مقایسه نتایج تست تکمیل ۳- *RI BA* و *RT-PCR* در مبتلایان به ویروس هپاتیت *C*

دکتر صدیقه امینی کافی آباد[۱]، علی طالبیان[۲]، زهرا عطایی[۳]، فهیمه رنجبر کرمانی[۴]

خلاصه

سابقه و هدف: نظر به شیوع و روند رو به افزایش هپاتیت C و عوارض شناخته شده و گزارشهای مختلف از نتایج تست های تکمیلی *RIBA* و *RT-PCR* و بـه مـنظور مقایسـه نتایج تست های *RIBA* و *RT-PCR* در بیماران با تشخیص *HCV* (به روش *ELISA*)، این تحقیق روی مراجعین به سازمان انتقال خون ایران در تهران انجام گرفت.

مـواد و روشـها: تحقیق با طراحی توصیفی انجام شد. روی نمونه های ۸۰ بیمار با نتیجه مثبت در *ELISA*-۳ با روشهای *RIBA*-۳ و *RT-PCR* مورد مطالعه قرار گرفتند. برای *ELISA* با کیت «سها» نسل سوم *ANTI-HCV* و در کیت های نسل سوم *RIBA* آنتی بادی علیه آنتی ژن *Core* استفاده شد. در تفسیر *RIBA* موارد فاقد باند به عنوان منفی، یک باند به عنوان موارد بینابی بیش از ۱ باند به عنوان مثبت تلقی و با آماره توصیفی ارائه گردیدند.

یافته ها: از ۸۰ بیمار مورد بررسی در تست تکمیلی *RIBA*، ۶۰ درصد مثبت، ۱۶/۲ درصد بینا بینی و ۲۳/۸ درصد منفی (*Non-Reactive*) و در روش *RA-PCR*، ۶۰درصـد مثبـت، و ۴۰ درصـد منفی بودند. از ۴۸ بیمار با نتیجه *RIBA* مثبت، ۹۱/۷ درصد تست *RT-PCR* مثبت نیز داشـتند. از ۲۰ نمونـه دارای ۴ باند در تست *RIBA*، ۹۰ درصد در تست *RT-PCR* مثبت بودند از بین ۱۳ بیماری که در تست *RIBA*-۳ به عنوان بینابینی (*Indeterminate*) گزارش شدند ۴ مورد در روش *RT-PCR* مثبت گزارش شدند. مواردی که در تست *RIBA* به عنوان منفی ارزیابی شدند در متد *RT-PCR* نیز منفی گزارش شدند.

نتـیجه گیری و توصیه ها: اگـر نتایج تست *RIBA* مثبت باشد، با احتمال قوی در تست *RT-PCR* هم مثبت می باشد و در همه موارد منفی *RIBA*، نتـیجه تسـت *RT-PCR* هم منفی می گردد. در موارد بینابینی، ضرورت انجام تست *RT-PCR* وجود دارد. البته این موضوع نیاز به تحقیق بیشتر نیز دارد.

واژگان کلیدی: ویروس هپاتیت *C*، (*RT-PCR*) *HCV*, *RIBA*-۳، پروتئینهای ساختمانی و غیرساختمانی

۱- استادیار، عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۲- متخصص آسیب شناسی و تشریحی و بالینی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۳- کارشناس بیولوژی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
• **پاسخگو: دکتر صدیقه امینی کافی آباد**
تهران، تقاطع بزرگراه همت، بزرگراه شیخ فضل ا... نوری، جنب برج میلاد، سازمان انتقال خون ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۸۲/۹/۲۰
تاریخ تایید: مقاله: ۸۳/۱۲/۲۰

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-05-20]

مقدمه

ویروس هپاتیت C (*HCV*) مهمترین عامل هپاتیت *non A-non B* و یکی از علل مهم هپاتیت پس از تزریق خون به شمار می آید (۱ و ۲). به علت تظاهر بیماری به شکل هپاتیت مزمن یکی از عوامل مهم در ایجاد سیروز محسوب می گردد، لذا در این بیماری شیوع کارسینوم سلول کبدی بیشتر است. تظاهرات بالینی عفونت با ویروس هپاتیت C از سایر علل هپاتیت ویروسی قابل افتراق نبوده ولی تمایل به سیر مزمن بیماری در آن شایع تر از سایرین است (۲ و ۳).

