

شیوع عفونت ثانویه و عفونت توأم هپاتیت دلتا در بیماران HBsAg مثبت مراجعه کننده به آزمایشگاه تشخیص طبی سازمان انتقال خون ایران

دکتر صدیقه امینی کافی آباد^{۱*}، افسانه تقی نیا^۲، فهیمه خان بابا^۳، دکتر علی طالبیان^۱

۱- حوزه مدیریت کنترل کیفی، سازمان انتقال خون ایران ۲- آزمایشگاه تشخیص طبی، سازمان انتقال خون ایران

دریافت: ۸۴/۱۰/۲۳ پذیرش: ۸۵/۱۰/۱۵

Title: Prevalence of Delta agent super-infection and co-infection among HBsAg-positive patients referring to reference IBTO Lab

Authors: Amini Kafi-abad S, (MD); Taghinia A, (BS); Khan Baba F, (BS); Talebian A, (MD).

Introduction: The hepatitis D virus (HDV) is a 36-nm virus, which needs hepatitis B virus for replication. Infection by the Delta agent can occur as a co-infection with hepatitis B, which usually causes acute hepatitis, or as a super-infection of hepatitis B infection. The present study was conducted to estimate the prevalence of super infection or co-infection in HBsAg positive patients.

Methods: Anti-HDV (IgM) and HDV Ag by EIA method were tested in 79 HBsAg-positive sera and the liver function tests including SGOT and SGPT were done. All anti-HDV IgM positive samples were tested for anti-HBc IgM by EIA method. The prevalence of super infection was determined.

Results: Delta Ag was not detected in any of the 79 sera. 7 out of 79 (8.8%) samples were positive for anti-HDV(IgM) but they were all negative for anti-HBc IgM. The liver enzyme function tests were elevated in 5 out of 6 samples.

Conclusion: 7 samples were positive for anti-HDV(IgM) and indicated recent infection with HDV in these patients, but anti-HBc (IgM) was not detected, so these serologic data suggest super-infection with Delta agent in HBV-infected patients. In HBsAg-positive patients with liver enzyme elevation, investigating possible HDV infection is strongly recommended.

Keywords: Delta hepatitis, hepatitis B, co-infection, super-infection.

Hakim Research Journal 2007; 9(4): 7- 11.

* نویسنده مسؤول: تهران، تقاطع بزرگراه شیخ فضل... و بزرگراه همت، سازمان انتقال خون ایران، حوزه مدیریت کنترل کیفی. تلفن: ۸۶۰۱۵۵۹، شماره: ۸۶۰۱۵۵۹
پست الکترونیک: dr.amini@gmail.com

چکیده

مقدمه: عامل هپاتیت دلتا یک ویروس 36 nm است که جهت تکثیر به ویروس هپاتیت «ب» احتیاج دارد. عفونت با عامل دلتا می‌تواند همزمان با عفونت ویروس هپاتیت «ب» رخ دهد در این صورت معمولاً سبب هپاتیت حاد می‌گردد و یا به شکل عفونت ثانویه در بیماران مبتلا به ویروس هپاتیت «ب» بروز می‌نماید. هدف از این مطالعه، تعیین شیوع عفونت ثانویه و یا عفونت همزمان در بیماران HBsAg مثبت است.

