جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۰، شماره ۲: از ۳۵-۴۱
تابستان ۱۳۸۶

به‌کارگیری یک روش حساس RT-Nested PCR برای تشخیص ویروس هپاتیت C

کیانا شاهزمانی[۱]، فرزانه صباحی[۲*]، شاهین مرآت[۳]، حوری رضوان[۴]، سیامک میراب سمیعی[۵]، محسن کریمی ارزنانی[۶]، رامین نقی‌زاده[۷]

۱ـ دانشجوی دکتری، گروه ویروس‌شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲ـ دانشیار، گروه ویروس شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳ـ دانشیار، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴ـ استاد، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران
۵ـ استادیار، آزمایشگاه‌های تحقیقاتی کنترل غذا و دارو، تهران، ایران
۶ـ دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، دانشگاه کارولینسکا، سوئد
۷ـ کارشناس ارشد، آزمایشگاه تخصصی بیمارستان دی، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۶/۴/۲۳ پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۱۱

چکیده

هدف: ویروس هپاتیت C یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده هپاتیت ویروسی به شمار می‌رود و تشخیص آن در نمونه‌های مشکوک از اهمیت بالایی برخوردار است. خطر انتقال عفونت ویروسی از طریق تزریق خون و فرآورده‌های آن ناشی از نقص روش‌های غربالگری سرولوژیک در تشخیص اهداکنندگان آلوده‌ای است که در دوره پنجره بیماری هستند. بنابراین تشخیص دقیق و به‌موقع عفونت HCV پیش از ظهور آنتی‌بادی در بدن فرد آلوده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تشخیص ژنوم ویروس HCV در نمونه‌های مشکوک، از گسترش بیماری و شیوع روزافزون آن جلوگیری خواهد نمود. با استفاده از این روش که مبتنی بر شناسایی اسید نوکلئیک ویروس است، می‌توان عفونت را در مراحل ابتدایی و قبل از ظهور آنتی‌بادی‌های اختصاصی تشخیص داد. هدف از این پژوهش طراحی روش بسیار حساس و دقیق RT-Nested PCR برای تشخیص عفونت HCV است.

مواد و روش‌ها: روش RT-Nested PCR به‌منظور جداسازی توالی حفاظت شده از ناحیه 5' UTR راه‌اندازی و به کار برده شد. ابتدا با استفاده از روش ترانس کریپتاز معکوس، سنتز cDNA از روی RNA ژنوم ویروس صورت گرفت. پس از آن با روش Nested PCR با استفاده دو جفت آغازگر اختصاصی و طی دو مرحله، قطعه مورد نظر تکثیر شد. محصولات PCR به کمک روش الکتروفورز بررسی و همچنین از کیت تجاری RT-PCR یک مرحله‌ای برای مقایسه با نتایج حاصل از روش طراحی شده استفاده شد.

نتایج: تعداد ۲۵ نمونه پلاسمای بیماران HCV مثبت که توسط روش‌های الایزا و وسترن بلات مثبت قطعی تشخیص داده شده بودند به‌عنوان نمونه‌های مثبت، رقت‌های مختلف از یک نمونه بیمار با تیتر بالا به‌عنوان استاندارد و ۲۵ نمونه پلاسمای منفی متعلق به اهداکنندگان خون سالم به‌عنوان کنترل منفی جمع‌آوری شده با این روش بررسی شد. در تمام موارد مثبت، باند مورد نظر روی ژل آگارز مشاهده شد. با توجه به این که در هیچ‌یک از نمونه‌های منفی باند مزبور ملاحظه نشد، مقایسه نتایج حاصل از روش طراحی شده با روش تجاری موجود همبستگی خوبی را نشان داد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، مشخص شد که روش راه‌اندازی شده در تشخیص عفونت HCV از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار است. همچنین با توجه به حساسیت این روش، به‌نظر می‌رسد که می‌توان ژنوم ویروس را پیش از تغییرات سرمی و ظهور آنتی‌بادی‌ها تشخیص داد و از این رو می‌توان دوره پنجره را کوتاه‌تر نمود.

کلیدواژگان: PCR دوگانه، RT-PCR، ویروس هپاتیت C، ناحیه 5' UTR.