تستهای تشخیصی هپاتیت C به دو گروه تقسیم می شود:

گروه اول، تستهای سرولوژیک که آنتی بادی بر علیه ویروس را می سنجند.

گروه دوم، تستهای ملکولی هستند که ژنوم ویروس هپاتیت *C* (*HCV-RNA*) را مشخص می کنند.

تستهای سرولوژیک شامل تستهای غربالگری با متد *ELISA* (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) و تست تکمیلی آن *RIB*(*Recombinant Immunoblot Assay*) هستند. *RIBA* با هدف حذف واکنشهای غیراختصاصی نمونه های مثبت در روش *ELISA* بکار می رود دارد. شناسایی *RNA* ویروس هپاتیت *C* با روشهای ملکولی مانند *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) جهت شناسایی عفونت حاد با ویروس، تایید تشخیص عفونت و پیگیری پاسخ به درمانهای ضد ویروسی کاربرد دارند (٤).

در بررسی پیشینه تحقیق مشاهده گردید که ۲۳ تا ۸٤ درصد افرادی که درتست *RIBA* مثبت بودند در *PCR* نیز مثبت شدند (۵، ٦ و ۷). با توجه به روند رو به افزایش *HCV*، عوارض شناخته شده آن، عدم اطلاع از وضعیت آن در کشور و به منظور مقایسه نتایج تست های *RIBA* و *RT-PCR*، این تحقیق روی مبتلایان به هپاتیت *C* (با تشخیص به روش *ELISA* و مراجعه کننده به سازمان انتقال خون تهران انجام گرفت.

مواد و روشها

در این مطالعه ۸۰ بیمار مورد بررسی قرار گرفتند که تا هنگام انجام تست هیچگونه درمانی جهت هپاتیت *C* دریافت نکرده بودند و به علل مختلف جهت بررسی آلودگی با ویروس هپاتیت *C* به آزمایشگاه مرکزی سازمان انتقال خون مراجعه نمودند. تعدادی از بیماران دارای یکی از عوامل خطر جهت ابتلاء به عفونت بودند. از بیماران نمونه های پلاسما و سرم تهیه شد.

نمونه سرم جهت آزمایشهای جستجوی آنتی‌بادی ضد ویروس هپاتیت با روشهای *ELISA* و *RIBA* مورد استفاده قرار گرفت و جهت *HCV-RNA* با روش *RT-PCR* از نمونه پلاسما استفاده شد. تا زمان انجام تست نمونه های سرم در ۲۰- درجه سانتی گراد و نمونه های پلاسما در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

آزمایشات سنجش آنتی بادی علیه ویروس هپاتیت *C*

جهت جستجوی آنتی بادی علیه *HCV* کلیه نمونه ها با کیتهای نسل سوم *Anti-HCV* و با متد *ELISA* بررسی شدند و سپس جهت بررسی آنتی بادی علیه قسمتهای مختلف ژنوم ویروس (به عنوان تست تکمیلی) توسط کیتهای نسل سوم *HCV RIBA* مورد بررسی قرار گرفتند. در کیت *RIBA* آنتی بادیهای ضد آنتی ژن *Core*، NS_{1-3}، NS_{2-3}، NS_4، NS_5 مورد بررسی قرار گرفتند. آنتی ژنهای مصرفی دارای ساختمان نوترکیبی بوده و باندهای کنترل موجود بر روی هر نوار سلولزی معیاری برای تعیین درجه و شدت باندها در هنگام قرائت نتیجه می باشند.

کلیه مراحل *HCV-RIBA* نسل سوم، طبق دستورالعمل موجود در کیت انجام شده و در تفسیر تست مواردی که هیچگونه باندی مشاهده نشد به عنوان منفی و عدم وجود آنتی بادی در نمونه سرم یا پلاسما منظور شد. زمانی که فقط یک باند وجود داشت به عنوان موارد بینابینی (*Indeterminate*) و در صورت بیش از یک باند به عنوان موارد مثبت گزارش گردید (۸ و ۹).

