

Occult Hepatitis B Virus Infection among Cornea Donors in the Central Eye Bank of Iran

Samiee S, PhD¹; Rezaei Kanavi M, MD^{2,3*}; Javadi MA, MD^{3,4}; Bagheri A, PhD⁵; Bayat Makoo K, MSc³

¹Iranian Blood Transfusion Organization Research Center, Tehran, Iran; ²Ocular Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran; ³Central Eye Bank of Iran, Tehran, Iran; ⁴Ophthalmic Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran; ⁵University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran, Iran

* Correspondence: mrezaie47@yahoo.com

Purpose: This study was designed to detect occult hepatitis B virus (HBV) infection among cornea donors to the Central Eye Bank of Iran using polymerase chain reaction (PCR).

Methods: Cornea donors with negative screening serologic results for HBS Ag, HBS Ab, HCV Ab, HIV Ab, HTLV Ab, and syphilis, and positive serology for HB Core Ab, underwent real-time PCR to detect HBV DNA with a detection level of 400IU/mL.

Results: Over a 2-year period, 8372 sera from 8372 cornea donors were enrolled; 76 (0.9%) out of which were serology negative for abovementioned antibodies except for HB Core Ab. Real-time PCR performed in these 76 cases detected HBV DNA in 6 (7.9%) cases. The sera were inadequate for PCR test in 4 cases (5.3%). HBV DNA was not detectable in 66 cases (86.8%), and hence the corresponding corneas were released for transplantation.

Conclusion: Nucleic acid amplification test for HBV is necessitated for detection of occult HBV in cornea donors in order to minimize the risk of HBV transmission via corneal transplantation. In the present study, HBV DNA was undetectable in the majority of cases who were suspicious of occult HBV infection, leading to release of the corresponding corneas for transplantation. These tissues used to be discarded because of inability to evaluate HBA DNA.

Keywords: Cornea Donors, Eye Bank, Hepatitis B virus, Occult HBV, Real Time PCR

• Bina J Ophthalmol 2016; 22 (1): 41-46.

Received: 5 July 2016

Accepted: 22 August 2016

شیوع عفونت پنهان با ویروس هپاتیت B در میان اهداکنندگان قرنیه در بانک چشم جمهوری اسلامی ایران

دکتر شهرام سمیعی^۱، دکتر مژگان رضایی کنوی^{۲*}، دکتر محمدعلی جوادی^۳، دکتر ابودر باقری^۴ و کامبیز بیات ماکو^۵

هدف: تعیین عفونت‌های پنهان Occult Hepatitis B Virus (HBV) در اهداکنندگان قرنیه بانک چشم جمهوری اسلامی ایران با استفاده از تکنیک Polymerase Chain Reaction و نیز ارزیابی تبعات فرهنگی و اقتصادی نتایج این روش در رد یا نگهداری قرنیه‌های این افراد جهت پیوند.

روش پژوهش: سرم خون اهداکنندگان قرنیه که آزمایش‌های سرولوژی غربالگری در آن‌ها برای HCV و HIV Ab و HTLV Ab و HBS Ag و HBS Ab و سفیلیس منفی و برای HB Core Ab مثبت بود، تحت Real Time PCR برای تعیین HBV DNA قرار گرفت و حد تشخیصی ۴۰۰ IU/ml برای تشخیص DNA ویروس هپاتیت B، در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: طی دوره دو ساله، تعداد ۸۳۷۲ نمونه سرم از ۸۳۷۲ دهنده مورد بررسی قرار گرفتند. از کل سرم‌های فوق، ۷۶ نمونه (۰٫۹ درصد) براساس نتایج آزمایشات الایزا HTLV Ab، HIV Ab، HCV Ab، HBS Ag و سفیلیس منفی، ولی HB Core Ab مثبت و HBS Ab منفی داشته و سرم آن‌ها تحت Real Time PCR برای HBV DNA قرار گرفت. نتایج PCR در ۶ مورد (۷٫۹ درصد) Detectable (بالتر از ۴۰۰ IU/ml) و در ۶۶ مورد (۸۶٫۸ درصد) Undetectable بود. در ۴ مورد (۵٫۳ درصد) مقدار سرم ارسالی

برای انجام آزمایشات PCR، ناکافی بود.

