Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:11 +0430 on Wednesday June 20th 2018

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2012; 15(63): 18-25

Rapid detection of HIV-1 viral RNA by real-time transcription mediated amplification assay

Paryan M(M.Sc)[1*], Mohammadi-Yeganeh S(M.Sc)[1], Khansarinejad B(M.Sc)[2], Mondanizadeh M(M.Sc)[3], Paryan S(M.D)[4]

1- Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
2- Department of Microbiology and Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3- Department of Medical Genetics and Molecular Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
4- Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Received: 2 Jul 2011, Accepted: 18 Oct 2011

Abstract

Background: Several different molecular methods have been developed that are capable of detecting HIV-1 in clinical specimens with different levels of sensitivity and specificity. This article describes the results of a reliability study on the development and application of a new real-time TMA method for isothermal detection of HIV-1.

Materials and Methods: In this ex Primental study, the molecular beacon primer and probe set were designed for a 176-base-pair region of HIV-1 pol gene using a specialized software. Logarithmic serial dilutions from 10-10^7 copies of an in-vitro transcribed RNA were used for determination of the analytical sensitivity of the assay. Clinical specimens that had previously been evaluated positive or negative by a valid commercial assay were used for assessing the clinical sensitivity and specificity of the assay.

Results: The analytical and clinical sensitivities of the assay were determined 500 copies/ml and 93.3%, respectively. The primers and the probe were HIV-1 specific and no cross-reaction was observed with other blood-borne viruses and human genome bioinformatically. The clinical specificity of the developed real-time TMA assay was examined experimentally using 20 negative samples and determined to be 100%.

Conclusion: The developed real-time TMA assay can be used as an appropriate tool for the rapid and isothermal detection of HIV-1 in patients' blood and plasma samples.

Keywords: Human immunodeficiency virus-1, Molecular Beacon, Probe, Transcription mediated amplification

*Corresponding author:
Address: Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Email: mparyan@gmail.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:11 +0430 on Wednesday June 20th 2018

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره 4 (شماره پیاپی 63)، شهریور 1391،25-18

تشخیص سریع RNA ویروس HIV-1 به وسیله روش Real-time Transcription mediated amplification

مهدی پریان[1*]، سمیرا محمدی یگانه[1]، بهزاد خوانساری نژاد[2]، مهدیه موندنی‌زاده[3] ،سعید پریان[4]

1- دانشجوی دکترای بیوتکنولوژی پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
2- دانشجوی دکترای ویروس‌شناسی پزشکی، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
3- دانشجوی دکترای پزشکی مولکولی، گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
4- پزشکی عمومی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: 90/4/12 تاریخ پذیرش: 90/7/27

چکیده

زمینه و هدف: روش‌های ملکولی متعددی توسعه یافته‌اند که قادرند با حساسیت و ویژگی متفاوتی HIV-1 را در نمونه‌های بالینی تشخیص دهند. در این مقاله نتایج حاصل از یک مطالعهٔ ارتباط سنجی در راه اندازی و به کارگیری یک روش Real-time PCR TMA نوین جهت تشخیص هم دمای ویروس HIV-1 ارائه شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعهٔ مقطعی، ست پرایمر و پروب Molecular Beacon توسط نرم افزارهای اختصاصی و برای یک ناحیهٔ 176 جفت بازی از ژن pol ویروس HIV-1 طراحی شد. برای تعیین حساسیت آنالیتیک واکنش از رقت‌های لگاریتمی 10^7-10 کپی RNAهای حاصل از رونویسی در آزمایشگاه، به عنوان استاندارد استفاده شد. برای ارزیابی حساسیت و ویژگی کلینیکی واکنش از نمونه‌های بالینی استفاده شد که پیش از این مثبت و منفی بودن آنها به وسیلهٔ یک تست تجاری معتبر تایید شده بود.

یافته‌ها: حساسیت آنالیتیک و کلینیکی این روش به ترتیب معدل 500 کپی در میلی‌لیتر و 93/3 درصد در نظر گرفته شد. پرایمرها و پروب طراحی شده تنها به توالی‌های اختصاصی HIV-1 متصل می‌گردند و مطالعات بیوانفورمانیکی هیچ گونه واکنش متقاطعی با ژنوم سایر ویروس‌های انتقال یابنده از طریق خون و ژنوم انسان نشان ندادند. ویژگی کلینیکی روش نیز به طور تجربی و با بررسی 20 نمونهٔ منفی به وسیلهٔ روش Real-time TMA راه اندازی شده، مورد آزمایش قرار گرفت و معادل 100 درصد در نظر گرفته شد.

