

بررسی HBV-DNA در افراد با شاخص سرولوژیکی HBsAg منفی به روش Real-TimePCR در ایلام

الهه غلامی پریزاد*، اسکندر غلامی پریزاد^۱، نورخدا صادقی فرد^۲، صفرعلی امیری اندی^۳

(۱) مرکز تحقیقات میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

(۲) گروه بهداشت عمومی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

(۳) گروه میکروپ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

(۴) گروه بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۲۱

تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۲۳

چکیده

مقدمه: عفونت ویروس هپاتیت B یکی از مشکلات بزرگ سلامت جهانی و شایع ترین عفونت ویروسی مزمن شناخته شده بشری است و در بیش از دو میلیارد نفر از مردم دنیا دیده شده است. بیش از سیصد و هفتاد میلیون نفر در سطح جهان حامل این ویروس هستند و در ایران حدود ۳ درصد حامل این ویروس می باشند. بیماران دارای اشکال مختلف بالینی بوده و در برخی افراد با وجود منفی بودن HbsAg آن ها، ممکن است در سرم خونشان ویروس هپاتیت B وجود داشته باشد. روش های مختلفی برای تشخیص هپاتیت B وجود دارد که روش الیزای HBsAg و روش های مولکولی کمی و کیفی، از آن جمله هستند. این مطالعه با هدف تعیین مقدار کپی HBV-DNA در سرم خون داوطلبان سالم در جامعه ایلام انجام شده است.

مواد و روش ها: این مطالعه مورد-شاهدی که در سال ۸۹-۸۸ به منظور بررسی وجود HBsAg به روش الیزای و تعیین مقدار کپی ویروس به روش Real-Time PCR در سرم ۷۰ نفر داوطلب سالم از نظر ابتلا به ویروس هپاتیت B که به دلایل مختلف به مراکز بهداشتی-درمانی شهر ایلام مراجعه و اعلام می کردند که تاکنون مبتلا به هپاتیت B نشده اند، به عنوان گروه مورد و مقایسه آن با سرم ۷۰ نفر بیمار مبتلا به هپاتیت B مزمن، به عنوان گروه شاهد در شهر ایلام به انجام رسید.

یافته های پژوهش: نتایج پژوهش نشان داد که ۷۰ نفر گروه شاهد (بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن) در تست الیزای HBsAg مثبت بودند. در گروه ۷۰ نفری مورد (داوطلبان سالم) ۲ نفر (۲/۸ درصد) HBsAg مثبت و ۶۸ نفر (۹۷/۲ درصد) HBsAg منفی گزارش شدند. هم چنین در گروه مورد (داوطلبان سالم) علاوه بر آن دو نفر که با استفاده از تست الیزا مثبت شدند، ۳ نفر دیگر (۴/۳ درصد) با وجود HBsAg منفی نیز به روش مولکولی کمی-Real Time PCR در سرم خود، حامل ویروس هپاتیت B بودند. در مجموع ۵ نفر (۷/۱ درصد) از ۷۰ نفر گروه مورد (داوطلبان سالم) حامل ویروس هپاتیت B بودند. میانگین کپی ویروس در سرم داوطلبان مثبت، 1.06×10^6 کپی در هر میلی لیتر از نمونه بود.

بحث و نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان داد که HBV-DNA می تواند در افراد با شاخص سرولوژیکی HBsAg منفی وجود داشته باشد. بر این اساس استفاده از تست الیزای HBsAg به تنهایی نمی تواند ملاک مطمئنی برای تشخیص هپاتیت B در افراد سالم و یا بیماران مزمن هپاتیت B باشد. لذا به کارگیری سایر روش های تشخیص بیماری از جمله روش های مولکولی می بایست مد نظر پزشکان محترم در عرصه سلامت قرار گیرد.

