تحقیقی

دارای رتبه علمی - پژوهشی از کمیسیون
نشریات علوم پزشکی کشور

هپاتیت B نهفته در بیماران تحت همودیالیز مزمن در بیمارستان پنجم آذر گرگان

عبدالله عباسی
دانشیار عفونی، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی دانشگاه علوم پزشکی گلستان

رامین تاجبخش
فوق تخصص نفرولوژی، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی دانشگاه علوم پزشکی گلستان

مریم کبوتری
پزشک عمومی، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی دانشگاه علوم پزشکی گلستان

ساره ژند
کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی دانشگاه علوم پزشکی گلستان

علیجان تبرائی
استادیار ویروس شناسی، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی دانشگاه علوم پزشکی گلستان

نویسنده مسئول: علیجان تبرایی

تلفن : 09112733221

پست الکترونیک: alijant@yahoo.com

آدرس : گلستان،گرگان، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پزشکی،گروه میکروبیولوژی

وصول مقاله: 90/12/13
اصلاح نهایی: 91/1/23
پذیرش مقاله:91/2/4

چکیده

زمینه و هدف *: عفونت با ویروس هپاتیت B یک معضل بزرگ بهداشتی در سراسر جهان است. فرم مزمن و مخفی عفونت هپاتیت B در بیماران همودیالیزی در کشورهای در حال توسعه همچنان بالا است. هپاتیت B نهفته به معنی حضور DNA ویروس هپاتیت B در سرم در غیاب تشخیص آنتی ژن سطحی این ویروس می باشد. هدف از این مطالعه بررسی شیوع عفونت نهفته هپاتیت B در بیماران تحت همودیالیز می باشد که دارای ریسک بالاتری جهت ابتلا به این عفونت هستند.*

روش بررسی: *مطالعه بر روی 100 بیمار دیالیزی که حد اقل هفته ای دو نوبت در بیمارستان پنجم آذر گرگان دیالیز شده و به روش سرشماری انتخاب شده بودند، انجام شد. تمامی بیماران واکسیناسیون کامل علیه HBV را دریافت کرده و در سه ماهه اخیر HBsAg منفی بودند. سپس 10cc نمونه پلاسما بیماران، به منظور جداسازی و شناسایی HBVDNA با استفاده از روش PCR کیفی به آزمایشگاه ارسال شد.*

یافته‌ها*: 48% از بیماران مذکر و 52% آن ها مؤنث بودند متوسط سن بیماران 54/60 سال بوده و به طور متوسط 48 ماه تحت همودیالیز قرار داشتند. در بین تمامی 100 بیمار همودیالیزی که مورد مطالعه قرار گرفتند و HBsAg منفی بودند، موردی از DNA ویروس هپاتیت B یافت نشد و میزان هپاتیت B نهفته در این افراد صفر درصد می باشد.*

نتیجه گیری*: نتایج بیانگر عدم وجود هپاتیت B نهفته در افراد تحت همودیالیز شهر گرگان و هم راستا با برخی مطالعات بوده واین امر با توجه به واکسیناسیون کامل بیماران تحت همودیالیز علیه HBV قابل توجیه می باشد.*

واژه های کلیدی *هپاتیت B نهفته، همودیالیز، HBsAg، گرگان*

آدرس مقاله:
عباسی ع، تاجبخش ر، کبوتری م، ژند س، تبرائی ع" هپاتیت B نهفته در بیماران تحت همودیالیز مزمن در بیمارستان پنجم آذر گرگان ". مجله علوم آزمایشگاهی بهار و تابستان ، 1391دوره ششم(شماره1) :12-7

