مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۷ – شماره ۳ – پاییز ۱۳۹۲

Journal homepage: www.ijmm.ir

تشخیص HBV-DNA در سرومن و ارتباط آن با برخی از عوامل ایمنولوژیک

الهه غلامی پریزاد[۱]، افرا خسروی[۲]، اسکندر غلامی پریزاد[۳]، نور خدا صادقی فرد[۱]، سبحان غفوریان[۴]

۱. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
۲. گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
۳. گروه بهداشت عمومی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایلام.
۴. مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۲/۰۴/۱۰

پذیرش:۱۳۹۲/۰۷/۱۰

انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۲/۱۵

موضوع:

ویروس‌شناسی پزشکی

IJMM 1392; 7(3): P 48-54

نویسنده مسئول:

افرا خسروی

گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تلفن: ۰۹۱۸۷۴۱۹۴۷۲

پست الکترونیک:

afrakhosravi@yahoo.co.uk

چکیده

زمینه و اهداف: عفونت ویروس هپاتیت B هنوز یکی از مشکلات بزرگ تهدیدکننده سلامت در بیش از دو میلیارد نفر از مردم دنیا است. تعداد قابل‌توجهی از جمعیت جهانی به عنوان حاملین مزمن این ویروس کشنده از ابتلای به آن رنج می‌برند. متأسفانه اکثر این حاملین در جنوب شرقی آسیا زندگی می‌کنند. حاملین این ویروس در ایران حدود ۳٪ می‌باشند. حتی با وجود منفی بودن HBsAg حضور ویروس با استفاده از روش های مولکولی در سرم تأیید شده است. این مطالعه به منظور تعیین میزان کپیHBV-DNA سرومن بیماران و ارتباط با برخی متغیرهای ایمنولوژیک انجام شد.

مواد و روش کار: در این مطالعه ۷۰ بیمار مزمن هپاتیت*B* (*CHB*) که بیش از یک سال از ابتلایشان به هپاتیت *B* گذشته بود و در گروه سنی ۲۰-۴۰ سال قرار داشتند. نمونه‌های سرومن تهیه گردید و در ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد. برای تشخیص برخی از عوامل ایمنولوژیک مانند *HBsAg*، *HBeAg*، *Anti HBe*از آزمایش الیزا استفاده گردید. به منظور تعیین مقدار کپی *HBV-DNA* سرومن و سرم بیماران از روش مولکولی کمی *Real-Time PCR* و کیت تشخیصی *aj Roboscreen Germany* استفاده شد. پارامترهای کیفی و کمی با آزمون آماری ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج مطالعه نشان داد که از ۷۰ بیمار *CHB* ۲۲ نفر (۳۱/٤٪) *HBeAg*مثبت و ٤٨ نفر (٦٨/٦٪) *HBeAg* منفی، ۳۷ نفر (۵۳٪) *Anti HBe*مثبت و ۱۱ نفر (۱۵/٦٪) همزمان از نظر *Anti HBe& HBeAg* منفی بودند. با روش مولکولی *Real-time PCR* مقدار کپی *HBV-DNA* سرومن و سرم بیماران *CHB*با ویژگی های مختلف ایمنولوژیک مورد بررسی قرار گرفتند. مشخص گردید گروه بیماران با ویژگی *Anti HBe & HBeAg* منفی بیش‌ترین میانگین کپی *HBV-DNA* را نسبت به دو گروه بیماران با ویژگی های ایمونولوژیک *HBeAg* مثبت، *AntiHBe* منفی و *HBeAg* منفی، *AntiHBe* مثبت داشتند؛ که میانگین کپی سرومن و سرم آنها به ترتیب$۱۰^{۸}$ × ۲/۳۷ و $۱۰^{۷}$ × ۲/۸۳ بود.

نتیجه‌گیری: ویژگی برخی از متغیرهای ایمنولوژیک مانند *HBeAg* مثبت و یا منفی، *AntiHBe* مثبت و یا منفی و هم زمان منفی بودن هر دو در بیماران *CHB*می‌تواند در مقدار کپی *HBV-DNA* آنها اثر گذاشته و به کمک سایر عوامل، این بیماران را در فازهای مختلف بیماری قرار دهد؛ بنابراین، استفاده از روش های مولکولی کمی در تشخیص با به‌کارگیری بعضی مایعات بیولوژیک نظیر سرومن، به همراه نشانگرهای ایمنولوژیک می‌تواند در مدیریت بیماری بیماران *CHB*بسیار موثر و رهگشا باشد.