نتیجه‌گیری: روش Real-time TMA راه‌اندازی شده به علت دارا بودن سرعت، حساسیت و سادگی می‌تواند به عنوان ابزار مفیدی جهت تشخیص سریع و هم دمای ویروس HIV-1 در نمونه‌های خون و پلاسمای بیماران استفاده شود.

واژگان کلیدی: ویروس نقص ایمنی اکتسابی 1، مولکولار بیکن، پروب، تکثیر بواسطه نسخه برداری

***نویسنده مسئول:** تهران، انسیتورپاستور ایران، گروه بیوتکنولوژی پزشکی

Eami: mparyan@gmail.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:11 +0430 on Wednesday June 20th 2018

مقدمه

در حال حاضر در سطح جهان، 33 میلیون نفر به ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسان (Human immunode ficiency virus-HIV) آلوده می‌باشند(1). عفونت با ویروس HIV-1 از جمله مهم‌ترین معضلات بهداشتی جهان محسوب می‌شود. بیماری پیشرونده مزمن و دورهٔ نهفتگی طولانی مدت از خصوصیات بارز عفونت با این ویروس است. بیش از 90 درصد از عفونت‌های جدید از طریق پوشش‌های مخاطی دستگاه تناسلی و دستگاه گوارش رخ می‌دهند(2). راه عمده انتقال HIV-1 بسته به نواحی جغرافیایی مختلف متفاوت است(3). عفونت با HIV-1 منجر به کاهش تدریجی تعداد سلول‌های TCD4 و توسعه بیماری ایدز می‌شود. ماکروفاژها نیز از اهمیت ویژه‌ای در پاتوژنز HIV-1، به عنوان سلول اصلی درگیر در انتقال از مخاط به نظر می‌رسند. علاوه بر این، به نظر می‌رسد ماکروفاژها در برابر اثرات سیتوپاتیک HIV-1 مقاوم می‌باشند به طوری که گمان می‌رود آنها نقش حیاتی در بقای ویروس، نهفتگی و انتشار ویروس داشته باشند(6-4).

روش شایع و اصلی تشخیص عفونت HIV-1، ردیابی سرولوژیک آنتی بادی‌های اختصاصی علیه این ویروس در سرم افرد بیمار است. روش‌های سرولوژیک دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشند. از جمله مهم‌ترین محدودیت‌های روش‌های سرولوژی عدم تشخیص موارد عفونی در دورهٔ پنجره (Window Period) و زمانی است که هنوز شاخص‌های ایمنی شناختی بیمار بالا نرفته است(7). یکی دیگر از محدودیت‌های روش‌های سرولوژی وجود آنتی‌بادی مادری و عدم امکان ارزیابی عفونت در نوزادان متولد شده از مادران HIV-1 مثبت می‌باشد(3، 10-8). در این شرایط، روش‌های مولکولی از جمله RT-PCR و Real-time RT-PCR روش‌های مناسب برای تشخیص عفونت HIV-1 هستند. این روش‌ها وابسته به سیکل‌های حرارتی جهت تکثیر اسید نوکلئیک بوده و بنابر این نیاز به دستگاه ترموسیکلر دارند(11، 12). از طرفی، این تکنیک‌ها علاوه بر RNA، قابلیت تکثیر DNA را نیز داشته و آلودگی RNA تخلیص شده از سلول با DNA ژنومیک می‌تواند مشکل ساز باشد و با این شرایط نمی‌توان نتیجه گرفت که محصولات تکثیر یافته در RT-PCR همگی حاصل تکثیر RNA بوده‌اند(13).

