

مقایسه نتایج تست تکمیل ۳- RIBA 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 به منظور مقایسه 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.

مواد و روشها: تحقیق با طراحی توصیفی انجام شد. روی نمونه های ۸۰ بیمار با نتیجه مثبت در ۳-ELISA با روشهای ۳-RIBA 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 بینایی 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 RT-PCR ۶۰ درصد مثبت، و ۴۰ درصد منفی بودند. از ۴۸ بیمار با نتیجه RIBA مثبت، ۹۱/۷ درصد تست RT-PCR مثبت نیز داشتند. از ۲۰ نمونه دارای ۴ باند در تست RIBA، ۹۰ درصد در تست RT-PCR مثبت بودند از بین ۱۳ بیماری که در تست ۳-RIBA به عنوان بینایی (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.

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

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

۱- استادیار، عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران تاریخ دریافت مقاله: ۸۲/۹/۲۰

۲- متخصص آسیب شناسی و تشریحی و بالینی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران تاریخ تایید: مقاله: ۸۳/۱۲/۲۰

۳- کارشناس بیولوژی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

• پاسخگو: دکتر صدیقه امینی کافی آباد

کج تهران، تقاطع بزرگراه همت، بزرگراه شیخ فضل ا... نوری، جنب برج میلاد، سازمان انتقال خون ایران

مقدمه

نمونه سرم جهت آزمایشهای جستجوی آنتی بادی 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 بادهای ضد آنتی ژن *Core*، *NS₁₋₃*، *NS₂₋₃*، *NS₄*، *NS₅* 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 بانندی 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 پیش 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 لاندلا 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 پلیمرز 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.

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 (*Polymerase Chain Reaction*) جهت شناسایی عفونت حاد با ویروس، تایید تشخیص عفونت و پیگیری پاسخ به درمانهای ضد ویروسی کاربرد دارند (۴).

در بررسی پیشینه تحقیق مشاهده گردید که ۲۳ تا ۸۴ درصد افرادی که در تست *RIBA* مثبت بودند در *PCR* نیز مثبت شدند (۵، ۶ 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.

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 ۴ تا ۶۳ سال 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، ۶۰ درصد مثبت، ۱۶/۲ درصد بینابینی و ۲۳/۸ درصد منفی بوده اند، همین افراد در آزمایش RT-PCR ۶۰ درصد مثبت و ۴۰ 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.

(Reactive bands) Core

منفی	مثبت	
۲۰ (۴۱/۷)	۲	NS ₁ , NS ₂ , NS ₃
۱۱ (۲۲/۹)	۱	NS ₄ , NS ₅
۱۰ (۲۰/۸)	۰	NS ₃

۱۳-بیمار 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 ۲۹۴ 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- RIBA HCV مورد بررسی قرار گرفتند، ۸۴ 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 پیش از دو باند واکنش نشان دادند در PCR نیز مثبت بودند (۱۳). در مجموع این مطالعات بین ۲۳ تا ۸۴ درصد افرادی که در تست RIBA مثبت بودند در PCR نیز مثبت گزارش شدند (۵، ۶، 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

جدول ۱- توزیع مبتلایان به ویروس هپاتیت C بر حسب نتایج تشخیص RT-PCR و ۳-RIBA

نتایج RIBA	نتایج RT-PCR		جمع
	مثبت	منفی	
مثبت	۴۴ (۵۵)*	۴ (۵)	۴۸ (۶۰)
بینابینی	۴ (۵)	۹ (۱۱/۲)	۱۳ (۱۶/۲)
منفی	۰ (۰)	۱۹ (۲۳/۸)	۱۹ (۲۳/۸)
جمع	۴۸ (۶۰)	۳۲ (۴۰)	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 (۴۱٪) دارای باندهای Core: NS₃, NS₄, NS₅ بوده اند از این گروه ۱۸ نفر در RT-PCR مثبت گزارش شده اند. ۱۱ بیمار در تست HCV RIBA دارای باندهای Core: NS₃, NS₄ بوده اند که ۱۰ نفرشان HCV R T-PCR مثبت گزارش شده اند. از ۱۰ بیماری که در تست تکمیلی دارای باندهای Core: NS₃ 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 (Reactive bands) Core	نتایج تست RT-PCR		جمع
	مثبت	منفی	

وزن ۲۱ کیلودالتون و ۲ گیلکو پروتئین متعلق به پوشش ویروس، E_1 و E_2 قرار دارد. گیلکو پروتئین 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 پلیمرز را می سازند (۳، ۶، ۵).

بیمارانی که دارای گزارش بینابینی در تست $HCV - 3$ $RIBA$ بوده اند در مطالعات مختلف $RT-PCR$ مثبت بودند ولی در مطالعه ای در استرالیا فقط ۲۱ درصد موارد مثبت گزارش شدند (۱۹). در این مطالعه از بین ۱۳ بیماری که دارای پاسخ بینابینی بودند ۴ 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 $RIBA-3$ هستند، همانند سایر مطالعات به احتمال بیش از ۹۰ درصد در PCR مثبت هستند. لازمست گروهی که در $RIBA-3$ 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. **Hepatitis 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(3suppl): 435-475
5. Tobler L.H., Lee S.R., Stramer S.L., Peterson J., Kochesky R., and et al. **Performance of second-and third-generation RIBAs for conformation of HCV ELA-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., Kuramoto I.K., and et al. **Comparative yield of HCV RNA testing in blood donors screened by 2.0 versus 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 antigen among samples indeterminate for anti-HCV after wide serological testing and correlation with viremia.** *Vox. Sang* 1996; 70: 213-216

واکنش با آنتی ژنهای ویروسی به سه گروه تقسیم نمودند که بیشترین واکنش مربوط به هر ۴ آنتی ژن موجود بر روی نوار شامل $Core$: NS_5 , NS_4 , NS_5 ۵۶٪ درصد بود. در این مطالعه نیز بیشترین میزان (۴۱ درصد) متعلق به بیمارانی بود که به هر ۴ 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 (۱۵،۱۶).

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 ضد ویروسی موجود هست گرچه کاهش یافته اند (۱۴، ۱۷). یکی از مهمترین علل گزارش بینابینی در تست $HCV RIBA$ واکنش به آنتی ژن $Core$ (۳-۲۲) می باشد (۱۷) در این بررسی ۸ مورد از ۱۳ مورد گزارش بینابینی فقط دارای باند $Core$ می باشند. در مطالعه ای در اسپانیا همه مواردی که در تست ۲- $RIBA$ بینابینی گزارش شدند و در اهداکنندگان کالیفرنیا، ۷۷٪ موارد بینابینی در تست ۲- $RIBA$ به آنتی ژن $Core$ واکنش نشان دادند. ویروس یک رشته منفرد RNA ، کروی شکل، دارای قطر ۵۰-۳۵ نانومتر و دارای پوشش لیپیدی است. در ساختمان ژنوم آن، در انتهای آمینی پروتئینهای ساختمانی شامل پروتئین $Core$ (C) با

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