مقدمه

عفونت هپاتیت B مخفی یا نهفته با حضور DNA ویروس و عدم حضور HBsAg در سرم افراد شناسایی می شود که با حضور یا عدم حضور مارکرهای سرولوژیک عفونت قبلی (آنتی HBc و یا آنتی HBs) همراه می باشد. به طور کلی حدود 20% از اشخاص مبتلا به هپاتیت B مخفی برای تمامی مارکر های سرولوژیکی منفی بوده و 80% آن ها برای مارکرهای سرولوژیکی عفونت های قبلی منفی می باشند. بیشتر مطالعات نشان داده اند که هپاتیت B مخفی معمولاً با میزان کم DNA ویروس هپاتیت B مرتبط است(1). هپاتیت B مخفی ممکن است پیشرفت فیبروز کبدی را سرعت داده و ریسک سرطان کبد را افزایش دهد (2). همچنین فاکتور مهمی جهت انتقال هپاتیت B در بخش همودیالیز می باشد. لذا در این جمعیت ها جداسازی DNA این ویروس علاوه بر سنجش HBsAg مورد تاکید قرار گرفته است. مطالعات مختلفی که شیوع هپاتیت B نهفته را در بیماران همودیالیزی بررسی کرده است، میزان آن را بین 0 تا 58% متفاوت گزارش کرده اند که این تفاوت می تواند تابعی از نحوه نمونه گیری، حساسیت و اختصاصیت تستها، میزان واکسیناسیون، مراقبت بهداشتی و ماشین همودیالیز اختصاصی برای بیماران باشد (3،4). واکسیناسیون افراد مستعد و کارمندان، جلوگیری از مصرف مجدد دیالیز، اختصاص دادن اتاق دیالیز و نیز کارمند و ماشین ویژه برای افراد عفونی، همگی از عوامل محدود کننده انتقال عفونتHBV در واحدهای دیالیز محسوب می شود. اگر چه در این میان تنها واکسیناسیون بیماران و کارمندان مستعد، تأثیر در محدود کردن انتقال عفونت مخفی هپاتیت B خواهد داشت(3). اگرچه علت اصلی عفونت هپاتیت B مخفی شناخته نشده است، نشان داده شده که وضعیت عفونت مخفی هپاتیت B می تواند با موتانت های ویروسی که توسط سنجش های رایج برای شناسایی آنتی ژن سطحی شناسایی نمی شوند در ارتباط باشد و نیز هپاتیت مخفی می تواند به علت سرکوب رونویسی ویروسی، بیان ژنی و ترشح ویروسی باشد. هپاتیت B نهفته می تواند به علت آلودگی با ویروس های موتاسیون یافته ای باشد که با روش های تشخیص ملکولی رایج شناسایی نمی شوند(5). در بروز هپاتیت B مخفی به طور کلی فعالیت سیستم ایمنی با سرکوب فعالیت ویروس و فاکتورهای اپی ژنتیک، نقش اساسی دارند. موارد متعددی برای علت حضور DNA ویروس در غیابHBsAg ارائه شده است که شامل: اینتگره شدن DNA ویروس در کروموزوم میزبان، موتاسیون در MHR ژن S، دوره window به دنبال عفونت حاد، همراهی با عفونت HCV ، سرکوب ایمنی، ضعف آزمایشگاه درتشخیص HBsAg و تشکیل کمپلکس های ایمنی می باشد که باعث مخفی شدن HBsAg می شود(6). نتایج اخیر منتشر شده در منطقه گلستان نشان داد که موتاسیون های P120S، R122K، M133I، S143L، G145R که به عنوان موتاسیون های فرار ایمنی در ناحیه S این ویروس شناسایی می شوند و موجب شکست آزمون های تشخیصی HBsAg در افراد مبتلا به هپاتیت B می شوند وجود دارد(7). هدف از این مطالعه بررسی وضعیت عفونت نهفته هپاتیت B در بیماران تحت همودیالیز شهر گرگان می باشد.

روش بررسی

100بیمار دیالیزی که حد اقل هفته ای دو نوبت در بیمارستان پنجم آذر گرگان همودیالیز می شدند به روش سرشماری انتخاب شده و وارد مطالعه شدند. تمام بیماران در سه ماهه اخیر تست HBsAg منفی داشتند. تمامی افراد ذکر شده تحت واکسیناسیون کامل علیه HBV قرار گرفته بودند. مقدار10cc نمونه ی خون از بیماران تهیه گردید.

