تعیین کمی بار ویروسی هپاتیت C با استفاده از روش In-House Real-Time PCR در بیماران آلوده به هپاتیت C در شهرستان خرم آباد

کیانا شاه زمانی[۱]، حامد اسمعیل لشگریان*[۲]، امید علی پاپی[۳]، حمید مخیری[۴]

۱- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

۲- استادیار، گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات هپاتیت، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

۳- کارشناس ارشد اپیدمیولوژی، معاونت بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

۴- کارشناس مبارزه با بیماری‌ها، معاونت بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

یافته / دوره هجدهم / شماره ۱ / بهار ۹۵ / مسلسل ۶۷

چکیده

دریافت مقاله: ۹۴/۱۱/۱۳ پذیرش مقاله: ۹۴/۱۲/۲۵

* **مقدمه:** روش‌های تشخیصی مولکولی ابزار عمده‌ای در مدیریت بیماران مبتلا به ویروس هپاتیت C (HCV) هستند. مطالعات نشان داده‌اند که بار ویروسی با مرحله عفونت و میزان پاسخ به درمان مرتبط می‌باشد و لذا ارزیابی و تعیین بار ویروسی اهمیت بسزایی دارد. هدف از این مطالعه بکارگیری روش دقیق و در عین حال ارزان قیمت جهت سنجش کمی بار ویروسی در پلاسمای بیماران می‌باشد.

* **مواد و روش‌ها:** پس از راه اندازی و تعیین اعتبار روش راه اندازی شده، سنجش کمی بار ویروسی بر روی پلاسمای ۲۰۰ بیمار آلوده به فرم مزمن HCV انجام شد. بار ویروس با استفاده از منحنی استاندارد خارجی و با بهره گیری از پانل استاندارد RNA صورت گرفت. نتایج حاصل از این روش با نتایج بدست آمده از کیت تجاری آرتوس مقایسه شد.

* **یافته‌ها:** محدوده تعیین این روش ۵۰ IU/ml می‌باشد. میانگین بار ویروسی اندازه‌گیری شده در مقیاس لگاریتمی (۰/۲۲ تا ۵/۸۱)، ($P<0/05$) بدست آمد. آنالیز موازی نمونه‌ها با استفاده از این روش و کیت تجاری آرتوس همبستگی خوبی بین دو روش نشان داد ($P<0/05$، $R^2=0/988$).

* **بحث و نتیجه‌گیری:** تعیین کمی بار ویروسی HCV در افراد آلوده به این ویروس در شهرستان خرم آباد برای اولین بار گزارش شده است. توجه به نتایج، این روش دارای حساسیت خوب و ویژگی برای سنجش کمی HCV RNA در مقیاس بزرگ است. این روش می‌تواند جایگزین مناسبی برای کیت‌های تجاری به‌ویژه برای ارزیابی بالینی درمان باشد.

* **واژه‌های کلیدی:** تعیین کمی، بار ویروسی، ویروس هپاتیت C، روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی.

*آدرس مکاتبه : خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، مرکز تحقیقات هپاتیت.

پست الکترونیک: hamedesmaiili@gmail.com

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-01-30]

مقدمه

هپاتیت C یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد هپاتیت مزمن در کشورهای توسعه یافته است. طبق آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO) بین ۲۱۰-۱۳۰ میلیون نفر در دنیا مبتلا به هپاتیت C هستند. سالانه ۳۵۰۰۰۰ نفر به دلیل ابتلا به این بیماری از دنیا می‌روند. این مبتلایان در اروپا، آمریکا و بسیاری از نقاط مختلف دنیا مشاهده می‌شوند (۲،۱).

ویروس هپاتیت C (HCV) عضوی از جنس هپاسی ویروس و متعلق به خانواده فلاوی ویریده است. ژنوم این ویروس به‌صورت RNA تک رشته‌ای با پلاریته مثبت است. اختلاف در ژنوم ویروس منجر به شناخت ۶ ژنوتیپ اصلی و بیش از ۵۰ تحت تیپ شده است. در مناطق مختلف جغرافیایی دنیا ژنوتیپ‌های مختلف مشاهده شده است (۲). در ایران ژنوتیپ ۱ و ۳، شایع است و ژنوتیپ ۲ و ۴ نیز به‌ندرت در افراد مبتلا مشاهده می‌شود. بر اساس آمار ارائه شده شیوع این بیماری در ایران کمتر از ۱٪ می‌باشد (۴). عامل انتقال عفونت در کشور ما اکثراً به علت استفاده از مواد مخدر تزریقی در بین معتادان تزریقی و سرنگ‌های مشترک گزارش شده است (۵). متداول‌ترین تست‌ها بر اساس تعیین آنتی‌بادی سرمی علیه آنتی‌ژن‌های HCV استوار است؛ اما نکته‌ای که در رابطه با روش‌های سرولوژیک وجود دارد، آن است که این تست‌ها فقط ابتلا به هپاتیت C را نشان داده تمایزی بین عفونت‌های حاد، مزمن و یا بهبود قائل نمی‌شوند. همچنین قادر به ردیابی بیماران در فاز پنجره (Window period) نمی‌باشند (۶،۷). بنابراین در چنین شرایطی لازم است از HCV RNA برای ارزیابی دقیق فعالیت و تکثیر ویروس استفاده شود (۸). Load viral، تعداد RNA ویروسی موجود در خون است که حاوی اطلاعات لازم برای ساختن ویروس‌های بیشتر می‌باشد. از آنجایی که تکثیر فعال ویروس در تمام مراحل بالینی بیماری اتفاق می‌افتد، احتمال شناسایی و سنجش کمی ویروس در تمام مراحل عفونت وجود دارد (۹). در افرادی که تحت درمان قرار نگرفته‌اند، میزان ویروس معمولاً در محدوده‌ای بین 10^{2}-10^{7} کپی HCV RNA در هر میلی‌لیتر خون است و در صورت درمان انتظار می‌رود که پایین‌تر رود (۱۰). در حال حاضر تعداد کپی RNA ویروس هپاتیت C به‌عنوان شاخصی برای بررسی وضعیت بالینی بیماران آلوده، به‌عنوان شاخصی در آگاهی از وضعیت پیشرفت بیماری، برای فهم سیر طبیعی و مطالعه پاتوژنز عفونت HCV و نیز به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی اثر داروهای ضد HCV مورد استقبال قرار گرفته است (۱۱،۱۲).

