

کاربرد طیف‌سنجی نزدیک مادون قرمز و ماشین بردار پشتیبان در تشخیص آلودگی به HIV-1

علی اصغر رحیمی^۱ MSc، میرزا خلیل بهمنی^{*} PhD، علی مسعودنژاد^۲ PhD، مجتبی سعادت^۱ PhD، ایوب خسروی^۱ MSc،
عزیزاله شفیعی خانی^۳ PhD، جواد محمدزاده^۴ MSc

^{*} مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، تهران، ایران
^۱ مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران
^۲ پژوهشکده فیزیک، پژوهشگاه دانش‌های بنیادی، تهران، ایران
^۳ دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
^۴ مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

اهداف: هدف این مطالعه بررسی امکان تشخیص آلودگی سرم انسانی به HIV-1 و تمایز سرم‌های آلوده از سالم با استفاده از طیف‌سنجی نزدیک مادون قرمز همراه با روش آنالیز چندمتغیره ماشین بردار پشتیبان به‌عنوان روشی سریع، ارزان و غیرمخرب بود.

مواد و روش‌ها: ۳۵ نمونه سرم آلوده به HIV-1 و ۱۵ نمونه سرم غیرآلوده انتخاب و در بازه ۱۱۰۰-۶۰۰ نانومتر، توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اسکن شدند و جذب آنها به دست آمد. نتایج حاصل برای انجام مرحله آموزش و کالیبراسیون به ماشین بردار پشتیبان ارایه شد. پس از تعیین ساختار آموزش SVM، مقادیر جذب حاصل از اسکن ۲۱ نمونه سرم آلوده به HIV-1 و ۲۰ نمونه سرم غیرآلوده در بازه همان طول موج به‌عنوان نمونه‌های مجهول برای آزمایش و تشخیص آلودگی یا عدم آلودگی به ماشین بردار پشتیبان اراده شد.

یافته‌ها: از ۲۱ نمونه آلوده مجهول، ۲ نمونه غیرآلوده و بقیه آلوده تشخیص داده شدند و از ۲۰ نمونه غیرآلوده مجهول، تنها ۱ نمونه توسط ماشین بردار پشتیبان آلوده تشخیص داده شد. حساسیت این روش ۹۱٪ و اختصاصیت آن ۹۵٪ برآورد شد.

نتیجه‌گیری: طیف‌سنجی نزدیک مادون قرمز همراه با ماشین بردار پشتیبان می‌تواند به‌عنوان روش پیش‌تشخیص آلودگی سرم انسان به HIV-1 به کار رود.

کلیدواژه‌ها: طیف‌سنجی نزدیک مادون قرمز، ماشین بردار پشتیبان، HIV

Application of near-infrared spectroscopy and support vector machine in detection of HIV-1 infection

Rahimi A. A.¹ MSc, Bahmani M. Kh.* PhD, Masoudnejad A.² PhD, Sa'adati M.¹ PhD, Khosravi A.¹ MSc, Shafi'khani A.³ PhD, Mohammadzade J.⁴ MSc

*Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

¹Biology Research Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

²Biochemistry & Biophysics Research Center, Tehran University, Tehran, Iran

³Physics Research Center, Institute of Fundamental Knowledge, Tehran, Iran

⁴Faculty of Sciences, Branch of Karaj, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Abstract

Aims: This study was performed to investigate the possibility of diagnosis of HIV-1 human serum infection and to differentiate the infected serum from healthy ones using near infrared (NIR) spectroscopy along with Support Vector Machines (SVM) analysis as a rapid, cost-effective and non-destructive method.

Materials & Methods: 35 HIV-1 infected serums and 15 healthy ones were selected and scanned within the range of 600-1100 nm using spectrophotometer device and their absorbance was obtained. The given results were then subjected to SVM for conducting the training phase and calibration process. After determination of training structure of SVM, absorbance data obtained from 21 HIV-1 infected and 20 uninfected serums at the same wavelength range were subjected to SVM as the unknown samples for test process and diagnosis of infection or the lack of it.

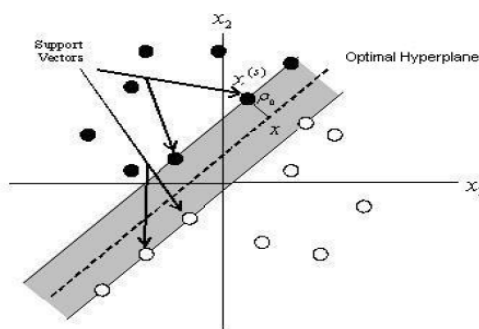
Results: Among 21 infected unknown samples, 2 cases were diagnosed as uninfected and the rest were diagnosed as infected and from 20 uninfected unknown samples, only 1 case was diagnosed by SVM as infected. The sensitivity of the method was estimated 91% and its specificity was 95%.

Conclusion: NIR-spectroscopy along with SVM analysis can be used as a pre-diagnostic method for detection of human serum infection with HIV-1.

