

## تعیین مقدار کپی *HBV-DNA* در سرومن و سرم بیماران مزمن هپاتیت *B* به روش *RealTime PCR* و ارتباط آن با برخی متغیرهای اپیدمیولوژیک

اسکندر غلامی پریزاد، الهه غلامی پریزاد، علی دلپیشه، مصطفی نیک فر

نویسندگان:

اسکندر غلامی پریزاد (کارشناس ارشد بهداشت عمومی-دانشگاه علوم پزشکی ایلام دانشکده بهداشت)  
Eskandar Gholami Parizad (MSc)/ eskandar\_parizad@yahoo.com  
الهه غلامی پریزاد (کارشناس ارشد میکروبیولوژی-دانشگاه علوم پزشکی ایلام دانشکده بهداشت)  
Elaheh Gholami Parizad(MSc)/elahehparizad@gmail.com  
علی دلپیشه (دکتری اپیدمیولوژی-دانشگاه علوم پزشکی ایلام دانشکده بهداشت)  
Ali Delpisheh(phD)/alidelpisheh@yahoo.com  
IlamUniversity of Medical Sciences, Department of Health  
مصطفی نیک فر (کارشناس ارشد میکروبیولوژی-دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان)  
Mostafa Nikfar(MSc) / mostafa\_nikfar  
Islamic azad university of Lahijan

\*نویسنده مسئول: الهه غلامی پریزاد (کارشناس ارشد میکروبیولوژی)  
دانشگاه علوم پزشکی ایلام-دانشکده بهداشت-گروه بهداشت عمومی  
تلفکس: ۰۸۴۱۲۲۲۷۱۰۳

پست الکترونیکی: [elahehparizad@gmail.com](mailto:elahehparizad@gmail.com)

### چکیده:

**مقدمه:** هپاتیت مزمن *B* شایع ترین عفونت ویروسی مزمن شناخته شده ی بشری می باشد. قریب یک سوم مردم دنیا تاکنون به عفونت هپاتیت *B* مبتلا شدند، بیش از چهارصد میلیون نفر حامل *HBV* در جهان هستند، و از این تعداد حدود چهل میلیون نفر به سیروز کبدی و شصت میلیون نفر نیز به علت کارسینوما هپاتوسلولار فوت نموده اند. شیوع بیماری در جنوب شرقی آسیا از سایر مناطق جهان بیشتر است. برآورد می شود که تاکنون بیست و پنج میلیون نفر در ایران به عفونت *HBV* مبتلا شده باشند و حدود ۳ درصد حامل *HBV* در جامعه ایران وجود داشته باشد.

مقادیر *HBV-DNA* در ترشحات مختلف بدن از جمله سرم، سرومن، بزاق و غیره به عوامل ایمنولوژیک فردی و برخی متغیرهای اپیدمیولوژیک بستگی دارد. این مطالعه برای اولین بار به منظور تعیین مقدار کپی *HBV-DNA* در سرم و سرومن و ارتباط آن با برخی عوامل اپیدمیولوژیک در ایران انجام شده است.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه ۷۰ نفر بیمار مبتلا به هپاتیت *B* مزمن در گروه سنی ۲۰-۴۰ ساله که همگی از نظر *HBsAg* مثبت بودند به عنوان نمونه انتخاب شدند. در این بررسی برای تعیین مقدار *HBV-DNA* سرومن و سرم

بیماران از روش ملکولی کمی *Real time PCR* ، دستگاه  $CFX_{96}^{TM}$  (detection system Biorad PCR/USA) و کیت تشخیصی (*aj Roboscreen – Germany*) استفاده گردید.

**یافته ها :** در این بررسی ۵۴/۳ درصد گروه مورد مطالعه مرد و ۴۵/۷ درصد زن بودند . ۱۰۰ درصد بیماران مورد مطالعه حداقل یکسال از تشخیص ابتلاءشان به بیماری هپاتیت *B* گذشته بود . ۶۱ نفر (۸۷/۲درصد) از بیماران در سرومن خود *HBV-DNA* داشتند. ۱۹ نفر (۲۷درصد) تحت درمان و ۵۱ نفر (۷۳درصد) هیچگونه دارویی دریافت نکرده بودند . ۵۸ نفر (۸۳درصد) از بیماران متأهل بودند . میانگین کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* سرومن مردان  $۱۰^۶ \times ۸/۷۳$  و زنان  $۱۰^۶ \times ۷/۴۴$  بوده است . آزمون هموژنتی واریانس میانگین ها در گروه های سنی نشان داد که اختلاف معنی داری بین میانگین کپی های سرومن در گروه های سنی مورد بررسی وجود دارد ( $P=۰/۰۰۳$ ).

