

بررسی فراوانی HBSAb, HBCAb, HCV Ab در افراد داوطلب اهدای خون سرونگاتیو برای HBSAg

دکتر حسن سلمان روغنی*

چکیده

مقدمه: منشا ابتلا به هپاتیت B در بعضی از افراد مشخص نمی‌باشد. همچنین مواردی از هپاتیت B در اثر انتقال خون با تمام احتیاط‌های لازم به جهت جلوگیری از انتقال بیماری گزارش شده است لذا به نظر می‌رسد باید موارد Occult Hepatitis B(OHB) را مشخص کرد و از این طریق، از انتقال هپاتیت B جلوگیری کرد. مطالعات متعدد همزمانی (OHB) را با مثبت بودن HBCAb در افراد سرونگاتیو HBSAg نشان داده است. هدف از این پژوهش تعیین شیوع HBSAb, HBC Ab, HCVAb در بیماران داوطلب اهدای خون که فاقد آنتی ژن سطحی هپاتیت B (HBSAg) می‌باشد.

روش بررسی: این مطالعه یک مطالعه توصیفی - مقطعی است که بر روی ۱۲۳۰ فرد داوطلب مراجعه کننده به سازمان انتقال خون شهر یزد انجام شد از بیماران بعد از بررسی‌های لازم و ثبت اطلاعات خون جهت بررسی HBSAb, HBCAb, ALT, AST گرفته شد. HBSAb, HBCAb, HCVAb با استفاده از کیت‌های «بهرینگ» ساخت آلمان انجام و برای بیماران HBCAb مثبت بررسی از نظر وجود آنتی بادی علیه آنتی ژن سطحی (HBSAb) انجام شد. بیماران مبتلا به HCVAb تحت بررسی هیستولوژیک، با انجام بیوپسی کبد قرار گرفتند.

نتایج: ۱۵/۱٪ جامعه مورد بررسی HBCAb+ بودند که از این تعداد ۵۱/۶٪ HBSAb مثبت بودند بین مثبت بودن HBCAb و سطح آمینوترانسفراز رابطه‌ای وجود نداشت در بیماران با HCVAb مثبت، ۵۰٪ بیماران آمینوترانسفراز بالا داشتند و در بررسی بافت‌شناسی همه بیماران دارای التهاب در کبد بودند.

نتیجه‌گیری: ۱۵/۱٪ افراد داوطلب انتقال خون سرونگاتیو برای HBSAg، دارای HBCAb+ هستند و به نظر می‌رسد در این افراد شیوع Occult Hepatitis B بسیار بالا باشد لذا بررسی تست‌های تکمیلی در این افراد نظیر استفاده از روش‌های مولکولی مانند PCR (Polymerase Chain Reaction) جهت جلوگیری از انتقال خون آلوده با ویروس ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: هپاتیت B مخفی سرونگاتیو HBSAg

مقدمه

هپاتوسلولار کارسینوما متفاوت است^(۱) همچنین ویروس هپاتیت B از طریق تأثیرات مستقیم و غیر مستقیم به عنوان عامل مهم در ایجاد سرطان کبد محسوب می‌شود.^(۲،۳،۴،۵،۶،۷) عفونت هپاتیت B معمولاً از طریق وجود آنتی ژن سطحی (HBSAg) در سرم شناسایی میشود. پیدایش تکنیک‌های بیولوژی مولکولی نظیر (Polymerase Chain Reaction) از سال ۱۹۸۰ به بعد قادر به شناسایی این ویروس در بیماران فاقد

عفونت با هپاتیت B یک مشکل بهداشتی در همه دنیا است و به عنوان یکی از ده علل شایع مرگ به حساب می‌آید. در دنیا حدود ۴۰۰ میلیون انسان به ویروس هپاتیت B آلوده هستند^(۲،۱). عفونت با هپاتیت B از یک عفونت بسیار خفیف تا یک عفونت بسیار شدید نظیر هپاتیت برق آسا، سیروز و یا

* استادیار گروه بیماری‌های داخلی - فوق تخصص گوارش و کبد
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد

HBSAg گردیده است^(۱۰،۹۸). همچنین دلایل زیادی وجود دارد که عفونت ویروسی هپاتیت B به طور مخفی (Occult) بسیار شایع است و می تواند باعث مشکلات بهداشتی شود^(۱۹،۱۸،۱۷،۱۶) به خصوص اینکه مشخص شده است که عفونت مخفی با هپاتیت B می تواند به سرعت به سیروز در بیماران هپاتیت C منجر شود^(۲۲،۲۱،۲۰). همچنین دلایل کافی مبنی بر این که HBSAg Occult به عنوان عامل خطر در پیدایش سرطان کبد در افراد فاقد آنتی ژن سطحی HBSAg عمل می کند و به نظر می رسد این دو ویروس در ایجاد کانسر کبد با هم همکاری می کنند^(۲۶،۲۵،۲۴،۲۳).

شیوع عفونت مخفی به ویروس هپاتیت B بستگی به شیوع کلی این عفونت در جوامع مختلف دارد. به طوری که شیوع آن در مناطق آندمیک که حدود ۷۰ تا ۹۰٪ است در معرض ابتلا به این عفونت هستند در حدود ۷ تا ۱۹٪ می باشد و در کشورهای غربی که در حدود ۵٪ افراد در معرض ابتلا هستند شیوع آن صفر تا ۹٪ می باشد^(۲۸،۲۷) لذا شیوع عفونت مخفی با هپاتیت B بستگی به وجود مارکرهای ویروسی مبنی بر تماس قبلی با ویروس دارد. بنابراین شیوع عفونت مخفی ویروس هپاتیت B در افراد با Anti HBCAb مثبت بیشتر از افرادی است که برای این آنتی بادی منفی هستند^(۳۰،۲۹) و دلایل زیادی وجود دارد که DNA ویروس هپاتیت B در افراد با عفونت مخفی کاملاً بدون نقص و فاقد موتاسیون می باشد و مانند یک ویروس کامل در موارد عفونت آشکار عمل می کند^(۳۳).

عفونت مخفی با هپاتیت B توسط وجود ویروس هپاتیت B در افراد منفی برای HBSAg مشخص می شود دلایل مخفی شدن هپاتیت B عبارتند از:

- ۱- موتاسیون در توالی زنجیره DNA ویروس ۲- جایگزین شدن DNA ویروس در DNA هسته سلول میزبان ۳- جایگزین شدن ویروس هپاتیت B در سلول های منونوکلر خون محیطی ۴- پیدا شدن کمپلکس های ایمنی با ویروس ۵- تغییر پاسخ ایمنی فرد به ویروس ۶- تداخل ویروس های دیگر در شناسایی این ویروس.
- مشکلات بالینی با ویروس هپاتیت B مخفی عبارتند از:
- ۱- شانس انتقال ویروس در انتقال خون، دیالیز و پیوند اعضا
 - ۲- عامل احتمالی در سیروزهای با علت نامشخص

۳- همراهی آن با پیدا شدن هپاتوسلولار کارسینوما
۴- همزمانی آن با هپاتیت C و تسریع در پیشرفت بیماری در اثر هپاتیت C^(۳۳،۲۸).
با توجه به این مقدمات هدف ما در این مطالعه بررسی شیوع HBCAb+ در بیماران مراجعه کننده به سازمان انتقال خون که HBSAg منفی هستند می باشد تا از این طریق گامی به سمت شناسایی موارد عفونت مخفی با هپاتیت B برداریم.

روش بررسی

این مطالعه از نوع توصیفی و به روش مقطعی است که بر روی ۱۲۳۰ نفر داوطلب اهدا خون که به سازمان انتقال خون شهر یزد مراجعه کرده بودند انجام و کلیه اطلاعات بیماران جمع آوری شد. بیماران HBSAg+ و HIV+ از مطالعه خارج شدند. برای همه بیماران آزمون Anti HCV HCV و سطح سرمی IgG علیه آنتی ژن HBC با استفاده از کیت های «بهرینگ» ساخت کشور آلمان انجام شد. برای همه بیماران بررسی سطح سرمی AST, ALT انجام شد و در افراد با HBCAb مثبت، بررسی سطح سرمی AntiHBSAb به عمل آمد در همه بیماران مبتلا به هپاتیت C بررسی بیوپسی کبد جهت بررسی وجود التهاب در کبد انجام شد نتایج حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم افزار رایانه ای SPSS تجزیه و تحلیل گردید.