کلمات کلیدی: *هپاتیت B مزمن، HBsAg، حاملین هپاتیت B، سرومن گوش، ایلام.*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

عفونت ناشی از ویروس هپاتیت B به عنوان یکی از مشکلات بزرگ سلامت جهانی مطرح است و در بیش از دو میلیارد نفر از مردم دنیا شایع می‌باشد. هم اکنون بیش از سیصد و هفتاد میلیون نفر در سطح جهان حامل این ویروس هستند که اکثر آنها

در جنوب شرقی آسیا زندگی می‌کنند (۵ –۱). تعداد حاملین این ویروس در ایران به طور متوسط حدود ۳٪ می‌باشد (۵، ۶). 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 می‌نمایند (۲، ۳، ۵). این ویروس یکی از کوچک‌ترین ژنوم ها را در بین ویروس های DNA دار دارد (۷، ۶). چهار ژن مهم آن شامل ژن S تولیدکننده HBsAg، ژن P برای تولید پلیمراز، ژن X برای تولید پروتئین X و ژن C برای تولید آنتی ژن HBeAg و HBcAg می‌باشد (۸، ۹). این آنتی ژن‌ها از جمله آنتی ژن های ایمنوژن اند که آنتی بادی‌ها ساخته‌شده علیه آنها با روش های سرولوژیک قابل اندازه‌گیری می‌باشد (۱۲–۱۰). چهار مرحله عفونت شامل تحمل ایمنولوژیک، کلیرانس ایمنولوژیک (HBeAg مثبت، CHB یا chronic hepatitisB)، حامل غیرفعال و نهایتاً حامل احیاء شده بسته به تعادل بین بیماری و پاسخ های سیستم ایمنی در بیماران مزمن هپاتیت ممکن است مشاهده گردد (۱۳، ۱۴).

در مطالعات اخیر با وجود منفی بودن HBeAg، حضور ویروس HBV با استفاده از روش های مولکولی در سرم حاملین به تأیید رسیده است (۱۷–۱۵). به نظر می‌رسد وجود این عفونت طی قرن‌ها در بدن انسان موجب فرار ویروس از سیستم ایمنی شده که نتیجه آن ویروس جهش‌یافته‌ای است که به شکل جدید ادامه حیات می‌دهد.

وجود عوامل مختلف ایمنولوژیک در فازهای بیماری CHB مقادیر کپی DNA- HBV متفاوتی را در میزبان ایجاد می‌کند که تشخیص و شناسایی دقیق آن مدیریت بیماری را برای پزشک معالج و بیمار تسهیل خواهد کرد. شیوع قابل‌توجه بیماری در جنوب شرقی آسیا و ایران با حدود ۳- ۲/۱۴٪ حاملین، ضرورت انجام مطالعات در زمینه‌های مختلف این بیماری اجتناب‌ناپذیر می‌کند (۲۰-۱۸). این مطالعه باهدف تعیین اثرات برخی از عوامل ایمنولوژیک در مقدار کپی DNA- HBV طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه بر روی ۷ نفر از بیماران مبتلا به هپاتیت B که حداقل بیش از یک سال از ابتلایشان به بیماری گذشته بود انجام شد. همه بیماران مورد بررسی ۴۰ – ۲۰ ساله بودند. تمام بیماران با استفاده از روش الیزا تست HBsAg مثبت بودند. از بیماران مورد مطالعه یک نمونه سرم و سرومن تهیه شد و در آزمایشگاه مرکز تحقیقات میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایلام مبادرت به انجام آزمایش‌های سرم شناسی و مولکولی گردید.

جمع‌آوری نمونه‌ها

نمونه‌های خون با کمک سرنگ ۵ ml در لوله‌های آزمایش جمع‌آوری و پس از سانتریفوژ سرم از آن جدا شد و نمونه‌های سرومن با کمک سواب استریل و قاشقک های استریل از هر دو گوش جدا شد. نمونه‌های سرومن در اپندورف ۱/۵ mlکه حاوی ۰/۵ ml نرمال سالین بود جمع‌آوری شد. سرم و سرومن تا سال‌ها در ۲۰ - درجه سلسیوس قابل نگهداری خواهند بود.

