Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۴، شماره۵ (شماره پیاپی ۵۸)، آذر و دی ۱۳۹۰، ۱۰-۱

راه اندازی و به کارگیری یک روش Multiplex Real-time RT-PCR حساس برای تشخیص همزمان ویروس نقص ایمنی انسانی نوع ۱ و ویروس هپاتیت C در نمونه‌های پلاسما

مهدی پریان[1*]، مهدیه موندنی‌زاده[2]، سمیرا محمدی یگانه[1]، بهزاد خوانساری نژاد[3]

۱- دانشجوی دکترای بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۲- گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۳- دانشجوی دکترای ویروس‌شناسی پزشکی، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۸ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۸

چکیده

زمینه و هدف: ویروس نقص ایمنی انسانی نوع ۱ و ویروس هپاتیت C از جمله مهم‌ترین عوامل عفونی منتقل شونده از طریق خون محسوب می‌شوند و از این رو تشخیص صحیح، دقیق و حساس این ویروس‌ها در افراد آلوده و خون‌های اهدایی از اهمیت بسیاری برخوردار است. به علت وجود برخی از محدودیت‌های روش‌های سرولوژیک در تشخیص این عوامل عفونی، هدف این مطالعه استفاده از روش‌های مولکولی سریع و حساس همچون Real-time PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، یک روش Multiplex Real-time PCR خانگی بر مبنای استفاده از رنگ SYBR GreenI راه اندازی شد که در آن با استفاده از آنالیز منحنی ذوب می‌توان عفونت منفرد و یا هم زمان ویروس نقص ایمنی انسانی نوع ۱ و ویروس هپاتیت C را در نمونه‌های پلاسمای بیماران شناسایی نمود. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد

یافته‌ها: نتایج به دست آمده از انجام واکنش‌های مختلف بر روی چندین نمونهٔ بالینی نشان داد که حساسیت تجزیه‌ای (آنالیتیکی) روش راه اندازی شده برای ویروس نقص سیستم ایمنی نوع ۱ معادل ۲۰۰ کپی در هر میلی لیتر ۲۰۰ و برای ویروس هپاتیت C برابر ۱۰۰ کپی در هر میلی لیتر است. به علاوه نشان داده شد که پرایمرهای طراحی شده برای هر ویروس هیچ‌گونه واکنش متقاطعی با یکدیگر و سایر عوامل مداخله گر ندارند.

نتیجه گیری: با توجه به سطح حساسیت و ویژگی مناسب، کاربرد آسان، هزینه نسبتاً کم و آنالیز سریع نمونه‌ها، این روش می‌تواند یک روش سریع و مناسب برای تشخیص موثر و آسان ویروس نقص ایمنی انسانی نوع ۱ و ویروس هپاتیت C در نمونه‌های پلاسما باشد.

واژگان کلیدی: ویروس هپاتیت، و ویروس نقص ایمنی انسانی نوع۱، مالتیپلکس، Real-time PCR، SYBR Green

***نویسنده مسئول:** تهران، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

Email: mparyan@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ویروس نقص ایمنی انسانی نوع ۱(HIV-1 - Human Immonodeficiency Virus-1) به عنوان عامل اتیولوژیک بیماری ایدز، و ویروس هپاتیت C(Hepatitis CVirus-HCV) به عنوان یکی از مهم‌ترین ویروس‌های ایجاد کننده هپاتیت، از جمله مهم‌ترین عوامل عفونی منتقل شونده از طریق خون محسوب می‌شوند. از اینرو تشخیص سریع و مناسب آنها در افراد مبتلا دارای اهمیت فراوانی است. به علاوه حصول اطمینان از سلامت خون و فراورده‌های خونی، به منظور پیش‌گیری از انتقال این ویروس‌ها، از جمله اولویت‌های اصلی هر سازمان انتقال خون در جهان محسوب می‌شود(۱، ۲). به علت وجود راه‌های انتقال مشترک، عفونت همزمان با ویروس‌های HIV-1 و HCV نیز رخ می‌دهد و شیوع آن در برخی از گروه‌های اجتماع از جمله معتادان تزریقی، بیماران همودیالیزی، مبتلایان به هموفیلی و بیماران تالاسمی زیاد است. تخمین زده می‌شود که در حدود ده میلیون نفردر سرتاسر جهان دارای عفونت همزمان HIV-1 و HCV هستند(۳). در یک مطالعه بر روی ۴۹۹ معتاد تزریقی در شهر تهران، شیوع عفونت همزمان HIV-1 و HCV، ۲۴درصد تخمین زده شده است(۴). در مطالعهٔ دیگری در استان لرستان عفونت همزمان HIV-1 و HCV، ۱۴/۵ درصد تخمین زده شده است(۵). عفونت همزمان HCV در افراد HIV-1 مثبت، منجر به افزایش خطر هپاتوتوکسیسیتی ناشی از درمان ضد ویروسی با فعالیت بالا شده و از جمله علل مهم مرگ و میر این بیماران محسوب می‌شود. و در مقابل عفونت همزمان HIV-1 منجر به کاهش احتمال پاک شدن خود به‌خود افراد دارای HCV و افزایش احتمال ابتلا به سیروز کبدی و کارسینوم هپاتوسلولار می‌شود(۳،۶). علاوه بر عفونت همزمان، به علت ضعف در روش‌های درمانی و فقدان واکسیناسیون مؤثر، عفونت منفرد هر یک از عوامل عفونی فوق نیز یک مشکل بهداشتی جدی محسوب می‌شود. بنابراین تشخیص به هنگام، دقیق و صحیح بیماران دارای عفونت با ویروس‌های HIV-1 و HCV از اهمیّت بسزایی برخوردار است(۷).