روش کار: در این تحقیق توصیفی بر روی سرم ۷۹ بیمار که HBsAg مثبت بودند، HDV Ag و Anti-HDV (IgM) با روش آنزیم ایمنونواسی بررسی گردید. آنزیم‌های کبدی، SGOT و SGPT اندازه‌گیری شدند. بر روی نمونه‌های Anti-HDV IgM مثبت Anti-HBc IgM انجام شد و شیوع عفونت ثانویه با HDV در مبتلایان به HBV با احتمال ۹۰٪ در جامعه برآورد گردید. یافته‌ها: آنتی‌ژن دلتا در هیچ‌یک از نمونه‌ها مثبت نبود. ۷ نمونه از ۷۹ نمونه (۸/۸٪) برای تست Anti-HDV (IgM) مثبت بوده ولی هیچ‌یک در تست Anti-HBc IgM مثبت نبودند. آنزیم کبدی در ۵ بیمار از ۶ بیماری که مورد بررسی قرار گرفتند، نسبت به محدوده مرجع افزایش یافته بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه در ۷ نمونه‌ای که Anti-HDV(IgM) مثبت گزارش گردید و نشانه عفونت اخیر با ویروس هپاتیت دلتا محسوب می‌شد، آزمایش Anti-HBcIgM منفی بود؛ لذا یافته‌های سرولوژیک فوق نشانگر عفونت با عامل دلتا به شکل عفونت ثانویه در مبتلایان هپاتیت «ب» بود. در بیماران HBsAg مثبت با هرگونه افزایش در آنزیم‌های کبدی بررسی عفونت ثانویه با عامل هپاتیت دلتا توصیه می‌گردد.

کل‌واژگان: هپاتیت دلتا، هپاتیت «ب»، عفونت ثانویه، عفونت توأم.

مقدمه

ویروس هپاتیت «د»^۱ در سال ۱۹۷۷ توسط ریزوتو^۲ و همکارانش کشف شد (۱ و ۲). ثابت شده که در چرخه تقسیم و تکثیر ویروس وجود یک ویروس کمکی الزامی است. معمولاً این ویروس کمکی، ویروس هپاتیت «ب» است؛ بنابراین فقط در بیماری عفونت با عامل هپاتیت دلتا رخ می‌دهد که عفونت با ویروس هپاتیت «ب» وجود داشته باشد (۳-۶). ویروس هپاتیت دلتا یک ویروس 36 nm با ساختمان شبه ویروسی از جنس RNA با ۱۰۶ کیلو باز می‌باشد که با HBsAg پوشیده شده است (۴ و ۷-۹). RNA آن یک رشته‌ای و حلقوی بوده و فاقد اشتراک با DNA ویروس هپاتیت «ب» است (۵ و ۱۰). ویروس دلتا شدیداً بیماری‌زا بوده و می‌تواند بیماری کبدی حاد یا مزمن ایجاد نماید (۱۰ و ۱۱).

عفونت با ویروس هپاتیت «د» عفونتی است که در سراسر دنیا دیده می‌شود ولی شیوع آن در نواحی مختلف جغرافیایی متفاوت است. از ۳۵۰ میلیون نفر مبتلا به HBV در سراسر جهان، ۵٪

آنان از عفونت توأم^۳ HBV و HDV رنج می‌برند (۸ و ۹). شیوع آن در سومالی، سنگال و کنیا ۵۰-۴۰٪ است و در ایران ۲-۵٪ بیماران HBsAg مثبت فاقد علائم بالینی گزارش شده‌اند (۹ و ۱۲ و ۱۳). در بیماران همودیالیزی، مبتلایان به سیروز و هپاتیت مزمن فعال، بیماران با بدخیمی سلول کبدی در ایران به ترتیب ۴۴/۵٪، ۴۹/۲٪ و ۶۳/۳٪ گزارش شده است (۱۲). عفونت با HDV می‌تواند همزمان با عفونت HBV رخ داده و به‌عنوان عفونت توأم باشد، یا در بیماری رخ دهد که قبلاً مبتلا به هپاتیت مزمن «ب» بوده و به‌عنوان عفونت ثانویه^۴ شناخته شود که در این صورت با افزایش مجدد آنزیم‌های کبدی همراه است (۲ و ۷ و ۱۴ و ۱۵). شدت علائم بالینی در این دو حالت متفاوت خواهد بود. در مطالعه‌های فوق شیوع عفونت توأم و عفونت ثانویه اعلام نشده است. آنتی‌ژن هپاتیت دلتا^۵ فقط زمان کوتاهی در ابتدای دوره بیماری تقریباً به مدت دو هفته قبل از پیدایش Anti-HDV قابل شناسایی است؛ بنابراین

