۸۷/۱۱۰۶/۹۳
۸۷_۱۲۳

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

رساله دوره دکتری تخصصی در رشته ویروس‌شناسی پزشکی

عنوان

راه‌اندازی تکنیک Real-Time RT-PCR به منظور تعیین بار و ژنوتیپ ویروس هپاتیت C با بهره‌گیری از پانل استاندارد بین‌المللی در بیماران مبتلا به هپاتیت C

نگارش
کیانا شاهزمانی

استاد راهنما
دکتر فرزانه صباحی

اساتید مشاور
دکتر شاهین مرآت
دکتر حوری رضوان

۱۳۸۷/۸/۱

۱۳۸۷

۹۹۲۲۸

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

با عنایت به سیاست‌های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱ : حقوق مادی و معنوی پایان‌نامه‌ها / رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره‌برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعمل‌های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲ : انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه / رساله به‌صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی می‌باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما نویسنده مسئول مقاله باشند.

تبصره : در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی به‌صورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه / رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳ : انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان‌نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و براساس آیین‌نامه‌های مصوب انجام می‌شود.

ماده ۴ : ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه / رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵ : این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم‌الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی - پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته **ویروس‌شناسی پزشکی** است که در سال **۱۳۸۷** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی** ، مشاوره **جناب آقای دکتر شاهین مرآت و سرکار خانم دکتر حوری رضوان** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **کیانا شاهزمانی** دانشجوی رشته **ویروس‌شناسی پزشکی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

کیانا شاهزمانی

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم / آقای کیانا شاهزمانی رساله دکتری واحدی خود را با عنوان: " راه اندازی تکنیک RT-PCR Real-Time به منظور تعیین بار و ژنوتیپ ویروس هپاتیت c با بهره گیری از پانل استاندارد بین المللی در بیماران مبتلا به هپاتیت c" درتاریخ ۸۷/۴/۸ ارائه کردند. اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
۱- استاد راهنمای	دکتر فرزانه صباحی	
۲- استاد مشاور	دکتر شاهین مرآت	
۳-استاد مشاور	دکتر حوری رضوان	
٤-استاد ناظر	دکتر طلعت مختاری آزاد	
٥-استاد ناظر	دکتر مجید صادقی زاده	
٦-استاد ناظر	دکتر طراوت بامداد	
۷-استاد ناظر	دکتر مهرداد روانشاد	
۹-نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر حوریه سلیمانجاهی	

تقدیم به :

همسرم

به خاطر تمامی خوبیهایش

پسر دلبندم نوید

با عرض پوزش از تمامی لحظات تنهائیش

و دو سلطان مهر و محبت

پدر و مادر عزیزم

و به همه معلمان و استادانم که هرچه تاکنون کسب کرده‌ام ثمره زحمات این عزیزان می‌دانم.

وجودم برایشان همه رنج بود و وجودشان برایم همه مهر، مویشان سپیدی گرفت تا رویم سپید بماند ...

آنانکه با فروغ نگاهشان گرمی کلامشان روشنایی رویشان سرمایه‌های جاودانی زندگی‌ام هستند، آنانکه راستی قامتم در شکستگی قامتشان تجلی یافت. در برابر وجود گرامیشان زانوی ادب بر زمین می‌نهم و بادلی مملو از عشق و محبت بر دستانشان بوسه می‌زنم.

بلندای وجودشان همه استوار

تشکر و قدردانی

حمد و سپاس پروردگار یکتا را که الطاف بیکرانش در تمام لحظات زندگی‌ام جاری است.

خالصانه و خاضعانه‌ترین مراتب سپاس، تقدیر و تشکر نثار بزرگوارانی که در تمامی مراحل تحصیل و تحقیق یاور و پشتیبانم بوده‌اند.

استاد عالیقدر سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی که راهنمایی‌های دقیق و بی‌دریغ ایشان در طول تحصیل و تحقیق همواره راه گشایم بود.

استاد بزرگوار جناب آقای دکتر شاهین مرآت که در طول این تحقیق همواره در کنارم بودند و با خلوص نیت حمایتم نمودند.

استاد گرانقدر سرکار خانم دکتر حوری رضوان که از مساعدت و نظرات ارزشمند ایشان در طول تحقیق بهره بردم.

استاد ارجمند جناب آقای دکتر سیامک سمیعی که بر دانشجویی و کسب فیض از تجارب علمی و سجایای اخلاقی ایشان افتخار می‌کنم.

جناب آقای رامین نقی‌زاده که بدون یاری و همراهی خالصانه و بی‌دریغ ایشان، انجام این تحقیق میسر نبود.

