مقایسه روش ایمونوکمی لومینسانس با PCR برای تشخیص ویروس هپاتیتB در بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان بقیه الله

مهدی قربانعلی زادگان*[۱] ، رضا رنجبر[۲] ، زهرا گودرزی[۳]

۱) کارشناس ارشد میکروبشناسی پزشکی ، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی ، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله عج

۲) استادیار مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی ، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله عج

۳) دانشجوی کارشناسی ارشد ویروس شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران ، دانشکده بهداشت ، دپارتمان پاتوبیولوژی ، بخش ویروس شناسی

تاریخ دریافت : ۸۵/۷/۲۹ **تاریخ پذیرش : ۸۶/۳/۳۱**

چکیده

مقدمه : ویروس هپاتیت B عامل هپاتیت سرمی و به عنوان هپادنا ویروس طبقه بندی می شود . این ویروس باعث ایجاد عفونت های مزمن در نوزادن آلوده و عامل مهمی در ایجاد بیماری های کبد و از جمله سرطان کبد در انسان می باشد . HBsAg نخستین مارکر سرولوژیکی است که قبل از بروز علائم کلینیکی در جریان خون ظاهر می گردد . شناسایی این آنتی ژن با روش های ایمونولوژیک از جمله ایمونوکمی لومینسانس امکان پذیر است . از طرفی امروزه روش های مولکولی نظیر PCR این امکان را به وجود آورده اند تا در مواردی که تست های سرولوژی قادر به شناسایی HBsAg نیستند ، وجود DNA مربوطه را در نمونهٔ کلینیکی مشخص کنند . هدف از این مطالعه مقایسه نتایج روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلی مراز با روش کمی ایمونو لومینسانس جهت شناسایی HBsAg می باشد .

مواد و روش ها : ۶۳ نمونهٔ سرمی بیماران مشکوک به هپاتیت B مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان بقیه ا.. (عج) مورد مطالعه قرار گرفت . برای بررسی ایمنولوژیک HBsAg از روش ساندویچ کمی لومینسانس ایمنواسی(Sandwich Chemiluminescence Immuno Assay) و برای تشخیص مولکولی از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR استفاده شد.

یافته های پژوهش : در PCR تمامی ۶۳ نمونه (۱۰۰ درصد) نتایج مثبت داشتند در حالیکه با روش سنجش ایمونوکمی لومینسانس ۵۷ مورد (۹۰/۵ درصد) مثبت و ۶ مورد (۹/۵ درصد) منفی بودند.

نتیجه گیری نهایی : حساسیت روش کمی لومینسانس کمتر از روش مولکولی PCR می باشد . حساسیت روش PCR در این متد۱۰۰ درصد و روش کمی ایمونولومینسانس ۹۰/۴ درصد می باشد . و با توجه به حساسیت و ویژگی و سرعت بالای تست های مولکولی ، پیشنهاد می گردد از روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلی مراز برای تشخیص سریع و پیگیری روند درمان بیماران مبتلا به هپاتیت ویروسی نوع B استفاده گردد.

واژه های کلیدی : ویروس هپاتیت B ، واکنش زنجیره ای پلیمراز ، کمی لومینسانس

* **نویسنده مسئول** : کارشناس ارشد میکروبشناسی پزشکی ، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی ، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»،
Email: gh_mahdi52 @ yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-13]

مقدمه

ویروس هپاتیت B عامل هپاتیت سرمی و در گروه هپادنا ویروس طبقه بندی می شود . این ویروس همچنین باعث ایجاد عفونت های مزمن در نوزادن آلوده و عامل مهمی در ایجاد بیماری های کبد و از جمله سرطان کبد در انسان می باشد . ژنوم این ویروس از زنجیر مضاعف DNA حلقوی تشکیل شده است که یک زنجیر آن کوتاهتر از زنجیر دیگر می باشد . HbeAg ، یک آنتی ژن محلول که با تکثیر ویروس ، تیترهای بالای ویروس در سرم و نیز با عفونت زایی سرم در ارتباط است . HbcAg ، آنتی ژن بخش مرکزی ویروس هپاتیت B می باشد . HbsAg ، آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیتB است که در سرم قابل اندازه گیری می باشد (۱) .

