مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۰، شماره ۲: از ۴۳-۵۰
تابستان ۱۳۸۶

به‌کارگیری روش Real Time RT-PCR با استفاده از رنگ سایبرگرین به‌منظور سنجش کمی ویروس نقص سیستم ایمنی انسانی نوع یک (HIV-1) و مقایسه نتایج به‌دست آمده با نتایج حاصل از روش کوباس آمپلی کور

سعید عامل جامه‌دار[۱]، فرزانه صباحی[۲*]، مهدی فروزنده[۳]، محبوبه حاجی عبدالباقی[۴]، انوشیروان کاظم‌نژاد[۵]، رزیتا عدالت[۶]، مهرناز رسولی‌نژاد[۷]، فرزانه برخورداری[۸]، فریدون مهبودی[۹]

۱ـ دانشجوی دکتری تخصصی ویروس شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲ـ دانشیار، گروه ویروس شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳ـ دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴ـ دانشیار، گروه بیماری‌های عفونی، مرکز تحقیقات ایدز ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۵ـ استاد، گروه آمار زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۶ـ فوق لیسانس ویروس شناسی، بخش ویروس شناسی انستیتو پاستور تهران، ایران
۷ـ استاد، گروه بیماری‌های عفونی، مرکز تحقیقات ایدز ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۸ـ لیسانس، بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور، تهران، ایران
۹ـ دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۶/۸/۲۲ پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۱۵

چکیده

هدف: در این تحقیق روش Real Time RT-PCR با استفاده از رنگ سایبرگرین به‌منظور سنجش کمی ویروس نقص سیستم ایمنی انسانی نوع یک (HIV-1) راه‌اندازی شد.

مواد و روش‌ها: این آزمایش بر اساس تکثیر ناحیه ژن pol ویروس بوده و از دستگاه ترموسایکلر ABI 7500 استفاده شد. ۲۶ بیمار مبتلا به HIV-1 با این روش مطالعه شدند و سپس نتایج با آزمون تجارتی استاندارد کوباس آمپلی کور مونیتور تست (COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Test) مقایسه شد.

نتایج: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که این روش قادر به اندازه‌گیری حداقل ۵۰۰ کپی از HIV-1 RNA در هر میلی‌لیتر است. علاوه بر این، آزمایش در محدوده ۵-۵×۱۰^{۹} کپی از RNA ویروس در هر میکرولیتر خطی است. از آنجایی که در هیچ کدام از افراد کنترل هیچگونه علامت مثبتی نشان داده نشد، ویژگی این روش ۱۰۰ درصد محاسبه شد. اندازه‌گیری کمی HIV-1 در بیماران با استفاده از روش راه‌اندازی شده و روش استاندارد نشان داد که همبستگی بسیار خوبی بین دو روش وجود دارد (R^2=۰/۹۵).

نتیجه‌گیری: بر اساس آخرین اطلاعات موجود، شیوع HIV در جمهوری اسلامی ایران در یک وضعیت هشدار دهنده در حال افزایش است. از آنجایی که سطح پلاسمایی ویروس، مؤثرترین شاخص برای بررسی درمان بیماری است، اندازه‌گیری سطح پلاسمایی HIV-1 ابزار بسیار مهمی برای پیگیری فعالیت ویروس در افراد آلوده است. در این راستا راه‌اندازی و توسعه روش‌های اندازه‌گیری HIV-1 RNA ابزار منحصر به فردی است که به پزشک برای آگاهی از وضعیت درمان در بیمارانی که تحت درمان ضد رتروویروسی قرار گرفته‌اند کمک می‌کند. در این تحقیق روش SYBR-green Real Time RT-PCR را به‌منظور سنجش کمی HIV-1 در بیماران آلوده راه‌اندازی شد. از آنجایی که در این روش از RNA استاندارد سنتز شده استفاده شد، محدوده شناسایی بالادست در این روش بسیار بالاتر از روش استاندارد بود (۵×۱۰^{۹} در مقابل $۷/۵\times۱۰^{۵}$). بنابراین اگر نیازی به محدوده دینامیکی گسترده‌تری باشد- مانند موارد حاد بیماری- این استاندارد مفید خواهد بود. در این تحقیق تکرارپذیری در سطح درون سنجش (Intra assay) و بین سنجش (Inter assay) بررسی شد.

* **نشانی مکاتبه**: تهران، تقاطع بزرگراه جلال آل احمد و شهید چمران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس شناسی، صندوق پستی: ۳۳۱- ۱۴۱۱۵
E-mail: sabahi_f@modares.ac.ir

ضریب تغییرات Ct به‌دست آمده در آزمون تکرارپذیری درون سنجش و بین سنجش به ترتیب کمتر از ۳ و ٤/٥ درصد بود که نشان می‌دهد این روش تکرارپذیری بالایی دارد. با توجه به نتایج به‌دست آمده روش راه‌اندازی شده، می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش استاندارد در سنجش کمی HIV-1 باشد.

