شواهد سرولوژیک و مولکولی هپاتیت B در بیماران مبتلا به هپاتیت C مزمن

دکتر زهرا هنرکار[۱]، دکتر سید مؤید علویان[۲]، دکتر شهرام سمیعی [۳]، دکتر کیوان سعید فر[۴]، دکتر مهناز بالادست [۵]، دکتر رحیم آقازاده[۶]، دکتر محدرضا زالی[۷]

چکیده

مقدمه: هپاتیت B مخفی[۸] حالتی است که آنتی ژن سطحی هپاتیت B[۹] در سرم بیمار منفی بوده ولی DNA ویروس هپاتیت B[۱۰] در سرم یا بافت کبدی ایشان قابل کشف باشد. در این مطالعه فراوانی هپاتیت B مخفی در بیماران هپاتیت C مزمن ونیز تغییرات بیوشیمیایی و هیستولوژیک آنان تحت بررسی قرار گرفت.

روش کار : در این مطالعه توصیفی نمونه‌گیری به صورت مبتنی بر هدف انجام شد، به طوری که ۲۷ بیمار هپاتیت C مزمن که HBsAg آنها منفی بوده و طی سالهای ۱۳۸۰ و ۱۳۸۱ به دو مرکز هپاتیت تهران و مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مراجعه وتحت نمونه برداری کبد قرار گرفته بودند وارد مطالعه شدند. بر روی بلوک پارافینی نمونه کبدی این بیماران آزمایشات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[۱۱] برای وجود HBVDNA و نیز آزمایش‌های ایمونوهیستو شیمی[۱۲] برای حضور و کشف HBsAg و آنتی ژن مرکزی هپاتیت B[۱۳] انجام گرفت.

نتایج: از میان ۲۷ نمونه بررسی شده PCR بیماران در ۵ مورد (۱۹درصد) از نظر HBVDNA مثبت گزارش شد. در کلیه این بیماران تست‌های IHC از نظر HBsAg و HBcAg منفی گزارش گردید. تغییرات هیستولوژیک سیروز و علائم سیروز جبران نشده فقط در گروه HBVDNA مثبت دیده شد.

نتیجه گیری: فراوانی هپاتیت B مخفی در بیماران مبتلا به هپاتیت C نسبتا قابل توجه است. در این بیماران، هپاتیت B مخفی می تواند آسیب به کبد را تشدید نموده ، روند پیشرفت به طرف سیروز را تسریع نماید.

واژگان کلیدی: هپاتیت B مخفی، بیماری مزمن کبدی، هپاتیت C، HBsAg، HBVDNA

۱- فوق تخصص گوارش، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

۲- دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله.

۳- دکترای بیوشیمی، سازمان انتقال خون ایران.

۴و ۵- پزشک ، محقق مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

۶- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

۷- استاد، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

8 - Occult hepatitis B
9 - HBsAg
10 - HBVDNA
11 - PCR: Polymerase chain reaction.
12 - IHC: Immunohistochemistry
13 - HbcAg

مقدمه

ویروس هپاتیت B [1] و هپاتیت C [2] هر دو از طریق خون و تماس جنسی انتقال می یابند. عفونت با هر دو نوع ویروس شایع است. مخصوصاً در مناطقی که هر دو ویروس اندمیک هستند و نیزدر بیمارانی که ریسک بالایی از عفونت‌های تزریقی دارند. عفونت HCV از طریق آنتی‌بادی‌های اختصاصی و نیز RNA ویروس در سرم تشخیص داده می شود.عفونت HBV معمولا از طریق مثبت شدن HBsAg شناخته می شود. مطالعات زیادی وجود عفونت HBV در بیماران فاقد HBsAg در سرم را با یا بدون نشانگان سرمی عفونت قبلی (HBcAb یا HBsAg) به اثبات رسانده است. دلایل عدم وجود HBsAg در سرم شناخته نشده است. ولی ممکن است بدلیل تغییر و دوباره چینی ردیف ژنی ژنوم HBV که با بیان ژنی آن تداخل می کند یا به دلیل تولید یک نوع پروتئین S تغییر شکل یافته باشد (۸-۱).