در حال حاضر روش‌های سرولوژی متداول‌ترین روش تشخیص ویروس‌های HIV-1 و HCV محسوب می‌شوند که جهت تشخیص اولیهٔ افراد و غربال‌گری خون‌های اهدایی استفاده می‌گردند. تشخیص سرولوژی HIV-1 با استفاده از آنتی‌ژن P24 وآنتی بادی‌های تولید شده بر علیه آن صورت می‌گیرد و در تشخیص سرولوژی HCV، عمدتاً از آنتی‌بادی‌های تولید شده بر علیه آنتی‌ژن نوترکیب پروتئین هسته استفاده می‌شود، البته استفاده از آنتی ژن‌های NS3، NS4 و NS5 این ویروس نیز در تولید کیت‌های تشخیصی کاربرد دارد(۸). با وجود حساسیت بالای تست‌های سرولوژی، به کارگیری این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد. از جمله مهم‌ترین محدودیت‌های روش‌های سرولوژی عدم تشخیص موارد عفونی در دورهٔ پنجره یعنی زمانی که هنوز شاخص‌های ایمنولوژیک بیمار بالا نرفته است می‌باشد(۹، ۱۰). در عفونت با ویروس HIV-1، فاصلهٔ زمانی بین ایجاد عفونت و تغییر سرمی معمولاً ۲۲ روز است ولی در برخی از مبتلایان می‌تواند تا بیش از ۳ ماه نیز به‌طول انجامد(۱۱) و در عفونت با ویروس HCV این فاصلهٔ زمانی طولانی‌تر و حدود ۹ تا ۱۲ هفته است(۷، ۱۱). از اینرو روش‌های سرولوژی در طی دورهٔ حاد عفونت قادر به شناسایی افراد مبتلا نمی‌باشند. یکی از محدودیت‌های دیگر روش‌های سرولوژی این است که به‌علت وجود آنتی‌بادی مادری، امکان ارزیابی عفونت در نوزادان متولد شده از مادران HCV یا HIV-1 مثبت میسّر نیست. علاوه براین، در ارزیابی عفونت ناشی از HCV محدودیت‌های دیگری نیز وجود دارد. ازجمله این که امکان تمایز افراد دارای عفونت فعال و افراد کاملاً بهبود یافته از بیماری، که دارای آنتی‌بادی IgG ضد HCV می‌باشند، با استفاده از روش‌های ایمنولوژیک وجود ندارد. بنابراین استفاده از روش‌های تکثیر اسید نوکلئیک (Nucleic Acid Testing،NAT) برای تشخیص HIV-1 و HCV بسیار مورد توجه قرار گرفته است(۱۴-۱۲). با

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از روش NAT تشخیص عوامل عفونی فوق در زمانی زودتر از روش‌های سرولوژی امکان‌پذیر است. روش‌های NAT توانایی شناسایی عفونت HCV را در حدود ۵۰ تا ۶۰ روز زودتر از روش‌های سرولوژی موجود میسّر می‌سازند(۱۱، ۱۵). به علاوه به علت حساسیت و ویژگی آنالیتیک بالاتر، همواره از NAT ها به عنوان روش تأییدی مناسب برای نتایج مثبت تست‌های سرولوژی استفاده شده است. از جمله کاربردهای دیگر NAT این است که با استفاده از آن‌ها می‌توان افراد بهبود یافته سرم مثبت و افراد دارای عفونت مزمن هپاتیت C را از یکدیگر تمایز داد و نیز عفونت را در نوزادان HIV-1 و HCV مثبت ارزیابی نمود(۱۱).

در میان روش‌های ملکولی مختلف که برای تشخیص عوامل عفونی ویروسی استفاده می‌شوند، روش‌های PCR و Real-time PCR به علت حساسیت و ویژگی بسیار مناسب، سهولت، قابلیت اتوماسیون و امکان بررسی نمونه‌ها در حجم انبوه، از مقبولیت بیشتری برخور دارند(۱۸-۱۶). البته با وجود این که مزیت‌ها و کارایی بسیار زیاد این روش‌ها در غربالگری افراد و خون‌های اهدایی کاملاً به اثبات رسیده و در برخی از کشورهای غربی نیز استفاده می‌شود، به علت هزینهٔ بالای آنها در بسیاری از کشورهای دنیا، در مقایسه با روش‌های سرولوژی، امکان استفاده از PCR برای تشخیص اولیه و غربالگری خون در سطح وسیع مورد پذیرش قرار نگرفته است و روش‌های PCR و Real-time PCR کیفی تنها به تشخیص تأییدی و تشخیص موارد خاص محدود باقی مانده‌اند(۱۹). یکی از مهم‌ترین راه‌کارهایی که همواره به منظور کاهش هزینه‌های روش‌های ملکولی در نظر گرفته می‌شود، استفاده از روش‌های چندگانه یا Multiplex، برای تشخیص هم زمان بیش از یک عامل عفونی در یک واکنش است(۲۰، ۲۱). در روش‌های چندگانه با استفاده از اجزا و مواد مورد نیاز برای یک واکنش مولکولی و تنها با افزودن الیگونوکلئوتیدهای بیشتر، امکان شناسایی بیش از یک عامل عفونی در نمونهٔ مورد نظر فراهم می‌گردد. که این مزیت علاوه بر صرفه‌جویی در منابع مالی منجر به صرفه‌جویی در زمان نیز می‌شود(۱۹).