کلیدواژگان: ویروس نقص سیستم ایمنی انسانی نوع یک، سنجش کمی بار ویروسی، Real Time RT-PCR، COBAS Amplicor Monitor Test.

۱ـ مقدمه

بر طبق آمار وزارت بهداشت، گسترش ناگهانی عفونت ویروس نقص ایمنی انسان (Human Immunodeficiency Virus :HIV) در ایران در دهۀ هشتاد همراه با روند رو به افزایش آلودگی بوده و بنابراین کنترل و مهار این بیماری جزء مسایل کلان بهداشتی کشور تلقی می‌شود [۱]. در این راستا راه‌اندازی و استفاده از آزمون‌های تشخیصی سریع و دقیق و روش‌های پیشرفته مولکولی از اهمیت خاصی برخوردار شده است. این روش‌ها از یک طرف با تشخیص افراد و یا فراورده‌های آلوده، از گسترش عفونت و ایجاد بیماری جلوگیری می‌نماید و از طرف دیگر با اندازه‌گیری میزان ویروس (Viral load) در افراد آلوده، ضمن تعریف پیش آگهی بیماری، استفاده از روش‌های درمانی بر طبق استانداردهای جهانی را ممکن می‌سازد [۳،۲]. بررسی میزان ویروس HIV در سال‌های اخیر به‌طور بسیار گسترده‌ای مورد توجه محققین و متخصصین عفونی قرار گرفته است. بر طبق دستورالعمل‌های جدید تعیین تعداد کپی RNA ویروس نقص سیستم ایمنی، به‌عنوان شاخصی برای تشخیص عفونت حاد، پیش بینی احتمال انتقال ویروس، پیش‌بینی میزان پیشرفت بیماری در بیمارانی که به‌طور مزمن آلوده هستند، تأیید تصمیم به شروع درمان ضد رتروویروسی (Antiretroviral Therapy) و سرانجام برای ارزیابی تأثیر و کفایت درمان، استقبال شده است [٤-۷].

یکی از جدیدترین روش‌های سنجش کمی که در حال حاضر مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته روش‌های تشخیص محصول PCR در زمان واقعی (Real Time) است. سیستم‌های تشخیص در زمان واقعی، این امکان را فراهم می‌سازند که بتوان میزان اسید نوکلئیک تکثیر شده طی یک چرخه تا چرخۀ بعدی را اندازه‌گیری نمود. یک روش ساده برای دستگاه‌های مخصوص سنجش در زمان واقعی، استفاده از رنگ ویژۀ اتصال به DNA دو رشته‌ای، به نام سایبرگرین I (SYBR Green I) است. این رنگ به تمام رشته‌های DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود و در حالت اتصال یک علامت فلوئورسانس را با طول موج معین ساطع می‌کند. در طول واکنش PCR و با افزایش مقدار محصول، رنگ بیشتری متصل خواهد شد و میزان فلوئورسانس افزایش خواهد یافت. بنابراین میزان تکثیر را می‌توان طی زمان، از طریق اندازه‌گیری فلوئورسانس در هر چرخه بررسی کرد. هر چه تعداد کپی اولیۀ اسید نوکلئیک هدف بیشتر باشد، افزایش قابل توجه در فلوئورسانس زودتر مشاهده می‌شود [۹،۸].

در این تحقیق روش Real Time RT-PCR (Real Time Reverse Transcriptase-PCR) به‌منظور سنجش کمی ویروس نقص سیستم ایمنی انسانی نوع یک استفاده شد. در این روش از سایبرگرین به‌عنوان رنگ فلوئورسانس و از دستگاه ترموسایکلر ABI 7500 به‌عنوان سیستم شناسایی استفاده شد. سرانجام نتایج حاصل از این روش با نتایج حاصل از روش تجارتی استاندارد کوباس آمپلی‌کور مقایسه شد.

۲ـ مواد و روش‌ها

۲ـ۱ـ نمونه‌گیری و استخراج RNA ویروسی

با مطالعات آماری انجام گرفته ۲٦ بیمار مبتلا به HIV-1 مراجعه‌کننده به مرکز مشاوره بیماری‌های رفتاری واقع در بیمارستان امام خمینی و ۲۰ فرد سالم مطالعه شدند. پس از مشاوره اولیه و کسب رضایت‌نامه، نمونه خون افراد با استفاده از سرنگ‌های مخصوص تهیه شد. عفونت HIV در افراد آلوده با روش‌های الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay :ELISA) و وسترن بلات تأیید شد. RNA ویروسی با استفاده از کیت High pure viral RNA (Roche، آلمان) و بر طبق دستورالعمل مربوط استخراج شد.

۲ـ۲ـ آزمایش استاندارد کوباس آمپلی کور

روش تجارتی استاندارد برای سنجش کمی ویروس HIV-1، با نام کوباس آمپلی کور، بر طبق دستورالعمل کیت انجام شد. این آزمایش بر

اساس روش RT-PCR و تکثیر ناحیه P24 از ژن HIV gag استوار است. این آزمایش در محدوده $۷/۵\times۱۰^{۵}$ – ۴۰۰ کپی در هر میلی‌لیتر خطی است و نتایج سنجش ویروس در این محدوده معتبر است.