Keywords: NIR-Spectroscopy, Support Vector Machine (SVM), HIV

مقدمه

این امر براساس الگوریتم کمومتریکس است. امروزه از روش‌های مختلف کمومتریکس یا ماشین‌های آموزش برای آنالیز داده‌ها استفاده می‌شود. از جمله این روش‌ها، روش ماشین بردار پشتیبان (SVM) است که در این مطالعه برای تشخیص و تمایز نمونه‌های سالم از بیمار، مورد استفاده قرار گرفته است. ایده اصلی SVM ایجاد یک ابرصفحه به‌عنوان سطح تصمیم‌گیری برای تعیین آستانه تفکیک حداکثر بین نمونه‌های مثبت و منفی است (شکل ۱). این روش براساس نظریه آموزش آماری، قابلیت دست‌یابی به خصیصه‌های بهینه را دارد. بنابراین می‌توان SVM را یکی از ابزارهایی شمرد که از کاهش ریسک ساختاری استفاده می‌کند. از آنجایی که SVM یکی از ماشین‌های یادگیری با ناظر است، از الگوریتم برای آموزش و تعیین ساختار خود استفاده می‌کند. یکی از زیرمجموعه داده‌های آموزش که توسط الگوریتم آموزش استخراج می‌شود، بردار پشتیبان نامیده می‌شوند. این زیرمجموعه باید کوچکترین زیرمجموعه ممکن باشد. هسته مرکزی الگوریتم فوق از یک ضرب داخلی بین بردارهای به‌دست‌آمده از فضای ورودی و بردارهای پشتیبان تشکیل شده است [۲۲، ۲۳، ۲۴].



شکل ۱) ابر صفحه برای تعیین آستانه تفکیک بین نمونه‌های مثبت (آلوده) و منفی (سالم)

هدف از این مطالعه بررسی امکان تشخیص آلودگی سرم انسانی به ویروس HIV-1 و تمایز سرم‌های آلوده از سالم با استفاده از طیف‌سنجی نزدیک مادون قرمز (NIR) همراه با روش آنالیز چندمتغیره ماشین بردار پشتیبان (SVM) به‌عنوان روش سریع، ارزان و غیرمخرب بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در سال ۸۸ انجام شده است. با توجه به این‌که آنالیز داده‌های طیف‌سنجی توسط ماشین بردار پشتیبان در دو مرحله آموزش و آزمون انجام می‌پذیرد، لذا در هر دو مرحله نیاز به اطلاعات حاصل از طیف‌سنجی نزدیک مادون قرمز نمونه‌های آلوده و غیرآلوده (سالم) است. برای مرحله آموزش، نمونه‌های آلوده به ویروس HIV-1 دریافت‌شده از مراکز تحقیقی شماره ۱ و ۲ (نام این مراکز در دفتر

ایدز بزرگترین بیماری عفونی کشنده و چهارمین علت مرگ در جهان است. این بیماری از عوامل اصلی موانع توسعه جوامع بشری بوده و اکثریت جمعیت فعال و مولد در جامعه را در بر گرفته است [۱]. بیماری ایدز حاصل تکثیر ویروس HIV است که با تخریب جدی دستگاه ایمنی بدن میزبان، زمینه‌ساز بروز عفونت‌های موسوم به فرصت‌طلب شده و پیشرفت همین عفونت‌ها منجر به مرگ بیمار می‌شود [۲]. موارد ابتلا به ویروس HIV و مرگ‌ومیر ناشی از آن در سراسر جهان رو به گسترش است. بنابراین شناسایی زودهنگام آلودگی به ویروس HIV-1 موجب اقدامات درمانی به‌موقع و کاهش چشمگیر هزینه‌های درمانی می‌شود. امروزه روش‌های متعددی مانند الایزا و PCR برای آشکارسازی آلودگی به ویروس HIV-1 به‌کار برده می‌شود. اگرچه روش الایزا از نظر تجاری در دسترس بوده و روشی مطمئن و اختصاصی است، ولی محدوده باریکی از غلظت p24 (پروتئین اختصاصی ویروس HIV-1) را پوشش داده و در ضمن، روشی وقت‌گیر و پرهزینه است [۳]. روش PCR، روشی اختصاصی بر پایه سکانس‌های ژنی است، لکن برای غربالگری در سطح وسیع مناسب نبوده و انجام آن نیز هزینه زیادی دربردارد [۴]. طیف‌سنجی نزدیک مادون قرمز (NIR) روشی سریع و ارزان است که قابلیت تشخیص چند جزء در یک نمونه را داشته و به هیچ واکنشگری نیاز ندارد. علاوه بر آن روشی غیرتهاجمی و غیرمخرب است [۵].