**بحث و نتیجه گیری :** استفاده از روش های ملکولی کمی می تواند وضعیت بیماران مبتلا به *CHB* را در مراحل مختلف بیماری به دقت مشخص نماید . نوع ترشحات بیمار از جمله سرم ، سرومن ، بزاق و غیره و همچنین برخی متغیرهای اپیدمیولوژیک مانند جنسیت ، مصرف دارو ، سیستم ایمنی فرد و ... بر مقدار کپی *HBV-DNA* تأثیر گذار هستند ، هر چند بعضاً ممکن است از نظر تست های آماری این اختلاف ها معنی دار نباشند . بنابراین شناخت این عوامل و به کارگیری روش های نوین تشخیصی ، در کنترل و همه گیر شناختی بیماری هپاتیت *B* اهمیت بسیار زیادی دارند .

**کلید واژه ها :** *HBV-DNA* ، سرم ، سرومن ، *CHB* ، اپیدمیولوژیک ، *Real Time PCR* ، ایلام

---

## مقدمه :

هپاتیت مزمن B شایع ترین عفونت ویروسی مزمن شناخته شده ی بشری می باشد (۱). قریب یک سوم مردم دنیا تاکنون به عفونت هپاتیت B مبتلا شده اند ، بیش از چهارصد میلیون نفر حامل HBV در جهان وجود دارد که ، حدود چهل میلیون نفر به دلیل سیروز کبدی و شصت میلیون نفر نیز به علت کارسینوما هپاتوسلولار فوت نموده اند (۵، ۴، ۳و۲). شیوع بیماری در جنوب شرقی آسیا از سایر مناطق جهان بیشتر است . برآورد می شود که تاکنون بیست و پنج میلیون نفر در ایران به عفونت HBV مبتلا شده باشند و میانگین حاملین این ویروس ۳-۲/۱۴ درصد در جامعه ایران باشد (۳۳، ۳۴، ۳۵، ۶ و ۲). عفونت مزمن HBV با دامنه وسیعی از تظاهرات کلینیکی همراه است که از یک حالت ناقل بدون علامت با یک سابقه کبدی نرمال تا بیماری کبدی مزمن مانند سیروز و کارسینوما هپاتوسلولار را شامل می شود (۱۷، ۱۸، ۱۴، ۱۲، ۱۱ و ۱۰).

اکثر عفونت های هپاتیت B تک گیر هستند و سیستم ایمنی بالغین آن را دفع می کند ولی در صورتی که مزمن شوند فرد در یکی از چهار فاز عفونی قرار می گیرد : تحمل پذیری ایمنی ، دفع ایمنی که در آن HBeAg مثبت می گردد ، مرحله حاملین غیر فعال و سرانجام ، مرحله فعالیت دوباره HBV می باشد که ویروس در بخش هایی از ژنوم خود دچار جهش شده که پیامدهای این موتاسیون می تواند منجر به منفی شدن HBeAg و HBsAg گردد (۲۴، ۲۳، ۲۲، ۲۱، ۱۶ و ۴). ویروس هپاتیت B در ترشحات مختلف بدن از جمله خون ، ترشحات جنسی ، مایع آمینوتیک ، اشک ، ادرار ، مدفوع ، بزاق ، عرق و اخیراً نیز در سرومن گوش یافت شده است (۲۰، ۱۹، ۹ و ۸). عوامل متعدد ایمنولوژیک و اپیدمیولوژیک ممکن است در مقدار کپی HBV-DNA در طول دوره بیماری CHB موثر باشند که از جمله می توان به سیستم ایمنی ، سن ، شیوه زندگی ، مصرف دارو ، موتاسیون و ... اشاره نمود . این مطالعه اولین بار با هدف بررسی برخی از متغیرهای اپیدمیولوژیک که احتمالاً در مقدار کپی HBV-DNA سرومن و سرم موثرند، در ایران طراحی و اجرا شده است .

## مواد و روش ها :

در این مطالعه ۷۰ بیمار مزمن هپاتیت B که بیش از یکسال از ابتلا آنها به بیماری می گذشت و همگی HBSAg مثبت بودند و در دامنه سنی ۴۰-۲۰ سال قرار داشتند انتخاب شدند .

۳۸ نفر از آنها مرد و ۳۲ نفر زن بودند . از گروه مورد مطالعه نمونه های خون و سرومن گوش تهیه شد . از خون سرم جدا شد و نمونه های سرومن که با سواپ و قاشقک پلاستیکی جمع آوری شده بود ، در لوله های اپندورف استریل ۱/۰ml که حاوی ۰/۰۵ml نرمال سالین بود، ذخیره گردید . به این ترتیب، سرومن و سرم در ۲۰ °C قابل نگهداری تا سالها خواهد بود .

