Research on Medicine *Original Article*

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.42; No.3; 2018

Design and Development of TaqMan Real-Time PCR Assay for Detection and Viral Load Determination of HIV-1

Hassan Noorbazargan[1], Seyed Alireza Nadji[2], Siamak Mirab Samiee[3], Mahdi Paryan[4,*], Samira Mohammadi-Yeganeh[5,6,*]

1. *Department of Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
2. *Virology Research Center (VRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
3. *Food and Drug Laboratory Research Center, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran*
4. *Department of Research and Development, Production and Research Complex, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*
5. *Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
6. *Department of Biotechnology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

(Received: 2018/02/16 Accept: 2018/07/22)

Abstract

Background: *Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) is one of the most important blood-borne infectious viruses that are considered a global problem, thus it is important to diagnose it with high accuracy and sensitivity. Serologic methods do not adequately detect this infection. Therefore, the purpose of the present study was to design a sensitive method based on TaqMan Real-time PCR method for diagnosis of HIV-1.*

Materials and Methods: *Primers and probes were designed using bioinformatics softwares for a region of 200 pairs of HIV-1 INT gene. The sequence was cloned into T/A cloning vector and in-vitro RNA transcription was performed to prepare standards for analytical sensitivity assay. To determine the analytical specificity, NCBI BLAST and different viral and bacterial samples were used. Clinical specificity was determined using negative plasma samples.*

Results: *The method introduced was able to detect as low as 10 copies of HIV-1 RNA/ml. Furthermore, it was linear in the range of 10-10^9 copies/ml. By examining the negative samples, the specificity of this method was determined to be 100%. Intra- and Inter-assay results ranged from 0.3% to 2.5% and 0.7% to 4.5%, respectively, that showed high reproducibility of the assay.*

Conclusion: *Due to proper sensitivity and specificity, rapid analysis, being user-friendly, and relatively low cost, as compared with commercial kits, the method introduced in the present study can be suitable to accurately diagnose HIV-1 virus. Applying this in-house Real-time PCR assay, viral infection can also be detected before seroconversion and appearance of bloodstream antibodies, which can reduce window period of this infection.*

Keywords: *HIV-1; TaqMan Real-time PCR; INT gene; Quantification; Viral load*

* *Corresponding Author: Samira Mohammadi-Yeganeh*
Email: s.mohammadiyeganeh@sbmu.ac.ir

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-13]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۲، شماره ۳، ۱۳۹۷، صفحات ۱۸۲ تا ۱۸۸

طراحی و راه اندازی روش TaqMan Real-time PCR جهت تشخیص و تعیین کمی ویروس نقص ایمنی اکتسابی نوع1(HIV-1)

حسن نوربازرگان[۱]، علیرضا ناجی[۲]، سیامک میراب سمیعی[۳]، مهدی پریان[۴]، سمیرا محمدی یگانه[۵و۶*]

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوریهای نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- آزمایشگاه ویروس شناسی، مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی بیمارستان مسیح دانشوری، تهران، ایران
۳- آزمایشگاه غذا و دارو مرجع سلامت وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
۴- مرکز تولیدی و تحقیقاتی انستیتو پاستور کرج، تهران، ایران
۵- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۶- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۸/۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۴/۲۴

چکیده:

سابقه وهدف: ویروس نقص ایمنی انسانی نوع1 *(HIV-1)* یکی از مهمترین عوامل عفونی منتقل شده از طریق خون است که یک معضل جهانی محسوب می شود، بنابراین تشخیص صحیح، دقیق و حساس این ویروس از اهمیت بسیاری برخوردار است. هدف از این مطالعه، طراحی یک روش حساس بر پایه *Real-time PCR TaqMan*برای تشخیص *HIV-1*می باشد.

مواد و روش‌ها: آغازگرها و پروب توسط نرم افزارهای بیوانفورماتیکی برای یک ناحیه ۱۹۹ جفت بازی برای ژن *INT HIV-1*طراحی شد. استانداردهای مورد استفاده برای تعیین حساسیت آنالیتیکی با استفاده از *RNA*های حاصل از رونویسی در آزمایشگاه تهیه شد. همچنین برای بررسی اختصاصی آنالیتیکی از پایگاه *Blast* و اختصاصیت کلینیکی با استفاده از پانل های ویروسی مختلف و نمونه ژنوم حاصل از افراد سالم استفاده شد.

یافته‌ها: این روش قادر به اندازه گیری حداقل ۱۰ کپی از *HIV-1 RNA* در هر میلی لیتر است. علاوه بر این، آزمایش در محدوده ۱۰-$۱۰^{۹}$ کپی در میلی لیتر خطی است. با بررسی نمونه های منفی، ویژگی این روش ۱۰۰ درصد می باشد. نتایج تکرارپذیری واکنش در سطح درون سنجی و بین سنجی بررسی شد برای این منظور ۹ تکرار از هر غلظت از نمونه کنترل در هر واکنش کاری مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: با توجه به سطح حساسیت و ویژگی مناسب، آنالیز سریع، کاربرد آسان و هزینه نسبتاً کم در مقابل کیت های مشابه، این روش می‌تواند برای تشخیص موثر ویروس *HIV-1* مناسب باشد. همچنین می توان آلودگی به ویروس را قبل از تغییرات سرمی و ظهور آنتی بادی ها در خون تشخیص داد و دوره پنجره عفونت را کوتاه‌تر کرد.

واژگان کلیدی: ویروس نقص ایمنی انسانی نوع *TaqMan Real-time PCR* ،*1*، ژن *INT*، بار ویروس.

