# طراحی آزمون PCR جهت تشخیص ویروس هپاتیت B و ارزیابی عملکرد این آزمون در غربالگری مراجعین به سازمان انتقال خون کاشان

روح الله نخعی سیستانی[۱*] و سید مهدی سادات الحسینی[۲و۳]

[۱]کاشان، دانشگاه کاشان، دانشکده شیمی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی

[۲]زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، گروه ژنتیک مولکولی

[۳] کاشان، سازمان انتقال خون کاشان

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۹

## چکیده

هپاتیت B از جمله ویروسهای شایعی است که یکی از راههای انتقال آن خون و فرآورده‌های خونی می‌باشد. هدف از این پژوهش طراحی آزمونی است بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی (PCR) که بتوان از آن به منظور تشخیص ویروس هپاتیت B در نمونه‌های بالینی استفاده نمود. در این مطالعه یک نمونه خون با بار مشخص ویروس تهیه شد تا قابلیت جفت پرایمر طراحی شده در تشخیص ویروس مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین اختصاصیت آن نیز علاوه بر بررسی بیوانفورماتیکی، با آزمون علیه سه ویروس شایع دیگر تا حدی تأیید گردید. همچنین از این روش در غربالگری مراجعین سازمان انتقال خون کاشان نیز استفاده گردید و نتایج آن با نتایج حاصل از روش متداول در این سازمان مقایسه شد. نتایج این مطالعه نشان داد که جفت پرایمر طراحی شده به طور اختصاصی ژنوم ویروس هپاتیت B را تکثیر می‌نماید و حساسیت آن در حدود ۱۰۰ ذره ویروس در هر میلی‌لیتر خون است که نزدیک به سه برابر حساس‌تر از روش الایزای متداول در سازمان انتقال خون است. همچنین در نمونه‌های بالینی، نتایج آزمون PCR کاملاً با نتایج تأیید شده سازمان انتقال خون کاشان مطابقت داشت. آزمون طراحی شده، فاقد نتایج مثبت کاذب بود که علاوه بر جلوگیری از حذف داوطلبین سالم اهدای خون، در کاهش هزینه‌های سازمان هم می‌تواند نقش به سزایی داشته باشد. بنابراین به نظر می‌رسد بتوان آن را جایگزین روش جاری غربالگری این ویروس نمود که اولاً هزینه انجام آن بسیار پایین‌تر می‌باشد و ثانیاً بخشی از واجدین شرایط، از اهدای خون منع نمی‌گردند.

واژه های کلیدی: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی ، الایزا، هپاتیت B

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۵۵۹۱۳۰۴۵ ، پست الکترونیکی: r.nakhaei@kashanu.ac.ir

## مقدمه

بیماری هپاتیت B یکی از مشکلات عمده سلامت در دنیا و کشور ایران بوده و عامل یکی از شدیدترین عفونتهای ویروسی کبدی در جهان می‌باشد (۸). این ویروس هر ساله مسئول مرگ حدود یک تا دو میلیون نفر در سراسر جهان است (۱۶) و تخمین زده می‌شود که حدود ۳۰۰ میلیون ناقل هپاتیت B در سراسر جهان (به جز افرادی که از وضعیت خود آگاهی ندارند) وجود دارد (۳ و ۱۴). ویروس هپاتیت B باعث بیماری هپاتیت مزمن، سیروز کبدی و سرطان کبد می‌شود (۱۴). هپاتیت B می‌تواند از طریق تزریق خون منتقل شود. این عفونت در موارد حاد منجر به مرگ و میر و در موارد مزمن می‌تواند منجر به هپاتیت مزمن، سیروز کبدی و کارسینومای سلولهای کبدی شود (۹). انتقال HBV از طریق تزریق خون نقش عمده‌ای را در شیوع این ویروس در سراسر جهان در چند دهه

گذشته ایفاء کرده است و هنوز هم به عنوان یک تهدید در کشورهای در حال توسعه که دارای شیوع بیشتری هستند به حساب می‌آید (۱۲). به گفته سازمان بهداشت جهانی (WHO شیوع هپاتیت B در بین اهداکنندگان خون در سال ۲۰۱۵ در کشورهای توسعه یافته ۰/۰۲ درصد، کشورهای در حال توسعه ۰/۶۴ درصد و کشورهای کمتر توسعه یافته ۳/۵۹ درصد تخمین زده می شود (۱۷).

