Quantitative Test of Serum Hepatitis B Surface Antigen versus Hepatitis B DNA Polymerase Chain Reaction in Detection of Hepatitis B in Yazd

Mohsen Kkhondi Meybodi [1,*], Hossein Hadinedoushan [1], Fateme Zare [1]

[1] Yazd Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

ABSTRACT

Background:
Hepatitis B DNA polymerase chain reaction (HBV-DNA PCR) is a test that is used in the evaluation and treatment of hepatitis B but this test is pretty expensive and may not be available everywhere. Quantitative test of serum hepatitis B surface antigen may be a surrogate test, which is available with much low price. The aim of this study was to compare the accuracy of these two tests.

Materials and Methods:
Patients with positive HBsAg who referred to Boali laboratory in Yazd, Iran for HBV DNA test in 2012-2014 were selected and divided into three groups as inactive carriers, those at the beginning of treatment, and those on treatment (30 patients in each group). HBV DNA PCR was performed with real-time PCR method with sensivity of 150 IU/mL. HBsAg and HBeAg levels were measured by electrochemiolance. The level more than 0.05/mL was considered positive for HBsAg.

Results:
Serum hepatitis B surface antigen quantitative level was significantly different between group one and group two, and also between group one and group three (p = 0.001) but it was not different between group two and three (p = 0.7). Serum HBV quantitative level and HBV DNA had a positive relation (p = 0.001, R = 0.527). There was a relation between HBsAg and viral load in group one (p = 0.017, R = 0.431) and group two (p = 0.023, R = 0.427) but there was not such a correlation in group three (p = 0.27, R = 0.22).

Conclusion:
HBsAg quantitative measurement may be a surrogate test for evaluation of patients with hepatitis B because it is simpler and economic.

Keywords: Serum hepatitis B surface antigen quantitation, Hepatitis B DNA polymerase chain

please cite this paper as:
Akhondi Meybodi M, Hadinedoushan H, Zare F. Quantitative Test of Serum Hepatitis B Surface Antigen versus Hepatitis B DNA Polymerase Chain Reaction in Detection of Hepatitis B in Yazd. *Govaresh* 2019;24:46-50.

Corresponding author:
Mohsen Kkhondi Meybodi, MD
Gastroentrology Ward, Yazd Shahid Sadoughi Hospital, Yazd, Iran
Tel: + 98 3538224000
Fax: + 98 3538224100
E-mail: akhondei@yahoo.com

Received: 05 Sep. 2018
Edited: 09 Jan. 2019
Accepted: 10 Jan. 2019

مقاله گزارش کوتاه

تعیین ارتباط سطح HBsAg با تعداد ویروس هپاتیت B درسرم افراد مبتلا به هپاتیت B در یزد

محسن آخوندی میبدی[1،*]، حسین هادی ندوشان[1]، فاطمه زارع[1]

[1] دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

چکیده

زمینه و هدف:
جهت پایش درمان هپاتیت ب مزمن (HBV) یک روش ساده و ارزان قیمت با قدرت تشخیص بالا و همه جانبه، طی دوره درمان ضروری است. اندازه گیری کمی HBsAg در سرم، به عنوان یک مارکر سرولوژیک، که کم هزینه و قابل دسترس است می تواند روشی جایگزین برای انجام HBV DNA بکار رود. در این بررسی سعی شده است این دو روش با هم مقایسه شود.

روش بررسی:
از سال ۹۱ تا ۹۳ بیمارانی که به آزمایشگاه بوعلی جهت انجام تست HBV PCR مراجعه کردند را به سه گروه ناقل[1]، شروع درمان، در حال درمان تقسیم شدند. در هر گروه ۳۰ نفر قرارگرفتند.
سطح HBsAg و HBeAg توسط دستگاه الکتروکمی لومینسانس LIAISON بر اساس دستورالعمل کیت اندازه گیری شد. غلظت های بالاتر از ۰/۰۵ IU/ml به عنوان HBsAg مثبت در نظر گرفته شد. نتایج HBeAg به صورت مثبت و منفی گزارش شد.
تعداد ویروس[2] در سرم بیماران با روش Real Time PCR با استفاده از COBASTaqMan HBV test (Roche Diagnostics) انجام شد. کمترین حد تشخیص برای این تست ۱۵۰ IU/ml بود.