واژه های کلیدی: الیزا، هپاتیت B، سرم، HBsAg منفی، Real-TimePCR

*نویسنده مسئول: آزمایشگاه مرکز تحقیقات میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

Email: elahparizad@gmail.com

مقدمه

عفونت ویروس هپاتیت B یکی از مشکلات بزرگ سلامت جهانی است و در بیش از دو میلیارد نفر از مردم دنیا اتفاق افتاده است و هم اکنون بیش از سیصد و هفتاد میلیون نفر در سطح جهان حامل این ویروس هستند که اکثر آن ها در جنوب شرقی آسیا زندگی می کنند، (۱،۲،۳،۴،۵). از سیصد و هفتاد میلیون حامل HBV در سطح جهان ۳۰ میلیون نفر به علت سیروز کبدی و ۶۰ میلیون نفر به علت کارسینومای هپاتوسلولار فوت می نمایند، (۲،۳،۵). حاملین این ویروس در ایران به طور متوسط ۳-۲/۱۴ درصد می باشد. (۶،۷،۸)

در مطالعات متعدد که طی سال های ۲۰۰۴-۱۹۸۰ انجام شده است، با وجود منفی بودن HBsAg، حضور ویروس HBV با استفاده از روش های مولکولی در سرم افراد به تأیید رسیده است، (۹،۱۰،۱۱،۱۲). به نظر می رسد به دلیل وجود این عفونت برای قرن ها در بدن و به منظور فرار از سیستم ایمنی، ویروس جهش یافته و به شکل جدید ادامه حیات می دهد. یکی از معروف ترین جهش های HBV جهش در منطقه (pre core) ژن ویروس می باشد که در اثر آن ژن C قادر به تولید HBeAg نبوده و فقط HBeAg را تولید می کند. ابتلا به این نوع ویروس خصوصاً در کشورهای آسیایی و اروپای شرقی بیشتر گزارش شده است. (۱۳)

هپاتیت B مزمن با تظاهر HBsAg منفی در سرم، به دلیل جهش در ژن های مختلف ویروس به خصوص در ژن S ممکن است HBV قادر به تولید HBsAg نباشد و عفونت HBV بدون پادگن S معمولی مشاهده شود، (۱۴). این مطالعه با هدف تعیین مقدار کپی HBV-DNA در سرم خون افراد داوطلب سالم در جامعه ایلام انجام شده است.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع مورد-شاهدی بوده و از بهمن ۸۸ تا تیر ماه ۸۹ در شهر ایلام انجام شده است. ۲ گروه ۷۰ نفری با دامنه سنی ۴۰-۲۰ سال متشکل از بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن با گذشت حداقل یک سال از زمان تشخیص بیماری آن ها، به عنوان گروه شاهد و ۷۰ نفر از داوطلبانی که به دلایل مختلف به مراکز بهداشتی و درمانی مراجعه می کردند و اظهار می داشتند که تاکنون به بیماری هپاتیت B مبتلا نشده اند، به عنوان گروه مورد انتخاب شدند. این طرح در کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه مورد تأیید

قرار گرفته و از هر دو گروه رضایت نامه کتبی نیز اخذ شده است.

نمونه گیری

از دو گروه مورد و شاهد ۵ml نمونه خون وریدی گرفته شد و در درون لوله های استریل ریخته شد. پس از کدگذاری، نمونه های خون به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد و نمونه های سرم از خون جدا گردید و در لوله های استریل پلاستیکی و درب دار ذخیره گردید و در ۲۰-درجه فریز شد.

تست الیزا

برای هر دو گروه مورد (داوطلبان سالم) و مورد (بیماران CHBV) تست های سرولوژیکی HBsAg, HBeAg, Anti-HBe, Anti-HBc به روش الیزا انجام شد. کیت مورد استفاده Diaplus ساخت کشور اسپانیا بود که مراحل کار مطابق با دستورالعمل کیت انجام شد و نتایج با دستگاه الیزا ریدر خوانده شد.

