

## بررسی مولکولی HCV با روش RT-PCR در بیماران بتا تالاسمی ماژور در بیمارستان هاجر شهر کرد

ناهید رئیسی<sup>۱</sup>، پوران رئیسی<sup>۲</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

تزریق مکرر خون در بیماران تالاسمی ماژور می‌تواند با خطر انتقال هپاتیت C همراه باشد. آمارهای متفاوتی در ایران از شیوع هپاتیت C در این بیماران بر اساس آزمایش‌های سرولوژیک گزارش شده است. این مطالعه با هدف تعیین شیوع آلودگی به HCV به روش سرولوژیک و مولکولی انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

در یک مطالعه توصیفی مقطعی از دی ماه ۸۳ تا شهریور ماه ۸۴، اطلاعات دموگرافیک ۹۱ بیمار تالاسمی ماژور بررسی و نمونه سرم آن‌ها از نظر آنتی‌بادی ضد HCV آزمایش شد. در افراد با آزمایش سرولوژیک مثبت، RNA ویروس با روش RT-PCR و ترانس آمینازهای کبدی (AST, ALT) اندازه‌گیری شد. یافته‌ها توسط آزمون‌های t و کای دو و نرم‌افزار SPSS ۱۱ تجزیه و تحلیل شدند.

#### یافته‌ها

از ۹۱ بیمار مورد بررسی، ۵۰ بیمار (۵۵٪) مؤنث، ۴۱ بیمار (۴۵٪) مذکر و متوسط سنی  $13/2 \pm 5/7$  سال بود. ۱۹ بیمار (۲۱٪)،  $17/77 - 25/82$  (CI ۹۵٪ = ۱۷/۷۷-۲۵/۸۲) anti-HCV مثبت بودند که تقریباً نصف آن‌ها (۴۷٪، n=۹) HCV-RNA مثبت و در ۹۸٪ آنزیم‌های کبدی بالا بود. سن بیماران anti-HCV مثبت نسبت به anti-HCV منفی بالاتر بود (p < ۰/۰۰۵).

#### نتیجه‌گیری

آزمایش‌های سرولوژی به تنهایی جهت تشخیص قطعی و فعال عفونت هپاتیت C در بیماران تالاسمی کافی نیست و آزمایش‌های مولکولی در این خصوص اهمیت بیشتری دارند.

**کلمات کلیدی:** تالاسمی، هپاتیت C، آنتی‌بادی‌های HCV، RT-PCR، ایران

تاریخ دریافت: ۱۹/ ۱/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۹/۱۰/۲۶

۱- مؤلف مسئول: فوق تخصص خون و آنکولوژی اطفال - دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اصفهان - بیمارستان الزهرا - صندوق پستی: ۸۷۱  
۲- PhD آمار و روش تحقیق - دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران - دانشکده مدیریت و اطلاع‌رسانی پزشکی

**مقدمه**

تالاسمی شایع‌ترین کم‌خونی ژنتیکی در جهان است و شیوع آن در ایران از ۴ تا ۱۰ درصد متفاوت می‌باشد (۱). امروزه با اعمال برنامه‌های پیشگیری، درصد افراد مبتلا کاهش یافته ولی هنوز به صفر نرسیده است. این افراد برای تداوم زندگی نیاز به دریافت مکرر خون دارند و نیاز سالیانه آن‌ها در ایران، ۱ میلیون کیسه خون برآورد شده است. گرچه تمامی این خون‌ها باید عاری از هر عفونتی باشند ولی علی‌رغم تمام توجهاتی که در تهیه خون سالم می‌شود، باز هم شیوع هپاتیت C در بیماران تالاسمی بالاست (۲).

آمارهای متفاوتی از شیوع هپاتیت C در بیماران تالاسمی ایران گزارش شده که اساس بیشتر این مطالعه‌ها آزمایش anti-HCV است. این شیوع در تهران ۲۴٪، گیلان ۲۵٪، شیراز ۲۷٪، یزد ۹/۴٪، شهرکرد ۲۳٪ و خوزستان ۲۸/۱٪ گزارش شده که در مقایسه با شیوع کلی آن در اهداکنندگان خون (۰/۹۷-۰/۵۰٪)، خیلی بالاتر می‌باشد (۵-۳). از آن جایی که عفونت مزمن HCV، خطراتی از جمله هپاتیت حاد (۷۰٪-۶۰٪)، سیروز (۲۰٪) و کارسینوم هپاتوسلولار (۵٪-۳٪) را به دنبال دارد، لازم است روش‌های دقیق‌تری علاوه بر آزمایش‌های غربالگری و بررسی anti-HCV، بر اساس آزمایش‌های مولکولی جهت تشخیص قطعی آلودگی در این بیماران به کار برده شود (۵). بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی شیوع HCV در بیماران تالاسمی شهرکرد از طریق آزمون‌های سرولوژیک و مولکولی انجام شد.

