شیوع عفونت ویروس هپاتیت D در بیماران همودیالیزی و HIV مثبت

محمد رضا اقاصادقی[۱] ،مینو محرز[۲]،آرزو آقاخانی[۳] ، گلناز بهرامعلی[۴]، محمد بنی فضل[۵]،مریم فروغی[۶] ، فرخ لقا احمدی[۷]، علی اسلامی فر[۳] و آمیتیس رمضانی[۸*]

۱. دکترای بیوتکنولوژی، استادیار انستیتو پاستور ایران
۲. متخصص بیماریهای عفونی و گرمسیری،استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. پاتولوژیست، استادیار انستیتو پاستور ایران
۴. فوق لیسانس، انستیتو پاستور ایران
۵. متخصص اطفال، انجمن حمایت از بیماران عفونی کشور
۶. پزشک عمومی ، مرکز تحقیقات ایدز ایران
۷. فوق تخصص نفرولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
۸. متخصص بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشیار انستیتو پاستور ایران

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران ،خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران،گروه تحقیقات بالینی، تلفن:۰۲۱۶۶۹۶۸۸۵۲ ، نمابر ۰۲۱۶۶۴۶۵۱۴۷، amitisramezani@hotmail.com

دریافت مقاله: تیر نود پذیرش برای چاپ: شهریور نود

چکیده

سابقه و هدف: *ویروس هپاتیت D(HDV) یک ویروس ناقص می باشد که برای تکثیر به ویروس هپاتیت B (HBV) وابسته است. به دلیل راه های مشترک انتقال، بیماران همودیالیزی و الوده به ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) در خطر اکتساب HDV می باشند. هدف از این مطالعه بررسی شیوع عفونت HDV در بیماران همودیالیزی و HIV مثبت می باشد.*

روش کار: *۷۲۰ بیمار شامل ۱۲۰ بیمار همودیالیزی و ۶۰۰ بیمار HIV مثبت در شهر تهران در این مطالعه وارد شدند. کلیه بیماران HBsAg مثبت از نظر حضور انتی بادیهای ضد HDV (anti-HDV) بررسی شدند. نمونه های anti-HDV مثبت جهت تایید وجود HDV-RNA با روش nested PCR مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های مثبت ، جهت تعیین ژنوتایپ HDV سکوانس شدند.*

یافته ها: *۹ بیمار از ۱۲۰ بیمار همودیالیزی (۷/۵٪)و ۹ بیمار از ۶۰۰ بیمار HIV مثبت (۱/۵٪) HBsAg مثبت بودند.۳ نفر(۳۳/۳٪)از بیماران همودیالیزی و ۵ نفر(۵۵/۵٪)از بیماران الوده به HIV که HBsAg مثبت بودند،anti-HDV مثبت داشتند. از بین این نمونه ها ۳ نمونه (۳۷/۵٪) در PCR از نظر HDV-RNA مثبت بودند. به طور کلی ۲/۵٪ بیماران همودیالیزی و ۰/۸۳٪ بیماران الوده به HIV، anti-HDV مثبت بوده و ۱/۶۶٪ از بیماران همودیالیزی و ۰/۱۶٪ از بیماران HIV مثبت ، HDV-RNA مثبت گزارش شدند.تمام ایزوله های HDV در Clade 1 قرار گرفتند.*

نتیجه گیری: *این مطالعه نشان داد که گرچه شیوع کلی HDV در بیماران مورد بررسی بالا نمی باشد ولی افزایش در میزان HDV در بیماران پر خطر HBsAg مثبت مشاهده می شود.*

واژگان کلیدی : ویروس هپاتیت D (HDV)، ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV)، همودیالیز

مقدمه

ویروس هپاتیت D (HDV) یک ویروس ناقص می باشد که برای تکثیر به ویروس هپاتیت B(HBV) وابسته است و تقریبا ۲۰ میلیون نفر در سراسر دنیا را الوده کرده است(۱). عفونت HDV نسبت به عفونت تنهای ویروس هپاتیت B (HBV) موجب بیماری کبدی شدیدتر با پیشرفت سریع تر به سمت فیبروز ،decompensation کبد و کارسینوم کبد می شود(۲).