استخراج DNA از سرم

برای انجام این تست مولکولی کمی که مشخص کننده حضور HBV-DNA و مقدار آن است، لازم بود تا ابتدا DNA ویروس از نمونه های سرم مورد (داوطلبان سالم) و کنترل (بیماران CHBV) جداگردد. بدین منظور از کیت مخصوص استخراج DNA ویروس هپاتیت B با نام تجاری QIAMP-DSP استفاده شد. اساس این کیت فیلترتیوب های سلیکاژلی است و تکرار شست و شو، دقیقاً بر مبنای دستورالعمل شرکت صورت گرفت که در نهایت ۱۵۰μl از DNA استخراج شده در انتهای لوله های اپندورف جمع گردید و به عنوان ذخیره در دمای ۲۰°C نگهداری شد. سپس برای تعیین صحت کیت استخراج، ۲ نمونه از DNA استخراج شده با استفاده از PCR کیفی مورد ارزیابی قرار گرفت. این کیت حاوی یک مستر شامل: Taq پلیمرراز، لودینگ بافر، dNTP و پرایمرهای فوروارد و ریورس به قرار زیر بود:

F: 5'-CACTCACCAACCTCTTGTC-3'
R: 5'-TGAAGTTCCGTCGAAGGT-3'

واکنش حرارتی اعمال شده به قرار زیر است:

National denaturation در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه ۱ بار تکرار، Denaturation در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، Annealing در دمای ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، Extention در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و Final extention در دمای ۷۲ درجه

۱ نفر مثبت (۱/۵ درصد) و ۶۹ نفر مابقی (۹۸/۵ درصد) منفی گردیدند.

در گروه شاهد (بیماران CHBV) ۳۷ نفر (۵۳ درصد) در Anti-HBe مثبت و ۲۲ نفر (۳۱/۳ درصد) در این تست منفی شدند. نتیجه همین تست در تمامی گروه ۷۰ نفری مورد (داوطلبان سالم) (۱۰۰ درصد) منفی گردید. در این بین ۱۱ نفر از گروه شاهد (بیماران CHBV) هم در تست Anti-HBe و هم در تست HBeAg منفی شدند. در تست Anti-HBc ۱۰۰ درصد افراد شاهد (بیماران CHBV)، و در گروه مورد تنها ۳ نفر (۴/۲ درصد) مثبت شدند. در بررسی وجود DNA در سرم هر دو گروه، نتایج حاصله به شرح زیر است:

در ۷۰ نفر از گروه شاهد (بیماران CHBV) ۶۹ نفر (۹۸/۵ درصد) دارای HBV-DNA بودند. سرم ۵ نفر (۷/۱ درصد) از گروه مورد (داوطلبان سالم) نیز حاوی HBV-DNA بود که مقدار کپی این ۵ نفر از گروه مورد به همراه نتیجه تست سرولوژیکی آن ها در جدول ۲ آورده شده است. میانگین مقدار کپی افراد داوطلب (مورد) HBV-DNA مثبت $1.0 \times 10^6 / 56$ و افراد بیمار (شاهد) 3.4×10^4 کپی در میلی لیتر بوده است. منحنی استاندارد و نمونه های سرم افراد داوطلب که حاوی HBV-DNA بوده اند ($R_2=1$) و ۹۵ درصد ($E=$) در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است.

ساعتی گراد به مدت ۷ ثانیه، که از مرحله دوم (Denaturation) تا مرحله آخر (Final extention) ۴۲ بار این سیکل تکرار می شود.

Real-Time PCR

پس از استخراج DNA، برای انجام Real-Time PCR از کیت تجاری مخصوص HBV با نام ajz-Roboscreen ساخت کشور آلمان استفاده شد. ترکیب محلول ها، Taq پلیمرز، بافر و واکنش حرارتی اعمال شده کاملاً منطبق با دستور شرکت سازنده کیت بود. اساس این کیت Absolut quantification و تغییرات استاندارد از 10^1 تا 10^8 کپی در هر میلی لیتر از نمونه بوده است. این تست مولکولی بر روی هر دو گروه مورد (داوطلبان سالم) و شاهد (بیماران CHBV) انجام پذیرفت.