بررسی حضور آنتی ژن سطحی S ( Hepatitis B surface antigen، HBsAg) شایع‌ترین روش جهت شناسایی ویروس هپاتیت B است. اگر چه در اوایل آلودگی می‌تواند جواب منفی کاذب ایجاد کند اما یک تا ۳ ماه بعد از آلودگی با ویروس، تشخیص دقیق‌تری را ارائه می‌دهد (۱۴). در بسیاری از کشورهای پیشرفته از آزمون آزمون اسیدهای نوکلئیک (Nucleic acid test، NAT) به همراه آزمونهای سرولوژیکی جهت شناسایی بهتر ویروس HBV و دیگر عوامل عمده ویروسی مثل Hepatitis C virus (HCV) و Human immunodeficiency virus (HIV) در راستای افزایش ایمنی خون استفاده می‌شود. در خصوص بیماری هپاتیت B در حال پیشرفت، استفاده از DNAی هپاتیت B به جای HBs Ag به تشخیص سریع‌تر و دقیق-تری می‌انجامد که می‌تواند باعث جلوگیری از انتقال HBV به واسطه تزریق خونهای دارای عفونت نهفته هپاتیت B، یا خونهای دارای ویروس هپاتیت B با آنتی ژن سطحی S تغییر یافته شود (۱۲).

عفونت مزمن HBV به تداوم حضور HBs Ag به همراه ژنوم HBV بیش از ۶ ماه در سرم بیمار گفته می‌شود. حدود ۸۰ درصد افراد با عفونت مزمن به دلیل عدم بروز علائم از بیماری خود آگاهی ندارند. علاوه بر این، تعداد کمی از افراد HBs Ag منفی دارای عفونت نهفتهHBV هستند که این افراد دارای HBV DNA در کبد هستند اما ژنوم ویروس ممکن است در سرم آنها وجود نداشته باشد در حالی که شاخصهای سرولوژیکی مثل HBs Ag و Anti-HBc می‌تواند مثبت یا منفی باشد (۱۴). عفونت نهفته Occult hepatitis B virus infection (OBI) به حضور HBV DNA در سرم یا کبد شخص بیمار با شاخص آنتی ژن سطحی S منفی گفته می‌شود و معمولاً در این هنگام میزان HBV DNA در سرم کمتر از۲۰۰IU/ml می‌باشد (۱۲).

بدون شک از مهم‌ترین اهداف سازمان انتقال خون بررسی هر چه دقیق‌تر حضور پاتوژنهای بیماری‌زا از جمله عفونتهای حاد هپاتیت می‌باشد. که با وجود غربالگری خونهای اهدایی از نظر هپاتیت B سازمان انتقال خون شاهد حضور این ویروس در خونهای انتقالی می باشد. در این مطالعه سعی شد آزمون PCR طراحی شده با آزمون الایزای سازمان انتقال خون، مورد مقایسه قرار گیرد.

## مواد و روشها

**نمونه‌ها:** یک نمونه خونی دارای ویروس با بار مشخص (یک میلیارد ذره در هر ml) از آزمایشگاه تخصصی ویروس شناسی کیوان (تهران، خیابان شهید بهشتی، بعد از سینما آزادی به طرف خیابان ولی عصر، پلاک ۴۹۸، طبقه همکف) به عنوان هدیه دریافت شد. همچنین از تعداد ۲۰ فردی که قبلاً توسط سازمان انتقال خون کاشان به عنوان مبتلای قطعی تشخیص داده شده بودند و ۳۰۰ نفر از بین مراجعه کنندگان به سازمان ظرف یک ماه که به صورت تصادفی سیستماتیک انتخاب شدند و همچنین ۲۰ بیمار تالاسمی و ۳۰ بیمار دیالیزی که در زمره دریافت کنندگان دایمی خون از سازمان هستند، نمونه گیری انجام گردید.

**بررسی حضور آنتی ژن S ویروس هپاتیت B:** جهت انجام آزمون الایزا برای ویروس HBV از کیت Murex HBs Ag Version 3 که در سازمان انتقال خون استفاده می‌شود و توسط دستگاه اتوماسیون داوینچی (Davinci) ساخت کشور فرانسه استفاده شد. این آزمایش بر روی سرم انجام گرفت. جهت به دست آوردن سرم از لوله ژل-

دار Vacuum collection system (VACUTEST KIMA، ایتالیا) استفاده شد بدین ترتیب که خون به طور مستقیم توسط این لوله‌ها جمع‌آوری گردید و پس از گذشت زمان ۳۰ دقیقه از خون‌گیری در دمای اتاق، لوله‌ها در دور rpm ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس سرم از بخش بالای ژل لوله جمع‌آوری گردید.

استخراج DNA: طبق روش کار کیت استخراج اسید نوکلئیک (Nucleic acid extraction kit) با نام تجاری RIBO-prep شرکت AmpliSens، DNA مورد نیاز از پلاسمای اهداکنندگان و بیماران تهیه شد. به منظور استخراج DNA از پلاسمای خون استفاده گردید. جهت تهیه پلاسما از لوله‌های EDTAK2 Tube PET (Narang، چین) استفاده شد. بدین منظور نمونه‌های خون به لوله‌های جمع‌آوری انتقال داده شد و به خوبی تکان داده شد تا با ماده ضد انعقاد مخلوط گردد. سپس به مدت ۵ دقیقه در rpm ۲۰۰۰ و دمای اتاق سانتریفیوژ شد و پلاسما برداشت گردید.