اساتید محترم گروه ویروس‌شناسی، سرکار خانم دکتر حوریه سلیمانجاهی، سرکار خانم دکتر طراوت بامداد و جناب آقای دکتر مهرداد روانشاد به خاطر سالها همدلی و همراهی .

استاد عزیزم جناب آقای دکتر محسن کریمی که از مشاوره و تجارب علمی ایشان بهره فراوان بردم.

جناب آقای دکتر حسین جباری که در اجرای این تحقیق از تجارب علمی ایشان بهره بردم.

سرکار خانم‌ها دکتر هانیه زائر رضایی، الهام فخارزاده و ریحانه اسدی که از همکاریشان بهره بردم.

جناب آقای دکتر هومن خادمی به پاس پشتیبانی‌های بی‌شائبه در تجزیه و تحلیل‌های آماری .

همکاران ارجمندم جناب آقای دکتر سعید اسماعیلی و جناب آقای فرهاد قجقی که همواره مرا در انجام تحقیق یاری فرمودند.

تمامی دوستان عزیزم در گروه ویروس‌شناسی و مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان شریعتی.

و با تشکر فراوان از سرکار خانم دباغی که با نهایت دقت و سلیقه زحمت تایپ رساله را برعهده داشتند.

چکیده

هدف: ویروس هپاتیت C یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده هپاتیت ویروسی بشمار می رود. خطر انتقال عفونت ویروسی از طریق تزریق خون و فرآورده های آن ناشی از نقص روش های غربالگری سرولوژیک در تشخیص افراد آلوده ای است که در دوره پنجره بیماری هستند. با استفاده از روشهای مبتنی بر شناسایی اسید نوکلئیک مانند RT-PCR می توان عفونت را در مراحل ابتدایی و قبل از ظهور آنتی بادیهای اختصاصی تشخیص داد. غلظت RNA ویروس در سرم یا پلاسما (بار ویروسی) با میزان پاسخ به درمان و مرحله عفونت مرتبط می باشد. لذا ارزیابی و تعیین بار ویروسی اهمیت بسزایی دارد. از سوی دیگر، تعیین ژنوتیپ ویروس و نقش آن در مدیریت بالینی هپاتیت مزمن مطرح می شود که در بررسی پاسخ به درمان و ارزیابی طول مدت درمان حائز اهمیت است. بنابراین هدف از این تحقیق راه اندازی و توسعه روشهای دقیق و در عین حال ارزان قیمت جهت تشخیص کیفی HCV RNA و نیز سنجش کمی بار ویروسی در پلاسمای بیماران به همراه راه اندازی روشی ارزان و ساده برای تعیین نوع ژنوتیپ HCV می باشد.

مواد و روشها: در ابتدا به منظور جداسازی توالی مشخصی در ناحیه کاملا حفاظت شده HCV 5'UTR، یک روش RT-Nested PCR حساس و دقیق راه اندازی و بکار برده شد. به علت کارایی بالای پرایمرهای طراحی شده در این روش از پرایمرهای دور دوم PCR به منظور راه اندازی روش Real-Time RT-PCR کیفی استفاده شد.در این روش سنتز آمپلیکون بطور مداوم بوسیله اتصال رنگ SYBR Green I به DNA دو رشته ای نشان داده میشود و از طریق آنالیز منحنی ذوب مشخص می گردد. در مرحله بعد، سنجش کمی بار ویروسی در بیماران آلوده به فرم مزمن HCV روش Real-Time RT-PCR کمی راه اندازی شد. برای این منظور از یک جفت پرایمر و پروب هیبریدیزاسیون اختصاصی ناحیه 5'UTR استفاده شد. سنجش غلظت RNA ویروس با استفاده از منحنی استاندارد خارجی صورت گرفت.نتایج حاصل از این روش با نتایج بدست آمده از کیت Real-Time RT-PCR تجاری مقایسه شد. در نهایت، با بهره گیری از سرعت بالای دستگاه LightCycler و بکارگیری فرآورده‌های حاصل از روش کمی راه اندازی شده، یک روش ژنوتایپینگ طراحی شد. در این روش تمایز ژنوتیپ های HCV با استفاده از یک جفت پروب هیبریدیزاسیون و به کمک آنالیز منحنی ذوب انجام گرفت. لازم به ذکر است که معتبرسازی و استاندارد نمودن کلیه روشهای راه اندازی شده در این تحقیق با استفاده از پانل استاندارد RNA و پانل استاندارد ژنوتیپ NIBSC صورت گرفت.