مقدمه

ویروس نقص ایمنی اکتسابی تیپ یک (HIV-1) عامل ایجاد کننده سندرم نقص ایمنی اکتسابی انسانی(ایدز) می باشد انتقال بیماری از طریق انتقال خون در دوره پنجره، در مراکز انتقال خون یک معضل جهانی محسوب می شود. طبق آمار موجود در سراسر جهان بطور متوسط روزانه ۱۳۵۰۰ نفر بر تعداد مبتلایان بیماری ایدز افزوده می شود. لذا با توجه به اهمیت بیماری و گسترش روزافزون آن نیاز به روش های تشخیصی با کارآیی بالاتری است تا بتوان از حجم فزاینده مبتلایان به بیماری کاست و یا آن را متوقف کرد (۱, ۲).

سال‌های متمادی است که روشهای سرولوژیکی بیشترین کاربرد را در زمینه تشخیص عفونت‌های ویروسی دارند و با اینکه روش کشت و جستجوی مستقیم و سریع در این‌گونه عفونت‌ها تأکید می شود، با این حال هنوز روشهای سرولوژیکی می توانند در تشخیص عفونت کمک کننده باشد. از جمله مهمترین محدودیت های این روش ها،

نویسنده مسئول: سمیرا محمدی یگانه
پست الکترونیک: *s.mohammadiyeganeh@sbmu.ac.ir*

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-13]

عدم تشخیص موارد عفونی در دوره پنجره (Window Period) و زمانی است که هنوز شاخص های ایمنی شناختی بیمار بالا نرفته است (۳, ۴). همچنین روشهای سرولوژی قادر به تشخیص عفونت در نوزادان تازه متولد شده از مادران HIV-1 بدلیل وجود آنتی بادی مادری در این نوزادان نیستند. از علل دیگر که تستهای سرولوژیکی کفایت لازم را ندارند می توان به تغییرات آنتی ژنیک ویروسی، آلودگی با سروتیپ های مختلف ویروسی، ناقلان خاموش از نظر ایمونولوژیکی یا ناقلین پنهان، و یا نبود آنتی بادی در مراحل اولیه بیماری اشاره کرد. البته گزارشهایی مبنی بر عدم شناسایی آنتی بادی در مراحل انتهایی بیماری ایدز به دلیل ضعف شدید سیستم ایمنی و یا گاماگلوبولینمیا در موارد نادر وجود دارد (۳–۶).

بر طبق دستورالعمل های جدید تعیین تعداد کپی RNA این ویروس، به عنوان شاخصی برای تشخیص عفونت حاد، پیش بینی احتمال انتقال ویروس، پیش بینی میزان پیشرفت بیماری در بیمارانی که به طور مزمن آلوده هستندو برای ارزیابی تأثیر درمان در افرادی که در حال درمان با داروهای ضدرترو ویروسی هستند، (۷, ۸) از اهمیت بسزایی برخوردار است. یکی از جدیدترین روشهای سنجش کمی که در حال حاضر مورد توجه قرار گرفته است سیستم‌های تشخیص در زمان واقعی یا روش Real-time PCR می باشد. این روش امکان کمی کردن PCR مرسوم را به صورت بسیار اختصاصی، حساس و با قابلیت بالا فراهم نموده است و مزایایی چون نشان دادن وضعیت واقعی حین آزمایش و امکان تعیین تعداد ویروس را نیز فراهم می‌کند (۹–۱۲). از سال ۲۰۱۳ تکنولوژی ها و دستگا های متعددی برای تشخیص ویروس HIV (DNA، RNA و p24) نظیر Liat TM analyser، Samba VL تا سال ۲۰۱۵ نظیر Gene-RADAR، RT CPA HIV-1 Viral Load و Viral Load Assay with BART وجود دارد (۱۳).

این پژوهش با هدف طراحی روش TaqMan Real-time PCR با استفاده ار آغازگرها و پروب اختصاصی برای منطقه ای از ژن INT ویروس HIV-1 که از مناطق حفاظت شده از ژنوم ویروس می باشد انجام شده است. . تحقیق حاضر بمدت یکسال و در دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی و با همکاری انستیتوپاستور ایران، بیمارستان مسیح دانشوری و بیمارستان دی انجام گرفته است.

مواد و روش ها:

طراحی آغازگر وپروب اختصاصی

بمنظور طراحی آغازگر و پروب ابتدا توالی مربوط به سه ژن حفاظت شده *INT–pol- gag* در ژنوتیپ های مختلف از پایگاه های داده ی معتبر نظیر Los Alamos- HIV database tools و NCBI Nucleotide دریافت شد و برای هر یک از ژن های *INT-pol- gag* یک Databank تهیه شد. سپس با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی نظیر MEGA6 و Clausٹal W آنالیزهای همردیفی صورت گرفت و بهترین ژن و ناحیه از این ژن‌ها انتخاب شد. جهت طراحی آغازگر و پروب از نرم افزارهایی AlleleID ۷,۵ و Beacon Designer استفاده شد. پس از طراحی آغازگر و آغازگر اختصاصیت آنها با NCBI blast و خصوصیات و ویژگی هر کدام با نرم افزارهای Generunner و Oligo7 ارزیابی شد. ژن INT از HIV-1 به طول ۲۰۰ جفت باز دارای بیشترین و بهترین مناطق حفاظت شده در ژنوم بود و آغازگر و پروب مورد استفاده در این مطالعه برای این ناحیه طراحی شد. (جدولA).

