ORIGINAL ARTICLE

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

Ahmad Habibi[1],
Mohamad Aberomand[2],
Ghorban Mohammadzadeh[3]

[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).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۳ آذر سال ۱۳۹۵ (۴۷-۳۷)

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 تکنیک‌های 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 خطرابتلا هپاتیت B هنوز بالا می‌باشد. هم‌چنین به دلیل ابتلا به نوع جهش یافته این ویروس و ایجاد نتایج منفی کاذب در این بیماران استفاده از تست‌های ملکولی مانندواکنش زنجیره پلی مراز (PCR(polymerase chain reaction جهت تشخیص این بیماری ضروری می‌باشد. هدف از این مطالعه مقایسه کارایی روش‌های سریع الایزا و ICT با تکنیک استاندارد طلایی Real Time PCR درتشخیص هپاتیت B در بیماران پرخطر بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی ۱۰۰ بیمارهمودیالیز،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 کیت‌های الایزای نسل چهارم و با روش سریع ICT با کیت ®Ecotest بررسی شدند.

یافته‌ها: 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) آن‌ها نیز ۱۰۰درصد بود.

استنتاج: پیشرفت‌های اخیر در تولید آنتی بادی منوکلونال ضدانواع جهش یافته ویروس هپاتیت B و بکارگیری آن‌ها در الایزای نسل چهارم و تست‌های سریع ICT سبب افزایش چشم گیر حساسیت و اختصاصیت تکنیک‌های فوق گردید. بنابراین در موارد اورژانسی یا عدم وجود امکانات real-time PCR ، استفاده از روش‌های تشخیص سریع هپاتیت B را با اطمینان بیش‌تری می‌توان 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 می‌شود به‌طوری‌که ممکن است در جریان گردش خون ۱۰۵ ذره ویروس موجود باشد. در برخی از

مولف مسئول: قربان محمدزاده– اهواز: دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، مرکز تحقیقات هپرلیپیدمی E-mail: mohammadzadeh@ajums.ac.ir
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 هیپرلیپیدمی، 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

بیماران وزن HBsAg موجود در خون بیش از آلبومین سرم می‌باشد(۱). هپاتیت B مخفی براساس وجود مقادیر اندک DNA ویروس درسرم یا کبد بیمارانی که از نظر HBsAg منفی بوده وفاقد مارکرهای سرلوژیک ناشی ازبرخورد قبلی باویروس می‌باشند و از طریق تست‌های تشخیصی حساس، مشخص می‌شوند. دراین بیماران تعداد ویروس موجود درسلول‌های کبد بیش‌تر از خون می‌باشد که می‌تواند ناشی ازتکثیر ویروس درکبد باشد. دلیل منفی بودن HBsAg در خون این بیماران می‌تواند به دلیل کم بودن مقدارآنتی ژن در خون یا تشکیل کمپلکس Ag–Ab باشد که امکان سنجش HBsAg با کیت‌های رایج مقدور نمی‌باشد. این گروه از بیماران درصورت نقص ایمنی به عفونت مزمن مبتلا خواهند شد(۲). بیش‌تر مطالعات نشان داده اند که هپاتیت B مخفی معمولاً با میزان اندک DNA ویروس هپاتیت B مرتبط است(۳). هپاتیت B مخفی ممکن است پیشرفت فیبروز 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 قرارگرفته است. مطالعات مختلفی که شیوع هپاتیت B نهفته را در بیماران همودیالیزی بررسی کرده‌اند، میزان شیوع آن را بین ۰ تا ۵۸ درصد گزارش کرده اند که این اختلاف می‌تواند ناشی از نحوه نمونه‌گیری، حساسیت و اختصاصیت تست‌ها، میزان واکسیناسیون، مراقبت بهداشتی و ماشین همودیالیز اختصاصی برای بیماران باشد(۶،۵). 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 به‌طورکلی فعالیت سیستم ایمنی و فاکتورهای اپی‌ژنتیک (تغییرات ژنتیکی در هنگام بیان ژن)، نقش اساسی دارند. علل متعددی جهت حضور DNA ویروس در غیاب HBsAg ارائه شده‌اند که شامل داخل شدن 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 درتشخیص 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 دراین است که ساده وارزان هستند وبه دستگاه وپرسنل آموزش دیده نیاز ندارند و در دمای اتاق قابل نگهداری می‌باشند. اساس کاراین نوارها بر مبنای روش‌های ایمونوکروماتوگرافی یا ICT می‌باشد و اختلاف آن‌ها دررقابتی 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 آنتی‌ژنیک 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 HBSAg 1 ng/ml یا حاوی HBSAg جهش یافته، منجر به نتایج منفی کاذب می‌شوند(۱۱،۱۰). اما با ظهور الایزای نسل چهارم و تولید آنتی‌بادی اختصاصی برعلیه ویروس‌های موتاسیون یافته،حساسیت این نوارها به میزان قابل توجهی بهبود یافته است(۱۲،۱۰). 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 درایران انجام نشده است، بنابراین هدف مطالعه حاضر مقایسه تکنیک‌های