از این رو این مقاله به معرفی یک آزمون Multiplex Real-time RT-PCR خانگی بر مبنای روش SYBR GreenI به همراه آنالیز منحنی ذوب می‌پردازد که با استفاده از آن امکان تشخیص و تمایز کارآمد دو ویروس HIV-1 و HCV در نمونه‌های پلاسمای بیماران به طور هم زمان و با حساسیت و ویژگی مناسب، فراهم گشته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعهٔ آزمایشگاهی در مجموع از ۵۵ نمونهٔ پلاسمای مختلف استفاده شد. این نمونه‌ها شامل ۲۰ نمونهٔ دارای عفونت هم‌زمان HIV-1 و HCV، ۵ نمونهٔ HIV مثبت و HCV منفی، ۵ نمونهٔ HCV مثبت و HIV منفی، و ۲۵ نمونهٔ HIV-1 و HCV منفی از افراد سالم بودند. لازم به ذکر است که صحت وضعیت تمامی نمونه‌های منفی، مثبت و دارای عفونت هم زمان به وسیلهٔ روش‌های سرولوژی تعیین شده بود و با یک روش RT-PCR معتبر نیز مورد تأیید مجدد قرار می‌گرفت.

به منظور طراحی پرایمرهایی که قادر به شناسایی سویه‌های مختلف ویروس‌های HIV-1 و HCV باشند، از توالی ژن Pol از ژنوم HIV-1 و ناحیهٔ 5`-UTR از ژنوم HCV استفاده شد، که این نواحی از مناطق حفاظت شدهٔ ژنوم این دو ویروس محسوب می‌شوند. به بیان دیگر توالی سویه‌های مختلف این دو ویروس از پایگاه نوکلئوتیدی NCBI به دست آمدند، سپس توسط هم ردیفی چندگانهٔ (Multiple Alignment) توالی‌ها بوسیلهٔ نرم افزار MEGA4، نواحی حفاظت‌شدهٔ مربوط به هر یک از توالی‌های Pol و 5`-UTR تعیین شد و در نهایت پرایمرها با استفاده از نرم افزار AlleleID 7 طراحی شدند(جدول۱).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه جهت تشخیص ویروس‌های HIV-1 و HCV

نام پرایمر	توالی پرایمرها	ناحیهٔ مورد تکثیر	اندازهٔ محصول PCR
HIV-1 Forward	5`-GTACAGTGCAGGGGAAAG-3`	Pol	۱۵۶bp
HIV-1 Reverse	5`-CCAGAGIAGYTTTGCTG-3`		
HCV Forward	5`-CATGGCGTTAGTATGAGTG-3`	5`-UTR	۲۱۶bp
HCV Reverse	5`-CTATCAGGCAGTACCACAAG-3`		

تمامی نمونه‌های خون افراد در تیوب‌های حاوی ضد انعقاد اتیلن دی آمین تترااستیک اسید جمع‌آوری شدند. سپس پلاسمای نمونه‌ها در مدت زمانی کمتر از ۴ ساعت از نمونه‌گیری، به وسیلهٔ سانتریفوژ ۲۵۰۰دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه جدا و تا زمان مصرف در فریزر ۷۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. استخراج RNA های ویروسی با استفاده از کیت استخراج RNA ویروسی(شرکت رش آلمان) از ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما و بر اساس دستورالعمل کیت صورت گرفت. واکنش نسخه‌برداری معکوس در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و با استفاده از آنزیم M-MuLV، انجام شد (جدول۲).

جدول۲. پروتکل واکنش نسخه برداری معکوس و تولید cDNA با استفاده از آنزیم M-MuLV

۱ میکروگرم	RNA استخراج شده
۱۰پیکومول	پرایمر اختصاصی الگو
تا ۱۲ میکرولیتر	آب تیمار شده با DEPC
انکوباسیون در دمای ۷۰ °C به مدت ۵ دقیقه و انتقال سریع تیوب حاوی اجزای فوق بر روی یخ	
۴ میکرولیتر	RT-Reaction Buffer(5x)
۰/۵میکرولیتر(۲۰واحد)	RNase Inhibitor
۲میکرولیتر(۱میلی مول)	dNTP Mix (10 mM each)
۲میکرولیتر(۴۰واحد)	M-MuLV Reverse Transcriptase
۲۰میکرولیتر	Final Volum
انکوباسیون در دمای ۴۲ °C به مدت ۶۰ دقیقه	
توقف واکنش در دمای ۷۰ °C به مدت ۱۰ دقیقه	

