مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۷۲/هفته چهارم اسفند ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۲۷

تشخیص هم‌زمان عفونت HIV-1 و HCV با استفاده از تکنیک Nucleic acid sequence based amplification

مهدی پریان[۱]، سمیرا محمدی یگانه[۱]، بهزاد خوانساری نژاد[۲]، مهدیه موندنی‌زاده[۳]

چکیده

مقدمه: با توجه به محدودیت‌های برخی از روش‌های سرولوژیک در تشخیص افراد دارای عفونت با ویروس‌های HIV-1 و HCV، استفاده از روش‌های تشخیصی ملکولی در شناسایی این دو عامل اهمیت بسیار زیادی دارد. با این حال اشکال عمده‌ی روش‌های ملکولی هزینه بر بودن آن‌ها و نیاز به وجود دستگاه ترموسایکلر که گران قیمت است.

روش‌ها: این پژوهش به راه‌اندازی و به کارگیری یک روش NASBA (Nucleic acid sequence based amplification) چندگانه جهت تشخیص هم‌زمان ژنوم دو ویروس نقص ایمنی انسانی ۱ (Human immunodeficiency virus 1 یا HIV-1) و هپاتیت C (HCV یا Hepatitis C virus) پرداخت که با استفاده از آن می‌توان عفونت منفرد یا هم‌زمان این دو ویروس را در نمونه‌های پلاسما تشخیص داد. حساسیت و ویژگی این روش با استفاده از نمونه‌های بالینی مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: پرایمرهای مورد استفاده در این روش هیچ گونه واکنش متقاطع با یکدیگر و نیز سایر عوامل احتمالی مداخله کننده در واکنش نداشتند. حساسیت آنالیتیک این روش برای هر دو ویروس HIV-1 و HCV معادل ۱۰۰۰ کپی در میلی‌لیتر و حساسیت و ویژگی کلینیکی این روش به ترتیب ۹۰ درصد و ۱۰۰ درصد بود.

نتیجه‌گیری: با استفاده از روش NASBA چندگانه راه‌اندازی شده می‌توان عفونت هم‌زمان یا منفرد ویروس‌های HIV-1 و HCV را با حساسیت و ویژگی مناسب در نمونه‌های پلاسمای بیماران تشخیص داد. به علت کاربری آسان، چندگانه بودن، و عدم نیاز به دستگاه ترموسایکلر، می‌توان از این روش به صورت مقرون به صرفه و در آزمایشگاه‌هایی با امکانات محدود استفاده نمود.

واژگان کلیدی: Nucleic acid sequence based amplification، ویروس نقص ایمنی انسانی، ویروس هپاتیت C

مقدمه

انواع ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV یا Human immunodeficiency virus) از آنتی‌ویروس‌های پریماتاها مشتق شده‌اند و عامل ایجاد سندرم نقص ایمنی اکتسابی (AIDS یا Acquired Immune deficiency syndrome) هستند. این بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ توصیف شد و HIV-1 در اواخر ۱۹۸۳ جداسازی گردید. از آن زمان به بعد بیماری ایدز به صورت یک اپیدمی در سراسر جهان در آمد که جمعیت‌ها و مناطق جغرافیایی مختلفی را درگیر کرده است. اکنون میلیون‌ها نفر درسرتاسر جهان به این ویروس آلوده شده اند و افراد پس از آلودگی تا آخر عمر آلوده باقی می‌مانند (۱). در طی یک دهه، در صورت عدم درمان، اکثریت افراد آلوده به HIV به علت نارسایی سیستم ایمنی ایجاد شده به وسیله‌ی این ویروس دچار عفونت‌های فرصت

[۱] دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۲] دانشجوی دکتری ویروس‌شناسی پزشکی، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
[۳] دانشجوی دکتری پزشکی مولکولی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: مهدی پریان
Email: mparyan@gmail.com

www.mui.ac.ir

طلب می‌شوند. بیماری ایدز یک مشکل عمده‌ی سلامتی در سراسر جهان در آغاز قرن ۲۱ است. ژنوم HIV-1 دارای دو مولکول RNA تک رشته ای مشابه به طول kb(Kilo base) ۹/۲ می‌باشد. شکل پایدار ژنوم آن در سلول‌های عفونی به صورت DNA دو رشته‌ای، که پرووایرال نامیده می‌شود، است (۱).