ناحیه طول موج کوتاه نزدیک مادون قرمز و ناحیه قرمز معروف به پنجره بینایی از ۶۰۰ نانومتر تا ۱۱۰۰ نانومتر، مفیدترین ناحیه برای اندازه‌گیری نمونه‌های بیولوژیک هستند [۶]. جذب هموگلوبین و آب به ترتیب در ناحیه زیر ۶۰۰ نانومتر و بالای ۱۱۰۰ نانومتر بسیار شدید بوده که این امر موجب محدودیت مطالعات طیف‌سنجی و میکروسکوپی شده است [۷]. جذب در ناحیه امواج کوتاه نزدیک مادون قرمز بستگی به ترکیب و امواج فرعی ارتعاشی مثل کشش و خمش گروه‌های حاوی هیدروژن از قبیل -OH، -CH، -NH دارد. اخیراً مولکول‌های مهم بیولوژیک مثل آلومین و گلوکز [۸، ۹، ۱۰]، کلاسترول و لیپید [۱۱، ۱۲]، پروتئین [۱۳] و نیز برخی از باکتری‌ها [۱۴، ۱۵] به‌طور کمی توسط طیف‌سنجی مادون قرمز مورد بررسی قرار گرفته‌اند. این روش همچنین برای تشخیص برخی از بیماری‌ها چون سرطان، آلزایمر، میگرن و دیابت نیز به‌کار برده شده است [۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰]. تفسیر مستقیم جذب طیف‌ها در مورد مخلوطی از چند جزء مختلف به‌دلیل همپوشانی گسترده، برهم‌کنش و تداخل باندهای جذبی با یکدیگر بسیار مشکل است [۲۱]. بنابراین طیف‌سنجی نزدیک مادون قرمز متکی به روش‌های آنالیز چندمتغیره برای مشخص کردن مقدار و اجزاء مورد نظر در یک ترکیب است. آنالیز چندمتغیره، آنالیز داده‌های حاوی متغیرهای زیاد براساس آمار و ریاضیات است. این روش می‌تواند داده‌های پیچیده را ساده کرده و اطلاعات پنهان را آشکار نماید. آنالیز می‌تواند کمی یا کیفی باشد که

کاربرد طیفسنجی نزدیک مادون قرمز و ماشین بردار پشتیبان در تشخیص آلودگی به HIV-1 ۲۵

JA168: 5'-ACA ATG TAC ACA TGG AAT TAG GCC A-3'
JA169: 5'-AGA AAA ATT CTC CTC TAC AAT TAA A-3'

مراحل (۳۰ چرخه)	زمان (دقیقه)	دما (سانتیگراد)
شروع داغ	۴ دقیقه	۹۵
واسرشتی	۴۰ ثانیه	۹۴
جفت شدن	۴۰ ثانیه	۴۸
طولیل سازی	۱ دقیقه	۷۲
طولیل سازی نهایی	۷ دقیقه	۷۲

مراحل (۳۰ چرخه)	زمان (دقیقه)	دما (سانتیگراد)
شروع داغ	۴ دقیقه	۹۵
واسرشتی	۴۰ ثانیه	۹۴
جفت شدن	۴۰ ثانیه	۴۸/۹
طولیل سازی	۱ دقیقه	۷۲
طولیل سازی نهایی	۵ دقیقه	۷۲

واکنش PCR استاندارد و PCR لانه دار توسط دستگاه ترموسایکلر (MJ Mini PCR BioRad؛ ایالات متحده) مطابق با برنامه مندرج در جداول ۱ و ۲، هر کدام در حجم ۲۵ میکرولیتر با ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از جفت پرایمرهای مربوطه، ۱ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار) به حجم ۱/۲۵ میکرولیتر انجام شد که در PCR استاندارد میزان آنزیم DNA تک پلیمراز (فرمنتاز)، ۰/۲۵ میکرولیتر و در PCR لانه دار، ۰/۱۲۵ میکرولیتر بوده است. در خاتمه، باندهای محصول PCR روی ژل الکتروفورز آگارز ۱٪، مشاهده شد. با انجام آزمایشات فوق تعداد ۳۵ نمونه سرم که دارای ویژگی HIV-1 مثبت، HBV منفی و HCV منفی بودند، به عنوان نمونه‌های آلوده برای آموزش ماشین بردار پشتیبان انتخاب شدند. در ادامه، برای آموزش ماشین بردار پشتیبان با نمونه‌های سالم، تعداد ۲۰ نمونه سرم (دریافتی از مرکز شماره ۳) متعلق به افراد سالم از نظر ابتلا به HIV-1، HBV و HCV مورد استفاده قرار گرفتند. پس از تعیین ساختار آموزش SVM، برای مرحله آزمون ماشین بردار پشتیبان، ۴۱ نمونه سرم جدید (دریافتی از مراکز شماره ۲، ۳ و ۴) نیز مورد استفاده قرار گرفت که برای بررسی واکنش‌های متقاطع و اثرات احتمالی آنها در تشخیص، نمونه‌های HCV مثبت، HBV مثبت، HCV منفی و HBV منفی نیز در انتخاب این نمونه‌ها لحاظ شدند. نمونه‌های فوق مشتمل بر ۲۰ نمونه سرم سالم بود که از آن میان ۱۱ نمونه، HIV-1، HBV و HCV منفی بوده، ۴ نمونه HIV-1 منفی، HBV مثبت و HCV مثبت و نیز ۵ نمونه HIV و HCV منفی و HBV مثبت بودند. ۲۱ نمونه باقی مانده نیز متعلق به افراد آلوده به ویروس HIV-1 بود که از آن میان ۱۱ نمونه، HIV-1 مثبت و HBV و HCV منفی بوده و ۵ نمونه نسبت به هر ۳ ویروس