پس از بهینه سازی اجزاء، واکنش‌های Real-time PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل: ۵ میکرولیتر cDNA، بافر1XPCR (شرکت کیاژن،آلمان)، ۲/۵ میلی‌مول کلرید منیزیوم، ۰/۴ میکرومول از هر یک از پرایمرهای HIV-1 و HCV، ۲۰۰ میکرومول از مخلوط نوکلئوتیدها، ۲ میکرولیتر محلول ۱/۱۰۰۰ SYBR GreenI(شرکت رش،آلمان)، ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز، ۳۰۰ نانوگرم محلول آلبومین سرم گاوی و آب تا رساندن به حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد. برنامه دمایی تکثیر به صورت واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و به‌دنبال آن ۴۰ چرخهٔ سه مرحله‌ای شامل: واسرشت شدن در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه داده شد. قرائت سیگنال فلورسانس در انتهای مرحله طویل سازی صورت می گرفت. در پایان سیکل‌های تکثیر، آنالیز منحنی ذوب با افزایش تدریجی دما از دمای ۶۰ درجه سانتیگراد تا ۹۵ درجه سانتیگراد به میزان ۰/۵ °C/s صورت گرفت. لازم به ذکر است که تمامی واکنش‌ها در دستگاه روتور-ژن ۳۰۰۰ (کوربت-استرالیا) انجام شد و تحلیل نتایج به وسیلهٔ نرم افزار کوربت ۶.۱.۲ صورت گرفت.

برای تعیین ویژگی تجزیه‌ای(آنالیتیکی) روش تشخیصی، علاوه بر بررسی صحت اتصال اختصاصی پرایمرها به الگوی مورد نظر در پایگاه NCBI nucleotide BLAST، از ۱۰ نمونهٔ مختلف ژنوم انسان و برخی از ویروس‌های منتقل شونده از طریق خون استفاده شد و به منظور تعیین ویژگی کلینیکی از ۲۵ نمونهٔ منفی، که عدم وجود HIV-1 و HCV در آنها با استفاده از روش‌های سرولوژی و ملکولی تجاری معتبر تأیید شده بود، استفاده شد.

برای تعیین حساسیت تجزیه‌ای(آنالیتیکی) از دو نمونهٔ دارای عفونت HCV و HIV-1 استفاده شد. به طوری که میانگین تعداد کپی نمونهٔ دارای HIV-1 و HCV مثبت، حاصل از سه بار کمیت سنجی مجزا به وسیلهٔ کیت‌های تشخیص مولکولی هپاتیت C و ویروس نقص سیستم ایمنی

www.SID.ir

Archive of SID

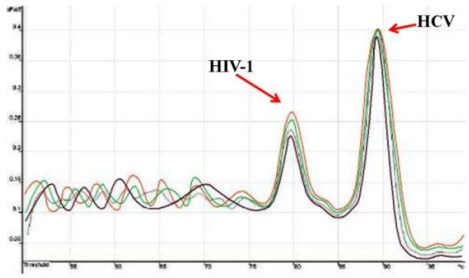
نوع ۱ (آرتوس آرجی)، به ترتیب ۱۵۰۴۱۹۷ و ۳۷۰۹۲۸۰ کپی در میلی‌لیتر بود. با استفاده از این نمونه‌ها و یک نمونه پلاسمای منفی، رقت‌های ۱۰۰۰ کپی در میلی‌لیتر، ۵۰۰ کپی در میلی‌لیتر ، ۲۰۰ کپی در میلی‌لیتر و ۱۰۰ کپی در میلی‌لیتر از هر یک از ویروس‌های HIV-1 و HCV تهیه شد. سپس از هر رقت هشت تکرار (چهار تکرار در دو روز مختلف) مورد استخراج RNA قرار گرفت و به وسیلهٔ روش راه اندازی شده بررسی شدند تا پایین‌ترین رقت قابل اندازه‌گیری از نمونه‌ها توسط روش راه اندازی شده تعیین گردد.

جهت تعیین حساسیت کلینیکی در مجموع از ۴۰ نمونهٔ مثبت استفاده شد. که شامل ۲۰ نمونهٔ به دست آمده از بیماران دارای عفونت همزمان HIV-1 و HCV، و ۲۰ نمونهٔ مثبت دست‌ساز که از مخلوط کردن سرم بیماران دارای عفونت منفرد با نمونه‌های سرم منفی حاصل شده بودند.

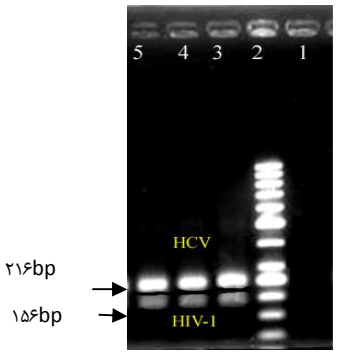
برای بررسی حساسیت و ویژگی کلینیکی از فرمول‌های مربوطه استفاده شد. و هم‌چنین برای بررسی تکرار پذیری نتایج کمیت سنجی کنترل‌ها از ضریب تغییرات Ct های واکنش‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 16 استفاده شد.