مطالعات نشان داده‌اند که بین سطوح پلاسمایی HCV RNA، مراحل بیماری و پیشرفت کلینیکی بیماری ارتباط مستقیمی وجود دارد. بعلاوه، ابزار مناسبی برای مانیتورینگ درمان ترکیبی در بیماران آلوده به HCV محسوب می‌شود. در صورت مؤثر بودن درمان، کاهش سطح پلاسمایی RNA و بهتر شدن وضعیت بالینی بیماری مشاهده خواهد شد. این کاهش همچنین منعکس کننده کاهش تکثیر ویروس در هپاتوسیت‌ها است. از طرف دیگر شرایطی را فراهم می‌کند تا آنالیز دقیق شکست درمان که ناشی از ظهور مقاومت به داروهای ضد ویروسی است، انجام شود (۱۳).

روش‌های مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک (NAT) قادر به تشخیص ویروس در خلال دوره پنجره می‌باشند. بسیاری از محققین برای تعیین کمی بار ویروسی در افراد مبتلا به HCV از روش PCR استفاده نموده‌اند. با روش PCR تاکنون توانسته‌اند هم از نظر کیفی و هم از نظر کمی ویروس را مورد ارزیابی و سنجش قرار دهند (۱۴،۱۵). در روش‌های PCR کمی اعم از رقابتی یا غیررقابتی، مقدار محصول نهایی در پایان پروسه آمپلیفیکاسیون اندازه‌گیری می‌شود. از آنجایی که آمپلیفیکاسیون به روش PCR ماهیت نمایی (Exponential) دارد، تغییر کوچکی در

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-01-30]

کارآیی آمپلیفیکاسیون، تفاوت قابل ملاحظه‌ای در مقدار محصول نهایی ایجاد می‌کند (۱۶). بعلاوه، این‌گونه روش‌های کمی نتایجی متضاد همراه با تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای تولید می‌کنند. برای مثال محدوده دینامیکی روش Cobas Amplicor در حدود ۱۰ برابر کمتر از روش RT-PCR رقابتی است، اما در حدود ۱۰۰ برابر بیشتر از روش b-DNA می‌باشد (۱۷). به‌منظور اجتناب از این‌گونه مسائل، روش‌های PCR کمی بایستی به‌گونه‌ای طراحی شوند تا بتوانند مقدار محصول را در خلال فاز لگاریتمی واکنش و قبل از رسیدن آن به مرحله پلاتو تعیین کنند.

اخیراً روش Real-Time PCR به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تحقیقات پایه و کاربردهای بالینی بکار گرفته شده است. روش Real-Time PCR مشکلات ذکر شده روش‌های قبلی را با مانیتورینگ پروسه آمپلیفیکاسیون PCR در زمان واقعی برطرف نموده است. این روش قادر است پیشرفت مراحل آمپلیفیکاسیون را در هر چرخه و در زمان واقعی نشان دهند. در روش Real-Time PCR محصول PCR در هر چرخه قابل ردیابی است. آزاد شدن نور فلورسانس از پروب هیبرید شده در هر چرخه در خلال واکنش Real-Time PCR متناسب با مقدار محصول PCR است. هرچه تعداد کپی نامبر آغازین اسید نوکلئیک هدف بیشتر باشد، افزایش قابل ملاحظه‌در نور فلورسانس زودتر مشاهده می‌شود. بررسی واکنش در هر سیکل از طریق افزایش فلورسانس آزاد شده صورت می‌گیرد، در واقع، تعیین کمی محصول در اوایل فاز نمایی واکنش صورت می‌گیرد. به این ترتیب نمونه‌های بسیار زیادی می‌توانند به‌طور همزمان آنالیز گردند (۱۸).

با توجه به مطالب ذکر شده، روش Real-Time PCR در مقایسه با سایر روش‌ها، تکنیک مناسبی برای بررسی پاسخ به درمان ضد ویروسی محسوب می‌شود. متأسفانه منابع مالی برای تأمین پیگیری درمان ضد ویروسی همراه با اندازه‌گیری منظم بار ویروسی در اکثر مناطق دنیا و از جمله ایران وجود ندارد و فقدان آن کاملاً احساس می‌شود. در این تحقیق، از تکنیک Real-Time RT-PCR به‌منظور سنجش بار ویروسی بیماران آلوده به HCV مراجعه کننده به درمانگاه عفونی بیمارستان شهدای عشایر استفاده شد.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد مطالعه

