

Evaluation of ICT, ELISA and Real Time PCR in Detection of Hepatitis B in Hemodialysis, Thalassemia and Hemophilic Patients

Ahmad Habibi¹,
Mohamad Aberomand²,
Ghorban Mohammadzadeh³

¹ MSc in Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

² Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

³ Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, Hyperlipidemia Research Center, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

(Received April 25, 2015 ; Accepted August 2, 2016)

Abstract

Background and purpose: Recently, use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and rapid Immunochromatographic test (ICT) in diagnosis and screening of patients with hepatitis B reduced the risk of hepatitis during blood transfusion. However, the incidence of hepatitis B is very high in high-risk patients such as hemodialysis, thalassemia and hemophilia which receive a lot of blood transfusions. Also, due to the infection with mutant type of hepatitis B virus (HBV) and false negative results, using molecular tests such as polymerase chain reaction (PCR) are necessary for detection of HBV. In this study we aimed to compare the efficacy of ELISA and rapid ICT kits with gold standard real time PCR for the detection of HBV in high risk patients.

Materials and methods: In a cross-sectional study, 100 patients consisting of hemodialysis, thalassemia and hemophilia were assessed by real time PCR as the gold standard for detection of HBV DNA, fourth-generation ELISA kits including Dia-pro®, Pishtazteb®, Pasteur® and ICT Ecotest® were applied for detection of HBSAg.

Results: Compared with real time PCR, sensitivity and specificity of fourth generation ELISA kits was 100% and positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were 100%.

Conclusion: Recent improvements in the monoclonal antibody production against mutant hepatitis B virus and their application in fourth-generation ELISA and rapid ICT kits resulted in significant increase in sensitivity and specificity of these methods. Thus, in emergency cases or lack of real-time PCR instruments, rapid ICT and ELISA kits could be suggest for detection of HBSAg.

Keywords: hepatitis B, real time PCR, hemodialysis, thalassemia, hemophilia

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(143): 37-47 (Persian).

ارزیابی تکنیک های ELISA, ICT و Real Time PCR در تشخیص هپاتیت B در بیماران دیالیزی، تالاسمی و هموفیلی

احمد حبیبی^۱
محمد آبرومند^۲
قربان محمدزاده^۳

چکیده

سابقه و هدف: امروزه استفاده از تکنیک های الیزا (ELISA(Enzyme-linked Immunosorbant Assay) و تست سریع ایمونوکروماتوگرافیک (ICT(Immunochromatographic Test) جهت تشخیص و غربالگری سریع هپاتیت B سبب کاهش خطر انتقال این بیماری شده است. با این وجود در بیماران پرخطر نظیر همودیالیز، تالاسمی و هموفیلی به دلیل دریافت مقادیر زیادی خون میزان خطر ابتلا به هپاتیت B هنوز بالا می باشد. هم چنین به دلیل ابتلا به نوع جهش یافته این ویروس و ایجاد نتایج منفی کاذب در این بیماران استفاده از تست های ملکولی مانند واکنش زنجیره پلی مرز (PCR(polymerase chain reaction) جهت تشخیص این بیماری ضروری می باشد. هدف از این مطالعه مقایسه کارایی روش های سریع الیزا و ICT با تکنیک استاندارد طلایی Real Time PCR در تشخیص هپاتیت B در بیماران پرخطر بوده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی ۱۰۰ بیمار همودیالیز، تالاسمی و هموفیلی به ترتیب با روش Real Time PCR به عنوان استاندارد طلایی برای تشخیص HBV DNA و از نظر HBSAg به روش ELISA با کیت های الیزای نسل چهارم و با روش سریع ICT با کیت Ecotest® بررسی شدند.

یافته ها: حساسیت (Sensitivity) و اختصاصیت (Specificity) کیت های الیزای نسل چهارم و کیت Ecotest® در مقایسه با روش Real Time PCR ۱۰۰ درصد همچنین ارزش اخباری مثبت (PPV) و منفی (NPV) آن ها نیز ۱۰۰ درصد بود.

استنتاج: پیشرفت های اخیر در تولید آنتی بادی منوکلونال ضد انواع جهش یافته ویروس هپاتیت B و بکارگیری آن ها در الیزای نسل چهارم و تست های سریع ICT سبب افزایش چشم گیر حساسیت و اختصاصیت تکنیک های فوق گردید. بنابراین در موارد اورژانسی یا عدم وجود امکانات real-time PCR، استفاده از روش های تشخیص سریع هپاتیت B را با اطمینان بیش تری می توان پیشنهاد کرد.

واژه های کلیدی: هپاتیت B، Real Time PCR، همودیالیز، تالاسمی، هموفیلی

مقدمه

آنتی ژن سطحی هپاتیت B (HBsAg) جزیی از کپسید ویروس بوده که به مقدار زیاد توسط ویروس تولید می شود به طوری که ممکن است در جریان گردش خون ۱۰۵ ذره ویروس موجود باشد. در برخی از

E-mail: mohammadzadeh@ajums.ac.ir

مؤلف مسئول: قربان محمدزاده - اهواز: دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، مرکز تحقیقات هپریلیدی

۱. کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۲. استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۳. دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات هپریلیدی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۲/۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۵/۱۲