³ Co- infection

⁴ Super infection

⁵ HDAg

¹ HDV

² Rizzetto

Organon Teknika (هلند) و آزمایش‌های HDAG، IgM Anti-HDV با کیت‌های محصول شرکت Diasorin (ایتالیا) طبق دستورالعمل کیت در بیماران انجام شد. کلیه کیت‌های مصرفی بر مبنای روش آنزیم ایمنونواسی طراحی شده بودند. شیوع عفونت ثانویه با عامل هپاتیت دلتا در مبتلایان به هپاتیت «ب» تعیین و میزان آن با احتمال ۹۰٪ در جامعه برآورد گردید.

نتایج

مطالعه بر روی ۷۹ نمونه از بیماران مبتلا به هپاتیت «ب»، HBsAg مثبت، در محدوده سنی ۹ تا ۷۲ سال و با میانگین سنی ۴۲/۴ سال انجام شد. کلیه نمونه‌ها جهت شاخص‌های HDAG، Anti-HD IgM و HDAG، Anti-HD IgM مورد بررسی و آزمایش برای شاخص Anti-HDV IgM قرار گرفتند که هیچ یک برای شاخص Anti-HBc IgM مثبت گزارش نشد. نتایج سایر آزمایش‌ها در جدول ۲ ذکر شده است.

جدول ۲- نتایج آزمایش‌های HBsAg، HDAG، Anti-HDV IgM، و Anti-HBc IgM در ۷۹ بیمار مورد مطالعه

آزمایش	HBsAg	HDAG	Anti HDV IgM
تعداد موارد مثبت	۷۹ (۱۰۰٪)	۰	۷ (۸/۸٪)
تعداد موارد منفی	۰	۷۹ (۱۰۰٪)	۷۲ (۹۱/۲٪)
جمع	۷۹	۷۹	۷۹

آنزیم‌های کبدی ۶ بیمار از ۷ بیمار فوق مورد بررسی قرار گرفت. آنزیم‌های کبدی یک بیمار در محدوده مرجع قرار داشت و ۵ بیمار دیگر دارای آنزیم بیش از حد مرجع بودند. آنزیم SGOT با محدوده مرجع U/l ۴۰-۵ افزایش ۵۵ تا U/l ۱۴۵ (افزایش ۱/۳ تا ۳/۲۶ نسبت به محدوده مرجع) و SGPT با محدوده مرجع U/l ۴۰-۵، افزایش ۵۲ تا U/l ۲۱۵ (افزایش ۱/۳ تا ۵/۳۳ نسبت به محدوده مرجع) را نشان داد. در جدول ۳ توزیع سنی، جنسی و سایر شاخص‌های ویروس هپاتیت «ب» در تعدادی از بیماران که مورد آزمایش قرار گرفتند، بیان شده است. نتایج آزمایش‌های فوق بیانگر ابتلای ۷ بیمار مبتلا به هپاتیت «ب» است که عفونت هپاتیت دلتا بر روی آن افزوده شده و شیوعی معادل ۸/۸٪ عفونت در بیماران HBsAg مثبت دارد. با توجه به شیوع در نمونه‌های مورد بررسی، شیوع آن در جامعه بیماران مبتلا به هپاتیت «ب» با احتمال ۹۰٪ از حداقل ۲/۶٪ تا حداکثر ۱۵٪ برآورد می‌گردد. در هیچ‌یک از بیماران

زمستان ۸۵، دوره نهم، شماره چهارم

به‌ندرت در بیماران قابل شناسایی خواهد بود. مثبت شدن آن نشانه عفونت حاد است (۵ و ۷). وجود Anti-HDV معتبرترین و اختصاصی‌ترین شاخص تشخیصی برای HDV محسوب می‌شود. علائم بالینی و زردی قبل از پیدایش آنتی‌بادی پدیدار می‌شود.