۲ـ۳ـ انتخاب آغازگر

حساسیت و ویژگی جفت آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی که استفاده شد در مطالعه قبلی بررسی شده بود [۱۰]. این آغازگرها در منطقه ژن HIV pol قرار دارند. واکنش تکثیری با این جفت آغازگر، محصولی به طول ۱۸۰ جفت باز تولید می‌کند. محل اثر آنزیم‌های برشی Hind III و Xba I به ترتیب به انتهای ´۵ آغازگرهای پایین دست و بالادست اضافه شد. توالی آغازگرهای بالادست و پایین دست عبارت است از:

HIVPOL 4505: 5'- AACAGGGCAGGAAACAGC -3'
HIVPOL 4686: 5'- TCTACTACTCCTTGACTTTGGGG -3'

۲ـ٤ـ کلون کردن قطعه هدف در پلاسمید (Plasmid) رونویسی کننده pSPT19

برای سنجش کمی RNA باید از مولکول‌های RNA به‌عنوان استاندارد استفاده کرد. HIV-1 RNA استاندارد که به صورت پانل‌های تجارتی موجود هستند، هزینه بسیار بالایی دارند. از طرف دیگر این پانل‌ها به راحتی در دسترس محققین قرار نمی‌گیرند. بنابراین به‌منظور سنجش کل مقادیر اسید نوکلئیک HIV-1، RNA استاندارد در آزمایشگاه ویروس شناسی (In-house) ساخته شد. این استاندارد با کلون کردن محصول PCR به داخل یک ناقل کلونینگ (Cloning vector) حاوی پروموتر (Promoter) آنزیم SP6 RNA Polymerase تهیه شد. به این منظور محصول PCR پس از خالص‌سازی با استفاده از کیت تجارتی Clean up (MN، آلمان)، با آنزیم‌های Hind III و Xba I بریده شد. واکنش برش آنزیمی به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. محصول برش آنزیمی مجدداً با استفاده از کیت تجارتی Clean up تخلیص شد. پلاسمیدpSPT19 نیز با دو آنزیم فوق برش داده شد و محصول هضم از روی ژل آگارز ۰/۸ درصد تخلیص شد. سپس محصول PCR و پلاسمید برش داده شده توسط آنزیم T4 DNA Ligase (BioLab، آلمان) به هم متصل شدند. واکنش الحاق به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انجام گرفت. پلاسمید نوترکیب حاصل به باکتری اشرشیاکلی گونه DH5α منتقل (Transform) شد و پس از تکثیر با استفاده از کیت استخراج پلاسمید در مقیاس زیاد (QIA Filter Plasmid Mega Kit (Qiagen، آمریکا) استخراج شد.

۲ـ۵ـ تولید HIV-1 RNA استاندارد

ساخت RNA استاندارد با استفاده از کیت SP6/T7 in vitro Transcription انجام شد. به‌منظور به‌دست آوردن RNA با طول یکسان و یکنواخت، پس از خطی کردن پلاسمید pSPT19 نوترکیب با آنزیم Hind III، واکنش رونویسی از روی پروموتر SP6 RNA polymerase موجود در پلاسمید به مدت ۱ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. این واکنش رونویسی مشتمل بر ۱ میکرو گرم از DNA پلاسمیدی نوترکیب، ۲۰۰ میلی مولار از مخلوط NTP، ۳۰ واحد آنزیم SP6 RNA polymerase و در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. پس از سنتز RNA، DNA پلاسمیدی با استفاده از DNase I در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه حذف شد. غلظت و خلوص RNA تولید شده با استفاده از اسپکتروفتومتر تعیین شد. سرانجام تعداد کپی RNA تولید شده با دانستن طول قطعه RNA محاسبه شد.

۲ـ٦ـ بررسی تکرارپذیری واکنش Real Time RT-PCR

به‌منظور بررسی تکرارپذیری روش راه‌اندازی شده، ابتدا رقت‌های سریال از استاندارد تولید شده تهیه کرده و تکرارپذیری درون سنجش (در چاهک‌های مختلف و همزمان) و همچنین تکرارپذیری بین سنجش (در روزهای مختلف) بررسی شد.