یافته‌ها

در واکنش مالتیپلکس SYBR GreenI Real-time PCR، تکثیر توالی‌های اختصاصی ویروس‌های HIV-1 و HCV ، بر مبنای دمای ذوب منحصر به فرد آنها، به راحتی قابل تمایز شدند. وجود منحنی ذوب در محدودهٔ دمایی ۷۹/۷ درجه سانتیگراد، نشانگر تکثیر توالی مربوط به ویروس HIV-1 است و مشاهده منحنی ذوب در محدودهٔ ۸۹ درجه سانتیگراد، بیانگر تشخیص ویروس HCV می‌باشد(شکل ۱). نتایج تکثیر مالتیپلکس بر روی ژل آگارز ۲ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم برماید(۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) الکتروفورز شد و باندهایی به طول ۱۵۶ bp و ۲۱۶ bp به دست آمد که به ترتیب بیانگر تکثیر ویروس‌های HIV-1 و HCV بودند.



شکل۱ . نمودار منحنی ذوب حاصل از تکثیر دو نمونه دارای عفونت همزمان HIV-1 و HCV



شکل۲. الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲٪
ردیف۱. کنترل منفی، ردیف ۲. مارکر اندازه bp ۵۰، ردیف ۵-۳ .محصول PCR نمونه‌های مالتیپلکس

همان طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، حساسیت آنالیتیکی (آستانه تشخیص) روش طراحی شده در حالت مالتیپلکس برای HIV-1 و HCV به ترتیب ۲۰۰ کپی در میلی لیتر و ۱۰۰ کپی در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

جدول۳. تعیین حساسیت آنالیتیکی واکنش مالتیپلکس دارای غلظت‌های مشابه ژنوم HCV و HIV-1

تعداد موارد مثبت HCV	HCV (کپی در میلی‌لیتر)	تعداد موارد مثبت HIV-1	HIV-1(کپی در میلی‌لیتر)
۸/۸	۱۰۰۰	۸/۸	۱۰۰۰
۸/۸	۵۰۰	۸/۸	۵۰۰
۸/۸	۲۰۰	۸/۸	۲۰۰
۸/۸	۱۰۰	۵/۸	۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

از آنجایی که ممکن است حساسیت آنالیتیکی یک واکنش مالتیپلکس به وسیلهٔ غلظت هر یک از الگوها تحت تأثیر قرار گیرد، در مرحلهٔ دوم تعیین حساسیت آنالیتیکی هر یک از رقت‌های ۱۰۰۰کپی در میلی‌لیتر، ۵۰۰ کپی در میلی‌لیتر ، ۲۰۰ کپی در میلی‌لیتر و ۱۰۰ کپی در میلی‌لیتر از هر ویروس در حضور رقت بالای(10^5 کپی در میلی‌لیتر) ویروس دیگر مورد بررسی قرار گرفت. وجود رقت بالای ویروس دیگر در حساسیت آنالیتیکی تعیین شده برای هریک از ویروس‌ها اثری ندارد و همچنان مقادیر ۲۰۰ کپی در میلی‌لیتر برای HIV-1 و ۱۰۰ کپی در میلی‌لیتر برای HCV، به عنوان آستانهٔ تشخیص در نظر گرفته می‌شود(جدول۴).

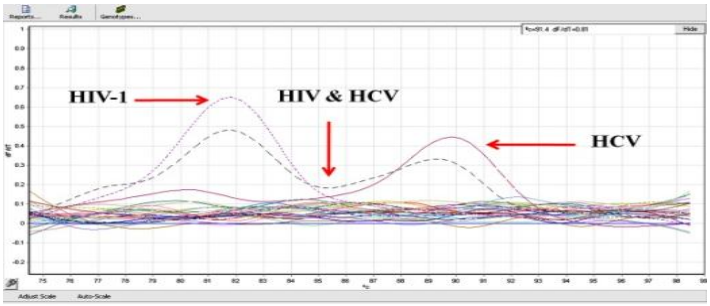
جدول۴.تعیین حساسیت آنالیتیکی واکنش مالتیپلکس دارای غلظت‌های مختلف ژنوم HCV و HIV-1

تعداد موارد مثبت HCV	HCV(کپی در میلی‌لیتر)	تعداد موارد مثبت HIV-1	HIV-1(کپی در میلی‌لیتر)
۸/۸	۱۰۰۰	۸/۸	10^5
۸/۸	۵۰۰	۸/۸	10^5
۸/۸	۲۰۰	۸/۸	10^5
۸/۸	۱۰۰	۸/۸	10^5
۸/۸	10^5	۸/۸	۱۰۰۰
۸/۸	10^5	۸/۸	۵۰۰
۸/۸	10^5	۸/۸	۲۰۰
۸/۸	10^5	۳/۸	۱۰۰

به منظور بررسی حساسیت کلینیکی در مجموع ۴۰ نمونهٔ دارای عفونت هم زمان HIV-1 و HCV مورد ارزیابی قرار گرفتند. از این تعداد ۲۰ نمونه به طور دستی و با مخلوط کردن سرم بیماران دارای عفونت منفرد با نمونه‌های سرم منفی حاصل شده بودند. لازم به ذکر است که در فرایند تهیهٔ ۲۰ نمونه دست‌ساز تلاش شد که تعداد کپی هر یک از ویروس‌ها حداکثر یک لگاریتم بالاتر از حساسیت آنالیتیکی روش باشد. به عبارت دیگر تعداد کپی ویروس HIV-1 حداکثر ۲۰۰۰ کپی در میلی‌لیتر و تعداد کپی ویروس HCV نیز زیر ۱۰۰۰ کپی در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد، تا از این طریق بتوان توانایی روش راه اندازی شده در شناسایی نمونه‌های دارای تعداد کپی کم ویروسی را به چالش کشید.