نتیجه‌گیری: استفاده از Nucleic Acid Amplification Tests (NATs) در تشخیص موارد Occult HBV در اهداکنندگان قرنیه به منظور کاهش خطر انتقال عفونت هیپاتیت B در اثر پیوند قرنیه الزامی است. غیرقابل تشخیص شدن HBV DNA در درصد بالایی از سرم اهداکنندگان قرنیه مشکوک به Occult HBV در مطالعه فعلی، منجر به قابل استفاده شدن قرنیه‌های اهدایی در این گروه از اهداکنندگان قرنیه برای پیوند گردید که در گذشته به علت عدم انجام HBV NAT، غیر قابل پیوند بودند.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۹۵؛ دوره ۲۲، شماره ۱: ۴۶-۴۱.

• **پاسخ‌گو:** دکتر مژگان رضایی کنوی (e-mail: mrezaie47@yahoo.com)

دریافت مقاله: ۱۵ تیر ۱۳۹۵

تایید مقاله: ۱ شهریور ۱۳۹۵

- ۱- دکترای بیوشیمی- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران- تهران- ایران
 - ۲- دانشیار چشم‌پزشک- مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران
 - ۳- چشم‌پزشک- بانک چشم جمهوری اسلامی ایران- تهران- ایران
 - ۴- استاد- چشم‌پزشک- مرکز تحقیقات چشم- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران
 - ۵- دکترای ژنتیک پزشکی- دانشگاه علوم بهزیستی و توان‌بخشی- تهران- ایران
 - ۶- کارشناس بانک چشم جمهوری اسلامی ایران- تهران- ایران
- تهران- پاسداران- بوستان نهم- خیابان پایدارفرد (خیابان امیر ابراهیمی)- پلاک ۲۳- مرکز تحقیقات چشم

مقدمه

موارد اهدایی عفونت یافته با HBV را رد کرده و با کاهش انتقال HBV به گیرنده و عواقب آن همراه می‌باشد، به ویژه در گیرندگانی که سیستم ایمنی‌شان تضعیف یافته باشد^۱. در مطالعه Said و همکاران^{۱۳} با استفاده از آزمایش Real time PCR، DNA ویروس هیپاتیت B در ۱۷/۲ درصد از دهندگان خون که HBS Ag منفی و HB core Ab مثبت بودند، تعیین شد که از میان آن‌ها HBS Ag در ۲۱/۱ درصد منفی و ۶ درصد مثبت بود. نتایج این مطالعه ثابت کرد که مثبت شدن آزمایش HB core Ab سبب رد تعداد ثابتی از دهندگان خون می‌شود که بیش از ۸۰ درصد این موارد از نظر DNA ویروس هیپاتیت B منفی بوده‌اند.

یکی از اهداف اصلی بانک‌های چشم، پیش‌گیری از انتقال بیماری از طریق بافت دهنده به گیرنده است. به منظور دستیابی به سطح بالای ایمنی برای بافت‌های چشم اهداکنندگان و به حداقل رسانیدن خطر انتقال بیماری‌های سیستمیک عفونی از جمله هیپاتیت B از دهنده و گیرندگان بافت چشم، انجام آزمایشات غربالگری سرولوژی روی سرم خون دهندگان ضروری و غیرقابل اجتناب است^{۱۴}. در بانک چشم جمهوری اسلامی ایران بر اساس استانداردهای طبی انجمن بانک چشم آمریکا و انجمن بانک چشم اروپا^{۱۵،۱۶} سرم خون دهندگان از نظر HBV، ویروس هیپاتیت C، ویروس HIV، ویروس HTLV و سفیلیس غربالگری می‌شود. در مورد HBV، خط اول غربالگری انجام آزمایش ELISA برای HBS Ag است^{۱۷} که در صورت مثبت شدن، بافت چشم اهداکننده جهت پیوند ارسال نمی‌شود^{۱۵،۱۶}. در صورت منفی شدن این آزمایش، HB Core Ab انجام می‌شود که با منفی شدن نتیجه آزمایش، بافت