۲ـ۷ـ سنجش کمی HIV-1 با استفاده از روش SYBR-green Real Time RT-PCR

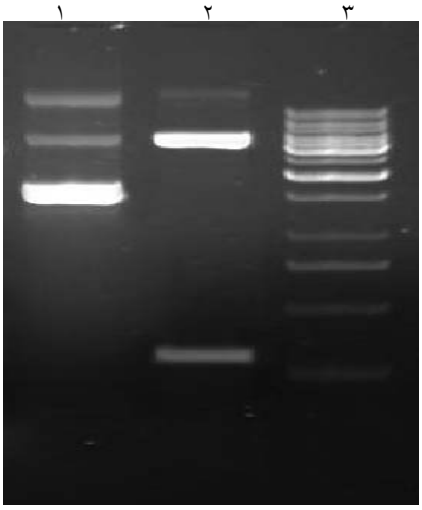
به این منظور از کیت SYBR-green Real Time RT-PCR (Qiagen، آمریکا) استفاده شد. واکنش تکثیر و آنالیز اطلاعات توسط سیستم ABI 7500 انجام شد. این آزمایش روی ۲٦ بیمار آلوده به HIV-1 انجام شد. برای رسم منحنی استاندارد ۵ غلظت مختلف از RNA استاندارد (۵×۱۰^{۵}–۵ کپی در هر میکرولیتر) انتخاب شد. طبق دستورالعمل کیت، واکنش تکثیری در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که مشتمل بر ۱۲/۵ میکرولیتر از محلول اصلی (Master Mix)، ۰/۵ میکرولیتر از محلول RT (RT Mix)، ۲۰۰ نانومولار از هر آغازگر و ۱۰ میکرولیتر از RNA استخراج شده یا از رقت‌های سریال

RNA استاندارد. لازم به ذکر است که آغازگرهای مورد استفاده برای بیماران فاقد محل آنزیمی در انتهای ´۵ بودند. واکنش تکثیری بر طبق الگوی دمائی زیر انجام شد: واکنش نسخه برداری معکوس در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، فعال‌سازی آنزیم Taq Polymerase شروع داغ (Hot start) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و سپس ٤۰ چرخه شامل: ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه. در انتهای چرخه‌های تکثیر، منحنی دمای ذوب به‌منظور بررسی اختصاصی بودن قطعه تکثیر یافته رسم شد.

۳ـ نتایج

۳ـ۱ـ کلون کردن محصول PCR درون پلاسمید رونویسی کننده pSPT19

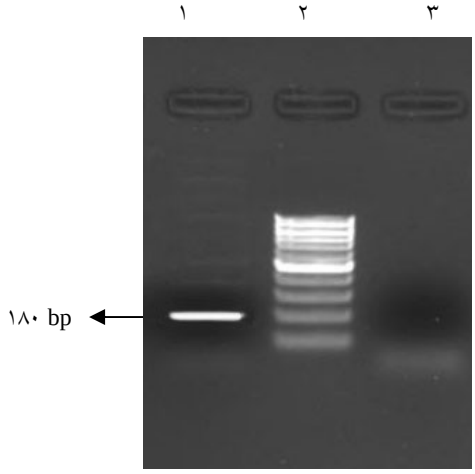
همان‌طور که قبلاً اشاره شد، محصول PCR و نیز پلاسمید pSPT19 با آنزیم‌های Hind III و Xba I بریده شده و واکنش الحاق و منتقل کردن آن به باکتری اشرشیاکلی گونه DH5α انجام شد.



شکل ۱ تأیید الحاق قطعه مورد نظر درون پلاسمید pSPT19 به کمک برش آنزیم Bam HI.

چاهک ۱ مربوط به پلاسمید برش نیافته؛ **چاهک ۲** مربوط به تأیید وجود قطعه مورد نظر درون پلاسمید با خروج قطعه bp ۳۰۰؛ **چاهک ۳** مربوط به نشانگر bp DNA ۱۰۰۰

پس از استخراج پلاسمید نوترکیب، صحت انجام واکنش الحاق، با روش PCR و برش آنزیمی تأیید شد. وجود باند ۱۸۰ جفت بازی در محصول PCR (شکل ۱) و نیز باند ۳۰۰ جفت بازی در روش هضم آنزیمی با آنزیم Bam HI (شکل ۲) نشان دهنده موفقیت واکنش الحاق است.



شکل ۲ تأیید الحاق قطعه مورد نظر درون پلاسمید pSPT19 با PCR.

چاهک ۱ مربوط به محصولPCR؛ **چاهک ۲** مربوط به نشانگر bp۱۰۰۰ DNA؛ **چاهک ۳** مربوط به کنترل منفی

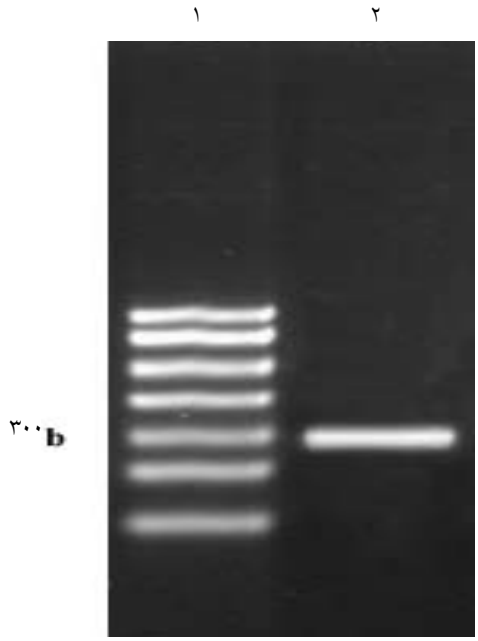
۳ـ۲ـ تولید RNA استاندارد به‌منظور سنجش کمی HIV-1 RNA

پس از خطی کردن پلاسمید نوترکیب و تولید RNAهای هم اندازه، حذف DNA پلاسمیدی انجام شد. به‌منظور بررسی RNA تولید شده ابتدا در شرایط عاری از RNase، باند مربوط روی ژل آگارز ملاحظه شد (شکل ۳). سپس غلظت و خلوص آن با استفاده از اسپکتروفوتومتر به مقدار $۱۰^{۱۳}$ کپی از RNA تولید شده در هر میکرولیتر تعیین شد. RNA تولید شده در میکرولوله‌های (Microtubes) عاری از نوکلئاز تقسیم شد و تا زمان استفاده در تانک ازت مایع (دمای ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد.