DNA ویروس در کروموزوم میزبان، موتاسیون در MHR (Major Hydrophilic Region) ژن ناحیه S، دوره window به دنبال عفونت حاد، همراهی با عفونت HCV، سرکوب ایمنی، ضعف آزمایشگاه در تشخیص HBsAg و تشکیل کمپلکس‌های ایمنی هستند که سبب مخفی شدن HBsAg می‌شوند (۸). بیماران تالاسمی و هموفیلی به دلیل دریافت مکرر خون و فرآورده‌های خونی، در معرض خطر ابتلا به بیماری‌های ویروسی قابل انتقال از راه خون به ویژه هپاتیت و HIV هستند (۹). خصوصیات نوارهای تست سریع Rapid جهت تشخیص هپاتیت B در این است که ساده و ارزان هستند و به دستگاه پرسنل آموزش دیده نیاز ندارند و در دمای اتاق قابل نگهداری می‌باشند. اساس کار این نوارها بر مبنای روش‌های ایمنو کروماتوگرافی یا ICT می‌باشد و اختلاف آن‌ها در رقابتی و یا غیر رقابتی بودن آن‌ها می‌باشد. کست‌هایی که برای HBSAg به کار می‌روند بر اساس مکانیسم الایزای غیر رقابتی ساخته می‌شوند. در این مکانیسم آنتی ژن حداقل دو ناحیه آنتی ژنیک متفاوت باید داشته باشد تا قادر به اتصال به هر دو آنتی‌بادی باشد. مشکل عمده این کست‌ها در حساسیت تشخیص می‌باشد به طوری که در نمونه‌های حاوی کم‌تر از 1 ng/ml HBSAg یا حاوی HBSAg جهش یافته، منجر به نتایج منفی کاذب می‌شوند (۱۰، ۱۱). اما با ظهور الایزای نسل چهارم و تولید آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه ویروس‌های موتاسیون یافته، حساسیت این نوارها به میزان قابل توجهی بهبود یافته است (۱۰، ۱۲). اگرچه امروزه از روش‌های مولکولی مانند PCR جهت بررسی بیماران با هپاتیت B به عنوان استاندارد طلائی به طور معمول استفاده نمی‌شود اما به دلیل جهش‌های منجر به تغییرات سرولوژیک یا وجود مقدار بسیار کم آنتی ژن و اهمیت تشخیص دقیق هپاتیت B در بیماران پرخطر مانند دیالیزی، هموفیلی و تالاسمی و با توجه به این‌که چنین مطالعه‌ای تاکنون در ایران انجام نشده است، بنابراین هدف مطالعه حاضر مقایسه تکنیک‌های

بیماران وزن HBsAg موجود در خون بیش از آلبومین سرم می‌باشد (۱). هپاتیت B مخفی براساس وجود مقادیر اندک DNA ویروس در سرم یا کبد بیمارانی که از نظر HBsAg منفی بوده و فاقد مارکرهای سرولوژیک ناشی از برخورد قبلی با ویروس می‌باشند و از طریق تست‌های تشخیصی حساس، مشخص می‌شوند. در این بیماران تعداد ویروس موجود در سلول‌های کبد بیش‌تر از خون می‌باشد که می‌تواند ناشی از تکثیر ویروس در کبد باشد. دلیل منفی بودن HBsAg در خون این بیماران می‌تواند به دلیل کم بودن مقدار آنتی ژن در خون یا تشکیل کمپلکس Ag-Ab باشد که امکان سنجش HBsAg با کیت‌های رایج مقدور نمی‌باشد. این گروه از بیماران در صورت نقص ایمنی به عفونت مزمن مبتلا خواهند شد (۲). بیش‌تر مطالعات نشان داده‌اند که هپاتیت B مخفی معمولاً با میزان اندک DNA ویروس هپاتیت B مرتبط است (۳). هپاتیت B مخفی ممکن است پیشرفت فیروز کبد و ریسک ابتلا به سرطان کبد را افزایش دهد (۴). هم‌چنین فاکتور مهمی جهت انتقال هپاتیت B در بخش همودیالیز می‌باشد. لذا در این جمعیت‌ها جداسازی DNA این ویروس علاوه بر سنجش HBsAg مورد تاکید قرار گرفته است. مطالعات مختلفی که شیوع هپاتیت B نهفته را در بیماران همودیالیزی بررسی کرده‌اند، میزان شیوع آن را بین ۰ تا ۵۸ درصد گزارش کرده‌اند که این اختلاف می‌تواند ناشی از نحوه نمونه‌گیری، حساسیت و اختصاصیت تست‌ها، میزان واکسیناسیون، مراقبت بهداشتی و ماشین همودیالیز اختصاصی برای بیماران باشد (۵، ۶). هپاتیت B نهفته می‌تواند به علت آلودگی با ویروس‌های موتاسیون یافته‌ای باشد که با روش‌های تشخیص ملکولی رایج قابل شناسایی نباشند (۷). در بروز هپاتیت B مخفی به‌طور کلی فعالیت سیستم ایمنی و فاکتورهای اپی ژنتیک (تغییرات ژنتیکی در هنگام بیان ژن)، نقش اساسی دارند. علل متعددی جهت حضور DNA ویروس در غیاب HBsAg ارائه شده‌اند که شامل داخل شدن

معمول سرولولوزیک ICT و الیزا با روش ملکولی real-time PCR و بررسی ارزش تشخیصی این تکنیک ها جهت تشخیص هیپاتیت B در بیماران پرخطر دیالیزی، هموفیلی و تالاسمی بوده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه مقطعی ۱۰۰ فرد بیمار (۵۱ بیمار همودیالیزی، ۴۴ بیمار تالاسمی و ۵ بیمار هموفیلی) مراجعه کننده به بیمارستان شهید معرفى زاده شهرستان شادگان (استان خوزستان) در سال ۱۳۹۴ بررسی شدند (جدول شماره ۱). از هر بیمار ۵ میلی لیتر خون فاقد EDTA جهت تهیه سرم گرفته شد. پس از لخته شدن خون و سانتریفوژ آن ها، سرم جدا و جهت انجام مراحل بعدی مطالعه در فریزر ۴۰°C- تا روز انجام آزمایشات نگهداری شدند. سپس تست های سطح سرمی HBSAg، سطح سرمی HCV Ab، سطح سرمی HIV Ab و سطح سرمی HBV DNA روی سرم تمام بیماران انجام شد.