جدولA: توالی آغازگرها و پروب مربوط به INT HIV-1

آغازگر رفت	5´TAARARRARAGGGGGGATTG´3
آغازگر برگشت	5´CYGCYCCTTCACCTTTCC´3
پروب اختصاصی	FAM-5´AGNAGYTTDGCTGGTCCYTTCCAA´3-BHQ

R: A/G Y: C/T N: A/T/G/C

استخراج RNA ویروسی

استخراج RNA ویروسی با استفاده از کیت استخراج RNA ویروسی (QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen,Germany و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. پس از آن بلافاصله واکنش نسخه برداری معکوس با استفاده از کیت Revert AidTM Firsٹ Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas, USA) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ابتدا ۱۰ میکرولیتر RNA ویروسی به همراه ۲ میکرولیتر آغازگر رندوم هگزامر، ۴ میکرولیتر بافر آنزیم RT، ۲ میکرولیتر مخلوط (۱۰ میلی مولار) dNTP، ۱ میکرولیتر آنزیم مهارکننده RNase (۲۰ واحد)، ۱ میکرولیتر آنزیم M-MuLV RT (۲۰۰ واحد) درحجم نهایی ۲۰ میکرولیتر اضافه شد. سپس مخلوط واکنش در دستگاه ترموسایکلر منتقل گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار گرفت و برای غیرفعال کردن واکنش، ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. cDNA سنتز شده به عنوان الگو برای مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفت (۱۴).

کلون کردن قطعه مورد نظر در پلاسمید

برای سنجش کمی RNA باید از مولکول RNA بعنوان استاندارد استفاده کرد. استاندارد RNA HIV-1 که بصورت پانل های تجاری موجود هستند، هزینه بسیار بالایی دارند. از طرف دیگر این پانل ها به راحتی در دسترس محققین قرار نمی گیرند. بنابراین به منظور سنجش کمی مقادیر اسیدنوکلئیک RNA، HIV-1 استاندارد در آزمایشگاه بصورت (In-house) ساخته شد. این استاندارد با کلون کردن محصول PCR به داخل یک ناقل کلونینگ (cloning vector) حاوی پروموتور آنزیم T7 RNA polymerase تهیه شد. برای این منظور از کیت T/A cloning (Fermentas, USA)استفاده شد که وکتورمورد استفاده در این کیت pTZ57R/T حاوی پروموتور برای آنزیم T7 RNA پلیمراز می باشد. ابتدا محصول PCR، که حاوی یک آویخته (over hang) آدنین (A) در انتهای رشته پلیمریزه شده می باشد، با استفاده از دستورالعمل کیت ACCU Prep PCR purification (BIONEER, Korea) خالص سازی شد. سپس واکنش اتصال (Ligation) میان محصول PCR خالص شده ژن INT و وکتور pTZ57R/T مطابق دستورالعمل کیت انجام گرفت. محصول واکنش اتصال به سویه DH5α باکتری اشرشیاکلی که از قبل بوسیله CaCl2 مستعد شده بود انتقال داده (Transform) شد. پس از کشت در محیط LB آگار حاوی آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) کلون های نوترکیب از نظر پلاسمید واجد ژن مورد نظر با استفاده از واکنش colony PCR با آغازگر یونیورسال M13 و واکنش هضم آنزیمی تایید شدند (۱۴, ۱۵).

تولید RNA HIV-1 استاندارد

ساخت RNA استاندارد با استفاده از انزیم T7 RNA polymerase (Fermentas, USA) انجام شد. به منظور بدست آوردن RNA با طول یکسان و یکنواخت از محصول PCR حاصل از آغازگر M13 استفاده شد. این واکنش شامل ۱ میکروگرم از محصول PCR، ۲۰۰ میلی مولار از مخلوط NTP، ۳۰ واحد آنزیم T7 RNA polymerase در حجم ۲۰ میکرولیتر بود.

زدودن DNA از RNA تولید شده در فرایند رونویسی درآزمایشگاه (In-vitro transcription)

از آنجایی که DNA مورد استفاده بعنوان الگو دارای بخش پروموتری می باشد، اگر محصولات RNA به دست آمده مستقیماً وارد واکنش Real-time شود، جواب مثبت کاذب خواهیم داشت. از این رو باید محصولات بخوبی DNA زدایی شوند. برای این منظور از آنزیم DNaseI (Fermentas, USA) عاری از RNase برای حذف آلودگی DNA استفاده شد. از آنجایی که آنزیم DNase I قادر است DNA دو رشته ای که در حین فرایند PCR تولید می شود را نیز تخریب کند، بنابراین باید بسیار دقت شود که این آنزیم به طور کامل از محیط حذف شود تا به DNAهایی که بعنوان مولکول حدواسط در فرایند PCR عمل می کنند، آسیبی نرساند. برای تخریب و غیرفعال کردن آنزیم DNase I، محصولات واکنش بمدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. از سوی دیگر باقیمانده قطعات و نوکلئوتید های حاصل از تخریب با آنزیم DNase I و باقیمانده خود آنزیم و بافرهای موجود در آن باید حذف شود تا در مراحل بعدی تداخلی ایجاد نکند. برای این منظور از محلول RNX™– Plus شرکت سیناژن و طبق پروتکل شرکت سازنده RNA سنتز شده خالص شد. در انتها مقدار اندکی از

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-13]

RNA ساخته شده با اسپکتروفوتومتری اندازه گیری و از طریق دانسیته نوری تعداد موکلولهای RNA محاسبه گردید (۱۵).