عفونت هپاتیت B مخفی به طور شایع در بیماران با هپاتیت C مزمن گزارش شده است. شواهد قابل توجهی وجود دارد که هپاتیت B مخفی می تواند آسیب به کبد را تشدید نموده و یا باعث ایجاد سرطان سلول کبدی شود(۸-۱).

علیرغم اهمیت بالینی بالقوه ، شیوع هپاتیت B مخفی در بیماران با هپاتیت C خصوصا در ایران هنوز به درستی معلوم نیست. در این مطالعه ، غیر از تعیین فراوانی هپاتیت B مخفی در بیماران با هپاتیت C مزمن ، تغییرات پاتولوژیک و سرولوژیک این بیماران را نیز مد نظر قرار داده ایم .

روش کار

۲۷ بیمار باتشخیص قطعی هپاتیت مزمن C (وجودآنتی بادی ویروس هپاتیت C [3] وRNA ویروس هپاتیت C [4] مثبت در سرم) از دو مرکز، مرکز هپاتیت تهران و مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد که در سالهای ۱۳۸۱-۱۳۸۲ تحت نمونه برداری کبدی قرار گرفته بودند وارد این مطالعه شدند.مطالعه به صورت توصیفی وروش نمونه گیری مبتنی بر هدف بود.معیارهای ورود به مطالعه عبارت بودند از : ۱- بیماری مزمن کبدی (افزایش آنزیمهای کبدی یا اختلال عملکرد کبد بیش از شش ماه) ۲- منفی بودن HBsAg در سرم ۳- وجود نمونه بافت کبدی ۴- عدم دریافت درمان ضد ویروس. نمونه های پارافینی این بیماران از بخش پاتولوژی تحویل گرفته شد. بر روی نمونه ها آزمون جداسازی HBVDNA به روش PCR و نیزآزمون ایمونو هیستو شیمی برای HBcAg و HBsAg انجام شد. تمام مراحل آزمایشگاهی در آزمایشگاه سازمان انتقال خون ایران با دقت زیاد و بهترین فن آوری انجام گرفت.

اطلاعات بهداشتی بیماران (سابقه قبلی هپاتیت ، تزریق خون ، اعتیاد تزریقی ، اعمال جراحی و خالکوبی)، اطلاعات فردی (سن ، جنس و وزن)، آزمایشات بیوشیمیایی (قندخون ، چربی‌های خون ، آنزیم‌های کبدی و الکتروفورز پروتئین) و اطلاعات سرولوژیک (آنتی

1- HBV
2 - HCV

3 -HCVAb.
4- HCVRNA.

بـادی‌هـای ویـروس هپاتیـتB) از پرونـده بیمـاران جمع‌آوری گردید .

بر اساس اطلاعات پاتولوژیک هپاتیت مـزمن یـا سیروز بر طبق معیارهای بین المللی(۹)، تغییرات مختـصر و گـاهی غیـر اختـصاصی شـامل اسـتاتوز ، دیلاتاسـیون سینوزوئیدی و التهاب مختصر یا نکروز گزارش شده بود.

ایمونوهیـستو شـیمی : رنـگ آمیـزی ایمونـوپر اکسیداز برای HBcAg و HBsAg برروی کلیه نمونه‌های کبدی بوسیله کیت های[1] شرکت داکو[2] انجام شد. نمونه‌ها با میکروسکوپ ایمونوفلورسانت تفسیر گردید.