ناقلین مزمن هپاتیت افرادی هستند که HbsAg آنها به مدت بیش از ۶ ماه با وجود HbeAg یا آنتی Hbe پایدار است ، HbsAg ممکن است سالها بعد از ناپدید شدن HbeAg در سرم پایدار بماند . پوشش حاوی ویروس حاوی گلیکوپروتئین آنتی ژن سطحی هپاتیت B **(HbsAg)** می باشد . ذرات حاوی HbsAg به تعداد خیلی بیشتر از ویریون های آلوده به درون سرم افراد آلوده رها می شوند . این ذرات می توانند کروی یا فیلامنتی باشند ، و نیز ایمونوژن هستند و در اولین واکسن تجارتی در برابر ویروس هپاتیت B به کار رفتند . تکثیر ویروس هپاتیت B به چند دلیل انحصاری است : ویروس گرایش فوق العاده ای به کبد دارد ، ژنوم کوچک آن نیازهای ویروس را برآورده می کند ، ویروس با دخالت یک RNA تکثیر می یابد و ذرات آنتی ژن سطحی را تولید و رها می سازد (۲) .

این ویروس که به وسیله گلیکوپروتئین های HbsAg به سلول های کبدی اتصال می یابد ، می تواند بیماری مزمن دارای علائم کلینیکی و بدون علائم را ایجاد کند که به پاسخ فرد نسبت به عفونت بستگی دارد. مشاهده هر دو آنتی ژن و ویریون HbsAg و HbeAg در خون ، نشان دهنده وجو د عفونت فعال است .

رادیو ایمونواسی و ELISA روشهایی بسیار حساس برای مشاهده آنتی ژن ها و آنتی بادی های HBV هستند . تشخیص اولیه هپاتیت را می توان بر اساس علائم کلینیکی و وجود آنزیم های کبدی در خون انجام داد . در هرحال سرولوژی عفونت با HBV معمولا دوره و چگونگی بیماری را نشان می دهد (۷) .

PCR روشی in vitro است که برای تکثیر بخشی از مولکول DNA که در بین دو ناحیه شناخته شده قرار دارد مورد استفاده قرار می گیرد . سرعت و سادگی روش PCR به همراه افزایش تنوع محصولات مربوطه باعث علاقه بسیار جهت استفاده از PCR در آزمایشات شده است . یکی از مزایای بزرگ PCR توانایی آن در تکثیر یک ناحیه مشخص DNA از یک الگوی اولیه بسیار پیچیده مانند DNA ژنومی می باشد . HBsAg نخستین مارکر سرولوژیکی است که قبل از بروز علائم کلینیکی در خون ظاهر می گردد و همچنین در جریان خون افراد دارای علائم کلینیکی به میزان بالایی بروز می کند . مارکرهای سرولوژیکی در تشخیص HBV حاد نقش کلیدی دارند . وجود HBsAg در سرم ممکن است نشانهٔ عفونت حاد ، مزمن و یا حالت ناقل سالم باشد (۸) . پرتو افشانی لومینول در مجاورت پراکسیدها مهمترین نوع واکنش کمی ایمونولومینسانس محسوب می شود . ساده ترین و راحت ترین راه استفاده از لومینسانس در آزمایشات ایمونولوژیک کونژوگه نمودن آنتی ژن یا آنتی بادی با مواد لومینسانت (نظیر لومینول) است. در این کیت از روش (SCIA)[1] استفاده گردیده است (۱۰، ۹) .

در روش PCR سه نوع واکنش مهم و کلیدی دناتوراسیون[2] ، آنلینگ[3] و اگزتانسیون[4] به وقوع می پیوندد . این سه نوع واکنش علیرغم مشخص و منفک بودن از هم ، در درون یک تیوب ، اما در درجه حرارت مختلف شکل می گیرند . برای انجام واکنش PCR مقادیر استانداردی تعیین گردیده است که در ابتدای شروع کار می تواند مورد استفاده قرار گیرد . البته با مطالعه مقالات در مورد موضوع خاص می توان مقادیر مناسب و بهینه جهت کسب نتایج مناسب را در هر آزمایشگاه به طور نسبی تعیین نمود . ولیکن قطعا برای

1-Sandwich Chemiluminescence Immuno Assay
2-Denaturation
3- Annealing
4 - Extension

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-13]

هر آزمایشگاه و هر عامل و نوع نمونه لازم است بهینه سازی ها صورت گیرد .