مجله محفوظ است) که در مرحله قبل از ایدز قرار داشتند (CD4=۴۰۰-۵۰۰ cell/ul)، براساس دستورالعمل کیت الایزای (Genscreen Plus HIV Ag-Ab, BioRad, 72375) ایالات متحده) برای بررسی آلودگی به ویروس HIV-1 مورد آزمایش قرار گرفتند. بدین منظور پس از افزایش ۲۵ میکرولیتر از کونژوگه اول (پلی کلونال آنتی بادی) به تمام چاهک‌های پلیت الایزا که حاوی آنتی بادی مونوکلونال و آنتی ژن خالص ویروسی بودند و نیز افزایش کنترل‌های مثبت و منفی در چاهک‌های مربوطه، مقدار ۷۵ میکرولیتر از هر نمونه در چاهک مربوط به خود ریخته شد و آنگاه پس از مراحل انکوباسیون و شستشو، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه دوم (اوبدین و آنتی ژن خالص ویروسی) به چاهک‌ها اضافه شده و بعد از انکوباسیون و شستشو، فرآیند ظهور و توقف صورت پذیرفت و در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر سنجیده شد. همچنین نمونه‌ها برای بررسی عدم آلودگی به ویروس هپاتیت B، توسط کیت الایزای (MONOLISA HBs Ag ULTRA, 72346) ایالات متحده) آزمایش شدند. در این روش، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در کنار کنترل‌های مثبت و منفی مورد استفاده قرار گرفتند که با افزایش ۵۰ میکرولیتر کونژوگه و طی مراحل انکوباسیون، شستشو، ظهور و توقف، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر سنجیده شد.

کیت الایزای (Hepanostica, HCV ULTRA؛ چین) نیز برای بررسی عدم آلودگی نمونه‌ها به ویروس هپاتیت C مورد استفاده قرار گرفت که بدین منظور برای کشف آنتی بادی علیه ویروس مذکور، مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در چاهک‌های حاوی آنتی ژن ویروس هپاتیت C ریخته شد و پس از انجام مراحل انکوباسیون، شستشو، افزایش کونژوگه، سوبسترا و توقف واکنش (طبق دستورالعمل کیت مذکور)، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر به دست آمد. برای اطمینان از آلودگی به HIV-1، آزمایش PCR نیز روی نمونه‌های فوق انجام شد. بدین منظور تخلیص DNA براساس دستورالعمل کیت آماده سازی الگوی PCR فوق خالص (متعلق به شرکت Roche) صورت گرفت. ژن مورد تکثیر در PCR برای شناسایی HIV عبارت است از قطعه ژن Env که دارای ۴۱۰ bp است. برای اطمینان از تکثیر صحیح و دقیق قطعه ژن مورد نظر، دو نوع PCR شامل PCR استاندارد و سپس PCR لانه دار انجام شد. به همین منظور در مرحله اول، پرایمرهای JA167 به عنوان پرایمر پیشرو و پرایمر JA170 به عنوان پرایمر معکوس، در دور اول برای PCR استاندارد و پرایمرهای JA168 به عنوان پیشرو و JA169 به عنوان پرایمر معکوس در دور دوم برای انجام PCR لانه دار مورد استفاده قرار گرفتند [۲۵]. سکانس پرایمرها به شرح زیر است:

پرایمرهای دور اول Env برای PCR استاندارد:

JA170: 5'-GTG ATG TAT TGC AGT AGA AAA ATT C-3'
JA167: 5'-TAT CTT TTG AGC CAA TTC CTA TAC A-3'

پرایمرهای دور دوم Env برای PCR لانه دار:

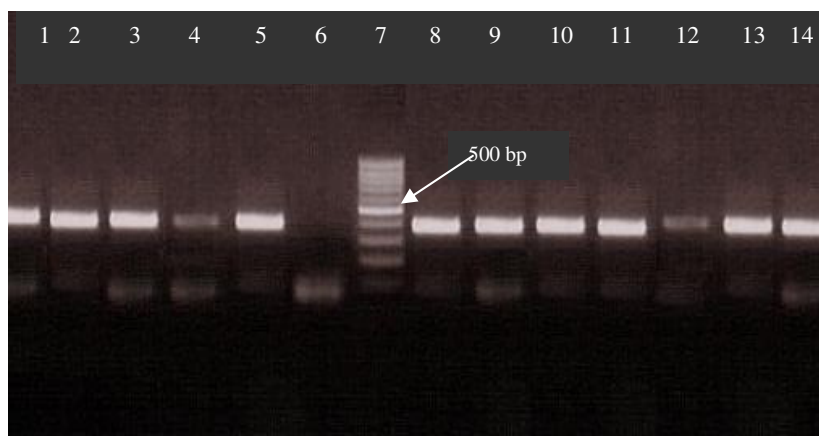
به SVM و استخراج خروجی از SVM و تغییر ساختار SVM با توجه به خروجی مورد نظر که در ورودی SVM قرار داشته است. ساختار SVM بعد از ۱۰۰۰ دوره با ۹۱٪ درستی تعیین شد و بعد از تعیین ساختار SVM، داده‌های آزمایشی برای آزمون شبکه به کار برده شد. این داده‌ها در SVM جدید بوده و در مرحله آموزشی به کار برده نشده بودند. داده‌های مذکور از ۴۱ فرد (نمونه‌های مورد آزمون) تشکیل شده بودند و تعداد مشخصه‌های هر داده به اندازه تعداد مشخصه‌های داده‌های آموزشی بوده و در یک ماتریس ۵۰۲ در ۴۱ به‌عنوان داده‌های آزمایشی به SVM داده شدند. چون اعداد منفی برای افراد بیمار و اعداد مثبت برای افراد سالم در نظر گرفته شد، لذا صفر به‌عنوان آستانه طبقه‌بندی افراد مورد استفاده قرار گرفت. برای محاسبه حساسیت و اختصاصیت نتایج حاصل از روش به کار گرفته شده در این مطالعه از فرمول زیر استفاده شد [۲۶]:

$$\text{حساسیت} = \frac{TP}{TP + FN} \quad \text{[منفی نادرست]}$$

$$\text{اختصاصیت} = \frac{TN}{TN + FP} \quad \text{[منفی درست]}$$

نتایج

۳۵ نمونه مورد آزمایش توسط کیت‌های الایزای HIV-1، همگی HIV-1 مثبت بوده و نتایج حاصل از PCR انجام شده بر این نمونه‌ها نیز آلودگی آنها را به ویروس مذکور تایید نمود (شکل ۲).