از دیگر ویروس‌های شایع و مهم در انتقال خون، ویروس هپاتیت C (Hepatitis C virus یا HCV) می‌باشد. HCV یک ویروس دارای ژنوم RNA تک رشته ای است که به عنوان یک فلاوی ویروس در یک جنس جداگانه به نام Hepacivirus طبقه بندی شده است. ویروس های مختلف این گروه بر اساس تحلیل توالی RNA به ۶ ژنوتیپ و بیش از ۹۰ زیرتیپ طبقه‌بندی می‌شوند. اندازه‌ی ژنوم این ویروس kb ۹/۴ می‌باشد (۲). روش‌های انتقال ویروس‌های HIV-1 و HCV شبیه به هم و از طریق راه‌های غیر خوراکی مانند راه‌های جنسی، خونی و مادر به فرزند است. البته نسبت انتقال از راه‌های مذکور در عفونت با هر یک از ویروس‌های فوق متفاوت است. در حالی که معتادان تزریقی جمعیت اصلی افراد آلوده به HCV را تشکیل می‌دهند، راه عمده‌ی انتقال HIV-1 بسته به نواحی جغرافیایی مختلف متفاوت است (۳).

روش شایع و اصلی تشخیص عفونت HIV-1 و HCV، ردیابی سرولوژیک آنتی‌بادی‌های اختصاصی بر علیه این ویروس‌ها در سرم افراد بیمار است. روش‌های سرولوژیک دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشند. از جمله مهم‌ترین محدودیت‌های روش‌های سرولوژی عدم تشخیص موارد عفونی در دوره‌ی پنجره (Window period) و زمانی است که هنوز شاخص‌های ایمنولوژیک بیمار بالا نرفته است. یکی از محدودیت‌های دیگر روش‌های سرولوژی این است که به علت وجود آنتی‌بادی مادری، امکان ارزیابی عفونت در نوزادان متولد شده از مادران HCV یا HIV-1 مثبت میسر نیست (۴).

علاوه بر این، در ارزیابی عفونت ناشی از HCV محدودیت‌های دیگری نیز وجود دارد. از جمله این که امکان تمایز افراد دارای عفونت فعال و افراد بهبود یافته‌ی کامل از بیماری، که دارای آنتی‌بادی IgG ضد HCV می‌باشند، با استفاده از روش‌های ایمنولوژیک وجود ندارد (۵). در این شرایط، روش‌های مولکولی روش‌های مناسب برای تشخیص عفونت HIV-1 و HCV هستند. این روش‌ها به علت دارا بودن حساسیت و ویژگی مناسب، سهولت، قابلیت اتوماسیون و امکان بررسی نمونه‌ها در حجم انبوه، از مقبولیت زیادی برخوردار هستند (۷-۶).

با به کارگیری تکنیک‌هایی مانند NASBA (Nucleic acid sequence base amplification) که یک روش تکثیر اسید نوکلئیک به صورت هم دما (Isothermal) می‌باشد، امکان گذر از چنین مشکلاتی فراهم می‌شود. از مزایای این روش این که امکان تکثیر DNA وجود ندارد. مزیت مهم دیگر این تکنیک نسبت به روش‌های RT-PCR، عدم نیاز به دستگاه ترموسایکلر است. بنابراین آن دسته از آزمایشگاه‌هایی که امکان تهیه‌ی دستگاه‌های ترموسایکلر را ندارند نیز قادر به انجام آزمایش‌های تشخیص اسید نوکلئیک خواهند بود. به علاوه تکنیک NASBA نسبت به PCR دارای سیکل‌های کمتری جهت تکثیر اسید نوکلئیک هستند که این خود از خطاهای آنزیمی که در طولانی شدن سیکل‌ها اتفاق می‌افتد، می‌کاهد. وجود این مزیت‌ها باعث شده است که تکنیک NASBA بتواند

جایگاه ویژه‌ای در شناسایی میکروارگانیسم‌ها بیابد.