تعیین حساسیت و ویژگی

حداقل تعداد کپی های ژنوم ویروس موجود در نمونه که می تواند بطور دقیق توسط واکنش Real-time تشخیص داده شود، حساسیت آنالیتیک واکنش می باشد. برای بدست آوردن حساسیت روش، سریال رقت های لگاریتمی از cDNA ساخته شده با ضریب ۱۰ از $۱۰^{-۷}$ کپی در میلی لیتر تهیه شد. سپس واکنش Real-time بصورت سه بار تکرار برای هر رقت انجام گرفت تا کمترین رقتی که قابل اندازه گیری است مشخص شود.

برای تعیین ویژگی آنالیتیک روش تشخیصی، علاوه بر بررسی صحت اتصال اختصاصی آغازگرها به الگوی مورد نظر در پایگاه NCBI nucleotide BLAST، از چند نمونه ژنوم ویروس های منتقل شونده از طریق خون از قبیل HTLV-1، HCV، HBV، HSV-1,2، EBV، VZV، B19، HHV-8,6 استفاده شد و به منظور تعیین ویژگی کلینیکی از ۲۰ نمونه منفی، که عدم وجود HIV-1 در آنها با استفاده از روش سرولوژی و مولکولی تجاری معتبر تایید شده بود، استفاده شد. تمامی نمونه های بالینی از مرکز تحقیقات ویروس شناسی بیمارستان مسیح دانشوری تهران و پس از اخذ رضایت نامه آگاهانه از افراد، تهیه شد. کلیه ی مراحل انجام کار بر اساس دستورالعمل کمیته اخلاق پزشکی، وزارت بهداشت و درمان جمهوری اسلامی ایران و با تصویب کمیته اخلاق دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (IR.SBMU. MSP.REC.1395.528) انجام شد.

بدست آوردن دقت با استفاده intra-assay و inter-assay

برای این منظور واکنش Real-time بر روی سریال رقت های مختلف تهیه شده ($۱۰^{-۹}$-۱۰) از cDNA سنتز شده از روی استاندارد تهیه شده بصورت ۳ بار تکرار در هر ران کاری و در ۳ روز متوالی انجام گرفت.

Inter-assay (میان سنجی) به اختلافات موجود در نتایج بین ران های مختلف واکنش Real-time یا نتایج حاصل از آزمایشگاه های مختلف اشاره دارد و معمولاً بصورت SD یا CV مربوط به تعداد کپی ها یا غلظت های مختلف از هر کدام از رقت های استاندارد ران های کاری در روزهای مختلف بیان می شود. Intra-assay(درون سنجی) به دقت و توانایی روش طراحی شده در تعیین غلظت تکرارهای مشابه در یک سیکل Real-time اشاره دارد که بصورت SD برای Cycling Threshold(Ct) مختلف نشان داده می شود. برای این منظور ۳تکرار از هر غلظت از نمونه کنترل در هر واکنش کاری مورد بررسی قرار میگیرد و مقادیر ضریب تغییرات (CV) برای مقادیر سیکل آستانه (Ct)، ضریب R2 و شیب خط برای نمونه های استاندارد محاسبه می شود.

واکنش Real time PCR بمنظور تشخیص HIV-1

برای این منظور از مستر میکس RealQ Plus 2X Master Mix for Probe, High ROX (Amplicon, Denmark) استفاده شد. برای رسم منحنی استاندارد ۹ غلظت مختلف از cDNA حاصل از RNA تهیه شده با روش In-vitro transcription ($۱۰^{-۹}$-۱۰ کپی در میلی لیتر) انتخاب شد. واکنش تکثیری در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد که مشتمل بر ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس، ۵ میکرولیتر cDNA از رقت‌های سریالی تهیه شده با نسبت ۱/۱۰، ۲/۵ میکرومولار از هر آغازگر و ۴ میکرومولار از پروب و با الگوی دمائی زیر انجام شد (۱۵).

۵۰ درجه سانتی گراد بمدت ۱ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی گراد بمدت ۱۵ دقیقه و سپس ۴۰ چرخه شامل: ۹۵ درجه سانتی گراد بمدت ۱۵ ثانیه، ۵۲ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد بمدت ۳۰ ثانیه. تمامی واکنش ها و آنالیز اطلاعات توسط دستگاه ABI (StepOne plus) انجام شد.

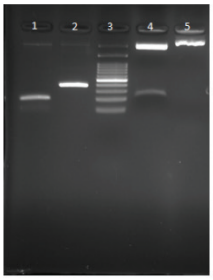
روش‌های تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمام آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار شدند. داده ها توسط نرم افزار SPSS ۱۶به صورت میانگین±SD گزارش شده و آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) برای مقایسه ی نتایج به کار برده شد. P value کمتر از ۰،۰۵ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

یافته ها:

کلون کردن محصول PCR ژن INT ویروس HIV-1 در وکتور pTZ57 R/T

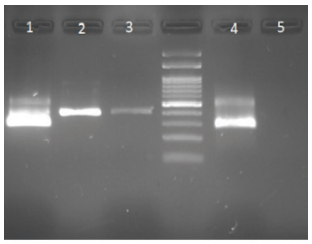
همانطور که قبلاً اشاره شد، واکنش الحاق محصول PCR حاوی انتهای آدنین با وکتور pTZ57 R/T حاوی انتهای تیمیدین و منتقل کردن آن به باکتری اشرشیاکلی سویه DH5α انجام شد. تایید کلونینگ با استفاده PCR روی کلنی های رشد کرده بر روی محیط حاوی آنتی بیوتیک با آغازگرهای اختصاصی و M13 و برش آنزیمی انجام گرفت (شکل۱).