جهت انجام PCR کمی (Real Time PCR) نیاز بود تا به استخراج DNA ویروس از نمونه ها اقدام شود . بدین منظور از کیت استخراج HBV با نام تجاری QIAMP-DSP استفاده شد . نمونه های سرم مستقیماً و بدون هیچ تیماری ، بنا بر دستورالعمل کیت مذکور ، تحت عمل قرار گرفتند و DNA استخراج شده در نهایت در لوله های اپندورف استریل جمع آوری شدند . اساس کیت استخراج بر مبنای فیلترتیوپ سلیکاژلی و یکسری محلولهای بافری -الکل بود . در مورد نمونه های سرومن ، از آنجا که معمولاً نمونه تکه ای و مومی شکل بود ، لازم شد تا تیمار پیش از استخراج انجام شود . بنابراین ابتدا ترکیب زیر که خاصیت لیز و هموژن کننده دارد ، تهیه شد :

$$\text{Tris} \quad - \quad \text{Cl} \quad 500$$

$$\text{mM} + \text{EDTA} 20 \text{mM} + \text{NaCl} 110 \text{mM}$$
 محلول فوق با NaOH به pH=۹ رسانده شد . ۳۰ μl از نمونه سرومن همراه با تکه تجزیه نشده آن و ۲۰ μl پروتئیناز K به ۱۵۰ μl از ترکیب فوق اضافه و سپس به مدت ۱ ساعت در ۶۵ °C انکوبه شد و برای استخراج این ویروس از این ترکیب نیز از همان کیت استخراج (QIAMP-DSP) استفاده گردید و ویروس استخراج شده در لوله های اپندورف جمع آوری گردید . برای انجام Real Time PCR دستگاه مورد استفاده - Bio Rad (Bio Rad Real Time PCR detection system CFX96) و

کیست مخصوص - *ajRoboscreen* اقدام شد. پروتکل حرارتی استفاده شده به شرح جدول (۱) می باشد: *Germany)Real- Time* بود که بر طبق دستور کیست

جدول (۱) پروتکل حرارتی *Real Time PCR* با توجه به کیست مورد استفاده

Step	Temp	Time	Repet
Taq activation	95	4 mint	1
Synthesis	57	1 mint	45
Melting	95	30 sec	
Fluorescence aqtvation	45	30 sec	

### یافته ها :

حداقل یکسال از تشخیص ابتلاء شان به هیپاتیت *B* گذشته بود. گروه سنی بیماران بین ۲۰-۴۰ سال بود که به چهار گروه سنی مطابق جدول (۲) طبقه بندی شدند.

در این مطالعه ۱۰۰ درصد بیماران از نظر *HBsAg* مثبت بودند. ۳۸ نفر (۳/۵۴) درصد از بیماران مرد و ۳۲ نفر (۷/۴۵) درصد (زن بودند). همه بیماران *CHB* مورد بررسی

جدول (۲) گروه بندی بیماران *CHB* در مطالعه *HBV-DNA* سرومن و سرم

گروه سنی	تعداد	درصد
۲۰-۲۴	۱۴	۲۰
۲۵-۲۹	۱۰	۱۴/۳
۳۰-۳۴	۱۸	۲۵/۷
۳۵-۴۰	۲۸	۴۰
جمع	۷۰	۱۰۰

بدون توجه به گروه های سنی چهارگانه (جدول ۲) به ترتیب: سرم ( $M=3/4 \times 10^4$ ،  $\bar{C}=1/24 \times 10^9$ ) کپی در میلی لیتر) و سرومن ( $M=8/14 \times 10^7$ ،  $\bar{C}=3/82 \times 10^7$ ) کپی در میلی لیتر) بوده است. به علاوه بیشترین میانگین کپی *HBV-DNA* سرم مربوط به گروه سنی (۲۰-۲۴) و سرومن مربوط به گروه سنی (۳۰-۳۴) بوده است که مقادیر آنها در جدول (۳) آمده است.

در این بررسی مقدار کپی *HBV-DNA* سرومن و سرم بیماران با استفاده از *Real Time PCR* مشخص گردید. از ۷۰ نفر بیمار *HBsAg* مثبت، ۶۹ نفر (۹۸/۶ درصد) *HBV-DNA* مثبت بودند و فقط یک نفر (۱/۴ درصد) از نظر *HBV-DNA* منفی بود. ولی سرومن ۶۱ نفر (۸۷ درصد) از همین بیماران حاوی *HBV-DNA* بود و از باقیمانده بیماران، ۹ نفر (۱۳ درصد) *HBV-DNA* جدا نشد. نتایج پژوهش نشان داد، میانگین و انحراف معیار کپی *HBV-DNA* سرومن و سرم بیماران

جدول (۳). مقایسه میانگین و انحراف معیار کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* سرم بیماران