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

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۱ـ مقدمه

هپاتیت C یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد هپاتیت مزمن در کشورهای توسعه یافته است. طبق آمار سازمان بهداشت بیش از ۱۷۰ میلیون نفر در دنیا مبتلا به هپاتیت C هستند که در اروپا، امریکا و بسیاری از نقاط مختلف دنیا مشاهده می‌شود. طبق آمار مرکز کنترل بیماری‌ها در امریکا، تنها در این کشور ٤ میلیون نفر مبتلا به هپاتیت C هستند که هر سال حدود ده هزار مرگ را سبب می شود [۱-۳]. به‌نظر می‌رسد که شیوع این بیماری در ایران کمتر از ۱ درصد باشد که این میزان بسیار پایین‌تر از سایر کشورهای منطقه است. عامل این عفونت در کشور ما اکثراً به علت استفاده از داروی تزریقی در بین معتادان تزریقی و سرنگ‌های مشترک گزارش شده است. از سوی دیگر، افزایش تعداد مراکز همودیالیز (Haemodialysis) و تسهیلات انتقال خون برای هموگلوبینوپاتی‌ها (Hemoglobinopathies) منابع جدید و جوامع حساسی در ایران به‌وجود آورده است. موقعیت کشور ایران در خاورمیانه همانند یک پل ارتباطی بین شبه قارهٔ هند، شبه جزیره عربستان، آسیای میانه و اروپاست. این موقعیت جغرافیایی، مهاجرت‌های دسته‌جمعی از افغانستان و عراق، مسافرت‌های پی در پی از مرزهای غربی به ترکیه، قاچاق مواد مخدر از مرزهای شرقی - پاکستان و افغانستان - همگی روی اپیدمیولوژی ویروس هپاتیت C (Hepatitis C Virus :HCV) در این کشور تأثیر می‌گذارند [٤].

این احتمال وجود دارد که در دهه‌های آینده تعداد افراد مبتلا به سیروز (Cirrhosis) کبدی و سرطان افزایش یابد، مگر اینکه راه‌های پیشگیری و مبارزه با آن به‌طور جدی مورد اجرا قرار گیرد. بنابراین با توجه به اهمیت بیماری و گسترش روزافزون آن، نیاز به روش‌های تشخیصی با کارآیی بالاتری است تا بتوان از حجم فزاینده مبتلایان به بیماری کبدی و سرطان کبد کاست یا آن را متوقف کرد.

در حال حاضر مهم‌ترین و متداولترین روش‌های تشخیصی برای تشخیص عفونت HCV شامل روش EIA (Enzyme Immuno Assay) به‌منظور جستجوی آنتی بادی و روش وسترن بلات برای تأیید عفونت است [۵-۹].

اهمیت مرحله پنجره در سیر بیماری و انتقال عفونت از مبتلایان به افراد سالم، بالا بودن بار ویروس در این مرحله و نیز عدم کارایی روش‌های سرولوژیک، استفاده از روش مولکولی RT-Nested PCR (Reverse Transcriptase-Nested PCR) را به‌عنوان یک روش تشخیصی با حساسیت و ویژگی بالا در مقایسه با سایر روش‌ها مطرح می‌نماید.

هدف از این پژوهش، راه‌اندازی روش RT-Nested PCR به‌منظور تشخیص ویروس هپاتیت C در مبتلایان به این بیماری است. برای این منظور از آغازگرهای اختصاصی برای ناحیه کاملاً حفاظت شده 5'UTR (Un-translated region) ژنوم HCV استفاده شد. این روش علاوه بر حساسیت و ویژگی بالا، دارای سهولت کاربرد و قیمت ارزان نیز است و از آن می‌توان به راحتی در مراکز تشخیصی استفاده نمود. همچنین با توجه به اینکه روش‌های سرولوژیک برای بیماران همودیالیزی و شیمی درمانی دارای نقص ایمنی، از کارایی کمتری برخوردار است، این روش می‌تواند یک راه مناسب برای تشخیص عفونت در بیماران مزبور باشد [۹،۱۲].