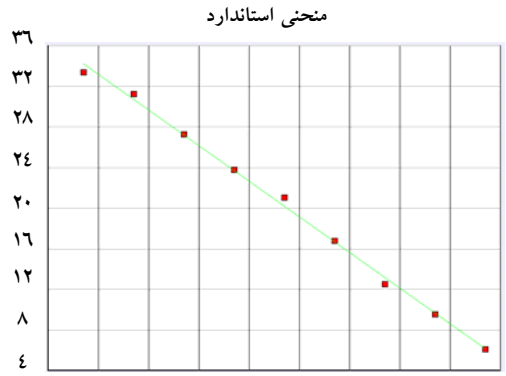
۳ ــ ۳ــ ارزیابی حساسیت و ویژگی روش SYBR-green Real Time RT-PCR

همان‌طور که در شکل ٤ نشان داده شده است آزمایش در محدوده ۵ -۵×۱۰^{۹} کپی در هر میکرولیتر خطی است. حساسیت به‌دست آمده با این روش، ۵ کپی در هر واکنش بود. از آنجایی که فقط ۱۰ میکرولیتر از RNA استاندارد استفاده شد، تعداد کپی در واحد میلی‌لیتر ۵۰۰ کپی محاسبه شد. از آنجایی که هیچ‌کدام از نمونه‌های سرم افراد سالم، علامت قابل شناسایی در آزمایش تولید نکردند، ویژگی این روش در شناسایی HIV-1 ۱۰۰درصد محاسبه شد. آزمون‌های تکرارپذیری روی رقت‌های سریال تهیه شده (۵- ۵×۱۰^{۹} کپی در هر میکرولیتر) انجام شد.

همان‌طور که در جدول‌های ۱ و۲ نشان داده شده است ضریب تغییرات Ct به‌دست آمده در آزمون تکرارپذیری درون سنجش و بین سنجش برای تمام رقت‌های سریال به ترتیب کمتر از ۳ و ٤/٥ درصد بود که نشان می‌دهد این روش تکرارپذیری بالایی دارد.



شکل۳ RNA تولید شده به روش In vitro Transcription ، **چاهک ۱** مربوط به نشانگر RNA؛ **چاهک ۲** مربوط به باند ۳۰۰b مربوط به استاندارد.



شکل٤ منحنی استاندارد سنجش کمی HIV-1 RNA. این منحنی حاصل لگاریتم رقتهای سریال در مقابل Ct مربوط به هر رقت است. همان‌طور که مشاهده می شود، آزمایش در محدوده۵×۱۰^{۹}–۵ کپی در هر میکرولیتر از RNA خطی است (R^2=۰/۹۹۷).

۳-٤- مقایسه نتایج حاصل از روش SYBR-green Real Time RT-PCR و روش استاندارد روی بیماران مبتلا به HIV-1

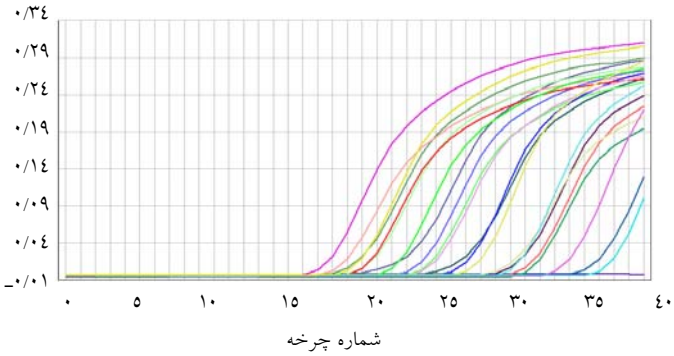
سنجش کمی HIV-1 در ۲٦ بیمار آلوده انجام شد. حداقل ۵ غلظت مختلف استاندارد (۵×۱۰^{۵}–۵ کپی در هر میکرولیتر) به‌منظور رسم منحنی استاندارد انتخاب شد. بار ویروسی در ۲۰ بیمار در محدوده بین ۲۷×۱۰^{٤}–٦۰۹ کپی در هر میکرولیتر بود و ٦ بیمار هیچ علامت قابل شناسایی نشان ندادند و تعداد کپی HIV-1 RNA آن‌ها کمتر از ۵۰۰ کپی در هر میکرولیتر در نظر گرفته شد (شکل ۵). اختصاصی بودن محصول‌های تکثیریافته با رسم منحنی ذوب بررسی شد. پیک (peak) اختصاصی محصول‌ها در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نشان داده شد (شکل ٦).