ویروس هیپاتیت B (hepatitis B virus, HBV) یکی از مشکلات اصلی در بهداشت عمومی بوده و حدود ۴۰۰ میلیون نفر در سراسر جهان به عفونت مزمن با این ویروس مبتلا هستند^{۱۸}. ایران به عنوان یک منطقه حدواسط از نظر آندمیک برای این عفونت به شمار می‌رود. شیوع این عفونت، ۱/۷ درصد در کل جمعیت است، با این حال شیوع عفونت در اهداکنندگان خون ۰/۸ درصد، در معتادان مواد مخدر تزریقی ۳/۲ درصد و در بیماران مبتلا به تالاسمی، صفر تا ۱/۵ درصد تخمین زده شده است^۳. عفونت پنهان با HBV، نخستین بار در سال ۱۹۷۰ توسط Tobar و همکاران تعریف شد^۴ که ویژگی آن وجود DNA ویروس هیپاتیت B در خون یا بافت و قابل تشخیص نبودن آنتی‌ژن سطحی HBV، با یا بدون آنتی‌بادی‌های ضد HB Core یا HB Surface و خارج از Window Period بود^۵. اکثر عفونت‌های پنهان با HBV، بدون علامت بوده و تشخیص آن‌ها با ارایه روش‌های پیش‌رفته مولکولی افزایش یافته است^۶. عفونت نهفته با HBV در اهداکنندگان سالم خون، بیماران مبتلا به بیماری مزمن کبدی و کارسینوم هپاتوسلولار در فعالیت مجدد ویروس به دنبال تضعیف ایمنی و انتقال تصادفی از طریق پیوند یا انتقال خون گزارش شده است^{۷،۸}. با استفاده از روش‌های با حساسیت بالا برای تعیین DNA ویروس هیپاتیت B، سطوح پایین ویرمی در ۳۸-۱/۶ درصد دهندگان خون که HBS Ag منفی و HB core Ab مثبت بوده‌اند، نشان داده شده است^{۹-۱۱}. اضافه شدن آنتی‌بادی ضد HB core برای غربالگری دهندگان خون اگرچه منجر به رد تعداد زیادی از موارد اهدا خواهد شد، ولی به طور قطع

شدن کلیه آزمایشات فوق در هر دهنده، بافت‌های چشم در صورت مناسب بودن قرنیه و صلبیه جهت پیوند ارسال می‌گردیدند. در صورت مثبت بودن HB core Ab، گام بعدی آزمایش HBS Ab (الایزا، Dia-Pro, Italy) بود که با پاسخ مثبت، بافت چشم برای پیوند ارسال می‌شد. در صورت منفی شدن HBS Ab، باقی‌مانده سرم خون دهنده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، صبح روز بعد از فرآوری بافت، به آزمایشگاه مرکز تحقیقات چشم جهت تعیین DNA ویروس هپاتیت B ارسال می‌گردید. در این میان، گلوب‌های اهداکنندگان، تا مشخص شدن نتایج بیولوژی مولکولی، پس از فرآوری گلوب در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد فریز می‌شوند و یا این که دیسک قرنیه در اسکرا کات شده و داخل محلول نگه‌دارنده در دمای یخچال نگه‌داری می‌گردد.

آزمایش Real Time PCR در آزمایشگاه سلولی - مولکولی مرکز تحقیقات چشم

جهت Set-up آزمایش Real time PCR، از روش Taqman و از دستگاه Corbett استفاده گردید. روش به صورت Dual Color بود و دو پروب هم‌زمان مصرف شدند. با این روش، ژن اصلی و ژن Internal Control هم‌زمان مورد استفاده قرار گرفتند. طراحی آزمون فوق به گونه‌ای بود که قادر به ارائه اطلاعات کمی بود. حساسیت این روش با کیت‌های معتبر کنترل شد و گزارش گردید. برای جداسازی اسیدهای نوکلئیک در ۱۵۰ میکرولیتر سرم دهنده، از کیت بهارافشان استفاده شد. RealTime PCR کمی با استفاده از EvaGreen (Solis BioDyne, Estonia) انجام گردید. متغیرهای PCR عبارت بودند از دنا تورا سیون ابتدایی (یک سیکل ۱۵ دقیقه‌ای با انکوباسیون در ۹۵°C و ۴۰ سیکل دنا تورا سیون و آمپلیفیکاسیون (۹۵°C برای ۱۰ ثانیه و ۶۰°C برای ۱۵ دقیقه) با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Q (QIAGEN, Germany). ویروس Brome mosaic virus (BMV) به عنوان کنترل برای ارزیابی مراحل آزمایش، از جداسازی اولیه اسید نوکلئیک DNA Extraction تا مراحل نهایی Real Time استفاده گردید. حد تشخیصی HBV DNA در این مطالعه 400 IU/mL در نظر گرفته شد. یک نمونه کنترل منفی و یک نمونه کنترل مثبت (با غلظت معین) به هر run کاری اضافه گردید. از جدول برای نمایش نتایج و از میانگین \pm انحراف معیار، فراوانی و درصد برای توصیف داده‌ها استفاده شد. تمام تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