PCR دوگانه (RT-Nested PCR)، روشی است که در آن از دو جفت آغازگر اختصاصی برای تکثیر یک قطعه از ژن مورد نظر استفاده می‌شود [۱۰،۱۱]. جفت اول (آغازگرهای خارجی) توالی مورد نظر را در مرحله اول تکثیر می‌کنند و جفت دوم (آغازگرهای داخلی) به نواحی داخلی محصولات اولیه متصل شده و محصولات نهایی را تکثیر می‌کنند. بنابراین حساسیت و اختصاصیت به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد [۱۰-۱۲]. هدف از به‌کارگیری این روش آن است که در صورت تکثیر نابه‌جا یا اشتباهی در مرحله اول، در مرحله دوم تکثیری صورت نخواهد گرفت. ضمن اینکه مرحله دوم تأییدی بر صحت محصول تکثیر یافته در مرحله اول خواهد بود [۱۳].

۲ـ مواد و روش‌ها

۲ـ۱ـ طراحی آغازگرها

ابتدا توالی مربوط به ناحیه حفاظت شده 5' UTR از بانک ژنی به‌دست آمد. سپس آغازگرهای خارجی و داخلی تکثیرکننده قطعه هدف با استفاده از نرم افزار طراحی آغازگر (Gene Runner) طراحی و انتخاب شد (جدول ۱). با استفاده از این آغازگرها و با توجه به محل اتصال آن‌ها طول قطعه تکثیر یافته برای دور اول PCR، ۲٦٤ جفت باز و برای دور دوم PCR، ۱۷۵ جفت باز است.

جدول ۱ توالی آغازگرهای خارجی و داخلی برای تشخیص HCV

P1	5'–AGC GTC TAG CCA TGG CGT-3'	18nt
P2	5'–GCA CGG TCT ACG AGA CCT-3'	18nt
P3	5'–GTG GTC TGC GGA ACC GG-3'	17nt
P4	5'–GGG CAC TCG CAA GCA CCC-3'	18nt

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۲ـ۲ـ جمع‌آوری نمونه و استخراج RNA ویروسی

۲۵ نمونه پلاسمای بیماران HCV مثبت که آزمایش الایزای (Enzyme Linked Immunosorbent Assay :ELISA) آن‌ها مثبت شده و آزمایش تأییدی وسترن بلات آن‌ها هم مثبت بود و آزمایش یاد شده را تأیید کرده بود؛ از مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان شریعتی تهران تهیه شد. تمامی این نمونه‌ها از نظر وجود آنتی‌بادی ضد ویروس نقص ایمنی انسان نوع ۱ (Human Immunodeficiency Virus Type-1 :HIV-1) به روش ELISA بررسی شده و همگی منفی بودند. به دلیل عدم دسترسی به پانل استاندارد WHO (World Health Organization)، رقت‌های مختلف از یک نمونه بیمار با تیتر بالا (10^5 کپی در هر میلی‌لیتر) که توسط روش کوباس آمپلی کور (Cobas Amplicor) تعیین تیتر شده بود، تهیه شده و به‌عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. به علاوه از ۲۵ نمونه متعلق به اهداکنندگان خون سالم به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (جدول ۲).

۱۴۰ میکرولیتر از پلاسما برای استخراج RNA ویروس استفاده شد. استخراج RNA ویروس با استفاده از کیت استخراج Qiagen (QIAamp Viral RNA Mini Kit) و مطابق با برنامه شرکت سازنده صورت گرفت. بعد از استخراج RNA، واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده و کیت RT-PCR یک مرحله‌ای (Qiagen، آلمان) روی تمامی نمونه‌ها انجام شد.

۲ـ۳ـ سنتز cDNA

RNA استخراج شده بلافاصله برای انجام مرحله ترانس کریپتاز معکوس و سنتز cDNA استفاده شد. ابتدا ۹/۵ میکرولیتر RNA به یک لوله اضافه شده، سپس لوله مزبور به دستگاه ترموسایکلر (Biometra, Master Cycler Gradient) منتقل و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از طی این زمان و در مرحله بعد، ٤ میکرولیتر بافر آنزیم RT، ۲۰ واحد آنزیم RT، ۲۰ واحد آنزیم آرناسین (RNasin)، ۲ میکرولیتر دی تیوتریتول (dithiothreitol :DTT)، ۲ میکرولیتر از مخلوط ۰/۲ مولار دزوکسی نوکلئوتیدها (dNTP) (Roche، آلمان) و یک میکرولیتر آغازگر اختصاصی آنتی‌سنس(Antisense) P2 (با غلظت ۱۲ پیکومول) به آن اضافه (حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) و سپس مجدداً به دستگاه ترموسایکلر منتقل شد. در این مرحله مخلوط فوق به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و یک ساعت در دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس cDNA سنتز شده به‌عنوان الگو برای مرحله بعد استفاده شد.