مطالعه حاضر از نوع Case series بوده و جامعه مورد مطالعه کلیه بیماران مبتلا به هپاتیت C شهرستان خرم آباد مراجعه کننده به درمانگاه عفونی بیمارستان شهدای عشایر به مدت ۶ ماه می‌باشد که ۲۰۰ نفر را شامل می‌شود. چگونگی انجام تحقیق توسط کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی لرستان مورد تأیید قرار گرفت. کلیه بیماران مبتلا به عفونت هپاتیت C شرکت کننده در این پژوهش، در درمانگاه عفونی بیمارستان شهدای عشایر پذیرش شده علائم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی آن‌ها توسط پزشک متخصص مورد بررسی قرار گرفت. پس از تأیید پزشک متخصص مبنی بر مزمن بودن بیماری به هر بیمار یک کد ویژه اختصاص داده شد. همچنین تمامی اطلاعات ضروری فرد آلوده و در صورت نیاز اطلاعات تکمیلی در پرسشنامه‌ای که برای این منظور تنظیم شده بود، ثبت و ضبط گردید. پس از پایان بازه زمانی مورد مطالعه، نمونه‌ها به روش تصادفی طبقه‌بندی گردیده و از بین کدهای موجود تعداد نمونه لازم جهت انجام تحقیق انتخاب گردیدند.

طراحی پرایمر و پروب های هیبریدیزاسیون:

به‌منظور بررسی نواحی حفاظت شده ژنوم HCV، توالی کامل ژنوتیپ‌های مختلف HCV از بانک ژنی، از طریق اینترنت، بدست آمد و با استفاده از نرم‌افزار Mega 4، ژنوم گروه‌های مختلف HCV با یکدیگر مقایسه شد. ابتدا جفت پرایمر رفتی و برگشتی با استفاده از نرم افزار

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-01-30]

Gene Runner طراحی گردید. سپس با کمک نرم‌افزار Blast از یکتا بودن محل اتصال پرایمرها اطمینان حاصل شد (جدول ۱).

جدول ۱. توالی پرایمرهای اختصاصی ناحیه 5ÅUTR

925706	HCV 5′-UTR		D10934	Tm
P1	CCC TGT AGG AAC TAC TGT CTT CA	S	43-69	65.4°C
P2	GGG CAC TGC ACA GCA CCC TAT	A	316-296	64.5°C

در مرحله بعد با استناد به مقالات معتبر، از روی توالی‌های HCV موجود در بانک ژنی یک جفت پروب انتخاب گردید. پروب‌های مزبور در نرم‌افزار Oligo از لحاظ Tm و محتوای GC بین ۶۰-۳۵٪ مورد بررسی قرار گرفت. برای واکنش FRET، انتهای ′۳ پروب بالا دست به‌عنوان دهنده (Donor) با فلورسئین و انتهای ′۵ پروب پایین دست به‌عنوان پذیرنده (Aceptor) با LightCycler Red 640 نشان‌دار شد (جدول ۲).

جدول ۲. توالی پروب های اختصاصی ناحیه 5ÅUTR

925706	HCV 5′-URT Hyb probes		D10934	Tm
FL	GCA CGC TCC AGG ACC CCC X	S	107-125	67.5°C
LC	LC640-CCG CGG ACACGCA TAG TGG TC P	S	128-150	66.9°C

جفت پرایمر و پروب‌های طراحی شده برای ساخت به شرکت Tib Mol Biol آلمان سفارش داده شد. پس از سنتز، از آن‌ها رقت ۲۰ µM و ۵۰ µM تهیه شده در فریزر ۲۰°C- نگهداری شد.

آماده سازی نمونه

ابتدا در حدود ۱۰ سی‌سی خون کامل بیمار در لوله‌های استریل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ریخته شد. سپس برای جداسازی پلاسما، لوله‌ها را در دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ کرده، پلاسمای حاصل به درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استریل منتقل گردید. به‌منظور شناسایی پلاسمای متعلق به هر بیمار، کد اختصاصی بیمار، کد آزمایشگاه و نام بیمار مربوطه بر روی هر ویال نوشته شد. سپس کلیه نمونه‌ها تا زمان استفاده در فریزر ۷۰°C- ذخیره شدند.

استخراج RNA ویروسی

پس از تهیه ۲۰۰ نمونه پلاسما از خون بیماران مبتلا به HCV که آزمایش الایزای آن‌ها مثبت بوده و آزمایش تأییدی وسترن بلات آن‌ها نیز مثبت بود، ۱۴۰ میکرولیتر از پلاسمای حاصل برای استخراج RNA ویروس استفاده شد. استخراج RNA ویروس با استفاده از کیت استخراج QIAamp Viral RNA Mini (شرکت Qiagen) انجام گرفت.

سنتز cDNA

در این مرحله RNA استخراج شده برای انجام آزمایش نسخه برداری معکوس و سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور از کیت (Roche) Expand RT استفاده شد. بر طبق دستورالعمل کیت، مقدار ۹/۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده به یک لوله اضافه شده سپس لوله مزبور به دستگاه ترموسایکلر (ABI, Thermal Cycler Gradient) منتقل و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ °C قرار داده شد. در مرحله بعد ۴ میکرولیتر بافر آنزیم RT، ۲ میکرولیتر دی تیوتریتول (DTT)، ۲ میکرولیتر از مخلوط ۰/۲ مولار دزوکسی ریبونوکلئوتید (dNTP)، ۱ میکرولیتر از پرایمر اختصاصی آنتی سنس (با غلظت ۵۰ پیکومول)، ۲۰ واحد آنزیم RT و ۲۰ واحد آنزیم RNasin به لوله حاوی RNA اضافه کرده (حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) و سپس مجدداً به دستگاه ترموسایکلر منتقل شد. در این مرحله مخلوط فوق به مدت یک ساعت در دمای ۴۲°C سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای۹۵°C قرار داده شد. cDNA سنتز شده تا مرحله بعد در فریزر ۲۰°C- نگهداری شد (۱۹).