نواحی دارای شیوع بالاتر HDV شامل ایتالیا،قسمت هایی از اروپای شرقی،حوزه رود امازون، ونزوئلا، کلمبیا،برخی جزایر اقیانوس آرام،پاکستان و اسیای غربی می باشد(۸-۳).

HDV یک مشکل بهداشتی عمده در ایران است(۹). مطالعات در نواحی مختلف کشور نشان دهنده شیوع متفاوت عفونت HDV از ۲/۴٪ تا ۵/۸٪ در ناقلین HBV می باشد(۱۰،۱۱). شیوع HDV در بیماران مبتلا به عفونت مزمن HBV در تهران ۵/۷٪ گزارش شده است(۱۲).

همچنین مطالعات در مورد شیوع HDV در بیماران پرخطر در ایران نیز محدود می باشد. در مطالعات انجام شده این شیوع در بیماران هموفیلی ۳۳/۳۳٪ ، در بیماران همودیالیزی بین ۲۵/۲٪ و ۴۴/۵٪ ، در بیماران HIV مثبت ۳۱/۵۷٪ و در بیماران مبتلا به کارسینوم کبد۶۲/۵٪ گزارش شده است(۱۵-۱۳).

HDV دارای ۳ ژنوتایپ و ۲ ساب تایپ می باشد. ژنوتایپ I در سراسر جهان دیده می شود ولی سایر ژنوتایپ ها دارای محدودیت جغرافیایی هستند. ژنوتایپ I به طور عمده در امریکا ،خاورمیانه و اروپا مشاهده می گردد(۳ و۱۶). ژنوتایپ II عمدتا در خاور دور،و ژنوتایپ III در امریکای جنوبی دیده می شود(۴،۱۷).

انالیزهای اخیر تسلسل ژن HDV نشان می دهد که ژنوتایپ های HDV حداقل در ۷ clade قرار می گیرند (۱۸). هر چند در مطالعه ای که اخیرا انجام شده HDV به ۸ clade تقسیم شده است(۱۹).

مطالعات نشان می دهند که عفونت HDV به طور عمده از راه های تزریقی و جنسی منتقل می گردد(۲۰،۲۱). بنابراین بیماران همودیالیزی و HIV مثبت در خطر اکتساب HDV می باشند(۲۲،۲۳).

از انجا که مطالعات انجام شده بر روی شیوع و ژنوتایپ HDV در بیماران پر خطر در ایران محدود می باشد در این مطالعه به بررسی شیوع عفونت HDV و ژنوتایپ های ان در بیماران همودیالیزی و HIV مثبت می پردازیم.

روش کار

این مطالعه به صورت مقطعی بر روی ۷۲۰ بیمار شامل ۱۲۰ بیمار همودیالیزی و ۶۰۰ بیمار HIV مثبت در شهر تهران انجام گرفت. پس ازاخذ رضایت نامه و تکمیل فرم اطلاعاتی شامل مشخصات دموگرافیک از بیماران ،نمونه خون گرفته شد.

HBsAg و anti-HCV توسط روش الایزا به ترتیب با استفاده از کیت های (Hepanostika bioMerieux, Boxtel, Netherlands) و (Biorad, Segrate, Italy) و نمونه های HBsAg مثبت از نظر حضور anti-HDV با روش الایزا با استفاده از کیت (Dia-Pro Diagnostic, Bioprobes sri, Milano, Italy جستجو شد.

anti-HIV با روش الایزا (MP Biomedicals, Illkirch, France) بررسی گردید و نمونه های مثبت با روش وسترن بلات (Diaplus, San Francisco, USA) تایید شد.