جدول۱ نتیجه آزمون تکرارپذیری درون سنجش. همان‌طور که ملاحظه می‌شود ضریب تغییرات Ct به‌دست آمده برای تمام رقت‌های سریال کمتر از ۳ درصد است که نشان می‌دهد این روش تکرارپذیری بالایی دارد.

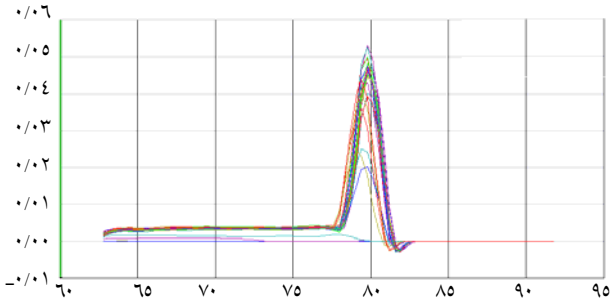
تعداد کپی HIV-1 RNA در واحد میکرولیتر	میانگین مقادیر Ct	انحراف معیار	ضریب تغییرات (٪)
۵×۱۰^{۹}	۷/۱۸	۰/٦	۲/٦
۵×۱۰^{۸}	۱۰/۹۷	۰/٤	۱/۵
۵×۱۰^{۷}	۱٤/۸۵	۰/۲۸	۱/۹
۵×۱۰^{٦}	۱۷/۵۱	۰/٤۲	۲/۱
۵×۱۰^{۵}	۲۰/۲۹	۰/۵۳	۲/٦
۵×۱۰^{٤}	۲۳/٦۷	۰/۱۳	۰/۵
۵×۱۰^{۳}	۲۷/۳۸	۰/۲۰	۰/۷۳
۵×۱۰^{۲}	۳۱/۱۷	۰/٤۸	۱/۵
۵×۱۰^{۱}	۳۳/٤۱	۰/۳۷	۱/۸
۵	۳۷/۱۵	۰/٦۸	۱/۰

جدول۲ نتیجه آزمون تکرارپذیری بین سنجش. همان‌طور که ملاحظه می‌شود ضریب تغییرات Ct به‌دست آمده برای تمام رقت‌های سریال کمتر از ٤/٥ درصد است که نشان می‌دهد این روش تکرارپذیری بالایی دارد.

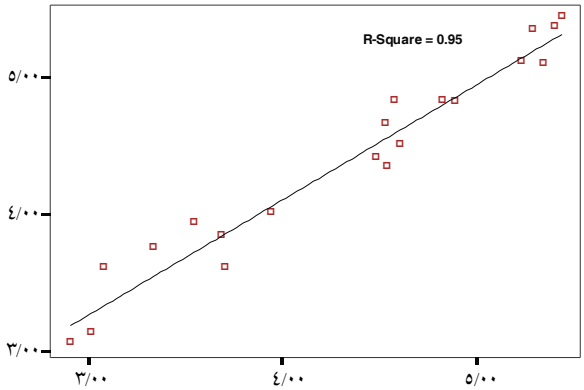
تعداد کپی HIV-1 RNA در واحد میکرولیتر	میانگین مقادیر Ct	انحراف معیار	ضریب تغییرات (٪)
۵×۱۰^{۹}	۷/٤	۰/٦	۱/۵
۵×۱۰^{۸}	۱۰/۵٦	۱	۲/۱
۵×۱۰^{۷}	۱٤/۳۵	۰/۹	۲/٤
۵×۱۰^{٦}	۱۷/۲۹	۰/۷۳	۳/۱
۵×۱۰^{۵}	۲۰/٦۳	۰/۸۵	٤/۱
۵×۱۰^{٤}	۲۳/٦۵	۰/۰۹	۰/۳۸
۵×۱۰^{۳}	۲۷/٤	۰/۱۷	۰/٦۲
۵×۱۰^{۲}	۳۰/۸۲	۰/۹	۲/۹۲
۵×۱۰^{۱}	۳٤/۲۰	۱/۱	۲/۵۱
۵	۳٦/۷۲	۰/۷۳	۱/۹



شکل ۵ منحنی‌های تکثیر بیماران در آزمایش Real Time RT-PCR نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان فلورسانت ساطع شده با افزایش مقادیر محصولات طی چرخه‌های واکنش PCR افزایش یافته است.



شکل ٦ آنالیز منحنی ذوب. در این منحنی اختصاصی بودن محصولات در واکنش Real Time RT-PCR بررسی شده است. دمای ذوب محصولات واکنش، ۸۰ درجه سانتی‌گراد است.



شکل۷ بررسی همبستگی بین روش SYBR-green Real Time RT-PCR و روش استاندارد کوباس آمپلی کور. نتایج حاصل از دو روش روی ۲٦ بیمار به صورت لگاریتمی نشان داده شده است. مطالعات آماری نشان داد که بر اساس شاخص R^2، همبستگی بسیار خوبی بین دو روش وجود دارد (R^2=۰/۹۵).