یافته ها:
میزان سطح HBsAg بین گروه یک و دو و همچنین بین گروه یک و سه معنی دار بود (p = ۰/۰۰۱) میزان سطح HBsAg بین گروه دو و سه معنی دار نبود (p = ۰/۷) بین میزان HBsAg و viral load در گروه های مورد بررسی ارتباط معنی داری وجود داشت (p = ۰/۰۰۱ و R = ۰/۵۲۷).
ارتباط معنی داری بین میزان سطح HBsAg و viral load در گروه یک (p = ۰/۰۱۷ و R = ۰/۴۳۱) و گروه دو (p = ۰/۰۲۳ و R = ۰/۴۲۷) وجود داشت ولی درگروه سه این ارتباط معنی دار نبود (p = ۰/۲۷ و R = ۰/۲۲).

نتیجه گیری:
اندازه گیری کمی HBsAg می تواند یک روش ساده و با صرفه از نظر اقتصادی، جهت ارزیابی مقدار ویروس HBV در ناقلان ویروسی باشد.

کلید واژه: هپاتیت ب، سطح کمی HBV DNA، HBsAg کمی

گوارش/ دوره ۲۴، شماره ۱/ بهار ۱۳۹۸-۵۰/۴۶

1. Inactive carrier
2. Viral load

***نویسنده مسئول: محسن آخوندی میبدی**
یزد، صفاییه بیمارستان شهید صدوقی، بخش گوارش
تلفن: ۰۳۵-۳۸۲۲۴۰۰۰
نمابر: ۰۳۵-۳۸۲۲۴۱۰۰
پست الکترونیک: akhondei@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۱۴
تاریخ اصلاح نهایی: ۹۷/۱۰/۱۹
تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۰

زمینه و هدف:

تشخیص و درمان عفونت HBV، از موضوع های پیچیده و مورد بحث در سراسر دنیا و سازمان های بین المللی بهداشت و سلامت عمومی بوده است. به کارگیری یک روش ساده و ارزان قیمت با قدرت تشخیص بالا و همه جانبه، جهت اندازه گیری مکرر میزان سرمی HBV، طی دوره درمان ضروری است.(۱و۲) اندازه گیری کمی HBsAg در سرم، به عنوان یک مارکر سرولوژیک، بطور معمول در تشخیص عفونت حاد یا مزمن HBV بکار می رود.(۳) روش های مولکولی متعددی جهت اندازه گیری DNA ویروسی استفاده می شود که معمولاً در ارزیابی تأثیر درمان های ضد ویروسی و تشخیص سریع مقاومت دارویی در حین درمان، بکار می رود.(۴و۵) پیشرفت های اخیر در زمینه دانش های

جدول ۱: میانگین HBsAg و viral load در گروه ها

گروه ها	I Inactive carrier	II Beginning of treatment	III On treatment
میانگین HBsAg	۱/۷۳۶۷×۱۰^۵	۵/۶۷۰۷×۱۰^۵	۶/۱۰۴۲×۱۰^۵
میانگین تعداد ویروس (viral load)	۱۳۷۹/۷	۵/۳۹۰۶×۱۰^۸	۸/۲۶۶×۱۰^۱۱
کمترین میزان ویروس	۱۰۲	۲۵۵	۱۰^۴×۱/۸
بیشترین میزان ویروس	۷۹۶۹	۱۰^۶×۷/۵۲	۲/۲۳×۱۰^۱۳

جدول ۲: مقادیر لگاریتمیک HBsAg و HBV DNA در گروهای سه گانه

گروه ها	I	II	III
log میانگین HBsAg	۵/۲۳	۵/۷۵	۵/۷۵
Log میانگین تعداد ویروس (viral load)	۳/۱	۸/۷۳	۱۰/۹۱

ملکولی، ما را قادر می سازد تا تعداد DNA ویروسی کمتر از ۱۰ کپی در ml را شناسایی کنیم. بر اساس مطالعه ای که توسط آقای چان[1] صورت گرفت مشخص شد که مقدار کم HBsAg قبل از درمان، یک پیشگوی کننده بهتری نسبت به تست DNA ویروسی جهت بررسی پاسخ خوب به درمان های ضد ویروسی با لامی وودین یا پگ اینترفرون[2] می باشد (۶) در این مطالعه همبستگی بین مقدار کمی HBsAg و مقدار DNA ویروسی را مورد ارزیابی قرار گرفت تا در صورت وجود یک همبستگی مناسب و معنی دار، بتوانیم روش کمی اندازه گیری HBsAg را در موارد لزوم جایگزین تست DNA کنیم.