Anti-HDV IgM ارتباط مستقیمی با تکثیر ویروس دارد. بنابراین در دوره حاد بیماری که تکثیر ویروس زیاد است تیتراژ آنتی‌بادی نیز بالا خواهد بود و با شروع ازمان بیماری کاهش خواهد یافت (۷ و ۱۶).

وجود تیتراژ بالای Anti-HBc IgM نشانه عفونت اخیر با HBV است. لذا در صورت مثبت بودن همزمان با شاخص‌های HDV نشانه عفونت توأم خواهد بود (۵). با انجام آزمایش‌های Anti-HDV IgM، HBsAg و Anti-HBc IgM تشخیص عفونت توأم HDV و HBV یا عفونت ثانویه HDV در مبتلایان به HBV مزمن مقدور است (جدول ۱).

جدول ۱- شاخص‌های عفونت با HDV در عفونت توأم همزمان و عفونت ثانویه در مبتلایان به عفونت HBV (۴ و ۷ و ۹)

آزمایش	هپاتیت حاد با عامل دلتا	
	عفونت ثانویه	عفونت توأم همزمان
HBsAg	مثبت	معمولاً مثبت
HDAG	مثبت گذرا/طولانی	مثبت گذرا
Anti-HDV IgM	افزایش تیتراژ	مثبت گذرا/ تیتراژ پایین
Anti-HBc IgM	منفی	مثبت

در این مطالعه بیماران با HBsAg مثبت مورد مطالعه قرار گرفتند و از نظر آنتی‌ژن ویروس دلتا، آنتی‌بادی IgM بر ضد ویروس دلتا، آنتی‌بادی IgM بر علیه HBcAg مورد آزمایش قرار گرفتند، تا از نظر عفونت توأم همزمان و یا عفونت ثانویه در مبتلایان به عفونت HBV مزمن ارزیابی شوند.

روش کار

در این مطالعه توصیفی، کلیه بیمارانی که از هفته چهارم فروردین تا هفته اول خردادماه ۷۹ به آزمایشگاه تشخیص طبی سازمان انتقال خون مراجعه نموده و HBsAg مثبت بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. از تمامی بیماران مورد مطالعه، نمونه در لوله‌های لخته جمع‌آوری و در طی ۵ ساعت پس از نمونه‌برداری سرم جدا و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش‌ها نگهداری شدند. آزمایش‌های HBsAg، Anti-HBe، HBeAg، Anti-HBc IgM با کیت‌های محصول شرکت BIO-RAD (فرانسه) و آزمایش‌های Anti-HBc با کیت محصول شرکت