به‌منظور بررسی همبستگی بین روش SYBR-green Real Time RT-PCR و روش استاندارد کوباس آمپلی کور نتایج حاصل از دو روش روی ۲٦ بیمار با هم مقایسه شد. مطالعات آماری نشان داد که براساس شاخص R^2 همبستگی بسیار خوبی بین دو روش وجود دارد (R^2=۰/۹۵) (شکل ۷).

٤ـ بحث

بر اساس آخرین گزارش‌های سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۰٦ میلادی، اپیدمی HIV در جمهوری اسلامی ایران در یک وضعیت هشداردهنده‌ای در حال افزایش است. طبق این گزارش بالغ بر ٦٦۰۰۰ نفر در ایران به ایدز آلوده هستند و تا کنون ۱٦۰۰ نفر به علت ایدز از بین رفته‌اند [۱]. از آنجایی که تعداد افراد آلوده به HIV و پیشرفت‌های اخیر در استراتژی‌های درمان در حال افزایش است، ارزیابی آزمایشگاهی و آگاهی از وضعیت (Monitoring) بیماران مبتلا به عفونت HIV از اهمیت بیشتری برخوردار شده است [۳]. در طول دهه گذشته تلاش‌های مالی و علمی قابل توجهی در توسعه تکنولوژی شناسایی کمی اسیدهای نوکلئیک به‌کار گرفته شده است. استفاده از این روش‌ها منجر به فراهم شدن سطوح بالاتری از حساسیت و ویژگی نسبت به سایر آزمون‌های معمول شده است. بررسی میزان ویروس در سال‌های اخیر به‌طور بسیار گسترده‌ای مورد توجه محققین و متخصصین عفونی قرار گرفته است. این روش حساسترین آزمون آزمایشگاهی برای پیگیری نمودن پیشرفت عفونت و بررسی پاسخ به درمان ضد رتروویروسی است [۲]. مطالعات اخیر نشان داده است که بین سطوح پلاسمایی HIV-1 RNA، مراحل و پیشرفت بالینی بیماری ارتباط مستقیمی وجود دارد. علاوه بر این تعیین دقیق سطوح پلاسمایی ویروسی، ابزار اساسی است که به‌منظور بررسی تأثیر درمان ترکیب HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy) در بیماران آلوده به HIV-1 استفاده می‌شود. از طرف دیگر شرایطی را فراهم می‌کند که آنالیز دقیق شکست درمان که ناشی از ظهور مقاومت به داروهای ضد رتروویروسی است، انجام شود [٤،۳].

در حال حاضر روش‌های مختلفی برای سنجش کمی RNA HIV-1 در نمونه‌های بالینی توسعه یافته است. از جمله: RT-PCR، bDNA (branched DNA) و NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification). هر یک از این روش‌ها به صورت تجارتی در دسترس قرار گرفته‌اند. در این روش‌ها میزان محصولات پس از یک تعداد چرخه ثابتی از PCR اندازه‌گیری می‌شود. متأسفانه این کیت‌های تجارتی هزینه بسیار بالایی دارند که خرید آن‌ها در توان مالی بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و مراکز تحقیقاتی نیست. علاوه بر این، در دسترس قرارگیری آن‌ها نیز محدودیت‌های زیادی ایجاد می‌کند [٦].

در تحقیق حاضر روش SYBR-green Real Time RT-PCR را به‌منظور سنجش کمی HIV-1 در بیماران آلوده راه‌اندازی شد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که این روش قادر به شناسایی ۵۰۰ کپی از RNA ویروسی در پلاسمای آلوده است و بنابراین حساسیتی در حد روش استاندارد دارد.

به دنبال اهمیت پیدا کردن و ارزش سنجش کمی بار ویروسی HIV-1 در کنترل و آگاهی از وضعیت درمان بیماران، مهم است که نتایج، دقیق و تکرار پذیر باشد. در این تحقیق تکرارپذیری در سطح درون سنجش و بین سنجش بررسی شد. تکرارپذیری درون سنجش، خطای کاربر در استفاده از سمپلر و نیز خطای کالیبره نبودن سمپلر را بررسی می‌کند. این در صورتی است که تکرارپذیری بین سنجش، خطای آزمایشگاه اعم از دستگاه‌ها و کالیبره بودن آن‌ها، مواد، ماندگاری و پایداری RNA و افت آنزیمی واکنش را بررسی می‌کند. مطالعه روی مقالات متعدد نشان دهنده آن است که ضریب تغییرات برای تکرارپذیری درون سنجش کمتر از ۵ درصد و نیز برای تکرارپذیری بین سنجش کمتر از ۱۰درصد، نشان دهنده تکرارپذیر بودن مناسب یک آزمایش است که برای روش ما به ترتیب کمتر از ۲/٦ و ٤/۱ درصد بودند.