جدول شماره ۱: خصوصیات افراد شرکت کننده در مطالعه در گروه های مختلف

گروه ها	جنس		متوسط سن (سال)
	مرد (درصد)	زن (درصد)	
دیالیز	۳۱	۲۰	۴۷
تالاسمی	۲۴	۲۰	۱۵
هموفیلی	۵	۰	۲۴

روش های آزمایشگاهی

۱- روش ایمنونوکروماتوگرافی یسا (ICT) (نوارها یا کست های سریع) در تشخیص هیپاتیت B

اساس کیت ICT مورد استفاده با شماره سریال ۱۴۱۱۲۸ بر پایه ساندویچ آنتی بادی استوار است. با اعمال نمونه مثبت، HBSAg در پد کنژوگه به دام می افتد و با حرکت فاز مایع تحت اثر خاصیت موینگی روی فیلتر نیتروسولوز به حرکت در آمده و در ناحیه تست با اتصال به آنتی بادی های ثانویه ایجاد مدل ساندویچ می نماید و با توجه به نشان دار بودن خط

رنگی ایجاد می کند. از طرفی با توجه به این که در ساختار کیت میزان آنتی بادی کنژوگه چندین برابر ملکول هدف به کار می رود لذا بخشی از این آنتی بادی های کنژوگه به دلیل عدم اتصال به ملکول هدف از ناحیه تست عبور نموده و در نتیجه در ناحیه کنترل با آنتی بادی ضد خود پیوند و منجر به ایجاد خط رنگی در ناحیه تست می شود که نشان دهنده صحت عملکرد نوار خواهد بود. بنابراین ایجاد دو خط رنگی در ناحیه تست و کنترل نشان دهنده مثبت بودن نتیجه آزمایش است (۱۹).

۲- الیزای نسل چهارم در تشخیص هیپاتیت B

الف- کیت های Diapro (Milano, Italy) و Pasto (Pasteur Institute, Karaj, Iran)

اساس تشخیص کیت های فوق با شماره سریال های C2T2/11 و ۰۱/۱/۹۴/۱۵۷ بر پایه ساندویچ آنتی بادی استوار است. در مرحله اول آنتی ژن سطحی هیپاتیت B (HBs Ag) موجود در نمونه با آنتی بادی های ضد HBsAg باند شده در چاهک ها واکنش می دهد. پس از طی زمان انکوباسیون و شستشو در مرحله دوم با افزودن آنتی بادی ضد HBsAg نشان دار شده با پراکسیداز تریچه کوهی (HRP) و طی زمان انکوباسیون و شستشو، سوبسترا و کروموژن به چاهک ها اضافه می شود. رنگ آبی ایجاد شده بعد از این مرحله نتیجه تجزیه سوبسترا توسط آنزیم و تغییر رنگ محلول کروموژن ناشی از این واکنش است. شدت این رنگ متناسب با تعداد کمپلکس های ایمنی ایجاد شده در چاهک ها می باشد. با افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد (۲۰، ۲۱).

ب- کیت Pishtaz Teb HBsAg Elisa kit (Tehran, Iran)

اساس تشخیص کیت فوق با شماره سریال ۹۳۰۰۳ بر پایه ساندویچ آنتی بادی دو مرحله ای استوار است. در مرحله اول HBs Ag موجود در نمونه به طور هم زمان با آنتی بادی های منوکلونال و پلی کلونال باند شده در

جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از کیت تجاری Artus HBV RG PCR kit (QIAGEN, Germany) ساخت شرکت کیاژن با شماره سریال 148030773 و دستگاه ترموسایکلر Applied Biosystems StepOne™ ساخت شرکت ABI استفاده شد. Mix HBV RG/TM Master کیت فوق حاوی پرایمرهای اختصاصی، پروب، معرف‌ها، واکنشگرها و آنزیم‌های لازم جهت تکثیر اختصاصی یک قطعه به طول ۱۳۴ bp از ژنوم ویروس هپاتیت B می‌باشد. هم‌چنین کیت فوق حاوی رنگ فلورسنت اختصاصی جهت تشخیص آمپلیکون اختصاصی تکثیر شده و کنترل داخلی جهت نرمالایز کردن داده‌ها می‌باشد. پروب الیگونوکلئوتیدی مورد استفاده به طور اختصاصی به این محصولات تکثیر شده متصل می‌شود و از طریق مشاهده شدت فلورسانس در طی انجام PCR می‌توان به تشخیص و محاسبه مقادیر محصولات پی‌برد (۲۴).

