مروری بر روش‌های تشخیص آزمایشگاهی ویروس هپاتیت C

عباس مروتی*؛ سمیه دهقانی سانیج**؛ اشکان دیربازیان***؛ هما آزادگان****؛ شیما آقایی*****؛ حسن وحیدی امامی******

چکیده

ویروس هپاتیت سی بیماری‌های هپاتیت حاد، سیروز کبدی و هپاتوسلولار کارسینوما را باعث می‌شود. این مقاله به طور خلاصه به بررسی روش‌های تشخیصی بر پایه تست‌های سرولوژیکی و تکنیک‌های مولکولی برای تشخیص و مدیریت عفونت ویروس هپاتیت سی پرداخته است.

پس از خواندن این مقاله باید بتوانید تست‌های آزمایشگاهی که برای تشخیص و مدیریت ویروس هپاتیت سی استفاده می‌شود، توصیف کنید و در توصیف این تست‌ها و اصول عمومی انتخاب تست‌های آزمایشگاهی اختصاصی برای درجه بیماری زایی، تشخیص ، ارائه تصمیمات درمانی و ارزیابی پاسخ درمانی ویروس باید توانا باشید. همچنین ایجاد تکنیک‌های جدید در تشخیص ویروس هپاتیت سی می‌تواند در شناسایی ژنوتیپ‌های این ویروس برای ادامه درمان بیمار کمک بسیار زیادی انجام دهد.

واژگان کلیدی: ویروس هپاتیت سی، هپاتیت، هپاتوسلولار کارسینوما، تشخیص مولکولی.

* دانشجوی دکترا، مدیر عامل شرکت دانش‌بنیان سازمان ژن آراد و استاد مدعو دانشگاه آزاد قم (AbbasMorovvati@gmail.com)

** کارشناس ارشد، مدیر عامل آزمایشگاه آریا آزما.

*** دانشجوی دکترا، مربی، دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، ایران.

**** کارشناسی، دانشجوی میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، ایران.

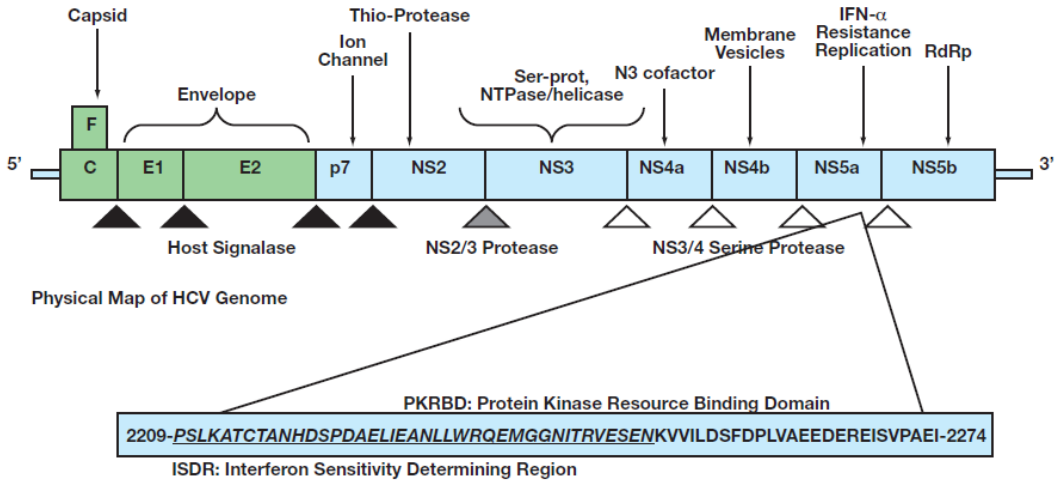
***** کارشناسی، دانشجوی میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، ایران.