جدا سـازیHBVDNA بـه روش گریـر[3] (۱۰) از نمونه های پارافینی انجام گرفت. ملاحظات کـافی جهـت جلوگیری از آلـودگی متقابـل صـورت گرفـت. هـر سـت PCR شامل ۱۲ نمونه بود :۷ نمونه بافت پـارافینی ، ۳ عـدد آب به عنـوان نمونـه منفـی و ۲ نمونـه مثبـت بـرای اثبـات حساسیت معادل ۳۰۰ و ۳۰۰۰ ژنـوم در میلـی لیتـر جهـت انجام PCR دو پرایمر[4] به کار رفت.

به طور خلاصـه ۶ میکرولیتـر از DNA بـرای ۳۵ سیکل، ۴۵ درجه سانتیگراد بـرای یـک دقیقـه ، ۶۰ درجـه سانتیگراد برای یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد برای یک دقیقـه و جهـت اکستانـسیون نهـایی ۷۲ درجـه سـانتیگراد برای۱۰دقیقه در ۲۰ میکرولیتر محلول واکنشی حـاوی ۱۰ میلی مول تریس – هیدروکلرایدpH ۸/۳[5]، ۱/۵ میلی مـول منیزیوم کلراید ۲ (شرکت پرومگا[6])، ۵۰ میلی مول پتاسیم کلرایـد[7]، ۲۰۰ مـول dNTP (شـرکت رش[8])، ۱/۵ واحـد Taq-polymerase و ۰/۵ مـــول از هـــر پرایمـــر مـــورد آمپلیفکاسیون قرار گرفت.

در آنالیز آماری از آزمون دقیق فیشر، تست تـی دانش آموزی و تست من – ویتنی استفاده شد. p کمتـر از ۰/۰۵ ارزشمند تلقی شد.

جهـت شـرکت در ایـن مطالعـه از کلیـه بیمـاران جهت شرکت در مطالعه رضایت نامه کتبی اخذ گردید.

نتایج

۲۷ بیمار با هپاتیـت C و HBsAg منفـی شـامل ۱۹ بیمار مرد (۷۰درصد) و ۸ بیمار زن (۳۰درصد) بـا سـن متوسط ۳۲/۴۸ سال مورد مطالعه قرار گرفتند.

HBVDNA در۵ بیمـار از ۲۷ بیمـار هپاتیـت C مثبت گزارش شد. همانطور که در جدول شـماره ۱ نـشان داده شده است ، اختلاف معنی‌داری بین دو گـــــــروه HBVDNA مثبـت و HBVDNA منفـی از لحـاظ سـن ، جـنس ، علایـم بـالینی ، سـطح آنـزیم‌هـای کبـدی و آنتی بادی‌های ضد هپاتیت B دیده نشد.

بیشتر بیماران با علامت هپاتیت مزمن یـا علایـم غیـر اختـصاصی مراجعـه نمـوده بودنـد. علایـم غیـر اختصاصی وخفیـف فقـط در گـروه HBVDNA منفـی و علائم ناشی از سـیروز بیـشتر درگـروه HBVDNA مثبـت

1-Clone HBcAg, lot No:128, antibody concenteration: 1/500 code No: BO586
Clone HBsAg: 3E7, lot No:058, antibody concenteration: 1/50and code No: M3506
2 - DAKO
3 - Greer.
4 -ATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACT Primer#1 (nt109-139).
AGCCCCTACGAACCACTGAACAAATGGCAC Primer 2R (nt 555-586).

5 -Tris- HCl pH8.3.
6 - MgCl 2.
7 -KCl.
8 -Roche.

دیده شد. هرچند اختلاف دو گروه از لحاظ آماری معنی‌دار نبوده است.

HBcAb در۱۲ بیمار و HBsAb در۳ بیمار در دسترس بود. HBcAb در ۴۰ درصد و HBsAb در ۲۰ درصد از بیماران دارای HBVDNA مثبت بود. رابطه معنی‌داری بین وجود HBcAb یا HBsAb با HBVDNA مثبت وجود نداشت.

آزمون ایمونوهیستوشیمی از نظر HBcAg و نیز HBsAg در همه بیماران منفی بود.