**مواد و روش‌ها**

در یک مطالعه توصیفی - مقطعی، ۹۱ بیمار تالاسمی ماژور بیمارستان هاجر شهرکرد، از دی ماه ۸۳ تا خرداد ۸۴ وارد مطالعه شدند که تعدادی از این بیماران قبل و تعدادی بعد از سال ۱۳۷۵ تزریق خون داشتند. بعد از اخذ رضایت کتبی از بیماران یا والدین آن‌ها، اطلاعات دموگرافیک شامل سن، جنس، تعداد دفعات و فاصله تزریق خون و سابقه قبلی هپاتیت از طریق بررسی پرونده‌های آن‌ها به دست آمد. از تمام بیماران هنگام مراجعه بعد از معاینه بالینی، ۳ سی‌سی خون گرفته شد و به آزمایشگاه ارسال گردید. در

آن جا سرم مربوطه جداسازی و جهت بررسی anti-HCV به آزمایشگاه مرکز انتقال خون استان فرستاده شد. در ابتدا تمام نمونه‌های سرمی به وسیله کیت اورتو Elisa - ۳ - HCV از نظر وجود anti-HCV آزمایش شدند و نتایج به صورت کیفی، مثبت یا منفی گزارش گردید. سپس نمونه‌های مثبت الایزا، برای شناسایی ژنوم ویروس با آزمون RT-PCR (با استفاده از کیت STR PTM ساخت شرکت سیناژن) مورد بررسی قرار گرفتند و هم‌چنین آنزیم‌های AST و ALT در آن‌ها (با کیت تشخیص کمی با روش فتومتریک شرکت پارس آزمون، کرج، ایران) اندازه‌گیری شد. داده‌های مربوطه با برنامه SPSS ۱۱ جمع‌آوری و با استفاده از آزمون‌های فراوانی، t-test و کای دو مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

**یافته‌ها**

از ۹۱ بیمار تالاسمی ماژور، ۴۱ بیمار (۴۵٪) مذکر و ۵۰ بیمار (۵۵٪) مؤنث (M:F ratio ۰/۸۲:۱) با متوسط سنی ۵/۷ ± ۱۳/۲ سال بودند. فاصله تزریق خون‌ها از ۴-۲ هفته یک بار متغیر بوده و تمام بیماران بیش از ده بار تزریق خون داشتند. در ۷۸٪ موارد کبد و در ۶۳/۶٪ موارد طحال بزرگ بود. تمام بیماران با خون‌های غربالگری شده از نظر هپاتیت C تحت تزریق قرار گرفته بودند. ۱۹ بیمار (۲۱٪)، ۲۵/۸-۱۷/۷ = ۹۵٪ anti-HCV (CI) مثبت گزارش شدند که ۹ نفر آن‌ها (۴۷٪) HCV-RNA مثبت بودند (جدول ۱).

در ۹۸٪ بیماران anti-HCV مثبت، میزان ALT ، U/L ۱۵۶-۱۶ (با mean ± SD : ۹۰ ± ۲۶) و میزان AST ، U/L ۱۵-۱۶۰ (با mean ± SD : ۹۶ ± ۱۹) بود (میزان نرمال ALT در زنان کمتر از ۳۱ U/L و در مردان کمتر از ۳۷ U/L و میزان نرمال AST در زنان کمتر از ۳۱ U/L و در مردان کمتر از ۴۱ U/L است).

جدول ۱: توزیع مبتلایان به HCV تایید شده با آزمایش تکمیلی RT-PCR

نتایج RT-PCR	تعداد	درصد
مثبت	۹	۴۷
منفی	۱۰	۵۳
جمع	۱۹	۱۰۰

در مطالعه اخیر تنها حدود نصف بیماران سرولوژی مثبت بر اساس روش RT-PCR ناقل قطعی HCV بودند و در مطالعه غفوریان نیز از ۵۸ بیمار مثبت، ۴۶ مورد (۷۹/۳٪) مبتلا به عفونت‌های فعال بیماری بودند، که این خود نشانگر آن است که تمامی افراد سرولوژی مثبت، فرم فعال بیماری را نداشته و بررسی‌های مولکولی جهت تشخیص قطعی و اهداف درمانی و پیشگیری این بیماران ضروری است (۴).