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-01-30]

بهینه سازی آزمـایش In- Real-Time PCR house

بـه‌منظـور دسـتیابی بـه بهتـرین نتـایج در آنـالیز بـا پـروب‌هـای هیبریدیزاسـیون، بهینـه‌سـازی مـواد و شـرایط آزمایش ضروری به نظر می‌رسد. برای نیل به ایـن هـدف، از نمونه‌های کنترل (مثبت و منفی) با بار ویروسی مشخص در هر ران استفاده شد. بعلاوه مناسب‌ترین غلظت $MgCl_2$ در تکثیر الگوی جدید انتخـاب گردیـد. غلظـت الگـوی هـدف، پرایمرها و پروب‌های هیبریدیزاسیون بهینه‌سازی شد.

رسم منحنی استاندارد

از آنجایی که در روش کمـی، مقـدار اسـید نوکلئیـک هدف موجـود در یـک نمونـه مجهـول در مقایسـه بـا یـک منحنی استاندارد تعیین می‌شود. این منحنی استاندارد بایـد واجد غلظت‌های مشخص از همـان اسـید نوکلئیـک هـدف می‌باشد. در این مطالعه چهار نمونه‌اسـتاندارد بـا رقـت‌هـای سریال تهیه شده و در میکروتیوب‌های مجزا ریخته شد، امـا در یک ران به همراه نمونه‌های مجهول مورد آزمـایش قـرار گرفت (استاندارد خارجی). در حین انجـام آزمـایش، شـیب منحنـی رگرسـیون خطـی (Crossing point در برابـر غلظت لگاریتمی) محاسبه مـی‌شـود. سـپس بـا اسـتفاده از فرمول زیر ارزش شیب به کارایی (E) تبدیل می‌گردد:

$$E = [۱۰^{-۱/slope}] - ۱$$

آماده‌سازی استانداردهای مرجع HCV

به‌منظور تهیه نمونه‌های استاندارد برای رسـم منحنـی خـارجی، آمادهـای مرجـع HCV RNA کـه بـر طبـق اسـتاندارد WHO شـماره ۹۶/۹۷۰ کـالیبره شـده بـود، از انسـتیتوی ملـی اسـتانداردهای بیولوژیـک و کنتـرل (NIBSC) در انگلستان خریداری شـد. سـپس مطـابق بـا دستورالعمل NIBSC، به هر ویال ۰/۵ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیـر اضـافه شـد. محلـول حاصـل واجـد رقـت IU/ml ۲۵۰۰۰ از ژنوتیپ HCV 1a می‌باشد. این غلظـت معـادل $۱۰^{۵}$ کپی RNA در هر میلی‌لیتر می‌باشد. این اسـتانداردها برای کالیبره نمودن روش‌هـای In –house Real-time PCR بکار می‌رود.

برای اثبات توانایی ایـن روش در تشـخیص ۶ ژنوتیـپ اصـلی HCV بـا حساسـیت یکسـان، یـک پانـل ژنوتیـپ مشـتمل بـر ۶ ژنوتیـپ اصـلی HCV RNA از NIBSC خریـداری گردیـد. هـر ویـال ایـن پانـل حـاوی ۰/۵-۰/۳ میلی‌لیتر سرم با غلظـت نهـایی 1000 IU/ml مـی‌باشـد. برای استفاده از این پانل مطابق بـا دسـتورالعمل NIBSC، استخراج HCV RNA از سـرم صـورت گرفتـه و پـس از تبدیل آن به cDNA، برای معتبر نمودن روش بکـار بـرده شـد بـه‌منظـور اعتبارسـنجی روش راه انـدازی شـده کلیـه پارامترهای دخیل در تعیین اعتبار و تأیید روش کمـی اعـم از حساسیت، ویژگی، محدوده تعیـین، دقـت و تکرارپـذیری مورد بررسی قرار گرفت.

انجام آزمایش In –house Real-time PCR بر روی نمونه بیماران

سنجش کمی HCV RNA بر روی ۲۰۰ بیمار آلوده در زمان‌صفر (قبل از درمان) ونیز ۲۰ فرد سالم (به‌عنوان کنترل) با روش Real-Time RT-PCR in-house انجـام گردیـد. به‌منظور رسم منحنی استاندارد خارجی ۴ رقت مختلـف (10^3-10^6 IU/ml) از RNA استاندارد کالیبره شده با استانداردهای NIBSC انتخاب شده به‌طور همزمان نیـز RNA ویـروس از پلاسمای بیماران استخراج شده سنجش کمی بر روی نمونه‌های استاندارد و بالینی انجام گرفت. برای این منظور، مخلوط نهـایی شامل ۲ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۰/۴ میکرولیتر dNTP (شـرکت Qiagen) با غلظت ۱۰ میلی مـولار، ۲/۵ میکرولیتـر $MgCl_2$ (شرکت Qiagen) با غلظت ۲۵ میلی مولار، ۰/۵۰ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفتی و برگشتی با غلظت ۲۰ میکرومولار، ۰/۲۵ میکرولیتر از هریک از پروب های هیبریدیزاسیون با غلظت ۲۰ میکرومـولار، ۰/۳ میکرولیتـر آنـزیم Taq DNA Polymerase (شرکت Qiagen) با غلظت ۵ واحد و نهایتاً ۳ میکرولیتـر از cDNA سـنتز شـده در میکروتیـوب‌هـای ۰/۲

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-01-30]

میکرولیتر ریخته شد. حجم نهایی با آب مقطر به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. میکروتیوب‌ها پس از سانتریفوژ کوتاهی در دستگاه Rotor Gene قرار داده شد. برنامه زمانی دستگاه عبارت است از: دناتوراسیون اولیه در ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، متعاقب آن ۴۵ سیکل شامل ۰/۰۵ ثانیه در ۹۵°C، ۲۰ ثانیه در ۵۷ °C و ۲۰ ثانیه در ۷۲°C. شدت نور فلورسانس در مرحله آنیلینگ و با استفاده از کانال F2/F1 بدست آمد.