مواد و روش ها

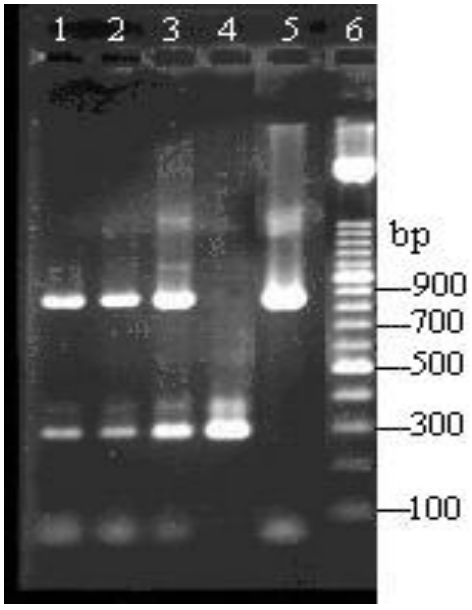
۶۳ نمونهٔ سرمی بیماران مشکوک به هپاتیت B مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان بقیه ا.. (عج) مورد مطالعه قرار گرفت . سرم های لیپمیک و همولیز یا سرم هایی که به دلیل آلودگی باکتریال کدر بودند ، از مطالعه حذف گردیدند . هر سرم پس از جداسازی به دو قسمت برای انجام تست های PCR و کمی لومینسانس تقسیم شد . برای بررسی ایمنولوژیک HBsAg با روش کمی ایمونولومینسانس از روش کیت LIASON LOT 400260 شرکت DiaSorin (ایتالیا ، نمایندگی ایران آریا فارمت) استفاده گردید . برای انجام PCR مواد مورد نیاز شامل DNA الگو ، قطعه DNA هدف ، بافر ، پرایمر ، آنزیم پلی مراز و کلرور منیزیم مورد استفاده قرار گرفت (۱۱) . برای انجام PCR مطابق با دستورالعمل کیت تشخیص Amplicence (کشور روسیه ، نمایندگی ایران تک کیاژن) عمل شد . پس از تکثیر برای شناسایی محصول 10 میکرولیتر از آن در ژل آگارز 1.5% الکتروفورز شد.

یافته های پژوهش

بیماران مورد بررسی شامل ۱۳ نفر مرد و ۵۰ نفر زن با میانگین سنی ۴۴/۵ بودند . با استفاده ازPCR، تمامی ۶۳ نمونه(۱۰۰درصد) از نظر وجود ناحیه هدف نتایج مثبت داشتند (نمودار شماره ۱) .

محصول واکنش PCR دارای اندازه ای معادل 295bp بود . در تصویر شماره۱ ، نمونه ای از ژل الکتروفورز شده مربوط به ۳ بیمار به همراه کنترل های مثبت و منفی نشان داده شده است .

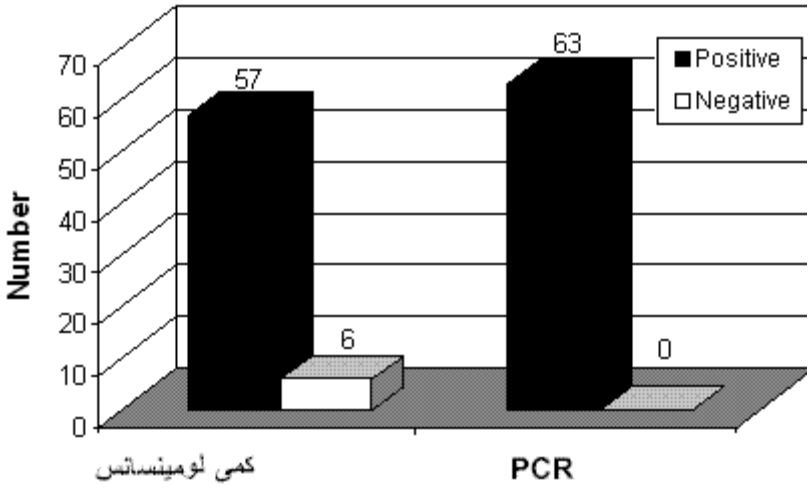
با روش سنجش ایمنی کمی لومینسانس ۵۷ مورد (۹۰/۵ درصد) نتیجه مثبت و ۶ مورد (۹/۵ درصد) نتیجه منفی داشتند (نمودار شماره ۱) .



تصویرشماره۱: نتایج حاصل از PCR بر روی نمونه ها

ردیف های ۳-۱ . مربوط به نمونه های سرم بیماران مبتلا به هپاتیت B که تکثیر باند اختصاصی به اندازه 295 bp را نشان می دهد ، ردیف ۴ کنترل داخلی مثبت کیت ، ردیف ۵ مربوط به کنترل منفی (Internal control) و ردیف ۶ مربوط به مارکر مولکولی(1Kbp) می باشد . محصول 850 bp بعنوان نشانگر عملکرد روند PCR در کیت گنجانده شده است که در ردیف های مربوط به سرم بیماران و ردیف ۵ وجود دارد .