آزمایش شناسایی *HCV RNA* در نمونه خون

برای شناسایی ژنوم ویروس هپاتیت *C* مراحل تخلیص، تکثیر و شناسایی انجام گردید. جهت تخلیص اسید نوکلئیک ویروس، از ۵۰۰ لاندا پلاسما استفاده شد . با استفاده از فنل – کلوفروم و ایزوپروپانول، *HCV RNA* استخراج گردید. *HCV RNA* تخلیص شده با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس تبدیل به *cDNA* شد. در مرحله بعد با استفاده از آنزیم پلیمراز مقاوم به حرارت و دو آغازگر (پرایمر) با توالی مشخص، تکثیر (آمپلیفیکاسیون) انجام شد. در طی این مرحله میزان ژنوم ویروس تخلیص شده تا ۱۰۸ یا بیشتر افزایش یافت.

محصول نهایی از طریق الکتروفورز بر روی ژل با استفاده از اتیلیوم بروماید در طول موج ۳۰۲ نانومتر قرائت شد. در هر نوبت کاری یک کنترل منفی و یک کنترل مثبت از مرحله تکثیر *RNA* و یک نمونه مثبت از مرحله استخراج *RNA* مورد آزمایش قرار گرفتند. کلیه مراحل انجام آزمایش طبق روش توصیه شده در کیت انجام گردید.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-05-20]

یافته ها

تحقیق روی ۸۰ نفر انجام گرفت. نیمی از بیماران، فاکتور خطر مشخص داشتند و در دیگر موارد منشا عفونت نامشخص بود. بیماران در محدوده سنی ٤ تا ٦٣سال و با میانگین سنی ۲۷/۹ سال بودند. در مورد کلیه بیماران تستهای جستجوی آنتی بادی با روش RIBA و ELISA و جستجوی ژنوم ویروس با روش RT-PCR انجام گردید. توزیع افراد مورد بررسی بر حسب نتایج RIBA و RT-PCR در جدول شماره ۱ ارائه شده که نشان می دهد در تست RIBA، ٦۰ درصد مثبت، ١٦/٢ درصد بینابینی و ۲۳/۸ درصد منفی بوده اند، همین افراد در آزمایش RT-PCR، ٦۰ درصد مثبت و ٤۰ درصد منفی بوده اند. اگر مواردی که در روش RIBA بینابینی تشخیص داده شدند (۱۹ نفر) کنار گذاشته شوند مشاهده می شود که ارزش پیش بینی مثبت RIBA برابر ۹۱/۲ درصد و ارزش پیش بینی منفی RIBA برابر ۱۰۰ درصد است و در موارد بینابینی نتیجه تست PCR بسیار متفاوت می باشد.

جدول ۱- توزیع مبتلایان به ویروس هپاتیت C بر حسب نتایج تشخیص RT-PCR و۳-RIBA

نتایج RIBA	نتایج RT-PCR		جمع
	مثبت	منفی	
مثبت	*٤٤ (٥٥)	٤ (٥)	٤٨ (٦٠)
بینابینی	٤ (٥)	۹ (۱۱/۲)	۱۳ (١٦/٢)
منفی	۰ (۰)	۱۹ (۲۳/۸)	۱۹ (۲۳/۸)
جمع	٤٨ (٦٠)	۳۲ (٤۰)	۸۰ (۱۰۰)

* اعداد داخل پرانتز بیانگر درصد می باشند.

نتایج بیماران دارای جواب مثبت در تست تکمیلی RIBA به تفکیک جواب تست بر حسب Core و نیز تست PCR در جدول شماره ۲ ارائه گردیده که نشان می دهد ۲۰ بیمار (٤١٪) دارای باندهای Core: NS_3، NS_4، NS_5 بوده اند از این گروه ۱۸ نفر در RT-PCR مثبت گزارش شده اند. ۱۱ بیمار در تست HCV RIBA دارای باندهای Croe: NS_3، NS_4 بوده اند که ۱۰ نفرشان HCV R1 T-PCR مثبت گزارش شده اند. از ۱۰ بیماری که در تست تکمیلی دارای باندهای Core: NS_3 بودند همگی در RT-PCR مثبت گزارش شدند.