با توجه به گروه سنی آن ها در مطالعه ایلام

متغیر های آماره گروه سنی	تعداد	میانگین کپی در میلی لیتر- <i>HBV</i> <i>DNA</i> سرم	انحراف معیار کپی در میلی لیتر- <i>HBV</i> <i>DNA</i> سرم	حدود اعتماد ۹۵ درصد		مینیمم کپی در میلی لیتر <i>HBV</i> - <i>DNA</i> سرم	ماکزیمم کپی در میلی لیتر <i>HBV</i> - <i>DNA</i> سرم
				حد پایین	حد بالا		
۲۰-۲۴	۱۴	$5/55 \times 10^4$	$2/03 \times 10^9$	$-6/2 \times 10^8$	$1/73 \times 10^9$	$2/85 \times 10^3$	$7/6 \times 10^9$
۲۵-۲۹	۱۰	$2/5 \times 10^8$	$5/35 \times 10^8$	$-1/36 \times 10^8$	$6/28 \times 10^8$	$2/05 \times 10^3$	$1/51 \times 10^9$
۳۰-۳۴	۱۸	$4/6 \times 10^8$	$1/63 \times 10^9$	$-3/48 \times 10^8$	$1/27 \times 10^9$	$1/54 \times 10^2$	$6/9 \times 10^9$
۳۵-۴۰	۲۸	$9/75 \times 10^7$	$3/31 \times 10^8$	$-3/07 \times 10^7$	$2/26 \times 10^8$	$5/51 \times 10^2$	$1/50 \times 10^9$
جمع	۷۰	$3/4 \times 10^8$	$1/24 \times 10^9$	$7/54 \times 10^6$	$6 \times 10^8$	$1/54 \times 10^2$	$7/6 \times 10^9$

جدول (۴). مقایسه میانگین و انحراف معیار کپی *HBV-DNA* در میلی لیتر سرمون بیماران آن

با توجه به گروه سنی آنها در مطالعه ایلام

متغیر های آماره گروه سنی	تعداد	میانگین کپی در میلی لیتر- <i>HBV</i> <i>DNA</i> سرمون	انحراف معیار کپی در میلی لیتر- <i>HBV</i> <i>DNA</i> سرمون	حدود اعتماد ۹۵ درصد		مینیمم کپی در میلی لیتر <i>HBV</i> - <i>DNA</i> سرمون	ماکزیمم کپی در میلی لیتر <i>HBV</i> - <i>DNA</i> سرمون
				حد پایین	حد بالا		
۲۰-۲۴	۱۴	$1/66 \times 10^7$	$5/5 \times 10^7$	$-1/5 \times 10^7$	$4/83 \times 10^7$	$1/54 \times 10^2$	$2/07 \times 10^8$
۲۵-۲۹	۱۰	$3/8 \times 10^0$	$1/1 \times 10^6$	$-4 \times 10^0$	$1/16 \times 10^6$	$1 \times 10^{*}$	$3/5 \times 10^6$
۳۰-۳۴	۱۸	$1/81 \times 10^7$	$5/75 \times 10^7$	$-1 \times 10^7$	$4/67 \times 10^7$	$1 \times 10^0$	$2/3 \times 10^8$
۳۵-۴۰	۲۸	$2/77 \times 10^0$	$1/12 \times 10^6$	$-1/57 \times 10^0$	$7/1 \times 10^0$	$1 \times 10^0$	$5/74 \times 10^6$
جمع	۷۰	$8/14 \times 10^6$	$3/82 \times 10^7$	$97 \times 10^0$	$1/72 \times 10^7$	$1 \times 10^0$	$2/3 \times 10^8$

\* non detected = < 10 copy/ml

مینیمم کپی *HBV-DNA* سرمون در گروه سنی (۲۰-۲۴) ساله  $1/54 \times 10^2$  و در سایر گروه های مورد بررسی کپی قابل قبولی جدا نشد. ماکزیمم کپی *HBV-DNA* سرمون مربوط به گروه سنی (۳۰-۳۴) ساله و مقدار آن  $2/3 \times 10^8$  بوده است. آزمون هموزنتی واریانس میانگین ها (*Test of Homogenity variances*) نشان داد که اختلاف معنی داری بین میانگین کپی های سرمون در گروه

مینیمم کپی *HBV-DNA* سرم مربوط به گروه سنی ( $\leq 40$ ) -۳۵ سال) و ماکزیمم کپی مربوط به گروه سنی (۲۰-۲۴) بوده است. آزمون هموزنتی واریانس میانگین ها (*Test of Homogenity Variances*) نشان داد که اختلاف معنی داری بین میانگین کپی های سرم در گروه های سنی مورد بررسی وجود ندارد ( $P=0/076$ )، ( $df_2=66$ ) و ( $df_1=3$ ).

در دوره بیماری هیچ درمانی مصرف نکرده بودند در جدول (۶ و ۵) آمده است .

جدول (۵) نشان می دهد که بین میانگین کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* سرم بیمارانی که دارو مصرف می کردند با آنانی که دارو مصرف نمی کردند اختلاف معنی داری وجود ندارد ( $P=0/188$ ).

آزمون واریانس کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* سرم بیمارانی که دارو مصرف می کردند با بیمارانی که دارو مصرف نمی کردند ، اختلاف معنی دار وجود داشت ( $P=0/000$ ) . بنابراین واریانس دو گروه با هم برابر نیستند . جدول ۶ نشان می دهد که ، بین میانگین کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* سرومن دو گروه بیماران ، با مصرف دارو و بدون مصرف دارو اختلاف معنی دار وجود ندارد ( $P=106$ ).

ولی بین واریانس میانگین کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* سرومن بیمارانی که دارو مصرف می کردند با گروهی از بیماران که دارو مصرف نمی کردند اختلاف معنی دار وجود داشت به عبارت دیگر واریانس میانگین دو گروه با هم برابر نیستند ( $P=0/000$ ).