نتایج: تعداد ۲۵ نمونه پلاسمای بیماران مبتلا به HCV و ۲۵ نمونه پلاسمای افراد سالم به عنوان کنترل منفی بوسیله روش RT-Nested PCR مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه نتایج حاصل از این روش با کیت One Step RT-PCR همبستگی خوبی را نشان داد. با استفاده از روش کیفی Real-Time RT-PCR مبتنی بر SYBR Green I، ۷۰ نمونه پلاسما (متعلق به ۵۵ بیمار مبتلا به HCV و ۱۵ فرد سالم) مورد آزمایش قرار گرفت. مقایسه نتایج حاصل از این روش با کیت One Step RT-PCR نشان داد که همبستگی خوبی بین دو روش وجود دارد.حساسیت روش کمی راه اندازی شده در این تحقیق معادل ۵۰IU/ml و محدوده تعیین آن IU/ml 10^{6}-10^{3} بود. ضریب تغییرات منحنی استاندارد ≥۰/۹۹ و ضریب تغییرات Intra- و Inter-assay نیز به ترتیب کمتر از ۱/۷۷٪ و ۳/۴۰٪ بود. آنالیز موازی ۵۶ نمونه آلوده به HCV با استفاده از این روش و کیت تجاری Real-Time RT-PCR نشان داد که همبستگی خوبی بین دو روش وجود دارد (قبل از درمان P<۰/۰۵ ، R^2=۰/۹۳۴)، (۱ ماه پس از درمان P<۰/۰۵ ، R^2=۰/۹۸۸)، (۳ ماه پس از درمان P<۰/۰۵ ، R^2=۰/۹۲۴). در پایان ژنوتیپهای ۵۶ بیمار مورد مطالعه بوسیله آنالیز منحنی ذوب تعیین گشته با نتایج حاصل از روش PCR-RFLP مقایسه گردید. نتایج حاصل نشان داد که دو روش از همبستگی مناسبی برخوردار می باشند (κ=۰/۸۷۵ ، P<۰/۰۵).

بحث: با توجه به نتایج بدست آمده، روشهای راه اندازی شده در این تحقیق از حساسیت و ویژگی بالایی در تشخیص کیفی، سنجش کمی و تعیین ژنوتیپ HCV در مقیاس وسیع برخوردار می باشند. بنابراین می توانند به عنوان جایگزین مناسبی برای روشهای گران قیمت تجاری به ویژه برای ارزیابی کفایت درمان مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: ویروس هپاتیت C، Real-Time RT-PCR ، بار ویروسی، ژنوتایپینگ