با استفاده از روش طراحی شده ۳۹ نمونه از چهل نمونه برای هر دو ویروس HIV-1 و HCV مثبت شد و یک نمونه نتیجهٔ مثبت را تنها برای HCV نشان داد. از این رو حساسیت کلینیکی روش مالتیپلکس راه اندازی شده معادل ۹۷/۵ درصد در نظر گرفته شد.

برای تعیین ویژگی آنالیتیکی روش تشخیصی، در مرحلهٔ اول صحت اتصال پرایمرها به توالی‌های مخصوص به خود و عدم اتصال آنها به توالی‌های غیر مرتبط و مداخله‌گر در پایگاه NCBI nucleotide BLAST مورد تأیید قرار گرفت. در مرحلهٔ بعد با استفاده از ۱۰ نمونهٔ مختلف ژنوم انسان و برخی از ویروس‌های منتقل شونده از طریق خون، از جمله ویروس‌های هپاتیتB، ویروس لوسمی سلول T انسانی نوع ۱(HTLV-1)، TTV، ویروس پارو ویروسB19، ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱(HSV-1) ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲ ،HHV-6، HHV-7، HCMV، و ویروس اپشتین بار(EBV) برای انجام آزمون استفاده شد. روش مالتیپلکس به کار گرفته شده، تنها قادر به شناسایی توالی‌های HIV-1 و HCV است و پرایمرهای واکنش در حالت بهینه شده با ژنوم انسان و هیچ یک از ویروس‌های فوق واکنش نمی‌دهد(شکل۳).



شکل۳. تعیین ویژگی آنالیتیکی واکنش با استفاده از ژنوم عوامل مداخله کننده احتمالی.

www.SID.ir

Archive of SID

به منظور تعیین ویژگی کلینیکی واکنش مالتیپلکس بر روی ۲۵ نمونهٔ منفی، که عدم وجود HIV-1 و HCV در آنها با استفاده از روش‌های سرولوژی و ملکولی تجاری معتبر تأیید شده بود، انجام شد. و در هیچ یک از موارد نتیجهٔ مثبتی مشاهده نشد. از این‌رو ویژگی روش راه اندازی شده معادل ۱۰۰درصد برآورد گردید.

بحث

تاکنون چندین روش مالتیپلکس برای تشخیص هم زمان HIV-1 و HCV شامل روش‌های PCR به همراه نسخه‌برداری معکوس(RT-PCR)، آزمون‌های تکثیر با واسطه نسخه‌برداری(Transcription–Mediated Amplification) و روش آمپلی نات ام پی ایکس معرفی شدند(۲۲-۱۱ ، ۲۴). با وجود این که این روش‌ها دارای حساسیت بالایی هستند، اما معمولاً قادر به تمایز مستقیم ویروس‌های هدف نمی‌باشند و بنابراین برای تمایز محصولات نیازمند مراحل دیگری پس از سیکل‌های تکثیر هستند. در مقابل روش Real-time RT-PCR دارای مزایای زیادی از جمله حساسیت بسیار زیاد، سرعت زیاد و عدم نیاز به مراحل پس از تکثیر، کاهش احتمال آلودگی ناشی از محصولات تکثیر، قابلیت انجام واکنش‌ها در حجم انبوه و کاربری آسان و تکرار پذیر واکنش‌ها می‌باشد. کاندوتی و همکاران یک روش Multiplex Real-time PCR برای تشخیص هم زمان سه ویروس HBV، HCV و HIV-1 ارائه نمودند که بر مبنای پروب TaqMan و استفاده از سه سیگنال فلئورسانس مختلف عمل می‌کند(۱۹). اگرچه این روش دارای حساسیت مناسبی می‌باشد، ولی نسبت به روش SYBR GreenI بسیار پر هزینه بوده و این موضوع کاربرد این روش را به عنوان یک روش غربالگری معمول تا حدی دچار مشکل می‌نماید. در پژوهشی مشابه دکریگنیس و همکاران یک روش Real-time RT-PCR SYBR GreenI بر مبنای آنالیز منحنی ذوب ارائه نمودند که قادر است دو ویروس HIV-1 و HCV را از یکدیگر در نمونه‌های لکه‌های خون خشک شده متمایز کند که حساسیت آنالیتیکی این روش در نمونه‌های لکه‌های خون خشک شده برای HIV-1 ۴۰۰کپی در میلی‌لیتر و برای HCV تقریباً ۲۵۰۰ کپی در میلی‌لیتر بوده که در این مورد چنین حساسیتی چندان مناسب به نظر نمی‌رسد(۲۵). در مطالعه گیبلینی با استفاده از آنالیز منحنی ذوب در واکنش SYBR GreenI Real-time PCR عفونت همزمان ویروس‌های HCV و HIV-1 را در نمونه‌های پلاسما با حساسیت ۵۰۰ کپی در میلی‌لیتر شناسایی نمود. پرایمرهای HIV-1 و HCV در آن واکنش به ترتیب برای ژن‌های gag و ناحیهٔ 5`-UTR ژنوم این ویروس‌ها طراحی شده بود(۲۶).