DNAی استخراج شده توسط بررسی جذب نوری در طول موج ۲۸۰ تعیین کمیت، و با بررسی نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ تعیین کیفیت گردید.

**طراحی آغازگر**: طراحی پرایمر بر اساس ناحیه با حداکثر همولوژی ژنوم این ویروس در بین کلیه توالیهای گزارش شده پایگاه نوکلئوتید در NCBI با تکیه بر توالیهای مربوط به ایران و کشورهای همسایه انجام گرفت. به منظور یافتن این ناحیه، پس از به دست آوردن توالیهای تک‌تک این ژنومها از نرم‌افزار ClustalW جهت انجام همردیفی چندگانه استفاده شد. توالی پرایمرهای طراحی شده در زیر ذکر شده است:

HBV forward Primer: 5′-TTG TCC TCC AAC TTG TCC TG-3′

HBV reverse Primer: 5′-CCA ATA CCA CAT CAT CCA TAT AGC -3′

پرایمر پیش‌رو منطبق بر موقعیت ۳۴۶ تا ۳۶۵ ژنوم ویروس و پرایمر برگشتی در موقعیت ۷۵۷ تا ۷۳۴ ژنوم ویروس است.

**انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز**: واکنش PCR با غلظت 1X از بافر PCR، ۲/۵ mM از $MgCl_2$، ۰/۲ mM از هر کدام از dNTPها، ۰/۴ pM از هر کدام از پرایمرها، 1U از آنزیم Taq DNA polymerase شرکت سیناژن و در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت.

برنامه PCR یک مرحله ۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد جهت جدا شدن اولیه رشته‌ها، و ۳۵ چرخه شامل مرحله واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۹/۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در پایان یک مرحله ۱۰ دقیقه‌ای دمای پیشروی نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس محصولات PCR با ماده Fluoro Dye DNA Fluorescent Loading Dye رنگ آمیزی و در ژل آگارز ۱درصد الکتروفورز شدند. طول آمپلیگون ۴۱۲ bp است. نتیجه کارتوسط دستگاه GEL DOC مشاهده شد. در تمامی واکنشها از نمونه کنترل مثبت (تهیه شده از آزمایشگاه تخصصی ویروس شناسی کیوان) استفاده گردید.

**Real-Time PCR**: به منظور بررسی صحت نتایج PCR نمونه‌هایی که نتایج آنها با آزمون الایزا مغایرت داشت از آزمون Real-Time PCR استفاده گردید. این آزمایش در آزمایشگاه آریا آزما (قم، میدان سعدی، ساختمان کیمیا) و با استفاده از کیت Geneproof (GeneProof، روسیه)، بر اساس دستورالعمل کیت و توسط کارکنان همان آزمایشگاه انجام گردید.

**آزمون حساسیت**: به منظور تعیین سطح حساسیت کیت مورد استفاده، هم از سرم (الایزا) و هم از خون کامل (PCR) نمونه مثبت رقتهای متوالی تهیه و آزمونهای الایزا و PCR بر روی آنها انجام شد.

## نتایج

به منظور تعیین سطح حساسیت کیت الایزای مورد استفاده، رقتهای ۱/۱۰ تا ۱/۱,۰۰۰,۰۰۰ تهیه شد و با قرائت جذب و مقایسه با پارامتر cut-off همچنان مثبت بود. در ادامه ۱۰ نمونه با رقتهای ۱/۱,۰۰۰,۰۰۰ تا ۱/۱۰,۰۰۰,۰۰۰ تهیه شد و نهایتاً مشخص گردید که کیت Murex تا رقت ۱/۳,۰۰۰,۰۰۰ به حضور HBs Ag حساس است.

در آزمون الایزا از ۳۰۰ نمونه مجهول مراجعه کننده به سازمان انتقال خون، ۲۹۵ مورد فاقد واکنش و ۵ مورد حساس اعلام شد که این ۵ نمونه وارد مرحله آزمون تأییدی شدند که با استفاده از دو آزمون HBc Ab و HBs Ag Confirmatory Test در نهایت تنها یک مورد به عنوان نمونه مثبت، تأیید شد. در مورد بیماران تالاسمی و دیالیزی کلیه نمونه‌ها منفی بود (جدول۱).