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. مقدمه ۲

۱-۲. مروری بر مطالعات انجام شده ۱۰

۱-۲-۱. تاریخچه و شناخت بیماری ۱۰

۱-۲-۲. شناسایی ویروس ۱۱

۱-۲-۳. طبقه‌بندی ۱۳

۱-۲-۴. نامگذاری و ژنوتیپ‌ها ۱۴

۱-۲-۵. سیر ایجاد ژنوتیپ ۱۵

۱-۲-۶. خصوصیات ویریون ۱۶

۱-۲-۷. سازماندهی ژنومی ۱۷

۱-۲-۷-۱. عناصر RNA کنترل کننده ترجمه و همانندسازی RNA ۱۸

۱-۲-۷-۱-۱. ناحیه 5′UTR ۱۸

۱-۲-۷-۱-۲. ناحیه 3′UTR ۱۹

۱-۲-۷-۱-۳. ساختار RNA داخلی و عناصر همانندسازی Cis-acting ۲۰

۱-۲-۷-۲. پروتئین‌های ویروسی ۲۰

۱-۲-۷-۲-۱. پروتئین Core ۲۱

۱-۲-۷-۲-۲. گلیکوپروتئین‌های انولوپ ۲۲

۱-۲-۷-۲-۳. پروتئین ARFP/F ۲۲

۱-۲-۷-۲-۴. پروتئین P7 ..... ۲۲

۱-۲-۷-۲-۵. اتوپروتئاز NS2-3 ..... ۲۳

۱-۲-۷-۲-۶. پروتئین NS3-4A ۲۳

۱-۲-۷-۲-۷. پروتئین NS4B ۲۴

۱-۲-۷-۲-۸. پروتئین NS5A ۲۴

۱-۲-۷-۲-۹. پروتئین NS5B ۲۵
۱-۲-۸. چرخه تکثیر ویروس ۲۵
۱-۲-۸-۱. ورود ویروس ۲۵
۱-۲-۸-۲. کمپلکس همانندسازی ویروسی ۲۷
۱-۲-۸-۳. گردهمایی و آزادسازی ذره ۲۹
۱-۲-۹. تکثیر ویروس در کشت سلولی ۳۰
۱-۲-۱۰. مدلهای حیوانی ۳۰
۱-۲-۱۱. تروپیسم بافتی ۳۱
۱-۲-۱۲. مکانیسم ایجاد بیماری مزمن ۳۱
۱-۲-۱۳. مکانیسم آسیب کبدی با واسطه ایمنی ۳۳
۱-۲-۱۴. اپیدمیولوژی ۳۵
۱-۲-۱۴-۱. شیوع ۳۵
۱-۲-۱۴-۲. روش‌های انتقال ۳۹
۱-۲-۱۵. تظاهرات بالینی ۳۹
۱-۲-۱۵-۱. هپاتیت C حاد ۳۹
۱-۲-۱۵-۲. هپاتیت C مزمن ۴۱
۱-۲-۱۵-۳. تظاهرات خارج کبدی ۴۲
۱-۲-۱۶. عوارض ۴۳
۱-۲-۱۶-۱. سیروز و کارسینومای هپاتوسلولار (HCC) ۴۳
۱-۲-۱۷. تشخیص ۴۳
۱-۲-۱۷-۱. روش‌های سرولوژی ۴۳
۱-۲-۱۷-۱-۱. تعیین آنتی‌بادی ضد HCV ۴۳
۱-۲-۱۷-۱-۲. تعیین سرولوژیکی ژنوتیپ HCV ۴۴
۱-۲-۱۷-۲. روش‌های تشخیص اسید نوکلئیک ویروس ۴۴
۱-۲-۱۷-۲-۱. تشخیص کیفی HCV RNA ۴۴

۱-۲-۱۷-۲-۲. تشخیص کمی HCV RNA ۴۵
۱-۲-۱۷-۳. تعیین مولکولی ژنوتیپ‌های HCV (ژنوتایپینگ) ۴۷
۱-۲-۱۷-۴. تعیین آنتی‌ژن HCV Core ۴۷
۱-۲-۱۸. پیشگیری ۴۸
۱-۲-۱۹. درمان ۴۹
۱-۲-۱۹-۱. درمان با اینترفرون آلفا ۴۹
۱-۲-۱۹-۲. اینترفرون با اثر طولانی ۴۹
۱-۲-۱۹-۳. درمان توام ۵۰
۱-۲-۲۰. بررسی متون ۵۱
۱-۲-۲۱. مقدمه‌ای بر Real-Time PCR ۵۷
۱-۲-۲۲. کاربردهای مختلف روش Real-Time PCR ۶۰
۱-۲-۲۳. مزایای Real-Time PCR ۶۳

فصل دوم: مواد و روشها ۶۵
۲-۱. جامعه مورد مطالعه ۶۶
۲-۲. روش نمونه‌گیری ۶۶
۲-۳. ملاحظات اخلاقی ۶۷
۲-۴. آماده‌سازی نمونه ۶۷
۲-۵. طراحی و انتخاب پرایمرها ۶۸
۲-۵-۱. انتخاب ناحیه کاملاً حفاظت شده ژنوم HCV ۶۸
۲-۵-۲. طراحی پرایمر اختصاصی ناحیه HCV 5' UTR ۶۸
۲-۶. فضا و تجهیزات لازم برای PCR ۶۹
۲-۷. استخراج RNA ویروس هپاتیت C ۷۱
۲-۷-۱. مواد و وسایل ۷۱
۲-۸. روش نگهداری RNA استخراج شده ۷۳

۲-۹. PCR های تغییریافته ۷۳
۲-۹-۱. مواد و وسایل ۷۳
۲-۹-۲. روش RT-PCR ۷۴
۲-۹-۲-۱. واکنش رونویسی معکوس ۷۴
۲-۹-۲-۲. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۷۵
۲-۹-۳. آزمایش RT-Nested PCR ۷۷
۲-۹-۳-۱. پرایمرهای مورد استفاده در روش RT-Nested PCR ۷۸
۲-۹-۳-۲. آغاز واکنش RT ۷۸
۲-۹-۳-۳. آغاز واکنش Nested PCR ۷۹
۲-۹-۳-۴. الکتروفورز در ژل آگارز ۸۲
۲-۹-۳-۵. بهینه‌سازی روش Nested PCR ۸۳
۲-۹-۳-۶. بکارگیری روش RT-Nested PCR بر روی نمونه‌های بالینی ۸۴
۲-۹-۴. روش RT-PCR یک مرحله‌ای ۸۴
۲-۱۰. روش تشخیص محصول PCR در زمان واقعی ۸۵
۲-۱۰-۱. روش Real-Time RT-PCR کیفی ۸۸
۲-۱۰-۱-۱. مواد و وسایل ۹۰
۲-۱۰-۱-۲. طراحی و انتخاب پرایمر ۹۱
۲-۱۰-۱-۳. واکنش نسخه‌برداری معکوس ۹۱
۲-۱۰-۱-۴. Real-Time PCR اولیه ۹۲
۲-۱۰-۱-۵. استراتژی بهینه‌سازی برای آنالیز با SYBR Green I ۹۶
۲-۱۰-۱-۶. بکارگیری روش Real-Time RT-PCR مبتنی بر SYBR Green I بر روی نمونه‌های بالینی ۹۸
۲-۱۰-۲. روش Real-Time RT-PCR کمی ۱۰۰
۲-۱۰-۲-۱. مواد و وسایل ۱۰۱
۲-۱۰-۲-۲. طراحی و انتخاب پرایمر ۱۰۱
۲-۱۰-۲-۳. انتخاب پروب‌های هیبریدیزاسیون ۱۰۲