شکل۱: واکنش PCR بر روی ژن کلون شده با آغازگرهای(200bp) INT ، ۲: واکنش PCR بر روی ژن کلون شده با آغازگرهای(380bp) M13 ، ۳: لدر 100bp، ۴: برش قطعه کلون شده با انزیم *HindIII* به منظور تایید کلونینگ صحیح (270bp)، ۵: وکتور هضم آنزیمی نشده.

تولید RNA استاندارد بمنظور سنجش کمی HIV-1 RNA

در مطالعه حاضر از محصول حاصل از واکنش In-vitro transcription با استفاده از آنزیم T7 RNA polymerase که از روی ژن INT کلون شده RNA سنتز می کند، بعنوان استاندارد استفاده شد. پس از تایید سنتز آن از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد بمنظور حذف الگو DNA موجود در واکنش، از DNase I استفاده شد سپس DNase I غیر فعال شد و بمنظور خالص نمودن RNA سنتز شده با محلول استخراج RNA تخلیص شد (شکل۲).



شکل۲: واکنش in-vitro transcription با آنزیم T7 RNA polymerase، ۲: محصول PCR حاصل از آغازگرهای M13 که بعنوان الگو برای سنتز RNA استفاده شد، ۳: واکنش in-vitro transcription بدون آنزیم فرمنتاز، ۴: RNA تیمار شده با DNase، ۵: واکنش مربوط به چاهک شماره ۳ به همراه DNase (که DNA حذف شده است).

ارزیابی حساسیت و ویژگی روش

نتایج نشان داد واکنش در محدوده $۱۰^{-۹}$-۱۰ کپی در میلی لیتر خطی است. حساسیت بدست آمده با این روش ۱۰ کپی در هر واکنش می باشد. از آنجایی که هیچ کدام از نمونه های سرم افراد سالم، پاسخ مثبت کاذب ایجاد نکردند، ویژگی این روش در شناسایی HIV-1 ۱۰۰ درصد محاسبه شد. آزمون های تکرارپذیری روی رقت های سریال تهیه شده ($۱۰^{-۹}$-۱۰ کپی در میلی لیتر) انجام شد. همانطور که در جدول ۱و۲ نشان داده شده است ضریب تغییرات Ct به دست آمده در آزمون تکرارپذیری درون سنجی و بین سنجش برای تمام رقت های سریال به ترتیب کمتر از۳ و ۵ درصد بود که نشان میدهد این روش تکرارپذیری بالایی دارد (جدول۱و۲).

در این محدوده کلیه معیارهای Intercept ، R^2 و Slope در دامنه تایید شده Real-time PCRقرار گرفتند. پارامتر y-intecept برابر ۴۰/۵۹ می باشد که نشان دهنده

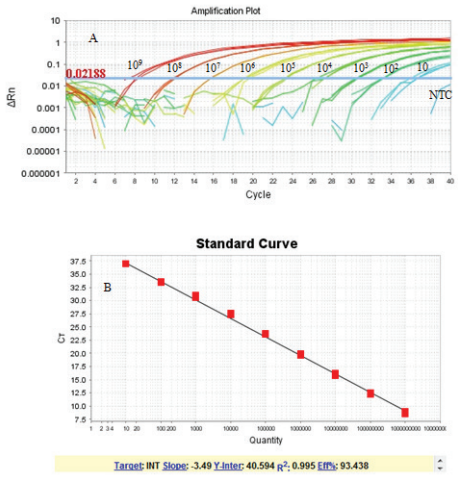
[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-13]

جدول۱: نتایج آزمون تکرارپذیری درون سنجی

تعداد کپی HIV-1 RNA در واحد میلی لیتر	میانگین مقادیر Ct	±SD	ضریب تغییرات (%)
10^9	۸/۳	+۰/۲	۲/۴
10^8	۱۲/۴	+ ۰/۱۲	۱
10^7	۱۶	+ ۰/۱۷	۱/۱
10^6	۱۹/۸	+ ۰/۱۲	۰/۶
10^5	۲۳/۶	+ ۰/۱	۰/۴
10^4	۲۷/۴	+ ۰/۱۶	۰/۶
10^3	۳۰/۹	+ ۰/۱۸	۰/۶
10^2	۳۳/۵	+ ۰/۰۹	۰/۳
10	۳۵/۹	+ ۰/۸۰	۲/۵

جدول۲: نتایج آزمون تکرارپذیری بین سنجی

تعداد کپی HIV-1 RNA در واحد میلی لیتر	میانگین مقادیر Ct	±SD	ضریب تغییرات (%)
10^9	۸/۷	+ ۰ /۳۹	۴/۵
10^8	۱۲/۳	+ ۰/۳۱	۲/۵
10^7	۱۶	+ ۰/۱۵	۰/۹
10^6	۲۰	+ ۰/۷۹	۴
10^5	۲۳/۷	+ ۰/۵۴	۲/۳
10^4	۲۷/۴	+ ۰/۵۳	۱/۹
10^3	۳۰/۸	+ ۰/۳۶	۱/۲
10^2	۳۳/۷	+ ۰/۷۷	۲/۳
10	۳۶/۲	+ ۰/۲۶	۰/۷



شکل۳:A ، نمودار منحنی تکثیر با رقت های متوالی ۱۰-۱۰۹ کپی در میلی لیتر. B، منحنی استاندارد سنجش کمی HIV-1. این منحنی حاصل لگاریتم رقتهای سریال در مقابل Ct مربوط به هر رقت می باشد.