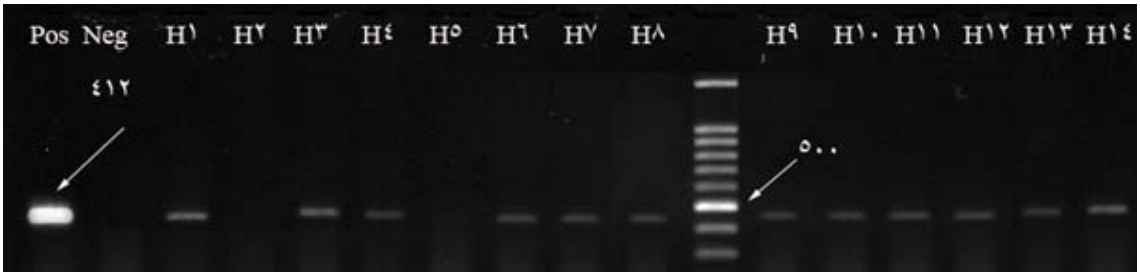
جدول ۱- نتایج آزمون الایزا HBs Ag در نمونه‌های مورد بررسی

| | تعداد کل افراد مورد بررسی | تعداد افراد الایزا مثبت |
|---|---|---|
| داوطلبین سالم اهداء کننده خون | ۳۰۰ | ۵ |
| بیماران همودیالیزی | ۳۰ | ۰ |
| بیماران مبتلا به تالاسمی | ۲۰ | ۰ |
| بیماران HBs Ag مثبت | ۲۰ | ۲۰ |

نتیجه واکنش PCR برای ۳۰۰ داوطلب سالم اهداء کننده‌ی خون، یک مورد مثبت و برای کلیه‌ی افراد دیالیزی و تالاسمی منفی شد (جدول ۲). از ۲۰ نمونه‌ی HBs Ag مثبت گزارش شده توسط سازمان در سال‌های قبل، ۱۸ مورد تأیید شد اما ۲ مورد منفی نشان داده شد (شکل ۱).

جدول ۲- نتایج آزمون PCR در نمونه‌های مورد مطالعه

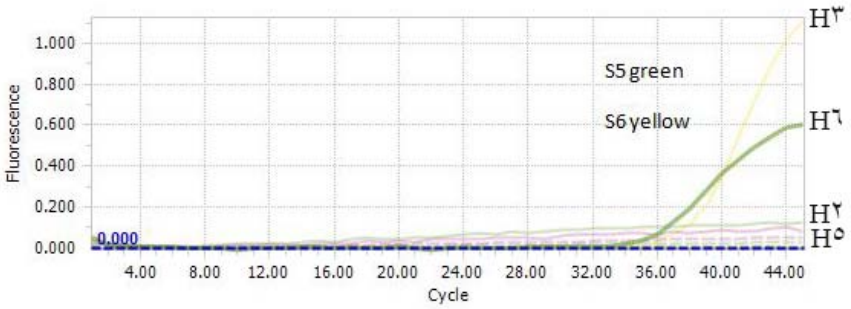
| | تعداد کل افراد مورد بررسی | تعداد افراد HBV DNA مثبت |
|---|---|---|
| داوطلبین سالم اهداء کننده خون | ۳۰۰ | ۱ |
| بیماران همودیالیزی | ۳۰ | ۰ |
| بیماران مبتلا به تالاسمی | ۲۰ | ۰ |
| بیماران HBs Ag مثبت | ۲۰ | ۱۸ |




شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR قطعه ۴۱۲ جفت بازی از ژن S ویروس HBV: از سمت چپ تصویر چاهک ۱ کنترل مثبت. چاهک ۲ کنترل منفی چاهک ۱۱ نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp (SMOBIO). چاهک ۴ و ۷: نمونه‌های HBV-DNA منفی. سایر چاهکها نمونه‌های مثبت شناسایی شده توسط PCR.

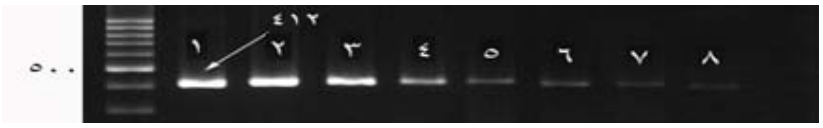
جهت اطمینان از صحت نتایج، ۲ نمونه منفی به همراه ۲ نمونه مثبت در بخش مولکولی آزمایشگاه رازی قم توسط Real-Time PCR با کیت تجاری Gene Proof که دقت آن تا ۱۰ کپی در هر میلی لیتر بود تکرار شد و نتایج تأیید

گردید (شکل ۲).




شکل۲- نتیجه آزمون Real-Time PCR برای نمونه‌های مثبت: H3 (نمودار زرد رنگ) و H6 (نمودار سبز رنگ) که از چرخه ۳۶ به بعد مثبت شدن آن با اوج گرفتن نمودار نمایان می‌شود و نمونه‌های منفی H2 ( نمودار آبی) و H5 (نمودار بنفش) که بدون تغییر تا انتها ادامه دارند.

در بررسی حساسیت آزمون طراحی شده بر اساس تعداد ذرات ویروس موجود در سرم خون با تهیه رقتهای مختلف از DNA، تا ۱۰ میلیون بار رقت قابل شناسایی بود که با توجه به غلظت نمونه مثبت، تا ۱۰۰ ذره ویروس در هر میلی لیتر خون (چاهک ۸) توسط آزمون طراحی شده قابل شناسایی است. نتیجه آزمون در شکل ۳ قابل مشاهده است.




شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR قطعه ۴۱۲ جفت بازی از ژن S ویروس HBV: از سمت چپ تصویر چاهک ۱ : نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp (SMOBIO).چاهک ۲ تا ۸ نمونه کنترل مثبت به ترتیب با رقتهای ۱ تا ۷-۱۰ بار با فواصل ده برابری رقیق شده‌اند.

به منظور ارزیابی اختصاصی بودن روش به کار رفته جهت شناسایی ویروس HBV، از ژنوم سه ویروس DNAیی شامل سایتومگالوویروس (CMV)، ویروس هرپس سیمپلکس (HSV) و ویروس اپشتن-بار (EBV) استفاده شد که نتایج نشان می‌داد هیچ کدام از این سه ویروس با این پرایمرهای طراحی شده تکثیر نمی‌شوند (داده‌ها نشان داده نشده است).

از محصول PCR نمونه‌های مثبت مقدار 3µl روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و پس از تأیید اندازه باند مربوطه، جهت تعیین توالی به شرکت 1st BASE مالزی فرستاده شد. توالیهای ارسالی بعد از عمل تعیین توالی، با توالیهای ثبت شده در بانک ژنومی NCBI، بلست (Blast) شد. نتایج حاصل از بلست نشان داد که محصول PCR پرایمرهای طراحی شده، با توالی ژن S ویروس هپاتیت B ثبت شده در پایگاه NCBI، ۹۹ درصد همولوژی دارند.

## بحث

هپاتیت B یک بیماری با عامل ویروسی از خانواده هپادنا ویریده می‌باشد. این بیماری به عنوان یک مشکل بهداشتی در دنیا و ایران مطرح است. به دلیل انتقال راحت بیماری از راههای مختلف نظیر مخاط، پوست آسیب دیده، مادر به جنین، رفتارهای پرخطر و فقدان شیوع فصلی خاص، بیماری در سراسر دنیا و در تمام سنین قابل مشاهده است. اصلی‌ترین راه انتقال بیماری از راه تزریق خون و همچنین تماسهای نزدیک می‌باشد. از سال ۱۹۶۰ به بعد جهت تشخیص موارد بیماری از روشهای تشخیص سرولوژیکی مختلف مانند روش الایزا، رادیوایمونواسی، لومینسانس و

PCR برای تشخیص و شناسایی این عفونت استفاده شده است که هر کدام از این روشها محاسن و معایبی دارند (۱و۷). روش الایزا از حساسیت بالایی برخوردار است اما بروز جهش در قسمت مرکزی پروموتور در ناحیه پایین دست HBe Ag و تغییر نوکلئوتید A به G موجب می‌گردد که حتی با وجود مقادیر زیادی از ذرات ویروسی در سرم و آلوده بودن فرد، بیشتر کیتهای تشخیصی الایزا قادر به شناسایی این موارد نباشند. بنابراین روش سرولوژیک، روش مناسبی برای پیگیری و کنترل بیماری نیست. روشهایی بر مبنای PCR مانند PCR و Nested PCR از حساسیت بالایی نسبت به روشهای سرولوژیک برخوردار بوده و قادر به شناسایی حتی copy/ml ۱۰-۱ در نمونه می‌باشند. لذا این روشها برای تشخیص و پیگیری عفونت به خصوص عفونتهای مزمن بسیار مناسب هستند.

آزمون HBs Ag منفی در بیمارانی که از نظر DNAی HBV مثبت هستند، می‌تواند دلایل مختلفی داشته باشد. از جمله آنها وقوع جهش در ژن S و یا انجام آزمون در مراحل اولیه عفونت که حتی در صورت آلوده بودن فرد جواب منفی کاذب ایجاد می‌شود. آزمون HBs Ag ۲ تا ۴ هفته بعد از عفونت در سرم مثبت می‌شود، در حالی که HBV DNA از هفته اول عفونت مثبت می‌گردد.

سازمان انتقال خون، به منظور غربالگری اهداکنندگان از نظر هپاتیت B با استفاده از کیت Murex افراد را دسته بندی می‌کند، تعداد زیادی از افراد به این آزمون واکنش نمی‌دهند و خون این دسته از افراد به صورت فرآورده‌های خونی فاقد شاخصهای ویروسی در اختیار مراکز درمانی قرار می‌گیرد (حالت ۱). نمونه‌های واکنش داده با این کیت از چرخه اهدای خون خارج می‌شوند (حالت ۲).

سپس به منظور اطمینان یافتن از آلوده بودن نمونه‌های واکنش داده با کیت فوق، یکی از آزمونهای تکمیلی زیر انجام می شود:

۱) آزمون Confirm (HBs Ag Confirmatory) که برای تأیید حضور آنتی ژن سطحی S هپاتیت B در نمونه‌های سرم یا پلاسما که با کیت Murex HBs Ag مثبت شده، به کار می‌رود.