نتایج

۷۱٪ بیماران مرد و ۲۹٪ زن بودند متوسط سنی بیماران مرد ۴۲±۱۱/۱ و برای زنان ۳۳±۹/۷ بود.
۱۵/۱٪ افراد مورد مطالعه آنتی بادی علیه HBCAb داشتند که از این تعداد ۵۱/۶٪ آنتی بادی علیه HBSAg نیز مثبت بود. ۰/۶ افراد مورد مطالعه به HCVAb داشتند و همه آنها مرد بودند که در نیمی از آنها اعتیاد به مواد مخدر وریدی وجود داشت. بررسی هیستولوژیک در همه افراد HCVAb مثبت انجام شد که همه آنها تغییرات التهابی در کبد داشتند. هیچکدام از افراد HCVAb مثبت، HBCAb مثبت نداشتند. همچنین در هیچکدام از بیماران HBCAb مثبت آمینوترانسفراز بالا نبود اما در نیمی افراد HCVAb مثبت، آمینوترانسفراز بالا بود (جدول ۱).

جدول ۱: بررسی مارکهای ویروسی در ۱۲۳۰ فرد داوطلب اهدا کننده خون

متغیرها	مثبت	درصد
HBCAb	۱۸۶	۱۵/۱۲
HBCAb+HBSAb	۹۶	۷/۸
HBCAb تنها	۹۰	۷/۳
HCVAb	۸	۰/۶

جدول ۲: مقادیر سطح سرمی آمینوترانسفراز در ۱۲۲۲ مرد داوطلب اهدا کننده خون سالم

متغیر سن	AST	ALT
۰-۱۸	۱۱۱۸	۱۰۳۰
۱۸-۲۷	۸۷	۱۱۵
بیش از ۲۷	۱۷	۷۷
زن	۱۱/۶۱±۵/۲۰	۱۱/۲۷±۸/۷۳
مرد	۱۳/۹۲±۷/۰۹	۱۳/۵۹±۱۰/۸۶

بحث

هپاتیت مزمن B یک مشکل بهداشتی عمده در دنیا محسوب می شود^(۲،۱). همچنین HBSAg به عنوان دومین عامل مؤثر در ایجاد کانسر بعد از سیگار محسوب می شود^(۶). بنابراین جلوگیری از انتقال هپاتیت B بسیار مهم است اگر چه در سازمان های انتقال خون، خون های HBSAg+ کنار گذاشته می شود اما به نظر می رسد در کشور ما و بقیه کشورهای با آلودگی متوسط تا شدید، کنار گذاشتن خونهای فاقد HBSAg+ برای جلوگیری از انتقال بیماری هپاتیت B کافی نیست و لذا بایستی به دنبال مارکهای دیگری که ارتباط با عفونت مخفی را بیشتر مشخص می کند باشیم. بررسی تستهای بیولوژی مولکولی نظیر PCR در کشورهای با شیوع بالای عفونت هپاتیت B برای غربالگری هپاتیت B مخفی مقرون به صرفه نمی باشد به خصوص که بایستی از تست های بیولوژی مولکولی با حساسیت بسیار بالا استفاده کرد^(۱۸). بنابراین به نظر می رسد که بایستی به دنبال عاملی بود که با عفونت مخفی بیشتر دیده می شود و برای غربالگری مقرون به صرفه باشد، مهمترین عامل وجود مارکهای تماس

گذشته با این ویروس نظیر HBCAb با یا بدون HBSAb در بیماران سرونگاتیو برای HBSAg+ می باشد^(۲۹،۳۰،۳۱).