یافته های پژوهش

نتایج تست الیزا HBsAg برای هر ۷۰ نفر از گروه شاهد (بیماران CHBV) و مورد در جدول ۱ آمده است.

نتایج تست الیزای HBeAg در گروه ۷۰ نفری شاهد (بیماران CHBV) به قرار زیر است:

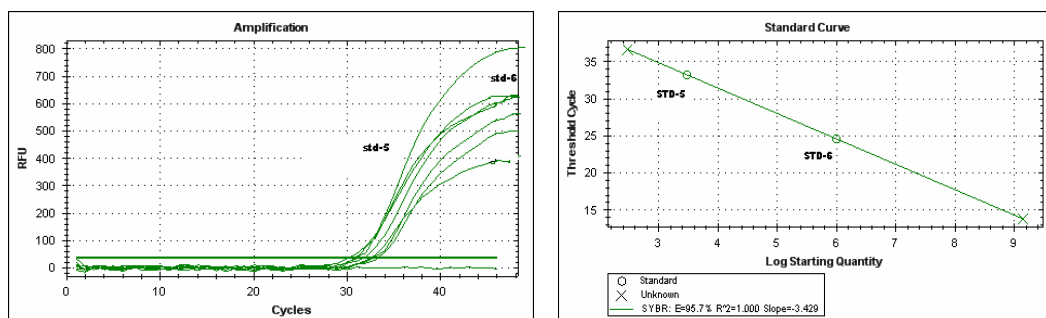
۲۲ نفر (۳۱/۳ درصد) مثبت و ۳۷ نفر (۵۳ درصد) منفی گردید. در تست HBeAg از ۷۰ نفر گروه مورد (داوطلبان)

جدول ۱. نتایج تست HBsAg دو گروه مورد (داوطلبان سالم) و شاهد (بیماران CHBV) با استفاده از تست الیزا

گروه	تست سرولوژی		HBsAg مثبت		HBsAg منفی	
	تعداد کل	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
کنترل (بیمار CHBV)	۷۰	۷۰	۱۰۰	۰	۰	
مورد (داوطلب سالم)	۷۰	۲	۲/۸	۶۸	۹۷/۲	

جدول ۲. مقایسه مقدار کپی HBV-DNA با توجه به تست سرولوژیکی در سرم ۵ نفر از گروه مورد (داوطلبان سالم)

شماره داوطلب	HBV-DNA کپی در میلی لیتر	HBsAg	HBeAg	Anti-HBe	Anti-HBc
۱	5.49×10^5	-	-	-	-
۲	2.16×10^3	-	-	-	+
۳	7.26×10^6	-	+	-	-
۴	8.19×10^3	+	-	-	+
۵	1.28×10^3	+	-	-	+



نمودار ۱. منحنی استاندارد و نمونه سرم ۵ نفر از گروه مورد (داوطلبان سالم) که حاوی HBV-DNA بود.

بحث و نتیجه گیری

به طور کلی حضور HBsAg به تکثیر ویروس و سایر اجزای عفونت زا در چرخه خون و نیز بر حضور مواد ژنومیک ویروسی در کبد دلالت و اشاره دارد. مطالعات گذشته نشان می دهند که تکثیر ویروس با HBsAg و بیماری های کبدی بدون علامت مرتبط است (۱۵،۱۶). مطالعات متعدد نشان می دهند که آنتی ژن e هیپاتیت B در بیماران، خطر پیشرفت بیماری و عفونت زایی را افزایش می دهد که در نهایت منجر به هیپاتیت فعال، مزمن پیشرفته، سیروز کبد و سرطان سلول های کبدی (HCC) خواهد شد (۱۶،۱۷،۱۸،۱۹). حاملین مزمن بدون علامت با HBeAg منفی و با بار ویروسی کمتر از 10^5 ژنوم بر میلی لیتر و آلانین ترانسفراز کبدی نرمال، در حالتی نسبتاً پایدار قرار می گیرند که پیشرفت پاتولوژیکی و کلینیکی بیماری در آن ها کمتر است (۲۰).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر افراد سالم جامعه (مورد) ۷/۱ درصد و افراد بیمار ۹۸/۶ درصد دارای HBV-DNA در سرم خود بودند و میانگین کپی در میلی لیتر سرم آن ها با استفاده از روش Real time PCR به ترتیب $10^6 \times 1/56$ و $10^4 \times 3/04$ کپی در میلی لیتر بوده است. براساس گزارش افراد داوطلب که داده های آن ها از طریق پرسش نامه جمع آوری گردید، این افراد تاکنون به هیچ وجه مبتلا به هیپاتیت B نشده اند، ولی نتایج مولکولی Real-Time PCR در این مطالعه مشخص نمود که ۷/۱ درصد داوطلبان در سرم خود حاوی HBV-DNA هستند. وجود HBV-DNA در سرم برخی از داوطلبان مورد بررسی در این مطالعه که HBsAg منفی بودند، ممکن است به دلیل ابتلای بدون علامت بالینی و یا ضعیف آن ها به هیپاتیت B در گذشته باشد که به هنگام بررسی،