جدول ۲- توزیع مبتلایان به ویروس و هپاتیت C تائید شده با تست تکمیلی RIBA به تفکیک Core و نتایج تست RT-PCR

نتایج تست ۳-RIBA بر حسب (Recative bands) Core	نتایج تست RT-PCR		جمع
	مثبت	منفی	
NS_1، NS_2، NS_3	۱۸	۲	۲۰ (٤١/٧)
NS_4، NS_5	۱۰	۱	۱۱ (۲۲/۹)
NS_3	۱۰	۰	۱۰ (۲۰/۸)

۱۳بیمار در تست تکمیلی HCV RIBA بینابینی گزارش شدند یعنی فقط دارای یک باند مثبت بودند که بیشترین واکنش (۸ بیمار) نسبت به باند Core بود و مواردی که با وجود پاسخ بینابینی در تست HCV RIBA در PCR، مثبت گزارش شدند در این گروه قرار داشتند. سایر موارد PCR منفی بودند.

کلیه مواردی که (۱۹ بیمار) در تست منفی بودند در آزمایش (RT-PCR) نیز منفی گزارش شدند.

بحث

تحقیق نشان داد که ۹۱/۷ درصد افرادی که در تست RIBA مثبت بودند در تست PCR نیز مثبت شدند و همه مواردی که در تست تکمیلی منفی بودند، در تست PCR نیز منفی بودند.

در یک مطالعه بر روی ۲۹٤ دریافت کننده خون در دانمارک، ۷۲ درصد در تست ELISA مثبت گزارش شدند که ۵۹ درصد آنها در روشهای RIBA و RT-PCR نیز مثبت گزارش شدند (۱۰). در استرالیا طی بررسی اهداکنندگان خون ۳۱ درصد افرادی که در آزمایش RIBA مثبت گزارش شده بودند در تست (RT-PCR) HCV RNA نیز مثبت بودند (۱۱). در مطالعه اهداکنندگان در دانمارک که با تست ۲- HCV RIBA مورد بررسی قرار گرفتند، ٨٤ درصد افرادی که دارای نتیجه مثبت بودند در تست PCR نیز مثبت گزارش شدند (۱۲). در بررسی اهداکنندگان در شمال کالیفرنیا ۸۰٪ کسانی که در ۳- RIBA بیش از دو باند واکنش نشان دادند در PCR نیز مثبت بودند (۱۳). در مجموع این مطالعات بین ۲۳ تا ٨٤ درصد افرادی که در تست RIBA مثبت بودند در PCR نیز مثبت گزارش شدند (۵، ٦، ۷). در این مطالعه نیز ۹۲ درصد بیماران در آزمایش HCV RNA مثبت گزارش شدند که در نیمی از موارد دارای عامل خطر مشخصی جهت ابتلا به بیماری بودند.

مجموعه افرادی که به عنوان HCV RIBA مثبت گزارش می شوند متناسب با واکنش به آنتی ژنهای موجود بر روی نوارهای سلولزی قابل تقسیم هستند. در یک مطالعه در تونس افراد را بنابر

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-05-20]

واکنش با آنتی ژنهای ویروسی به سه گروه تقسیم نمودند که بیشترین واکنش مربوط به هر ٤ آنتی ژن موجود بر روی نوار شامل *Core*، NS_3، NS_4، NS_5 ٥٦/٤ درصد بود. در این مطالعه نیز بیشترین میزان (٤١ درصد) متعلق به بیمارانی بود که به هر ٤ آنتی ژن واکنش نشان دادند. لازم به ذکر است گروهی از بیماران که دارای باندهای *Core*، NS_3 بودند، همگی در *RT-PCR* مثبت گزارش شدند. بنابراین با توجه به بروز آنتی بادیهای ضد *Core* و NS_3 مقدم بر سایر آنتی بادیها، در این گروه از بیماران وجود نتیجه مثبت در *RT-PCR* قابل پیش بینی است.