با به کارگیری تکنیک‌هایی مانند Transcription mediated amplification-TMA که یک روش تکثیر اسید نوکلئیک به صورت هم‌دما می‌باشد، امکان گذر از چنین مشکلاتی فراهم می‌شود و امکان تکثیر DNA وجود ندارد. مزیت مهم دیگر این تکنیک نسبت به روش‌های RT-PCR، عدم نیاز به دستگاه ترموسیکلر است. وجود تمامی این مزیت‌ها باعث شده که تکنیک TMA بتواند جایگاه ویژه‌ای در شناسایی میکروارگانیسم‌ها بیابد. این روش برای تکثیر و آشکارسازی ژنوم RNA ویروسی، بسیار مناسب می‌باشد زیرا نیاز به مرحله جداگانه‌ای جهت نسخه‌برداری معکوس ندارد(13، 14). تا کنون چندین مطالعه روش TMA را برای تشخیص ارگانیسم‌ها گزارش کرده‌اند. از جمله NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) برای ردیابی تغییر بیان RNA مربوط به pp67 و IE1 کد شده توسط ویروس CMV (15). و هم‌چنین ردیابی همزمان مایکوپلاسما پنومونیه، کلامیدیا پنومونیه و گونه‌های لژیونلا در نمونه‌های تنفسی(12). از این‌رو هدف از این مطالعهٔ اعتبار سنجی، راه اندازی و به کارگیری یک روش Real-time TMA جهت تشخیص ویروس HIV-1 بوده تا با استفاده از آن بتوان عفونت با این ویروس را در نمونه‌های پلاسما تشخیص داد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعهٔ تجربی، در مجموع از 30 نمونهٔ پلاسمای آلوده به HIV-1 استفاده شد.

جهت طراحی پرایمر و پروب، توالی‌های ژنوم ویروس HIV-1 از سایت NCBI دریافت و با استفاده از نرم افزار Mega4، هم ردیفی ژنوم‌های ویروسی انجام شد تا بهترین منطقه حفاظت شده انتخاب و برای طراحی پرایمر و پروب مورد استفاده قرار گیرد. سپس با استفاده از نرم

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:11 +0430 on Wednesday June 20th 2018

افزارهای Oligo6 و Beacon designer7 سازگاری توالی‌های انتخاب شده برای طراحی پرایمر و پروب بررسی و توالی‌های مورد نظر از نظر ساختار ثانویه در نرم افزار Mfold و Oligo analyzer3 مورد بررسی قرار گرفت.

ژن pol از HIV-1 به طول 176 جفت باز دارای بیشترین و بهترین مناطق حفاظت شده در ژنوم ویروس بود که این منطقه برای طراحی پرایمر و پروب Molecular Beacon استفاده شد(جدول1).

جدول1. توالی پرایمرهای مربوط به دو ویروس HIV-1

پرایمر رفت	5` GTACAGTGCAGGGGAAAG 3`
پرایمر برگشت	5` AATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCAGAGIAG(C/T)TTTG CTG 3`
پروب	TET-5` GGCGTGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAACGCC 3`-BHQ-1

سپس استخراج ژنوم ویروسی با استفاده از کیت استخراج کیا ژن (QiaAmp RNA mini kit) بر اساس دستور العمل شرکت سازنده کیت و با حجم نمونه 140 میکرولیتر صورت گرفت.

تشخیص ژنوم ویروس HIV-1 با تکنیک TMA Real-time

تمام اجزای مورد نیاز به جزء آنزیم‌ها، با غلظت‌های مشخص و تعیین شده وارد مخلوط واکنش شدند(جدول2). مخلوط حاصل به مدت 3 دقیقه در دمای 65 درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت 3 دقیقه در دمای 41 درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و سپس به سرعت ترکیب آنزیمی به مخلوط اولیه افزوده شد. پس از آن تیوب به مدت 120 دقیقه در دمای 41 درجه سانتی‌گراد انکوبه و اطلاعات مربوط به شدت افزایش فلورسانس در هر دقیقه جمع‌آوری گردید.

برای تعیین حد تشخیص (حساسیت آنالیتیک) واکنش، از RNAهای حاصل از رونویسی محصولات PCR کلون شده، به عنوان استاندارد استفاده شد. به منظور تولید استانداردهای RNA، واکنش رونویسی در آزمایشگاه (Invitro-Transcription) با استفاده از محصولات PCR کلون شده در حجم نهایی 50 میکرولیتر و با استفاده از آنزیم TranscriptAid™ T7 High Yield Transcription Kit (Fermentas)، انجام گردید(جدول3).