این افراد در فاز پنهان بیماری (Occult) بوده اند که خود از آن بی اطلاع بودند.

عفونت هیپاتیت B با ویژگی HBsAg منفی (Occult) سال هاست به عنوان یک موضوع چالش برانگیز ویروس هیپاتیت B بوده است (۲۱). که از سال ۲۰۰۴-۱۹۸۰ بیش از هفتاد مقاله در این خصوص به چاپ رسیده است (۱۲). در این فاز از بیماری مقدار کپی ویروس معمولاً کمتر از 10^4 کپی در میلی لیتر است که در مقایسه با فاز ناقل مزمن با HBsAg مثبت که معمولاً 10^{11} - 10^8 کپی در میلی لیتر می باشد، تفاوت آشکار دارد (۲۱،۲۲).

شیوع هیپاتیت B در فاز پنهان (Occult) که به روش مولکولی انجام گرفت در ایتالیا ۱۱ درصد، در هنگ کنگ ۶/۹ درصد و در انگلیس صفر بوده است (۲۲،۲۳). مطالعه Fukuda در سال ۱۹۹۶ در ژاپن که بر روی دو گروه از جمعیت افراد سالم و الکلیسم ها انجام گرفت، شیوع هیپاتیت B با HBsAg منفی (Occult) به ترتیب صفر و ۲۰ درصد بوده است (۲۵،۲۴).

در مطالعه حاضر یک نفر از شاهدان (بیماران CHBV) که HBV-DNA از سرم وی جدا نشد، مشخص گردید که فرد مورد نظر بیش از ۶ ماه از داروی ضد ویروسی هیپاتیت B استفاده نموده است، به علاوه ممکن است اختلال در روند مراحل آزمایشگاهی علت این نتیجه بوده باشد.

بر اساس یک مطالعه که بر روی ۲۵۰ هزار نفر داوطلب در تهران صورت گرفت، مشخص گردید که ۳/۶ درصد از مردان و ۱/۶ درصد زنان تهرانی حامل HBsAg می باشند. ۸۴ درصد بیماران ایرانی مبتلا به سیروز کبدی با تظاهر HBcAb و ۵۱ درصد HBsAg در

HBV-DNA بودند و میانگین کپی در این مطالعه $10^6 \times 3/73$ در هر میلی لیتر از سرم بود. (۲۷)
 تشخیص حاملین سالم جامعه صرفاً با استفاده از تست غربالگری HBsAg نمی تواند نشان گر مناسبی برای محک زدن واقعی درصد حاملین سالم آن جامعه که اهمیت بالایی در انتقال و انتشار بیماری دارند، باشد. به همین دلیل استفاده از یک روش مولکولی مانند PCR کیفی و کمی (Real Time PCR) می بایست به عنوان تست تاییدی یا تکمیلی توسط همکاران پزشکی در دستور کار آزمایشگاهی آنان، لحاظ شود.