مراحل انجام Real-time PCR

ابتدا Master Mix را از فریزر خارج کرده تا به دمای محیط برسد و بعد از یک سانتریفیوژ کوتاه (short spin) آماده استفاده شدند. میکروتیوب‌های استریپی مخصوص دستگاه را بر روی یخ قرارداده و درون هر یک از آن‌ها ۳۰ میکرولیتر Master Mix ریخته شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از DNA نمونه‌های استخراج شده که به دمای محیط رسیده‌اند بعد از یک سانتریفیوژ کوتاه (short spin) به هر میکروتیوب اضافه گردید. استریپ‌ها داخل دستگاه قرار دادند و PCR طبق دستورالعمل موجود در کیت در ۴۵ سیکل انجام گردید (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: پروتکل Real-Time PCR

حجم	ترکیب
۳۰ میکرولیتر	Master Mix
۲۰ میکرولیتر	Eluted Sample DNA
۵۰ میکرولیتر	حجم کل

چاهک‌ها و آنتی‌بادی ضد HBsAg نشان دار شده با بیوتین (کنژوگه ۱) واکنش می‌دهد. پس از طی زمان انکوباسیون در مرحله دوم با افزودن کنژوگه حاوی کمپلکس استرپتوآویدین - پراکسیداز (کنژوگه ۲)، استرپتوآویدین به بیوتین موجود در کنژوگه اول متصل می‌گردد. پس از انکوباسیون و شستشو، محلول سوبسترا و کروموژن به چاهک‌ها اضافه می‌شوند. رنگ آبی ایجاد شده بعد از این مرحله نتیجه تجزیه سوبسترا در اثر فعالیت آنزیم و تغییر رنگ محلول کروموژن ناشی از این واکنش است. شدت این رنگ متناسب با تعداد کمپلکس‌های ایمنی ایجاد شده در چاهک‌ها می‌باشد. با افزودن محلول متوقف‌کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد (۲۲).

۳- استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Real-time PCR)

استخراج DNA با استفاده از کیت High pure viral nucleic acid kit ساخت شرکت Roch با شماره سریال 10343200 انجام شد. اساس استخراج DNA این کیت بر پایه میل اتصال اختصاصی DNA به فیبر می‌باشد. ابتدا ویروس‌های موجود در سرم توسط دترجنت و پروتئین کیناز K موجود در کیت لیز و تمام اسیدهای نوکلئیک ویروس آزاد می‌شوند. سپس در حضور یک نمک کاتوتروپیک (گوانیدین هیدروکلرید) اسیدهای نوکلئیک ویروس به طور انتخابی به فیبرهایی از جنس پشم شیشه موجود در تیوب‌های فیلتردار متصل می‌شوند. تحت شرایط تامپونی مورد استفاده برای شستشو، DNA ویروس به فیبر متصل باقی می‌ماند در صورتی که مواد آلوده‌کننده (املاح، پروتئین‌ها و دیگر مواد آلوده‌کننده سلولی) متصل نمی‌شوند. شستشوی متوالی و ملایم فیلترها با تامپون به آسانی عوامل آلودکننده را حذف می‌کند. سپس DNA خالص شده با حجم کمی از بافر باغلظت اندک نمک شستشو و جمع‌آوری می‌شود (۲۳).

جدول شماره ۳: شرایط دمایی ترموسایکلیک

مرحله	دما و مدت زمان
۱	95°C و ۱۰ دقیقه
۲	95°C و ۱۵ ثانیه
	60°C و ۶۰ ثانیه

CT در محور عمودی و لگاریتم تعداد کپی های DNA در محور افقی رسم می شود (نمودار شماره ۲). منحنی حاصل به صورت خطی با شیب منفی است. با تعیین ضریب زاویه و معادله خط و با دانستن CT نمونه مجهول (که برای آن همراه نمونه های استاندارد PCR انجام شده است) و قرار دادن آن در معادله منحنی استاندارد توسط نرم افزار، تعداد کپی آن مشخص می شود. همان طور که زیر منحنی استاندارد مشخص شده است (نمودار شماره ۲)، R2 برابر ۰/۹۹۸ و کارایی (Efficiency) آزمایش ۹۷/۳۹ می باشد.

تنظیم دستگاه Applied Biosystems StepOne™

جهت استفاده از کیت QIAGEN

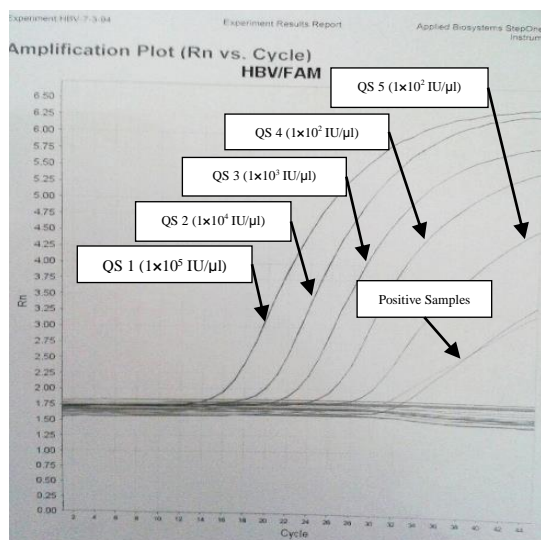
بر اساس دستورالعمل کیت مورد استفاده و جدول موجود در دفترچه راهنمای دستگاه (جدول شماره ۴) از فیلتر ۱ برای شناسایی ژن هدف و از فیلتر ۲ برای شناسایی ژن کنترل داخلی استفاده شد.