معمول سرولوژیک ICT و الایزا با روش ملکولی real-time PCR و بررسی ارزش تشخیصی این تکنیک‌ها جهت تشخیص هپاتیت 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) مراجعه‌کننده به بیمارستان شهید معرفی زاده شهرستان شادگان (استان خوزستان) در سال ۱۳۹۴ بررسی شدند (جدول شماره ۱). از هر بیمار ۵ میلی‌لیتر خون فاقد EDTA جهت تهیه سرم گرفته شد. پس از لخته شدن خون و سانتریفوژ آن‌ها، سرم جدا و جهت انجام مراحل بعدی مطالعه در فریزر ۴۰oC- تا روز انجام آزمایشات نگهداری شدند. سپس تست‌های 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 ایمونوکروماتوگرافی یا ICT(نوارها یا کست های سریع) درتشخیص هپاتیت B

اساس کیت ICT مورد استفاده با شماره سریال ۱۴۱۱۱۲۸ بر پایه ساندویچ آنتی‌بادی استوار است. با اعمال نمونه مثبت، HBSAg در پد کنژوگه به دام می‌افتد و با حرکت فاز مایع تحت اثر خاصیت مویینگی روی فیلتر نیتروسلولز به حرکت در آمده و در ناحیه تست با اتصال به آنتی‌بادی‌های ثانویه ایجاد مدل ساندویچ می‌نماید و با توجه به نشان دار بودن خط رنگی ایجاد می‌کند. از طرفی با توجه به این که در ساختار کیت میزان آنتی‌بادی کنژوگه چندین برابر ملکول هدف به‌کار می‌رود لذا بخشی از این آنتی‌بادی‌های کنژوگه به دلیل عدم اتصال به ملکول هدف از ناحیه تست عبور نموده و در نتیجه در ناحیه کنترل با آنتی‌بادی ضد خود پیوند و منجر به ایجاد خط رنگی درناحیه تست می‌شودکه نشان‌دهنده صحت عملکرد نوار خواهد بود. بنابراین ایجاد دوخط رنگی در ناحیه تست و کنترل نشان‌دهنده مثبت بودن نتیجه آزمایش است(۱۹).

۲- الایزای نسل چهارم در تشخیص هپاتیت B

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

اساس تشخیص کیت‌های فوق با شماره سریال‌های C2T2/11 و۰۱/۱/۹۴/۱۵۷ بر پایه ساندویچ آنتی‌بادی استوار است. در مرحله اول آنتی ژن سطحی هپاتیت B (HBs Ag) موجود در نمونه با آنتی‌بادی‌های ضد HBsAg باندشده در چاهک‌ها واکنش می‌دهد. پس از طی زمان انکوباسیون و شستشو در مرحله دوم با افزودن آنتی‌بادی ضد HBsAg نشان دار شده با پراکسیداز تربچه کوهی (HRP) و طی زمان انکوباسیون و شستشو، سوبسترا و کروموژن به چاهک‌ها اضافه می‌شود. رنگ آبی ایجادشده 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 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(۲۱،۲۰).