جدول ۲ خصوصیات فردی نمونه های مثبت و منفی

HCV	مثبت		منفی	
خصوصیات فردی	فرکانس	درصد	فرکانس	درصد
جنس				
مرد	۱٦	٦٤	۲۰	۸۰
زن	۹	۳٦	۵	۲۰
گروه سنی				
۲۵>=	۱	٤	۷	۲۸
۳۵-۲٦	۸	۳۲	۷	۲۸
٤۵-۳٦	٦	۲٤	٤	۱٦
۵۵-٤٦	۸	۳۲	٦	۲٤
۵٦<=	۲	۸	۱	٤
میزان تحصیلات				
دیپلم یا کمتر	۲۱	۸٤	۲۲	۸۸
فوق دیپلم	۱	٤	۰	۰
لیسانس یابیشتر	۳	۱۲	۳	۱۲
وضعیت تاهل				
مجرد	۱۱	٤٤	٦	۲٤
متاهل	۱۳	۵۲	۱۹	۷٦
جدا شده	۱	٤	۰	۰

۲ـ٤ـ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

دور اول PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱X، $MgCl_2$ (۱/۵ میلی‌مولار)، ۵ میکرولیتر از cDNA، ۱ میکرولیتر از آغازگرهای خارجی (هر یک ۱۲پیکومول) P1 و P2، مخلوط dNTP ۰/۲۲ میلی‌مولار و یک واحد آنزیم تگ DNA پلیمراز (Taq DNA Polymerase) با افزودن یک قطره روغن معدنی (Mineral Oil) به سطح آن تحت شرایط زیر انجام گرفت:

۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل مرحله واسرشتگی (Denaturation)، ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه، مرحله جفت شدن (Annealing) (اتصال آغازگرها)، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه، مرحله طویل شدن (Extension)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه و در نهایت یک مرحله طویل شدن نهایی به مدت ۵ دقیقه.

سپس از محصول دور اول به‌عنوان الگویی برای دور دوم استفاده شد. مواد و شرایط دور دوم به قرار زیر است:

۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱X، ۰/۷ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱/۵ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر از محصول PCR دور اول، ۱ میکرولیتر (۱۲ پیکومول)

از آغازگرهای داخلی P3 و P4، مخلوط dNTP ۰/۲ میلی‌مولار به همراه یک واحد آنزیم تگ DNA پلیمراز را در یک لوله ۰/۲ میلی‌لیتری اپندورف (Eppendorf) ریخته (حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر) یک قطره روغن معدنی به سطح آن اضافه شد. آنگاه دور دوم مطابق با برنامه زیر انجام شد:

۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ دقیقه، ۲۵ چرخه شامل مراحل واسرشتگی، ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه، جفت شدن، ٦٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه، طویل شدن، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مرحله طویل شدن نهایی.

۲ـ۵ـ ژل الکتروفورز

۱۰ میکرولیتر از محصول دور دوم PCR با یک میکرولیتر از بافر نمونه‌گذاری ۱۰X مخلوط و روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) منتقل شد. پس از آن ژل مزبور در بافر TBE ۱X (Tris-borate-EDTA) به مدت یک ساعت با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد. با پایان یافتن زمان الکتروفورز ژل به دستگاه ژل داک (Gel Doc) منتقل شد و با اشعه ماورای بنفش (Ultraviolet: UV) باندها مشاهده و تصویر آن‌ها ثبت شد.