****** دانشجوی ارشد، مربی، دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، ایران.

مقدمه

ویروس هپاتیت سی* (HCV) یک ویروس RNA با سنس مثبت است که بـه جـنس هپاسـی ویـروس در خـانواده فلاوی ویریده متعلق است [۱]. این ویروس عامل اصلی هپاتیت حاد و سرطان سلولی هپاتیـت اسـت. تقریبـاً ۷/۲ نفر میلیون از مردم ایالات متحده آمریکا و ۱۷۰ میلیون نفر از مردم جهان فکر می‌کنند عفونت ویروس هپاتیت سی مزمن و ماندگار است. ویروس هپاتیت سی سبب عفونت سخت به علت توانایی تکرار، انتشار، و پاسخ تغییـر دادن در میزبان است. ژنوم ویروسی آن ۹/۶کیلو جفت باز طول دارد که توسط ۲ ناحیه غیر قابل ترجمه در سر '۵ و '۳ (UTRs)آن قرار دارد و شامل یک قاب خواندن باز است که پروتئین حدود ۳ هزار اسید آمینه را رمزگذاری می‌کنـد. پلی پروتئین به ۱۰ پروتئین تک توسط پپتیداز سیگنال میزبان در منطقه ساختاری و با پروتئین‌های ویروسی پروتئـاز در منطقه غیر ساختاری تقسیم شده است. پروتئین‌های ساختاری که ذرات ویروسی را تشکیل مـی‌دهنـد، پـروتئین هسته و گلیکوپروتئین‌های بسته E۱ و E۲ را شـامل می‌باشـند. پروتئین‌هـا، شـامل پروتئین‌هـای p۷، NS۲، NS۳، NS٤A، NS٤B، NS٥A و NS٥B است(شکل ۱). با توجه به تکرار قوی ویروس، تخمین زده می‌شود ۱۰ تریلیون ویریون در روز در طول فاز فعال عفونت تولید شود [۲]. اجزای HCV به ٦ ژنوتیپ تقسیم می‌شـوند کـه در تـوالی نوکلئوتید آن‌ها با ۳۰٪ -۳۵٪ و به چندین تحت تیپ متفاوت است که در توالی نوکلئوتیـد آن‌هـا بـا ۲۵٪ -۲۰٪ تفـاوت دارنـد [۳]. ژنوتیـپ‌هـای ۱a و ۱b شـایع‌ترین ژنوتیپ‌هـای درایـران، آمریکـا و اروپـای غربـی و در ادامـه ژنوتیپ‌های ۲ و ۳ هستند. در مقابل، ژنوتیپ ٤ در آفریقـای شـمالی و مرکـزی، ژنوتیـپ ۵ در آفریقـای جنـوبی و خاورمیانه ژنوتیپ ٦ در چین و آسیای جنوب شرقی رایج است[٤]. ویروس هپاتیت سی به دلیل داشتن یـک ناحیـه بسیار متغیر□ این ژنوتایپ‌ها و ساب تایپ‌های متنـوع را ایجـاد می‌کنـد کـه هـر یـک از ایـن ژنوتایپ‌هـا و تعـداد ویروس‌ها می‌توانند در ارتباط با میزان شدت بیماری و پاسخ به درمان ویروس متفاوت باشند[۵].

* Hepatitis C Virus
□ Hyper Variable region



شکل ۱. نقشه ژنومی ویروس هپاتیت سی و پروتئین‌های ساختمانی و غیر ساختمانی

تست‌های آزمایشگاهی برای تشخیص عفونت ویروس هپاتیت سی

روش‌های کشت معتبر برای ویروس هپاتیت سی به طور جاری در دسترس نیست. تست‌های مورد بررسی ویروس هپاتیت سی، تست‌های سرولوژی، تشخیص آنتی بادی‌های ویروس هپاتیت سی و آنتی ژن‌های هسته‌ای، تست‌های مولکولی، تشخیص کیفی (RNA) ویروس هپاتیت سی و تکنیک‌های ژنوتایپینگ را شامل می‌شود.

ـ آزمایش‌های سرولوژی

تشخیص اولیه ویروس هپاتیت سی معمولاً مطابق نشانه‌های کلینیکی و بالا بودن سطح آنزیم‌های کبدی ALT* و آنزیم‌های مثبت ایمونوساید (EIA)[۵] یا کمی لومینسانس (CIA)[۵] برای آنتی بادی‌های ضد ویروس هپاتیت سی در افراد بیمار براساس ریسک فاکتورهای شناسایی شده می‌باشد.

تولید روش‌های آنزیم‌های ایمونوساید نسل اول، (EIA-۱) ، نسل دوم (EIA-۲) و نسل سوم (EIA-۳) ، برای تشخیص آنتی بادی‌های ضد هستهٔ ویروس هپاتیت سی و آنتی ژن‌های (NS۵-NS٤-NS۳) به کار گرفته شد [٦].

اخیراً نسل دوم و سوم تولید کنندهٔ پروتئین‌های آنزیمی مثبت ایمونوساید (EIA)، عامل استفادهٔ تست‌های