آزمایش سرولوژیکی

روشی که در این مطالعه از آن استفاده شد الیزا بود. با کمک این روش شاخص های ایمونولوژیک ویروس در سرم نظیر HBsAg, HBeAg, Anti HBeو Anti HBe مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای انجام آزمایش مولکولی Real-Time PCR نیاز بود تا ابتدا DNA ویروس از سرم و سرومن افراد (بیمار) جدا گردید. بدین منظور و برای کسب نتیجه دقیق و بهتر از کیت استخراج ویروس هپاتیت B با نام تجاری (QIAMP DSP) بهره گرفته شد. این کیت حاوی فیلتر تیوپ بر پایه Gel Base بوده که برای جداسازی از لایه سلیکاژلی و یکسری بافرهای الکلی برای شستشو استفاده شد. در انتهای کار DNA ویروس در ته لوله‌های استریل اپندورف، جمع‌آوری گردید و قابل فریز شد. نکته قابل‌توجه قبل از استخراج سرومن این است که نمونه‌های سرومن گاه همراه با تکه های مومی ضخیم و چرب بوده که برای استخراج DNA از آنها تدبیر پیش از استخراج به کار گرفته شد. بدین منظور یک ترکیب حاوی 500 mM Hcl – Tris,10 mM NaCl و اتیدیوم 20 mM با هم مخلوط و با کمک NaOH به PH=۹ رسانده شد. سپس ۲۰ µl پروتئیناز K و ۳۰ µl از نمونه سرومن و تکه های آن با هم ترکیب شده و به مدت ۱ ساعت در مدت ۶۵ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسیکلر قرار گرفتند. بعد از مدت زمان طی شده مراحل استخراج که شرح آن در بالا بر روی سرم گذشت، بر روی سرومن نیز انجام پذیرفت (کیت استخراج QIAMP). جهت به کار گرفتن روش Real-Time PCR

کیت اختصاصی این روش با نام تجاری (oboscreenGermany R aj) تهیه شد. دستگاه ترموسیکلر مخصوص Real-Time PCR BioRad مدل (detection system 96CFX) بود.

آزمون آماری

پارامترهای کمی و کیفی با آزمون های – Whitney U test Mann، Pearson chi squared و فیشر مورد بررسی قرار گرفت. در طول مطالعه p value کمتر از ۵٪ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

از متغیرهای ایمنولوژیک مورد بررسی در این مطالعه HBeAg، HBsAg، HBc – Anti، HBe – Anti بود که در جدول ۲ خلاصه شده است. از ۷۰ نفر بیمار CHB ۲۲ نفر(۳۱/۴ ٪) HBeAg مثبت و ۴۸ نفر (۶۸/۶ ٪) HBeAg منفی هستند (لازم به توضیح است که از ۴۸ نفر افراد HBeAg منفی، ۱۱ نفر علاوه بر HBeAg منفی، همزمان Anti – cHB آنها نیز منفی بوده است). با استفاده از PCR کیفی سرم بیماران از نظر وجود DNA – HBV مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که از ۷۰ بیمار CHB که HBsAg مثبت بودند ۶۹ نفر (۹۸/۵٪) دارای DNA – HBV مثبت و یک نفر (۱/۵٪) DNA – HBV آنها منفی بوده است. با بررسی سوابق یک مورد بیمار DNA – HBV مثبت مشخص گردید که وی از جمله بیمارانی است که تحت درمان ضد هپاتیت B بوده است. از ۷۰ بیمار CHB مورد بررسی ۱۹ نفر تحت درمان ضد هپاتیت B و ۵۱ نفر آنها هیچ داروی ضد HB مصرف نکرده بودند.