جدول شماره ۴: روش انتخاب فیلترها در دستگاه

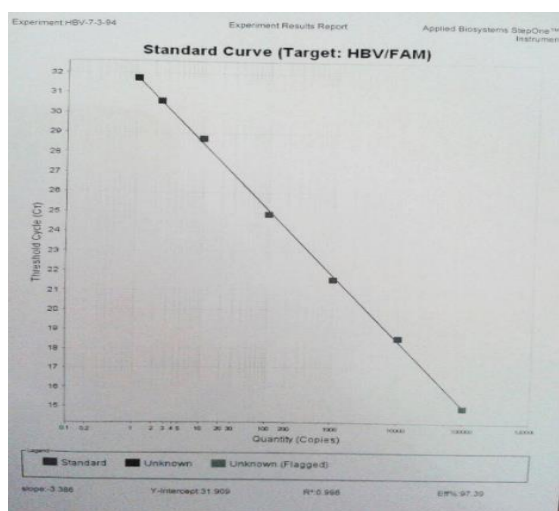
Applied Biosystem StepOne™

فیلترها		فیلترها	
StepOnePlus systems		StepOne	
Dye	فیلتر	Dye	فیلتر
FAM™ dye	۱	FAM™ dye	۱
SYBER® Green dye		SYBER® Green dye	
JOE™ dye	۲	JOE™ dye	۲
VIC® dye		VIC® dye	
TAMRA™ dye	۳	ROX™ dye	۳
NED™ dye	۴		

دستگاه های StepOne و StepOnePlus systems از فیلترهای با استفاده می کنند.



نمودار شماره ۱: نمودار تکثیر نمونه های استاندارد
OS=Quantitation Standard

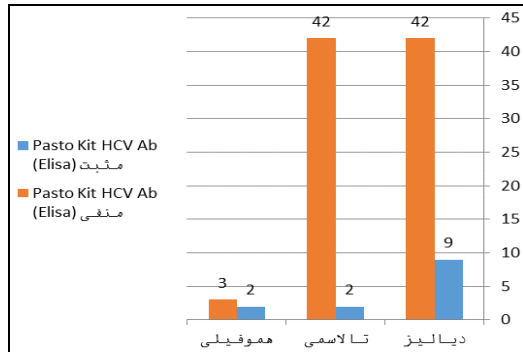


نمودار شماره ۱: منحنی استاندارد HBVDNA

رسم منحنی استاندارد و تفسیر نتایج

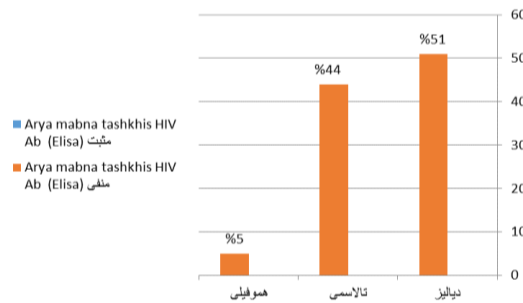
ابتدا برای رقت های متوالی از نمونه های استاندارد با غلظت 101-105 IU/μl که به صورت آماده در کیت موجود است، واکنش PCR انجام و نمودار تکثیر ثبت شد (نمودار شماره ۱). نمودار تکثیر، چرخه آستانه یا CT (cycle threshold) نمونه ها را مشخص می کند. با لگاریتم تعداد کپی اولیه نمونه رابطه معکوس دارد و اولین نموداری که زودتر از بقیه نمودارها وارد فاز لگاریتمی می شود، دارای رقت های کم تری بوده و مقدار کپی اولیه آن بیش تر خواهد بود. نمونه هایی که منحنی آن ها خط Threshold را قطع می کنند به عنوان مثبت و آن هایی که خط فوق را قطع نمی کنند یعنی DNA تکثیر نمی شود، به عنوان منفی می باشند. پس از تعیین CT برای هر رقت استاندارد، منحنی آن ها براساس

تمام بیماران از نظر وجود HCV Ab با روش الایزا و با استفاده از کیت ساخت شرکت پاستور بررسی شدند. نتایج نشان دادند که از ۱۰۰ بیمار مورد مطالعه، ۹ نفر از بیماران دیالیز، دو نفر از بیماران تالاسمی و دونفر از بیماران هموفیلی از نظر وجود HCV Ab مثبت شدند (نمودار شماره ۵).



نمودار شماره ۵: نتایج HCV Ab

تمام بیماران مورد مطالعه از نظر وجود HIV Ab و با استفاده از کیت ساخت شرکت Arya mabna tashkhis با روش الایزا بررسی شدند و نتایج نشان دادند که تمام بیماران از نظر وجود HIV Ab منفی بودند (نمودار شماره ۶).



نمودار شماره ۶: نتایج HIV Ab

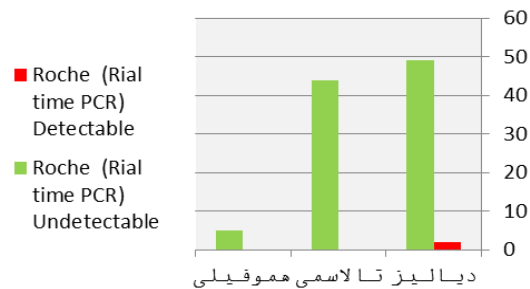
مقایسه روش Real-time PCR به عنوان استاندارد طلایی با سایر تکنیک ها در تشخیص هیپاتیت B و تعیین NPV و PPV، Specificity و Sensitivity

در جدول شماره ۵ نتایج مثبت و منفی کاذب و نتایج مثبت و منفی حقیقی ارائه شده است. نتایج نشان می دهند که از بین ۱۰۰ بیمار مورد مطالعه، ۲ بیمار مثبت

داده ها پس از جمع آوری از طریق کدگذاری و با استفاده از نرم افزار MedCalc® 12.1.4.0 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. سپس حساسیت، ویژگی، رسم نمودار ROC، بیان آمارهای توصیفی، ارزش پیش بینی کننده مثبت (PPV) و منفی (NPV) تعیین شدند.