آزمایش Real-time PCR با استفاده از کیت تجاری

به‌منظور تائید صحت آزمایش انجام گرفته با روش راه اندازی شده، بار ویروسی نمونه‌های بیماران به‌طور همزمان با کیت تجاری آرتوس نیز مورد آزمایش قرار گرفت. بنابراین ابتدا مواد واکنش اعم از مخلوط نهایی و استانداردها به‌طور کامل ذوب شده با یک ورتکس کوتاه و سریع کاملاً مخلوط گردید. سپس ۱۵ میکرولیتر از مخلوط نهایی به‌تمامی ویال‌ها اضافه شد. در نهایت ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده مربوط به نمونه‌ها، ۵ میکرولیتر از هر یک از استانداردها و ۵ میکرولیتر از آب دیونیزه به‌عنوان کنترل منفی اضافه شد. به‌طوری که حجم کلی هر ویال ۲۰ میکرولیتر شود. سپس کلیه نمونه‌ها به مدت ۱۰ ثانیه در دور rpm ۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. پروفایل حرارتی برای تشخیص و تعیین کمیت HCV RNA به شرح زیر است: نسخه برداری معکوس در ۵۰ °C به مدت ۱۰ دقیقه، دناتوره شدن اولیه در ۹۵°C به مدت ۱۰ ثانیه، متعاقب آن ۵۰ سیکل شامل ۹۵°C به مدت ۲ ثانیه، ۵۵°C به مدت ۱۲ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۱۰ ثانیه.

آنالیز آماری

در این مطالعه، میانگین بار ویروسی اندازه‌گیری شده در مقیاس لگاریتمی و بر حسب IU/ml محاسبه گردید. برای مقایسه نتایج حاصل از دو روش ذکر شده از Spearman's correlation و Mann-Whitney test استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تعیین اعتبار روش راه اندازی شده:

نتایج حاصل از بکارگیری پانل ژنوتیپ نشان داد که هر ۶ ژنوتیپ به‌طور کارآمدی توسط روش راه اندازی شده شناسایی می‌شوند. برای تعیین ویژگی از ۴ نمونه HCV منفی که به ترتیب HBV، CMV، EBV و HIV آن‌ها مثبت بود به همراه یک نمونه HCV مثبت (به‌عنوان کنترل مثبت) استفاده شد. نتایج نشان داد که پرایمر و پروب‌های طراحی شده کاملاً اختصاصی عمل نموده با عوامل ویروسی غیر از HCV واکنش نمی‌دهند. به‌منظور تعیین حساسیت این روش از یک نمونه با غلظت 10^6 IU/ml رقت‌های مشخص تهیه شده به همراه پانل استاندارد RNA به‌صورت دوتایی مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که محدوده تعیین این روش ۵۰ IU/ml با محدوده دینامیکی (Dynamic range) بین 10^6 IU/ml-10^3 می‌باشد. آمپلیفیکاسیون RNA استاندارد HCV در غلظت‌های مختلف، خطی بودن این روش را نشان داد. ضریب رگرسیون منحنی استاندارد نیز به‌طور متوسط ۰/۹۹≤ بود. برای تعیین دقت و تکرارپذیری این روش، رقت‌های 10^3 تا 10^6 پانل استاندارد RNA در یک ران (intra-assay) و در رآن‌های مختلف (inter-assay) مورد آزمایش قرار گرفت. سپس شاخص انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) بر اساس Crossing Point حاصل از هر رقت محاسبه گردید. ضریب تغییرات Intra- و Inter- در این روش به ترتیب کمتر از ۱/۷۷٪ و ۳/۴٪ بود.

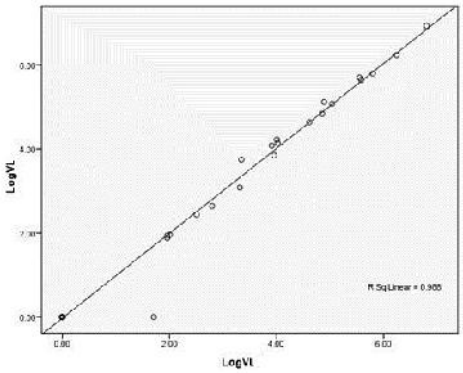
تعیین بار ویروس

با توجه به نتایج بدست آمده از روش راه اندازی شده، بار ویروس در ۳۷/۹٪ از موارد کمتر از IU/ml ۵۰۰،۰۰۰، در ۳۳/۶٪ از موارد بین IU/ml ۷۰۰،۰۰۰-۵۰۰،۰۰۰ و در ۲۸/۷٪ از موارد بیش از IU/ml ۷۰۰،۰۰۰ بود. میانگین بار ویروسی اندازه‌گیری شده در مقیاس لگاریتمی عبارت است از: (۰/۲۲ ± ۵/۸۱، P<۰/۰۵).