از لحاظ پاتولوژی ، هپاتیت مزمن در۲۵ بیمار (۹۳ درصد) و سیروز در ۲ بیمار (۷ درصد) دیده شد.

HBVDNA در ۵ بیمار مثبت بود. با توجه به اشکال مختلف هیستو پاتولوژیک در بیماران با HBVDNA مثبت ۴۰درصد سیروز و ۶۰ درصد هپاتیت مزمن گزارش شده بود. هر چند هپاتیت مزمن بیشتر در بیماران با HBVDNA منفی و سیروز فقط در بیماران HBVDNA مثبت دیده شد ، ولی از لحاظ آماری این اختلاف معنی‌دار نبود.

جدول ۱. خصوصیات بالینی، بیوشیمایی و هیستولوژیک بیماران هپاتیتC براساس وجود HBVDNA

HBVDNA / خصوصیات بیماران	HBVDNA+ تعداد :۵	HBVDNA- تعداد:۲۲
سن(سال)	۴۱±۱۴	۲۷±۱۸
نسبت جنس(مذکر/مونث)	۱/۴	۷/۱۵
تظاهرات بالینی		
سیروز جبران نشده	۱ (۲۰)	۰ (۰)
علایم غیر اختصاصی	۴ (۸۰)	۲۲ (۱۰۰)
آنزیمهای کبدی (واحد/لیتر)		
AST	۹۸۸±۷۸	۱۱۸±۸۷
ALT	۱۵۳±۱۶۱	۱۵۷±۱۷۳
سرولوژی		
HBcAb+	۲(۴۰)	۱۰(۴۵/۵)
HBsAb+	۱(۲۰)	۲ (۹/۱)
پاتولوژی		
سیروز	۲(۴۰)	۰ (۰)
هپاتیت مزمن	۳(۶۰)	۲۲(۱۰۰)

ارقام داخل پرانتزمعرف درصد هستند.

بحث

در مطالعه ما وجود عفونتHBV را در بیماران با هپاتیت C مزمن و HBsAg منفی مورد بررسی قرار دادیم. مطالعه ما نشان داد که ۱۸/۵درصد بیماران با هپاتیتC مزمن علیرغم منفی بودن HBsAg سرم از نظر HBVDNA مثبت بودند. این فراوانی کاملاً قابل توجه

است (۱۱-۱، ۱۳). عفونت همزمان HBV و HCV در اتریش ۲۲درصد، در ژاپن۸۷ درصد، در اسپانیا ۴۹ درصد و در فرانسه فقط ۵/۵ درصد گزارش شده است.وجود این اختلاف در فراوانی هپاتیت B مخفی در بیماران با هپاتیت C به دلیل اختلاف در حساسیت روش‌های مورد استفاده در کشف ژنوم ویروس، اختلاف در مقدار ذرات HBV ، ویرمی[1] و نیز اختلاف جغرافیایی از نظر شیوع عفونتHBV می باشد(۷، ۱۴، ۱۵).

در مطالعه ما بین دو گروه HBVDNA مثبت و HBVDNAمنفی از لحاظ سطح آنزیم‌های کبدی اختلافی دیده نشد، ولی دیده شده است که در بیماران با هپاتیت C مزمن و عفونت همزمانHBV سطح آنزیم‌های کبدی و فعالیت نسجی بالاتر است(۱، ۱۸). HBcAb در ۴۰ درصد و HBsAb در ۲۰ درصد از بیماران با HBVDNA مثبت دیده می شد.در سایر مطالعات نیز نشان داده شده است که شیوع آنتی بادی ضد هپاتیت C در بیماران با آنتی بادی ضد HBc بیشتر است(۱-۱۳، ۱۶).