۲-۱۰-۲-۴. آزمایش Real-Time RT-PCR اولیه ۱۰۳
۲-۱۰-۲-۵. استراتژی بهینه‌سازی برای آنالیز با پروب‌های هیبریدیزاسیون ۱۰۷
۲-۱۰-۲-۶. منحنی استاندارد ۱۰۸
۲-۱۰-۲-۷. آماده‌سازی استانداردهای مرجع HCV ۱۰۹
۲-۱۰-۳. معتبر کردن و تأیید نمودن روش Real-Time RT-PCR کمی ۱۱۰
۲-۱۰-۳-۱. ویژگی ۱۱۰
۲-۱۰-۳-۲. حساسیت و محدوده تعیین ۱۱۰
۲-۱۰-۳-۳. دقت ۱۱۱
۲-۱۰-۳-۴. تکرارپذیری ۱۱۱
۲-۱۰-۳-۵. خطی بودن ۱۱۲
۲-۱۱. بکارگیری روش Real-Time RT-PCR کمی بر روی نمونه‌های بالینی ۱۱۲
۲-۱۲. آزمایش Real-Time RT-PCR به کمک کیت ۱۱۶
۲-۱۳. ژنوتایپینگ با استفاده از پروب‌های هیبریدیزاسیون ۱۱۸
۲-۱۳-۱. انتخاب پروب‌های هیبریدیزاسیون ۱۱۹
۲-۱۳-۲. راه‌اندازی آزمایش ژنوتایپینگ ۱۲۰
۲-۱۳-۳. بهینه‌سازی روش ژنوتایپینگ ۱۲۱
۲-۱۳-۴. استفاده از روش ژنوتایپینگ بر روی نمونه‌های بالینی ۱۲۲

فصل سوم: نتایج ۱۲۴
۳-۱. نتایج حاصل از RT-Nested PCR اولیه ۱۲۵
۳-۱-۱. نتایج حاصل از PCR دور اول ۱۲۵
۳-۱-۲. نتایج حاصل از PCR دور دوم ۱۲۶
۳-۲. بهینه‌سازی روش Nested PCR ۱۲۶
۳-۲-۱. غلظت $MgCl_2$ ۱۲۶
۳-۳. تعیین حساسیت آنالیتیکی روش RT-Nested PCR ۱۲۹

۳-۴. نتایج حاصل از آزمایش RT-Nested PCR بر روی نمونه‌های بالینی ۱۲۹
۳-۵. نتایج حاصل از مقایسه روش RT-Nested PCR راه‌اندازی شده با کیت RT-PCR یک مرحله‌ای ۱۳۰
۳-۶. نتایج اولیه حاصل از روش Real-Time RT-PCR کیفی ۱۳۱
۳-۷. نتایج حاصل از بهینه‌سازی روش Real-Time RT-PCR کیفی ۱۳۲
۳-۷-۱. غلظت $MgCl_2$ ۱۳۲
۳-۷-۲. دمای اتصال پرایمر ۱۳۲
۳-۷-۳. بهینه‌سازی غلظت پرایمر ۱۳۳
۳-۷-۴. تعیین حساسیت آنالیتیکی روش Real-Time RT-PCR کیفی ۱۳۴
۳-۷-۵. تعیین ویژگی روش Real-Time RT-PCR کیفی ۱۳۴
۳-۸. نتایج حاصل از آزمایش Real-Time RT-PCR کیفی بر روی نمونه‌های بالینی ۱۳۶
۳-۹. نتایج حاصل از مقایسه روش Real-Time RT-PCR کیفی و روش RT-PCR یک مرحله‌ای ۱۳۷
۳-۱۰. نتایج اولیه حاصل از روش Real-Time RT-PCR کمی ۱۳۸
۳-۱۱. نتایج حاصل از بهینه‌سازی روش Real-Time RT-PCR کمی ۱۳۹
۳-۱۱-۱. نتایج حاصل از تغییر مقدار الگوی هدف ۱۳۹
۳-۱۱-۲. نتایج حاصل از تغییر غلظت پرایمر ۱۴۰
۳-۱۱-۳. نتایج حاصل از تغییر دمای اتصال پرایمرها ۱۴۰
۳-۱۱-۴. نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت پروب‌های هیبریدیزاسیون ۱۴۲
۳-۱۱-۵. استفاده از نمونه‌های با بار ویروسی مشخص ۱۴۳
۳-۱۲. نتایج حاصل از معتبر بودن روش Real-Time RT-PCR کمی ۱۴۴
۳-۱۲-۱. تعیین ویژگی روش راه‌اندازی شده ۱۴۴
۳-۱۲-۲. تعیین حساسیت روش راه‌اندازی شده ۱۴۴
۳-۱۲-۳. تعیین دقت روش راه‌اندازی شده ۱۴۷
۳-۱۲-۴. نتایج حاصل از تعیین تکرارپذیری روش راه‌اندازی شده ۱۴۸
۳-۱۲-۵. تأیید خطی بودن روش راه‌اندازی شده ۱۴۹
۳-۱۲-۶. کالیبره نمودن استانداردهای روش راه‌اندازی شده ۱۴۹