حساسیت و دقت مقدار سنجی روش طراحی شده می باشد. Slope برابر با۳/۴- و ضریب $995/0R^2$ بدست آمد که نشان دهنده کارایی بالای واکنش انجام شده می باشد (شکل۳).

بحث

پایان دادن به بیماری همه گیر ایدز یکی از هدف های اصلی بهداشت جهانی است که از طریق همبستگی جهانی و مشارکت چندبخشی امکانپذیر خواهد بود. در دسامبر ۲۰۱۳، هیئت هماهنگی برنامه ایدز سازمان ملل (UNAIDS) بمنظور هماهنگ کردن تلاشهای کشورها ومناطق درگیر با این بیماری، طرحی را تحت عنوان درمان HIV در مقیاس بالا تا سال ۲۰۱۵ مطرح کرد. در حال حاضر هدف اصلی سازمان بهداشت جهانی، سازمان UNAIDS و سازمانهای مرتبط با HIV این است که تا سال ۲۰۲۰ حداقل ۷۳% از تمام مردمی که با HIV زندگی میکنند، این ویروس در آنها مهار خواهد شد. (۱۶).

در افرادی که سیستم ایمنی آنها سرکوب شده و نوزادان که قادر به تولید آنتی‌بادی برعلیه ویروس نباشند در این‌صورت انجام تست های بر پایه سرولوژی با هر کیتی ممکن است پاسخ منفی دهد. لذا در چنین مواردی انجام این تست ها نمی‌تواند قابل اطمینان باشد. بنابراین، در تفسیر نتایج این‌گونه نمونه ها دقت بسیار زیادی لازم است (۱۷, ۱۸).

برای کاهش این عوامل، روشهای مبتنی بر اسید نوکلئیک NAT(Nucleic Acid

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-13]

(Testing برای شناسایی اسید نوکلئیک ویروسها توسعه یافته اند. از مزایای NAT می توان به بررسی مستقیم و اختصاصیت بسیار زیاد آن برای ژنوم یک عامل عفونی نسبت به روشهای سرولوژیک یا روشهای جداسازی ویروسی (به منظور شناسایی آن) اشاره کرد. آزمایش تعیین میزان HIV-1 RNA در تشخیص عفونت حاد، پیش آگهی سیر بیماری، کمک به محاسبه میزان خطر افزایش انتقال در بیمارانی که به طور مزمن آلوده هستند و مهمتر از همه برای مانیتورینگ درمان در افراد آلوده و بیمارانی که داروهای ضد رتروویروسی استفاده می نمایند، کاربرد دارد. عیار ویروس با میزان کاهش سلول های CD4+ ارتباط دارد و یک اندیکاتور مهم در پیش آگهی بیماری در مراحل اولیه عفونت به شمار می رود (۵، ۷، ۹).

در حال حاضر روش های مختلفی برای سنجش کمی HIV-1 RNA در نمونه های بالینی توسعه یافته است. از جمله RT-PCR، bDNA (branched DNA) و NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification). هر یک از این روش ها به صورت تجارتی در دسترس قرار گرفته اند. متأسفانه این کیت های تجارتی هزینه بسیار بالایی دارند که خرید آن ها در توان مالی بسیاری از آزمایشگا ه های تشخیص طبی و مراکز تحقیقاتی نیست. علاوه بر این، در دسترس نبودن همیشگی آن ها نیز محدودیت های زیادی ایجاد می کند (۱۹، ۲۰).

بمنظور کنترل و آگاهی از وضعیت درمان بیماران، مهم است که روشی که برای سنجش کمی بار ویروس استفاده می شود نتایج، دقیق و تکرار پذیر داشته باشد. در این پژوهش، تکرارپذیری در سطح درون سنجی (Intra assay) و بین سنجی (Inter assay) بررسی شد. تکرارپذیری درون سنجی، خطای کاربر و نیز خطای کالیبره نبودن ابزارهای مورد استفاده را بررسی می کند. این در صورتی است که تکرارپذیری بین سنجش، خطای آزمایشگاه اعم از دستگاه ها، آنزیم یا مسترمیکس مورد استفاده و کالیبره نبودن استانداردها ، مواد، ماندگاری و پایداری واکنش را بررسی می کند. بر اساس معیارها و دستورالعمل های معرفی شده از سوی CAP (College of American Pathology) ضریب تغییرات برای تکرارپذیری درون سنجش نباید بیشتر از ۵ درصد بوده و نیز برای تکرارپذیری بین سنجش کمتر از ۱۰ درصد، نشان دهنده تکرارپذیر بودن مناسب یک آزمایش است که در روش ما بترتیب کمتر از ۳ و ۵ بوده است (۱۵).

روش راه اندازی شده در این پژوهش می تواند به عنوان 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، به منظور راهنمایی

تجویز دارو و پیگیری درمان، از اندازه گیری بار ویروسی HIV-1 به خاطر هزینه بالا چشم پوشی می شود. راه اندازی این روش که هزینه کمی نیز دارد ، می تواند حداقل به خاطر ممانعت از ظهور ویروس های مقاوم به درمان بخشی از آگاهی از وضعیت درمان را بر عهده بگیرد.