(۱۷). در یک بررسی در اندونزی هپاتیت D در مبتلایان عفونت مزمن هپاتیت «ب» کمتر از ۰/۵٪ گزارش شده، در مطالعه مذکور بیماران و اهدا کنندگان خون مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۸). در مطالعه‌های مذکور حضور آنتی‌بادی بر علیه ویروس دلتا مورد مطالعه قرار گرفته که از کلاس IgM و IgG توأم بوده است. عفونت با HDV از راه تماس با خون یا سایر مایعات بیولوژیک بدن مانند اگزودای زخم مبتلایان به عفونت رخ می‌دهد. شایع‌ترین راه انتقال بیماری از راه تزریق مواد مخدر با سوزن‌های چند بار مصرف است (۲ و ۸ و ۱۸ و ۲۷-۲۴). از سایر راه‌های انتقال عفونت، تزریق خون، تماس جنسی (هم‌جنس‌باز یا غیرهم‌جنس‌باز) و عفونت‌های بیمارستانی مانند انتقال در واحدهای همودیالیز، تزریقات و واکسیناسیون با سوزن آلوده است (۷). در این مطالعه به شیوع عفونت با عامل هپاتیت «د» پرداخت نشده است ولی با وجود بررسی در جهت افتراق عفونت ثانویه از عفونت توأم، افزایش اندک شیوع عفونت نسبت به تحقیق‌های قبلی که در ایران انجام شده مشاهده می‌گردد هر چند نسبت به بسیاری از کشورها کمتر است. این افزایش می‌تواند با توجه به راه‌های انتقال بیماری و افزایش حساسیت کیت‌های تولیدی در جهان باشد که مقادیر کمتر آنتی‌بادی را شناسایی می‌کند. در مطالعه‌های قبلی آنتی‌بادی بر علیه ویروس دلتا بررسی شده که از هر دو کلاس IgM و IgG بوده است و حتی در صورت بهبودی از بیماری به علت وجود Anti-HDV IgG در خون می‌تواند مثبت باقی بماند (۷ و ۲۸ و ۲۹). ولی در این مطالعه برای افتراق عفونت ثانویه از عفونت توأم همزمان از Anti-HD IgM استفاده شده است که ارتباط مستقیمی با تکثیر ویروس دارد و در دوره حاد بیماری تیتراژ آنتی‌بادی بالا بوده و با شروع ازمان بیماری کاهش خواهد یافت و منفی می‌شود (۹ و ۳۰). در کشور ما شایع‌ترین راه انتقال عفونت با HBV انتقال عمودی است (۳۱)، ولی در HDV انتقال مادر به فرزند راه شایعی نبوده (۳۲) و راه‌های دیگر انتقال مانند انتقال از راه تزریق با سوزن آلوده مطرح است. چنان‌که در این مطالعه نیز عفونت فقط در بزرگسالان گزارش شده است. با توجه به نتایج این مطالعه توصیه می‌گردد در صورت هرگونه افزایش در آنزیم‌های کبدی بیماران HBsAg مثبت، بیماران از نظر عفونت ثانویه با عامل هپاتیت دلتا مورد ارزیابی قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری کلیه کارکنان بخش هپاتیت و ایدز آزمایشگاه تشخیص طبی و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

عفونت همزمان ویروس هپاتیت «ب» و عامل هپاتیت دلتا رخ نداده است. با توجه به سن مبتلایان عفونت اغلب در بزرگسالان رخ داده و همراه با افزایش آنزیم‌های کبدی است.

جدول ۳- توزیع فراوانی عفونت ثانویه HDV در بیماران HBsAg مثبت به تفکیک عوامل مرتبط

عوامل مرتبط	عفونت ثانویه HDV در مبتلایان به HBV مزمن	عدم ابتلا به HDV	جمع
جنس مذکر	۶	۴۸	۵۴
مونث	۱	۲۴	۲۵
سن (سال) ۰-۱۵	۰	۳	۳
۱۶-۳۰	۰	۱۲	۱۲
۳۱-۴۵	۳	۲۸	۳۰
۴۶-۶۰	۲	۲۱	۲۳
۶۱-۷۵	۲	۸	۱۰
	مثبت	مثبت	منفی
* شاخص Anti-HBc	۳	۲۱	۰
Anti-HBe	۲	۲۱	۲
HBe Ag	۰	۲	۲۳
	مثبت	مثبت	منفی
	۳	۲	۲۸