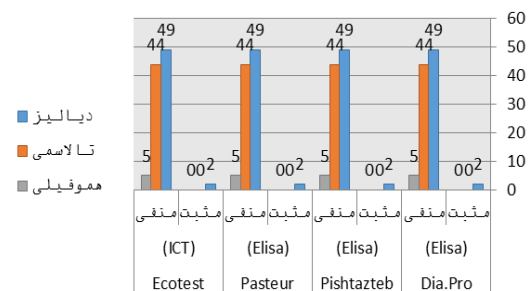
یافته ها

از ۱۰۰ بیمار مورد مطالعه فقط دو بیمار از گروه دیالیز با روش استاندارد طلایی HBV DNA Real time PCR مثبت شدند و بقیه بیماران غیر قابل شناسایی (Undetectable) بودند (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳: نتایج HBV DNA Real time PCR

نتایج HBsAg با تکنیک های الایزا و با کیت های تجاری ساخت شرکت های Dia.Pro، Pishtazte، Pasteur و تکنیک ICT با کیت Ecotest در نمودار شماره ۴ نشان داده شده اند. با توجه به نمودار در مورد هر چهار کیت فقط دو نمونه از بیماران دیالیزی مثبت شدند و بقیه نمونه ها منفی بودند.



نمودار شماره ۴: نتایج HBsAg

کشور که در سطح وسیع در آزمایشگاه های تشخیص طبی استفاده می شوند از نظر حساسیت و اختصاصیت بررسی شدند. نتایج مطالعه حاضر حساسیت و ویژگی بالای تکنیک های مذکور در مقایسه با روش استاندارد طلایی PCR جهت تشخیص هیپاتیت B را نشان داد.

مطالعات مختلف در خصوص مقایسه تکنیک های مذکور جهت تشخیص هیپاتیت B نتایج متفاوتی گزارش کرده اند. در مطالعه Bottero و همکاران حساسیت و ویژگی کیت Vikia به روش ICT به ترتیب ۹۶٫۵ درصد و ۹۹٫۹ درصد و هم چنین برای کیت Determine به ترتیب ۹۳٫۶ درصد و ۱۰۰ درصد گزارش گردید (۱۳). مقایسه عملکرد ICA با روش PCR کمی برای تشخیص سریع HBsAg در سرم انسان توسط انصاری و همکاران انجام شد. در این مطالعه از ۲۴۰ نمونه سرم، ۱۲۰ نمونه با تکنیک های الایزا یا PCR مثبت و ۱۲۰ نمونه منفی شدند. سپس نمونه ها با تکنیک ICT با استفاده از کیت های ساخت کمپانی های Dima، ACON، Cortez، Blue Cross، Intec بررسی و با تکنیک PCR به عنوان استاندارد طلایی مقایسه شدند، نتایج مقایسه نشان داد که کیت های Intec و Blue Cross، نسبت به

حقیقی و ۹۸ بیمار منفی حقیقی بودند. هم چنین، نتایج مثبت و منفی کاذب در مقایسه با روش PCR به عنوان استاندارد طلایی مشاهده نشد. در مقایسه روش های الایزا و ICT با روش Real time PCR (به عنوان استاندارد طلایی) توسط نرم افزار Medcalc، Sensitivity و Specificity، PPV و NPV تعیین شد. با توجه به نتایج جدول شماره ۶ حساسیت و ویژگی معادل ۱۰۰، PPV و NPV معادل ۱۰۰ و AUC معادل ۱ برای این روش ها تعیین شد.

جدول شماره ۵: نتایج منفی و مثبت کاذب و حقیقی

روش اندازه گیری	Number of samples with following results				
	کل	مثبت حقیقی	مثبت کاذب	منفی حقیقی	منفی کاذب
Dia.Pro® HBsAg (Elisa)	۱۰۰	۲	۰	۹۸	۰
PishtazTeb® HBsAg (Elisa)	۱۰۰	۲	۰	۹۸	۰
Pasteur® HBsAg (Elisa)	۱۰۰	۲	۰	۹۸	۰
Ecotest® HBsAg (ICT)	۱۰۰	۲	۰	۹۸	۰

بحث

امروزه استفاده از تست های سریع به روش ICT و تست های ال ایزا متعددی در آزمایشگاه های تشخیص طبی جهت تشخیص HBSAg معمول می باشد. در این مطالعه کیت های ساخت شرکت های داخل و خارج از

جدول شماره ۶: مقایسه روش Real time PCR به عنوان استاندارد طلایی با سایر تکنیک ها در تشخیص هیپاتیت B و تعیین حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری منفی و مثبت