۳-۱۳. نتایج حاصل از سنجش کمی HCV RNA بیماران با استفاده از روش Real-Time RT-PCR ۱۵۰
۳-۱۴. نتایج مربوط به مقایسه روش Real-Time RT-PCR کمی راه‌اندازی شده و کیت تجاری ۱۵۲
۳-۱۵. نتایج حاصل از آزمایش ژنوتایپینگ اولیه ۱۵۴
۳-۱۶. نتایج حاصل از بهینه‌سازی روش ژنوتایپینگ ۱۵۴
۳-۱۶-۱. نتایج حاصل از تغییر غلظت $MgCl_2$ ۱۵۴
۳-۱۶-۲. نتایج حاصل از تغییر غلظت پروب‌های هیبریدیزاسیون ۱۵۵
۳-۱۶-۳. نتایج حاصل از بکارگیری پانل استاندارد ژنوتیپ ۱۵۶
۳-۱۶-۴. نتایج حاصل از انجام آزمایش ژنوتایپینگ بر روی نمونه‌های بالینی ۱۵۶
۳-۱۷. نتایج حاصل از مقایسه روش ژنوتایپینگ راه‌اندازی شده با روش PCR-RFLP ۱۵۷
۳-۱۸. یافته‌های بالینی و آنالیز آماری ۱۵۷

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۶۱
۴-۱. بحث ۱۶۲
۴-۲. نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۷۴

فهرست منابع ۱۷۵
ضمایم ۱۸۷
چکیده انگلیسی ۱۹۶

فهرست جداول

جدول ۱-۱. مدل‌های in vitro و in vivo برای مطالعه HCV ۳۱

جدول ۱-۲. مقایسه روش‌های کمی و کیفی سنجش HCV RNA ۴۶

جدول ۲-۱. توالی پرایمرهای اختصاصی ناحیه 5′UTR برای آزمایش Real-Time RT-PCR کیفی ۹۱

جدول ۲-۲. توالی پرایمرهای اختصاصی ناحیه 5′UTR برای آزمایش Real-Time RT-PCR کمی ۱۰۲

جدول ۲-۳. توالی پروب‌های اختصاصی برای آزمایش Real-Time RT-PCR کمی ۱۰۳

جدول ۲-۴. توالی پروب‌های اختصاصی برای آزمایش ژنوتایپینگ ۱۱۹

جدول ۲-۵. تغییرات توالی 5′ UTR اختصاصی ژنوتیپ HCV در ناحیه هدف پروب Sensor ۱۲۰

جدول ۳-۱. تعیین میزان مثبت بودن غلظت‌های مختلف از یک نمونه با بار ویروسی مشخص ۱۲۹

جدول ۳-۲. تعیین حساسیت و ویژگی روش RT-Nested PCR راه‌اندازی شده ۱۳۰

جدول ۳-۳. مقایسه روش RT-PCR یک مرحله‌ای با روش RT-PCR راه‌اندازی شده ۱۳۰

جدول ۳-۴. شناسایی ژنوتیپ‌های HCV به‌وسیله روش Real-Time RT-PCR ۱۳۵

جدول ۳-۵. همبستگی روش Real-Time RT-PCR کیفی و روش RT-PCR یک مرحله‌ای ۱۳۷

جدول ۳-۶. تعیین حساسیت آنالیتیکی روش راه‌اندازی شده ۱۴۵

جدول ۳-۷. شناسایی ژنوتیپ‌ها به‌وسیله روش Real-Time RT-PCR ۱۴۶

جدول ۳-۸. دقت Intra-assay در روش Real-Time RT-PCR ۱۴۷

جدول ۳-۹. دقت Inter-assay در روش کمی Real-Time RT-PCR ۱۴۸

جدول ۳-۱۰. تکرارپذیری روش کمی Real-Time RT-PCR ۱۴۸

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱. آنالیز منحنی ذوب اولیه ۱۳۱