روش بررسی:

از سال ۹۱ تا ۹۳ بیمارانی که به آزمایشگاه بوعلی جهت انجام تست HBV PCR مراجعه کردند و براساس تشخیص پزشک فوق تخصص گوارش به سه گروه ناقل، شروع درمان، در حال درمان تقسیم شدند. در هرگروه از ۳۰ بیمار نمونه گیری انجام شد. جهت نمونه گیری از این افراد ۵ میلی لیتر خون گرفته شد و بعد از سانتریفیوژ کردن سرم آن ها را جدا و تا جمع آوری کامل نمونه ها در ۲۰- نگهداری شد.

اندازه گیری HBsAg

سطح HBsAg توسط دستگاه تمام اتوماتیک الکتروکمی لومینسانس LIAISON بر اساس دستوالعمل کیت اندازه گیری شد. واحد اندازه گیری IU/ml بود.

اندازه گیری HBeAg

سطح HBeAg نیز توسط دستگاه تمام اتوماتیک الکتروکمی لومینسانس LIAISON بر اساس دستوالعمل کیت اندازه گیری و نتایج به صورت مثبت و منفی گزارش شد.

اندازه گیری تعداد ویروس (viral load)

تعداد ویروس (viral load) در سرم بیماران با روش Real Time PCR با استفاده از COBASTaqMan HBV test (Roche Diagnostics) انجام شد. نتایج به صورت IU/ml اندازه گیری شد. کمترین حد تشخیص برای این تست ۱۵۰ IU/ml بود.

آنالیز آماری

نتایج به کمک نرم افزار آماری SPSS ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. برای مقایسه میانگین های HBsAg و تعداد ویروس سرم از روش غیرپارامتری من-ویتنی استفاده شد. از روش رگرسیون خطی برای تعیین ارتباط بین HBsAg و تعداد ویروس سرم استفاده شد. ضریب همبستگی اسپیرمن برای سنجش همبستگی استفاده شد. مقادیر $p < ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج به صورت Mean ± SEM آورده شده است.

یافته ها:

از مجموع ۹۰ بیمار، ۶۵ مرد و ۲۵ زن با میانگین سنی ۳۹ (۱۸ تا ۶۹) در این مطالعه شرکت داشتند. جزئیات مشخصات بالینی گروه یک شامل افراد ناقل، گروه دو افرادی که در مرحله ی شروع درمان بودند و گروه سه افرادی که تحت درمان قرار گرفته بودند.

در گروه یک کمترین میزان HBsAg ۱۵۰۰ و بیشترین میزان ۷/۹×۱۰^۵، در گروه دو کمترین مقدار HBsAg ۳/۴×۱۰^۴ و بیشترین میزان آن ۱۰^۶× ۱/۹۲، و در گروه ۳ کمترین میزان HBsAg ۳۹۰۰ و بیشترین میزان ۱۰^۶×۲/۱ بود. (جدول ۱)

در گروه یک کمترین تعداد ویروس (viral load)، ۱۰۲ copy/ml و بیشترین میزان ۷۹۶۹ copy/ml،

در گروه دو کمترین تعداد ویروس (viral load)، ۲۵۵ copy/ml و بیشترین میزان آن ۱۰^۹×۷/۵۲ copy/ml، و

در گروه ۳ کمترین تعداد ویروس (viral load)، ۱۰^۴×۱/۸۶ copy/ml و بیشترین میزان آن ۱۰^۱۳×۲/۲۳ copy/ml بود. (جدول ۲)

1. Chan
2. Peginterferon

جدول ۳: ارتباط سطح سرمی HBsAg log و viral load log با وضعیت HBeAg status

HBeAg status	HBsAg log	viral load log
HBeAg positive	۵/۸۹	۱۳/۹۰
HBeAg Negative	۵/۵۰	۱۱/۵۵
P value	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱

همچنین HBeAg نیز در نمونه ها اندازه گیری شدند. در گروه یک، ۴ نمونه، در گروه دو، ۹ نمونه و در گروه سه، ۱۰ نمونه از نظر HBeAg مثبت بود. در جدول یک میانگین HBsAg و بار ویروسی در گروه های مورد بررسی، آورده شده است.