ارزش اخباری منفی (95% CI) ^a	ارزش اخباری مثبت (95% CI)	اختصاصیت (95% CI)	حساسیت (95% CI)	سطح زیرمنحنی (95% CI)	QIAGEN HBV DNA Real time PCR		
					منفی	مثبت	
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱	(n=98)	(n=2)	
					۰	۲	مثبت
					۹۸	۰	منفی
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱	(n=98)	(n=2)	
					۰	۲	مثبت
					۹۸	۰	منفی
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱	(n=98)	(n=2)	
					۰	۲	مثبت
					۹۸	۰	منفی
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱	(n=98)	(n=2)	
					۰	۲	مثبت
					۹۸	۰	منفی

a: 95% Confidence interval

B بررسی کردند و در نتایج خود حساسیت و اختصاصیت این روش را ۱۰۰ درصد گزارش کردند (۱۸). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که حساسیت (Sensitivity) و اختصاصیت (Specificity) کیت های الایزای نسل چهارم $\text{Dia-pro}^{\text{®}}$ ، $\text{Pishtazteb}^{\text{®}}$ و $\text{Pasteur}^{\text{®}}$ و کیت $\text{Ecotest}^{\text{®}}$ در مقایسه با روش Real Time PCR به عنوان استاندارد طلایی جهت تشخیص هپاتیت B، ۱۰۰ درصد می باشد. هم چنین ارزش اخباری مثبت (PPV) و منفی (NPV) این کیت ها نیز به میزان ۱۰۰ درصد می باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد پیشرفت قابل توجه شرکت های تولید کننده کیت های الایزا در تولید آنتی بادی های منوکلونال و به کارگیری آن ها سبب افزایش حساسیت و اختصاصیت تشخیص هپاتیت B در بیماران پرخطر شده است.

با توجه به پیشرفت های حاصل در زمینه تولید آنتی بادی های منوکلونال ضد انواع جهش یافته ویروس هپاتیت B و به کارگیری آن ها در الایزای نسل چهارم و در تست های سریع به روش ICT، سبب افزایش قابل توجه حساسیت و اختصاصیت تکنیک های مذکور جهت تشخیص هپاتیت B شده است. بنابراین می توان با اطمینان بیش تری در موارد اورژانسی یا در موارد عدم وجود امکانات الایزا و PCR از این روش های سریع جهت تشخیص هپاتیت B استفاده نمود.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه آقای احمد حبیبی می باشد که هزینه انجام آن توسط مرکز تحقیقات هیپریلپیدمی-دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تامین شده است (شماره طرح HLRC-9406). نویسندگان این مقاله هم چنین از همکاری ارزشمند جناب آقای دکتر مرادزادگان مسئول فنی آزمایشگاه پاستور اهواز و خانم مهندس حامد مدیریت بخش Real time PCR آزمایشگاه در انجام این مطالعه کمال تقدیر و تشکر دارند.

بقیه کیت ها حساسیت بیش تری دارند و حساسیت، ویژگی، PPV و NPV آن ها بیش تر از ۹۸ درصد می باشد. در مقایسه کلی برای تمام کیت های مورد استفاده حساسیت بین ۹۷/۵ تا ۹۹/۲ درصد و اختصاصیت بین ۹۷/۵ تا ۹۹/۲ درصد گزارش شد که نتایج آن مشابه نتایج مطالعه حاضر بود (۱۴). در مطالعه ای دیگر Raj و همکاران کیت سریع کمپانی Hepacard برای تشخیص HBsAg را با الایزای نسل سوم کیت Axsym HBsAg مقایسه کردند. در این مطالعه ۱۰۰۰ نمونه سرم مورد ارزیابی قرار گرفتند و حساسیت ۷۹ درصد و اختصاصیت ۹۸/۹ درصد برای این کیت گزارش شد که نتایج اختصاصیت آن نزدیک نتایج مطالعه حاضر بود (۱۵). در مطالعه Lau و همکاران تکنیک سریع ICT جهت تشخیص HBsAg با تکنیک الایزا مقایسه گردید. در این مطالعه ۲۴۶۳ نمونه سرم (۸۲۷ فریز شده، ۱۰۱۱ سرم تازه و ۶۲۵ خون تام) مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج مشابهی از نظر انواع نمونه های مورد مطالعه به دست آمد. حساسیت و اختصاصیت به ترتیب ۹۵ درصد و ۱۰۰ درصد به دست آمد و PPV و NPV به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۹/۷ درصد گزارش شد که مشابه نتایج مطالعه حاضر بود (۱۱). Kaur و همکاران در مطالعه ای کیت های سریع Hepacard جهت تشخیص HIV، HCV و HBsAg را با کیت الایزای Ortho Diagnostics به عنوان استاندارد طلایی ارزیابی کردند. در این مطالعه ۲۷۵۴ نمونه بررسی شدند و اختصاصیت کیت های سریع ۱۰۰ درصد گزارش شد اما حساسیت این کیت ها برای HIV، HCV و HbsAg به ترتیب ۸۰ درصد، ۸۸/۵ درصد و ۹۳/۴ درصد گزارش شد (۱۶). Irwig و همکاران در مطالعه ای در سئول نشان دادند که تکنیک ICT جهت تشخیص هپاتیت B حساسیت ۹۷ درصد و اختصاصیت ۱۰۰ درصد دارد (۱۷). در مطالعه ای دیگر Sato و همکاران میزان حساسیت و اختصاصیت تکنیک ICT را با استفاده از کیت Dainascreen HBsAg جهت تشخیص هپاتیت