جدول ۱: واکنش حرارتی برای انجام PCR

تکرار	زمان	دما	ماحل
۱	۲ min	۹۵.c	Nitiol Denaturation
۴۲	۳۰ sec	۹۵.c	Denaturation
	۴۵ sec	۶۱.c	Annealing
	۳۰ sec	۷۲.c	Extention

جدول ۲: نتایج آزمایش های سرولوژیک و PCR کیفی سرم بیماران CHB

فراوانی متغیرهای ایمنولوژیک	مثبت		منفی	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
HBsAg	۱۰۰	۱۰۰	–	–
HBeAg	۲۲	۳۱/۴	۳۷	۵۳
Anti eBc	۳۷	۵۳	۲۲	۳۱/۴
HBeAg &Anti HBe	–	–	۱۱	۱۵/۶
cBe Anti	۷۰	۱۰۰	–	–
HBV – DNA	۶۹	۹۸/۵	۱	۱/۵

جدول ۳: مقادیر کپی HBV - DNA در سرم و سرومن بیماران CHBبر اساس وضعیت HBeAg

آماره / متغیرهای ایمنولوژیک	تعداد	میانگین کپی در میلی لیتر HBV – DNA سرم بیماران HBC	انحراف معیار کپی در میلی لیتر HBV – DNA سرم بیماران HBC	میانگین کپی در میلی لیتر HBV – DNA سرومن بیماران HBC	انحراف معیارکپی در میلی لیتر HBV – DNA سرومن بیماران HBC
$HBeAg^{+}$مثبت	۲۲	۵/۳۹ × ۱۰ ^۸	۱/۹ × ۱۰ ^۹	۱/۰۷ × ۱۰ ^۷	۴/۸۹ × ۱۰ ^۷
$HBeAg^{-}$ منفی	۴۸	۱/۹۶ × ۱۰ ^۸	۱/۱× ۱۰ ^۹	۶/۹۶ × ۱۰ ^۶	۳/۲۶× ۱۰ ^۷
جمع	۷۰	۳/۰۴ × ۱۰ ^۸	۱/۲۴ × ۱۰ ^۹	۸/۱۴ × ۱۰ ^۶	۳/۸۲ × ۱۰ ^۷

آمار / متغیرهای ایمنولوژیک	تعداد	میانگین کپی HBV – DNA سرم	انحراف معیار کپی HBV – DNA سرم	میانگین کپی HBV – DNA سرومن	انحراف معیار کپی HBV – DNA سرومن
$HBeAg^{+}$ &Anti HBe^{-}	۲۲	۵/۳۹ × ۱۰ ^۸	۱/۵ × ۱۰ ^۹	۱/۰۷ × ۱۰ ^۷	۴/۸۹ × ۱۰ ^۷
$HBeAg^{-}$ &Anti HBe^{+}	۳۷	۳/۵ × ۱۰ ^۸	۱/۸۹× ۱۰ ^۹	۶/۰۳ × ۱۰ ^۵	۲/۸۳× ۱۰ ^۷
$HBeAg^{-}$ &Anti HBe^{-}	۱۱	۷/۳۷ × ۱۰ ^۸	۲/۲۷ × ۱۰ ^۹	۲/۸۳ × ۱۰ ^۷	۶/۵۸ × ۱۰ ^۷
جمع	۷۰	۳/۰۴ × ۱۰ ^۸	۱/۲۴ × ۱۰ ^۹	۸/۱۴ × ۱۰ ^۶	۳/۸۲ × ۱۰ ^۷

آزمون میانگین (t) نشان داد با وجود اختلاف قابل توجه در میانگین کپی های سرم و سرومن در دو گروه از بیماران با داشتن HBeAg مثبت و HBeAg منفی، از نظر آماری این اختلاف معنی دار نبوده است. (٪< ۰/۰۵). به علاوه بین واریانس میانگین کپی ها در سرم و سرومن دو گروه بالا نیز اختلاف آماری معنی داری وجود نداشت (به ترتیب vc P = ۰/۰۵۵، vc P = ۰/۰۸۰). در مجموع میانگین کپی HBV-DNA بیمارانی که دارای HBeAg مثبت هستند نسبت به بیمارانی که دارای HBeAg منفی بودند در سرم و سرومن بیشتر بوده است.

با توجه به حضور و نقش با اهمیت Anti - Be در جلوگیری از تکثیر ویروس HB، بیمارانی که همراه این شاخص ایمنولوژیک شاخص های دیگر از جمله HBeAg مثبت یا منفی داشتند نیز از نظر تکثیر HBV - DNA مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج آن در جدول ۴ آمده است.