چشم دهنده از نظر ویروس هپاتیت B ایمن و در صورت مثبت شدن، احتمال عفونت نهفته با HBV وجود دارد^{۱۷-۱۵ و ۴}. در این موارد گام بعدی، آزمایش سرمی HBS Ab است که با مثبت شدن، احتمال عفونت نهفته با HBV از بین رفته و بافت چشم از این نظر برای پیوند ایمن خواهد بود^{۱۵ و ۱۶}. در صورت منفی شدن HBS Ab، همچنان احتمال عفونت نهفته با HBV وجود دارد^{۴ و ۵}. در این موارد در بانک چشم جمهوری اسلامی ایران به علت هزینه بالای آزمایش‌های مولکولی بیولوژیک مانند Real Time PCR جهت تشخیص DNA ویروس هپاتیت B در سرم اهداکنندگان قرنیه، آزمایش مذکور انجام نمی‌شد و کلیه بافت‌های چشمی فرد اهدا کننده مورد پیوند قرار نگرفته و به محل اهدا برگشت داده می‌شد. با افزایش روزافزون موارد مشکوک به عفونت پنهان HBV و افزایش موارد برگشتی بافت‌های چشمی به این دلیل (اطلاعات منتشر نشده)، ضرورت انجام آزمایش Real Time PCR روی سرم خون دهنندگان مذکور قوت گرفت. بر اساس آمار سالیانه بانک چشم جمهوری اسلامی ایران، تعداد موارد برگشت داده شده به علت احتمال عفونت نهفته با HBV در سال ۱۳۹۲ حدود ۵۰۰ چشم بود (اطلاعات منتشر نشده). در بررسی متون، گزارشی از عفونت پنهان HBV در اهداکنندگان قرنیه و یا سایر اعضا و بافت‌ها یافت نمی‌شود. این مطالعه به منظور تعیین عفونت‌های پنهان HBV در دهنندگان قرنیه در بانک چشم جمهوری اسلامی ایران با استفاده از تکنیک PCR و نیز ارزیابی تبعات فرهنگی و اقتصادی نتایج این روش در رد یا نگه‌داری قرنیه‌های این افراد جهت پیوند طراحی گردید.

روش پژوهش

از اهدای قرنیه تا آزمایشات سرولوژی بانک چشم

پس از انتخاب فرد متوفی برای اهدای قرنیه بر اساس تاریخچه پزشکی، چشم‌پزشکی، معاینات فیزیکی و ظاهر چشم جسد فرد دهنده، حدود ۵ میلی‌لیتر خون از جسد گرفته و داخل لوله استریل ریخته شد و بلافاصله سانتریفوژ گردید تا سرم از لخته جدا شود. سپس لوله‌های محتوی لخته - سرم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه سرولوژی بانک چشم جهت انجام آزمایشات HBS Ag (الایزا، Enzygnost, Siemens, Germany)، HCV Ab (الایزا، Dia-Pro, Italy)، HIV Ab (الایزا، Enzygnost, Siemens, Germany)، HTLV Ab (الایزا، Dia-Pro, Italy)، HB core Ab (الایزا، Enzygnost, Siemens, Germany)، و سفیلیس (Immutrep RPR, Omega, USA) منتقل شدند. در صورت منفی

بحث

نتایج تحقیق حاضر حاکی از آن بود که انجام آزمایش‌های مولکولی Real Time PCR برای تعیین DNA ویروس هپاتیت B در سرم دهندگان قرنیه نه تنها دهندگان مبتلا به Occult HBV را تشخیص داده و به کاهش خطر انتقال هپاتیت B از طریق پیوند کمک می‌کند، بلکه با تشخیص موارد Undetectable یا غیرقابل تشخیص DNA ویروس هپاتیت B، سبب قابل استفاده شدن گلوب‌های مربوطه برای پیوند گردیده و از Dispose شدن بافت‌های اهدایی موردنظر جلوگیری می‌نماید. این امر به لحاظ فرهنگی و اقتصادی برای بانک چشم ارزشمند می‌باشد. بر اساس گزارش سالیانه بانک چشم جمهوری اسلامی ایران (اطلاعات منتشر نشده)، حدود ۶ درصد از گلوب‌های اهدایی به بانک چشم که سرولوژی منفی برای HBS-Ag، HCV-Ab، HTLV-I&II، HIV-1&II، و تریپونما داشتند به علت سرولوژی مثبت برای HBcore Ab و سرولوژی منفی برای HBS-Ab و عدم انجام HBV PCR، به مرکز پزشکی قانونی عودت داده شده بودند. این میزان از خرداد ماه ۱۳۹۳ تاکنون بر اساس گزارش سالیانه بانک چشم جمهوری اسلامی ایران (اطلاعات منتشر نشده) به دلیل انجام HBV PCR روی سرم کلیه دهندگانی که به جز HBcore Ab، سرولوژی منفی برای سایر آزمایش‌های غربالگری در بانک چشم داشتند، به حدود ۰/۰۷ درصد کاهش پیدا کرده است.