RNA از ۲۰۰ میکرولیتر سرم ، توسط کیت (High pure Viral Nucleic Acid kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) استخراج شد ، سپس RNA به cDNA تبدیل شده و cDNA تکثیر شد. cDNA با استفاده از روش RT-PCR شامل مرحله اولیه denaturation (۹۵ درجه ۳ دقیقه) و متعاقب ان ۴۰ سیکل denaturation (۹۵ درجه ۴۰ ثانیه) ، annealing(۶۱ درجه ۴۵ ثانیه) وextension (۷۲ درجه ۵۰ ثانیه) تکثیر گردید. محصول RT-PCR با روش nested PCR (۹۵ درجه ۳ دقیقه و ۳۵ سیکل ۹۵ درجه ۴۵ ثانیه، ۶۰ درجه ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه ۴۵ ثانیه) با استفاده از Taq polymerase(Roche Diagnostics Gmbh, Mannheim, Germany) مجددا تکثیر(amplify) شد. پرایمرهای استفاده شده در RT-PCR/Nested PCR به صورت زیر بودند:

E1 (outer; sense), CCA GGT CGG ACC GCG AGG AGG (858–881 bases)

E2 (outer; anti sense), ACA AGG AGA GGC AGG ATC ACC GAC (1312–1289 bases)

E3 (inner; sense), GAT GCC ATG CCG ACC CGA AGA G (883–906 bases)

E4 (inner; anti sense), GAA GGA AGG CCC TCA AGA ACA AGA (1288–1265 bases)

پرایمرهای داخلی یک قطعه ۴۰۴ bp در ناحیه C-terminal انتی ژن HDV (HDAg) را تکثیر نمودند(۲۴). محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و در زیر نور U.V ارزیابی شد. سپس محصولات PCR توسط کیت تخلیص محصول PCR (Roche Diagnostics Gmbh, Mannheim, Germany) خالص شده و برای تعیین توالی (سکوانسینگ) ارسال شد.

آنالیز فیلوژنیک با استفاده از MEGA version 4 (۲۵) و BioEdit (The BioEdit Sequence Alignment Editor software, Department of the Microbiology, North California State University) انجام شد.

سکانس های بدست آمده توسط برنامه CLUSTAL W بررسی مقایسه ای (Aligned)شدو فواصل ژنتیکی با استفاده از روش Kimura 2- algorithm parameter براورد شد(۲۶). درخت فیلوژنیک با استفاده از روش neighbor-joining ترسیم شد. برای اثبات اعتبار درخت فیلوژنیک Resampling bootstrap ۱۰۰۰ بار انجام گرفت(۲۷). سکانس های نوکلئوتید ایزوله های HDV گزارش شده در این مقاله در بانک ژن تحت accession numbers (JF694492 - JF694494) ثبت شد.

یافته ها با استفاده از نرم افزار SPSS 11.5 و آزمونهای اماری t و chi-square (یا تست دقیق فیشر) تجزیه و تحلیل شد و مرز معنی داری اختلافات روی $P<0.05$ قرار داده شد. داده ها به صورت means ± standard deviations و در صورت لزوم عدد مطلق یا در صد گزارش شدند.