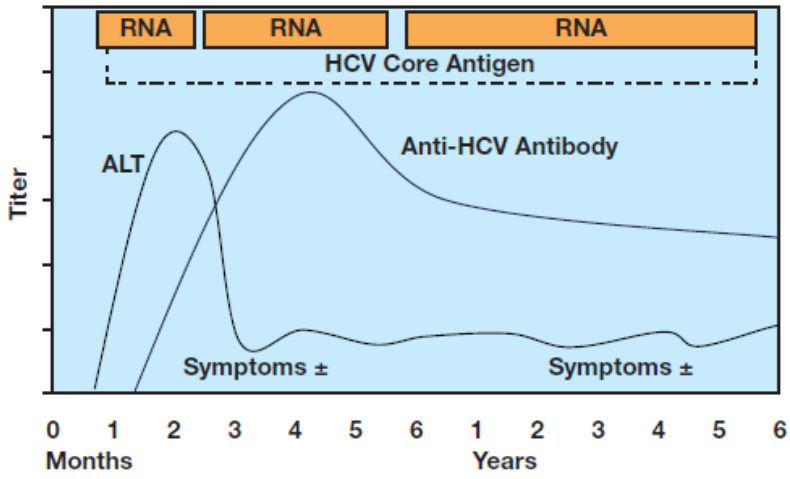
---

*. Alanine aminotransferase

۵. enzyme immunoassay

۵. chemiluminescence immunoassay

آزمایشگاهی در شناسایی و تشخیص ویروس هپاتیت سی می‌باشد. سروتایپ‌های مثبت به وسیلهٔ ایـن تسـت‌ها در ۸ تا ۱۰ هفته بعد از قرار گرفتن در معرض ویروس ها به کار گرفته می‌شود و تست‌های مثبت باقی مانده برای ۶ ماه بعد از زمان عفونت زایی استفاده می‌شود (شکل۲) [۷].



شکل ۲. پاسخ های تست‌های سرولوژیک به عفونت‌های حاد و مزمن ویروس هپاتیت سی و میزان آنزیم کبدی ALT

میزان اختصاصیت کیت‌های نسل دوم و سوم بیش از ۹۹% و میـزان حساسـیت ایـن کیت‌هـا بـه ترتیـب ۹۵ و ۹۷% است. کیت‌های غربالگری آنتی بادی ویروس هپاتیت سـی EIA بـه وسـیله سـازمان غـذا و داروی ایـالات متحده آمریکا پذیرفته شده و در آزمایشگاه‌های ایالات متحده استفاده می‌شود [۷].

تعداد آزمایش‌های ایمنی برای شناسایی IgG ضد HCV در نمونه‌های سرمی یـا پلاسـما افـزایش یافتـه اسـت. تست‌های نسل اول که بر پایه پروتئین نوترکیب شده بود، حاوی یک اپی توپ از منطقه (NS٤ ۳) ژنوم HCV بود. این آزمایش‌های ضد ویروس IgG گلوکز را تقریباً در ۸۰٪ بیماران مبتلا به هپاتیت، پس از انتقال خون نشـان داد و بـه کاهش قابل توجه عفونت HCV مرتبط با انتقال خون منجر شد؛ اما حساسیت و کیفیت نداشت [۸]. تست‌های نسل دوم و سوم از یک فرمت چندتایی استفاده کرده و آنتی ژن‌هایی از هسته، NS۳ و NS٤ را شامل شد. این تغییرات به طور چشمگیری حساسیت و خاصیت را بهبود بخشید [۹]. تفاوت بین آزمایش‌های نسل دوم و سوم، شامل آنتی ژن اضافی از منطقه NS٥ است [۱۰]. این آزمایش‌ها مدت زمان پنجره‌ای که در آزمایش‌های نسل اول مشاهده می‌شود، به طور متوسط ۵ هفته کاهش می‌یابد و اجازه می‌دهد آنتی بادی ضد ویروس در ۱۰ هفته پـس از در معـرض قـرار گرفتن، تشخیص داده شود. با این وجود، آزمایش‌های ایمنی نسل سوم (EIAs) می‌تواند نتایج منفی کاذب در بیماران تحت همودیالیز یا افراد مبتلا به نقص ایمنی داشته باشد[۱۱]. علاوه بر این، این آزمایش‌ها می‌توانند مقادیر پیش‌بینی