جدول2. اجزای لازم برای واکنش Real-time TMA

اجزای واکنش	غلظت
Tris-HCL	40 میلی‌مولار
KCL	50 میلی‌مولار
DTT	1 میلی‌مولار
Mgcl2	3 میلی‌مولار
پرایمر فوروارد	10 پیکومولار
پرایمر ریورس	10 پیکومولار
پروب	10 پیکومولار
dNTP	0/4 میلی‌مولار
NTP	0/8 میلی‌مولار
DMSO	5 درصد
مهار کننده RNase	12 واحد
آنزیم M-Mulv	8 واحد
آنزیمT7 RNA پلیمراز	20 واحد
جمع‌آوری شدت افزایش فلورسانس در هر دقیقه	

جدول3. اجزای لازم برای فرآیند رونویسی در آزمایشگاه

اجزای واکنش	غلظت
بافر نسخه برداری 5 X	5 میکرولیتر
ترکیب NTPها	1 میلی‌مولار
مهار کننده RNase	12/5 واحد
آنزیمT7 RNA پلیمراز	20 واحد
محصول PCR	1 میکروگرم
آب حاوی DEPC	تا حجم 50 میکرولیتر
انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتیگراد به مدت 2 ساعت	

زدودن DNA از RNA تولید شده در فرآیند رونویسی در آزمایشگاه

از آنجایی که DNA وکتور دارای بخش پروموتری می‌باشد، اگر محصولات RNA به دست آمده مستقیماً وارد واکنش TMA شود، جواب مثبت کاذب خواهیم داشت. از این رو باید محصولات به خوبی DNA

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:11 +0430 on Wednesday June 20th 2018

زدایی شوند. بدین منظور از آنزیم DNase (Fermentas) I عاری از RNase برای حذف آلودگی DNA وکتوری استفاده شد. به علت این که فعالیت این آنزیم بسیار زیاد است حدود 4 الی 5 واحد از آنزیم برای این هدف کافی است. از آنجایی که آنزیم DNase I قادر است DNA دو رشته‌ای که در حین فرآیند TMA تولید می‌شود را نیز تخریب کند، بنابراین باید بسیار دقت شود که این آنزیم به طور کامل از محیط حذف شود تا به DNA هایی که به عنوان مولکول حد واسط در فرآیند TMA عمل می‌کنند، آسیبی نرساند. برای تخریب آنزیم DNase I محصولات واکنش به مدت 15 دقیقه در دمای70 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. مقدار اندکی از RNA ساخته شده بدین روش، با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و از طریق دانسیته نوری، تعداد مولکول‌های RNA محاسبه گردید.

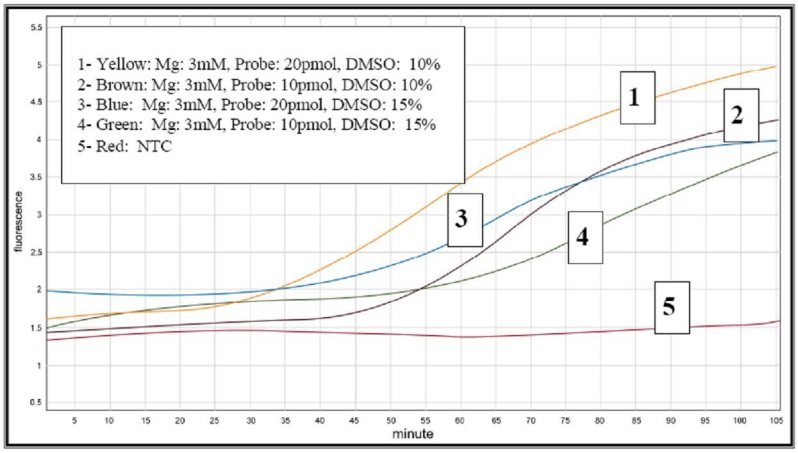
برای به دست آوردن حساسیت روش، رقت‌های لگاریتمی از RNA ساخته شده به صورت فرآیند رونویسی در آزمایشگاه تهیه گردید که معادل تعداد کپی10^7-10 در میلی‌لیتر بود.