میانگین میزان بار ویروس درافرادی که از لحاظ HBeAg منفی بودند برابر با $۳/۵۴۱\times۱۰^{۱۱} \pm ۳/۵۴۲\times۱۰^{۱۱}$ و در افرادی که از لحاظ HBeAg مثبت بودند برابر با $۴/۶۷۴\times۱۰^{۸} \pm ۷/۷۸۹\times۱۰^{۱۱}$ بود. میان میزان viral load با وجود یا عدم وجود HBeAg در نمونه ها، تفاوت معنی داری وجود داشت (p = ۰/۰۰۱). (جدول ۳)

میانگین میزان HBsAg درافرادی که از لحاظ HBeAg منفی بودند، برابر با $۴/۶۶\times۱۰^{۴} \pm ۳/۱۹\times۱۰^{۵}$ و در افرادی که از لحاظ HBeAg مثبت بودند برابر با $۱/۳۰۲\times۱۰^{۵} \pm ۷/۸۶۲\times۱۰^{۵}$ بود. بین میزان HBsAg باوجود یا عدم وجود HBeAg در نمونه ها ، تفاوت معنی داری وجود داشت (p = ۰/۰۰۲)

ارتباط بین گروه ها

میزان viral load بین گروه یک و دو و همچنین بین گروه دو و سه معنی دار بود (p = ۰/۰۰۱).

میزان HBsAg بین گروه یک و دو و همچنین بین گروه یک و سه معنی دار بود (p = ۰/۰۰۱)

میزان سطح HBsAg بین گروه دو و سه معنی دار نبود (p = ۰/۷)

بین میزان HBsAg و بار ویروسی در گروه های مورد بررسی ارتباط معنی داری وجود داشت (p = ۰/۰۰۱ و R = ۰/۵۲۷).

ارتباط معنی داری بین میزان HBsAg و بار ویروسی در گروه یک (p = ۰/۰۱۷ و R = ۰/۴۳۱) و گروه دو (p = ۰/۰۲۳ و R = ۰/۴۲۷) وجود داشت ولی در گروه سه این ارتباط معنی دار نبود (p = ۰/۲۷ و R = ۰/۲۲).

بحث:

اندازه گیری کمی HBsAg به کمک روش کمی لومینسانت خودکار، به دلیل حساسیت بالا می تواند جایگزین روش های مولکولی اندازه گیری DNA ویروس شود.(۳و۴) در این مطالعه همبستگی بین مقدار کمی HBsAg و مقدار DNA ویروسی مورد ارزیابی قرار گرفت. ارتباط معنی داری بین میزان HBsAg و بار ویروسی در گروه یک (p = ۰/۰۱۷ و R = ۰/۴۳۱) وگروه دو (p = ۰/۰۲۳ و R = ۰/۴۲۷) وجود داشت ولی در گروه سه این ارتباط معنی دار نبود (p = ۰/۲۷ و R = ۰/۲۲). میزان بار ویروسی بین گروه یک و دو و همچنین بین گروه دو و سه معنی دار بود (p = ۰/۰۰۱).

میزان کمی HBsAg بین گروه یک و دو و همچنین بین گروه یک و سه معنی دار بود (p = ۰/۰۰۱). میزان HBsAg بین گروه دو و سه معنی دار نبود (p = ۰/۷). این موضوع نشان می دهد از میزان کمی HBsAg می توان گروه یک (inactive carrier) را از افراد فعال (گروه دو و سه) جدا کرد، ولی میزان کمی HBsAg در حین درمان کمک کننده نیست. در بررسی اوزاراس[1] و همکاران که با جایگزینی روش سرولوژیک اندازه گیری HBsAg بجای روش اندازه گیری DNA ویروس مورد ارزیابی قرار گرفت. هدف این مطالعه پاسخ به این سوال بود که آیا مقدار کمی HBsAg با مقدار DNA ویروس HBV، طی پروسه درمان هپاتیت B مزمن (CHB)، همبستگی معنی داری دارد یا نه؟ آنها یک همبستگی قابل توجهی را نشان دادند. (همبستگی دوسویه = ۸۳).(۷) در مطالعه ای که توسط آقای چان و همکاران صورت گرفت، هدف مطالعه ارزیابی این موضوع بود که آیا مقدار کمی HBsAg می تواند جایگزین اندازه گیری DNA حلقوی ویروس (CCC DNA) و DNA ویروسی موجود در کبد باشد و این که آیا HBsAg قادر به پیش بینی پاسخ ویروسی، نسبت به درمان ترکیبی لامی وودین و پگ اینترفرون باشد، نتیجه نهایی حاصل شده از این مطالعه بیانگر همبستگی خوب HBsAg با تست DNA می باشد و حتی جهت پیشگویی پاسخ مناسب به لامی وودین و پگ اینترفرون، میزان پایین HBsAg قبل از درمان، بهتر از DNA ویروسی است.(۶)