شکل ۲) ژل الکتروفورز حاوی محصولات PCR قطعه ژن Env از نمونه‌های مورد آزمایش (ستون ۶؛ کنترل منفی، ستون ۷؛ نردبان ۱۰۰ bp DNA از شرکت Fermentas و دیگر ستون‌ها حاوی باندهای حاصل از PCR قطعه ژن ۴۱۰ bp Env تعدادی از نمونه‌ها)

متعلق به ۴۱ نمونه مرحله آزمون (۲۱ نمونه آلوده به HIV-1 و ۲۰ نمونه غیرآلوده به HIV-1، مشتمل بر تعدادی از نمونه‌های آلوده به HBV و HCV برای واکنش‌های متقاطع) به سیستم SVM ارایه شد و نتایج زیر به‌عنوان خروجی پیشگویی سیستم دریافت شد: در گروه نمونه‌های آلوده به HIV-1 و در بین ۱۱ نمونه HIV-1 مثبت، HCV منفی و HBV منفی، ۱۰ نمونه آلوده و ۱ نمونه (I-V)، سالم تشخیص داده شد که در جدول ۳ نتایج قابل مشاهده است.

ذکر شده مثبت و نیز ۵ نمونه از آنها HIV-1، HCV مثبت و HBV منفی بودند. نمونه‌های آلوده در این بخش نیز در مرحله قبل از ایدز (CD4=۴۰۰-۵۰۰ cell/ul) قرار داشتند. کلیه نمونه‌های فوق تا انجام فرآیند طیف‌سنجی و آنالیز SVM در دمای ۷۰°C- نگهداری شدند. برای انجام طیف‌سنجی، ۳۰۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌های فوق در کووت پلی‌استیرین ریخته شده و با بافر PBS به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شدند. آن‌گاه توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV (LABOMED, UVD-2950؛ ایالات متحده) با درجه تفکیک ۱ نانومتر و در بازه ۶۰۰-۱۱۰۰ نانومتر در دمای آزمایشگاه، طیف جذبی NIR هر یک از نمونه‌ها اندازه‌گیری و ثبت شد.

برای پردازش داده‌ها، نرم‌افزار Neuro Solution مورد استفاده قرار گرفت. مجموعه داده‌ها، در مورد نمونه‌های مرحله آموزش، مشتمل بر مشخصات طیف جذبی ۲۰ فرد سالم و ۳۵ فرد آلوده به HIV-1 (بیمار) بوده است. با توجه به این که SVM یک ماشین با ناظر است، در این مجموعه، داده‌ها برای افراد سالم ۱ و برای افراد آلوده (بیمار) -۱، در نظر گرفته شد. این مجموعه از داده‌ها در نهایت به صورت یک ماتریس ۵۰۲ در ۵۵ (تعداد نمونه‌های مرحله آموزش) به‌عنوان ورودی مجموعه داده‌های آموزشی به SVM داده شد. قابل ذکر است که یکی از سطرها خروجی مورد نظر برای الگوریتم در مرحله آموزش SVM بوده است. الگوریتم آموزشی به صورت دوره‌ای مبادرت به تعیین ساختار اصلی نمود که هر دوره عبارت بود از ورود تمامی ۵۵ نفر

نتایج حاصل از آزمون الایزای HBV و HCV، حاکی از منفی بودن نمونه‌های فوق نسبت به ۲ ویروس مذکور بود. ۲۰ نمونه سالم دریافتی نیز پس از انجام آزمون‌های الایزای ذکر شده همگی نسبت به HIV-1، HBV و HCV منفی بودند. نتایج حاصل از طیف‌های نزدیک مادون قرمز در بازه ۶۰۰-۱۱۰۰ نانومتر متعلق به هر دو دسته نمونه مرحله آموزش (۵۵ نمونه) به‌عنوان داده‌های آموزشی به سیستم ماشین بردار پشتیبان (SVM) ارایه و سیستم کالیبره شد. پس از آن یافته‌های حاصل از طیف‌سنجی نزدیک مادون قرمز در بازه فوق،

بوده است:

$$\%91 = 21 / (21 + 2) = \text{حساسیت}$$

$$\%95 = 20 / (20 + 1) = \text{اختصاصیت}$$

جدول ۶ نتایج آنالیز SVM از نمونه‌های غیرآلوده (سالم)