در یک مطالعه در سال ۱۹۹۲ Ijzok و همکاران در ۲۹۴ مورد، افرادی را که فاقد HBSAg - که HBCAb مثبت بودند بررسی و از نظر وجود HBV DNA مطالعه نمودند که در ۹/۶٪ از افراد که تیترا بالای HBCAb داشتند DNA ویروس هپاتیت B وجود داشت. البته این شیوع وقتی همه بیماران با تیترا مثبت HBCAb را بررسی کردند بالاتر بود^(۲۹).

مطالعه دیگری در سال ۱۹۹۵ توسط Jilg w بر روی ۱۶۴ نفر که دارای HBSAg مثبت بودند برای HBCAb به عنوان تنها مارکر عفونت با هپاتیت B نشان داد که ۳۲/۹٪ افراد ناقل ویروس هپاتیت B هستند^(۳۱).

در مطالعه دیگر در ۱۹/۴٪ افراد HBSAg منفی اما Anti HBC مثبت ناقل ویروس هپاتیت B در سرم بودند^(۳۲).

اینکه عفونت مخفی می تواند باعث انتقال عفونت شود یا خیر مشخص نمی باشد اما به نظر می رسد که افراد با HBCAb با تیترا کم در سرم در حضور HBSAb مثبت انتقال دهنده ویروس نمی باشند اما وجود HBCAb تنها بدون حضور HBSAb می تواند ناقل باشد^(۲۰) بنابراین اگر چه در مطالعه ما (جدول ۱) ۱۵/۱٪ بیماران برای HBCAb مثبت هستند اما ۵۱/۶٪ از این بیماران HBSAb داشتند که اگر چه شانس وجود ویروس هپاتیت B به طور مخفی در این بیماران کم است اما این گروه در اولویت بعدی بررسی PCR برای رد نمودن عفونت مخفی هپاتیت B هستند.

نه تنها وجود عفونت مخفی باعث افزایش خطر انتقال می شود بلکه عاملی برای پیدایش کانسر کبد است^(۳).

اگر چه سیر هپاتیت B در اغلب موارد با از بین رفتن ویروس و بنابراین ایجاد آنتی بادی علیه آنتی ژن سطحی پایان می پذیرد اما در تعدادی از افراد حتی با ایجاد این آنتی بادی ضد آنتی ژن سطحی، ویروس به طور کامل در سرم می ماند و حتی ممکن است آنتی بادی علیه HBCAg, HbeAg نیز به وجود آید و بار ویروسی در سرم به طور مخفی زندگی کند بشدریج آنتی بادی

در تمام آنها مشکل التهابی در کبد وجود دارد لذا به نظر می‌رسد که بایستی در همه بیماران با هپاتیت C با علائم بالینی یا بدون آن و با هر سطحی از آمینوترانسفرازهای سرم بررسی هیستولوژی کبد انجام شود و بر اساس هیستولوژی نسبت به درمان بیماران اقدام کرد. اگرچه چنین نتیجه‌گیری به مطالعه با تعداد بیشتری بیمار نیازمند است.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که با این فرض که همه افراد داوطلب انتقال خون در مورد اعتیاد به مواد مخدر تزریقی، پاسخ درست مبنی بر اعتیاد بدهند در ۶ فرد معتاد به مواد تزریقی وجود دارد اما ۲ نفر از آنها HCVAb+ دارند و در ۴ نفر دیگر هیچ مارکری دال بر بیماریهای ویروسی نداشتیم لذا به نظر می‌رسد که برای این افراد بایستی تستهای دقیق PCR قبل از انتخاب یا حذف خون آنها برای انتقال خون انجام داد.

بررسی آمینوترانسفرازها در بیماران نشان داد که سطح آمینوترانسفرازها در بیش از ۸۰٪ افراد داوطلب اهدا کننده خون سالم از محدوده نرمال پایین تر است (جدول ۲) و در بسیاری از افراد زمانی که آنزیم‌های کبدی آنها به حد ۱/۵ برابر نرمال یعنی سطحی که در مواقع وجود التهاب در کبد انتظار آن را داریم برسد در این صورت تازه به حد بالای نرمال نزدیک می‌شود و بنابراین حتی در مواقع التهاب در کبد نیز بر اساس معیارهای موجود آنزیم‌های نرمال است و لذا در تشخیص به موقع این افراد دچار اشتباه می‌شویم بنابراین بایستی در مورد افراد ناقل هپاتیت B و هپاتیت C و همچنین افراد مبتلا به هپاتیت ناشی از انفیلتراسیون جری در کبد به این موضوع توجه کنیم^(۴۰،۳۹،۳۸،۳۷،۳۶) و مقادیر نرمال و غیر نرمال جدید برای این بیماران بایستی بر این اساس و توجه به این موضوع تعیین کرد^(۴۳،۴۲،۴۱).