های سنی مورد بررسی وجود دارد . ( $P=0/003$ ) ، ( $df_1=3$  ،  $df_2=66$ )

آزمون (*t*) میانگین کپی *HBV-DNA* سرومن و سرم بیماران بر حسب جنس نشان داد که بین میانگین کپی *HBV-DNA* سرم گروه زنان بیمار با مردان بیمار اختلاف معنی داری وجود ندارد ( $P=0/967$ ) به علاوه بین میانگین کپی *HBV-DNA* سرومن ، در گروه زنان و مردان بیمار نیز اختلاف معنی دار نبود . ( $P=0/889$ )

نتایج پژوهش نشان داد که ۵۸ نفر (۸۳ درصد) از بیماران مورد بررسی متأهل و ۱۲ نفر (۱۷ درصد) مجرد بودند . شاخص تأهل به عنوان یکی از متغیرهای انتشار بیماری به همسر و دیگر افراد خانواده از اهمیت بالایی در اپیدمیولوژی بیماری هپاتیت *B* برخوردار است . این موضوع زمانی اهمیتش مضاعف می شود که جامعه از فرهنگ بهداشتی و سلامت مناسبی برخوردار نباشد .

در این مطالعه مشخص گردید ۵۱ نفر (۷۳ درصد) از بیماران *CHB* داروی ضد هپاتیت *B* مصرف نکرده اند و در مقابل ۱۹ نفر (۲۷ درصد) در مقطعی از بیماری تحت درمان ضد ویروس (*HB*) قرار گرفته بوده اند .

نتایج آزمون (*t*) میانگین و واریانس کپی *HBV-DNA* سرومن و سرم مربوط به دو گروه، شامل گروهی که تحت درمان ضد ویروس هپاتیت قرار گرفته بودند با گروهی که

جدول (۵) . میانگین ، انحراف معیار و واریانس کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* سرم

بیماران مبتلا به هپاتیت *B* مزمن بر حسب مصرف دارو

حدود اعتماد ۹۵ درصد		آزمون برابری واریانس		آزمون برابری میانگین			انحراف معیار کپی <i>HBV-DNA</i> سرم بیماران	میانگین کپی در میلی لیتر سرم بیماران <i>HBV-DNA</i>	تعداد	آماره وضعیت مصرف دارو
حد بالای کپی <i>HBV-DNA</i>	حد پایین کپی <i>HBV-DNA</i>	<i>Pu</i>	<i>F</i>	<i>Pu</i>	<i>df</i>	<i>T</i>				
							$2/3 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	۱۹	مصرف دارو
$1/82 \times 10^9$	$-3/83 \times 10^8$	۰/۰۰۰	۲۰/۹۴۱	۰/۱۸۸	۱۸	۱/۳۶۸	$3/5 \times 10^9$	$8/3 \times 10^8$	۵۱	عدم مصرف دارو

جدول ۶. میانگین ، انحراف معیار و واریانس کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* سرومن

بیماران مبتلا به هیپاتیت *B* مزمن بر حسب مصرف دارو

حدود اعتماد ۹۵ درصد		آزمون برابری واریانس		آزمون برابری میانگین			انحراف معیار کپی	میانگین کپی در میلی لیتر <i>HBV-DNA</i> سرومن بیماران	تعداد	آماره وضعیت مصرف دارو
حد بالای کپی <i>HBV-DNA</i>	حد پایین کپی <i>HBV-DNA</i>	<i>F</i>	<i>Pu</i>	<i>T</i>	<i>df</i>	<i>Pu</i>	<i>HBV-DNA</i> سرومن بیماران			
$6/2 \times 10^7$	$-6/5 \times 10^6$	۴۱/۶۹۵	۰/۰۰۰	۱/۷۰۲	۱۸	۰/۱۰۶	$2/6 \times 10^6$	$6/5 \times 10^6$	۱۹	مصرف دارو
							$7 \times 10^7$	$2/8 \times 10^7$	۵۱	عدم مصرف دارو

### بحث :

مقدار کپی *HBV-DNA* آن ها مشخص و جدا گردید (۲۹، ۳۰ و ۲۸).

در این مطالعه مشخص گردید که ۶۹ نفر (۹۸/۵ درصد) از بیماران *HBSAg* مثبت نمونه های سرم خون شان از نظر *HBV-DNA* مثبت بودند . نمونه های سرومن ۱۱ نفر (۸۷ درصد) از این بیماران حاوی *HBV-DNA* بودند .

میانگین کپی *HBV-DNA* سرم بیماران مورد بررسی در تمام گروه های سنی چهارگانه (جدول ۳) با وجود مقادیر کپی *HBV-DNA* متفاوت ، اختلاف معنی داری وجود نداشت. مقایسه میانگین مقدار کپی *HBV-DNA* سرومن در گروه سنی چهارگانه (جدول ۴) نشان می دهد که اختلاف معنی داری بین میانگین *HBV-DNA* گروه های سنی وجود ندارد ولی در آزمون هموژنتی واریانس میانگین ها این اختلاف معنی دار بوده است ( $P=0/003$ ) میانگین *HBV-DNA* سرومن و سرم (۷۰) بیمار مورد بررسی به ترتیب : ( $Ms=3/04 \times 10^6$  و  $Mc=8/14 \times 10^6$ ) کپی در میلی لیتر بوده است .