و به لوله های حاوی ماده ضدانعقاد EDTA منتقل گردید. پلاسما از نمونه خون جدا و در فریزر دمای منهای20درجه ی سانتی گراد تا زمان استخراج اسید نوکلئیک نگه داری شد. اطلاعات دموگرافیک و بالینی از پرونده بیماران استخراج و به همراه سایر نتایج حاصل از آزمایشات در نرم افزار spss 16 وارد شد.

برای استخراج اسید نوکلئیک (DNA) از کیت تجارتی Qiagen استفاده شد و DNA ویروس از µl 200 نمونه پلاسما با استفاده از کیت استخراج اسید نوکلئیک طبق دستورالعمل تخلیص گردید. DNA حاصل بلافاصله جهت انجام PCR استفاده گردید و مقادیر باقی مانده جهت تائید یا تکرار آزمایشات در منهای 20 درجه سانتی گراد نگه داری شد.

پرایمر های اختصاصی مورد استفاده شامل پرایمرهای زیر بود که توسط نرم افزار BLAST بررسی شده و سکانس انتخابی تایید شد. توالی پرایمری انتخاب شده 100% مکمل ناحیه ای از ژن S ویروس هپاتیت B می باشد. ناحیه تکثیری دربرگیرنده دترمینانت a و اپی توپ های ایمنی هومورال و سلولی و ناحیه تعیین کننده ژنوتیپ و ساب ژنوتیپ ویروس می باشد. (8):

5' CTA GAC TCG TGG TGG ACT TCT C 3' (Forward) 250-272

5' AAG CCA NAC ART GGG GGA AAGC 3 '(Reverse) 732-709

با استفاده از پرایمرهای فوق، قطعه 482 جفت بازی از ژن S طبق روش زیر PCR گردید. محتویات واکنش شامل:(2/5 mM)MgCl2، 1x PCR buffer ، (0/1mM) dNTP، (0/2 pmol/µl)پرایمرهای (Forward,Reverse)، آنزیم Taq DNA پلی مراز(2/5 U) و 200 ng DNA که توسط آب مقطر استریل به حجم نهایی 50 µl برای انجام PCR رسید.

مراحل PCR ، شامل 30 سیکل بود که مراحل مختلف آن، دما و زمان لازم برای انجام آن در جدول شماره 1 نشان داده شده است.

سپس محصول PCR در ژل آگارز 1/5% الکتروفورز شده و با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی و با دستگاه Gel Doc مشاهده شد. در تمام آزمون های PCR از آب مقطر به عنوان کنترل منفی واز یک نمونه بیمار که با روش Real-Time PCR بار ویروسی بالایی داشت، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

یافته ها

سن متوسط بیماران 54 سال بوده و از بیماران 48% آن ها مذکر و 52% آن ها مؤنث بودند. به طور متوسط بیماران به مدت 48 ماه تحت همودیالیز قرار گرفته بودند که کمترین آن ها 1 ماه و بیشترین آن ها 333 ماه بود. تمامی 100 بیمار ، HBsAg منفی بوده و نتایج PCR نیز در آنان منفی گزارش شد و در تمامی افراد HBsAg منفی، HBV-DNA یافت نشد و میزان هپاتیت B نهفته در بین افرادHBsAg منفی که تحت همودیالیز قرار گرفتند 0% گزارش شد. جدول شماره 2 بیانگر اطلاعات دموگرافیک و بالینی بیماران تحت همودیالیز گرگان می باشد.