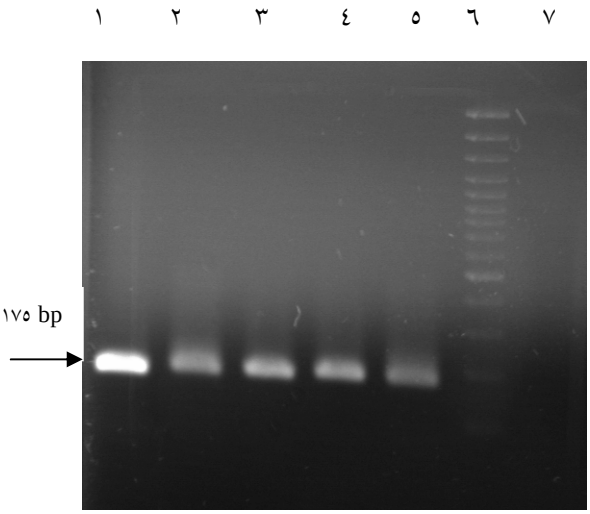
۲ـ٦ـ روش RT-PCR یک مرحله‌ای

برای انجام این آزمایش از RNA حاصل از پلاسمای بیماران به‌عنوان الگو استفاده شد. آزمایش RT-PCR با استفاده از کیت تجاری RT-PCR یک مرحله‌ای و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

۳ـ نتایج

RT-Nested PCR طراحی شده روی ۲۵ نمونه پلاسمای HCV مثبت متعلق به بیماران آلوده انجام شد. به علاوه کارایی این روش روی ۲۵ نمونه پلاسمای HCV منفی تأیید شده مورد بررسی قرار گرفت. در تمام نمونه های مثبت، باند ۱۷۵ کیلودالتونی مشاهده شد.در حالی که در هیچ‌یک از نمونه های منفی باند مزبور مشاهده نشد (شکل ۱).

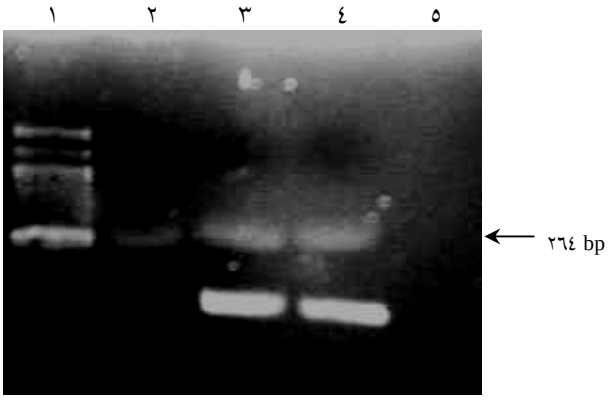
لازم به ذکر است که در این روش پس از آن که محصولات دور اول روی ژل آگارز برده شد، یک باند ۲٦٤ bp نسبتاً واضح در تمامی نمونه‌های مثبت قابل مشاهده بود اما درهیچ‌یک از نمونه‌های منفی این باند دیده نشد (شکل‌های ۲و۳). به علاوه در مراحل بهینه‌سازی این پژوهش تأثیر قابل ملاحظه میزان برداشت الگو برای انجام دور دوم واکنش PCR مشاهده شد.



شکل ۱ محصول نهایی واکنش PCR در دور دوم

چاهک ۱ مربوط به کنترل مثبت؛ **چاهک‌های ۲، ۳، ٤ و ۵** مربوط به نمونه‌های بیماران؛ **چاهک ٦** مربوط به نشانگر وزنی ۱۰۰ bp؛ **چاهک ۷** مربوط به کنترل منفی

از آنجایی که بهینه‌سازی واکنش PCR برای تشخیص میزان کم ژنوم ویروس در نمونه بالینی بسیار حایز اهمیت است؛ در این مطالعه رقت‌های مختلف محصولات مرحله اول و مقادیر متفاوت از یون $MgCl_2$ بررسی شد. همچنین با کمک شیب دمایی مناسبترین دما برای هر دور PCR تعیین شد. در نتایج حاصل از این پژوهش، غلظت بهینه $MgCl_2$، ۱/۵ میلی‌مولار بود و دمای بهینه برای دور اول و دوم PCR به ترتیب ۵۸ و ٦٤ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد.