تشخیص	SVM	نمونه HIV ⁻ , HBV ⁻ , HCV ⁻
غیرآلوده	۰/۰۷	۱-H
غیرآلوده	۰/۲	۲-H
غیرآلوده	۰/۵۱	۳-H
غیرآلوده	۰/۴۲	۴-H
غیرآلوده	۰/۰۸	۵-H
غیرآلوده	۰/۶۹	۶-H
غیرآلوده	۰/۵۲	۷-H
غیرآلوده	۰/۰۳	۸-H
غیرآلوده	۰/۰۱	۹-H
آلوده	-۰/۰۵	۱۰-H
غیرآلوده	۰/۳۹	۱۱-H

جدول ۷ نتایج آنالیز SVM از نمونه‌های غیرآلوده (سالم)

تشخیص	SVM	نمونه HIV ⁻ , HBV ⁺ , HCV ⁺
غیرآلوده	۰/۰۸	۱۲-H
غیرآلوده	۰/۵۳	۱۳-H
غیرآلوده	۰/۴۱	۱۴-H
غیرآلوده	۰/۰۳	۱۵-H

جدول ۸ نتایج آنالیز SVM از نمونه‌های غیرآلوده (سالم)

تشخیص	SVM	نمونه HIV ⁻ , HBV ⁺ , HCV ⁺
غیرآلوده	۰/۰۵	۱۶-H
غیرآلوده	۰/۱	۱۷-H
غیرآلوده	۰/۲۱	۱۸-H
غیرآلوده	۰/۳۶	۱۹-H
غیرآلوده	۰/۰۷	۲۰-H

بحث

در حال حاضر روش‌های مختلفی برای تشخیص آلودگی به HIV-1 از جمله روش‌های سرولوژیکی و ملکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند که هر کدام دارای مزایا و معایبی هستند. البته بیشتر این روش‌ها پرهزینه و وقت‌گیر بوده و به تجهیزات خاصی نیاز دارند [۲۷]. با توجه به این‌که پرتوهای نزدیک مادون قرمز، قابلیت عبور از بافت‌های بیولوژیکی را دارند، اخیراً طیف‌سنجی مادون قرمز به‌عنوان روشی مناسب برای تشخیص عوامل مختلف موجود در سرم انسان یا تشخیص برخی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. همپوشانی و برهم‌کنش باندهای جذبی در یک مخلوط، در طیف‌سنجی مادون قرمز عموماً مانع از تفسیر مستقیم طیف‌های جذبی می‌شود از این رو

جدول ۳ نتایج آنالیز SVM از نمونه‌های آلوده

تشخیص	SVM	نمونه HIV ⁺ , HBV ⁻ , HCV ⁻
آلوده	-۰/۰۵	۱-I
آلوده	-۰/۰۴	۲-I
آلوده	-۰/۲۷	۳-I
آلوده	-۰/۴۲	۴-I
آلوده	-۰/۰۷	۵-I
آلوده	-۰/۰۱	۶-I
غیرآلوده	۰/۸۶	۷-I
آلوده	-۰/۸۴	۸-I
آلوده	-۰/۳۵	۹-I
آلوده	-۰/۰۸	۱۰-I
آلوده	-۰/۴۲	۱۱-I

از میان ۵ نمونه HIV-1 مثبت، HBV مثبت و HCV مثبت، تمامی آنها آلوده تشخیص داده شدند (جدول ۴).

جدول ۴ نتایج آنالیز SVM از نمونه‌های آلوده

تشخیص	SVM	نمونه HIV ⁺ , HBV ⁺ , HCV ⁺
آلوده	-۰/۷۱	۱۲-IBC
آلوده	-۰/۰۴	۱۳-IBC
آلوده	-۰/۶۳	۱۴-IBC
آلوده	-۰/۰۷	۱۵-IBC
آلوده	-۰/۵۱	۱۶-IBC

در همان گروه از بین ۵ نمونه HIV-1 مثبت، HBV منفی و HCV مثبت، ۴ نمونه آلوده و ۱ نمونه (نمونه شماره ۱۸-IC) سالم تشخیص داده شد (جدول ۵). در گروه نمونه‌های سالم نسبت به HIV-1، در پیشگویی انجام‌شده بر ۱۱ نمونه HIV-1 منفی، HBV منفی و HCV منفی، تعداد ۱۰ نمونه سالم و ۱ نمونه (نمونه شماره ۱۰-H)، آلوده تشخیص داده شد (جدول ۶). از میان ۴ نمونه HIV-1 منفی، HBV مثبت و HCV مثبت، تمامی آنها سالم تشخیص داده شدند (جدول ۷).

جدول ۵ نتایج آنالیز SVM از نمونه‌های آلوده

تشخیص	SVM	نمونه HIV ⁺ , HBV ⁻ , HCV ⁺
آلوده	-۰/۷۵	۱۷-IC
غیرآلوده	۰/۰۹	۱۸-IC
آلوده	-۰/۰۱	۱۹-IC
آلوده	-۰/۰۶	۲۰-IC
آلوده	-۰/۴۱	۲۱-IC

همچنین از ۵ نمونه HIV-1 منفی، HBV مثبت و HCV منفی، تمامی آنها سالم تشخیص داده شدند (جدول ۸). حساسیت و اختصاصیت روش مورد استفاده در این مطالعه به شرح زیر