بیمارانی که دارای پاسخ بینابینی در آزمایش *RIBA* هستند به سه گروه تقسیم می شوند. گروهی که دارای واکنش متقاطع با آنتی ژنهای ویروس بوده و عفونت با ویروس هپاتیت *C* ندارند (١٥،١٦).

عده ای که به هپاتیت *C* مبتلا شده اند ولی هنوز پاسخهای آنتی بادی کامل ایجاد نشده و واکنش فقط به یکی از باندهای موجود بر روی نوارهای سلولزی مشاهده می شود. گروه سوم کسانی هستند که بهبودی یافته اند ولی هنوز در خونشان آنتی بادی های ضدویروسی موجود هست گرچه کاهش یافته اند (١٤، ١٧). یکی از مهمترین علل گزارش بینابینی در تست *HCV RIBA* واکنش به آنتی ژن *Core* (*C*٢٢-٣) می باشد (١٧) در این بررسی ٨ مورد از ١٣ مورد گزارش بینابینی فقط دارای باند Core می باشند. در مطالعه ای در اسپانیا همه مواردی که در تست ٢-*RIBA* بینابینی گزارش شدند و در اهداکنندگان کالیفرنیا، ٧٧٪ موارد بینابینی در تست ٢-*RIBA* به آنتی ژن Core واکنش نشان دادند. ویروس یک رشته منفرد *RNA*، کروی شکل، دارای قطر ٥٠ -٣٥ نانومتر و دارای پوشش لیپیدی است. در ساختمان ژنوم آن، در انتهای آمینی پروتئینهای ساختمانی شامل پروتئین *Core* (*C*) با وزن ٢١ کیلودالتون و ٢ گیلکو پروتئین متعلق به پوشش ویروس، E_1 و E_2 قرار دارد. گیلکوپروتئین E_2 به عنوان NS_1 نیز نامیده می شود. باقیمانده ژنوم ویروس، تعدادی پروتئین را می سازد که به عنوان پروتئین های غیرساختمانی تلقی می شوند و در تکثیر سلول نقش دارند. NS_2 دو پروتئاز ویروس، NS_4 هیلکاز و NS_5 یک *RNA* پلیمراز را می سازند (٣، ٦، ٥).

بیمارانی که دارای گزارش بینابینی در تست ٣ - *HCV RIBA* بوده اند در مطالعات مختلف *RT-PCR* مثبت بودند ولی در مطالعه ای در استرالیا فقط ٢١ درصد موارد مثبت گزارش شدند (١٩). در این مطالعه از بین ١٣ بیماری که دارای پاسخ بینابینی بودند ٤ مورد در *RT-PCR* مثبت گزارش شد (همان مواردی که دارای واکنش در باند *Core* بودند).

با توجه به این بررسی بیمارانی که دارای جواب مثبت در ٣-*RIBA* هستند، همانند سایر مطالعات به احتمال بیش از ٩٠ درصد در *PCR* مثبت هستند. لازمست گروهی که در ٣-*RIBA* بینابینی گزارش شوند جهت بررسی بیماری مورد آزمایش *RT-PCR* قرار گیرند، به خصوص بیمارانی که دارای باند Core هستند. بیمارانی که در تست *RIBA* منفی گزارش شوند ضرورتی جهت انجام تست *RT-PCR* ندارند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران انجام شده است. نویسندگان مقاله از سرکار خانم ندا پسندیده و آقای تقی امینی کارکنان آزمایشگاههای ملکولار پاتولوژی (*PCR*) و هپاتیت و ایدز سازمان انتقال خون، آزمایشگاه ستاد مرکزی تشکر می نمایند.