نتایج بررسی (*Eui- kung gohi et al*) در کره در سال ۲۰۰۸ نشان داد که صددرصد بیماران *HBSAg* مثبت مورد مطالعه از نظر *HBV-DNA* سرم مثبت بودند ، در صورتی که فقط از ۶۶ درصد نمونه های سرومن آن ها *HBV-DNA* جدا گردید . میانگین کپی *HBV-DNA*

کمیت سنجی *HBV-DNA* به روش مولکولی *Real Time PCR* در پایش مراحل بیماری و بازدهی درمان در بیماران *CHB* بسیار مفید و رهگشا می باشد.

این روش با وجود پایین بودن سطح *HBV-DNA* در ترشحات مختلف بدن امکان تشخیص *HBV* را در بیماران مزمن افزایش می دهد و به عنوان یک ابزار مهم در تحقیق کاربرد دارد (۲۷، ۲۶ و ۲۵). *HBV-DNA* از ترشحات مختلف بدن مانند خون ، مدفوع ، ادرار ، صفرا ، عرق ، اشک ، بزاق ، منی ، شیر پستان ، مایع مغزی نخاعی ، ترشحات واژن ، مایع آمینوتیک و سرومن جدا شده است (۸، ۷ و ۹) . ایران یکی از مناطق با شیوع متوسط هیپاتیت *B* بوده و برآورد می شود که حدود ۳۵ درصد از ایرانیان با این ویروس مواجه شده باشند . تقریباً ۳ درصد مبتلا به حامل مزمن بوده و میزان *HBSAg* مثبت در برخی مناطق مانند جی پیسی شهر کرد حدود ۱۵/۵ درصد می باشد (۳۴، ۳۳ و ۳۲).

در این بررسی ۷۰ بیمار *CHB* که حداقل یکسال از تشخیص ابتلاءشان به هیپاتیت *B* گذشته بود ، از گروه سنی ۲۰-۴۰ ساله برای ورود به مطالعه انتخاب شدند . کلیه بیماران *HBSAg* مثبت بودند نمونه های سرومن و سرم از آنها تهیه شد و با استفاده از روش مولکولی کمی *Real Time PCR* که از حساسیت بالایی برخوردار است ،

سرومن و سرم دو جنس، از نظر آماری این اختلاف معنی دار نبوده است ( $Pc=0/889$  و  $Ps=0/967$ ). به علاوه بین واریانس های مقدار کپی *HBV-DNA* در نمونه های سرومن و سرم دو جنس نیز، اختلاف معنی داری وجود نداشت ( $Pcv=0/859$  و  $Psv=0/819$ ).

همچنین حد بالا و پایین کپی *HBV-DNA* در نمونه های سرومن و سرم دو جنس به ترتیب (سرم زنان و مردان =  $10^4 \times 6/2 - 10^8 \times 5/87$ ، سرومن زنان و مردان =  $10^7 \times 1/71 - 10^7 \times 1/98$ ) بوده است ( $P<0/05$ ). به عبارت دیگر جنسیت بیماران *CHB* نتوانسته است اختلاف آماری معنی داری بین مقدار کپی *HBV-DNA* در نمونه های سرومن و سرم این مطالعه نشان دهد.

نتایج مطالعه اخیر نشان داد، میانگین کپی *HBV-DNA* سرومن و سرم بیمارانی که در طول بیماری داروی ضد *HBV* مصرف کرده بودند با آنانی که هیچ دارویی مصرف نکرده بودند اختلاف معنی دار وجود ندارد ( $Ps=0/188$  و  $Pc=0/106$ ) ولی بین واریانس کپی های *HBV-DNA* نمونه های سرومن و سرم، این دو گروه اختلاف معنی دار نبوده است ( $Ps=0/000$  و  $Pc=0/000$ ). میانگین کپی *HBV-DNA* بین دو گروه بیماران (عدم مصرف دارو، با مصرف دارو) در سرومن و سرم به ترتیب: سرم (عدم مصرف دارو =  $10^4 \times 8/3$  کپی در میلی لیتر، با مصرف دارو =  $10^4 \times 1$  کپی در میلی لیتر) در آزمایشات نشان داده شد.