به‌منظور بررسی همبستگی بین روش راه‌اندازی شده و کیت تجاری، نتایج حاصل از دو روش بر روی ۲۰۰

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-01-30]

بیمار قبل از شروع درمان با یکدیگر مقایسه شد. مطالعات آماری نشان داد که بر اساس شاخص R^2، همبستگی خوبی بین نتایج حاصل از دو روش قبل از درمان ($P<۰/۰۵$، $R^2=۰/۹۸۸$) وجود دارد (نمودار ۱). از آنجایی که افراد کنترل سالم که تست آنتی‌بادی آن‌ها منفی بود هیچ‌گونه سیگنالی ناشی از تکثیر نشان ندادند، بنابراین ویژگی روش راه‌اندازی شده ۱۰۰٪ ارزش پیشگویی مثبت و منفی این روش نیز ۱۰۰٪ بود.



نمودار ۱. مقایسه نتایج حاصل از روش In house Real-time PCR و کیت تجاری

یافته‌های بالینی

در این مطالعه ۲۰۰ بیمار مبتلا به هپاتیت C مورد بررسی قرار گرفتند. خصوصیات دموگرافیک بیماران در جدول ۳ آمده است. با توجه به نتایج بدست آمده بیشترین مبتلایان به بیماری هپاتیت C (۹۵/۵٪) در این جامعه‌ی آماری را مردان تشکیل می‌دهند از بیماران مرد هستند. طیف سنی بیماران ۱۸ تا ۶۳ سال می‌باشد. گروه سنی ۲۰ تا ۴۰ سال با ۱۳۴ نفر (۶۷٪) بیشترین و گروه سنی ۶۰ سال به بالا با ۴ نفر (۲٪) کمترین گروه سنی را شامل می‌شود. از نظر وضعیت تأهل بیشترین تعداد بیماران (۴۶٪) به افراد مجرد اختصاص دارد. بودند. از لحاظ شغلی، بیشترین درصد ابتلا (اختصاصی شغلی) به ترتیب در جمعیت بیکاران ۵۲/۵٪ و پس از آن در مشاغل آزاد با رقم ۳۳/۵٪ دیده می‌شود.

جدول ۳. خصوصیات دموگرافیک بیماران مبتلا به هپاتیت C

خصوصیات بیماران		فراوانی	درصد
جنس	مرد	۱۹۱	٪۹۹/۵
	زن	۹	٪۴/۵
وضعیت تأهل	متأهل	۹۳	٪۴۶/۵
	مجرد	۸۶	٪۴۳
	جدا شده	۲۱	٪۱۰/۵
وضعیت تحصیلی	زیر دیپلم	۱۹۱	٪۹۹/۵
	بالاتر از دیپلم	۹	٪۴/۵
وضعیت شغلی	بیکار	۱۱۵	٪۵۷/۵
	شاغل	۸۵	٪۴۲/۵

از نظر فاکتورهای خطر در میان ۲۰۰ بیمار مورد مطالعه، سابقه اعتیاد تزریقی و زندانی شدن به ترتیب بیشترین میزان را به خود اختصاص داده است. در این میان سابقه ابتلا به HCV در خانواده کمترین میزان است (جدول ۴).

جدول ۴. فاکتورهای خطر ابتلا به هپاتیت C

درصد	فراوانی	فاکتورهای خطر
٪۹	۱۸	سابقه ابتلا به HCV در خانواده
٪۸۹/۵	۱۷۹	سابقه اعتیاد تزریقی
٪۶۱/۵	۱۲۳	سابقه بستری شدن در بیمارستان
٪۲۴	۴۸	سابقه تزریق خون
٪۵۴/۵	۱۰۹	سابقه تماس جنسی پرخطر
٪۲۲/۵	۴۵	سابقه حجامت
٪۵۵/۵	۱۱۱	سابقه خال‌کوبی
٪۶۵	۱۳۰	سابقه دندانپزشکی
٪۸۵	۱۷۰	سابقه زندانی شدن
٪۷۴	۱۴۸	مصرف سیگار
٪۴۱/۵	۸۳	سابقه مصرف الکل

بحث و نتیجه گیری

امروزه روش‌های سنجش بار ویروسی به‌صورت کیت‌های تجاری در دسترس هستند، اما به علت هزینه بالایی که دارند، استفاده از آن‌ها در محیط‌های کم درآمد و به‌ویژه در مراکز دولتی محدود و در اکثر اوقات متوقف شده است. هدف از این مطالعه راه‌اندازی روش Real-Time PCR In- House به‌عنوان یک روش جایگزین برای کیت‌های تجاری است تا به کمک آن بتوان بار ویروسی را در بیماران مبتلا به HCV تعیین نموده و در مراحل بعدی برای ارزیابی پاسخ به درمان ضدویروسی مورد استفاده قرار داد.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-01-30]

در این مطالعه برای تعیین کمی محصولات PCR از پروب‌های هیبریدیزاسیون (Hybprobe) در سیستم Real-Time استفاده شد. مطالعات اخیر از پروب‌های مزبور در کاربردهای متنوع Real-Time PCR بهره برده‌اند (۲۰). فرمت تشخیصی پروب‌های هیبریدیزاسیون بر پایه استفاده از دو پروب اولیگونوکلئوتیدی استوار است. این دو پروب به‌صورت نزدیک به هم به یک توالی واقع در میان پرایمرهای آمپلیفیکاسیون متصل می‌شوند. این پروب‌ها بایستی به‌گونه‌ای طراحی شوند که در خلال فاز آنیلینگ به حالت سر به دم و با فاصله ۵-۱ نوکلئوتید به یک رشته متصل شده دو رنگ (فلوروفور) را به یکدیگر نزدیک کنند. با توجه به هتروژنیسیتی توالی HCV، انتخاب پرایمر و پروب بسیار حائز اهمیت است. به‌طوری که روش راه‌اندازی شده بتواند تمامی ژنوتیپ‌ها و تحت تیپ‌های HCV را با حساسیت یکسان شناسایی و تعیین کمیت نماید، لذا اولین قدم در راه‌اندازی روش انتخاب پرایمر و پروب از ناحیه‌ای است که کمترین تغییرات نوکلئوتیدی را در میان ژنوتیپ‌های مختلف ویروس داشته باشد.