با توجه به داده های جدول ۴ مشخص شد که بیشترین میانگین کپی HBV - DNA مربوط به گروهی از بیماران CHB است که دارای متغیر ایمنولوژیک (منفی HBeAg & منفی Anti HBe) می باشد. آزمون واریانس میانگین در سرم و سرومن نشان داد با وجود تفاوت های قابل توجه بین میانگین کپی ها در گروه های بیماران CHB با ویژگی های ایمنولوژیک متفاوت اختلاف آماری معنی دار نبوده است.

بحث

مطالعات نشان داده است که ترشحات داخلی و خارجی بیماران مبتلا به هپاتیت B از جمله سرم، مایع آمنیوتیک، اشک، ادرار، عرق، مدفوع، ترشحات واژن و اخیراً سرومن حاوی HBV-DNA است و مقادیر کپی HBV – DNA آنها نیز با توجه به نوع ترشح متفاوت است و می تواند به عنوان منابع عفونت بالقوه انتقال بیماری هپاتیت B در دیگر افراد جامعه باشد (۲۵-۲۱).

ویروس هپاتیت B یکی از پاتوژن های بزرگ و ماندنی بیماری های کبد محسوب می شود که در نتیجه آن التهاب، سیروز و کارسینوما هپاتوسلولار (HCC) بر کبد عارض می شود. آسیب به جا مانده از این بیماری به حضور عوامل مختلف

ایمونولوژیک مانند HBsAg، HBeAg، Th_1 و Th_2 و ژنوتیپ HBV، مقادیر کپی HBV - DNA و برخی عوامل دیگر بستگی دارد (۳۰ -۲۶). در این مطالعه از سرومن ۸۷ ٪ بیماران CHB و سرم ۹۸/۵ درصد آنها ویروس HBV - DNA جدا گردید. میانگین کپی HBV – DNA سرومن و سرم بیماران مورد بررسی بدون توجه به برخی از متغیرهای ایمونولوژیک به ترتیب: سرومن $۸/۱۴ \times ۱۰^{۶}$ کپی در میلی لیتر سرم $۳/۰۴ \times ۱۰^{۸}$ کپی در میلی لیتر بوده است. به علاوه، حداقل و حداکثر کپی در میلی لیتر HBV – DNA آنها به ترتیب سرومن ($۲/۳ \times ۱۰^{۸}$ - $۱/۵۳ \times ۱۰^{۲}$) و سرم ($۷/۵۶ \times ۱۰^{۹}$ - $۱/۲ \times ۱۰^{۲}$)، مشخص گردید. سرم همه بیماران از نظر HBsAg و Anti - eHB به روش الیزا مثبت بود. به منظور تحلیل دقیق تر، بیماران CHBمورد مطالعه از نظر متغیرهای HBeAg و Anti-HBe، به سه گروه تقسیم و مورد بررسی قرار گرفتند.

گروه بیماران CHB با (Anti - eHB منفی & HBeAg مثبت) ۳۱/۴ درصد با میانگین کپی در میلی لیتر سرم $۵/۳۹ \times ۱۰^{۸}$ و میانگین کپی در میلی لیتر سرومن $۱/۰۷ \times ۱۰^{۷}$.

گروه بیماران CHBبا (HBeAg منفی & Anti HBeمثبت) ۵۳ درصد با میانگین کپی در میلی لیتر سرم $۳/۰۵ \times ۱۰^{۷}$ و میانگین کپی در میلی لیتر سرومن $۶/۰۳ \times ۱۰^{۵}$.

گروه بیماران CHB با (HBeAg منفی & Anti HBe منفی) ۱۵/۶ درصد با میانگین کپی در میلی لیتر سرم $۷/۳۷ \times ۱۰^{۸}$ و میانگین کپی در میلی لیتر سرومن $۶/۵۸ \times ۱۰^{۷}$. مقایسه میانگین کپی HBV – DNA سه گروه از بیماران CHB مورد بررسی نشان می دهد که به طور کلی میانگین کپی در میلی لیتر HBV – DNA سرم نسبت به سرومن بیشتر است. به علاوه، از میان سه گروه بیماران CHBفوق، گروه سوم از میانگین کپی در میلی لیتر HBV-DNA سرم و سرومن بالاتری نسبت به گروه اول و دوم برخوردار بوده است. انتظار معمول این بود که میانگین کپی در میلی لیتر HBV – DNA بیماران گروه دوم نسبت به دو گروه دیگر بیشتر باشد (**۱۶**، **۴**). با وجود این که تمام بیماران مورد بررسی بیش از یک سال از ابتلاء شان به هپاتیت B گذشته بود، نمی توان این پدیده را به اواخر دوره حاد بیماری نسبت داد. در اواخر دوره حاد بیماری ممکن است پدیده «منفی – Anti HBeAg & HBe منفی» اتفاق بیافتد که در این صورت می بایست مقدارک پی HBV – DNA کمتری داشته باشیم.