یافته ها

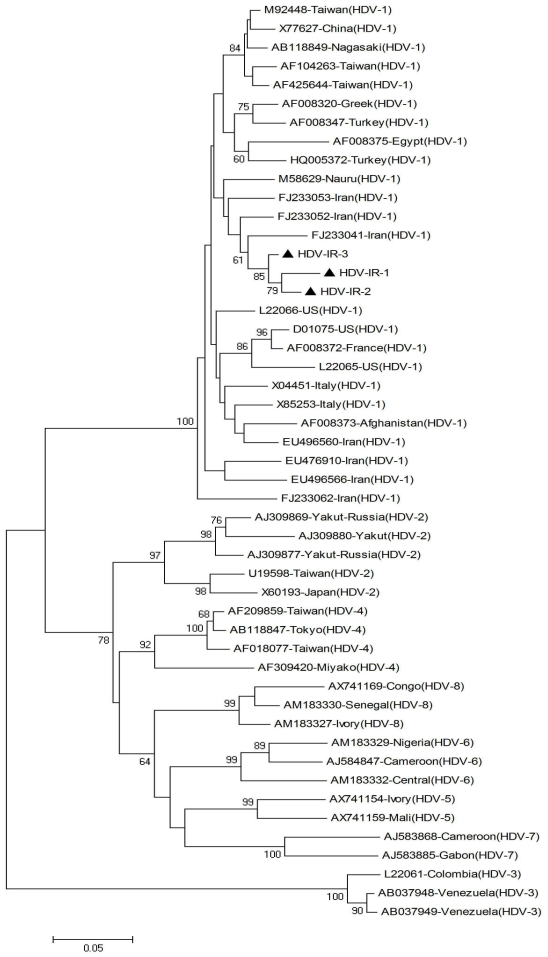
در این مطالعه ۷۲۰ بیمار شامل ۱۲۰ بیمار همودیالیزی و ۶۰۰ بیمار HIV مثبت وارد شدند. میانگین سنی بیماران همودیالیزی ۱۶± ۵۵ سال بود. ۶۰٪ بیماران مرد و ۴۰٪ انها زن بودند. مدت زمان دیالیز در این بیماران ۵/۱± ۵/۲ سال بود. تمام بیماران سابقه تزریق خون را ذکر می کردند ولی هیچ یک از انها سابقه پیوند عضو نداشتند.

میانگین سنی بیماران HIV مثبت ۹/۲± ۳۶/۹ سال بود.۶۹/۶٪ انها مرد و ۳۰/۴٪ زن بودند. میانگین سلول های CD4 بیماران $cells/mm^3$ (۱۶-۱۰۰۰) ۱۸۱±۲۷۵/۶ بود. شایع ترین راه احتمالی انتقال HIV در بیماران تزریق مواد مخدر ۵۳/۶٪ و انتقال از همسر الوده ۲۸/۷٪ بود.

۹ بیمار از ۱۲۰ بیمار همودیالیزی (۷/۵٪)و ۹ بیمار از ۶۰۰ بیمار HIV مثبت (۱/۵٪) HBsAg مثبت بودند.۳ نفر(۳۳/۳٪)از بیماران همودیالیزی و ۵ نفر (۵۵/۵٪)از بیماران الوده به HIV که HBsAg مثبت بودند،anti-HDV مثبت داشتند. از بین این نمونه ها ۳ نمونه (۳۷/۵٪) در PCR از نظر HDV-RNA مثبت شد. ۲ نفر از انها همودیالیزی و ۱ نفر الوده به ویروس HIV بود. عفونت HDV در مردان شایع تر از زنان بود. تمام بیماران الوده بهHIV/HBV/HDV معتاد به مواد مخدر تزریقی و دارای الودگی همزمان با HCV بودند.

به طور کلی ۲/۵٪ بیماران همودیالیزی و ۰/۸۳٪ بیماران الوده به HIV، anti-HDV مثبت بوده و ۱/۶۶٪ از بیماران همودیالیزی و ۰/۱۶٪ از بیماران HIV مثبت ،HDV-RNA مثبت گزارش شدند.تمام ایزوله های HDV در Clade 1 (ژنوتایپ I)قرار گرفتند(شکل ۱).