* شاخص‌های ویروسی در تعدادی از بیماران انجام شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این تحقیق، ۷ نفر (۸/۸٪) از بیماران HBsAg مبتلا به عفونت ثانویه با عامل دلتا هستند و هیچ‌یک از این گروه بیماران، عفونت همزمان HBV و HDV را نشان ندادند. این بیماران افزایش قابل توجه آنزیم‌های کبدی را نسبت به میزان مرجع نشان دادند. از نظر گسترش جغرافیایی، مناطق جغرافیایی جهان را به سه گروه تقسیم نموده‌اند، نواحی با همه‌گیری بالا مانند نواحی آمازون در ونزوئلا و برخی از کشورهای آفریقایی؛ نواحی آندمیک مانند جنوب ایتالیا، یونان، کشورهای حوزه مدیترانه و بنگلادش و نواحی با شیوع کمتر مانند کشورهای صنعتی که بین افراد با عوامل خطر ساز مانند معتادان به مواد مخدر تزریقی دیده می‌شود (۷ و ۱۷ و ۱۹-۹). شیوع آن در ناقلین و مبتلایان به عفونت مزمن HBV در سومالی، سنگال و کنیا ۵۰-۴۰٪ (۹)، جنوب ایتالیا ۲۳٪ (۷)، عربستان سعودی ۱۳/۶٪ (۲۰)، هند ۱/۸٪ (۲۱)، چین ۷/۷٪ (۲۲)، ژاپن ۸/۵٪ (۲۳)، یمن ۲/۵-۲٪ و ایران در بیماران HBsAg مثبت فاقد علائم بالینی، همودیالیزی، مبتلایان به سیروز و هپاتیت مزمن فعال، بیماران با بدخیمی سلول کبدی به ترتیب ۲/۵-۲٪، ۴۴/۵٪، ۴۹/۲٪ و ۶۳/۳٪ گزارش شده است (۹ و ۱۲ و ۱۳). در یک تحقیق در بنگلادش، با وجود شیوع متوسط عفونت با ویروس هپاتیت B، عفونت همزمان با عامل دلتا ۲۱/۸٪ تا ۲۵/۶٪ متناسب با سن بیماران برآورد شده است