شکل ۲ محصول نهایی واکنش PCR در دور اول

چاهک ۱ مربوط به نشانگر وزنی kb۱؛ **چاهک ۲** مربوط به کنترل مثبت؛ **چاهک‌های ۳ و ٤** مربوط به نمونه‌های بیماران؛ **چاهک ۵** مربوط به کنترل منفی

جدول ۳ تعیین میزان مثبت بودن رقت‌های سریال نمونه با تیتر ویروسی بالا

تعداد نسخه در هر میلی لیتر	تعداد تکرار آزمایش	میزان مثبت بودن
۱۰۰۰۰۰	۵	۵/۵
۱۰۰۰۰	۵	۵/۵
۱۰۰۰	۵	۵/۵
۵۰۰	۵	۵/۵
۲۰۰	۵	۵/۵
۱۰۰	۵	۲/۵

جدول ٤ تعیین حساسیت و ویژگی روش RT-Nested PCR راه‌اندازی شده

نمونه‌های مورد مطالعه	نتایج به‌دست آمده از روش RT-Nested PCR طراحی شده		
	مثبت	منفی	مثبت و منفی کاذب
نمونه‌های مثبت (۲۵)	۲۵	۰	۰
نمونه‌های منفی تأیید شده (۲۵)	۰	۲۵	۰
نمونه استاندارد (۱۰)			
مثبت (٦)	٦	۰	
منفی (٤)	۰	٤	
مجموع نتایج (حساسیت و ویژگی)	۳۱ (۱۰۰)	۲۹ (۱۰۰)	۰ (۰)

برای ارزیابی حساسیت این روش از نمونه پلاسمای یک بیمار مبتلا به HCV با تیتر ویروسی ۱×۱۰^{۵} کپی در هر میلی‌لیتر (با استفاده از روش کمی کوباس آمپلی‌کور)، رقت‌های سریال تهیه شد. جدول ۳ حساسیت روش راه‌اندازی شده را نشان می‌دهد. ویژگی این روش نیز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و فقدان واکنش مثبت کاذب با ژنوم انسانی یا ویروسی مورد تأیید قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل میزان حساسیت و ویژگی این روش محاسبه شد (جدول ٤). در آخر، نتایج حاصل از آزمایش RT-PCR با استفاده از کیت تجاری RT-PCR یک مرحله‌ای با روش راه‌اندازی شده در این تحقیق مقایسه شد (جدول ۵).

٤ـ بحث

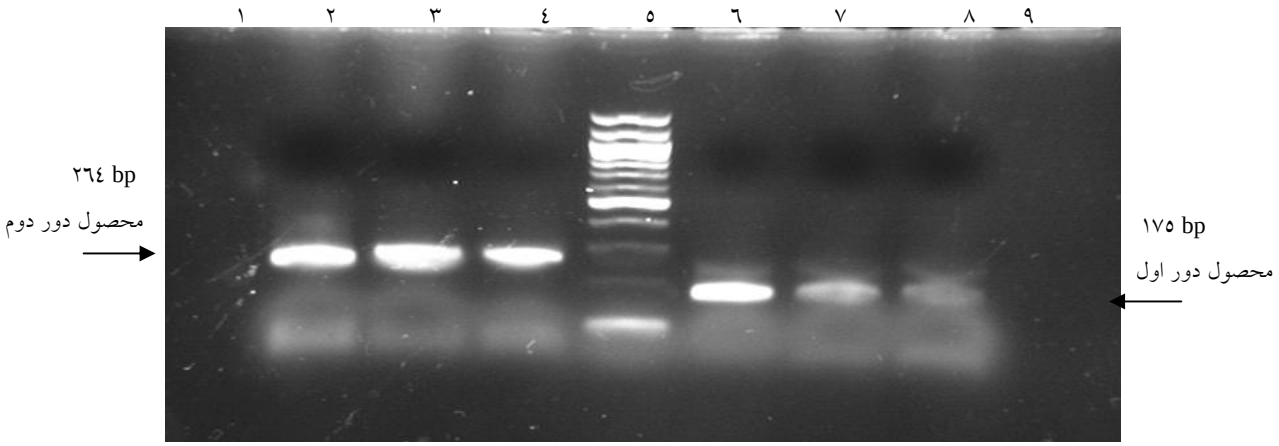
تا سال ۱۹۹۰، غربالگری خون و تشخیص انتقال ویروس به‌طور کامل بر پایه روش‌های سرولوژی استوار بود. علیرغم حساسیت بالای این روش‌ها در کاهش خطر انتقال ویروس بعد از تزریق خون، خطر انتقال HCV در آمریکا و اروپای غربی همچنان باقی است و در حدود ۱ در ٤۹۳۰۰۰ تزریق خون تخمین زده شده است [١٤]. برای کاهش این خطر، آزمون‌های مبتنی بر شناسایی و تکثیر اسید نوکلئیک (Nucleic Acid Tests :NATs) برای تشخیص ژنوم HCV توسعه یافته است. این آزمون‌ها، مزیت تشخیص مستقیم و بسیار اختصاصی عوامل عفونی نظیر HCV را با حساسیت تحلیل‌گرایانه که بسیار بالاتر از روش‌های سرولوژی تجاری است، درهم آمیخته است [١٤].