در مطالعه حاضر بر خلاف برخی مطالعه‌های دیگر که ابتلا به HCV را در جنس مؤنث بیشتر گزارش کرده‌اند، تفاوت معنی‌داری بین جنس و ابتلا به هپاتیت C یافت نشد و به نظر نمی‌رسد که ارتباط مشخصی بین جنس و ابتلا به HCV در بیماران تالاسمی وجود داشته باشد. اما بین افزایش سن و آلودگی به HCV ارتباط معنی‌دار بود و تمام افراد مبتلا، سن بالای ۱۰ سال داشتند که شاید به دلیل تکرر دفعات تزریق خون یا عدم اجرای برنامه‌های غربالگری قبل از سال ۱۳۷۵ باشد (۹، ۵).

ابتلا به هپاتیت C می‌تواند با خطر بالای آسیب سلول‌های پارانشیم کبد و افزایش آزمایش‌های کبدی همراه باشد و ۹۸٪ بیماران در این مطالعه نیز این افزایش را نشان دادند که این مورد با سایر مطالعه‌ها از جمله مطالعه لائوسومات و همکارانش در ایتالیا که به افزایش ALT در ۹۰٪ موارد اشاره کرده‌اند هم‌خوانی دارد (۱۰).

### نتیجه‌گیری

گرچه در غربالگری عفونت هپاتیت C، آزمایش‌های سرولوژیک بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند ولی جهت تعیین آلودگی قطعی و اهداف پیشگیری و درمانی آزمایش‌های مولکولی از اهمیت بیشتری برخوردار هستند.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از پرسنل بخش تالاسمی بیمارستان هاجر شهرکرد و خانم‌ها دکتر رویا حبیبیان و آمنه یگانگی، معاون پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و هم‌چنین پرسنل پایگاه انتقال خون شهرکرد که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند تشکر می‌نمایم.

بین جنس و anti-HCV مثبت ارتباط معنی‌داری یافت نشد ولی بین افزایش سن و مثبت بودن anti-HCV، ارتباط معنی‌دار بود ( $p < 0.005$ ) و تمام موارد anti-HCV مثبت سن بالای ۱۰ سال داشتند.

### بحث

تزریق‌های مکرر خون در بیماران تالاسمی ماژور گرچه عوارض آنمی در این بیماران را کاهش می‌دهد ولی آن‌ها را در معرض خطرهای جدی از جمله افزایش بار آهن و انتقال عفونت‌ها به خصوص هپاتیت C قرار می‌دهد (۵، ۲). امروزه با تلاش‌هایی که انجام شده، این خطرها کاهش یافته ولی هنوز هم می‌تواند یک مساله مهم در درمان این بیماران باشد.

در ایران از سال ۱۳۷۵ آزمایش غربالگری هپاتیت C بر اساس آزمایش anti-HCV بر روی کیسه‌های خون، اجباری شده اما هنوز هم امکان ابتلا به HCV در بیماران تالاسمی وجود دارد که میزان شیوع آن در مقایسه با جمعیت عمومی بالاتر است (۶).

در مطالعه حاضر نیز ۲۱ درصد بیماران anti-HCV مثبت بودند که در مقایسه با آمار قبلی همین مرکز تقریباً ثابت مانده بود، اما در مقایسه با شیوع ۰/۴٪ آن در اهداکنندگان خون سال ۱۳۸۵-۱۳۸۴ شهرکرد بالاتر می‌باشد (۷، ۳).

مطالعه‌های دیگری بعد از برنامه بیماری‌یابی HCV در ایران از جمله مطالعه آذرکیوان سال ۸۹ در تهران، مطالعه کریمی در شیراز و مطالعه غفوریان در خوزستان نیز شیوع بالای هپاتیت C در بیماران تالاسمی را نشان داده که این خود لزوم بازنگری در برنامه‌های پیشگیری از هپاتیت C را نشان می‌دهد (۸، ۶، ۴).

بیشتر مطالعه‌هایی که در ایران و سایر نواحی در مورد HCV انجام شده بر اساس آزمایش‌های سرولوژیک بوده و کمتر به بررسی‌های مولکولی که نشانگر قطعی فعالیت ویروس در بدن می‌باشند پرداخته شده، با وجودی که امروزه حساسیت آزمایش‌های سرولوژی در تشخیص HCV خیلی بالاست ولی به علت نتایج مثبت کاذب و یا ابتلا به هپاتیت C قبلی، این آزمایش‌ها نمی‌توانند به درستی ابتلای قطعی و فعال HCV را در بدن نشان دهند و انجام آزمایش‌های مولکولی برای این امر ضروری است.