حساسیت و ویژگی

جهت تعیین حساسیت کلینیکی در مجموع از 30 نمونهٔ HIV-1 مثبت استفاده شد. برای تعیین ویژگی آنالیتیک روش تشخیصی، علاوه بر بررسی صحت اتصال اختصاصی پرایمرها به الگوی مورد نظر در پایگاه NCBI nucleotide BLAST، از چند نمونهٔ ژنوم ویروس‌های منتقل شونده از طریق خون از قبیل HCV، HTLV-1، HHV-8، HHV-6، B19، VZV، EBV، HSV-2، HSV-1 و HBV استفاده شد و به منظور تعیین ویژگی کلینیکی از 20 نمونهٔ منفی، که عدم وجود HIV-1 در آنها با استفاده از روش‌های سرولوژی و ملکولی تجاری معتبر تأیید شده بود، استفاده شد. تمامی نمونه‌های بالینی مثبت و منفی از آرشیو آزمایشگاه بیمارستان دی تهران به دست آمدند.

یافته ها

در این مطالعه واکنش Real-time TMA راه اندازی شده بر روی 30 نمونه HIV-1 انجام شد. اطلاعات مربوط به شدت افزایش فلورسانس در هر دقیقه جمع‌آوری گردید(شکل1).



شکل 1. نمودار افزایش فلورسانس Real-time TMA

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:11 +0430 on Wednesday June 20th 2018

بررسی ویژگی آنالیتیک پرایمر و پروب TMA Real-time:

توالی پرایمرها و پروب طراحی شده با استفاده از نرم افزار Nucleotide BLAST موجود در سایت NCBI به منظور بررسی ویژگی آنالیتیک مورد ارزیابی قرار گرفته و مشخص گردید که پرایمرها و پروب طراحی شده تنها به توالی‌های اختصاصی HIV-1 متصل می‌گردند و هیچ گونه واکنش متقاطعی با سایر عوامل مداخله کننده احتمالی وجود ندارد. برای بررسی عملی ویژگی آنالیتیک این روش، از ویروس‌هایی مانند HCV، HSV-1، HSV-2، CMV، HBV، EBV، B19 و HTLV-1 استفاده شد که هیچ یک از این پاتوژن‌ها پس از انجام واکنش مربوط به TMA Real-time، تکثیر قابل مشاهده نشان نداد که تائیدکننده ویژگی آنالیتیک مناسب این روش می‌باشد.

تعیین حد تشخیص روش Real-time TMA

برای تعیین حد تشخیص و یا به عبارت دیگر، Real-time TMA، از رقت‌های لگاریتمی RNA تولید شده با روش رونویسی در آزمایشگاه استفاده شد. رقت‌های 10000، 5000، 1000، 500 و 200 کپی در میلی‌لیتر از RNA رونویسی شده به پلاسمای منفی افزوده شد و پس از تخلیص RNA، واکنش Real-time TMA انجام شد. از هر رقت تهیه شده ده واکنش به صورت پنج تکرار در دو روز مختلف انجام شد. همان گونه که در جدول 4 نشان داده شده است حساسیت آنالیتیک این روش معادل 500 کپی در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

جدول4. تعیین حساسیت آنالیتیک روش Real-time TMA با بررسی رقت‌های مختلف ژنوم ویروسی

تعداد موارد مثبت HIV-1	کل تعداد آزمایشات انجام شده	غلظت (کپی در میلی‌لیتر)
10	10	10000
10	10	5000
10	10	1000
10	10	500
6	10	200

به منظور بررسی حساسیت کلینیکی نیز، 30 نمونهٔ دارای عفونت HIV-1 مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از روش طراحی شده 28 نمونه از 30 نمونه برای ویروس HIV-1 مثبت شد. در نتیجه حساسیت کلینیکی روش راه اندازی شده معادل 93/3 درصد در نظر گرفته شد.

به منظور تعیین ویژگی کلینیکی روش از 20 نمونهٔ منفی که عدم وجود HIV-1 در آنها با استفاده از روش‌های سرولوژی و ملکولی تجاری معتبر تأیید شده بود، انجام شد. در هیچ یک از موارد نتیجهٔ مثبتی مشاهده نشد. از این رو ویژگی روش راه اندازی شده معادل 100 درصد در نظر گرفته شد.