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-13]



نمودار شماره ۱ . نتایج PCR و کمی لومینسانس

بحث و نتیجه گیری

هپاتیت ویروسی ناشی از HBV یکی از مشکلات مهم بهداشتی محسوب می گردد . تخمین زده می شود حدود دو میلیارد نفر در دنیا با ویروس HBV در تماس بوده و حدود شش درصد (بیش از ۳۵۰ میلیون نفر) از جمعیت جهان ناقل این ویروس می باشند که احتمال دارد پانزده تا بیست درصد موارد به بیماری حاد کبدی منجر شود (۱۴،۱۳،۱۲) .

این ویروس می تواند طیف وسیعی از بیماری ، از یک هپاتیت خفیف تا بیماری مهاجم که منجر به سیروز و سرطان هپاتوسلولار می گردد را ایجاد نماید (۷) . سرطان کبد سالیانه منجر به مرگ نیم میلیون انسان می گردد (۱۶، ۱۵) که بیشتر از ۷۰ درصد آن ناشی از ویروس هپاتیت B می باشد . بعلاوه عفونت هپاتیت B ممکن است تظاهرات آنتی ژنیک خود را بدون بروز علائم کلینیکی نشان دهد (۱۳) .

از حدود سی سال پیش روش های سنجش ایمنی مختلفی برای تشخیص HBV معرفی شده اند و تا امروز همانند روش های مولکولی مبتنی بر اسید های نوکلئیک سیر تکاملی داشته اند. این روش ها شامل رادیو ایمنواسی و آنزیم ایمنواسی می باشند (۱۷،۱۸) . در ادامه سیر تکاملی روش های سنجش ایمنی ، روش های متکی بر واکنش لومینسانس معرفی شدند (۱۹) .

اما از طرف دیگر ، امروزه روش های مولکولی نظیر PCR این امکان را به وجود آورده اند تا در مواردی که تست های سرولوژی قادر به شناسایی HBsAg نیستند ، وجود DNA مربوطه را در نمونهٔ کلینیکی مشخص کنند (۲۰) .

در این بررسی کارایی این دو روش در تشخیص هپاتیت B در بیمارانی که ابتلا به این بیماری در آنها مسجل بود مقایسه گردید . در تحقیقات انجام شده در اروپا ، ژاپن و آمریکا ، موارد HBsAg منفی با PCR مثبت گزار ش شده و بر لزوم استفاده همزمان روش های مولکولی و سرولوژی تاکید شده است (۲۱) . در تحقیق دیگری که به صورت کوهورت در مکزیک انجام شده است به نتایج مشابه ای دست یافته اند که استفاده همزمان روش های مولکولی و سرولوژی را برای بررسی ویروس هپاتیت B در اهدا کنندگان خون ضروری می داند (۲۲) .

در این تحقیق بیماران در مراحل مختلف درمان آنتی ویرال قرار داشتند، میزان ویروس هپاتیت B در سرم آنها در سطوح متفاوتی قرار داشت . با توجه به سابقهٔ مثبت بودن HBsAg در تمامی نمونه های مورد

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-13]

بررسی و نتایج مثبت تست مولکولی PCR در مورد تمامی نمونه ها و همچنین از طرفی حساسیت بیشتر روش کمی لومینسانس نسبت به سایر روش های سنجش ایمنی نظیر رادیوایمنواسی و آنزیم ایمنواسی و با توجه به نتایج تحقیقات مشابه در سایر کشورها (۱۴،۲۰) می توان چنین نتیجه گرفت که نتایج منفی در روش کمی لومینسانس شاید به دلیل دوز بسیار پایین آنتی ژن های ویروسی در نمونه های مورد بررسی بوده و یا آزمایشات سرولوژی آنها از الگوی کلاسیک پیروی نمی کرده است و دچار تغییرات سرولوژیک شده اند .

اگر چه امروزه روش های مولکولی برای ارزیابی بیماران با هپاتیت B مزمن به عنوان استاندارد طلائی توصیه نمی شوند ، اما با توجه به این مطلب که نتایج آزمایشات سرولوژی پنج تا بیست درصد از ناقلین مزمن HBV از الگوی کلاسیک پیروی نمی کند و دچار تغییرات سرولوژیک می شوند (۱۴) ، پیشنهاد می گردد از روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلی مراز برای تشخیص سریع DNA ویروس در بیماران مبتلا به هپاتیت ویروسی نوع B در کنار روش های سرولوژیک استفاده گردد.