در مطالعه ما، هر دو بیمار سیروز فقط در گروه HBVDNA مثبت دیده شد. به عبارت دیگر۴۰درصد بیماران با هپاتیت B مخفی مبتلا به سیروز بودند. در سایر مطالعات نیز عفونت مخفی HBV در بیماران با هپاتیت C، به طور قابل توجه با وجود سیروز در ارتباط بوده است. این بدان معناست که عفونت مخفی یا HBV می‌تواند باعث تسریع در تبدیل هپاتیت مزمن به سیروز گردد. نشان داده شده است که تکثیر مخفی HBV در مقادیر کم می‌تواند پیشرفت به طرف سیروز را در بیماران با هپاتیتC مزمن تشدید نماید. از طرف دیگر وقوع عفونت همزمان HBV وHCV در بیماران غیر سیروزی هپاتیتC نسبتا پائین است(۱، ۱۷-۳).

سیروز بطورکلی مهم‌ترین فاکتور خطر برای ایجاد کارسینوم سلول کبدی در نظرگرفته می‌شود. بنابراین عفونت مخفی با HBV علاوه بر توانایی در سرطان‌زایی مستقیم می تواند در بیماران با هپاتیت مزمنC باعث ترانسفورماسیون سرطانی از طریق تشدید ایجاد سیروز گردد. عفونت مخفی با HBV با عدم پاسخ به درمان با انترفرون در بیماران هپاتیت مزمن همراه است. در این بیماران پس ازدرمان با انترفرون سطح HCV پائین آمده در حالیکه سطح HBV سرم تغییری نمی کند. دیده شده است که ژنوتیپ 1b در عفونت همزمان HCV وHBV شایع تر است(۱، ۱۴).

عفونت هپاتیت مخفی معمولا به دلیل سرکوب شدید تکثیر ویروس و بیان ژنی است. در عفونت همزمان HBV وHCV، ویروس هپاتیت C باعث سرکوب فعالیت HBV می‌شود(۳). علت منفی شدن HBsAg سرم، علیرغم تداوم عفونت باHBV نا مشخص است ولی به فاکتورهای مربوط به خود ویروس یا فاکتورهای مربوط به میزبان اشاره شده است. فاکتورهای ویروسی شامل تداخل اثر با ویروس هپاتیتC یا یک ویروس ناشناخته جدید، جهش ژنی در منطقهcore promoter یا جهش در منطقه کد کننده HBsAg ژنوم ویروس، مخصوصا در ژنS می‌باشند. عوامل مربوط به میزبان نیز در منفی بودن HBsAg موثرند. گفته می شود که مکانیزم‌های ایمنی

1 -Viremia.

میزبان، عفونت HBV را در یک شرایط خفته نگاه داشته تا زمانی که انتقال به فرد دیگری باعث فعال‌تر شدن ویروس شود. مخصوصاً وقتی که داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی مصرف گردند(۶-۱، ۱۱، ۱۹-۱۳).

در مطالعه ما، آزمون ایمینوهیستوشیمی برای دو آنتی ژن c و s در همه بیماران با بیماری مزمن کبدی، حتی بیماران با HBVDNA مثبت، منفی گزارش شد. به نظر می رسد تمام عواملی که در بالا ذکر شد و باعث منفی شدن HBsAg سرم می گردند ، شامل سرکوب شدن قوی تکثیر ویروس و نیزکاهش بیان ژنی آن، باعث منفی شدن آزمون ایمینوهیستیوشیمی نیز گردیده اند(۲۰).

به دلیل شیوع بالای هپاتیت B درایران وعوارض دراز مدت آن ونیز به دلیل آمار رو به تزاید هپاتیت C ، عفونت هم زمان این دو نیازمند توجه و بررسی دو چندان با تعداد بیشتری بیمار می باشد.

کلیه هزینه های مربوط به این طرح تحقیقاتی توسط مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی پرداخت گردید، که به این وسیله از این مرکز قدردانی به عمل می آید.