بحث

در این مطالعه به توسعه تکنیک Real- TMA time برای تشخیص ویروس HIV-1 پرداختیم. هدف انجام چنین مطالعه‌ای، شناسایی و پایش ویروس HIV-1 انتقال یابنده در جمعیت و فراهم نمودن ابزاری مناسب جهت تشخیص امکان حضور این ویروس در یک فرد می‌باشد. به منظور طراحی پرایمرهای این واکنش، از هم ردیفی چندگانه ناحیه‌هایی از ژنوم این ویروس استفاده شد که بیشترین درجهٔ حفاظت شدگی را در بین ایزوله‌های مختلف دارا است. بررسی حساسیت و ویژگی پرایمر و پروب طراحی شده نشان داد که تنها قادر به شناسایی ویروس HIV-1 هستند و هیچ گونه واکنشی با ژنوم عوامل ویروسی دیگر ندارند. تشخیص بیمارانی با تعداد کپی کم ویروس‌در پلاسما، در تشخیص عامل عفونی مهمی هم چون HIV-1 بسیار حائز اهمیت است. حساسیت آنالیتیک این روش برای ویروس HIV-1 معادل 500 کپی در میلی‌لیتر تعیین شد. در تعیین حساسیت کلینیکی روش، 28 نمونه از 30 نمونه مثبت مورد آزمایش، مثبت شدند و 2 نمونه منفی گزارش گردید. پس از بررسی نتایج روش تجاری کمی بر روی این دو نمونه مشخص شد که تعداد کپی ویروس HIV-1 در این دو نمونه معادل 433 و 132 کپی در

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:11 +0430 on Wednesday June 20th 2018

میلی‌لیتر بوده و از این رو کمتر از حد تشخیص تست راه‌اندازی شده می‌باشد.

این تکنیک در مطالعات دیگری از جمله آیل و همکاران در سال 2003 برای تمایز ایزوله‌های c و c' ویروس HIV-1 مورد استفاده قرار گرفت(16). هم‌چنین دی بار و همکاران در سال 2001 تستی برای تشخیص HIV-1 طراحی نمودند که علاوه بر تشخیص ویروس قادر به تمایز ایزوله‌های آن نیز بود. حساسیت این روش 1000 کپی در میلی‌لیتر تعیین شد(17).

در مطالعه دیگر که توسط یائو جی و همکاران در سال 2005 برای مقایسه دو کیت تجاری گران قیمت از نظر حساسیت انجام شد حد تشخیص در این دو کیت بیش از 500 کپی در میلی‌لیتر گزارش شد که این نشان دهنده حساسیت بالای روش طراحی بود(18). از دیگر مزایای این تکنیک می‌توان به اختصاصیت بسیار زیاد به دلیل استفاده از کاوش‌گر اختصاصی توالی‌های اسید نوکلئیکی هدف با استفاده از رنگ فلوروسنت اشاره کرد. در این تحقیق سعی شد تا کاوش‌گر اختصاصی مربوط به توالی کاملا حفاظت شده ویروس HIV-1، طراحی و با رنگ فلوروسنت نشاندار شود. استفاده از این کاوشگر تشخیص ویروس HIV-1 را به صورت کاملا اختصاصی امکان پذیر می‌سازد.