### نتیجه گیری :

کاربرد روش های مولکولی کمی در سنجش مقدار کپی *HBV-DNA*، می تواند در پایش مراحل بیماری و بازدهی درمان بیماران *CHB*، بسیار مفید و رهگشا باشد. مطالعه اخیر که با استفاده از روش ملکولی *Real Time PCR* برای تشخیص و تعیین مقدار کپی *HBV-DNA* در سرومن و سرم بیماران *CHB* در ایلام انجام شد نسبت به سایر مطالعات مشابه در خصوص سرومن، میزان موارد مثبت *HBV-DNA* بیشتری را نشان می دهد (۸۷ درصد). مطالعه اخیر نشان داد متغیرهای اپیدمیولوژیک مانند گروه های سنی، جنسیت و مصرف دارو با وجود تأثیرگذاری بر مقادیر کپی *HBV-DNA* در سرومن و سرم بیماران،

سرومن و سرم آن ها به ترتیب ( $Ms=3/7 \times 10^6$  و  $Ms=4 \times 10^4$ ) بوده است (۲۰).

یافته های بررسی (*Kalcioglu MT et al*) در سال ۲۰۰۴ مشخص نمود که از ۴۰ بیمار *HBsAg* مثبت، سرم تمام آن ها از نظر *HBV-DNA* مثبت بوده است. در صورتی که از نمونه های سرومن همین بیماران فقط از ۱۱ نمونه (۲۷/۵ درصد) با استفاده از روش *HBV-DNA Real Time PCR* جدا شده بود. میانگین کپی در میلی لیتر سرومن و سرم در بررسی (*Kalcioglu MT et al*) به ترتیب ( $Ms=2/4 \times 10^7$  و  $Ms=1/2 \times 10^4$ ) نشان داده شد (۸).

مطالعه (*AKI, Abes et al*) که بر روی سرم ۴۰ بیمار *CHB* انجام گرفت، نشان داد که میانگین کپی *HBV-DNA* ۸ نمونه در چهار بار آزمایش  $4/3 \times 10^4$  بوده است (۳۱).

مقایسه نتایج مطالعه ایلام با بررسی های (*Eui - kungohi et al*) و (*Kalcioglu MT et al*) در خصوص جداسازی *HBV-DNA* از سرم افراد *HBsAg* مثبت نشان می دهد که در بررسی اخیر از ۹۸/۵ درصد افراد، ولی در مطالعات فوق الاشاره از صد درصد افراد، *HBV-DNA* جدا شده است. این تفاوت نتیجه می تواند مربوط به یک مورد *CHB* تحت درمان در مطالعه ایلام باشد، که از وی *HBV-DNA* جدا نگردید.

نتایج جداسازی *HBV-DNA* از سرومن بیماران در مطالعه اخیر، در مقایسه با نتایج بررسی های (*Eui - kungohi et al*) و (*Kalcioglu MT et al*) مشخص شده است که مطالعه ایلام ۸۷ درصد، (*Eui*) و همکاران ۶۶ درصد و *Kalcio* و همکاران ۲۷/۵ درصد، *HBV-DNA* مثبت بوده اند. دلایل تفاوت نتایج سرومن در مطالعه اخیر با دو مطالعه دیگر ممکن است ناشی از کیفیت نمونه گیری سرومن، نوع کیت به کار گرفته شده، نوع دستگاه *Real Time PCR* و یا دقت عمل متفاوت، در مراحل مختلف آزمایش (*Real Time PCR*) باشد.

مقایسه میانگین کپی در میلی لیتر *HBV-DNA* زنان و مردان در نمونه های سرومن و سرم نشان داد، با وجود تفاوت آشکار در مقدار *HBV-DNA* نمونه های سرومن



### فهرست منابع :

1. Mancini-Bourgine M, Fontaine H, Brechot C, Pol S, Michel ML. Immunogenicity of a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers . *Vaccine* 2006; **24** :4482-9.
2. Redeker AG . *Viral hepatitis : clinical aspects* AM J Med Sci 1975;270:9-16.
3. Shi VH, Shi Ch. Molecular characteristic and of chronic hepatitis B . *World Gasetrology*2009;**15**(25) :3099-3105.
4. Macmahon BJ . *Epidemiology and natural history of hepatitis B* . *Semin Liver Dis* 2005;**25** (1): 3-8.
5. Lavanchy D. *Hepatitis B virus epidemiology , disease burden treatment, and current and emerging prevention and control measures.* *J Viral Hepat* 2004 ; **11**:97-107.
6. Gish RG , Gadano AC. *Chronic hepatitis B , current epidemiology in the Americas and implification for management* . *J Viral Hepat*2006;**13**:187-89.
7. Gastaud P, Badouin CH, Ouzan D. *Detection of HBs antigen , DNA polymerase activity and hepatitis B virus DNA in tears : relevance to hepatitis B transmission by tears* . *BrJ ophthulmol*1989;**73**:333-6.
8. Kalcioğlu MT, Durmza R, Ozturan O, Bajindir Y, Direkel S. *Does cerumen have a risk for transmission of hepatitis B?* . *INC Laryngoscope*2004;**114** :577-80.
9. Towers CV, Asrat T, Rumney p. *The presence of hepatitis B surface antigen and deoxy ribonucleic acid in amniotic fluid and cord blood* . *AmJ Obstet Gynecol* 2001; **184**:1514-20.
10. Knutsson M, Kidd-Ljunggren K . *Urine from chronic hepatitis B virus carriers : implications for infectivity* . *J Med Virol* 2000 ; **6**:1720.
11. Ileje UH, Yang HI, SU J, Jen CL, You Sh, Chen CJ. *Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis viral load.**Gastroenterolo* 2006;**130**: 678-86.
12. Lupberger J, Hildt E. *Hepatitis B virus – induced oncogenesis* . *Worl J Gastroenterol* 2007;**13**:74-81.
13. Elgouhari HM, Abu-Rajab Tamimi TI, Carey WD . *Hepatitis B virus infection : understanding its epidemiology course and diagnosis* . *cleve clin J med* 2008; **75**:881-89.
14. Chen CJ, Yang HI, SUJ, et al . *Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum haptitis B virus DNA level* . *JAMA* 2006 ;**296**:65-73.
15. Sharma SK, Saini N, Chwla Y. *Hepatitis B virus : inactive carriers* . *Virol J* 2005 ; **2**:82.
16. Chen MT, Billaud JN, Sallberg M, Guidottil G, Chisari FV, Jones J, Hughes J, Milich DR . *A function of the hepatitis B virus Precore protein is to regulate the immune response to the coreantigen* . *Pronatl Acad Sci USA*2004 ;**101**:14913-14918.
17. Lee WM . *hepatitis B virus infection* . *N Engl J Med* 1997; **337**:1733-1745.
18. He VL, Zhao YR, Zhang SL, Lin SM. *Host susceptibility to persistent hepatitis B virus infection* . *World J Gastroenterol* 2006;**12**:4788-4793.
19. Victoria Fdus, Oliverra CM, Victoria MB, Victoria CB, Ferrei LC. *Characterization of HBeAg – negative*