سپاس گزاری

این پروژه تحقیقاتی از محل اعتبارات پژوهشی حوزه معاونت آموزش، فن آوری و تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی ایلام تأمین شده است که بدین وسیله از کلیه همکاران این بخش کمال قدردانی را به عمل می آوریم.

سرم خود بودند. هم چنین ۷۲ درصد از مبتلایان به کارسینوما هیپاتوسلولار کبدی دارای HbCAb و ۴۶ درصد دارای HBsAg در سرم خود بوده اند. (۱۳)
 در مطالعه Kalcioğlu و همکاران در سال ۲۰۰۴ که بر روی ۴۰ بیمار مزمن هپاتیت B انجام شد، نشان داد که ۱۰۰ درصد این بیماران هم در تست الیزا و هم در روش مولکولی Real-Time PCR حامل ویروس در سرم خود بودند و میانگین کپی در سرم آن ها $10^7 \times 2/4$ در هر میلی لیتر از نمونه بود، (۲۶). در صورتی که در مطالعه حاضر با وجود مثبت شدن تست الیزای HBsAg سرم هر ۷۰ نفر گروه شاهد (بیمار مزمن هپاتیت B) ۹۸/۶ درصد با روش مولکولی کمی Real-Time PCR، کپی ویروس داشتند. علت این امر می تواند در استفاده از نوع کیت های PCR کمی و یا دقت فرد آزمایش گر باشد.

در مطالعه Eui Kung و همکاران در سال ۲۰۰۸ که بر روی ۳۰ بیمار انجام شد همگی در سرم خود حامل

References

- 1-Shi Y, Shi CH. Molecular characteristic and stage of chronic hepatitis B. J World Gastroenterol 2009;15(25):3099-105.
- 2-Lee WM. Hepatitis B virus infection. N Engl J Med 1997;337:1733-45.
- 3-Mac Mahon BJ. Epidemiology and natural history of hepatitis B. Semin Liver Dis 2005;25(1):3-8.
- 4-Macin-Borgini M, Fontain H, Brechot C, Pol S, Michel ML. Immunology of a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers. Vaccine 2006;24:4482-9.
- 5-Taber E, Gerety RJ. Possible role of immune response to hepatitis B core antigen in protection against hepatitis infection. Lancet 1984;1:172.
- 6-Alavian SM, Hajarizadeh B, Ahmadzad ASL, Kabiri A, Bagheri-Lankarani K. Hepatitis B virus infection in Iran: a system review. Hepat 2008;8(4):281-94.
- 7-Mahboobi N, Agha-Hossieni F, Mahboobi N, Safari S, Alavian SM. Hepatitis B virus infection in dentistry: a forgotten topic. J of Viral Hepat 2010;17:307-16.
- 8-Pouatchi H, Mohammadnejad M, Malekzadeh R. Hepatitis B infection in Iran. Iranian J of Clin Infec Dis 2007;2(1):37-51.
- 9-Lau ST-Y, Everhart J, Kliner DE, Park Y, Vergalla J, Schmid P, et al. Long-Term follow-up of with chron, hepatitis B treated with interferon with interferon alpha. J Gastroenterol 1997;113:16610-67.
- 10-Greberding JL. Management of occupational exposure to blood-born viruses. N Engle J Med 1995;332:1092-3.
- 11-Levy P, Marcellin P. Clinical course of spontaneous reactivation of HBV infection in patients with chronic hepatitis B. Hepatol 1990;12:570-4.
- 12-Brechot C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. Gastrointrol 2004; 127(5supply1):56-61.
- 13-Azizi F, Janqurbani M, Hatami H. Epidemilgy and control common disease in Iran. Khodravi Pub, 2004;714-41.
- 14-Lok ASF, Lai CC, Chung HT, Lau JY, Leung EK, Wong LS. Morbidity and mortality from chronic HBV in family members of patients with HBV chronic hepatitis. Hepatol 1991;13:834-7.
- 15-Scotto J, Hadchoiel M, Hery C, Yvart J, Tiollais P, Brechot C. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique: comparison with result for other viral markers. Hepatol 1983;3:279-84.