جدول ۵ مقایسه روش RT-PCR یک مرحله‌ای (شرکت Qiagen) با روش RT-PCR راه‌اندازی شده

تعداد نمونه بیماران	روش RT-PCR راه‌اندازی شده	روش RT-PCR یک مرحله‌ای
نمونه‌های مثبت (۲۵)	+	+
نمونه‌های منفی تأیید شده (۲۵)	–	–
نمونه استاندارد (۱۰)		
مثبت (٦)	+	+
منفی (٤)	–	–

غربالگری ژنومی HCV، گامی اساسی برای شناسایی خون‌های آلوده جمع‌آوری شده در خلال دوره پنجره، تشخیص موارد نادر عفونت‌های خاموش و نیز شناسایی طیف گسترده‌ای از واریانت‌های (Variants) ویروس به شمار می‌رود [۱۸،١٤]. نکته‌ای که در رابطه با آزمون‌های سرولوژیک وجود دارد، آن است که این آزمون‌ها فقط ابتلا به هپاتیت C را نشان می‌دهند و قادر نیستند عفونت‌های حاد، مزمن یا بهبود یافته را از هم متمایز نمایند. از سوی دیگر، تشخیص عفونت ویروسی در دوره پنجره یعنی قبل از ظهور آنتی‌بادی در خون، بسیار با اهمیت است. در چنین شرایطی لازم است تا از HCV RNA برای ارزیابی دقیق فعالیت و تکثیر ویروس استفاده شود [١١-١٤]. چنانچه روشی بتواند این مرحله از عفونت را شناسایی کند از اهمیت به سزایی در تشخیص و درمان بیماری برخوردار خواهد بود. روش RT-Nested PCR طراحی شده در این پژوهش دارای این مزیت است.

با توجه به نتایج حاصل به‌نظر می‌رسد که روش RT-Nested PCR



شکل ۳ محصول نهایی واکنش PCR در دور اول و دوم و اندازه آن‌ها

چاهک ۱ مربوط به کنترل منفی؛ **چاهک ۲** مربوط به کنترل مثبت؛ **چاهک‌های ۳ و ٤** مربوط به نمونه‌های بیماران؛ **چاهک ۵** مربوط به نشانگر وزنی ۱ kb

راه‌اندازی شده در مقایسه با روش‌های سرولوژیک تشخیص HCV از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار است. در حال حاضر افق‌های تازه‌ای در ارتباط با روش‌های تشخیصی HCV فراروی محققین قرار دارد. روش RT-PCR یکی از متداول‌ترین این روش‌ها است که قادر است به‌طور متوسط ۱۲–۱۵ روز قبل از تشکیل آنتی‌بادی (مرحله پنجره) ژنوم ویروس را در خون مبتلایان به HCV نشان دهد [۱۷،۱٦]. با توجه به هزینه بسیار بالای کیت‌های تجاری روش Real Time PCR و نیاز به تجهیزات پیشرفته، استفاده از این روش محدود به مراکز تحقیقاتی بوده و در اغلب مراکز تشخیصی قابل استفاده نیست. بنابراین برای تشخیص به موقع عفونت می‌توان از روش‌های کم‌هزینه‌تر مانند PCR به‌عنوان جایگزینی مناسب استفاده نمود. روش راه‌اندازی شده در این مطالعه در مقایسه با روش‌های تجاری موجود از حساسیت و ویژگی مناسبی برخوردار است. علت این امر به‌کارگیری روش نستد (Nested) و نیز انتخاب آغازگرهای اختصاصی از ناحیه 5' UTR ژنوم است که در میان انواع ژنوتایپ‌ها (Genotypes) وساب‌تایپ‌های (Subtypes) این ویروس حفاظت شده است. به علاوه این روش قادر است تا حدود ۲۰۰ کپی از ژنوم ویروس را در نمونه بیماران ردیابی کند. بنابراین حساسیت و ویژگی آن نسبت به روش‌های موجود افزایش یافته است. از طرفی هزینه انجام این روش نیز نسبت به کیت‌های تجاری موجود بسیار کمتر بوده و نیاز به خریداری کیت‌های خارجی را مرتفع می‌سازد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، می‌توان از این روش در مراکز تشخیصی استفاده نمود و دوران پنجره را کوتاه‌تر کرد. تشخیص دقیق و به موقع بیماری از گسترش عفونت جلوگیری نموده، فرصت مناسبی را برای درمان مؤثر و کارآمد این بیماران فراهم می‌نماید [۱۱، ۱۸].