## References :

- 1- Habibzadeh F, Yadollahie, Merat A, Haghshenas M. Thalassemia in Iran; an overview. Available from: URL: <http://razi.ams.ac.ir/aim/9811/contents9811.html>.
- 2- Alavian SM, Fallahian F. Epidemiology of hepatitis C in Iran and the world. Shiraz E-Medical journal 2009; 10(4).
- 3- Rezvan H, Abolghassemi S, Kafiabad SA. Transfusion-transmitted infections among multitransfused patients in Iran: a review. Transfus Med 2007; 17(6): 425-33.
- 4- Ghafourian Boroujerdnia M, Assareh zadegan MA, Zandian KM, Haghivizadeh Rodan M. Prevalence of hepatitis-C virus (HCV) among thalassemia patients in Khuzestan province, southwest Iran. Pak J Med Sci 2009; 25(1): 113-17.
- 5- Tamaddoni A, Mohammadzadeh I, Ziaei O. Seroprevalence of HCV antibody among patients with  $\beta$ -thalassemia major in Amirkola Thalassemia center, Iran. Iran J Allergy Asthma Immunol 2007; 6(1): 41.
- 6- Azarkeivan A, Hajibeigy B, Nasiritosi M, Amini Kafiabad S, Maghsudlu M, Shadman A, *et al.* Trace back of thalassemic patients with positive HCV markers to their donors in Adult Thalassemia Center. Sci J Iran Blood Transfus Org 2010; 7(3): 156-161.
- 7- Tajbakhsh E, Momtaz H, Dusti A, Yaghobi R, Momeni M. RT-PCR test in confirmed diagnosis of HCV in HCV-Ab positive cases. Sci J Iran Blood Transfus Org 2009; 5(4): 287-292.
- 8- Karimi M, ghavanini AA. Seroprevalence of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency virus antibodies among multitransfused thalassaemic children in shiraz, Iran. J Paediatr Child Health 2001; 37(6): 564-6.
- 9- Ansari H, kamani H, Sarjo AA. Prevalence of hepatitis C and related factors among beta-thalassemia major patients in southern Iran in 2005-2006. J Medical Sci 2007; 7(6): 997-1002.
- 10- Laosombat V, Pornpatkul M, Wongchanchailert M, Worachat K, Wiriyasatienku A. The prevalence of hepatitis C virus antibodies in thalassemic patients in the south of Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1977; 28(1): 149-53.

*Short Communication***Molecular evaluation of HCV infection by RT-PCR test in major beta thalassemia patients, Hajar Hospital of Shahrekord***Reisi N.<sup>1</sup>, Raeisi P.<sup>2</sup>*<sup>1</sup>*Pediatric Hematology and Oncology Department, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran*<sup>2</sup>*School of Management and Medical Information Services, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran***Abstract****Background and Objectives**

Multiple studies in Iran reported different prevalence rates for HCV infection in thalassemics but most studies were based on serologic tests not on molecular tests. The present study was carried out to determine the prevalence of HCV in thalassemics based on serologic and molecular tests.

**Materials and Methods**

A retrospective cross-sectional study was conducted on 91 thalassemic patients. Demographic data were obtained from patient files and serum specimens were tested by ELISA for anti-HCV antibody and by RT-PCR for HCV RNA. Serum aminotransferase (ALT&AST) were also tested.

**Results**

Out of 91 patients, 41 (45%) were male and 50 (55%) female, with mean age range of  $13.2 \pm 5.7$  years. The overall prevalence rate of anti-HCV was 21% (19.91, CI 95%=17.77-25.82). Nine of anti-HCV positive patients (9.19, 47%) were HCV RNA positive and 98% had high serum level of ALT and AST. Anti HCV- positive patients were significantly older than anti HCV-negative ones ( $p < 0.005$ ).

**Conclusions**

Because all anti HCV- positive patients do not have active HCV infection, it is suggested that before any decision to be made in case of seropositive thalassemic patients HCV infection be confirmed by RT- PCR and other precise tests.

**Key words:** Thalassemia, Hepatitis C, Anti-HCV Antibodies, RT-PCR, Iran  
*Sci J Iran Blood Transfus Org 2011; 8(1): 74-78*

Received: 13 Apr 2010

Accepted: 16 Jan 2011

*Correspondence:* Reisi N., MD. Pediatric Hematologist. Associate Professor of Isfahan University of Medical Sciences. Alzahra hospital.

P.O.Box: 871, Isfahan, Iran. Tel: (+98311) 6255555; Fax : (+98311) 6684510

E-mail: [reisi@med.mui.ac.ir](mailto:reisi@med.mui.ac.ir)