با توجه به مدت زمان ابتلاء بیماران مورد بررسی همه آنها بدون تردید از نظر شاخص زمانی در گروهCHB طبقه بندی می شدند. سئوال بدون پاسخ دیگر در این رابطه اینست که بیماران CHBکه دارای چهار فاز مشخص (ایمونوتولرانس، ایمونوکلیرانس، حاملی، فعالیت مجدد) و یک فاز پنهان (Occult) هستند (**۳۱**، **۶**)، گروه سوم بیماران CHB (HBeAg منفی Anti HBe – منفی) مطالعه اخیر در کدام فاز طبقه بندی خواهند شد.

هر چند برای طبقه بندی فاز چهارگانه بیماران CHBنیاز به اطلاع از سایر شاخص های ایمونولوژک مانند (Th1)، (Th2)، ALT و ویژگی های بافت شناسی کبد می باشد، ولی وجود HBeAg منفی & Anti – HBe منفی در گروهی از بیماران مورد مطالعه اخیر که همگی بیش از یکسال از ابتلاء شان به هپاتیت B گذاشته بود، با میانگین بالایی از کپی HBV – DNA، نکته ابهامی است که در این مطالعه با آن مواجه شدیم.

مطالعه ی Kalcioglu و همکاران در سال ۲۰۰۴ که بر روی سرومن و سرم ۴۰ بیمار CHB انجام شد، نشان داد که ۱۶ نفر (۴۰٪) از بیماران دارای متغیر ایمنولوژیک HBeAg مثبت Anti HBe – منفی بودند. میانگین کپی در میلی لیتر HBV – DNA این گروه از بیماران در سرم و سرومن به ترتیب ($۴/۷ \times ۱۰^{۸}$ = Ms) و ($۳/۰۸ \times ۱۰^{۸}$ = Mc) بوده است. به علاوه، ۷ نفر (۱۷/۵٪) از این بیماران با متغیر ایمنولوژیک (HBe) Anti – منفی & HBeAg (منفی) به ترتیب از میانگین کپی سرم ($۱/۷۵ \times ۱۰^{۸}$ = Ms) و سرومن ($۱/۳ \times ۱۰^{۳}$ = Mc) برخوردار بوده اند. گروه سوم از بیماران مورد مطالعه Kalcioglu به تعداد ۱۷ نفر (۴۲/۵٪) دارای متغیر ایمنولوژیک (Anti – HBe مثبت HBeAg & منفی) بوده که نتایج آزمایش کپی سرم و سرومن این گروه به ترتیب ($۳/۷ \times ۱۰^{۷}$ = Ms) و ($۲/۱۳ \times ۱۰^{۲}$ = Mc) را نشان داده است (**۲۱**).

Kalcioglu توانست از سرم ۱۰۰٪ بیماران CHB مورد بررسی خود، HBV–DNA جدا کند ولی سرومن ۱۱ نفر (۲۷/۵٪) از بیماران حاوی HBV–DNA بوده است (**۲۱**).

بررسی Eui–Kunggoh و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داد سرم، سرومن و ترشحات بلغمی گوش (Otorrhea) بیماران CHB حاوی HBV – DNA قابل توجهی بوده است که میانگین کپی هر کدام از این ترشحات به ترتیب ($۳/۳۷ \times ۱۰^{۶}$ = Ms) و (۴×۱۰^{۴} = Mc) و (9×۱۰^{4} = MO) بوده است (**۲۲**). به علاوه، نتایج

آزمایش مشخص نمود از ۳۰ نفر بیمار CHB مورد مطالعه سرم، سرومن و ترشحات بلغمی گوش آنها به ترتیب: سرم (۱۰۰٪)، سرومن (۶۶/۷٪) و ترشحات بلغمی گوش (۱۰۰٪) حاوی HBV – DNA بوده است (**۲۲**).