شکل ۱ . درخت فیلوژنتیک ترسیم شده با استفاده از روشneighbor-joining و kimura two-parameter matrix .ایزوله های ایران با پیشوند ▲ نشان داده شده اند



بحث

شیوع عفونت HDV متغیر بوده و به طور غالب در نواحی خاصی از جهان مشاهده می گردد(۲۸).مطالعات نشان داده اند که عفونت HDV به طور عمده از راه های تزریقی و جنسی منتقل می شود(۲۰،۲۱). بنابراین بیماران همودیالیزی و HIV مثبت در ریسک اکتساب HDV می باشند(۲۲،۲۳). تخمین زده می شود که ۵-۱/۹٪ بیماران الوده به HIV به طور همزمان با HBV و HDV نیز الوده هستند.این عفونت همزمان به ویژه در معتادین به مواد مخدر تزریقی مشاهده می گردد(۲۲،۲۳).

Fainboim و همکاران نشان دادند که شیوعanti-HDV در بیماران HIV مثبت پایین می باشد(۱/۹٪).در این مطالعه anti-HDV در معتادین به مواد مخدر تزریقی بالاتراز گروه هتروسکسوال بود (۳/۴٪ در برابر ۰٪)ولی اختلاف معنی داری بین ۲ گروه مشاهده نشد(۲۳).در مطالعه دیگری در تایوان ۲۲/۲٪ بیماران HIV مثبت دارای عفونت همزمان با HBV و HDV بودند(۲۹).مطالعه ای درایران شیوع HDV در بیماران دارای عفونت همزمان با HBV و HIV را ۳۱/۵۷٪ گزارش کرد(۳۰).

مطالعه ما نشان داد که ۰/۸۳٪ بیماران HIV مثبت دارای عفونت همزمان با HBV و HDV می باشند. تمام این بیماران معتاد به مواد مخدر تزریقی بودند.از سوی دیگر ما شیوع بالاتری از HDV را در بیماران دارای عفونت همزمان با HBV و HIV (۵۵/۵٪) نسبت به جمعیت عادی ایران (۲/۴٪-۵/۸٪) نشان دادیم.

شیوع HDV در بیماران همودیالیزی کاملا مشخص نمی باشد(۳۱).در مطالعاتی که توسط Ramia و Voiculescu و همکارانشان انجام شد در هیچ یک از بیماران همودیالیزی anti-HDV مشاهده نگردید(۳۲ و ۳۳). Abraham و همکاران گزارش کردند که۲/۹٪ گیرندگان پیوند کلیه با HDV الوده می باشند(۳۴). در مطالعه ای در ایران ۴۴/۵٪ بیماران همودیالیزی الوده به HBV دارای عفونت همزمان با HDVنیز بودند(۱۴).در مطالعه دیگری در ایران ۲۵/۲٪ بیماران همودیالیزی HBsAg مثبت از نظرanti-HDV نیز مثبت بودند(۱۳). یافته های ما نشان دهنده این است که به طور کلی ۳۳/۳٪ بیماران همودیالیزی HBsAg مثبت از نظر anti-HDV مثبت می باشند که نزدیک به سایر گزارشات از ایران است. همچنین ما افزایشی در میزان عفونت HDV در بیماران دارای عفونت همزمان با HBV وHIV (۵۵/۵٪) و بیماران همودیالیزی HBsAg مثبت (۳۳/۳٪)مشاهده کردیم گرچه ممکن است شیوع کلی HDV در بیماران پرخطر بالا نباشد.

اخیرا ۸ Clade اصلی برای HDV (HDV-1 تاHDV-8) گزارش شده است. HDV-1 و HDV-3 در سراسر جهان گسترش دارند ولی سایر ژنوتایپ ها دارای محدودیت جغرافیایی می باشند.HDV-2 به طور عمده در ژاپن، تایوان و روسیه مشاهده می گردد، HDV-4 عمدتا در ژاپن و تایوان و HDV-5, -6, -7, -8 در افریقا مشاهده می شوند(۳۵).