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

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

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 وانجام واکنش زنجیره ای پلی مراز (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. ابتداویروس‌های موجود در سرم توسط دترجنت و پروتئین کیناز K موجود در کیت لیز وتمام اسیدهای نوکلئیک ویروس آزاد می‌شوند. سپس در حضور یک نمک کائوتروپیک (گوآنیدین هیدروکلرید) اسیدهای نوکلئیک ویروس به طور انتخابی به فیبرهایی ازجنس پشم شیشه موجود در تیوب‌های فیلتردار متصل می‌شوند. تحت شرایط تامپونی مورداستفاده برای شستشو، DNA ویروس به فیبرمتصل باقی می‌ماند درصورتی که مواد آلوده‌کننده (املاح، پروتئین‌ها ودیگرموادآلوده‌کننده سلولی) متصل نمی‌شوند. شستشوی متوالی وملایم فیلترها با تامپون به آسانی عوامل آلودکننده راحذف می‌کند. سپس DNA خالص شده باحجم کمی ازبافرباغلظت اندک نمک شتشو و جمع‌آوری می‌شود(۲۳).

جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز از کیت تجاری Artus HBV RG PCR kit (QIAGEN,Germany) ساخت شرکت کیاژن با شماره سریال 148030773 و دستگاه ترموسایکلر Applied Biosystems StepOneTM ساخت شرکت ABI استفاده شد. Mix HBV RG/TM Master کیت فوق حاوی پرایمرهای اختصاصی، پروب، معرف‌ها، واکنشگرها وآنزیم‌های لازم جهت تکثیراختصاصی یک قطعه به طول bp ۱۳۴ ازژنوم 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 رابر روی یخ قرارداده و درون هر یک از آن‌ها ۳۰ میکرولیتر Master Mix ریخته شد. سپس ۲۰ میکرولیتراز 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 داده شدند و PCR طبق دستورالعمل موجود در کیت در ۴۵ سیکل انجام گردید (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: پروتکل Real-Time PCR

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

جدول شماره ۳: شرایط دمایی ترموسایکلر

مرحله	دما ومدت زمان	
۱	95°C و ۱۰ دقیقه	۱چرخه
۲	95°C و ۱۵ ثانیه 60°C و ۶۰ ثانیه	۴۵ چرخه

تنظیم دستگاه Applied Biosystems StepOneTM 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.

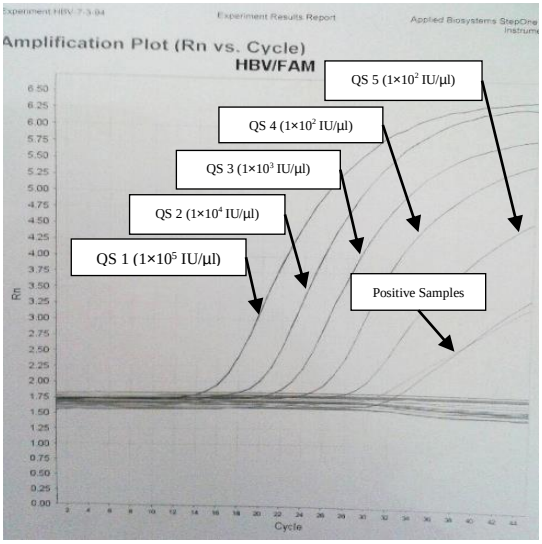
جدول شماره ۴: روش انتخاب فیلترها در دستگاه Applied Biosystem StepOneTM