یک روش In-house Real Time PCR assay جهت شناسایی ساب تیپ C ویروس HIV توسط Acharya و همکارانش بر اساس نواحی حفاظت شده ژن gag طراحی شد. خطی بودن این روش در محدوده ۵۰ کپی از ژنوم ویروس تا ۱۰۷ کپی از ویروس به ازای هر ml از نمونه پلاسما می باشد و کمترین محدوده تشخیصی آن در حدود ۵۰ copies/ml از ژنوم ویروس می باشد (۲۱). در مطالعه ای دیگر در هند یک روش HIV-1 TaqMan real time PCR assayجهت شناسایی ساب تیپ C ویروس HIV بر پایه ژن gag بر روی نمونه های پلاسما و CSF برای سنجش میزان RNA ویروس طراحی شد. این روش قادر به شناسایی تمامی ساب تیپ های M ویروس HIV-1به جز ساب تیپ E بوده است. حساسیت این روش در حدود ۱۸۰ copies/ml بوده و ارتباط این روش با روش های تجاری موجود در حدود r = ۰,۸۸۵ بوده است و حتی از روش Amplicor monitor assay, Version 1.5 (400 copies/ml) بیشتر بوده است (۲۲).

Tang و همکارانش یک روش کمی برای شناسایی ژن pol ویروس HIV-1 بر پایه پروب طراحی کردند. این روش حساسیت بالایی با محدوده خطی بین ۴۰ تا ۱۰ میلیون کپی در میلی لیتر را نشان می دهد. همچنین در مطالعه ای دیگر kamangu و همکارانش روشی جهت شناسایی ژن LTR با حداقل محدودیت تشخیص در حدود log1095/1 کپی در میلی لیتر، نتایج حاصل از این مطالعه در مقایسه با روشهایی که برای شناسایی ویروس HIV-1 طراحی شده نشان می دهد که ژن INT برای اولین بار بعنوان یک هدف جهت شناسایی این ویروس استفاده شده است. همچنین محدوده خطی و حداقل محدودیت تشخیص روش طراحی شده قابل مقایسه با سایر روشهای ارائه شده می باشد (۲۳, ۲۴).

تاکنون در ایران هیچ روش کمی بر پایه روش TaqMan Real time PCR برای تعیین کمی ویروس HIV-1 طراحی نشده است و مطالعه حاضر برای اولین بار در ایران انجام گرفته است.

علاوه بر حساسیت و اختصاصیت بالا این روش تشخیصی دارای سهولت کاربرد بوده و در مدت زمان کمتری قادر به تعیین عیار RNA ویروس می باشد و از آن به راحتی می توان در مراکز تشخیصی استفاده کرد. همچنین استانداردهایی که به صورت پنل های تجارتی موجود هستند، هزینه بسیار بالایی دارند و از نظر در دسترس قرارگیری آن ها نیز محدودیت های بسیاری گریبانگیر محققین است .درحالیکه استانداردهای تهیه شده در این تحقیق در آزمایشگاه بسیار ارزان تر بوده و از انجایی که روش حاضر محدوده دینامیکی گسترده ای دارد، میتواند در تشخیص موارد حاد بیماری و پیگیری نتایج درمانی در بیماران در حال درمان که بارهای ویروسی متنوعی دارند مفید باشد. از آنجایی که تکنینک Real-time PCR بر پایه پروب TaqMan به انجام مراحل بعد از فرایند تکثر (post amplification) نیاز ندارد، علاوه بر کاهش هزینه ها، انتقال آلودگی های تکنیکی که منجر به پاسخ مثبت کاذب می شود را به حداقل می رساند همچنین این روش در آزمایشگاههایی که توان مالی بالا ندارند جایگزین مناسبی برای روش های تجاری پرهزینه می باشد. در این پژوهش از ژن ویژه INT که فوق العاده در بین انواع زنوتیپ های ویروس حفاظت شده است استفاده شده که در روش های دیگر استفاده نشده است، لذا حساسیت و ویژگی روش نسبت به آزمایش های و روش های موجود بسیار افزایش و بهبود یافته است. همچنین مزایایی دیگری نظیر افزایش سرعت از طریق کاهش زمان تکثیر، حذف مرحله آشکارسازی پس از تکثیر، حساسیت بالا و ساده بودن تکنیک را دارا می باشد. درکنار حساسیت و اختصاصیت بالا، آسان بودن و آنالیز سریع از مزایای عمده این تکنیک می باشد (۲۵).

در مطالعه دیگری که برای بررسی کارآیی و سودمندی این روش در نمونه های بالینی و با لودهای مختلف ویروس HIV-1 توسط تیم تحقیقاتی حاضر انجام شد، نتایج آنالیز پروبیت نشان داد این روش در نمونه های مختلف بالینی دارای رنج خطی مناسب بوده و با احتمال بیش از ۹۵% می تواند حداقل ۱۳ کپی از ویروس در پلاسما را ردیابی نماید (۲۶). بنابراین با توجه به نتایج دو مطالعه اخیر به نظر می رسد از روش فوق می توان در مراکز تشخیصی به عنوان روش کمکی در تشخیص استفاده نمود و علاوه بر آن می توان دوران پنجره را کوتاه تر کرد. علاوه بر موارد ذکر شده، از این روش می توان در تشخیص آلودگی یا عفونت نوزادان متولد شده از مادران آلوده به HIV نیز استفاده نمود . مجموع این موارد باعث می شود که بیماری در مراحل ابتدایی تشخیص داده شود تا از گسترش عفونت جلوگیری کند و فرصت راه کارهای درمانی مناسب را فرا روی پزشکان و بیماران قرار دهد (۲۷).