ضد HbeAg پاک می‌شود و تنها مارکری که در انتها باقی می‌ماند HBCAb است که می‌تواند با یا بدون Anti HBSAb باشد. لذا با پیدایش تست‌های تشخیص هپاتیت C به نظر می‌رسد ریسک انتقال برای هپاتیت B در حال حاضر بیشتر از هپاتیت C باشد^(۲۴) همچنین با توجه به گزارش‌های زیاد مبنی بر وجود مارکرهای هپاتیت B در افراد مبتلا به کانسر کبد این ویروس همچنان مشکل آفرین باشد.

شیوع کانسر کبد در افراد ناقل HBSAg+، ۴۹۵ نفر در هر یکصد هزار نفر است و در افراد HbcAb+، ۵ نفر در هر یکصد هزار نفر است اما این شیوع در افراد سرونکاتیو برای مارکرهای هپاتیت B صفر در صد است^(۳۴).

در مطالعه Pollicino و همکاران نشان داده شد که از مجموع ۲۹۹ بیمار با کانسر کبد و بیماری‌های مزمن کبد که فاقد HBSAg+ بودند در ۸۴٪ از ۲۰۱ بیمار HBCAb مثبت Occult HBV وجود داشت. لذا به نظر می‌رسد نه تنها Occult HBSAg در افراد HBCAb مثبت می‌تواند باعث انتقال بیماری هپاتیت B شود بلکه با توجه به شیوع ۵ برابر کانسر کبد نسبت به افراد منفی برای این آنتی‌بادی، بایستی این افراد جهت جلوگیری از پیدایش کانسر کبد، تحت بررسی غربالگری قرار گیرند.

بررسی این افراد از نظر HCVAb نشان داد که ۶٪ از افراد مبتلا به هپاتیت C هستند اگرچه در هیچکدام از این بیماران HBCAb مثبت نیست اما اظهار نظر در باره اینکه افراد مبتلا به هپاتیت C، بیماری را از طریق منابع غیر مشترک با هپاتیت B کسب می‌کنند یا خیر مشکل می‌باشد. همه بیماران مبتلا به هپاتیت C در این مطالعه فاقد علائم بالینی هستند اما در بررسی هیستولوژی تقریباً

References

- 1- Lee WM. *Hepatitis B virus infection: a review*. N Engl J Med 1997;324:1733-1745.
- 2- Bergsland EK, Venook AP. *Hepatocellular carcinoma*. Curr Opin Oncol 2000;12:357-361.
- 3- Beasley RP, Hwang LY. *Overview on the epidemiology of hepatocellular carcinoma*. In *Viral hepatitis and liver disease*, eds Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS. Baltimore: Williams & Wilkins;