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که پرایمر و پروب‌هایی که توالی بسیار حفاظت شده ناحیه 5′ UTR ژنوم HCV را مورد هدف قرار می‌دهند، بسیار اختصاصی عمل نموده با حساسیت مشابه قادر به شناسایی تمامی ژنوتیپ‌ها و تحت تیپ‌های HCV می‌باشد (۲۱). در جریان بهینه‌سازی روش، از غلظت‌های مختلف پرایمر، پروب و الگوی هدف استفاده شد. در نهایت مناسب‌ترین غلظت برای هر یک از این عوامل انتخاب شد.

مطلب دیگری که در راه‌اندازی یک روش از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است استاندارد نمودن و معتبرسازی روش راه‌اندازی شده است. در این مطالعه به‌منظور استاندارد نمودن روش طراحی شده از پانل استاندارد NIBSC استفاده شد. از سوی دیگر به‌منظور تعیین حساسیت آنالیتیکی روش، از RNA استاندارد رقت‌های سریال تهیه شده و در یک ران مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که حساسیت روش راه‌اندازی شده 50 IU/ml با محدوده دینامیکی بین 10^3-10^6 IU/ml می‌باشد. آمپلیفیکاسیون RNA استاندارد HCV در غلظت‌های مختلف، خطی بودن این روش را نشان داد. ضریب رگرسیون منحنی استاندارد نیز به‌طور متوسط ۰/۹۹≤ می‌باشد.

دقیق بودن نتایج و تکرارپذیری آن از پارامترهای مهم در معتبرسازی روش راه‌اندازی شده محسوب می‌شوند. در این راستا، تغییرات Intra-assay و Inter-assay برای روش راه‌اندازی شده مورد بررسی قرار گرفت. ضریب تغییرات Intra- و Inter- در این روش به ترتیب کمتر از ۱/۷۷٪ و ۳/۴٪ بود. مطالعات متعدد حاکی از آن است که ضریب تغییرات کمتر از ۵٪ برای Intra-assay و ضریب تغییرات کمتر از ۱۰٪ برای Inter-assay، نشان دهنده تکرارپذیر بودن و دقت مناسب یک روش است. بنابراین ملاحظه می‌شود که روش راه‌اندازی شده هم در مورد استانداردهای RNA و هم درباره نمونه‌های بالینی از تکرارپذیری و دقت مناسبی برخوردار می‌باشد.

از سوی دیگر به منظور تعیین کاربرد گسترده این روش در مطالعات بالینی و تحقیقاتی، توانایی آن در شناسایی ۶ ژنوتیپ اصلی شایع در جهان از طریق استفاده از پانل استاندارد ژنوتیپ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر ۶ ژنوتیپ می‌توانند به‌طور کارآمدی به‌وسیله روش طراحی شده شناسایی شوند. برای اثبات کاربردی بودن روش طراحی شده ۲۰۰ نمونه بالینی قبل از درمان مورد آزمایش قرار گرفت. میانگین بار ویروسی (۵/۸۱ ± ۰/۲۲، P<۰/۰۵) محاسبه شد. نتایج حاصل از روش راه اندازی شده بر روی نمونه‌های بالینی طیف 10^2-10^6 IU/ml را نشان داد که این نتایج قابل مقایسه با سایر مطالعات در زمینه Real- time PCR می‌باشد (۲۲،۲۳). از طرفی نتایج حاصل از این روش با نتایج بدست آمده از کیت تجاری Real-Time RT-PCR مقایسه شد. مقایسه

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-01-30]

نتایج نشان داد که همبستگی خوبی بین روش طراحی شده و کیت تجاری قبل از درمان ($P<۰/۰۵$، $R^2=۰/۹۸۸$)، مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که افراد کنترل سالم که تست آنتی‌بادی آن‌ها منفی بود هیچ‌گونه سیگنالی ناشی از تکثیر نشان ندادند، بنابراین ویژگی روش راه‌اندازی شده ۱۰۰٪ ارزش پیشگویی مثبت و منفی این روش نیز ۱۰۰٪ بود. در نهایت نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که روش کمی راه‌اندازی شده روشی سریع، دقیق و تکرارپذیر با محدوده تعیین گسترده جهت تعیین بار ویروسی نمونه‌های بالینی می‌باشد. این روش برای پیشگویی و مانیتورینگ کارآیی درمان ضدویروسی بسیار سودمند است. این تکنیک‌راهنمای مفیدی در تشخیص عفونت اولیه و ارزیابی پاسخ به درمان ضدویروسی در افراد در معرض خطر مانند اهداکنندگان خون، بیماران هموفیلی، معتادان تزریقی به شمار می‌رود. با تشخیص به‌موقع و درمان مناسب می‌توان از افزایش چشم‌گیر این بیماری و تبعات ناشی از آن تا حد امکان جلوگیری نمود. به دلیل هزینه بالای انجام آزمایش‌های تشخیص کمی و کیفی HCV، عدم استطاعت‌مالی، بیماران غالباً از انجام این آزمایش چشم‌پوشی می‌کنند. با بکارگیری این روش و قیمت نازل آن نسبت به کیت‌های تجاری موجود، می‌توان بیماری را در مراحل ابتدایی شناسایی نمود و نسبت به درمان آن اقدام کرد. امید است تا با کاربردی نمودن این روش گامی هرچند ناچیز در جهت شکوفایی کشور و کمک به بیماران مبتلا به HCV که اکثراً از قشر کم درآمد و بی‌بضاعت جامعه هستند، برداشته باشیم.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر طرح HSR بوده و حامی مالی آن دانشگاه علوم پزشکی لرستان می‌باشد. از آقای برخورداری مدیر امور آزمایشگاه‌ها و کلیه پرسنل مرکز رفرانس معاونت بهداشت دانشگاه علوم پزشکی لرستان که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، صمیمانه تشکر می‌نماییم.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-01-30]