به‌طور کلی روش SYBR-green Real Time RT-PCR راه‌اندازی شده در این تحقیق مزایای بسیار مناسبی را پیشنهاد می‌کند که عبارت است از:

۱- RNAهای استاندارد که به صورت پانل‌های تجارتی موجود هستند، هزینه بسیار بالایی دارند و از نظر در دسترس قرارگیری آن‌ها نیز محدودیت‌های بسیاری گریبانگیر محققین است. علاوه بر این، به علت رقت‌های سریال که از کالیبراتورمان تهیه شد، محدوده شناسایی بالادست (Upper limit of quantification) در آزمون حاضر بسیار بالاتر از روش استاندارد بود (۵×۱۰^{۹} در مقابل $۷/۵\times۱۰^{۵}$). بنابراین اگر نیازی به محدوده دینامیکی (Dynamic range) گسترده‌تری باشد - مانند موارد حاد بیماری- کالیبراتور ما مفید خواهد بود.

۲- مطالعات آماری و مقایسه روش SYBR-green Real Time RT-PCR با روش استاندارد کوباس آمپلی کور روی ۲٦ بیمار نشان داد که همبستگی قابل قبولی بین نتایج به‌دست آمده از دو روش وجود دارد و بنابراین روش راه‌اندازی شده می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش استاندارد در سنجش کمی HIV-1 در بیماران آلوده باشد.

۳- از آنجایی که در روش Real Time به انجام مراحل بعد از فرآیند تکثیر (Post-Amplification) نیاز نیست، علاوه بر کاهش هزینه ها، انتقال آلودگی‌های تکنیکی که منجر به پاسخ مثبت کاذب می‌شود، به حداقل می‌رسد. همچنین امکان بررسی دقیق مراحل اجرای آزمایش وجود دارد. از این گذشته، این روش در آزمایشگاه‌هایی که توانایی مالی بالایی دارند، جایگزین بسیار خوبی برای روش‌های تجارتی است.

روش راه‌اندازی شده در این تحقیق می‌تواند به‌عنوان راهنمای مفیدی در تشخیص اولیه عفونت HIV در کودکان و نیز آگاهی از وضعیت کفایت و تأثیر درمان ترکیبی بیماران آلوده باشد. در بسیاری از کشورها با استطاعت مالی محدود، به‌منظور راهنمای تجویز دارو و پیگیری درمان، شمارش سلول‌های CD4+ T ضروری به‌نظر می‌رسد ولی از اندازه‌گیری بار ویروسی HIV-1 به خاطر هزینه بالا چشم پوشی می‌شود. در هر حال با راه‌اندازی این روش و قیمت نازل آن، محققان حاضر معتقدند که این روش می‌تواند حداقل به خاطر ممانعت از ظهور ویروس‌های مقاوم به درمان بخشی از آگاهی از وضعیت درمان را بر عهده بگیرد.

۵- منابع

[1] http://www.who.int/globalatlas/predefinedreports/

[2] Gupta V, Gupta S. Laboratory markers associated with progression of HIV infection. Indian J Med Microbiol 2003; 22: 7-15.

[3] Yilmaz G. Diagnosis of HIV infection and laboratory monitoring of its therapy. J Clin Virol 2001; 21: 187-96.

[4] Schmitt Y. Performance characteristics of quantification assays for human immunodeficiency virus type 1 RNA. J Clin Virol 2001; 20:31-3.

[5] Katsoulidou A, Papachristou E, Petrodaskalaki M, Sypsa V, Anastassopoulou CG, Gargalianos P, Karafoulidou A, Lazanas M, Kordossis T, Andoniadou A, Hatzakis A. Comparison of three current viral load assays for the quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. J Virol Meth 2004; 121: 93-9.

[6] Ernest I, Alexandre I, Zammatteo N, Herman M, Houbion A, Leener F, Fransen K, Groen G, Remacle J. Quantitative assay for group M (subtype A-H) and group O HIV-1 RNA detection in plasma. J Virol Meth 2001; 93: 1-14.

[7] Johanson J, Abravaya K, Cammini W, Erickson D, Flanders R, Leckie G, Marshall E, Mullen C, Ohhashi Y, Perry R, Ricci J, Salituro J, Smith A, Tang N, Vi M, Robinson J. A new ulterasensetive assay for quantitation of HIV-1 RNA in plasma. J Virol Meth 2001; 95: 81-92.

[8] Mackay I, Arden K, Nitsche A. Real-Time PCR in virology. Nucleic Acids Res 2002; 30: 1292-305.

[9] Gibellini D, Vitone F, Gori E, Plasa M, Re MC. Quantitative detection of human immunodeficiency virus type-1 viral load by SYBR Green real time RT-PCR technique in HIV-1 seropositive patients. J Virol Meth 2004; 115:183-9.

[10] Amel Jamehdar S, Sabahi F, Forouzandeh M, Haji Abdolbaghi M, Kazemnejad A, Edalat R, Mahbodi F. Evaluation of a New, Highly Sensitive and Specific Primer Set for Reverse-transcriptase PCR Detection of HIV-1 Infected Patients: Comparison with Standard Primers. J Biol Sciences 2007; 7: 954-8.