References

- 1- Taylor JM. Replication of hepatitis D virus. In: Harrison TJ, Zuckerman AJ. *The molecular medicine of viral hepatitis*. Chichester: John Wiley and Sons; 1997: 133-141.
- 2- Hadler SC, Monzon MD, Ponzetto A, et al. Delta virus infection and severe hepatitis. *Annals Internal Med* 1984; 100: 339-344.
- 3- Robinson SW. Hepatitis B virus and hepatitis D virus. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. *Principle and practice of infection disease*. New York :Churchill Living Stone; 2000: 1406-1439.
- 4- Sherlock Sh, Dodey J. *Disease of the liver and biliary system*. Malden: Blackwell Science; 1997: 265-302.
- 5- Bendinell M, Pistello M, Freer G, et al. Viral hepatitis. In: Rose NR, Hamilton RG, Detrick B. *Manual of clinical laboratory immunology*. Washington D.C: ASM Press; 2002: 696-717.
- 6- Rizetto M. The delta agent. *Hepatology* 1983; 3: 729-737.
- 7- Zuckerman AJ, Thomas HC. *Viral Hepatitis*. London: Churchill Livingstone; 1998: 359-395.
- 8- Adhami T, Levinthal G. Disease management project: hepatitis D. 2002. is Available at: www.clevelandmed.com/diseasemanagement/gastro/hepatitis_d
- 9- Fagan EA, Harrison TJ. *Viral hepatitis*. Oxford: Bios; 2000: 89-130.
- 10- Smedile A, Verme G, Cargnel A, et.al. Influence of Delta infection on severity of hepatitis B. *Lancet* 1982; 945-947.
- 11- Wu JC, Huang IA, Huang YH, et al. Mixed genotypes infection with hepatitis D virus. *J Med Viral* 1999; 57(1): 64-67.
- 12- Rezvan H, Forouzandeh B, Taroyan S, et al. A study on delta virus infection and its clinical impact in Iran. *Infection* 1990; 18(1): 26-8.
- 13- Amini S, Mahmoodi MF, Andalibi S, et al. Seroepidemiology of hepatitis B, delta and human immunodeficiency virus infections in Hamadan province, Iran: a population based study. *J Trop Med Hyg* 1993; 96(5): 227-287.
- 14- Ryder SD. Viral hepatitis. In: Cohen J, Powderly GW. *Infectious disease*. London: Mosby; 2004: 529-545.
- 15- Caredda F, Rossi E, Monforte AA, et al. Hepatitis B virus-associated coinfection and superinfection with delta agent: indistinguishable disease with different outcome. *J Infet Dis* 1985; 151(5): 925-928.
- 16- Dianstag JL, Isselbacher KJ. Acute viral hepatitis. In: Braunwald E, Hauser SL, Fauci AS, et al. *Principles of internal medicine*. New York: McGraw Hill; 2001: 1721-1737.
- 17- Zaki H, Darmstadt GL, Baten A, et al. Seroepidemiology of hepatitis B and delta virus infections in Bangladesh. *J Trop Pediatr* 2003; 49(6): 371-374.
- 18- Lusida MI, Surayah, Sakugawa H, et al. Genotype and subtype analysis of hepatitis B virus (HBV) and possible co-infection of HBV and hepatitis C virus (HCV) or hepatitis D virus (HDV) in blood donors, patients with chronic liver disease and patients on hemodialysis in Surabaya, Indonesia. *Microbiol Immunol* 2003; 47(12): 969-972.
- 19- Bader FT. Viral hepatitis. In: Storch GA. *Essentials of diagnostic virology*. New York: Churchill Living Stone; 2000: 115-128.
- 20- Njoh J, Zimmo S. Prevalence of antibody to hepatitis D virus among HBsAg- positive drug dependent patients in Jeddah, Saudi Arabia. *East Afr Med J* 1998;75(6):327-8.
- 21- Bhattacharya S, Dalal BS, Lahiri A. Hepatitis D infectivity profile among hepatitis B infected hospitalized patients in Calcutta. *Indian J Public Health* 1998; 42(4): 108-12.
- 22- Chen X, Xuan-M, Yin Y. Study of HDV infection in Shandong province. *Chung Hua liu* 1998;19(3):138-140.
- 23- Arakawa A, Moriyama M, Yaira M, et.al. Molecular analysis of hepatitis D virus infection in Miyako Island, a small Japanese island. *J Viral Hepatitis* 2000; 7: 375-381.
- 24- Manock SR, Kelley PM, Hyams KC, et al. An Outbreak of fulminant hepatitis delta in the Waorani, an indigenous people of the Amazon basin of Ecuador. *Am J Med Hyg* 2000; 63(3,4): 209-213.
- 25- Rizetto M, Purcell RH, Gerin JL. Epidemiology of HBV-associated delta agent: geographical distribution of anti-delta and prevalence in polytransfused HBsAg carriers. *Lancet* 1980; 7: 1215- 1218.
- 26- Roumeliotou-Krayannis A, Tassopoulos N, Karpodini E, et al. Prevalence of HBV, HDV and HIV infections among intravenous drug addicts in Greece. *Eur J Epidemiol* 1987; 3(2): 143-146.
- 27- Theamboonlers A, Hansurabhanon T, Verechai V, et al. Hepatitis B virus infection in Thailand: HDV genotyping by RT PCR, RFLP and direct sequencing. *Infection* 2002; 30(3): 140-144.
- 28- Shattock AG, Morris MC. Evaluation of commercial enzyme immunoassays for detection of hepatitis delta antigen and anti-hepatitis delta virus (HDV) and immunoglobulin M and anti-HDV antibodies. *J Clinic Microbiol* 1991; 29(9): 1873-1876.
- 29- Jardi R, Buti M, Cortina M, et al. Determination of hepatitis delta virus RNA by polymerase chain reaction in acute and chronic delta infection. *Hepatology* 1995; 21(1): 25-29.
- 30- Horvat RT, Tegtmeier GE. Hepatitis B and D viruses. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al. *Manual of clinical microbiology*. Washington D.C: ASM Press; 2003: 1464-1479.
- 31- Winbaum C, Lyster R, Margolis HS. Prevention and control of infections with hepatitis viruses in correctional settings. 2003; [1-33]. is available at: <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis>.
- 32- Smedile A, Dentico P, Zanetti A, et al. Infection with the delta agent in chronic HBsAg carriers. *Gastroentrol* 1981; 81: 992-997.