منابع

1. Hu KO, Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. J Viral Hepat 2002; 9(4):243-57.
2. Chemin I, Jeantet D, Kay A, Trepo C. Role of silent hepatitis B virus in chronic hepatitis B surface antigen (-) liver disease. Antiviral Res 2001; 52(2):117-23.
3. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. N Engl J Med 1999; 341(1):22-6.
4. Chan HL, Tsang SW, Leung NW, Tse CH, Hui Y, Tam JS, Chan FK, Sung JJ. Occult HBV infection in cryptogenic liver cirrhosis in an area with high prevalence of HBV infection. Am J Gastroenterol 2002; 97(5):1211-5.
5. Komori M, Yuki N, Nagaoka T, Yamashiro M, Mochizuki K, Kaneko A, Yamamoto K, Hikiji K, Kato M. Long-term clinical impact of occult hepatitis B virus infection in chronic hepatitis B patients. J Hepatol 2001; 35(6):798-804.
6. Hennig H, Puchta I, Luhm J, Schlenke P, Goerg S, Kirchner H. Frequency and load of hepatitis B virus DNA in first-time blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. Blood 2002;100(7):2637-41.
7. Kazemi-Shirazi L, Petermann D, Muller C. Hepatitis B virus DNA in sera and liver tissue of HBsAg negative patients with chronic hepatitis C. J Hepatol 2000; 33 (5) : 785 - 90.
8. Yuki N, Nagaoka T, Yamashiro M, Mochizuki K, Kaneko A, Yamamoto K, Omura M, Hikiji K, Kato M. Long-term histologic and virologic outcomes of acute self-limited hepatitis B. Hepatology 2003; 37(5):1172-9.
9. Terminology of chronic hepatitis. International Working Party. Am J Gastroenterol 1995;90(2):181-9
10. Greer CE, Lund JK, Manos M . PCR Amplification from paraffin – embedded tissue: Recommendation on Fixative for long term storage and prospective studies. PCR Methods and Applications 1991;1:46-50.
11. Mei SD, Yatsuhashi H, Parquet MC, Hamada R, Fujino T, Matsumoto T, Inoue O, Koga M, Yano M. Detection of HBV RNA in peripheral blood mononuclear cells in patients with and without HBsAg by

reverse transcription polymerase chain reaction. Hepatol Res 2000; 18(1):19-28.
12. Cabrerizo M, Bartolom J, Caramelo C, Barril G, Carreno V. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases. Hepatology 2000; 32(1):116-23.
13. Berasain C, Betes M, Panizo A, Ruiz J, Herrero JI, Civeira MP, Prieto J. Pathological and virological findings in patients with persistent hypertransaminasaemia of unknown aetiology. Gut 2000; 47(3):429-35.
14. Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection and liver disease: fact or fiction? J Hepatol 2001; 34(3):471-3.
15. Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Brechot P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? Hepatology 2001; 34(1):194-203.
16. Blackberg J, Kidd-Ljunggren . Occult hepatitis B virus after acute self-limited infection persisting for 30 years without sequence variation. J Hepatol 2000; 33(6):992-7.
17. Fan CL, Wei L, Jiang D, Chen HS, Gao Y, Li RB, Wang Y. Spontaneous viral clearance after 6-21 years of hepatitis B and C viruses' co-infection in high HBV endemic area. World J Gastroenterol 2003; 9(9):2012-6.
18. Liaw YF, Yeh CT, Tsai SL. Impact of acute hepatitis B virus superinfection on chronic hepatitis C virus infection. Am J Gastroenterol 2000; 95(10):2978-80.
19. The incident investigation teams and others. Transmission of hepatitis B to patients from four infected surgeons without hepatitis B e antigen. N Engl J Med 1997; 16;336(3):178-84.
20. Guido M, Thung SN, Fattovich G, Cusinato R, Leandro G, Cecchetto A, Cesaro S, Panese P, Rugge M. Intrahepatic expression of hepatitis B virus antigens: effect of hepatitis C virus infection. Mod Pathol 1999; 12(6):599-603.