کننده مثبت را در میان جمعیت‌هایی با شیوع کم (<۱۰٪) عفونت HCV ایجاد کنند[۱۲]. نتایج مثبت کاذب می‌تواند برای فرد مورد آزمایش عواقب ناخواسته‌ای داشته باشد که به آسیب روانی و بازدیدهای پزشکی غیر ضروری منجر می‌شود. مراکز ایالات متحده برای کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (CDC) توصیه می‌کنند که یک فرد به عنوان شاهد سرولوژیک عفونت HCV در نظر گرفته شود؛ اگر نتایج مثبتی از غربالگری ضد HCV با نتایج مثبت یک آزمایش دیگر تأیید شود؛ از یک آزمایش آنتی بادی ضد ایمنی نوترکیب (RIBA) یا از NAT برای شناسایی RNA HCV استفاده کنید. با این حال، به رغم این توصیه‌ها، آزمایش‌های تکمیلی به دلایل گوناگونی توسط آزمایشگاه‌های مختلف انجام نشده است؛ مانند پیچیدگی تست‌ها، زمان بازنگری طولانی نتایج آزمون و هزینه‌های بالا. CDC مجموعه دیگری از دستورالعمل‌هایی را ارائه می‌کند که توصیه‌های قبلی را گسترش می‌دهند (شامل گزینه‌ای برای استفاده از نسبت سیگنال به قطع برای محدود کردن تعداد نمونه‌هایی که نیاز به تست مکمل دارند [۱۳]). این دستورالعمل‌ها بر اساس مطالعهٔ نمونه‌های سرم (۲۵ هزار نفر) از جمعیت ایالات متحده با شیوع IgG ضد ویروس HCV اعم از ۰٫۸٪ تا ۲۵٪، با استفاده از کیت‌های غربالگری ضد ویروس HCV، RIBA و NAT انجام گرفت. این مطالعه نسبت‌های سیگنال به قطع را برای چندین آزمون تعیین کرد که نتیجه مثبت آنتی بادی واقعی را > ۹۵٪ از زمان بدون در نظر گرفتن شیوع ضد ویروس هپاتیت C یا خصوصیات جمعیت مورد آزمون قرار داد [۱۳].

تست‌های سریع

با وجود حساسیت و خاصیت EIA نسل سوم، زمان چرخش برای گزارش نتایج آزمون، حداقل یک روز است، و این باعث می‌شود که نتایج را برای افراد منتخب در اولین بازدید از دست ندهید. تست‌های سریع به گونه‌ای طراحی شده‌اند که به ابزار دقیق و یا آزمایش توسط کارکنان فنی ماهر نیازی ندارند. آن‌ها بالقوه نتایج را در طول یک ساعت تولید می‌کنند و بنابراین، می‌توانند برای آزمایش نقطه مراقبت استفاده شوند. CDC اخیرا ارزیابی ۳ آزمایش سریع برای تشخیص IgG ضد HCV را در تنظیمات آزمایشگاهی و میدانی انجام داده است. این تست‌ها بر اساس آنتی ژن‌های نوترکیب مشتق شده از پروتئین‌های هسته، NS۳، NS٤ و NS٥ در فرمت ایمونوکروماتوگرافی، بر اساس ویژگی‌های بالاتر از ۹۹% و حساسیت از ۸٦ تا ۹۹% نشان داده شده است [١٤ و ١٥].

آزمایش آنتی بادی سریع OraQuick HCV برای تشخیص IgG ضد HCV، اخیراً توسط FDA برای استفاده با نمونه‌های خون انگشتی، کل خون و خون وریدی از افراد بالای ۱۵ سال و در معرض خطر ابتلا به HCV و از افراد مبتلا به علائم و نشانه‌های هپاتیت تأیید شد [١٦].

تست‌های سریع معمولاً از آزمون‌های ایمونولوژی معمول گران‌تر هستند و برای آزمایش دسته‌های بزرگ نمونه‌ها طراحی نشده‌اند. با این حال، در آزمایشگاه‌های غیر بالینی و آزمایشگاه‌هایی که تست کم حجم را

انجام می‌دهند، انجام دادن تست‌های سریع می‌تواند مقرون به صرفه باشد. دستورالعمل‌های CDC برای تأیید غربالگری نتایج ضد HCV هنوز برای تست سریع ضد HCV ، مورد نیاز است. تأکید می‌شود که آزمایش OraQuick HCV، برای غربالگری عمومی تأیید نشده است. نتیجه مثبت یک آزمایش سریع ضد HCV نشان دهنده حضور ضد HCV است و در عین حال، عفونت فعال را نشان نمی‌دهد [۱۶].

روش‌های تشخیص مولکولی ویروس

RNA ویروس هپاتیت سی در سرم یا پلاسما در اوایل یک هفته پس از در معرض قرار گرفتن قابل تشخیص است و بنابراین، قابل اعتمادترین مؤلفه و استاندارد طلایی برای تشخیص عفونت HCV فعال می‌باشد [۱۷]. تست NAT* در حال حاضر در استفاده معمول برای تشخیصRNA ویروس هپاتیت سی براساس واکنش زنجیره‌ای پلیمریزاسیون (PCR) می‌باشد. آزمایش‌های کیفی و کمی PCR برای ویروس هپاتیت سی که برای استفاده بالینی از سوی مقامات نظارتی در ایالات متحده و اروپا مورد تأیید قرار گرفته است؛ در جدول ۱ آمده است[۱۷]. با ظهور فوق العاده آزمون‌های حساس NAT ها که دارای یک دامنه وسیع هستند و می‌توانند به اندازه ۵ IU / mL RNA ویروس هپاتیت سی تشخیص دهند؛ انتظار می‌رود که با استفاده از روش‌های کیفی کاهش یابد. تا سال ۱۹۹۷، تیترهای RNA ویروس هپاتیت سی با استفاده از NATهای با کمیت مختلف اندازه‌گیری و در واحدهای مختلف ارائه شدند. توسعه یک استاندارد بین المللی RNA ویروس هپاتیت سی از سوی سازمان بهداشت جهانی، یک واحد استاندارد اندازه گیری واحد IU □ را فراهم کرد که در حال حاضر در همه آزمایش‌های تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد. تمام NAT ها در تمام ٦ ژنوتیپ HCV، دارای ویژگی‌های بالا تا ۹۹٪ هستند. در دسترس بودن NATهای فوق حساس، همراه با گزارش دهی تیترهای ویروسی در واحد های مشابه در تست‌های مختلف برای بررسی اثربخشی واکنش به درمان در طول درمان ضد ویروسی در مبتلایان به HCV بسیار مهم بوده است [۱۸].