نمودار ۳-۲. نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت $MgCl_2$ ۱۳۲

نمودار ۳-۳. نتایج حاصل از بهینه‌سازی دمای اتصال پرایمر ۱۳۳

نمودار ۳-۴. نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت پرایمر ۱۳۳

نمودار ۳-۵. محدوده تعیین روش Real-Time RT-PCR کیفی ۱۳۴

نمودار ۳-۶. تعیین ویژگی روش Real-Time RT-PCR کیفی ۱۳۵

نمودار ۳-۷. آنالیز منحنی ذوب محصولات Real-Time PCR ۱۳۶

نمودار ۳-۸. نتایج اولیه حاصل از روش Real-Time RT-PCR کمی ۱۳۸

نمودار ۳-۹. نتایج حاصل از تغییر مقدار الگوی هدف ۱۳۹

نمودار ۳-۱۰. نتایج حاصل از تغییر غلظت پرایمر ۱۴۰

نمودار ۳-۱۱. نتایج حاصل از تغییر دمای اتصال پرایمرها ۱۴۱

نمودار ۳-۱۲. نتایج حاصل از بهینه‌سازی غلظت پروب‌های هیبریدیزاسیون. ۱۴۲

نمودار ۳-۱۳. نتایج حاصل از بکارگیری نمونه‌های با تیتر ویروسی مشخص (الف)، به همراه استانداردها (ب). ۱۴۳

نمودار ۳-۱۴. نتایج حاصل از تعیین ویژگی روش راه‌اندازی شده ۱۴۴

نمودار ۳-۱۵. محدوده تعیین روش Real-Time RT-PCR کمی ۱۴۵

نمودار ۳-۱۶. نتایج حاصل از آزمایش Real-Time RT-PCR کمی بر روی پانل ژنوتیپ ۱۴۶

نمودار ۳-۱۷. الگوی تکثیری حاصل از آزمایش Intra-assay ۱۴۷

نمودار ۳-۱۸. نتایج حاصل از خطی بودن روش راه‌اندازی شده ۱۴۹

نمودار ۳-۱۹. نتایج حاصل از کالیبره نمودن استانداردهای روش راه‌اندازی شده ۱۴۹

نمودار ۳-۲۰. الگوی تکثیری مربوط به نمونه‌های بیماران و رقت‌های سریال RNA استاندارد. ۱۵۰

نمودار ۳-۲۱. بار ویروسی اندازه‌گیری شده با روش Real-Time RT-PCR کمی در مقیاس لگاریتمی در بیماران مبتلا به HCV قبل از درمان، یک و سه ماه بعد از درمان. ۱۵۱

نمودار ۳-۲۲. مقایسه نتایج حاصل از روش راه‌اندازی شده و کیت تجاری بر روی بیماران قبل از درمان (P<۰/۰۵) ۱۵۲
نمودار ۳-۲۳. مقایسه نتایج حاصل از روش راه‌اندازی شده و کیت تجاری بر روی بیماران یک ماه بعد از درمان (P<۰/۰۵). ۱۵۳
نمودار ۳-۲۴. مقایسه نتایج حاصل از روش راه‌اندازی شده و کیت تجاری بر روی بیماران سه ماه بعد از درمان (P<۰/۰۵) ۱۵۳
نمودار ۳-۲۵. آنالیز منحنی ذوب حاصل از آزمایش ژنوتایپینگ اولیه ۱۵۴
نمودار ۳-۲۶. آنالیز منحنی ذوب حاصل از یک نمونه بیمار مبتلا به HCV ژنوتیپ ۳ در غلظت‌های ۸-۱ میلی‌مولار از $MgCl_2$ ۱۵۵
نمودار ۳-۲۷. آنالیز منحنی ذوب حاصل از غلظت‌های مختلف پروب‌های هیبریدیزاسیون بر روی دو نمونه بیمار با ژنوتیپ‌های ۱ و ۲. ..... ۱۵۵
نمودار ۳-۲۸. آنالیز منحنی ذوب حاصل از بکارگیری پانل استاندارد ژنوتیپ ۱۵۶
نمودار ۳-۲۹. آنالیز منحنی ذوب حاصل از آزمایش ژنوتایپینگ بر روی نمونه‌های بالینی ۱۵۷
نمودار ۳-۳۰. فرکانس ژنوتیپ‌های موجود در جامعه مورد مطالعه ۱۵۹
نمودار ۳-۳۱. مقایسه میانگین لگاریتم بار ویروسی در غیرپاسخ دهنده‌ها قبل از درمان، یک و سه ماه پس از آن ۱۶۰
نمودار ۳-۳۲. مقایسه میانگین لگاریتم بار ویروسی در پاسخ‌دهنده‌ها قبل از درمان، یک و سه ماه پس از آن .. ۱۶۰