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

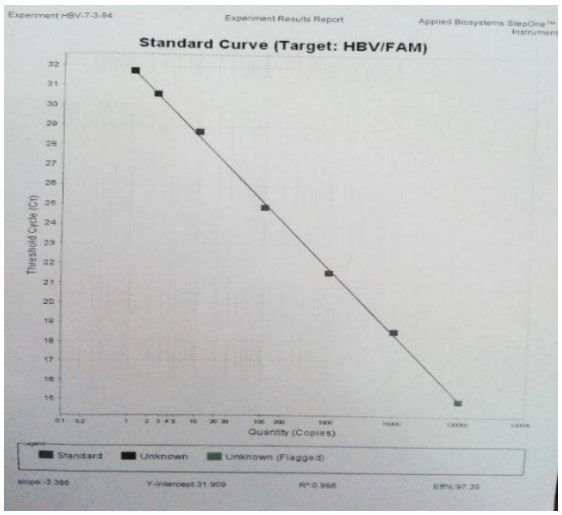
دستگاه های StepOne و StepOnePlus systems از فیلترهای با استفاده می کنند.

رسم منحنی استاندارد و تفسیر نتایج

ابتدا برای رقت‌های متوالی از نمونه‌های 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) نمونه‌ها را مشخص می‌کند. CT با لگاریتم تعداد کپی اولیه نمونه رابطه معکوس دارد و اولین نموداری که زودتر از بقیه نمودارها وارد فاز لگاریتمی می‌شود، دارای رقت‌های کم‌تری بوده و مقدار کپی اولیه آن بیش‌تر خواهد بود. نمونه‌هایی که منحنی آن‌ها خط Threshold را قطع می‌کنند به عنوان مثبت و آن‌هایی که خط فوق را قطع نمی‌کنند یعنی DNA تکثیر نمی‌شود، به عنوان منفی می‌باشند. پس از تعیین CT برای هررقت استاندارد، منحنی آن‌ها براساس CT در محور عمودی و لگاریتم تعداد کپی‌های DNA در محور افقی رسم می‌شود (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 نمونه‌های استاندارد PCR انجام شده است) و قرار دادن آن در معادله منحنی استاندارد توسط نرم‌افزار، تعداد کپی آن مشخص می‌شود. همان‌طور که زیر منحنی استاندارد مشخص شده است (نمودار شماره ۲)، R2 برابر ۰/۹۹۸ و کارآیی (Efficiency) آزمایش ۹۷/۳۹ می‌باشد.



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

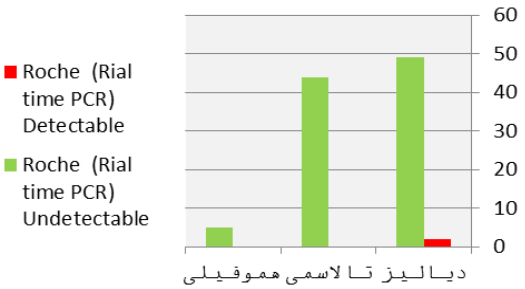


نمودار شماره ۱ : منحنی استاندارد HBVDNA

داده‌ها پس از جمع‌آوری از طریق کدگذاری و با استفاده از نرم‌افزار MedCalc® 12.1.4.0 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. سپس حساسیت، ویژگی، رسم نمودار ROC، بیان آمارهای توصیفی، ارزش پیش‌بینی کننده مثبت(PPV) و منفی (NPV) تعیین شدند.

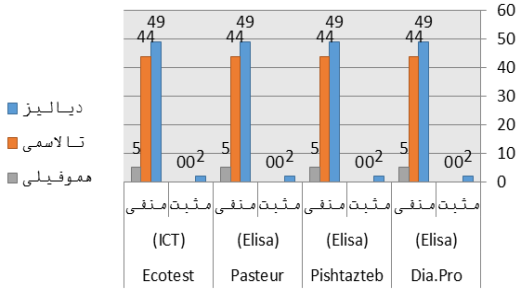
یافته ها

از ۱۰۰ بیمار مورد مطالعه فقط دو بیمار از گروه دیالیز با روش استاندارد طلایی HBV DNA Rial time PCR مثبت شدند وبقیه بیماران غیرقابل شناسایی(Undetectable) بودند (نمودار شماره ۳).