۲) آزمون Anti-Hbc : مدتی پس از آلودگی، تیتر Anti-Hbc در خون فرد مبتلا افزایش یافته و ممکن است تا پایان عمر حتی پس از بهبودی ثابت بماند.

در هر حال افرادی که آزمون تکمیلی آنها مثبت شود بیمار تلقی شده و جهت مشاوره به پزشک معرفی می‌شوند. به دلایل ذکر شده برای هر آزمون، پزشک مربوطه جهت اطمینان از حضور ویروس در بدن و بررسی مقدار تیتر ویروس به منظور شروع درمان، Real-time PCR را پیشنهاد می‌دهد و در صورت بالا بودن نسخه‌های ویروس، درمان را شروع می‌نماید. این فرآیندها علاوه بر زمان‌بر بودن و افزایش هزینه، معایب دیگری نیز دارند.

ممکن است افرادی باشند که به Murex Hbs Ag پاسخ منفی بدهند اما DNA ویروس و Anti-Hbc در آنها مثبت باشد که در این صورت افراد بیمار از غربالگری سازمان عبور کرده و خون آلوده وارد سیستم انتقال خون شده به افراد نیازمند به دریافت خون تزریق می‌شود و بدین ترتیب باعث انتشار این بیماری خواهد شد. در این صورت با استفاده از روشهای مولکولی می‌توان حضور ویروس را تأیید نمود. از سوی دیگر ممکن است افرادی باشند که بهبود یافته باشند و دیگر ویروسی در بدن آنها نباشد اما به دلیل حساسیت بالای کیت مورد استفاده به عنوان بیمار معرفی شوند و از چرخه اهداء خون حذف گردند. بنابراین اگر در ابتدا به جای انجام آزمون سرولوژیک الایزا آزمون PCR انجام شود، در یک مرحله می‌توان به حضور یا عدم حضور ویروس در افراد پی برد. بنابراین افرادی تحت عنوان مثبت کاذب از چرخه اهداء خون خارج نمی‌شوند یا با خونهای آلوده درمجموعه دهندگان خون باقی نمی-مانند.

در پژوهش حاضر نیز مزیت آزمون PCR بر الایزا تأیید شد چرا که که از بین ۵ نمونه واکنش داده در Murex Hbs Ag تنها یک نمونه در مرحله دوم با آزمونهای تکمیلی مثبت اعلام شد. این در حالی است که با واکنش PCR در یک مرحله، همان یک نمونه تشخیص داده شد. بنابراین ۴ نمونه مثبت کاذب در عین سالم بودن از چرخه اهداء خارج می‌شوند و با وجود تمام هزینه‌هایی که سازمان در قبال این افراد صرف می‌نماید اما این اهداکنندگان را از دست می‌دهد و این خود سالانه خسارت هنگفتی را به سازمان تحمیل می‌نماید.

در این مطالعه، نمونه الایزا منفی که با آزمون PCR مثبت تعیین شود، یا به اصطلاح عفونت هپاتیت مخفی، یافت نشد. اما در مطالعات زیر که در داخل و خارج کشور در سالهای اخیر روی خونهای اهدایی انجام شده چنین مواردی اتفاق افتاده است. پورآذر و همکاران در سال ۲۰۰۵ روی ۵۴۵ نمونه خون اهداشده که از نظر HBs Ag منفی بودند آزمون anti-HBc و HBV DNA انجام دادند که ۴۳ نفر (۸ درصد) anti-HBc مثبت و از این ۴۳ نفر ۵ نفر HBV DNA مثبت بودند (۱۱). بهبهانی و همکاران در سال ۲۰۰۵ روی ۲۰۰۰ نمونه خون اهدایی که HBs Ag آنها منفی گزارش شده بود آزمون anti-HBc انجام دادند که ۱۳۱ مورد (۶/۵۵ درصد) مثبت و از این تعداد ۱۶ مورد (۱۲/۲ درصد) HBV DNA مثبت بودند (۲). واعظ جلیلی در تحقیقی در سال ۲۰۱۱ روی ۱۰۰۰ نمونه خون اهداء شده که HBs Ag آنها منفی بود آزمون anti-HBc انجام داد که ۸۰ نمونه (۸ درصد) مثبت و از این ۸۰ نمونه ۵۰ درصد دارای HBV DNA بودند (۱۵). هنینگ در سال ۲۰۰۲ از میان ۱۴۲۵۱ اهداء کننده بار اول، ۲۱۶ مورد (۱/۲۵ درصد) که anti-HBc مثبت داشتند. ۲۰۵ نمونه مورد آزمون HBV DNA قرار گرفتند که ۱۷ مورد مثبت بود (۵). کلینمن در سال ۲۰۰۳ روی ۳۹۵ نمونه خون HBs Ag منفی آزمون PCR انجام داد که ۴ مورد (۳/۷ درصد) مثبت و حاوی HBV DNA بود (۶).