References

1. Lee MH, Yang HI, Yuan Y, L'Italien G, Chen CJ. Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. World J Gastroenterol. 2014; 28: 9270-80.
2. Wiessing L, Ferri M, Grady B, Kantzanou M, Sperle I, Cullen KJ, et al. Hepatitis C Virus Infection Epidemiology among People Who Inject Drugs in Europe: A Systematic Review of Data for Scaling Up Treatment and Prevention. PLoS One. 2014; 9:1-19.
3. McGravey MJ, Houghton M. Structure and Molecular virology: Viral hepatitis. 3rd edition, Blackwell. USA; 2005, pp. 381-406.
4. Khodabandehloo M, Roshani D. Prevalence of hepatitis C virus genotypes in Iranian patients: a systematic review and meta-analysis. Hepat Mon. 2014; 14: 1-12.
5. Samimi-Rad K, Nasiri Toosi M, Masoudi-Nejad A, Najafi A, Rahimnia R, Asgari F, et al. Molecular epidemiology of hepatitis C virus among injection drug users in Iran: a slight change in prevalence of HCV genotypes over time. Archives of virology. 2012; 157:1959-1965.
6. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Use of virologic assays in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. Clin Liver Dis. 2005; 9: 371-382.
7. Raghuraman S, Thermozhi S, Dolly D. Occurrence of false positive during testing for antibodies of hepatitis C virus among volunteer blood donors in India. J Clin Microbiol. 2003; 41:1788-1790.
8. Gullett JC, Nolte FS. Quantitative nucleic acid amplification methods for viral infections. Clin Chem. 2015; 61:72-78.
9. Franciscus A. HCSP Publication. An overview of HCV diagnostic tests. http://www.hcvadvocate.org. 2015.
10. Wilkins T, Malcolm JK, Raina DD, Schade RR. Hepatitis C: Diagnosis and Treatment. Am Fam Physician. 2010; 81: 1351-1357.
11. Jabbari H, Zamani F, Hatami K, Sheikholeslami A, Fakharzadeh E, Shahzamani K, et al. Pegaferon in hepatitis C: Results of a Multicenter Study. Middle East J Dig Di. 2011; 3:110-114.
12. Davis GL. Monitoring of viral levels during therapy of Hepatitis. Hepatology. 2002; 36:145-151.
13. Jabbari H, Bayatian A, Sharifi AH, Zaer-Rezaee H, Fakharzadeh E, Asadi R, et al. Safety and efficacy of locally manufactured pegylated interferon in hepatitis C patients. Arch Iran Med. 2010; 13: 306-312.
14. Khalvati Fahlyani B و Behzad-Behbahani A, Taghavi SA, Farhadi A, Salehi S, Adibzadeh S, et al. Development of an In-House TaqMan Real Time RT-PCR Assay to Quantify Hepatitis C Virus RNA in Serum and Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection. Hepat Mon. 2015; 15: e28895.
15. Shahzamani K, Sabahi F, Merat S, Sadeghizadeh M, Esmaeil Lashkarian H, of hepatitis C virus RNA in HCV-infected patients by real-time RT-PCR using SYBR Green I. Arch Iran Med. 2011; 14: 396-400.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-01-30]

16. Chevaliez S.New markers for diagnosis and management of chronic hepatitis C virus infection. Ann Gastroenterol.2013; 26: 98-99.
17. Gupta E, Bajpai M, Choudhary A. Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. Asian J Transfus Sci. 2014; 8:19-25.
18. Halfon P, Bourlière M, Pénaranda G, Khiri H, Ouzan D. Real-time PCR assays for hepatitis C virus (HCV) RNA quantitation are adequate for clinical management of patients with chronic HCV infection. J Clin Microbiol. 2006; 44:2507-2511.
19. Shahzamani K, Merat S, Rezvan H, Mirab-Samiee S, Khademi H, Malekzadeh R, et al. Development of a low-cost real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique for the detection and quantification of hepatitis C viral load. Clinical chemistry and laboratory medicine. 2010; 48: 777-784.
20. Caplin BD, Rasmussen RP, Bernard PS, et al. LightCyclerTM-Hybridization probes. The most direct way to monitor PCR amplification for quantification and mutationdetection. Biomedica 1999; 1: 5-8.
21. Elkady A, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Sugiyama M, Khan A, et al. Performance of two Real-Time RT-PCR assays for quantitation of hepatitis C virus RNA: evaluation on HCV genotypes 1-4. J Med Virol. 2010; 82:1878-1888.
22. Pierce KE, Wangh LJ. Rapid detection and identification of hepatitis C virus (HCV) sequences using mismatch-tolerant hybridization probes: A general method for analysis of sequence variation. Biotechniques. 2013; 55:125-32.
23. Ratge D, Scheiblhuber B, Landt O, Berg J, Knabbe C. Two-round rapid-cycle RT-PCR in single closed capillaries increases the sensitivity of HCV RNA detection and avoids amplicon carry-over. J Clin Virol. 2002; 24:161-72.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-01-30]