- 16-Zyzik E, Gerlich WH, UY A, Kochel H, Thomssen R. Assay of hepatitis B virus genome titers in sera of infected subject. *Eur J Clin Microbiol* 1986; 5: 330-5.
- 17-Tang B, Kruger WD, Chen G. Hepatitis viremia is associated with increased risk hepatocellular carcinoma in chronic carriers. *J Med Virol* 2004;72:35-40
- 18-Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CI, You SI, Chen CJ. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006;130:678-86.
- 19-Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection, natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004;1; 350.
- 20-Sharifi Z, Yari F, Samiee SH, Mahmoodian Shoshtari M. [Cloning of hepatitis B Virus surface antigen (HBsAg) encoded gene in E.Coli]. *J of Iran Med University* 2007;56:109-16. (Persian)
- 21-Chemin I, Trepo C. Clinical impact of occult HBV. *J of Clinical Virol* 2005; 34(1);15-21.
- 22-Chaudhuri V, Tayal R, Nayak B, Acharya SK, Panda SK. Occult hepatitis virus infection in chronic liver disease: full-length genome and analysis of mutant surface promoter. *Gastroenterol* 2004; 127(5):1356-71.
- 23-Lo YM, Lo ES, Mehal WZ. Geographical variation in prevalence of hepatitis B virus DNA in HBsAg negative patients. *J Clin* 1993;46:304-8.
- 24-Fukuda R, Ishimora N, Kushiyama Y. Hepatitis B virus with x gen mutation is associated with the majority of serologically "silent" non-b, non-c chronic hepatitis. *Microbiol Immunol* 1996;40:481-88.
- 25-Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002;2:479-86.
- 26-Kalcioglu TM, Durmaz P, Ozturan O, Bayinder Y, Drikel S. Does cerumen have a risk for transmission of hepatitis B? *J Am Laryngol* 2004;114:577-80.
- 27-Goh EK, Son BH, Kong SK, Chon KM, Cho KS. Analysis of hepatitis B virus in the cerumen and otorrhea of chronic HBV - infected patient. *J Otolaryngol & Neurology* 2000;29:929-32.



Investigation of HBV-DNA in Individuals With Seronegative HBsAg Indicators By Real-Time PCR in Ilam(western Iran)

Gholami parizad E^{1*}, Gholami Parizad ES², Sadeghifard N³, Amiri Andi S⁴

(Received: 13 May, 2010 Accepted: 12 Mar, 2011)

Abstract

Introduction: Hepatitis B infection is a considerable health problem throughout the world involving more than 2 billions people. It is estimated that over 370 million people are chronic carriers of HBV worldwide. It has been revealed that 3% of Iranian populations are chronic carriers of this virus. The current study aimed to detect HBV DNA amongst some HBsAg negative individuals as chronic carriers of HBV using sera as a source of infection in Ilam(western Iran).

Materials & Methods: In a case-control study, the viral DNA in sera of 70 healthy individuals as case group was evaluated during 2009-10. Samples were tested using PCR and Real Time PCR while for some immunological evaluations Elisa was performed using sera of healthy people.

Findings: All the 70 individuals (100%) in control group were HBsAg positive, while in the case group, only 2 people (2.8%) were HBsAg positive. 3 individuals in case group were positive using PCR and Real

Time PCR, indicating that about 7% of healthy individuals were chronic carriers of HBV.

Discussion & Conclusion: It was concluded that seronegative HBsAg indicating individuals can be carriers of HBV-DNA. Therefore, ELISA test of HBsAg can not alone be a reliable approach to diagnose hepatitis B in people without or with chronic H.B. As a result, Medical doctors are expected to apply other diagnostic methods such as molecular approaches to detect the disease.

Keywords: hepatitis B ,negative HBsAg, serum, ELISA, Real-Time PCR

1.Microbiological Research Center Lab., Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran(corresponding author)

2.Dept of Public Health, Health School, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

3.Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

4.Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran