مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
بهار 1391، دوره چهارم، شماره دوازدهم، صفحه 52-43

طراحی و بهینه سازی اینترنال کنترل تست PCR ویروس هرپس سیمپلکس

الهام مسلمی[1]، آسیه اکبریان[2]، محمد حسن شاه حسینی[3و4]، مریم قهری[4]، فهیمه استاد غلامی رضایی[4]، سام مساحی[4]، مونیکا علمی [4]

1. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق، گروه زیست شناسی، تهران/ایران
2. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات ،گروه میکروبیولوژی، تهران/ایران
3. دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی، تهران/ایران
4. موسسه ایرانیان ژن فناور(IGF) ، تهران/ایران

نویسنده مسوول: دکتر الهام مسلمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق، گروه زیست شناسی.Elham_moslemi60@yahoo.com

دریافت: 91/1/18 پذیرش: 91/3/15

چکیده

زمینه و هدف: ویروس هرپس سیمپلکس که در انسان ایجاد عفونت می کند، عضوی از خانواده ی هرپس ویریده می باشد. روش های متنوعی برای تشخیص این ویروس وجود دارد اما برای ویروس ها روش هایی مثل کشت بسیار زمان بر است، در نتیجه روش های مولکولی از جمله PCR، تکنیک های مناسب تری هستند، اما بروز نتایج متفاوت در آزمایشگاهها بدلیل استاندارد نبودن روش از معایب این تکنیک مولکولی قوی است. برای رفع این خطا در این تحقیق اقدام به طراحی اینترنال کنترل رقابتی IC به طریق PCR-Cloning گردید.

روش بررسی: در این مطالعه برای ساخت کنترل داخلی ویژه HSV ابتدا پرایمرهای ویژه PCR جهت تشخیص مولکولی بهینه شد. پرایمرهای مرکب (Composite Primer) برایIC-HSV نیز طراحی و سپس روش PCR برای IC-HSV بهینه گردید. IC-HSV تکثیر شده در پلاسمید pTZ57R الحاق شد و سپس درباکتری *اشریشیا کلی* JM107 ترانسفورم و کلون گردید. حساسیت و اختصاصیت تست مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: اندازه محصول HSV PCR با پرایمرهای اختصاصی آن برابر با 454 جفت باز و محصول IC-HSV برابر با 662 جفت باز بود، که از نظر اندازه، اختلاف مطلوب را با هم دارند. تعداد حداقل IC در هر واکنش 1000 عدد تعیین شد. حساسیت تست PCR همراه با IC برای DNA ویروس هرپس سیمپلکس بین یک میلیون تا 100 پارتیکل ویروس مشخص گردید.

نتیجه‌گیری: در کنار سرعت و دقت بالای تکنیکPCR ، نتایج منفی کاذب که به دلیل وجود مهارکنندگان واکنش PCR، رخ می دهند از مشکلات مهم این تکنیک هستند که می توانند کارایی این روش ها را کاهش دهند. استفاده از یک DNA دیگر به عنوان کنترل داخلی می تواند این خطاها را شناسایی کند. در واقع تکثیر این DNA حاکی از صحیح طی شدن تمامی مراحل تکثیر و شناسایی است.

واژه‌های کلیدی: ویروس هرپس سیمپلکس ،PCR ، اینترنال کنترل.

www.SID.ir

مقدمه

ویروس هرپس سیمپلکس در نتیجه تماس نزدیک از فردی به فرد دیگر منتقل می‌گردد. این ویروس عامل بسیاری از عفونت های پوست و مخاط دهان، چشم و دستگاه تناسلی انسان می باشد(1). از بین دو نوع ویروس هرپس، HSV1 عمدتا با عفونت های صورت-دهانی همراه است در حالی که HSV2 بیشتر عامل عفونت های دستگاه تناسلی می باشد که از طریق روابط جنسی به شدت قابل انتقال است. هومولوژی نهائی DNA بین HSV-1 و HSV-2 تقریباً 50 درصد است(2). آنسفالیت ناشی از ویروس هرپس سیمپلکس یک بیماری بسیار خطرناک است که در صورت عدم استفاده از درمان ضدویروسی اغلب منجر به مرگ بیمار یا ضایعات جبران ناپذیر می‌گردد. موفقیت در درمان این بیماری بستگی به تشخیص سریع بیماری دارد(3) . تشخیص و درمان بیماری های ناشی از عفونت ویروس هرپس سیمپلکس از جمله آنسفالیت سالهاست که مورد بررسی قرار گرفته است. ولی علیرغم این مطالعات، تظاهرات بالینی، نتایج آزمایشگاهی و بررسی‌های سیستم عصبی کمک چندانی به تشخیص قطعی این بیماری ها نکرده و کوششهای مکرر برای پیداکردن یک راه مناسب برای تشخیص سریع، قطعی و در عین حال بی‌خطر، بی ثمر بوده است(4). روشهای مولکولی مانند PCR مسیری را برای شناسایی پاتوژن می گشاید که دارای 100% اختصاصیت و 99% حساسیت است. امروزه PCR به عنوان روشی استاندارد برای تشخیص ویروس هرپس سیمپلکس در عفونت های سیستم عصبی مرکزی مورد استفاده قرار می گیرد. مطالعات سال‌های اخیر حاکی از آن است که تشخیص و ردیابی DNA ویروس هرپس سیمپلکس به ویژه در مایع نخاع (CSF) با استفاده از PCR یک روش حساس، اختصاصی برای تشخیص در مراحل اولیه بیماری به حساب می آید. این روش در مقایسه با بیوپسی مغزی 96 الی 98% حساس تر و 94 تا حدود 100% اختصاصی ارزیابی شده است(5). با این و جود هنوز به دلیل بهینه نبودن روش PCR و مشکلات خاص آن از روش های جایگزین و سنتی مانند کشت ویروس استفاده می گردد. یکی از مسائل مهم در بکارگیری روش PCR جهت تشخیص بالینی پاتوژن ها حضور یک کنترل داخلی (IC) به منظور تایید نهایی تست می باشد. بر خلاف کنترل مثبت خارجی، کنترل داخلی یک توالی غیر اختصاصی از DNA موجود در شرایط مشابه است که به طور همزمان با توالی هدف تکثیر می شود. در یک PCR بدون کنترل داخلی، پاسخ منفی به معنای نبود توالی هدف در واکنش تلقی می شود، درحالیکه ممکن است به دلیل باز داشته شدن واکنش ناشی از عملکرد نا صحیح ترموسایکلر، ترکیب نا صحیح واکنش دهنده ها ، فعالیت ضعیف DNA پلیمراز و یا حضور مواد باز دارنده در نمونه باشد. بلعکس در یک PCR که دارای کنترل داخلی است، همیشه یک باند کنترل ایجاد می شود، حتی هنگامیکه توالی هدف وجود ندارد این امر می تواند عدم موفقیت PCR را نمایان کند(6). استفاده از اینترنال کنترل، اطلاعات مهم و اساسی را در رابطه با وجود عوامل بازدارنده در یک تست منفی مشخص می کند. حضوراینترنال کنترل در تست های مولکولی PCR، اطمینان از نتیجه منفی صحیح را افزایش می دهد و باعث افزایش حساسیت تست PCR به عنوان بهترین روش مولکولی برای تشخیص سریع و زود هنگام ویروس هرپس سیمپلکس می شود(7). هدف از این مطالعه طراحی و بکارگیری یک کنترل داخلی جهت تست PCR تشخیصی ویروس هرپس سیمپلکس می باشد تا بتوان از آن بعنوان تست تاییدی با حساسیت و اختصاصیت بالا برای تشخیص HSV در نمونه های بالینی استفاده نمود.

روش بررسی

طراحی پرایمرهای HSV: در این مطالعه جهت بهینه نمودن تکنیک PCR، پرایمرهای خاص ژن DNA پلی‌مراز ویروس هرپس سیمپلکس به کمک نرم‌افزار موجود در سایت Invitrogen بصورت online طراحی گردید(9). توالی پرایمرهای طراحی شده به صورت LEFT PRIMER 5` ACCTACCGGCATACAAGCTCA 3` و RIGHT PRIMER 5` AAGTGGCTCTGGCCTATGTCC 3` می باشد.

استخراج DNA : برای دستیابی به DNA الگو کشت سلولهای آلوده به ویروس هرپس سیمپلکس(سلولهای vero در محیط RPMI) تهیه و DNA به کمک کیت DNP (سیناژن) استخراج گردید.

www.SID.ir
Archive of SID

واکنش PCR : مخلوط واکنش در حجم نهایی 25 میکرولیتر شامل 5 میکرولیتر DNA الگو ، 2/5 میکرولیتر از 10X PCR Buffer ، 1 میکرولیتر از هر یک از دو پرایمر جلویی و پرایمر عقبی (10mM)، 75 /0 میکرولیتر از $MgCl_2$ (50Mm) ، 0/5 میکرولیتر از dNTP (10 mM) ، 0/4 میکرولیتر Taq DNA polymerase (5u/µ l) صورت گرفت. پروتکل دمایی به صورت دناتوراسیون در دمای 93درجه به مدت 40 ثانیه و دمای چسبیدن 60 درجه به مدت 40 ثانیه و در نهایت پلی مریزاسیون در دمای 72 درجه به مدت 40 ثانیه به تعداد 40 سیکل انجام شد.

مشاهده محصول PCR: محصول PCR در ژل آگارز 1/5 درصد حاوی سایبر گرین (سیناژن)در بافر TBE 0.5X الکتروفورز گردید.

طراحی اینترنال کنترل: برای ساخت اینترنال کنترل قطعه ایی از ژن کینتوپلاست انگل لیشمانیا (620 bp) هدف قرار داده شد. به دو انتهای این قطعه، دو قطعه اضافی که مکمل پرایمرهای متصل شونده به ژنوم ویروس HSV است اضافه شد که منجر به تولید یک قطعه 662 bp گردید(14). پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه اینترنال کنترل، پرایمرهای مرکب (42 جفت بازی) هستند که از اتصال پرایمرهای جلویی و عقبی مربوط به ویروس هرپس سیمپلکس به پرایمرهای جلویی و عقبی مربوط به ژن کینتوپلاست انگل لیشمانیا *L. major* (P strain) تشکیل شده اند(14-13). بدین صورت که در انتهای 3′ پرایمر تکثیری HSV توالی پرایمر تکثیری لیشمانیا قرار گرفت. توالی پرایمرهای جلویی و عقبی کینتوپلاست لیشمانیا و HSV جهت ساخت پرایمر مرکب برای تکثیر اینترنال کنترل در جدول 1 آمده است.

جدول 1: توالی پرایمرهای تکثیری کینتوپلاست لیشمانیا و HSV جهت ساخت پرایمر مرکب برای تکثیر ICHSV

Kinetoplast-F	5′ -TCG-CAG-AAC-GCC-CCT-ACC- 3′	18bp
Kinetoplast-R	5′ -AGG-GGT-TGG-TGT-AAA-ATA-GGC- 3′	21bp
HSV-F	5′ -ACC-TAC-CGG-CAT-ACA-AGC-TCA- 3′	21bp
HSV-R	5′ -AAG-TGG-CTC-TGG-CCT-ATG-TCC- 3′	21bp

واکنش PCR اینترنال کنترل: به منظور تهیه اینترنال کنترل واکنش PCR با پروفایل حرارتی ذیل صورت گرفت. دناتوراسیون در دمای 93 درجه سانتی گراد به‌مدت 40 ثانیه، دمای چسبیدن 55 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه، پلیمریزاسیون در دمای 72 درجه سانتی گراد به‌مدت 30 ثانیه و به تعداد 40 سیکل، و پلیمریزاسیون نهایی در دمایی 72 درجه سانتی گراد و به مدت 10 دقیقه.

تهیه پلاسمید حاوی IC: محصول PCR بدست آمده در وکتور pTZ57R به کمک کیت TA Cloning فرمنتاس کلون گردید. پلاسمید حاوی اینسرت (به کمک کیت Bioneer) استخراج شد. از پلاسمید بدست آمده ، به روش سریال دایلوشن رقتهای 10^{-1}، 10^{-2} ، 10^{-3}و 10^{-4} تهیه گردید و به کمک تست PCR مورد ارزیابی قرار گرفت تا بهترین رقت بعنوان رقت اینترنال کنترل بهینه مورد استفاده قرار گیرد.

بهینه نمودن تست PCR به همراه IC : جهت بررسی حساسیت روش PCR برای HSV به همراه اینترنال کنترل از DNA هرپس سیمپلکس ویروس رقت تهیه شد. برای این منظور از نمونه با تیتر معین یک میلیون پارتیکل ویروس که از بخش ویروس شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود، رقت های ۱۰۰،۰۰۰، ۱۰،۰۰۰، 1000، 100 و 10 پارتیکل ویروس تهیه سپس رقتهای مختلف DNA با مقدار IC بهینه شده مورد بررسی قرار گرفت.

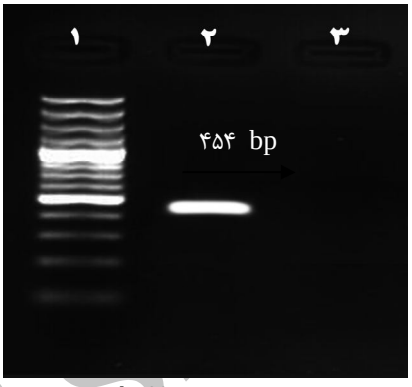
کلونینگ محصول IC: محصول PCR اینترنال کنترل با کمک کیت TA کلونینگ (فرمنتاس) در وکتور pTZ57R کلون شد. پس از انجام مراحل کلونینگ، برروی محیط LB-Agar حاوی IPTG، X-Gal و آمپی سیلین کشت داده شد. کلنی های سفید جدا شده حاوی pICHSV برروی محیط LB-Agar کشت انبوه داده شدند سپس مراحل استخراج پلاسمید برروی کلنی های رشد کرده صورت گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

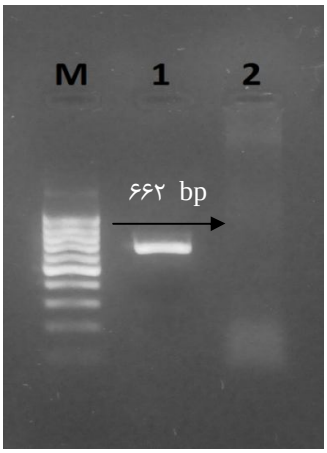
یافته ها

محصول تست PCR بهینه شده توسط پرایمرهای اختصاصی دارای 454 جفت باز می باشد که در شکل 1 نشان داده شده است.



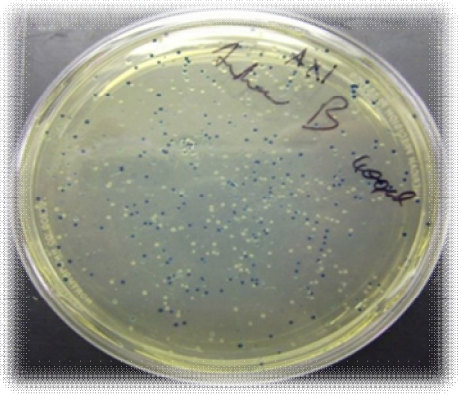
شکل 1. ستون 1 : سایز مارکر 100 bp (Fermentas فنلاند) ، ستون 2 : کنترل مثبت (هرپس سیمپلکس)، ستون 3 : کنترل منفی (ژل آگارز 1.5% و بافر TBE 0.5x).

محصول PCR قطعه تکثیر یافته اینترنال کنترل به کمک پرایمرهای مرکب 662 bp طول داشت (شکل 2).



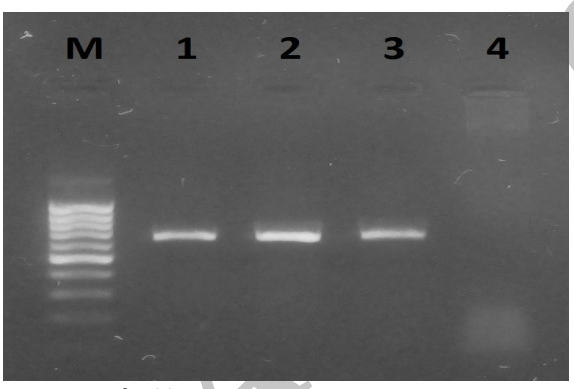
شکل 2. ستون M: سایز مارکر 100 bp plus (Fermentas فنلاند) ، ستون 1: محصول IC تکثیر شده، ستون 2: کنترل منفی.

پس از انجام مراحل کلونینگ کلنی های سفید و آبی برروی محیط کشت در شکل 3 نشان داده شده است.



شکل 3. کلنی های سفید حاوی قطعه IC مورد نظر کلنی های آبی فاقد قطعه

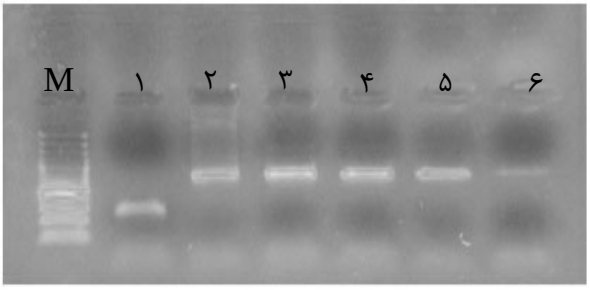
3 کلنی از کلنی های سفید انتخاب گردید سپس توسط روش boiling پلاسمید استخراج شد. هر 3 کلنی بوسیله تست PCR، و با استفاده از پرایمر های HSV بررسی گردید. همانطور که در شکل 4 مشاهده می گردد، هر 3 کلون دارای محصول IC بوده اند.



شکل 4. ستونM: سایز مارکر 100 bp plus (Fermentas فنلاند) ، ستون 1: محصول PCR با استفاده از DNA های بدست آمده از کلنی 1، 2: محصول PCR با استفاده از DNA های بدست آمده از کلنی 2، 3: محصول PCR با استفاده از DNA های بدست آمده از کلنی 3، 4: کنترل منفی.

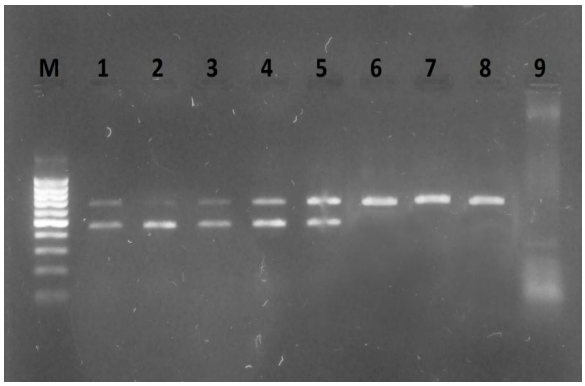
بهترین نتیجه تست PCR برای IC با رقتهای مختلف پلاسمید در رقت 10^{-3} که معادل 1000 عدد از DNA ی پلاسمیدی pICHSV داشت دیده شد.

www.SID.ir



شکل 5. M: سایز مارکر 100 bp plus (Fermentas) فنلاند) ، ستون1: 454 bp HSV DNA، ستون2: DNA پلاسمیدی pICHSV (Net)، ستون3: رقت 1-10، ستون4: رقت 2-10، ستون 5: رقت 3-10، ستون 6: رقت 4-10.

حساسیت تست PCR همراه با pICHSV با رقت های مختلف DNA هرپس سیمپلکس از حداقل 100 پارتیکل تا یک میلیون پارتیکل ویروس مثبت پاسخ داد، در صورتی که با رقت های 1 و 100 پارتیکل ویروس واکنش صورت نگرفت(شکل 6). بنابراین طیف پاسخ IC بین 100 تا ده میلیون پارتیکل ویروس ارزیابی شده است.



شکل 6. ستون M: سایز مارکر 100 bp plus (Fermentas) فنلاند) ، ستون 1:کنترل مثبت حاوی HSV DNA و pICHSV، ستون 2: حاوی DNA ی ده میلیون پارتیکل ویروس و 1000 عدد پلاسمید pICHSV، ستون 3: حاوی DNA ی یک میلیون پارتیکل ویروس و 1000 عدد پلاسمید pICHSV، ستون 4: حاوی DNA ی ده هزار پارتیکل ویروس و 1000 عدد پلاسمید pICHSV ، ستون 5: حاوی DNA ی 100 پارتیکل ویروس و 1000 عدد پلاسمید pICHSV ، ستون 6: حاوی DNA ی 50 عدد پارتیکل ویروس و 1000 عدد پلاسمید pICHSV ، ستون 7: حاوی DNA ی 5 پارتیکل ویروس و 1000 عدد پلاسمید pICHSV ، ستون 8: حاوی DNA ی 1000 عدد پلاسمید pICHSV ، ستون 9: کنترل منفی(ژل آگاروز 1,5 درصد، بافر TBE 0.5X.

بحث

ویروس هرپس سمپلکس از جمله ویروس هایی است که انتشار جهانی دارد و به دلیل سهولت انتقال، هر ساله میزان قابل توجهی به تعداد افراد آلوده اضافه می گردد. این ویروس طیف وسیعی از بیماریها را در تنها میزبان طبیعی خود (انسان) ایجاد می کند. روشهای تشخیصی عفونت HSV به دو گروه متواتر و مولکولی تقسیم می شوند. روشهای متواتر شامل مشاهده مستقیم، کشت ویروس، سیتولوژیک، ویرولوژیک، مورفولوژیک، سرولوژیک و ایمونو مورفولوژیک و روشهای تشخیصی مولکولی به روشهای تکثیر هدف، روشهای تکثیر کاوشگر یا پروپ و روشهای تکثیر سیگنال تقسیم می شوند(8). رایج ترین و مهمترین روش از روش های تکثیر هدف، تکنیک PCR است که دارای مزایا و کاربردهای زیادی بخصوص در تشخیص عفونت های باکتریایی و ویروسی است (9). علیرغم تمام مزایا، PCR نیز دارای معایب و مشکلات خاص خود می باشد(18). کاربست PCR از آزمایشگاه های تحقیقاتی به آزمایشگاهای تشخیصی با موانعی مانند نبود استانداردهای بین المللی مواجه بوده و این امکان وجود دارد که نتایج حاصل از یک آزماشگاه با آزمایشگاه دیگر تفاوت داشته باشد(10).

یکی دیگر از مشکلات PCR علی رغم حساسیت بالای این سنجش بروز نتایج منفی کاذب است که عمدتا به علت حضور مهارکننده ها می باشد. به نظر می رسد بروز نتایج منفی کاذب به علت وجود مقدار زیاد بازدارنده در نمونه های کلینیکی از جمله مایع پلورال، مایع مغزی- نخاعی(CSF)، خون محیطی و خلط می باشد(11). فاکتورهای دیگری غیر از بازدارنده ها مانند پایین بودن غلظت DNA هدف، نقص در عملکرد ترمال سایکلر، عدم واکنش صحیح DNA پلی مراز و استخراج نا مناسب DNA نیز می توانند سبب ایجاد نتایج منفی کاذب شوند. به این ترتیب مشکل اساسی روشهای PCR شناخته شده، حتی آنهایی که امروزه استفاده می شود، نداشتن یک کنترل داخلی (IC) عنوان شده است. وجود کنترل داخلی در یک تست PCR استاندارد علاوه بر کنترل مثبت و منفی، از ضروریات ویژه ایی برخوردار است(12). بر خلاف کنترل مثبت خارجی، کنترل داخلی یک توالی DNA غیر هدف موجود در

Archive of SID
www.SID.ir

لوله مشابه است که به طور همزمان با توالی هدف تکثیر می شود. این DNA غیر هدف یا به صورت مصنوعی طراحی می شود و یا ژن خاصی را به عنوان کنترل داخلی هدف قرار می دهد. یکی از راه های ساخت کنترل داخلی روش رقابتی است که در این روش می توان از DNA خارجی استفاده نمود که از پرایمرهای یکسانی برای تکثیر DNA کنترل داخلی و DNA هدف استفاده می کند. در صورتی که برای ساخت کنترل داخلی از DNA غیر هدف موجود در نمونه استفاده شود باید از جفت پرایمر های متفاوتی برای تکثیر IC و DNA هدف استفاده نمود که روش اتخاذ شده غیر رقابتی نام دارد و از آنجایی که پرایمرهای تکثیری متفاوتی طراحی گشته است به طور واضح بین DNA های کنترل داخلی و هدف برای اتصال به پرایمر ها رقابتی وجود ندارد. در هر دو روش رقابتی و غیر رقابتی حساسیت و اعتبار PCR به علت بکارگیری کنترل داخلی و تمایز نتایج منفی کاذب و واقعی افزایش می یابد(18). نتایج منفی کاذب برای تشخیص هرپس سیمپلکس، خطر بزرگی برای توسعه PCR به عنوان یک متد تشخیصی استاندارد جهت تشخیص HSV در نمونه های مرضی به شمار می آید. با توجه به این مطالب هدف از این مطالعه طراحی PCR همراه با IC رقابتی برای ممانعت از ایجاد نتایج منفی کاذب ناشی از بازدارنده ها می باشد(13). در این مطالعه ساخت کنترل داخلی جهت تشخیص صحت انجام PCR ویروس هرپس سیمپلکس به صورت رقابتی و با بکارگیری پرایمرهای مرکب انجام شد. قسمتی از ژن کینتوپلاست (bp 620) DNA لیشمانیا جهت ساخت IC استفاده شد(14). پرایمرهای تکثیری HSV دنباله ی پرایمر های تکثیری DNA لیشمانیا قرار گرفته و پرایمر مرکب (composite primer) را به وجود آورد. به علت اختلاف اندازه ی مناسب این دو محصول (IC= 662 bp , HSV DNA= 454 bp) تمایز هر دو محصول حاصل شده بر روی ژل آگارز کاملا مشهود می باشد. در سال Fordany 1996 و Belak استفاده از یک مولکول استاندارد را به عنوان معیاری برای نمایان سازی درستی واکنش و آشکار ساختن خطاها پیشنهاد کردند. در این مطالعه یک متد سریع و آسان پیشنهاد گردید. در این سنجش برای شناسایی DNA ویروس bovine leukemia (FIPV-RT-PCR) از روش تکثیر cDNA استفاده شد. برای ساخت IC از یک DNA غیر متجانس که قسمتی از ژن بتا-آکنین انسانی (beta-acin) بود، استفاده گردید و مولکول اینترنال کنترل mimic نامیده شد که دارای جایگاهای اتصال پرایمر یکسانی با DNA ویروس هدف بود. در این سنجش 5 تا 20 مولکول کنترل داخلی در تکثیر همزمان استفاده گردید(15). در سال 2004، Burggraf و Olgemoller برای نمایان ساختن نتایج منفی کاذب و افزایش دقت تکنیک real-time PCR، شروع به ساخت IC الیگونوکلئوتیدی که شامل پرایمر و جایگاه اتصال پروب DNA هدف بود، نمودند. در این مطالعه IC برای MTBC ساخته شد که این IC الیگونوکلئوتیدی مستقیما به نمونه ها قبل از استخراج DNA اضافه شد. تعداد مناسب IC در تمامی تست ها 60 تا 625 کپی در هر واکنش تعیین شد و این رقت IC برای حداقل 25 و حداکثر 5000 کپی در هر واکنش مورد تایید قرار گرفت. در این مطالعه دو پروب نشان دار متفاوت هدف و IC را از هم متمایز می سازد(16). Dingle و همکارانش در همین سال تحقیقی برای ساخت IC غیر رقابتی از جنس RNA را برای Reverse Transcriptase PCR جهت تشخیص 9 ویروس تنفسی آغاز نمودند. این IC از ژنوم تغییر یافته ی ویروس هپاتیت دلتا بود که ساختار غیر معمول آن باعث افزایش مقاومت و پایداری در مقابل نوکلئازها می شود و این امر مزیتی برای استفاده از آن به عنوان IC محسوب می شد. برای تکثیر IC و ژنوم ویروس های مختلف از پرایمر های متفاوت استفاده شد که موید غیر رقابتی بودن آمپلیفیکاسیون بود. میزان کنترل داخلی استفاده شده در این مطالعه 10 فمتو گرم تعیین گشت. حساسیت تست بین 10 تا 100 مولکول RNA در هر واکنش بود. آمپلیکون IC (761 bp) از آمپلیکون تمام 9 ویروس های هدف بزرگتر طراحی شده بود(17). استفاده از پرایمر های یکسان برای کنترل داخلی و هدف یک مزیت محسوب می شود زیرا ست های چندگانه از پرایمر های ممکن است با تکثیر یک یا هر دو ژن های هدف به دلیل تفاوت در توالی پرایمر ها تداخل پیدا کند. تفاوت در سایز، توالی های داخلی محصولات تکثیر شده و نسبت مقادیر دو DNA همچنین ممکن است با تکثیر DNA هدف تداخل پیدا کند. بنابراین در یک تست تشخیصی مبتنی بر PCR علاوه بر نمونه، کنترل مثبت، کنترل منفی و کنترل فاقد DNA نیاز به یک کنترل داخلی نیز دارد(12). در سال 2010، Jing chen و همکارانش در مرکز تحقیقاتی مواد غذایی آمریکا در مطالعه ای برای ممانعت از نتایج منفی کاذب در شناسایی *salmonella enterica* و *salmonella typhimorium* توسط real-time PCR کنترل داخلی رقابتی را طراحی نمودند. پروب IC توسط کنار هم قرار دادن

Archive of SID
www.SID.ir

تصادفی سکانس های پروب هدف و یک الیگونوکلئوتید تک زنجیره ساخته شد و IC ساخته شده برای 40 نمونه *salmonella.spp* 100% اختصاصی عمل نمود. مقدار IC در هر واکنش 44,2 f/g تعیین شد. و حداقل DNA موجود در هر واکنش 41,2 fg/PCR از *S.typhimorium* و 18,6 fg/PCR از *S.enteric* تعیین گشت(18). در این مطالعه نیز با استفاده از روش خاص در جهت ساخت کنترل داخلی برای تست تشخیص HSV PCR، یک کنترل داخلی جدید طراحی گردید(15و 18). در این مطالعه طراحی یک کنترل داخلی با کیفیت با استفاده از یک قطعه DNA خارجی برای ارزیابی تمامی مراحل PCR از استخراج تا تکثیر توسط دستگاه PCR و حتی شناسایی محصول PCR پرداخته شد. این مطالعه نشان داد که PCR همراه با کنترل داخلی یک تکنیک ایده آل برای شناسایی و تشخیص نمونه های منفی واقعی به حساب می آید. بدین وسیله نمونه های حاوی کنترل داخلی لازم به آنالیز و بررسی دوباره ندارند که حذف مراحل اضافی و حتی تکرار تست باعث کاهش در هزینه و اتلاف وقت خواهد شد. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می دهد که کنترل داخلی ساخته شده برای تکثیر همزمان با DNA ویروس هرپس سیمپلکس بدون کاهش محدوده ی تشخیصی PCR، مناسب خواهد بود. در این تحقیق، حداقل مقدار IC که برای رقابت با DNA هدف و همچنین حداقل میزان DNA هدف قابل شناسایی با آزمودن نمونه هایی که دارای مقدار مشخصی از DNA هدف بودند را محاسبه و تعیین گردید. تست تشخیص PCR ویروس هرپس سیمپلکس همراه با کنترل داخلی تکثیری طراحی شده، می تواند باعث افزایش چشم گیر اعتبار و دقت آن در شناسایی ویروس در نمونه های مرضی شود(18و21). در یک سنجش تشخیصی، کنترل داخلی همیشه باید ایجاد یک نتیجه PCR مثبت کند که طبیعتاً نشان دهنده آن خواهد بود که نتیجه منفی حاصل شده، واقعی می باشد و ناشی از مهار PCR نبوده است. کنترل داخلی همچنین می تواند مؤید صحت مراحل استخراج نوکلئیک اسید، تکثیر و تشخیص محصول PCR باشد. نتایج این بررسی نشان می دهد که کاربرد IC در تست های تشخیص PCR هرپس سمپلکس ویروس، حساسیت تست را با توانمند کردن محقق برای تشخیص افزایش می دهد و امکان شناسایی تست های باز داشته شده و تست دوباره نمونه هایی که PCR را مهار می کنند را می دهد(19). به علاوه نتیجه مثبت سیگنال IC ، نشانگر این است که تکثیر اتفاق افتاده و بنابراین این اطمینان را به وجود می آورد که نتایج منفی تست هرپس سیمپلکس حقیقتا منفی هستند. بنابراین در یک تست تشخیصی مبتنی بر PCR علاوه بر وجود نمونه کنترل مثبت و کنترل منفی نیاز به وجود یک کنترل داخلی نیز می باشد. اگرچه یک کنترل داخلی فقط یک شناساگر خطای PCR است و خودش به تنهایی هیچ اثری در برابر فاکتور های مهار کننده ندارد12). معهذا، در این تحقیق با استفاده از PCR ساده سعی بر این شد که برای شناسایی نتایج منفی کاذب در تشخیص هرپس سیمپلکس ویروس یک کنترل داخلی رقابتی طراحی شود که به اعتبار و حساسیت تست بیفزاید. همچنین امکان استفاده از آن تقریباً در تمام آزمایشگاه‌های تشخیص طبی در مرکز استانها وجود دارد.

نتیجه گیری

در این مطالعه از روش رقابتی با بکارگیری تکنیک های پرایمر مرکب و کلونینگ برای ساخت کنترل داخلی تست PCR هرپس سیمپلکس استفاده گردید. در این روش به دلیل یکسان بودن پرایمر ها، میان کنش بین آنها وجود نداشته که خود مزیت این روش می باشد. بنابراین در این مطالعه با طراحی و ساخت کنترل داخلی سعی بر استانداردسازی روش PCR در تشخیص HSV گردیده است.

تشکر و قدردانی

از اساتید و مسئولان دانشگاه آزاد اسلامی تهران شرق(قیامدشت) و همینطور موسسه دانش بنیان ایرانیان ژن فناور که به صور مختلف پیشبرد این پژوهش را یاری نمودند تشکر و قدردانی می شود.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Franzenröhl E, Tiveljunglindell A, Grillner E. *Increased detection vate in diagnosis of herpes simplex virus type2 meningitis by real-time PCR using cerebrospinal fluid samples.* American Society for Microbiology.2007; 45: 2516-2520.
2. Koelle DM, Corey L. *Herpes simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. A*nnual Review of Medicine. 2008; 59: 381–95.
3. Graclabardecia PD, Jose'pana M. *Value of the Polymerase Chain reaction in the diagnosis of herpes infections of the nervous in the diagnosis of herpes infections of the nervous system.* Enfermedades Infrcciosasy Microbiolagia. Clinica. 2004; 22: 150-155.
4. Nicoll S, Brass A, Cubie HA. *Detection of herpes viruses in clinical samples using real time PCR.* J. Virological Methods. 2001; 96: 25-31.
5. Ratman S, Severini A, Zahariadis G, Romanowski PB. *The diagnosis of genital herpes-beyond culture: An eridence-Bansed- guide for the utilization of polymerase Chain reaction and herpes Simplex virus type-specific serology.* Con J. Infect Dis Med Microbial. 2007; 18: 233-240.
6. Jiunrong S, Yidong W, Meiting C, Shiqiang S. *Rapid diagnosis of herpetic encephalitis in Children by PCR-microarray technology for Simultaneous detection of seven human herpes viruses.* Springer- Verlag. 2010; 169: 421-425.
7. Thomas FS, James RU, Mark JE, Lynne MS, Emily AV. *Development, implementation, and trend analysis of real-time PCR tests for the Clinical microbiology laboratory.* Clinical Microbiology Newsletter. 2004; 26:145-153.
8. Shahhosseiny MH. *Basic Molecular diagnosis.* Publisher: Islamic azad University. 2005; pp: 12-35.
9. Faulkner S, Smith A. *A Prospective diary study of the role of psychological stress and negative mood in the recurrence of herpes simplex virus (HSV1).* Stress Health. 2009; 25: 179-187.
10. Athmanathan S, Preanesh VM, Pasricha G, Garg P. *A typical herpes Simplex keratitis presenting as a perforated corneal ulcer with a large infiltrate in a contact lens wearer: multinucleated giant cells in the Giemsa smear offered a clue to the diagnosis.* BMC Ophthalmology. 2001; 1:12-19.
11. Elizabeth CH, Rosa DS. *Internal Control in PCR for Mycobacterium tuberculosis: Usefulness and Improvement of the Diagnosis.* Braz. arch. biol. Technol. 2008; 51:685-691.
12. Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood NA, Wagner M, Fach P. *Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays.* J. Clin. Microbiol. 2004; 42; 1863-1868.
13. Stephane B, Anne MK, Francoise P, Catherine C, Michel V, Jocelyne F. *Detection of Aspergillus Species DNA in Bronchoalveolar Lavage Samples by Competitive PCR.* J. Clin. Microbiology. 1995; 33:1164-1168.
14. Mahboudi F, Abolhassan M, Yaran M, Mobtaker H, Azizi M. *Identification and differentiation of Iranian Leishmania species by PCR amplification of kDNA.* J Infect Dis. 2001; 33:596-598.
15. Ballagi AB, Belák S. *The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR.* Molecular and cellular probes. 1996; 10: 159-164.
16. Siegfried B, Bernhard OL. *Simple Technique for Internal Control of Real-Time Amplification Assays.* Clinical Chemistry.2004; 50: 819-825.
17. Dingle KE, Crook D, Jeffery K. *Stable and Noncompetitive RNA Internal Control for Routine Clinical Diagnostic Reverse Transcription-PCR.* J. Clin. Microbiology.2004; 42: 1003-1011.
18. Jing CH, Lida ZH, George CP, Chunlei SH, Shu IT, Xianming SH. *A real-time PCR method for the detection of Salmonella enterica from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis.* International Journal of Food Microbiology. 2010; 137: 168–174.
19. Cubero J, van der W, J van B, López M. *An internalcontrol for the diagnosis of crowngall by PCR.* The Journal of Mirobiological Methods. 2002; 51: 387-392.

Archive of SID

www.SID.ir

20. Kate ET, Sitha AS, Matthias FC, Aloys C M, Eric CJ. *Rapid and Sensitive Method Using Multiplex Real-Time PCR for Diagnosis of Infections by Influenza A and Influenza B Viruses, Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Viruses 1, 2, 3, and 4.* Clinical Chemistry.2004; 42: 1564-1569.
21. Maurice R, Zhuang W. *An Internal Control for Routine Diagnostic PCR: Design, Properties, and Effect on Clinical Performance.* J. Clin. Microbiol.1998; 36: 191-197

Archive of SID

www.SID.ir