در مقالهٔ حاضر نیز مراحل راه‌اندازی و تأیید یک روش Multiplex Real-time RT-PCR برای تشخیص هم زمان RNA ویروس‌های HIV-1 و HCV در نمونه‌های پلاسما شرح داده شد. این روش قادر است با حساسیتی مناسب، در زمانی اندک و بر اساس آنالیز منحنی ذوب ویروس‌های فوق را از یکدیگر متمایز کند. به منظور طراحی پرایمرهای این واکنش، از هم ردیفی چندگانه نواحی ژنوم این دو ویروس استفاده شد، که بیشترین درجهٔ حفاظت شدگی را در بین ایزوله‌های مختلف دارا هستند. براساس نتایج BLAST و بررسی واکنش بر روی عوامل احتمالی مداخله کننده، از جمله DNA های استخراج شده از ۱۰ نمونه انسانی متفاوت و نیز ژنوم ۱۰ نوع ویروس منتقل شونده از طریق خون، نشان داده شد که پرایمرهای طراحی شده، و به بیان دیگر کل روش، تنها قادر به شناسایی ویروس‌های HIV-1 و HCV است و هیچ گونه واکنشی با ژنوم انسانی و سایر عوامل ویروسی ندارد. حساسیت آنالیتیکی این روش برای HIV-1 و HCV به ترتیب ۲۰۰ کپی در میلی‌لیتر و ۱۰۰ کپی در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. همان گونه که در جدول ۴ نشان داده شده، وجود غلظت بالای ویروس دیگر اگرچه اندکی از حساسیت واکنش مالتیپلکس می‌کاهد(بخصوص در غلظت‌های کم HIV-1) ولی تأثیری در حساسیت آنالیتیکی تعیین شده در محدوده‌های مذکور ندارد. به منظور محاسبهٔ حساسیت آنالیتیکی، از ویروس‌هایی

www.SID.ir

Archive of SID

با تعداد کپی مشخص استفاده شد که از نمونه‌های بیماران HIV-1 و HCV مثبت رقیق شده بودند. در این مورد برای به حداقل رساندن خطا در محاسبهٔ تعداد کپی اولیه نمونه‌های بیماران از میانگین حاصل از سه بار کمیت سنجی مجزا، توسط کیت‌های تجاری معتبر، در سه روز مختلف استفاده شد. لازم به ذکر است که در طی این سه بار کمیت سنجی، ضریب تغییرات آستانه سیکل‌های(cycle threshold) حاصله برای هر ویروس همواره کمتر از ۵ درصد بود که این مسئله مؤید تخمین نسبتاً تکرار پذیر تعداد کپی نمونه‌های اولیه است. با بررسی بر روی ۴۰ نمونهٔ HIV-1 و HCV مثبت و ۲۵ نمونهٔ افراد سالم، حساسیت و ویژگی کلینیکی این روش به ترتیب ۹۷/۵ و ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. یکی از نکات قابل توجه در محاسبهٔ حساسیت کلینیکی تعیین شده در این است که دست کم ۲۰ نمونه از ۴۰ نمونهٔ مثبت دارای عفونت هم زمان، دارای تعداد کپی کم (حداکثر یک لگاریتم بیشتر از حساسیت آنالیتیکی) از ویروس‌های HIV-1 و HCV در خود هستند و این بیانگر توانایی روش راه اندازی شده در تشخیص بیمارانی با تعداد کپی کم ویروس‌های فوق در پلاسمای خود است، که البته این مسئله در تشخیص عوامل عفونی مهمی همچون HIV-1 و HCV بسیار حائز اهمیت می‌باشد