1991. 532-535.
- 4- Hillman MR. *Overview of the pathogenesis, prophylaxis and therapeutics of viral hepatitis B, with focus on reduction to practical applications*. Vaccine 2001;19:1837-1848.
- 5- Chisari FV. *Viruses, immunity, and cancer: lessons from hepatitis B*. Am J Pathol 2000;156:1118-1132.
- 6- Chen PJ, Chen DS. *Hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma: molecular genetics and clinical perspectives*. Semin Liver Dis 1999;19:253-262.
- 7- Buendia MA, Pineau P. *The complex role of hepatitis B virus in human hepatocarcinogenesis*. In *DNA tumor viruses: oncogenic mechanisms*, eds Barbanti-Brodano. New York: Plenum; 1995. 171-193.
- 8- 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;34:194-203.
- 9- Iizuka H, Ohmura K, Ishijima A, Satoh K, Tanaka T, Tsuda F, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. *Correlation between anti-HBc titers and HBV DNA in blood units without detectable HBsAg*. Vox Sang 1992;63:107-111.
- 10- Douglas DD, Taswell H, Rakela J, Rabe D. *Absence of hepatitis B virus DNA detected by polymerase chain reaction in blood donors who are hepatitis B surface antigen negative and antibody to hepatitis B core antigen positive from a United States population with a low prevalence of hepatitis B serologic markers*. Transfusion 1993;33:212-216.
- 11- Weinberger KM, Bauer T, Bohm S, Jilg W. *High genetic variability of the group-specific-a-determinant of hepatitis B virus surface antigen and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus lacking detectable HbsAg in serum*. J Gen Virol 2000;81:1165-1174.
- 12- Kaneko S, Miller RH, Feinstone SM, Unoura M, Kobayashi K, Hattori N, Purcell RH. *Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay*. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:312-316.
- 13- Wang JT, Wang TH, Sheu JC, Shih LN, Lin JT, Chen DS. *Detection of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in plasma of volunteer blood donors negative for hepatitis B surface antigen*. J Infect Dis 1991;163:397-399.
- 14- Zhang YY, Hansson BG, Kuo LS, Widell A, Nordenfelt E. *Hepatitis B virus DNA in serum and liver is commonly found in Chinese patients with chronic liver disease despite the presence of antibodies to HBsAg*. Hepatology 1993;17:538-544.
- 15- Liang TJ, Baruch Y, Ben-Porath E, Enat R, Bassan L, Brown NV, Rimon N, Blum HE, Wands JR. *Hepatitis B virus infection in patients with idiopathic liver disease*, Hepatology 1991;13:1044-1051.
- 16- 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;341:22-26.
- 17- Raimondo G, Balsano C, Craxi A, Farinati F, Levrero M, Mondelli M, Pollicino T, Squadrito G, Tiribelli C. *Occult hepatitis B virus infection*. Dig Liver Dis 2000;32:822-826.
- 18- 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;34:194-203.
- 19- Torbenson M, Thomas DL. *Occult hepatitis B*. Lancet Infect Dis 2002;2:479-486.
- 20- 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;341:22-26.
- 21- Fukuda R, Ishimura N, Niigaki M, Hamamoto S, Satoh S, Tanaka S, Kushiyama Y, Uchida Y, Iihara S, Akagi S, Watanabe M, Kinoshita Y. *Serologically silent hepatitis B virus coinfection in patients with hepatitis C virus-associated chronic liver disease: clinical and virological significance.* J Med Virol 1999;58:201-207.
- 22- Koike K, Kobayashi M, Gondo M, Hayashi I, Osuga T, Takada S. *Hepatitis B virus DNA is frequently found in liver biopsy samples from hepatitis C virus-infected chronic hepatitis patients.* J Med Virol 1998;54:249-255.
- 23- Paterlini P, Gerken G, Nakajima E, Terre S, D'Errico A, Grigion W, Nalpas B, Franco D, Wands JR, Kew MC, Brechot C. *Polymerase chain reaction to detect hepatitis B virus DNA and RNA sequences in primary liver cancers from patients negative for hepatitis B surface antigen.* N Engl J Med 1990;323:80-85.
- 24- Huo TI, Wu JC, Lee PC, Chau GY, Lui WY, Tsai SH, Ting LT, Chang FY, Lee SD. *Sero-clearance of hepatitis B surface antigen in chronic carriers does not necessarily imply a good prognosis.* Hepatology 1998;28:231-236.
- 25- Sheu JC, Huang GT, Shih LN, Lee WC, Chou HC, Wang JT, Lee PH, Lai MY, Wang CY, Yang PM, Lee H-S, Chen D-S. *Hepatitis C and B viruses in hepatitis B surface antigen-negative hepatocellular carcinoma.* Gastroenterology 1992;103:1322-1327.
- 26- Tamori A, Nishiguchi S, Kubo S, Koh N, Moriyama Y, Fujimoto S, Takeda T, Shomi S, Hirohashi K, Kinoshita H, Otani S, Kuroki T. *Possible contribution to hepatocarcinogenesis of X transcript of hepatitis B virus in Japanese patients with hepatitis C virus.* Hepatology 1999;29:1429-1434.
- 27- Matsumoto C, Nishioka K, Oguchi T, Mitsunaga S, Nojiri N, Tadokoro K, Juji T. *Detection and quantitation of HBV DNA by semi-nested PCR in donated blood: comparison with HBV serological markers.* J Virol Meth 1997;66:61-69.
- 28- S.Martin et al. *Occult hepatitis B and its clinical implications journal of viral hepatitis.* 2002; vol 9 Iss 4 p 243.
- 29- Iizukah , ohmura k, Ishijima A , satoh k . et al *Comelation between anti-HBC titers and HBV DNA in blood units without detectable HBSAg vox sanguinis,* 1992; 63 (2) :107-11.
- 30- *Occult hepatitis B virus infection implications in transfusion vox sanguinis.* 2004 86 (2) :83-91:
- 31- Jilg w, sieger E. *Zachoval R.schat zlh individuls with antibodies against hepatitis B core antigen as the only serological marker for hepatitis B infection : high precentage of hepatitis B and C virus .* Journal of Hepatology. 1995; 23(1) :14-20.
- 32- Matsumotoc Nishiokak . *oguchi Tat al detection and quantitation of HBV DNA by semi nested PCR in donated blood .* journal of virologic methods. Jun 1997 66(1):61-90 .
- 33- Lok , ANNA SF . *Occult hepatitis B virus infection : diagnosis implication and management .*Journal of gastroentrolgy and hepatology. December 2004; 19 (sup PL7) : 5114 – 5117 .
- 34- 350 : Beasley RP. *Hepatitis B virus : the major ethialogy of Hepatocellular carcinoma cancer* 1988;61:1942-56.
- 35- Theresa Pollicino ,Giovanni Squadrito & et al. *Hepatitis B virus maintains its prooncogenic properties in the case of occult HBV infection Gastroentrolgy* 2004 ;126:102-111.
- 36- Tassopoulos NC. *Treatment of patients with chronic hepatitis C and normal ALT levels.* J Hepatol 1999;31:193-196.
- 37- Sanyal AJ, Haydon GH, Piris J, Jarvis LM, Hayes PC. *Assessment of liver histology in patients with hepatitis C and normal transaminase levels.* Eur J Gastroenterol Hepatol 1996;8:869-872.