جدول شماره1 - پروتکل دمایی و زمانی PCR برای تکثیر ناحیه ای از ژن S ویروس هپاتیت B

نام مرحله	دما (°C)	زمان
Primary Denaturation	94	**5 دقیقه**
Denaturation	94	**20 ثانیه**
Annealing	60	**30 ثانیه**
Extention	72	**40 ثانیه**
Final extention	72	**5 دقیقه**

جدول شماره 2: توزیع فراوانی بیماران دیالیزی شهر گرگان بر مبنای سن، جنس و سابقه دیالیز

		HBV-DNA منفی(%)
سن	(10-20)	(4%)
	(21-30)	(5%)
	(31-40)	(7%)
	(41-50)	(17%)
	(51-60)	(36%)
	(61-70)	(14%)
	(71-90)	(17%)
جنس	(مرد)	(48%)
	(زن)	(52%)
مدت زمان دیالیز(ماه)	(1-40)	(60%)
	(41-80)	(24%)
	(81-120)	(9%)
	(121-333)	(7%)

بحث

در این مطالعه موردی از هپاتیت B مخفی در افراد مورد بررسی که تحت همودیالیز بوده و علیه هپاتیت B واکسینه شده بودند با به کارگیری روش PCR یافت نشد. مطالعات مختلف شیوع هپاتیت B نهفته را در بیماران همودیالیزی بین 0 تا 58% متفاوت گزارش کرده اند که این تفاوت می تواند تابعی از نحوه نمونه گیری، حساسیت و اختصاصیت تست ها، میزان واکسیناسیون، مراقبت بهداشتی و تخصیص ماشین همودیالیز اختصاصی برای بیماران باشد (3،4).

یافته ما با نتایج به دست آمده از مطالعه Fabrizi و Jardim که شیوع هپاتیتB مخفی را در افراد تحت همودیالیز ایتالیایی و برزیلی 0% گزارش نموده اند و روش به کار گرفته شده برای شناسایی نیز PCR می باشد، هم خوانی و مشابهت دارد (9،10). در نقطه مقابل نیز موارد متعددی از جداسازی DNA ویروس در دیالیزی های HBsAg منفی به میزان کم تا 50% گزارش گردیده است.

تفاوت در شیوع عفونت هپاتیت B مخفی را در مطالعات مختلف می توان به عوامل مختلفی از جمله حساسیت در روش شناسایی ژنوم ویروس نسبت داد(5). اگرچه حساسیت روش Real-time PCR نسبت به روش های معمول PCR بالاتر می باشد و بیشتر مطالعات نیز نشان داده اند که هپاتیت B مخفی معمولاً با میزان کم DNA ویروس هپاتیت B مرتبط است(1) لیکن نتایج متفاوتی در استفاده از تکنیک مذکور نیز گزارش گردیده است. به طوری که نتایج حاصل از Altindis در ترکیه بر روی بیماران همودیالیزی HBsAg منفی با استفاده از روش Real-Time PCR ، شیوع 12/4% HBV DNA را نشان داده است (11) در حالی که در مطالعه Gwak با روش Real-Time PCR شیوع هپاتیت B نهفته صفر بوده است(12). به نظر می رسد که علیرغم حساسیت بالای روش مذکور نسبت به تکنیک PCR ضمن بیان تشابه نتایج آن با مطالعه حاضر، نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه، بخصوص به صورت مقایسه ای وجود دارد.

تفاوت در نوع نمونه در دسترس نیز می تواند به عنوان عامل دیگر در تفاوت شیوع هپاتیت B مخفی باشد(5). Oesterreicher شیوع هپاتیت B مخفی را در سلول های تک هسته ای خون محیطی افراد تحت همودیالیز 8/9% و در سرم این افراد 0% گزارش کرده است که نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج مطالعه ما هم خوانی دارد و این امر می تواند به دلیل

استفاده از سرم در هر دو مورد باشد (13).