نتیجه گیری

Real-time TMA مزایایی نظیر افزایش سرعت از طریق کاهش زمان تکثیر، حذف مرحله آشکار سازی پس از تکثیر، حساسیت بالا و ساده بودن تکنیک را دارا می‌باشد. در کنار حساسیت و اختصاصیت بالا، آسان بودن و آنالیز سریع (حدود دو ساعت) از مزایای عمده این تکنیک می‌باشد. به علاوه این سنجش روش مفید و سریع برای آشکار سازی عوامل پاتوژن در نمونه‌های مختلف بیماران می‌باشد. هم‌چنین از آن می‌توان برای ارزیابی عفونت‌های ویروس HIV-1 در غربال‌گری واحدهای خونی استفاده کرد و آن را جایگزین روش‌های سنتی غربالگری در انتقال خون ساخت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات همه همکاران محترم به ویژه جناب آقای دکتر سیامک میراب سمیعی مسئول بخش ملکولی بیمارستان دی و جناب آقای دکتر کیهان آزادمنش رئیس بخش ویروس شناسی انستیتو پاستور ایران که در تهیهٔ نمونه و رهنمودهای علمی ما را یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1. SeyedAlinaghi M, Kheirandish P, Shirzad H, Karami N, Jahani M, Payvarmehr F, et al. Prevalence and correlates of co-infection with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in male injection drug users in Iran. Archives of Iranian Medicine. 2010;13(4):318-23.[Persian]
2. Kheirandish P, SeyedAlinaghi SA, Jahani MR, Shirzad H, Seyed Ahmadian MR, Majidi A, et al. Prevalence and correlates of hepatitis C infection among male injection drug users in detention, Tehran, Iran. Journal of Urban Health. 2009;86(6):902-8.[Persian]
3. Kilmarx PH. Global epidemiology of HIV. Current Opinion in HIV and AIDS. 2009; 4(4): 240-6.
4. Von Lindern JJ, Rojo D, Grovit-Ferbas K, Yeramian C, Deng C, Herbein G, et al. Potential role for CD63 in CCR5-mediated human immunodeficiency virus type 1 infection of macrophages. Journal of virology. 2003; 77(6): 3624-33.
5. Zhang H, Dornadula G, Beumont M, Livornese Jr L, Van Uitert B, Henning K, et al. Human immunodeficiency virus type 1 in the semen of men receiving highly active antiretroviral therapy. New England Journal of Medicine. 1998;339(25):1803-9.
6. Friedrich B, Li G, Dziuba N, Ferguson MR. Quantitative PCR used to assess HIV-1 integration and 2-LTR circle formation in human macrophages, peripheral blood lymphocytes and a CD4+ cell line. Virol J. 2010; 7:354.
7. Rockstroh JK, Spengler U. HIV and hepatitis C virus co-infection. The Lancet infectious diseases. 2004; 4(7):437-44.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:11 +0430 on Wednesday June 20th 2018

8. Ma Y, Anantpadma M, Timpe JM, Shanmugam S, Singh SM, Lemon SM, et al. Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. Journal of virology. 2011;85(1):86-97.
9. Meng Q, Wong C, Rangachari A, Tamatsukuri S, Sasaki M, Fiss E, et al. Automated multiplex assay system for simultaneous detection of hepatitis B virus DNA, hepatitis C virus RNA, and human immunodeficiency virus type 1 RNA. Journal of Clinical Microbiology. 2001;39(8):2937-45.
10. Lane T, Gernsheimer T, Busch M, Holland P. Transfusion of the HIV-seropositive patient. Transfusion Medicine Reviews. 1999; 13(4): 334.
11. Lau LT, Feng XY, Lam TY, Hui HK, Yu ACH. Development of multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of human respiratory tract viruses. Journal of virological methods. 2010;168(1):251-4.
12. Loens K, Beck T, Ursi D, Overdijk M, Sillekens P, Goossens H, et al. Development of real-time multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae, and Legionella spp. in respiratory specimens. Journal of Clinical Microbiology. 2008; 46(1): 185-91.
13. Leone G, van Gemen B, Schoen CD, van Schijndel H, Kramer FR. Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA. Nucleic Acids Research. 1998; 26(9): 2150-5.
14. Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MFC, Kroes ACM, Claas ECJ. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. Journal of Clinical Microbiology. 2004;42(4):1564-9.
15. Greijer AE, Adriaanse H, Dekkers CAJ, Middeldorp JM. Multiplex real-time NASBA for monitoring expression dynamics of human cytomegalovirus encoded IE1 and pp67 RNA. Journal of Clinical Virology. 2002;24(1):57-66.
16. Ayele W, Pollakis G, Abebe A, Fisseha B, Tegbaru B, Tesfaye G, et al. Development of a nucleic acid sequence-based amplification assay that uses gag-based molecular beacons to distinguish between human immunodeficiency virus type 1 subtype C and C′ infections in Ethiopia. Journal of Clinical Microbiology. 2004; 42(4): 1534-41.
17. De Baar MP, Timmermans EC, Bakker M, De Rooij E, Van Gemen B, Goudsmit J. One-tube real-time isothermal amplification assay to identify and distinguish human immunodeficiency virus type 1 subtypes A, B, and C and circulating recombinant forms AE and AG. Journal of Clinical Microbiology. 2001; 39(5): 1895-902.
18. Yao J, Liu Z, Ko LS, Pan G, Jiang Y. Quantitative detection of HIV-1 RNA using NucliSens EasyQ HIV-1 assay. Journal of virological methods. 2005;129(1):40-6.