دقیقه)، غیرمخرب و بدون نیاز به هرگونه واکنشگر برای پیش‌تشخیص آلودگی سرم انسانی به ویروس HIV-1 و نیز تمایز نمونه‌های آلوده از سالم استفاده کرد.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از همکاری مدیریت و کارکنان محترم مراکز تحقیقی و بهداشتی - درمانی که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند و نیز از همکاری مهندس احمدی از پژوهشکده فیزیک پژوهشگاه دانش‌های بنیادی و دکتر فرامرزی از دانشکده داروسازی دانشگاه تهران، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- 1- Unaid.org [homepage on the Internet]. The Association; c1996-2009 [updated 2009 Aug 2; cited 2007 Nov 20]. The impact of AIDS on people and societies, report on the global AIDS epidemic. Available from: <http://www.unaids.org>
- 2- Holes CB, Losina E, Walensky RP, Yazdanpanah Y, Freedberg KA. Review of human immunodeficiency virus type 1 related opportunistic infections in Sub-Saharan Africa. *Clin Infect Dis*. 2003;5:656-62.
- 3- Klein SA, Karsten S, Ruster B, Klebba C, Pape M, Ottmann OG, et al. Comparison of TaqMan real-time PCR and p24 ELISA for quantification of in vitro HIV-1 replication. *J Virol Methods*. 2003;107:169-75.
- 4- Jackson BR, Busch MP, Stramer SL, Aubuchon JP. The cost-effectiveness of NAT for HIV, HCV and HBV in whole-blood donations. *Transfusion*. 2003;43:721-9.
- 5- Ciurczak EW, Drennen JK. Pharmaceutical and medical applications of near-infrared applications: Practical spectroscopy. New York: Marcel Dekker Inc; 2002.
- 6- Nioka S, Chance B. NIR spectroscopic detection of breast cancer. *Technol Cancer Res Treat*. 2005;4:497-512.
- 7- Konig K. Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc*. 2000;200:83-104.
- 8- Murayama K, Yamada K, Tsenkova R, Ozaki Y. Near-infrared spectra of serum albumin and gamma-globulin and determination of their concentrations in phosphate buffer solutions by partial least squares regression. *Vib Spectrosc*. 1998;18:33-40.
- 9- Hall JW, Pollard A. Near-infrared spectrophotometry: A new dimension in clinical chemistry. *Clin Chem*. 1992;38:1623-31.
- 10- Heise HM, Marbach R, Koschinsky T, Gries FA. Noninvasive blood glucose sensors based on near-infrared spectroscopy. *Artif Organs*. 1994;18:439-47.
- 11- Peuchant E, Salles C, Jensen R. Determination of serum cholesterol by near-infrared reflectance spectrometry. *Anal Chem*. 1987;59:1816-9.
- 12- Hirosawa N, Sakamoto Y, Katayama H, Tonooka S, Yano K. In vivo investigation of progressive alterations in rat mammary gland tumors by near-infrared spectroscopy. *Anal Biochem*. 2002;305:156-65.
- 13- Hall JW, Pollard A. Near-infrared spectroscopic determination of serum total proteins, albumin, globulins and urea. *Clin Biochem*. 1993;26:483-90.
- 14- Navratil M, Norberg A, Lembren L, Mandenius CF. On-line multi-analyzer monitoring of biomass, glucose and acetate for growth rate control of a *Vibrio cholerae* fed-batch cultivation. *J Biotechnol*. 2005;115:67-79.
- 15- Arnold SA, Gaensakoo R, Harvey LM, McNeil B. Use of

استفاده از روش‌های آنالیز چندمتغیره برای مشخص کردن اجزاء مورد نظر و مقدار آنها در یک ترکیب ضروری است. در آنالیز چندمتغیره از مدل‌های مختلفی برای پردازش و آنالیز داده‌های طیف‌های NIR استفاده شده است. در مطالعه‌ای که به منظور تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد فسفولیپید موجود در پلاسما افراد مبتلا به بیماری لوپوس اریتماتوزیس توسط جونزو نوجیما و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام شد [۲۸]، مدل SIMCA مورد استفاده قرار گرفت که حساسیت آن در تشخیص نمونه‌های بیمار ۸۷/۵٪ و اختصاصیت آن در مورد نمونه‌های سالم ۹۱/۷٪ بوده است.

در تحقیق دیگر که توسط آکیکازو ساکودو و همکاران [۲۹] برای تشخیص سندروم خستگی مزمن (CFS) با استفاده از سرم افراد بیمار انجام پذیرفت نیز از مدل فوق‌الذکر استفاده شد که نتایج حاصله دلالت بر حساسیت ۹۳/۳٪ در تشخیص نمونه‌های بیمار و اختصاصیت ۱۰۰٪ در مورد نمونه‌های سالم داشته است. همچنین در سال ۲۰۰۵ ساکودو و همکاران، مطالعه‌ای را روی ۷ نمونه پلاسما آلوده به ویروس HIV-1 و ۵ نمونه سالم، از طیف‌سنجی نزدیک مادون قرمز برای تشخیص آلودگی به ویروس مذکور و سنجش و مقایسه میزان آنتی‌ژن اختصاصی ویروس HIV-1(P24) با میزان حاصل از آزمایش الایزا انجام دادند. در این مطالعه از یکی دیگر از مدل‌های آنالیز چندمتغیره به نام حداقل مجذور ناتمام (PLS) برای آنالیز داده‌های طیف‌سنجی استفاده شد و ارتباط قابل قبولی بین میزان غلظت P24 حاصل از الایزا و طیف‌سنجی نزدیک مادون قرمز (با ضریب همبستگی $R^2 = 0.7319$) به دست آمد [۳۰]. در تحقیقی، ماشین بردار پشتیبان (SVM) به عنوان یکی از روش‌های آنالیز چندمتغیره برای آشکارسازی چهره، مورد استفاده قرار گرفت که نرخ آشکارسازی قابل قبولی نیز در پی داشت [۳۱].