شاید بتوان گفت که یکی از مهمترین علل تفاوت در نتایج شیوع هپاتیت B نهفته واکسیناسیون و یا عدم واکسیناسیون در افراد تحت همودیالیز باشد(5). کاظمی عرب آبادی در رفسنجان نشان داد که حدود1/54 درصد از کل نمونه های HBsAg منفی،HBV-DNA مثبت بودندکه متفاوت از یافته های این مطالعه بوده و البته شاید بتوان این مورد را به عدم واکسیناسیون این نمونه ها نسبت داد(14). مطالعه Ismail بر روی بیماران دیالیزی مصری که هیچ یک از آن ها واکسیناسیون علیه HBV را دریافت نکرده اند نشان داد که به طور متوسط در 5/2٪ این افراد HBV-DNA یافت شد که متفاوت از نتایج مطالعه ما می باشد و شاید دریافت واکسن عامل اصلی عدم بروز هپاتیت B مخفی در افراد بررسی ما باشد (5). مطالعه Siagris نشان داد که در 20/4% افرادی که واکسیناسیون کامل را دریافت نکرده و تیتر مناسب آنتی بادی های سرمی علیه آنتی ژن سطحی در آنها مشاهده نشده بود، HBV-DNA وجود داشت که می تواند تاکیدی بر نقش موثر واکسیناسیون کامل باشد(15). در مقابل مطالعه Goral بر روی 50 بیمار تحت همودیالیز HBsAg منفی که تنها 57/1٪ آنان در طول زندگی خود واکسیناسیون علیه HBV را دریافت کرده اند شیوع هپاتیت مخفی 0٪ را گزارش نمود که علیرغم تفاوت در پوشش واکسیناسیون افراد تحت مطالعه ما با نتایج این مطالعه همخوانی دارد(3).

عامل دیگری که در شناسائی هپاتیت B مخفی مطرح می باشد موتاسیون های فرار ایمنی در ژن S ویروس است که آنتی ژنیسیته HBsAg را تغییر داده، باعث شکست آزمایشات تشخیصی شناسایی HBsAg و فرار ویروس از دست سیستم ایمنی میزبان می شود (7). Minuk با نشان دادن شیوع 3/8% هپاتیت مخفی آن را با سطح پائین بار ویروسی و فقدان HBsAg ونیز سطح بالای موتاسیون G145R مرتبط دانست (16). مطالعات انجام شده در استان گلستان نیز موتاسیون G145R را در ژن S نشان داده است(7).

در مطالعه ای که توسط Besisik و همکاران بر روی بیماران تحت همودیالیز با عفونت HCV، با به کار گیری روش PCR انجام شد، مشخص گردید که هپاتیت B مخفی در (36/4٪) آنها وجود دارد و در این میان تنها (9/1٪) آن ها سابقه واکسیناسیون علیه HBV را داشتند(17). این یافته نیز مشابه با مطالعه قبل، عدم واکسیناسیون کامل و نیز آلوده بودن به عفونت HCV را می تواند به عنوان ریسک فاکتوری برای شیوع بالای هپاتیت B مخفی مطرح نماید و توجیه کننده عدم همخوانی آن با مطالعه ما به حساب می آید.

از جمله عوامل احتمالی در اختلاف در شیوع هپاتیت B، مدت زمان دیالیز در بیماران تحت همودیالیز در نظر گرفته می شود(5). Yakaryilmaz هپاتیت B مخفی را در 2/7٪ موارد با متوسط 98 ماه همودیالیز نشان داد که متفاوت از نتایج حاضر با متوسط زمان دیالیز 48 ماه می باشد (18). از مجموعه ریسک فاکتورها، پیوند کبد و همراهی عفونت با هپاتیت C را نیز می توان از جمله عوامل موثر در بروز هپاتیت مخفی به ترتیب بر اساس مطالعه campe و Besisik دانست(17،19).

نتیجه گیری

نتایج بیانگر عدم وجود هپاتیت B نهفته در افراد تحت همودیالیز شهر گرگان بوده واین امر با توجه به واکسیناسیون کامل بیماران تحت همودیالیز علیه HBV قابل توجیه می باشد که این نتایج با برخی مطالعات هم راستا می باشد.

References

1- Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. *Occult hepatitis B virus infection.* J Hepatol. 2007; 46(1):160-70.

2- Kukka Ch. *Hepatitis B "Occult HBV Issue"*. HBV journal review. 2010; 7(11):1-4.

3- Goral V, Ozkul H,Tekes S. *Prevalance of occultHBV infection in hemodialysis patients with chronic HCV*. World J Gastroentestinal. 2006; 12:3420-3424.