- 38- Kronenberger B, Ruster B, Lee JH, Sarrazin C, Roth WK, Herrmann G, Zeuzem S. *Hepatocellular proliferation in patients with chronic hepatitis C and persistently normal or abnormal aminotransferase levels*. J Hepatol 2000;33:640-647.
- 39- Nutt AK, Hassan HA, Lindsey J, Lamps LW, Raufman JP. *Liver biopsy in the evaluation of patients with chronic hepatitis C who have repeatedly normal or near-normal serum alanine aminotransferase levels*. Am J Med 2000;109:62-64.
- 40- Wagner MV, Lee JH, Friedl R, Wolfgang J, Kronenberger B, Sarrazin C, Zeuzem S. *Impaired quality of life in patients with chronic hepatitis C and persistently normal aminotransferase levels*. (abstr). Hepatology 2003;38:454A.
- 41- Bacon BR. *Treatment of patients with hepatitis C and normal serum aminotransferase levels*. Hepatology 2002;36:S179-S184.
- 42- Prati D, Taioli E, Zanella A, Della Torre E, Butelli S, Del Vecchio E, Vianello L, Zanuso F, Mozzi F, Milani S, Conte D, Colombo M, Sirchia G. *Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels*. Ann Intern Med 2002; 137:1-10.
- 43- Piton A, Poynard T, Imbert-Bismut F, Khalil L, Delattre J, Pelissier E, Sansonetti N, Opolon P, MULTIVIRC Group. *Factors associated with serum alanine transaminase activity in healthy subjects: consequences for the definition of normal values, for selection of blood donors, and for patients with chronic hepatitis C*. Hepatology 1998;27:1213-1219.