با وجود استفاده از آزمایش بسیار حساس HBS Ag، هنوز احتمال انتقال هپاتیت B، هرچند اندک، از طریق پیوند قرنیه از اهداکنندگان به ظاهر سالم وجود داشته و به دلیل عدم وجود قابلیت آزمایش‌های غربالگری برای تشخیص HBS Ag در زمان Window Period یا در نتیجه عفونت‌های پنهان (occult) هپاتیت B (۲۰-۱۸)، بافت چشمی ایمن (Safe) نبوده و برای پیوند قابل استفاده نمی‌باشد^{۱۵}. با استفاده از آزمایش‌های تکمیلی Real Time PCR در مطالعه اخیر این موارد قابل تشخیص شده و از موارد قابل پیوند حذف می‌گردند.

در مطالعه فعلی تعداد نمونه‌هایی که به جز HBcore Ab، دارای سرولوژی منفی برای سایر آزمایش‌های غربالگری در بانک چشم بودند، روند کاهنده‌ای از سال ۱۳۹۳ تاکنون داشته‌اند. حتی تعداد نمونه‌های موردنظر که انتظار می‌رفت طی مدت ۲ سال مطالعه از

۳۸۴ مورد فراتر رود، به ۷۶ مورد رسید. توجه این امر ممکن است واکنش شدن وسیع جمعیت جوان جامعه ایرانی علاوه بر کارکنان خدمات بهداشتی و تاثیر بیش از ۸۰ درصدی واکسن هپاتیت B در این جمعیت باشد^{۲۱ و ۲۲}. کاهش بروز عفونت هپاتیت B پس از واکسیناسیون بر علیه این ویروس در بسیاری از کشورهایی که آندمی سبب متوسط تا بالا برای HBV دارند مشاهده شده است^{۲۳ و ۲۴}. ترکیبی از اثر واکسیناسیون علیه هپاتیت B و بهبود وضعیت بهداشت عمومی ممکن است سبب روند رو به کاهش نمونه‌های ذکر شده در بانک چشم شده باشند. با این حال در این موارد از ضرورت انجام HBV PCR کاسته نخواهد شد.

در بسیاری از بانک‌های چشم و بافت کشورهای پیشرفته، استفاده از Nucleic Acid Amplification Tests (NATs) برای تشخیص HIV، HCV، و HBV در پلاسما، خطر انتقال عفونت پس از پیوند را در زمان Window Period بیماری‌های نام برده شده، یعنی در زمانی که پروتئین‌های ویروسی قابل تشخیص نیستند، کاهش داده است^{۲۵}. در برخی مطالعات در بانک‌های خون، نشان داده شده که Window Period هپاتیت B با استفاده از NAT از ۲۸ روز به ۶ الی ۱۵ روز کاهش پیدا می‌کند^{۲۶ و ۲۷}. با انجام HBV PCR بر روی نمونه‌هایی که به جز HBcore-Ab، سرولوژی منفی برای سایر آزمایش‌های غربالگری در بانک چشم جمهوری اسلامی ایران داشتند، حداقل می‌توان اذعان داشت که موارد Occult HBV تشخیص داده شده و از آن جایی که این آزمایش روی نمونه سرم تمام دهندگان قرنیه انجام نمی‌شود آزمایش ذکر شده تاثیری بر کاهش زمان Window Period هپاتیت B در دهندگان قرنیه نداشته است.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، استفاده از NATs در تشخیص موارد Occult HBV در دهندگان قرنیه نه تنها به لحاظ کاهش خطر عفونت هپاتیت B بعد از پیوند قرنیه الزامی است بلکه در بسیاری موارد، منجر به قابل استفاده شدن گروهی از قرنیه‌های اهدایی می‌شود که در گذشته به علت سرولوژی مثبت برای HBcore Ab و سرولوژی منفی برای سایر آزمایش‌های غربالگری، Dispose می‌شدند.