4- Hollinger FB, Habibollahi P, Daneshmand A, Alavian SM. *Occult Hepatitis B Infection in Chronic Hemodialysis Patients:Current Concepts and Strategy*. Hepatitis Monthly. 2010; 10(3):199-204.

5- Ismail H, Soliman M, Ismail N. *Occult hepatitis B virus infection in Egyptian hemodialysis patients with or without hepatitis C virus infection.* Pathology and Laboratory Medicine International. 2010; 2:113–120.

6- Ramezani A, Banifazl M, Aghakhani A. *Occult hepatitis B infection in chronic hemodialysis patients: Comparison of results and concepts.* Hepatitis Monthly. 2011; 11(2):128-129

7- Moradi A, Zhand S, Ghaemi A, Javid N, Tabarraei A. *Mutations in the S gene region of hepatitis B virus genotype D in Golestan Province-Iran.* Virus Genes. 2012;44(3): 382-7

8-Özaslan M, Özaslan E, Barsgan A, Koruk M. *Mutations in the S gene region of hepatitis B virus genotype D in Turkish patients.* Journal of genetics.2007;86(3): 195-201

9– Fabrizi F, Messa PG, Lunghit G, Aucella F, Bisegna S, Mangano S and et al. *Occult hepatitis B virus infection in dialysis patients: a multicentre survey.* Aliment Pharmacol Ther.2005; 21(11):1341-47.

10- Jardim RN, Gonçales NS, Pereira JS, Fais VC, Gonçales Junior FL. Occult hepatitis B virus infection in immunocompromised patients. Braz J infect dis. 2008; 12(4):300-5

11- Altindis M, Uslan I, Cetinkaya Z, Yuksel S, Ciftci IH, Demirturk N, et al. *Investigation of hemodialysis patients in term of presence of occult hepatitis B*. Mikrobiyol Bul. 2007;41(2):227-33.

12- Gwak GY, Huh W, Lee DH, Min BH, Koh KC, Kim JJ, et al, *Occult hepatitis B virus infection in chronic hemodialysis patients in korea*. Hepato gastroentralogy. 2008; 55:1721-4.

13- Oesterreicher C, Hammer J, Koch U, Pfeffel F, Sunder-Plassmann G, Petermann D and Müller C. HBV and HCV genome in peripheral blood mononuclear cells in patients undergoing chronic *hemodialysis*. Kidney Int. 995; 48(6):1967–1971.

14- Kazemi arab abadi M, Fathallah pour AA, Jafar zadeh A, Hassanshahi GH, Afrouz M, Haddadian M. *Occult HBV* infection *in Rafsanjanese* blood *donors*. Modarres Journal of Medical Science.2008; 3(4):81-86(Farsi)

15- Siagris D, Christofidou M, Triga K, Pagoni N, Theocharis GJ, Goumenos D, et al. *Occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients with chronic HCV infection*. J Nephrol. 2006; 19(3):327-33.

16- Minuk G, Sun D, Greenberg R. *Occult hepatitis B virus infection in North American Adult hemodialysis patients population.* Hepatology. 2004; 40(5):1072-107.

17- Besisik F, Karaca C, Akyüz F, Horosanli S, Onel D, Badur S, et al. *Occult HBV infection and YMDD variants in hemodialysis patients with chronic HCV infection*. J *Hepatol*. 2003; 38(4):506-10.

18-Yakaryilmaz F, Gurbuz OA, Guliter S, Mert A, Songur Y, Karakan T, Keles H. *Prevalence of occult hepatitis B and hepatitis C virus infections in Turkish hemodialysis patients*. Ren Fail. 2006; 28(8):729-35.

19- Campe H, Hillebrand GF, Mairhofer H, Nitschko H, Jager G. *Undetected chronic hepatitis B virus infection of a vaccinated dialysis patient after liver transplantation*. Nephrol Dial Transplant. 2005; 20(7): 1492–1494.