حصونا و همکارانش در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۱ در مصر روی ۵۴۱۰ نمونه خون اهداء شده که HBsAg آنها منفی گزارش شده و سالم تشخیص داده شده بودند آزمون HBV DNA انجام دادند که در نهایت ۴۸ مورد (۰/۹ درصد) از این نمونه ها مثبت بودند (۴). در پژوهشی که اخیراً توسط اولوئینکا در نیجریه روی ۴۲۹ اهداء کننده خون انجام شد ۷۲ مورد (۱۷ درصد) HBV DNA به عنوان عفونت نهفته خون تشخیص داده شد (۱۰). زیانلین یه و همکارانش نیز در مطالعه‌ای روی ۱۰۳۳ اهداء کننده خون مراجعه کننده به مرکز اهدای خون شنژن در جنوب چین در سال ۲۰۱۴ آزمون anti-HBc و HBV DNA انجام دادند که از این تعداد ۱۴ مورد دارای عفونت نهفته HBV بودند (۱۸).

در این پژوهش غربالگری HBV DNA روی گیرندگان خون و فرآورده‌های خونی که بیماران تالاسمی وهمودیالیزی می‌باشند انجام داده شد و مورد مثبتی مشاهده نگردید که یک دلیل آن را می‌توان واکسینه بودن این بیماران در برابر HBV دانست. در مطالعه‌ای که توسط زهره شریفی در سال ۲۰۰۹ در مرکز انتقال خون تهران بر روی ۹۹ کودک تالاسمی صورت گرفت نتایج حاصل با نتایج این پژوهش همخوانی داشت (۱۳). این افراد در ۳ نوبت واکسن نوترکیب دریافت کرده بودند. به دلیل این که بیماران تالاسمی مکررا تزریق خون دارند، لذا از گروههای پرخطر محسوب می‌شوند. در این بررسی از روش الایزا و Nested PCR جهت بررسی عفونت هپاتیت B استفاده گردید. از ۹۹ کودک، ۸۹ نفر بعد از واکسیناسیون از نظر HBs Ab مثبت بوده، اما در بررسی با روش Nested PCR از نظر وجود HBV DNA تمام ۹۹ نفر منفی بودند و مورد مثبتی یافت نگردید (۱۳).

در مجموع، آزمون PCR طراحی شده در این پژوهش در مطالعات مقدماتی توانست با حساسیت بالاتر نسبت کیت تجاری الایزای سازمان انتقال خون و با اختصاصیت کامل،

نمونه‌های آلوده به ویروس هپاتیت B را تشخیص دهد. بنابراین به نظر می‌رسد اگر مطالعات تکمیلی به خصوص درباره اختصاصیت آن علیه سایر پاتوژنها تأیید گردد می تواند جایگزین الایزا گردد و در نتیجه هزینه‌ها را کاهش دهد و تنها با یک مرحله آزمایش وجود ویروس را در نمونه تأیید نماید. به علاوه از حذف بی دلیل اهداء کنندگان مجاز جلوگیری به عمل آید.

## منابع


1- Alavian, S.M., Keyvani, H., Rezaei, M., Ashayeri, N. and Sadeghi, H.M., 2006. Preliminary report of hepatitis B virus genotype prevalence in Iran. *World journal of gastroenterology*, *12*(32), p.5211.

2- Behzad-Behbahani, A., Mafi-Nejad, A., Tabei, S.Z., Lankarani, K.B., Rashidi, M, Rasouli, M., Pourabbas, B., Torab, A. and Salah, A.R., 2015. Indication of anti-HBc antibody screening and HBV-DNA detection in diagnosing latent hepatitis B virus infection. *Iranian Journal of Medical Sciences*, *30*(1), pp.28-33.

3- Gulia, S.P., Panda, S., Sitaramam, E. and Reddy, K.P., 2011. Seroprevalence of Hepatitis B Virus infection among blood donors in local population. *Internet. J. Pathol*, *12*(1).

4- Hassuna, N.A., Mohamed, Z.M., Eleuoon, S.M.A. and Hamid, M.A., 2015. Prevalence of Hepatitis B Virus (HBV), Hepatitis C Virus (HCV) Infection and their Co-infection among Blood Donors in Minia Governorate, Egypt. *British Journal of Medicine & Medical Research*, 5(8), pp.987-993.

5- Hennig, H., Puchta, I., Luhm, J., Schlenke, P., Goerg, S. and Kirchner, H., 2002. Frequency and load of hepatitis B virus DNA in first-time blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. *Blood*, *100*(7), pp.2637-2641.

6- Kleinman, S.H., Kuhns, M.C., Todd, D.S., Glynn, S.A., McNamara, A., DiMarco, A., Study, F.T.R.E.D. and Busch, M.P., 2003. Frequency of HBV DNA detection in US blood donors testing positive for the presence of anti□HBc: implications for transfusion transmission and donor screening. *Transfusion*, *43*(6), pp.696-704.

7- Kluwer W. 2010, HBV vaccine Side Effects, Drug Information, *Medical Journal*, 7, pp.103-105.