References:

1. Pockers P.J., Tong M., Lee W.M., Van Leevwen D.J., Keffe E.B., Bala K. and et al ***Relationship between biochemical and virological responses to interferon therapy in chronic hepatitis C infection.*** *J.of Vir. Hep. 1998; 5: 271-276.*

2. Reesink H.W. ***Hepatitic C virus.*** *Karger, 1998.*

3. Marcellin P. ***Hepatitis C: Current status, future progress.*** *J. of vir. Hep. 1998; 5: 1-5*

4. Gretch D.R. ***Diagnostic tests for hepatitis C.*** *Hepatology 1997; 26(3suppll): 435-475*

*5. Tobler L.H., Lee S.R., Stramer S.L., Peterson J., Kocheshy R., and et al.****Performance of second-and third-generation RIBAs for conformation of HCV EIA-reactivity blood donations. Retrovirus Epidemiology Donor Study.*** *Transfu. 2000; 40 (8): 917-23*

6. Galel S.A., Strong D.M., Tegtmeier G.E., Holland P.V., Kuramato I.K., and et al. ***Comparative yield of HCV RNA testing in blood donors screened by 2.0 verus 3.0 antibody assays.*** *Transfu. 2002; 42(11): 1507-13*

7. Tobler L.H., Stramer S.L., Lee S.R., Masecar B.L., Peterson J.E., Dav E.A., and et al. ***Impact of HCV 3.0 ElA relative to HCV 2.0 ELA Blood donor screening.*** *Transfu. 2003; 43(10): 1452-9*

8. Leon P., Lopez J.A., Eloa C., Domingo C.J., Echevarria J.M. and et al. ***Detection of antibody to hepatitis C virus E2 recombinant antgen among samples indeterminate for anti-HCV after wide serological testing and correlation with viremia.*** *Vox. Sang 1996; 70: 213-216*

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-05-20]

9. Bendinelli M., Pistello M., Freer G., Vatteroni M., and Maggi F. ***Viral Hepatitis. In*** *Rose N.R., Folds J.D., Clifford Lane H., Nakamura R.M.: Manual of clinical laboratory Immunology 6th ed. Washington, DC: Rress; 2002: 696-717*

10. Christensen P.B., Groenbaek K., Kraup H.B. and et.al. ***Transfusion-acquired hepatitis C: The Danish look-back experience.*** *Trans. 1999; 34, 188-193*

11. wong P.Y., Dodd R., Kiely P., Carroll C. and Whyte G. ***Characteristics of hepatitis C positive blood donors in Victoria, Australia.*** *Trans. Med. 1999; 9, 15-19*

12. Dow B.C., Coote L., Munro H., Mcomish F., Yap P.L., Simmonds P. and et al. ***Confirmation of hepatitis C virus antibody in blood donors.*** *J. Med Virol. 1993; 41(3): 215-20*

13.Tobler L.H., Busch M.P., Wilber J., Drnello R., Quan S., Polito A. and et al. ***Evaluation of indeterminate C22-3 reactivity in volunteer blood donors.*** *Transfu. 1994; 34(2): 130-4*

14. Abid S., Fkih S, Khlass AB., Cherif W., Toumi N.H., Jenhani F; and etal. ***Screening and confirmation of anti HCV antibodies in Tunisian blood donors.*** *Trans. Clin. Biol. 1997; 4 (2): 221-6*

15. Tobler. L.H., Busch M.P., Wilber J., Dinello R., Ruan S., Polito A. and et al. ***Evaluation of indeterminate C22-3 reactivity in Volunteer blood donors.*** *Trans. 1994; 34(2): 130-4*

16. Leon.P., Lopez J.A., Elola C., lee S.R, Calmann M. and Echevarria j. ***M Use of overlapping synthetic peptides to characterize samples from blood donors with indeterminate results to hepatitis C virus core antigen.*** *Vox. Sang; 75(1): 32-6*

17. Keller A., Cooper G.J., Vallari D.V., Delancy S.R. and Kuhns M.C. ***Perdiction of Hepatitis C Virus infectivity in seropositive Australian Blood Donors by supplemental immunoassays and detection of viral RNA.*** *Blood 1991; 78, 2462-2468*

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-05-20]