References

1. Gregory A, Storch MD. Essentials of diagnostic virology, 1th ed. London: Churchill Livingstone, 1999.
2. Zobeiri M. Occult Hepatitis B: Clinical Viewpoint and Management. Hepatitis Research and Treatment 2013; 2013: Article ID 259148, 7 pages.
3. Pollicino T, Raimondo G. Occult hepatitis B infection. J Hepatol 2014; 61(3): 688-689.
4. Abbasi A, Tajbakhsh R, Kabotari M, Zhand S, Tabarraei A. Occult Hepatitis B Virus Infection in Chronic Hemodialysis Patients in Panje-Azar Hospital, Gorgan. MLJGOMS 2012; 6(1): 7-12 (Persian).
5. Hollinger BF, Habibollahi P, Daneshmand A, Alavian SM. Occult hepatitis B infection in chronic hemodialysis patients: current concepts and strategy. Hepatitis Monthly 2010; 10(3): 199-204.
6. Goral V, Ozkul H, Tekes S, Sit D, Kadiroglu AK. Prevalence of occult HBV infection in haemodialysis patients with chronic HCV. World J Gastroenterol 2006; 12(21): 3420-3424.
7. Ismail H, Soliman M, Ismail N. Occult hepatitis B virus infection in Egyptian hemodialysis patients with or without hepatitis C virus infection. Pathol Lab Med Int 2010; 2: 113-120.
8. Ramezani A, Banifaz M, Mohraz M, Rasoolinejad M, Aghakhani A. Occult hepatitis B virus infection: A major concern in HIV-infected patients: occult HBV in HIV. Hepat Mon 2011; 11(1): 7-10.
9. Khamesipour A, Amiri ZM, Kafiabad SA, Saadat F, Mansour-ghanai F, Esteghamati AR, et al. Frequency of hepatitis B virus DNA in anti-HBc positive, HBsAg negative blood donors in Rasht, northern Iran. Transfus Apher Sci 2011; 45(2): 195-197.
10. Hayder I, Ahmed W, Alam SE. Comparison of Different ICT Kits for HBsAg and Anti HCV Using Gold Standard ELISA. Pak J Med Res 2012; 51(3): 72-76.
11. Lau DT, Ma H, Lemon SM, Doo E, Ghany MG, Miskovsky E, et al. A rapid immunochromatographic assay for hepatitis B virus screening. J Viral Hepat 2003; 10(4): 331-334.
12. Saville RD, Constantine NT, Cleghorn FR, Jack N, Bartholomew C, Edwards J, et al. Fourth-generation enzyme-linked immunosorbent assay for the simultaneous detection of human immunodeficiency virus antigen and antibody. J Clin Microbiol 2001; 39(7): 2518-2524.
13. Bottero J, Boyd A, Gozlan J, Lemoine M, Carrat F, Collignon A, et al. Performance of rapid tests for detection of HBsAg and anti-HBsAb in a large cohort, France. J Hepatol 2013; 58(3): 473-478.
14. Khadem Ansari MH, Omrani MD, Movahedi V. Comparative evaluation of immunochromatographic rapid diagnostic tests (Strip and Device) and PCR methods for detection of human hepatitis B surface antigens. Hepat Mon 2007; 7(2): 87-91.
15. Raj AA, Subramaniam T, Raghuraman S, Abraham P. Evaluation of an indigenously manufactured rapid immunochromatographic test for detection of HBsAg. Indian J Pathol Microbiol 2001; 44(4): 413-414.
16. Kaur H, Dhanao J, Oberoi A. Evaluation of rapid kits for detection of HIV, HBsAg and HCV infections. Indian J Med Sci 2000; 54(10): 432-434.

17. Irwig L, Bossuyt P, Glasziou P, Gatsonis C, Lijmer J. Designing studies to ensure that estimates of test accuracy are transferable. *BMJ* 2002; 324(7338): 669-671.
18. Sato K, Ichiyama S, Iinuma Y, Nada T, Shimokata K, Nakashima N. Evaluation of immunochromatographic assay systems for rapid detection of hepatitis B surface antigen and antibody, Dainascreen HBsAg and Dainascreen Ausab. *J Clin Microbiol* 1996; 34(6): 1420-1422.
19. One step Infectious disease HBsAg Rapid Test Strip. Available from: https://www.alibaba.com/product-detail/One-step-Infectious-disease-HBsAg-Rapid_60022373228.html. Accessed May 2, 2016.
20. Diagnostic Bioprobes srl. HB_s Ag Ultra-Diapro. Advanced Laboratory Diagnostics. Available from: <https://www.diapro.it/index.php/products/elisa/hepatitis/hepatitis-b/hbs-ag-detail>. Accessed May 2, 2016.
21. Institut Pasteur Iran. Pasto kit HB_sAg. Available from: <http://www.pasteur-prc.ir>. (Persian).
22. HBs Antigen ELISA Kit. Pishtaz Teb Diagnostics. Enzyme Immunoassay for the Detection of Hepatitis B surface antigen (For In Vitro Diagnostic Use Only) Catalogue No. PT-HBs Antigen-96. Available from: <http://www.pishtazteb.com/product/p25-HBs-Ag>. Accessed May 9, 2016.
23. Roche A. Rapidly isolate highly purified viral DNA and RNA. Available from: <http://www.roche-ascience.com/napure>. Accessed May 9, 2016.
24. artus@HBV TM PCR Kit Handbook. QIAGEN Sample and Assay Technologies. Available from: <https://www.qiagen.com/kr/resources/download.aspx?id=fc9c2c4a-54db-4732-b09c-21176582567a&lang=en>. Accessed May 2, 2016.