* Nucleic acid testing

□ international units

جدول ۱. روش‌های کیفی و کمی برای بررسی RNA ویروس هپاتیت سی مورد استفاده در تشخیص های کلینیکی

Assay	Manufacturer	Method	Lower Limit of Detection,[a] (Dynamic Range) IU/mL
Qualitative			
Amplicor HCV v2.0	Roche	RT-PCR (manual)	50
COBAS Amplicor HCV v2.0	Roche	RT-PCR (semiautomated)	50
Ampliscreen[b]	Roche	RT-PCR (semiautomated)	<50
Versant HCV RNA	Gen-Probe	TMA (manual)	10
UltraQual HCV RT-PCR	National Genetics	RT-PCR	10
Procleix HIV-1/HCV[b]	Gen-Probe	TMA (manual)	<50
Quantitative			
Amplicor HCV Monitor	Roche	RT-PCR (manual)	50 (600–700 000)
COBAS Amplicor HCV Monitor v2.0	Roche	RT-PCR (semiautomated)	50 (600–700 000)
Versant HCV RNA 3.0	Siemens	bDNA (semiautomated)	615 (615–7 700 000)
COBAS Ampliprep/TaqMan	Roche	qPCR (semiautomated)	18 (43–69 000 000)
Real Time HCV/m2000sp/m2000rt	Abbott	qPCR (semiautomated)	12 (12–100 000 000)
HCV SuperQuant	National Genetics	RT-PCR (semiautomated)	20 (20–1 000 000)
LCx HCV RNA-Quantitatie[b]	Abbott	RT-PCR (manual)	25 (25–2 630 000)

b-DNA: branched DNA, qPCR: quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction, TMA:transcription-mediated amplification

[a] Dynamic ranges are specific in parentheses

[b] Used for blood screening only

علاوه بر NAT ها برای RNA، ویروس هپاتیت سی آزمایش‌های کمی و کیفی HCV موجود است. این‌ها به طور متفاوتی بر روی سکانس ویروس، هیبریداسیون معکوس به نشانگر اولیگونوکلئوتید اختصاصی ژنوتیپ و تجزیه و تحلیل پلی مورفیسم طول قطعه محدود می‌شوند. ژنوتیپ HCV دارای برنامه‌های کاربردی بالینی است؛ زیرا عفونت توسط برخی ژنوتیپ‌ها با نتایج درمانی مرتبط است [۱۹].

تست تشخیصی برای ژنوتایپ‌های ویروس هپاتیت سی

در حال حاضر هیچ آزمایشی مورد تأیید (FDA) برای اندازه گیری ژنوتیپ ویروس هپاتیت سی وجود ندارد. تست اصلی برای شناسایی ژنوتایپ ویروس هپاتیت سی PCR, و سکانس بر روی ژنوم ویروس هپاتیت سی بر اساس بخش (NSB۵) یا ۵'-UTR و آنالیز های فیلوژنیک می‌باشد. همهٔ آزمایش‌ها نیازمند زمان و تکمیل امکانات هستند و معمولاً در آزمایشگاه‌های تحقیقی و بیش‌تر در تحقیقات اپیدمیولوژی که در آن ژنوتیپ دقیق لازم است، استفاده می‌شود [۲۰]. مزیت تعیین سکانس این است که تنوع ژنومیک‌ها و حضور quasi-species در حین پیشرفت طبیعی بیماری به داروی ضد ویروسی پاسخ می‌دهد. در اقدامات بالینی ژنوتایپ ویروس هپاتیت سی با استفاده از کیت‌های تجاری انجام می‌شود که تقویت PCR و هیبریدی کدون با پروب خاص ژنوتیپ را انجام می‌دهند [۲۱].

تکنیک پروب هیبریدزاسیون معکوس ویروس هپاتیت سی* شرکت INNO LIPA که در این تست می‌توان ژنوتایپ‌های مختلف این ویروس را به سادگی و به طور همزمان بررسی کرد. این آزمایش‌ها سطح بالایی از هماهنگی و قابلیت اطمینان دارند و نادرست بودن نوع ژنوتیپ‌ها نادر و کم‌تر از ۳%، به ندرت اتفاق می‌افتند [۲۲].

در ویروس هپاتیت سی کیت‌های INNO LIPA از پروب‌های ویژهٔ الیگونوکلیوتید بر اساس بخش ۵'-UTR از ژنوم ویروس هپاتیت سی می‌باشد. آزمایش ژنوتیپ معکوس ویروس هپاتیت سی ورژن ۲، نسل بعدی آزمایش‌های پروب است که بر اساس ۵'-UTR و ناحیه هسته در ژنوم ویروس هپاتیت سی مشخص می‌کند. [۲۳]. امروزه آزمایش‌های INNO LIPA ویروس هپاتیت سی ورژن ۲ مؤثرترین آزمایش تجاری برای تعیین ژنوتیپ ویروس هپاتیت سی، تشخیص زیر گروه در آزمایش‌های بالینی و تحقیقاتی استفاده می‌شود. با استفاده از این تکنیک با اجرای تست RT-PCR و در ادامه با روش هیبریدزاسیون معکوس توالی مربوط به پروب را برای هر یک از ٦ ژنوتیپ‌های ویروس در زمانی واحد مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۳].

فن آوری‌های جدید برای تشخیص HCV

پیشرفت‌های اخیر در تکنولوژی‌های مولکولی، ابزارهای جدید امید بخشی تولید کرده‌اند که برای استفاده از آن در توسعه آزمایش‌های جدید و ارتقا یافته، برای تشخیص عفونت HCV توانمند هستند. روش‌های تشخیصی براساس نانوذرات مبتنی بر پروتئین برای شناسایی بیومارکرها در بیماری‌های مختلف، از جمله هپاتیت سی توسعه یافته است. بیش‌ترین استفاده از نانوذرات، نقطه‌های کوانتومی و نانوذرات طلا است. QD□ها و نانو ذرات ساخته شده از مواد نیمه‌هادی هستند که روی تحریک در طیف‌های مختلف، (بسته به اندازه آن‌ها) موجب برانگیختن نور می‌شوند، که شدت توانایی چندگانه را افزایش می‌دهد [۲٤]. حساسیت یک نانوگرم در میلی لیتر در یک آزمایش مبتنی بر چیپ زیستی انجام شد که در آن، پروبیوتیک الیگونوکلئوتید RNA متصل به QD براساس بخش HCV NS۵B هدف قرار گرفت [۲۵]. یک پلت فرم چندتایی با استفاده از تراشه‌های ذرات مایع و QDهای پوشش داده شده با آنتی ژن که در دانه‌های پلی استایرن جاسازی شده است، گزارش شده که آنتی بادی‌های HBV، HCV و HIV را با حساسیت در محدوده پیکومولار مشخص می‌کند [۲٦ و ۲۷]. نانوذرات طلا، معمولاً با اندازه ۲ تا ۵۰ نانومتر، در فرآیند های مختلفی برای تشخیص ضد HCV و همچنین HCV RNA مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۲۸].

در میان دیگر فن‌آوری‌های جدید که در حال حاضر برای پتانسیل تشخیص خود در عفونت‌های HCV ارزیابی می‌شود، استفاده از آپتامرها به عنوان مولکول‌های جذب می‌باشد. آپتامترها، الیگونوکلئوتیدهای تک سلولی کوتاه

* Reverse Hybridization Line Probe

□ quantum dots

هستند که می‌توانند به ساختارهای ۳ بعدی خاص برسند و مولکول‌های هدف مانند مواد شیمیایی کوچک، پروتئین‌ها و حتی سلول‌ها را تشخیص دهند [۲۹]. از آن‌ها برای برنامه‌های مختلف تشخیصی (به سبب توانایی شایع آن‌ها برای اتصال به اهداف خود) با ارتباطات و ویژگی‌های بالایی استفاده شده‌اند. علاوه بر این، این مولکول‌ها توسط یک فرآیند انتخاب آزمایشگاهی تولید می‌شوند که نیاز به تولید آنتی‌بادی‌ها را در درون موجود زنده از بین می‌برند [۳۰]. نقش این مولکول‌ها در تشخیص آنتی ژن HCV در گزارش‌های اولیه شرح داده شده است [۳۱ و ۳۲].

یک روش و آزمون تکثیر جدید، تکنیک ایزوترمال متصل به حلقه LAMP*، این پتانسیل را دارد که بتواند به یک نقطه مراقبت NAT برای تشخیص RNA ویروس هپاتیت تبدیل شود [۳۳و۳٤]. گزارش شده است که RNA ویروس هپاتیت سی به طور قابل توجهی به حساسیت هشت واحد در میلی لیتر با این روش افزایش یافته است. یک دستگاه که متدولوژی LAMP را در تراشه‌های میکرو فلوئید ادغام می‌کند، شرح داده شده است و توانایی تکمیل تقویت در یک ساعت، با استفاده از <۱ µL نمونه با حساسیت ۱۰ fg / µL گزارش شده است. این فن آوری‌های متنوع و امیدوار کننده ارزیابی بیش‌تر را می‌طلبند [۳۵].

نتیجه‌گیری

تست سرولوژیک برای شناسایی عفونت رایج HCV بر اساس IgG ضد ویروس، روشی مناسب معرفی شده است. با معرفی روش‌های سریع برای آزمایش ضد HCV، یک پایگاه، حتی بیش‌تر از جمعیت‌هایی که در معرض خطر ابتلا به عفونت HCV قرار دارند، می‌تواند با شناسایی افراد آلوده برای ارجاع به مراقبت و درمان، نمایش داده شود. تست‌های مولکولی برای شناسایی RNA های HCV به عنوان عاملی اصلی برای تشخیص ویروس و تعداد آن در فرد مبتلا، به عنوان روشی بسیار مناسب در شناسایی افراد مبتلا می‌باشد. همچنین استفاده از شیوه‌های جدید برای شناسایی این ویروس به عنوان یک تکنیک مناسب در افراد مبتلا، در مدت زمان بسیار کوتاه در تعیین ژنوتایپ ویروس و نحوه درمان مبتلایان به این ویروس کمک بسیار زیادی می‌تواند انجام دهد.

* Loop-Mediated Isothermal Amplification Method

منابع

۱. Thiel HJ. Virus taxonomy. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Waltham, Massachusetts: Academic Press, ۲۰۰۵:۹۷۹–۹٦.

۲. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. Science ۱۹۹۸; ۲۸۲:۱۰۳–۷.

۳. Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. Hepatology ۲۰۰۵; ٤۲:۹٦۲–۷۳.

٤. Lin HJ, Lau JY, Lauder IJ, Shi N, Lai CL, Hollinger FB. The hepatitis C virus genome: a guide to its conserved sequences and candidate epitopes. Virus Res ۱۹۹۳; ۳۰:۲۷–٤۱.

٥. Chevaliez S, Pawlotsky J-M. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *Int J Med Sci.* ۲۰۰٦;۳(۲):۳٥-٤۰.

٦. Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. *MMWR Recomm Rep.* ۲۰۰۳;٥۲(RR-۳):۱-۱۳, ۱٥; quiz CE۱۱-۱٤.

۷. Gretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology.* ۱۹۹۷;۲٦(۳ Suppl ۱):٤۳S-٤۷S.

۸. Barrera JM, Bruguera M, Ercilla MG, et al. Incidence of non-A, non-B hepatitis after screening blood donors for antibodies to hepatitis C virus and surrogate markers. Ann Intern Med ۱۹۹۱; ۱۱٥:٥۹٦–٦۰۰.

۹. Alter HJ. New kit on the block: evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. Hepatology ۱۹۹۲;۱٥:۳٥۰–۳.

۱۰. Barrera JM, Francis B, Ercilla G, et al. Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. Vox Sang ۱۹۹۵; ۶۸:۱۵–۸.

۱۱. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management,
and treatment of hepatitis C: an update. Hepatology ۲۰۰۹; ۴۹:۱۳۳۵–۷۴.

۱۲. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. MMWR ۱۹۹۸; ۴۷(RR-۱۹):۱–۳۳.

۱۳. CDC. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. MMWR ۲۰۰۳; ۵۲(RR-۳):۱–۱۶.

۱۴. Smith BD, Teshale E, Jewett A, et al. Performance of premarket rapid hepatitis C virus antibody assays in ۴ national human immunodeficiency virus behavioral surveillance system sites. Clin Infect Dis ۲۰۱۱;۵۳:۷۸۰–۶.

۱۵. Smith BD, Drobeniuc J, Jewett A, et al. Evaluation of three rapid screening assays for detection of antibodies to hepatitis C virus. J Infect Dis ۲۰۱۱; ۲۰۴:۸۲۵–۳۱.

۱۶. Food and Drug Administration. Available at: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfClia/detail.cfm?id=۵۰۸۸۶۲۰&NoClia=۱&pagenum=۵۰۰. Accessed ۱۵ April ۲۰۱۲.

۱۷. Pawlotsky JM. Use and interpretation of hepatitis C virus diagnostic assays. Clin Liver Dis ۲۰۰۳; ۷:۱۲۷–۳۷.

۱۸. Saldanha J, Heath A, Aberham C, et al.. World Health Organization collaborative study to establish a replacement WHO international standard for hepatitis C virus RNA nucleic acid amplification technology assays. Vox Sang ۲۰۰۵; ۸۸:۲۰۲–۴.