یک همبستگی مناسب و معنی دار، بین روش کمی اندازه گیری HBsAg و HBV DNA وجود دارد.(۸-۱۶) و نتیجه این که اندازه گیری کمی HBsAg می تواند یک روش ساده و باصرفه از نظر اقتصادی، جهت ارزیابی مقدار ویروس HBV در ناقلان ویروسی باشد و در موارد لزوم جایگزین تست DNA کنیم.

1. Ozaras

REFERENCES:

1. Gish RG, Locarnini SA. Chronic hepatitis B: current testing strategies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:666-76.
2. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, et al. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 2007;46:254-65.
3. Kohmoto M, Enomoto M, Tamori A, Habu D, Takeda T, Kawada N, et al. Quantitative detection of hepatitis B sur-

face antigen by chemiluminescent microparticle immunoassay during lamivudine treatment of chronic hepatitis B virus carriers. *J Med Virol* 2005;75:235-9.

4. Bowden S. Serological and molecular diagnosis. *Semin Liver Dis* 2006;26:97-103.
5. Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment. *J Hepatol* 2006;44(1 Suppl):S71-6.
6. Chan HL, Wong VW, Tse AM, Tse CH, Chim AM, Chan HY, et al. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:1462-8.
7. Ozaras R, Tabak F, Tahan V, Ozturk R, Akin H, Mert A, et al. Correlation of quantitative assay of HBsAg and HBV DNA levels during chronic HBV treatment. *Dig Dis Sci* 2008;53:2995-8.
8. Teriaky A, Al-Judaibi B. Correlation between HBsAg quantitation and HBV DNA in HBeAg-negative HBV/D patients. *Saudi J Gastroenterol* 2013;19:243-4.
9. Alghamdi A, Aref N, El-Hazmi M, Al-Hamoudi W, Alswat K, Helmy A, et al. Correlation between hepatitis B surface antigen titers and HBV DNA levels. *Saudi J Gastroenterol* 2013;19:252-7.
10. Liu CJ, Kao JH. Global perspective on the natural history of chronic hepatitis B: Role of hepatitis B virus genotypes A to J. *Semin Liver Dis* 2013;33:97-102.
11. Besharat S, Poustchi H, Mohamadkhani A, Katoonizadeh A, Moradi A, Roshandel G, et al. Association of Mutations in the Basal Core Promoter and Pre-core Regions of the Hepatitis B Viral Genome and Longitudinal Changes in HBV Level in HBeAg Negative Individuals: Results From a Cohort Study in Northern Iran. *Hepat Mon* 2015;15:e23875.
12. Deguchi M, Yamashita N, Kagita M, Asari S, Iwatani Y, Tsuchida T, et al. Quantitation of hepatitis B surface antigen by an automated chemiluminescent microparticle immunoassay. *J Virol Methods* 2004;115:217-22.
13. Chen CH, Lee CM, Wang JH, Tung HD, Hung CH, Lu SN. Correlation of quantitative assay of hepatitis B surface antigen and HBV DNA levels in asymptomatic hepatitis B virus carriers. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:1213-8.
14. Martin LA, Stramer SL, Kuhns MC, Schlauder GG. Correlation of improved hepatitis B surface antigen detection limits with hepatitis B virus DNA nucleic acid test yield in blood donations. *Transfusion* 2012;52:2201-8.
15. Matsubara N, Kusano O, Sugamata Y, Itoh T, Mizuii M, Tanaka J, et al. A novel hepatitis B virus surface antigen immunoassay as sensitive as hepatitis B virus nucleic acid testing in detecting early infection. *Transfusion* 2009;49:585-95.
16. Ganji A, Esmaeilzadeh A, Ghafarzadegan K, Helalat H, Rafatpanah H, Mokhtarifar A. Correlation between HBsAg quantitative assay results and HBV DNA levels in chronic HBV. *Hepat Mon* 2011;11:342-5.