تشکر و قدردانی:

مقاله حاضر، حاصل بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی مصوب در معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد ثبت ۱۰۱۷۵ می باشد که بعنوان پایان نامه دکتری بیوتکنولوژی آقای حسن نوربازرگان انجام شده است. در اینجا لازم است از همکاری مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و انستیتوپاستور ایران جهت فراهم نمودن شرایط انجام طرح قدرانی و تشکر نماییم.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-13]

منـابع:

1. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. Lancet. 2014;384(9939):258-71.

2. Simon V, Ho DD, Abdool Karim Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. Lancet. 2006;368(9534):489-504.

3. Lane TA, Gernsheimer TB, Busch MP, Holland P. Transfusion of the HIV-seropositive patient. Transfus Med Rev. 1999;13(4):334.

4. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. Nat Med. 2003;9(6):727-8.

5. Detrick B, Hamilton RG, Folds JD. Manual of Molecular and Clinical Lab Immunology: American Society for Microbiology Press; 2006.

6. Gupta V, Gupta S. Laboratory markers associated with progression of HIV infection. Indian journal of medical microbiology. 2004;22(1):7.

7. Gilks CF, Crowley S, Ekpini R, Gove S, Perriens J, Souteyrand Y, et al. The WHO public-health approach to antiretroviral treatment against HIV in resource-limited settings. Lancet. 2006;368(9534):505-10.

8. Jahanbakhsh F, Mostafavi E, Haghdoost A. The potential for HIV self-testing in Iran. International journal of preventive medicine. 2015;6.

9. Williams I, Churchill D, Anderson J, Boffito M, Bower M, Cairns G, et al. British HIV Association guidelines for the treatment of HIV-1-positive adults with antiretroviral therapy 2012. HIV medicine. 2012;13(S2):1-6.

10. Schmitt Y. Performance characteristics of quantification assays for human immunodeficiency virus type 1 RNA. Journal of clinical virology. 2001;20(1):31-3.

11. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques. 2005;39(1):75.

12. Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR, Todd JA, Hoo BS, Kokka RP, et al. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. Annals of internal medicine. 1995;122(8):573-9.

13. Branson BM, Owen SM, Wesolowski LG, Bennett B, Werner BG, Wroblewski KE, et al. Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection: updated recommendations. 2014.

14. Handbook.pdf>., Q.G.Q.V.R.M.H.h.w.E.-Q.V.R.M.

15. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical chemistry. 2009;55(4):611-22.

16. 90-90-90An ambitious treatment target to help end the AIDS epidemic. UNAIDS / JC2684 (English original, October 2014).

17. Shetty S, Prabhu S, Hallikeri K, Krishnapillai R. Laboratory Tests for HIV: Diagnosing, monitoring and managing AIDS-an overview. International Journal of Oral and Maxillofacial Pathology. 2011;2(1):20-8.

18. Yılmaz G. Diagnosis of HIV infection and laboratory monitoring of its therapy. Journal of clinical virology. 2001;21(3):187-96.

19. Ernest I, Alexandre I, Zammatteo N, Herman M, Houbion A, De Leener F, et al. Quantitative assay for group M (subtype A–H) and group O HIV-1 RNA detection in plasma. J Virol Methods. 2001;93(1):1-14.

20. Katsoulidou A, Papachristou E, Petrodaskalaki M, Sypsa V, Anastassopoulou CG, Gargalianos P, et al. Comparison of three current viral load assays for the quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. J Virol Methods. 2004;121(1):93-9.

22. Acharya A, Vaniawala S, Shah P, Parekh H, Misra RN, Wani M, et al. A robust HIV-1 viral load detection assay optimized for Indian sub type C specific strains and resource limiting setting. Biological research. 2014;47(1):22.

Kamat A, Ravi V, Desai A, Satishchandra P, Satish K, Borodowsky I, et al. Quantitation of HIV-1 RNA levels in plasma and CSF of asymptomatic HIV-1 infected patients from South India using a TaqMan real time PCR assay. Journal of clinical virology. 2007;39(1):9-15.

23. Tang N, Huang S, Salituro J, Mak W-B, Cloherty G, Johanson J, et al. A RealTime HIV-1 viral load assay for automated quantitation of HIV-1 RNA in genetically diverse group M subtypes A–H, group O and group N samples. Journal of virological methods. 2007;146(1-2):236-45.

24. KAMANGU E, Chatte A, Boreux R, Susin F, KALALA R, Mwumbi GL, et al. Comparison of an In-House Quantitative Real-Time PCR and COBAS ampliprep/Taqman Roche for determination of viral load for HIV type 1 non-b. Open Access Library Journal. 2015;2(e1402).

25. Tatarelli P, Taramasso L, Di Biagio A, Sticchi L, Nigro N, Barresi R, et al. HIV-1 RNA quantification in CRF02_AG HIV-1 infection: too easy to make mistakes. New Microbiol. 2016;39:150-2.

26. Noorbazargan H, Nadji SA, Samiee SM, Paryan M, Mohammadi-Yeganeh S. New design, development, and optimization of an in-house quantitative TaqMan Real-time PCR assay for HIV-1 viral load measurement. HIV clinical trials. 2018;19(2):61-8.

27. Gibellini D, Vitone F, Gori E, La Placa M, Re MC. Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral load by SYBR green real-time RT-PCR technique in HIV-1 seropositive patients. J Virol Methods. 2004;115(2):183-9.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-13]