۵ـ منابع

[1] Barienschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C Virus. J Gen Virol 2000; 81: 1631-48.

[2] Alavian SM, Gholami B, Masarat S. Hepatitis B and C virus infection: Hepatitis C risk factors in Iranian blood donors; a case-control study. J Gastroenterocl and Hepatol 2002; 17: 1022-97.

[3] Kim WR. The burden of hepatitis C in the United States. Hepatology 2002; 36: S30-4.

[4] Alavian SM, Adibi P, Zali MR. Hepatitis C Virus in Iran: epidemiology of an emerging infection. Arch Iranian Med 2005; 8(2): 84-90.

[5] Rezvan H, Ahmadi J, Farhadi M. A preliminary study on the prevalence of anti-HCV among healthy blood donors in Iran. Vox Sang 1994; 67:100-10.

[6] Carithers RL, Marquarot A, Gretch DR. Diagnostic testing for hepatitis C. Semin Liver Diseases 2000; 20: 159-71.

[7] Gallarda JL, Dragon E. Blood screening by nucleic acid amplification technology: current issues, future challenges. Molecular Diagnostics 2000; 5: 11-22.

[8] Yerly S, Pedrocchi M, Perrin L. The use of polymerase chain reaction in plasma pools for the concomitant detection of hepatitis C virus and HIV type 1- RNA. Transfusion 1998; 38: 908-14.

[9] Sukanya R, Thermozhi S, Dolly D. Occurrence of false positive results during testing for antibodies of hepatitis C virus among volunteer blood donors in India. J Clinl Microbiol 2003; 1788-90.

[10] Cristiano K, Bisceglie AM, Hoofnagle JH, Feinstone SM. Hepatitis C Viral RNA in Serum of patients with Chronic Non-A, Non-B Hepatitis: Detection by the polymerase chain Reaction Using Multiple primer. Hepatology 1991; 51-5.

[11] Meng Q, Wong C, Rangachari A, Tamatsukuri M, Fliss E. Automated multiplex assay for simultaneous detection of Hepatitis B virus, Hepatitis C virus RNA and Human Immunodeficiency virus type-1 RNA. J Clinl Microbiol 2001; 39(8): 2937-45.

[۱۲] رضوان حوری. ویروس‌ها و انتقال خون: روش‌های نوین کاهش خطر. تحفه. ۱۳۸٤؛ ۵۱-٦۰.

[13] http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/nested PCR.html

[14] Adami V, Falasca E, Dorotea L, Malangone W, Astori G, Marini L, Biffoni F, Rinaldi C, Degrassi A, Pipan C. Qualitative multiplex RT-PCR for simultaneous detection of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus in plasma samples. Clin Microbiol infect 2004; 10(12): 1075-80.

[15] Knipe DM, Hepatitis C Virus in: Fields Virology. USA. Forth Edition; 2001; 1127-35.

[16] Anderson J, Simonetti J, Fisher DG, Williams J, Yamamura Y, Rodriguez N, Sullivan DG, Gretch DR, McMahon B, Williams KJ. Comparison of different viral load and genotyping assays**.** J Clin Virol 2003; 28: 27-37.

[17] Yang JH, Lai JP, Douglas SD, Metzger D, Zho XH, Ho WZ. Real-time RT-PCR for quantification of hepatitis C virus RNA. J Virol Methods 2002; 102 (1-2): 119-28.

[18] Gallarda JL, Dragon E. Blood screening by nucleic acid amplification technology: current issues, future challenges. Mol Diagn 2000; 5: 11-22.