۱۹. Pawlotsky JM. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. Clin Liver Dis ۲۰۰۳; ۷:۴۵–۶۶.

۲۰. Cavalheiro NP. Hepatitis C: genotyping. *Braz J Infect Dis.* ۲۰۰۷;۱۱(۵ Suppl. ۱):۲۵-۲۷.

۲۱. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology.*۲۰۰۹;٤۹(٤):۱۳۳۵-۱۳۷٤.

۲۲. Germer JJ, Rys PN, Thorvilson JN, Persing DH. Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence analysis of products generated with the Amplicor HCV test. *J Clin Microbiol.*۱۹۹۹;۳۷(۸):۲٦۲٥-۲٦۳۰.

۲۳. Bouchardeau F, Cantaloube JF, Chevaliez S, et al. Improvement of hepatitis C virus (HCV) genotype determination with the new version of the INNO-LiPA HCV assay. *J Clin Microbiol.* ۲۰۰۷;٤٥(٤):۱۱٤۰

۲٤.Al Olaby RR, Azzazy HM. Hepatitis C virus RNA assays: current and emerging technologies and their clinical applications. Expert Rev Mol Diagn ۲۰۱۱; ۱۱:٥۳–٦٤.

۲٥. Roh C, Lee HY, Kim SE, Jo SK. A highly sensitive and selective viral protein detection method based on RNA oligonucleotide nanoparticle. Int J Nanomedicine ۲۰۱۰; ٥:۳۲۳–۹.

۲٦. Klostranec JM, Xiang Q, Farcas GA, et al. Convergence of quantum dot barcodes with microfluidics and signal processing for multiplexed high-throughput infectious disease diagnostics. Nano Lett ۲۰۰۷; ۷:۲۸۱۲–۸.

۲۷. Duan L, Wang Y, Li SS, Wan Z, Zhai J. Rapid and simultaneous detection
of human hepatitis B virus and hepatitis C virus antibodies based on a protein chip assay using nano-gold immunological amplification and silver staining method. BMC Infect Dis ۲۰۰٥; ٥:٥۳.

۲۸. Shawky SM, Bald D, Azzazy HM. Direct detection of unamplified hepatitis C virus RNA using unmodified gold nanoparticles. Clin Biochem ۲۰۱۰; ٤۳:۱۱٦۳–۸.

۲۹.Shi H, Hoffman BE, Lis JT. RNA aptamers as effective protein antagonists
in a multicellular organism. Proc Natl Acad Sci U S A ۱۹۹۹;۹٦:۱۰۰۳۳–۸.
۳۰. Tang J, Yu T, Guo L, Xie J, Shao N, He Z. In vitro selection of DNA aptamer against abrin toxin and aptamer-based abrin direct detection. Biosens Bioelectron ۲۰۰۷; ۲۲:۲٤٥٦–٦۳.
۳۱. Chen F, Hu Y, Li D, Chen H, Zhang XL. CS-SELEX generates highaffinity
ssDNA aptamers as molecular probes for hepatitis C virus envelope glycoprotein E۲. PLoS One ۲۰۰۹; ٤:e۸۱٤۲.
۳۲. Lee S, Kim YS, Jo M, Jin M, Lee DK, Kim S. Chip-based detection of hepatitis C virus using RNA aptamers that specifically bind to HCV core antigen. Biochem Biophys Res Commun ۲۰۰۷; ۳٥۸:٤۷–٥۲.
۳۳. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res ۲۰۰۰; ۲۸:E٦۳.
۳٤. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loopmediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun ۲۰۰۱; ۲۸۹:۱٥۰–٤.
۳٥. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loopmediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes ۲۰۰۲; ۱٦:۲۲۳–۹.

Review on Laboratory tests for Diagnosis of Hepatitis C Virus

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) infection is associated with chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. This review summarizes the pathogenesis and significance of serological and molecular-based assays and new methods in the diagnosis and management of HCV infection after reading this article, readers should be able to describe laboratory tests used in the diagnosis and management of HCV infection. They should also be able to describe the general principles for selecting the most appropriate laboratory test for diagnosis, therapeutic decision making, and assessment of virologic response to therapy. New methods for diagnosis of HCV virus infection could help for HCV detection and virus Genotypes in patient. Molecular methods are very sensitive and specific for RNA diagnosis and uses of this test for HCV genotypes Because HCV genotypes different response to druges.HCV genotypes detection could help for follow up treatment by interferon of patient.

Keywords: hepatitis C virus, hepatitis, hepatocellular carcinoma, molecular diagnostics