References

1-Mahoney FJ . Update on diagnosis, management , and prevention of hepatitis B virus infection . *Clin Micobiol Rev* . 1999 ; 12 : 351-366 .

2-Jarvis L ; Cleland A ; Simmonds P ; Dow B ; Munro M ; Jordan A ; Prowse C ; Yap P L . Screening blood donations for hepatitis C virus by polymerase chain reaction. *Vox Sang* . 2000 ; 78 : 57-58 .

3-Maynard JE ; Kane MA ; Alter MJ . Control of hepatitis B by immunization In global perspectives . *Viral hepatitis and liver diseases* .1988 : 20 : 967-969 .

4-Christie AB . Infectious disease Epidemiology and clinical practice. *Churchill Livingstone* . 1980 : 73 : 447-618 .

5-Rizzetto M . The diagnosis approach to chronic hepatitis . *Advances in hepatobiliary and pancreatic diseases* . 1995 : 21 : 3-13 .

6-Sablon E ; Shapiro F. Advances in molecular diagnosis of HBV infection and drug resistance . J Med Sci . 2005 : 2 : 8-16 .

7-Lutwick LJ. HepatitisB virus.In: Belshe RB, editor. *Textbook of human virology* ; Mosby Yearbook; 1991: p. 65 – 89.

8-Ozkal P, Ilgin – Ruhi H , Akdogan M,. The genotoxic effect of hepatitis B virus to host DNA . *Mutagenesis* . 2005 : 20 : 147-150 .

9-Ching Tai P ; Moon Suk F , Wolfram H , Hypermodification and immune escap of an internally Deleted middle – Envelope (M) Protein of Frequent and Predominant Hepatitis B Virus Variants. *Virology* . 2002 : 92 : 44 - 58 .

10-William F ; Carman A . Molecular Variants of Hepatitis B Virus . *Hepatitis and chronic liver diseas* . 1996 : 16 : 63-72 .

11-Sambrook J ; Russell DW . Molecular Cloning . New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press . 2001 .

12-Nahed I ; Geoffrey E ; Michael P ; Smith B . Laboratory evaluation of a fully automated chemiluminescence's immunoassay for Rapid Detection of HbsAg , antibodies to HbsAg , and antibodies to hepatitis C Virus . *GMC* . 2004 : 42 : 610-617 .

13-Maynard JE ; Kane MA ; Alter MJ . Control of hepatitis B by immunization in global perspectives .*Viral hepatitis and liver diseases* . 1988 : 20 : 967-969 .

14-Sablon E ; Shapiro F. Advances in molecular diagnosis of HBV infection and drug resistance. *International Jornal of Medical Sciences* . 2005 : 2 : 8-16 .

15-Global health situation and projections and estimates . Geneva , Switzerland . *World Health Organization* . 1993 : 106-115 .

16-Timothy MB ; Anand SM ; Claus JF ; Robert J . Molecular viral oncology of hepatocelluar carcinoma . *Oncogene Jornal* . 2003 : 22 : 5093-5107 .

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-13]

17-Robert J A ; Diepersloot Y ; Zantvliet V ; Gleaves A . Comparison of a chemiluminescent immunoassay with two microparticle enzyme immunoassays for detection of hepatitis B virus surface antigen . *Clin Diagn Lab Immunol* . 2000 ; 7 : 865–66 .
18-Weber B . Recent developments in the diagnosis and monitoring of HBV infection and role of the genetic variability of the S gene . *Expert Rev Mol Diagn* . 2005 ; 5 : 75-91 .
19-Chen D ; Kaplan L ; Liu Q . Evaluation of two chemiluminescent immunoassays of ADVIA Centaur for hepatitis B serology markers . *Clin hin Acta* 2005 ; 355 : 41-5 .
20-Servoss JC ; Friedman LS. Serologic and molecular diagnosis of hepatitis B virus . *Clin Liver Dis* 2004 ; 8 : 267-81 .
21-Kuhns MC ; Busch MP . New strategis for blood donor screening for hepatitis B virus . Nucleic acid testing versus immunoassay methods . *Mol Diagn Ther* 2006 ; 2 : 77-91 .
22-Chiquete E ; Sanchez LV ; Becerra G ; Quintero A ; Maldonado M ; Panduro A . Performance of the serologic and molecular screening of blood donations for the hepatitis B and C viruses in a Mexican Transfusion Center . *Ann Hepatol* 2005 ; 4 : 275-87 .

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-13]