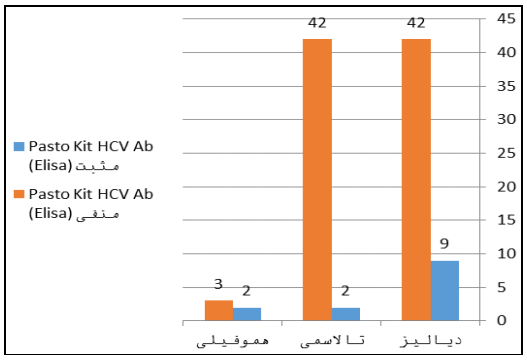
نمودار شماره ۳: نتایج HBV DNA Real time PCR

نتایج HBsAg با تکنیک‌های الایزا وبا کیت‌های تجاری ساخت شرکت‌های Dia.Pro، Pishtazte و Pasteur و تکنیک ICT با کیت Ecotest در نمودار شماره ۴ نشان داده شده‌اند. با توجه به نمودار در مورد هر چهارکیت فقط دو نمونه از بیماران دیالیزی مثبت شدند و بقیه نمونه‌ها منفی بودند.



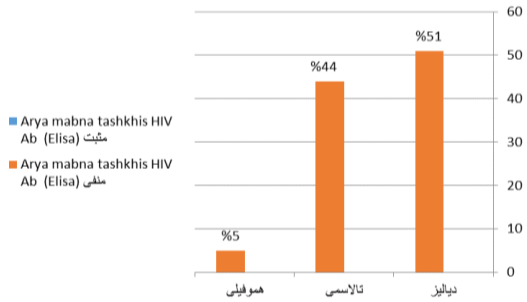
نمودار شماره ۴: نتایج HBsAg

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 (نمودارشماره ۵).



نمودار شماره ۵: نتایج HCVAb

تمام بیماران مورد مطالعه ازنظر وجودHIV Ab و با استفاده ازکیت ساخت شرکت Arya mabna tashkhis با روش الایزا بررسی شدند و نتایج نشان دادند که تمام بیماران ازنظروجود HIV Ab منفی بودند (نمودارشماره ۶).



نمودار شماره ۶: نتایج HIVAb

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

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

حقیقی و ۹۸ بیمار منفی حقیقی بودند. هم‌چنین، نتایج مثبت و منفی کاذب در مقایسه با روش PCR به عنوان استاندارد طلایی مشاهده نشد. در مقایسه روش‌های الایزا و ICT با روش Real time PCR (به عنوان استاندارد طلایی) توسط نرم‌افزار 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 روش‌ها تعیین شد.

جدول شماره ۵ : نتایج منفی ومثبت کاذب وحقیقی

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 ازتست های سریع به روش ICT و تست های ال یزای متعددی درآزمایشگاهای تشخیص طبی جهت تشخیص HBSAg معمول می‌باشد. در این مطالعه کیت‌های ساخت شرکت‌های داخل و خارج از کشور که در سطح وسیع در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی استفاده می‌شوند از نظر حساسیت و اختصاصیت بررسی شدند. نتایج مطالعه حاضر حساسیت و ویژگی بالای تکنیک‌های مذکور در مقایسه با روش استاندارد طلایی PCR جهت تشخیص هپاتیت B رانشان داد.