منابع

1. Brojer E, Grabarczyk P, Liszewski G, et al. Characterization of HBV DNA+/HbsAg blood donors in Poland identified by triplex NAT. Hepatology 2006;

- 44: 1666-1674.
2. WHO. Hepatitis B immunization. WHO. 2001. WHO/V&B/01.28 Available at URL:

- <http://www.who.int/vaccinesdocuments/>
3. Poorolajal J, Majdzadeh R. Prevalence of chronic hepatitis B infection in Iran: a review article. *J Res Med Sci* 2009;14:249-258.
 4. Tabor E, Hoofnagle JH, Smallwood LA, et al. Studies of donors who transmit posttransfusion hepatitis. *transfusion* 1979;19:725-731.
 5. Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox Sang* 2004; 86: 83-91.
 6. Allain JP. Occult hepatitis B virus infection. *Hepatitis B Annual* 2009; 2: 14-30.
 7. Hollinger FB, Sood G. Occult hepatitis B virus infection: a covert operation. *J Viral Hepat* 2010; 17: 1-15.
 8. Chemin I, Trépo C. Clinical impact of occult HBV infections. *J Clin Virol* 2005; 34 Suppl 1: S15-S21.
 9. Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, et al. Frequent presence of HBV in the sera of HBsAg-negative, anti-HBc-positive blood donors. *Transfusion* 2001;41:1093-1099.
 10. Hennig H, Puchta I, Luhm J, et al. Frequency and load of hepatitis B virus DNA in first-time blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. *Blood* 2002;100:2637-2641.
 11. Dreier J, Kröger M, Diekmann J, et al. Low-level viraemia of hepatitis B virus in an anti-HBc- and anti-HBs-positive blood donor. *Transfus Med* 2004;14:97-103.
 12. Panigrahi R, Biswas A, Datta S, et al. Anti-hepatitis B core antigen testing with detection and characterization of occult hepatitis B virus by an in-house nucleic acid testing among blood donors in Behrampur, Ganjam, Orissa in southeastern India: implications for transfusion. *Viol J* 2010;7:204.
 13. Zeinab N Said, Manal H El Sayed, Iman I Salama, et al. Occult hepatitis B virus infection among Egyptian blood donors. *World J Hepatol* 2013;5:64-73.
 14. Glasser DB. Medical standards for eye banking. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis & Management*. 2005, 2nd edition, Elsevier/Mosby, China, Volume 1, part IV:411-422.
 15. EBAA. Medical Standards. November 2003. Copyright 2003 project ORBIS International Inc; Eye Bank Association of America.
 16. European Eye Bank Association Directory. January 2011, 19th edition.
 17. Candotti D, Allain JP. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009; 51: 798-809.
 18. Cabrerizo M, Bartolome J, Caramelo C, et al. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases. *Hepatology* 2000;32:116-23.
 19. Zaaier HL, Torres P, Ontanon A, et al. Multiple surface antigen mutations in five blood donors with occult hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 2008;80:1344-1349.
 20. Said ZN. An overview of occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2011;17:1927-1938.
 21. Alavian S, Lankarani K. Hepatitis B virus infection; a vanishing disease in Iranian children. *J Compr Ped* 2012;3:1-2.
 22. Tazhibi M, Hajivandi A, Tafti AD, et al. The efficacy of hepatitis B vaccine in Iranian population: a systematic review and meta-analysis. *J Edu Health Promot* 2014;3:53.
 23. Ni YH, Huang LM, Chang MH, et al. Two decades of universal hepatitis B vaccination in taiwan: impact and implication for future strategies. *Gastroenterology* 2007;132:1287-1293.
 24. Nardone A, Anastassopoulou CG, Theeten H, et al. A comparison of hepatitis B seroepidemiology in ten European countries. *Epidemiol Infect* 2009;137:961-969.
 25. Kuhns MC, Busch MP. New strategies for blood donor screening for hepatitis B virus. *Infectious Diseases* 2006;10:77-91.
 26. Biswas R, Tabor E, Hsia CC, et al. Comparative sensitivity of HBV NATs and HBsAg assays for detection of acute HBV infection. *Transfusion* 2003;43:788-798.
 27. Busch MP, Strame SL, Kleinman SH. Evolving application of nucleic acid amplification assays for prevention of virus transmission by blood components and derivatives. In: Garatty G, ed. *Applications of Molecular Biology to Blood Transmission Medicine*. Bethesda: American Association of Blood Banks. 1997;123-176.