مطالعه ما نشان داد که تمام ایزوله های HDV این بررسی در Clade 1(ژنوتایپ I)قرار دارند که با نتایج مرتبط با ژنوتایپ از سایر مطالعات ایران، کشورهای همسایه و کشورهای اسیای میانه مانند لبنان، مصر، ترکیه و پاکستان هماهنگی دارد(۱۷، ۳۲، ۳۸-۳۶).

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که گرچه شیوع کلی HDV در بیماران مورد بررسی بالا نمی باشد ولی افزایش در میزان کلی HDV در بیماران پر خطرHBsAg مثبت مشاهده می شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از بخش هپاتیت و ایدز وتحقیقات بالینی انستیتو پاستور ایران به جهت حمایت مالی از طرح فوق قدردانی می نمایند.

REFERENCES

1. Dény P. Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades? Curr Top Microbiol Immunol. 2006;307:151-71

2. Grabowski J, Wedemeyer H. Hepatitis delta: immunopathogenesis and clinical challenges. Dig Dis. 2010;28(1):133-8

3. Rizzetto M, Hadziyannis S, Hansson BG, Toukan A, Gust I. Hepatitis delta virus infection in the world: epidemiological patterns and clinical expression. Gastroenterol Int 1992; 5:18–32.

4. Casey JL, Brown TL, Colan EJ, Wignall FS, Gerin JL. A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:9016–20.

5. Anonymous. Centers for Disease Control. Hepatitis surveillance report. MMWR 1990;53:23.

6. Rizzetto M, Ponzetto A, Forzani I. Epidemiology of hepatitis delta virus: overview. Prog Clin Biol Res 1991; 364:1–20.

7. Mumtaz K, Hamid SS, Adil S, et al. Epidemiology and clinical pattern of hepatitis delta virus infection in Pakistan. J Gastroenterol Hepatol 2005; 20:1503–7.

8. Gaeta GB, Stroffolini T, Chiaramonte M, et al. Chronic hepatitis D: a vanishing disease? An Italian multicenter study. Hepatology 2000; 32:824–7.

9. Alavian SM. We have more data regarding epidemiology of hepatitis D in Iran but there are defects to be filled yet! Hepatitis Mon 2008; 8: 245-247

10. Jaiswal SP, Chitnis DS, Artwani KK, Naik G, Jain AK. Prevalence of anti-delta antibodies in central India. Trop Gastroenterol 1999; 20: 29-32

11. Bhattacharyya S, Dalal BS, Lahiri A. Hepatitis D infectivity profile among hepatitis B infected hospitalised patients in Calcutta. Indian J Public Health 1998; 42: 108-112

12. Alavian SM, Assari Sh, Manzoori-Joybari H, et al. Frequency and risk factors of hepatitis D virus in hepatitis B patients. Govaresh 2005; 10: 21-26

13. arimi A, Amini S, Amirkhani A. Investigation and Comparison of hepatitis D prevalence in dialysis patients and the donors of HBsAg carrier. Teb va Tazkie 2000; 36:30-35

14. Rezvan H, Forouzandeh B, Taroyan S, Fadaiee S, Azordegan F. A study on delta virus infection and its clinical impact in Iran. Infection 1990; 18: 26-28

15. Abbas Z, Jafri W, Raza S. Hepatitis D: Scenario in the Asia-Pacific region. World J Gastroenterol. 2010;16(5):554-62

16. Shakil AO, Hadziyannis S, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM, Gerin JL, Casey JL. Geographic distribution and genetic variability of hepatitis delta virus genotype I. Virology 1997; 234: 160-167

17. Moatter T, Abbas Z, Shabir S, Jafri W. Clinical presentation and genotype of hepatitis delta in Karachi. World J Gastroenterol 2007; 13: 2604-2607

18. Radjef N, Gordien E, Ivaniushina V, et al. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. J Virol. 2004; 78: 2537 – 2544.

19. Le Gal FL, Gault E, Rapault MP, et al. Eight clade for hepatitis delta virus. Emerging Infect Dis. 2006; 12: 1447 – 1450.