نتایج بررسی Eijk و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی سرم و بزاق نشان داد، افرادی که دارای ویژگی ایمنولوژیک HBeAg منفی Anti – HBe منفی بوده اند میانگین کپی HBV – DNA جدا شده از آنها به ترتیب: سرم ($۲/۱\times۱۰^{۵}$) و بزاق $۲/۷۲\times۱۰^{۴}$ بوده است (**۲۴**). مطالعات Nappornpanth و همکاران، Zheavchvshy و همکاران و Pas و همکاران نشان دادند که حضور متغیرهای ایمنولوژیک مانند HBsAg، HBeAg و Anti–HBe در سرم و بزاق می توانند در مقدار کپی HBV–DNA و پتانسیل انتقال عفونت HBV موثر باشند (**۳۴-۳۲**).

ویژگی برخی از متغیرهای ایمنولوژیک مانند HBeAg مثبت یا منفی، Anti – HBe مثبت یا منفی و همزمان منفی بودن (Anti – HBe & HBeAg) در بیماران CHB می تواند در مقدار کپی HBV–DNA آنها اثر گذاشته و به کمک سایر عوامل، این بیماران را در فازهای مختلف بیماری قرار دهد؛ بنابراین، استفاده از روش های مولکولی کمی در تشخیص با بکارگیری بعضی مایعات بیولوژیک نظیر سرومن، به همراه نشانگرهای ایمونولوژیک می تواند در مدیریت بیماری بیماران CHB بسیار موثر و رهگشا باشد.

این مطالعه باید با تعداد بیشتر نمونه انجام شود تا بتوان نتایج آن را تعمیم داد. در این صورت می توان به متخصصین گوش و حلق و بینی توصیه نمود کلیه وسایل و تجهیزات پزشکی را که برای مشاهده و تشخیص اولیه آسیب های گوش استفاده می نمایند قبل از استفاده مجدد گندزدایی نمایند.

تقدیر و تشکر:

از معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام و کلیه همکاران ارجمندی که در اجرای این مطالعه همکاری نموده اند سپاسگزاریم.

References

1. Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment. J hepatol 2006;44:571-576.
2. Rizzetto M,Ciancio A. Chronic HBV related liver disease.Mol Aspects Med 2008;29(1-2):72-84.
3. Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention, J clin virol 2005; 34(1):51-53.
4. Waris G. Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. J Biosci 2003;28(3): 311-321.
5. Ryu WS. Molecular aspects of hepatitis B viral infection and the viral carcinogenesis. J biochem Mol Biol 2003;31: 138-143.
6. Taber E, Gerety RJ. Possible role of immune response to hepatitis B core antigen in protection against hepatitis B infection Lancet 1984,1:172.
7. Chri Sari FV, Ferravi C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. Annu Rev Immunol 1995;13:29-60
8. Takashima H, Alraki K, Miyazaki J, Yamamutu K, Kimoto M. Characterization of T- cell to lorence to hepatitis B virus antigen in rransgenic. Immunology 1992;75:398-405.
9. Lu YW, Tan TL, Zhang J, Chen WN. Cellular apoptosis induced by replication of hepatitis B virus, possible link between viral genotype and clinical out come.Virol J 2007;4:117.
10. Poustchi H, Mohammadnejad M, Malekzadeh R. Hepatitis B virus infection in Iran. Iranin J Clin Infect Dis 2007;2(1):37-51.
11. Mohamadnejad M, Montazeri G, Fazlollahi A, et al. Noninvasive markers of liver fibrosis & inflammation in chronic hepatitisB virus related liver disease. Am J Gastroenterol 2006; 101: 2537-45.
12. Malekzadeh R, Mohamadnejad M, Rakhshani N, et al. Reversibility of cirrhosis in chronic hepatitisB. Clin Gastroenterol Hepatol 2004;2:344-7.
13. Millich DR, Peterson DL, Schodel F, Jones JE, Hughes JL. Preferntial recognition of hepatitis B nucleo capsid antigens by Th1 or Th2 cells is epitop and major histocom patibility complx dependent.J Virol 1995; 69: 2776-2785.
14. Sharma SK, Saini N, Chwla Y. Hepatitis B virus inactive carriers. Virol J 2005;2:82.
15. ..Chan HL, Hussain M, Lok AS. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different