در مقایسه با مطالعات ذکر شده در بالا، نتایج به دست آمده در این تحقیق که در آن از طیف‌سنجی نزدیک مادون قرمز همراه با ماشین بردار پشتیبان استفاده شده و حساسیت ۹۱٪ و اختصاصیت ۹۵٪ در بر داشته است، بیانگر قابلیت استفاده از این روش به عنوان روش پیش‌تشخیصی، قبل از انجام آزمایشاتی مانند الایزا و PCR است که علی‌رغم وقت‌گیر بودن و پرهزینه بودن دارای حساسیت و دقت بالایی هستند. حساسیت روش مورد استفاده در این مطالعه در تشخیص و تمایز نمونه‌های آلوده و سالم، با یکسان کردن و ثابت نگه داشتن شرایطی از قبیل فواصل زمانی بین خونگیری و انجام طیف‌سنجی، انجماد و ذوب نمونه‌ها و دفعات آن، دما و رطوبت و نیز افزایش تعداد نمونه‌های مورد بررسی قابل افزایش است.

نتیجه‌گیری

می‌توان از ترکیب طیف‌سنجی نزدیک مادون قرمز (NIR) و روش آنالیز چندمتغیره ماشین بردار پشتیبان (SVM) که یکی از روش‌های آنالیز چندمتغیره است، به عنوان ابزاری نوین، سریع (تشخیص در ۱

- pattern recognition, data mining and knowledge discovery. Lucent. 1998;2(2):955-74.
- 24- Vapnick VN. The nature of statistical learning theory. 2nd ed. New York: Springer; 2000.
- 25- Leitner T, Korovina G, Marquina S, Smolskaya T, Albert J. Molecular epidemiology and MT-2 cell tropism of Russian HIV type1 variant. AIDS Res Hum Retrovir. 1996;12:1595-603.
- 26- Stewart A, Mcpherson K. Basic statistics and epidemiology: A practical guide. Edinburgh: Press Ltd; 2007.
- 27- Jackson BR, Busch MP, Stramer SL, Aubuchon JP. The cost-effectiveness of NAT for HIV, HCV and HBV in whole-blood donations. Transfusion. 2003;43:721-9.
- 28- Nojima J, Sakudo A, Hakariya Y, Kuratsune H, Watanabe Y, Kanakura Y, et al. Spectroscopic diagnosis of anti-phospholipid antibodies by visible and near-infrared spectroscopy in SLE patients' plasma samples. Biochem Biophys Res Commun. 2007;362(2):522-4.
- 29- Sakudo A, Hakariya Y, Kobayashi T. Visible and Near Infrared (Vis-NIR) spectroscopy: Introduction and perspective for diagnoses of chronic fatigue syndrome. Biochem Biophys Res Commun. 2006;345(4):1513-6.
- 30- Iwabu Y, Warachit J, Li S, Morita K, Onozuka T, Tsenkova R. A novel diagnostic method for human immunodeficiency virus type-1. Microbiol Immunol. 2005;49(7):695-701.
- 31- Mirjalili G, Rhi M, Sadeghi MT. New method for face detection using support vector machines. Ferdosi University of Mashad; First Congress of Intelligent Systems, 2008. [Persian]
- at-line and in-situ near-infrared spectroscopy to monitor biomass in an industrial fed-batch Escherichia coli process. Biotechnol Bioeng. 2002;80:405-13.
- 16- Hock C, Villringer K, Muller-Spahn F, Hofmann M. Near infrared spectroscopy in the diagnosis of Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci. 1996;777:22-9.
- 17- Simick MK, Jong R, Wilson B, Lilge L. Non-ionizing near-infrared radiation transillumination spectroscopy for breast tissue density and assessment of breast cancer risk. J Biomed. 2004;9:794-803.
- 18- Gabriely, Wozniak R, Mevorach M, Kaplan J, Aharon Y, Shamon H. Transcutaneous glucose measurement using near-infrared spectroscopy during hypoglycemia. Diabetes Care. 1999;22:2026-32.
- 19- Robinson MR, Eaton RP, Haaland DM, Koepp GW, Thomas EV, Stallard BR, et al. Noninvasive glucose monitoring in diabetic patients: A preliminary evaluation. Clin Chem. 1992;38:1618-22.
- 20- Shinoura N, Yamada R. Decreased vasoreactivity to right cerebral hemisphere pressure in migraine without aura: A near-infrared spectroscopy study. Clin Neurophysiol. 2005;116:1280-5.
- 21- Iwamoto M, Kawano S. Advantages and disadvantages of NIR applications for the food industry. In: Murray I, Cowe AI, editors. Making light work: Advances in near infrared spectroscopy. New York: Infrared Spectroscopy; 1992.
- 22- Haykin S. Neural networks a comprehensive foundation. 2nd ed. New York: Prentice-Hall Inc; 1999.
- 23- Burger CJC. A tutorial on support vector machines for