8- Lavanchy D., 2004. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *Journal Viral Hepatology*, 11, pp.97-107.

9- Nwobegahay, J.M., Njukeng, P.A., Kengne, M. and Roger, C., 2016. Prevalence of Hepatitis B virus infection among blood donors at the Yaounde Military Hospital, Cameroon. *Microbiology Research International*. 4(2), pp.6-10.

10- Oluyinka, O.O., Van Tong, H., Tien, S.B., Fagbami, A.H., Adekanle, O., Ojurongbe, O., Bock, C.T., Kremsner, P.G. and Velavan, T.P., 2015. Occult hepatitis B virus infection in Nigerian blood donors and hepatitis B virus transmission risks. *PloS one*, *10*(7), p.e0131912.

11- Pourazar, A., Salehi, M., Jafarzadeh, A., Kazemi Arababadi, M., Oreizi, F. and Shariatinezhad, K., 2005. Detection of HBV DNA in HBsAg negative normal blood donors. *Iranian Journal of Immunology*, *2*(3), pp.172-176.

12- Romanò, L., Velati, C., Cambiè, G., Fomiatti, L., Galli, C., Zanetti, A.R. and SIMTI study group for HBV infection among first-time blood donors, 2013. Hepatitis B virus infection among first-time blood donors in Italy: prevalence and correlates between serological patterns and occult infection. *Blood Transfus*, *11*(2), pp.281-288.

13- Sharifi, Z., Milani, S. and Shooshtari, M.M., 2010. Study on efficacy of hepatitis B immunization in vaccinated beta-thalassemia children in Tehran. *Iranian journal of pediatrics*, *20*(2), p.211.

14- Sosa-Jurado, F., Rosas-Murrieta, N.H., Guzman-Flores, B., Zempoaltecalt, C.P., Torres, A.P.S., Rosete, L.R., Bernal-Soto, M., Marquez-Dominguez, L., Melendez-Mena, D., Torres, M.A.M. and Delgado, M.T.L., 2016. Prevalence of Serologic Hepatitis B Markers in Blood Donors From Puebla, Mexico: The Association of Relatively High Levels of Anti-Core Antibodies With the Detection of Surface Antigen and Genomic DNA. *Hepatitis Monthly*, *16*(6):e36942.

15- Vaezjalali, M., Rashidpour, S., Rezaee, H., Hajibeigi, B., Zeidi, M., Gachkar, L., Aghamohamad, S., Najafi, R. and Goudarzi, H., 2013. Hepatitis B viral DNA among HBs antigen negative healthy blood donors. *Hepatitis monthly*, *13*(3): e6590.

16- WHO, 2013 WHO urges governments to act on hepatitis threat [Internet]. WHO. Available from: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/hepatitis_threat_20130724/en./

17- WHO, 2015. Media Centre. Blood safety and availability. [Internet]. WHO. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets /fs279/en./

18- Ye, X., Li, T., Xu, X., Du, P., Zeng, J., Zhu, W., Yang, B., Li, C. and Allain, J.P., 2016. Characterisation and follow-up study of occult hepatitis B virus infection in anti-HBc-positive qualified blood donors in southern China. *Blood transfusion= Trasfusione del sangue*, pp.1-7.

# The designation of PCR test to detect hepatitis B virus and evaluate the performance of this test in screening applicants of blood transfusion organization

**Nakhaei Sistani R.[1] and Sadatolhosseini S.M.[2,3]**

**[1] Biotechnology Division, Cell and Molecular Biology Dept., Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, I.R. of Iran**

**[2] Molecular Genetics Dept., Azad University of Zanjan, Zanjan, I.R. of Iran**

**[3] Blood Transfusion Organization, Kashan, I.R. of Iran.**

## Abstract

Hepatitis B virus (HBV) is of common viruses that transmitted by blood and blood products. The aim of this study is to design a polymerase chain reaction-based test to detect HBV in clinical samples. In this study, one blood sample with known load of HBV is prepared to assess the ability of designed primer pair. The specificity of the primer pair was somewhat confirmed by testing against three common virus types, in addition to bioinformatics analysis. The test was also used to screen applicants of blood transfusion organization of Kashan and its results compared with results of a current method used by this organization. The results of this study showed that the designed primer pair specifically amplifies the HBV genome and its sensitivity is 100 particle per ml of blood, which is more sensitive than the results of the ELISA method currently used in blood transfusion organization. In clinical samples, however, the results of the polymerase chain reaction (PCR) test were completely in accordant with the results obtained by blood transfusion organization after confirmatory tests. The designed test has no false positive results in contrast to ELISA, which, in addition to preventing the exclusion of healthy volunteer blood donors, could also have a significant role in reducing costs of the organization. So, it seems that it can replace the current screening method of this virus, that firstly the cost of doing it is much lower and secondly a part of bona fide person are not prevented from donating blood.

**Key words:** PCR, ELISA, hepatitis B