نتیجه‌گیری

این روش علاوه بر داشتن حساسیت و ویژگی بالا، دارای کاربری آسان، سرعت زیاد و قیمت تمام شده مناسبی نیز می‌باشد که مجموع این ویژگی‌ها باعث می‌شود که بتوان از آن به عنوان یک روش برای تشخیص سریع هم زمان یا منفرد ویروس‌های HIV-1 و HCV در آزمایشگاه‌های تشخیصی و واحدهای غربالگری خون بهره گرفت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات همه همکاران محترم بویژه جناب آقای دکتر سیامک میراب سمیعی مسئول بخش ملکولی بیمارستان دی و جناب آقای دکتر کیهان آزادمنش رئیس بخش ویروس شناسی انستیتو پاستور ایران، که در تهیهٔ نمونه و رهنمودهای علمی ما را یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1. Allain JP, Stramer SL, Carneiro-Proietti AB, Martins ML, Lopes da Silva SN, Ribeiro M, et al. Transfusion-transmitted infectious diseases. Biologicals. 2009 Apr;37(2):71-7.
2. Traineau R, Elghouzzi MH, Bierling P. [Update on infectious risks associated with blood products]. Rev Prat. 2009 Jan 20;59(1):86-9.
3. Thomas DL. The challenge of hepatitis C in the HIV-infected person. Annu Rev Med. 2008;59:473-85.
4. Hosseini M, Seyedalinaghi S, Kheirandish P, Esmaeli Javid G, Shirzad H, Karami N, et al. Prevalence and correlates of co-infection with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in male injection drug users in iran. Arch Iran Med. 2010 Jul;13(4):318-23.
5. Mohammadi M, Talei G, Sheikhian A, Ebrahimzade F, Pournia Y, Ghasemi E, et al. Survey of both hepatitis B virus (HBsAg) and hepatitis C virus (HCV-Ab) coinfection among HIV positive patients. Virol J. 2009;6:202
6. Nelson KE, Thomas DL. Reciprocal interaction of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. Clin Diagn Lab Immunol. 2001 Sep;8(5):867-70.
7. Busch MP, Kleinman SH. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors. Transfusion. 2000;40:143-59.
8. Lemon SM, Walker C, Alter MJ, Yi M. Hepatitis C Virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1253-304.
9. Soldan K, Barbara JA, Ramsay ME, Hall AJ. Estimation of the risk of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus infectious donations entering the blood

www.SID.ir

Archive of SID

supply in England, 1993-2001. Vox Sang. 2003 May;84(4):274-86.
10. Widell A, Elmud H, Persson MH, Jonsson M. Transmission of hepatitis C via both erythrocyte and platelet transfusions from a single donor in serological window-phase of hepatitis C. Vox Sang. 1996;71(1):55-7.
11. Giachetti C, Linnen JM, Kolk DP, Dockter J, Gillotte-Taylor K, Park M, et al. Highly sensitive multiplex assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus RNA. J Clin Microbiol. 2002 Jul;40(7):2408-19.
12. Allain JP. Will genome detection replace serology in blood screening for microbial agents? Baillieres Best Pract Res Clin Haematol. 2000 Dec;13(4):615-29.
13. Reichelderfer PS, Coombs RW. Virologic parameters as surrogate markers for clinical outcome in HIV-1 disease: verification, variation, and validation. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1995;10 Suppl 2:S19–24.
14. Stramer SL, Caglioti S, Strong DM. NAT of the United States and Canadian blood supply. Transfusion. 2000 Oct;40(10):1165-8.
15. Gallarda JL, Dragon E. Blood screening by nucleic acid amplification technology: current issues, future challenges. Molecular Diagnosis. 2000;5:11-22.
16. Barbara JA, Garson JA. Polymerase chain reaction and transfusion microbiology. Vox Sang. 1993;64(2):73-81.
17. Kalland KH, Myrmel H, Nordbo SA. [Nucleic-acid based diagnostics in clinical microbiology]. Tidsskr Nor Laegeforen. 2005 Nov 17;125(22):3110-4.
18. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res. 2002 Mar 15;30(6):1292-305.
19. Candotti D, Temple J, Owusu-Ofori S, Allain JP. Multiplex real-time quantitative RT-PCR assay for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus type 1. J Virol Methods. 2004 Jun 1;118(1):39-47.
20. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. Clin Microbiol Rev. 200۰Oct;13(4):559-70.
21. Jackson BR, Busch MP, Stramer SL, AuBuchon JP. The cost-effectiveness of NAT for HIV, HCV, and HBV in whole-blood donations. Transfusion. 2003 Jun;43(6):721-9.
22. Adami V, Falasca E, Dorotea L, Malangone W, Astori G, Marini L, et al. Qualitative multiplex RT-PCR for simultaneous detection of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus in plasma samples. Clin Microbiol Infect. 2004 Dec;10(12):1075-80.
23. Vargo J, Smith K, Knott C, Wang S, Fang C, McDonough S, et al. Clinical specificity and sensitivity of a blood screening assay for detection of HIV-1 and HCV RNA. Transfusion. 2002 Jul;42(7):876-85.
24. Meng Q, Wong C, Rangachari A, Tamatsukuri S, Sasaki M, Fiss E, et al. Automated multiplex assay system for simultaneous detection of hepatitis B virus DNA, hepatitis C virus RNA, and human immunodeficiency virus type 1 RNA. J Clin Microbiol. 2001 Aug;39(8):2937-45.
25. De Crignis E, Re MC, Cimatti L, Zecchi L, Gibellini D. HIV-1 and HCV detection in dried blood spots by SYBR Green multiplex real-time RT-PCR. J Virol Methods. 2010 Apr;165(1):51-6.
26. Gibellini D, Gardini F, Vitone F, Schiavone P, Furlini G, Re MC. Simultaneous detection of HCV and HIV-1 by SYBR Green real time multiplex RT-PCR technique in plasma samples. Mol Cell Probes. 2006 Jun-Aug;20(3-4):223-9.

www.SID.ir