مطالعات مختلف در خصوص مقایسه تکنیک‌های مذکورجهت تشخیص هپاتیت B نتایج متفاوتی گزارش کرده اند. در مطالعه Bottero و همکاران حساسیت و ویژگی کیت Vikia به روش ICT به ترتیب ۹۶,۵درصد و ۹۹/۹ درصد و هم‌چنین 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 تکنیک‌های الایزا یا PCR مثبت و ۱۲۰ نمونه منفی شدند. سپس نمونه‌ها با تکنیک ICT با استفاده از کیت‌های ساخت کمپانی‌های ACON، Dima، Cortez، Blue Cross، Intec بررسی و با تکنیک PCR به عنوان استاندارد طلایی مقایسه شدند، نتایج مقایسه نشان داد که کیت‌های Intec و Blue Cross ،نسبت به

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

		QIAGEN HBV DNA Real time PCR		سطح زیرمنحنی (95% CI)	حساسیت (95% CI)	اختصاصیت (95% CI)	ارزش اخباری مثبت (95% CI)	ارزش اخباری منفی (95% CI)[a]
		مثبت	منفی					
		(n=2)	(n=98)	۱	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
Dia.Pro® HBsAg (Elisa)	مثبت	۲	۰					
	منفی	۰	۹۸					
		(n=2)	(n=98)	۱	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
Pishtaz Teb® HBsAg (Elisa)	مثبت	۲	۰					
	منفی	۰	۹۸					
		(n=2)	(n=98)	۱	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
Pasteur® HBsAg (Elisa)	مثبت	۲	۰					
	منفی	۰	۹۸					
		(n=2)	(n=98)	۱	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
Ecotest® HBsAg (ICT)	مثبت	۲	۰					
	منفی	۰	۹۸					

a: 95% Confidence interval

بقیه کیت‌ها حساسیت بیش‌تری دارند و حساسیت، ویژگی، PPV و NPV آن‌ها بیش‌تر از ۹۸ درصد می‌باشد. در مقایسه کلی برای تمام کیت‌های 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 مطالعه‌ای 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) موردارزیابی قرار گرفتند و نتایج مشابهی ازنظر انواع نمونه‌های 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 مطالعه‌ای کیت‌های 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 کیت‌های سریع ۱۰۰ درصد گزارش شد اما حساسیت این کیت‌ها برای HIV، HCV و HbsAg به ترتیب ۸۰درصد، 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 ۹۷درصد و اختصاصیت ۱۰۰ درصد دارد(۱۷). در مطالعه‌ای دیگر Sato و همکاران میزان حساسیت واختصاصیت تکنیک ICT را بااستفاده از کیت Dainascreen HBsAg جهت تشخیص هپاتیت B بررسی کردند ودرنتایج خود حساسیت و اختصاصیت این روش را ۱۰۰درصد گزارش کردند(۱۸). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که حساسیت(Sensitivity) و اختصاصیت (Specificity) کیت های الایزای نسل چهارم ®Dia-pro،®Pishtazteb و ®Pasteur و کیت ®Ecotest در مقایسه با روش Real Time PCR به عنوان استاندارد طلایی جهت تشخیص هپاتیت B ، ۱۰۰درصد می‌باشد. هم‌چنین ارزش اخباری مثبت (PPV) و منفی(NPV) این کیت‌ها نیز به میزان ۱۰۰درصد می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد پیشرفت قابل توجه شرکت‌های تولید کننده کیت‌های الایزا در تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال و به‌کارگیری آن‌ها سبب افزایش حساسیت و اختصاصیت تشخیص هپاتیت B دربیماران پرخطر شده است.

با توجه به پیشرفت‌های حاصل درزمینه تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد انواع جهش یافته ویروس هپاتیت B و به کارگیری آن‌ها در الایزای نسل چهارم و در تست‌های سریع به روش ICT ،سبب افزایش قابل توجه حساسیت و اختصاصیت تکنیک‌های مذکور جهت تشخیص هپاتیت B شده است. بنابراین می‌توان با اطمینان بیش‌تری 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 هیپرلیپیدمی-دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تامین شده است (شماره طرح HLRC-9406). نویسندگان این مقاله هم چنین ازهمکاری ارزشمند جناب آقای دکتر مرادزادگان مسئول فنی آزمایشگاه پاستوراهواز و خانم مهندس حامد مدیریت بخش Real time PCR آزمایشگاه در انجام این مطالعه کمال تقدیر و تشکر دارند.

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. MLJGOUMS 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-ghanaei 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.