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱. سازماندهی ژنومی و پردازش پلی‌پروتئین ویروس هپاتیت C ۱۸

شکل ۱-۲. ساختار ثانویه HCV RNA در ناحیه 5'UTR ۱۹

شکل ۱-۳. جدیدترین مدل برای ورود ویروس هپاتیت C ۲۷

شکل ۱-۴. چرخه تکثیر ویروس هپاتیت C ۲۹

شکل ۱-۵. تصویر میکروسکوپ الکترونی ویروس هپاتیت C ۳۰

شکل ۱-۶. شمایی از تاریخچه طبیعی عفونت HCV ۴۲

شکل ۱-۷. سیستم‌های مختلف شناسایی در Real-Time PCR ۶۲

شکل ۲-۱. فازهای مختلف Real-Time PCR ۸۷

شکل ۲-۲. آنالیز منحنی ذوب ۸۹

شکل ۲-۳. منحنی‌های افزایش میزان فلورسانس در چرخه‌های PCR ۱۰۰

شکل ۳-۱. نتایج حاصل از روش PCR دور اول قبل از بهینه‌سازی. ۱۲۵

شکل ۳-۲. نتایج حاصل از روش Nested PCR قبل از بهینه‌سازی. ۱۲۶

شکل ۳-۳. بهینه‌سازی غلظت $MgCl_2$ و دمای اتصال پرایمرها در دور اول PCR ۱۲۷

شکل ۳-۴. بهینه‌سازی غلظت $MgCl_2$ و دمای اتصال پرایمرها در دور دوم PCR ۱۲۸

شکل ۳-۵. نتایج حاصل از روش RT-Nested PCR بعد از بهینه‌سازی. ۱۲۸

شکل ۳-۶. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات Real-Time PCR کیفی ۱۳۷

شکل ۳-۷. نتایج حاصل از الکتروفورز نمونه‌ها قبل از بهینه‌سازی. ۱۳۸

شکل ۳-۸. نتایج حاصل از الکتروفورز نمونه‌ها. ۱۴۱

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات انجام شده

۱-۱. مقدمه

هپاتیت C یکی از مهمترین عوامل ایجاد هپاتیت مزمن در کشورهای توسعه یافته است. طبق آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO) بیش از ۱۷۰ میلیون نفر در دنیا مبتلا به هپاتیت C هستند. این مبتلایان در اروپا، آمریکا و بسیاری از نقاط مختلف دنیا مشاهده می‌شوند. آمار مرکز کنترل بیماری‌ها در آمریکا حاکی از آن است که تنها در این کشور ۴ میلیون نفر مبتلا به هپاتیت C هستند که هر سال حدوده ده هزار مرگ را سبب می‌شود. این احتمال وجود دارد که در دهه‌های آینده تعداد افراد مبتلا به سیروز کبدی و سرطان کبد افزایش یابد، مگر اینکه راههای پیشگیری و مبارزه با آن به‌طور جدی مورد اجرا گذاشته شود [۳-۱].

ویروس هپاتیت C (HCV) عضوی از جنس هپاسی ویروس و متعلق به خانواده فلاوی ویریده است. بنابراین از لحاظ ویروس‌شناسی با ویروس تب زرد و تب دانگ مرتبط می‌باشد. HCV از نظر سازماندهی ژنومی و هیدروفوبیسیتی پلی‌پروتئین شبیه به پستی ویروس‌ها و فلاوی ویروس‌ها است. ژنوم این ویروس به‌صورت RNA تک رشته‌ای با پلاریته مثبت است. دارای قطر ۳۸-۳۰ نانومتر و یک انولوپ لیپیدی می‌باشد. ژنوم ویروس مشتمل بر یک قالب خواندنی (ORF) بزرگ با ۹۴۸۱-۹۳۷۹ نوکلئوتید است. در دو انتهای ژنوم دارای UTR[1] است که ORF کد کننده پلی‌پروتئین ۳۰۰۰ آمینواسیدی را احاطه کرده‌اند [۴ و ۵].

در انتهای 5′ (5′UTR)، یک ناحیه ۳۴۱-۳۲۹ نوکلئوتیدی با ۹۲٪ همولوژی بین تیپ‌های مختلف HCV وجود دارد. این ناحیه احتمالاً در ترجمه ژنوم ویروس ایفای نقش می‌کند و ویژگی بسیار

[1] Untranslated Region