20. Liaw YF, Chiu KW, Chu CM, Sheen IS, Huang MJ. Heterosexual transmission of hepatitis delta virus in the general population of an area endemic for hepatitis B virus infection-a prospective study. J Infect Dis 1990; 162:1170–2.

21. Stroffolini T, Ferrigno L, Cialdea L, Catapano R, Palumbo F, Novaco F. Incidence and risk factors of acute Delta hepatitis in Italy: results from a national surveillance system. SEIEVA Collaborating Group. J Hepatol 1994; 21:1123–6.

22. Shukla NB, Poles MA. Hepatitis B virus infection: co-infection with hepatitis C virus, hepatitis D virus, and human immunodeficiency virus. Clin Liver Dis 2004; 8:445–60.

23. Fainboim H, Gonzalez J, Fassio E, et al. Prevalence of hepatitis viruses in an anti-human immunodeficiency virus-positive population from Argentina. J Viral Hepat 1999; 6:53–7.

24. Behzadian F, Sabahi F, Karimi M, et al. Molecular phylogenetic analysis of Iranian HDV complete genome. Virus Genes. 2005;30(3):383-93

25. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEG A4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 2007; 24:1596–1599.

26. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 1980; 16:111–120.

27. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 1987; 4:406–425.

28. Solomon RE, Kaslow RA, Phair JP et al. Human immunodeficiency virus and delta virus in homosexual men. A study of four cohorts. Ann Intern Med 1988; 108: 51–54.

29. Sheng WH, Hung CC, Kao JH, et al. Impact of hepatitis D virus infection on the long-term outcomes of patients with hepatitis B virus and HIV coinfection in the era of highly active antiretroviral therapy: a matched cohort study. Clin Infect Dis. 2007;44(7):988-95

30. Vaziri S, Mansouri F, Sayad B, Afsharian M, Janbakhsh A, Karami M. Hepatitis D virus infection among HIV-HBV coinfected patients in Kermanshah, West of Iran. Hepatitis Mon 2008; 8: 252-257

31. Zuckerman M. Surveillance and control of blood-borne virus infections in haemodialysis units. J Hosp Infect. 2002; 50(1):1-5.

32. Ramia S, El-Zaatari M, Sharara AI, Ramlawi F, Farhat B. Current prevalence of hepatitis delta virus (HDV) infection and the range of HDV genotypes in Lebanon. Epidemiol Infect. 2007;135(6):959-62

33. Voiculescu M, Iliescu L, Ionescu C, et al. A cross-sectional epidemiological study of HBV, HCV, HDV and HEV prevalence in the SubCarpathian and South-Eastern regions of Romania. J Gastrointestin Liver Dis. 2010;19(1):43-8

34. Abraham P, John GT, Raghuraman S, et al. GB virus C/hepatitis G virus and TT virus infections among high risk renal transplant recipients in India. J Clin Virol. 2003; 28(1):59-69.

35. Mirshafiee H, Mahmoodian-Shooshtari M, Sharifi Z, Hosseini SM. Genotype analysis of hepatitis delta virus from hepatitis B surface antigen-positive patients using PCR-RFLP in Tehran, Iran. Arch Iran Med. 2009;12(3):238-43

36. Mohebbi SR, Zali N, Derakhshan F, Tahami A, et al. Molecular epidemiology of hepatitis delta virus (HDV) in Iran: a preliminary report. J Med Virol. 2008;80(12):2092-9

37. Saudy N, Sugauchi F, Tanaka Y, Suzuki S, Aal AA, Zaid MA, et al. Genotypes and phylogenetic characterization of hepatitis B and delta viruses in Egypt. J Med Virol. 2003; 70: 529 - 536.

38. Bozdayi AM, Aslan N, Bozdayi G, Türkyilmaz AR, Sengezer T, Wend U, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. Arch Virol. 2004;149(11):2115-29