mutation in the core promoter and precore region during hepatitis B(e) antigen sero conversion. Hepatology 1999; 29:976-984.
16. Shi YH, Shi Ch. Molecular characteristic and of chronic hepatitis B virus infection. World J Gasetrol 2009; 15:3099-3105.
17. Alavian SM, Hajarizaddeh B, Ahmadzad ASL M, Kabiri A, Bagheri Lan Karani K. Hepatitis B virus infection in Iran: a systematic review. Hepat 2008;8(4): 281-294.
18. MaHBoobi N, Agha Hossieni F, Safari S, Lavanchy D, Alavian SM.Hepatitis B virus infection in dentistry: a forgotten topic. J Viral Hepat 2010;17: 307-316.
19. Mancini Bourginee M, Fontaine H, Brechot C, Pol S, Michel ML. Immunogencity of a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carries. Vaccine 2006; 24:4482-90.
20. Macmahon BJ. Epidemiology and natural history of hepatitis B. Semin liver Dis 2005; 25(1): 3-8.
21. .Kalcioglu MT,Durmaz R, Ozturan O, Bayindir Y, Direkel S. Does cerumen have a risk for transmission of hepatitis B. American Larynngological, Rhinological socity, INC. Laryngoscope 2004;114: 577-80.
22. GhO EU KY, Son Bo HY, Kong So- Ke, Chon KY MY, Cho KY Su. Analysis of Hepatitis B virus in the cerumen and otorrhea of chronic HBV infected patents: is there a hepatitis B virus infectivity? J Otology & Neurology 2008; 29:929-932.
23. Gish RG, Gadano AC. Chronic hepatitisB, current epidemiology in the Americas and implification for manag ment. J Viral Hepat 2006;13:187-89.
24. Niesters HGM, Gotz HM, Janssen HLA, Schalm SW, Osterhaus ADME, Eijk AA Van Der. Paired measurements of quantitative hepatitis B virus DNA in saliva and serum of chronic hepatitisB patients: implications for saliva as infectious agent. J Clin Virol 2004;29:92-94.
25. Abe AK Inoue, Tanaka T, Kato J, Kajiyama N, Kawaguchi R et al. 1999. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. J. Clin. Microbiol. 37:2899-2903.
26. Millich Dr. Influence of T-helper cell subsets and crossregulation in hepatitis B virus infection. J Viral Hepat 1997;2: 48-59.
27. Oon CJ, Chen Wn, Goh KT, Mesenas S, Ng Hs, Chaing G, Tan G, et al. Molecular characterization of hepatitis B virus surface antigen mutants in Singapore patients with hepato cellular carcinoma and hepatitis B carries negative for HBsAg but positive for Anti HBc. J Gastroentrol Hepatol 2002;17:5491-5496.
28. Brechot C. Pathogenesis of hepatitis B virus related heptocellular carcinoma old and new paradigm. Gastroenterol J 2004;127:556-561.
29. .Liu CJ, Kao JH. Hepatitis B virus related hepato cellular carcinoma. epidemiology and pathogenic role of viral factors. clin Med Assoc 2007; 10(4):141-145.
30. Menne S, Cote PJ. The wood chuck as animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitisB virus infection. World Gastroenterol 2007;13:104-124.
31. Ozaslan E, Purnak T. Controversies about occult hepatitis B virus infection. World J Gastro enterol 2009; 15: 3099-3105.
32. Nopporn parth S, Sathir A, Pongsas Uti N, Chongsvisawat V. Detection of HBsAg and HBV-DNA in serum and saliva of HBV carriers. Southeast Asian J Trop Med public Health 2000; 60(1):17-20.
33. .Zhevachevsky NG, Nomokonova NY, Beklemishev AB,Belov GF. Dynamic study of HBsAg and HBsAg in saliva samples from patients with hepatitis B infection: diagnostic and epidemiological significance.J Med Virol 2000;61(4):433-8.
34. Pas DS, Fries E, De Man RA, Osterhous AD, Niesters HG. Development of a quantitative real time detection assay for hepatitis B virus DNA and comparison with two comer assay. J Clin Microbiol 2000; 38(8):2897-901.