- chronic hepatitis in western Brazillian Amazonia .*Bra J Infec Dis* 2008; **12**:27-37.
20. GhO EU-KY, Son Bo-Y, Kong So- Ke, Chon KY-MY, Cho KY -Su . Analysis of Hepatitis B virus in the cerumen and otorrhea of chronic HBV –infected patients : is there a hepatitis B virus infectivity?. *J Otology & Neurology* 2008; **29**:929-932.
21. Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J, Wang LY, et al . Association between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepato cellular carcinoma . *J Natl cancer Inst* 2008;**100**: 1134-1143.
22. Mahtab MA, Rahman S , Khan M , Karim F. Hepatitis B – virus genotypes : an over view . *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008 ;7 :457-64.
23. Maruyama T, Kuwata S, Koike K , Iino S, Yasuda K, Yotsuyanagi H, Moriya K , et al. Precore wild – type DNA and immune complexes persist in chronic hepatitis B after seroconversion : no association between genome conversion and seroconversion . *Hepatolo*1998; **27**:245-53.
24. 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 Be antigen serroconversion . *Hepatolo* 1999 ; **29**:976-984.
25. Chu, CJ, LOK AS . Clinical utility in quantifying serum HBV DNA levels Using PCR assays. *J Hepatol*2002 ; **36**:549-51.
26. Lok AS, Heathcote EJ, Hofnagle JH. Management of hepatitis B : 2000 summary of a work shop . *Gastroenterol*2001; **120**:1828-53.
27. Paraskevis DC, Haidu N, Tassopoulos M, Ratopoulodu D, Tsantoulas H, papachistou V, Sypsa & Hatzakis A . Development and assessment of a novel Rea-1 Time PCR assay for quantitation of HBV DNA . *J Virol Methods* 2002; **103**: 201-12.
28. Hendrisk DA, Stowe BJ, Hoo BS, Kolberg J, Irvine BD, Neuwald PD, et al . Quantitation of HBV DNA in human serum using branched DNA Signal amplification assay . *AMJ clin pathol* 1995 ;**104**:537-46.
29. HO SKN, Chan TM. An overview of assy for serum HBVDNA .*clin lab* 2000;**46**:609-14.
30. Sum SM ,Wong DKH, Yuen MF, Yuan HJ, YUJ, Lai CH, et al . Real time PCR assay using molecular be a confor quantitation of Hepatitis B virus DNA. *J of Clin Microbiol* 2004 ;**42**(8) :3438-40.
31. AKI ABE, Inou Ek , Tanaka T, Kato J, Kajijama N, Kawaguchi R , et al . Quantitation of hepatitis B virus Genomic DNA by Realtime Detection PCR , *Journal of Microbiol*1999; 2899-2903.
32. Hosseini ASL, Alaviyan SM, Mohammadnejad M . High prevalence of HBV , HCV and HIV infection in gypsy papulation residingi shahr-e cord . *Arch Iran Med* 2004 ; 7:20-2.
33. Poustchi H , Mohammadnejad M , Malekzadeh R . Hepatitis B virus infection in Iran .*IraninJ of clin infec Dise* 2007;**2**(1) :37-51.
34. Alaviyan SM, Hajarizaddeh B, Ahmadzad ASL, Kabir A, Bagheri –Lan Karani K. Hepatitis B virus infection in Iran : a systematic review .*Hepat* 2008;**8**(4):281-294.