NASBA یک روش تکثیری بر اساس رونویسی است. در این روش ابتدا به وسیله‌ی آنزیم رونویسی معکوس (RT) و پرایمر مناسب متصل به پروموتر T7، یک رشته DNA از روی RNA الگو، ساخته می‌شود. محصول این واکنش یک هیبرید DNA-RNA خواهد بود. سپس آنزیم RT با دارا بودن خصوصیت RNase H، RNA متصل به DNA را تخریب می‌کند و به این ترتیب یک DNA تک رشته باقی می‌ماند که پرایمر دوم به آن متصل می‌شود. آنزیم RT در این شرایط با فعالیت DNA dependent DNA polymerase خود، DNA تک رشته‌ای را به DNA دو رشته‌ای تبدیل می‌کند. این DNA دو رشته‌ای در یک سر خود دارای توالی پروموتوری T7 است. آنزیم T7 RNA polymerase با شناسایی ناحیه‌ی پروموتری خود، کار رونویسی را انجام می‌دهد و تعداد زیادی RNA تولید می‌شود (از هر رشته ۱۰۰ الی ۱۰۰۰ RNA ساخته می‌شود). حال هر کدام از RNAهای سنتز شده می‌توانند الگو قرار گیرند و این سیکل دوباره تکرار شود (۹-۸).

روش‌ها

نمونه‌ها

۲۰ نمونه‌ی خون آلوده به دو ویروس HIV-1/HCV و ۲۰ نمونه‌ی خون سالم که از نظر سرولوژی منفی بودن آن‌ها به اثبات رسیده بود در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری شدند. این نمونه‌ها فاقد اسم و تنها بر اساس شماره، شناسه گذاری شدند و از بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور به دست آمدند. این نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفوژ با دور ۲۵۰۰ rpm قرار داده شدند و پلاسماهای به دست آمده تا استخراج RNA در ۸۰ – درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

بررسی توالی‌های ژنوم ویروس HIV-1 و HCV جهت انتخاب توالی‌های مناسب برای طراحی پرایمر:

توالی‌های RNA ژنوم هر دو ویروس که در سایت NCBI ثبت شده بودند، گرفته شد و برای هر یک از ویروس‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mega4، هم ردیفی RNA ژنومیک انجام شد تا مناطق حفاظت شده در بین آن‌ها انتخاب و برای طراحی پرایمر مورد استفاده قرار گیرد. سپس با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo6 و Beacon designer7 سازگاری توالی‌های انتخاب شده برای طراحی پرایمر بررسی و توالی‌های مورد نظر از نظر ساختار ثانویه در نرم‌افزار Mfold و Oligo analyzer3 مورد بررسی قرار گرفت. ژن pol از HIV-1 به طول ۱۷۶bp و ناحیه‌ی 5'NCR از HCV به طول ۲۴۱ bp بیشترین و بهترین مناطق حفاظت شده در RNA دو ویروس بودند که این دو منطقه برای طراحی پرایمر استفاده شد (جدول ۱).

تخلیص RNA ویروسی از پلاسما

استخراج RNAهای ویروسی با استفاده از کیت

جدول ۱. توالی پرایمرهای مربوط به دو ویروس HIV-1 و HCV

HIV-1 Forward	دما: ۵۷/۳ درجه‌ی سانتی‌گراد	5’ GTA CAG TGC AGG GGA AAG 3’
HIV-1 Reverse	دما: ۵۵/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد	5’ AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCC AGA GIA G(C/T)T TTG CTG 3’
HCV Forward	دما: ۵۶/۱ درجه‌ی سانتی‌گراد	5' CATGGCGTTAGTATGAGTG 3'
HCV Reverse	دما: ۵۷/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد	5' AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCT ATC AGG CAG TAC CAC AAG 3'

QIAamp viral RNA mini kit # cat.No. 52906 (Qiagen) بر اساس دستورالعمل کیت با حجم نمونه‌ی ۱۴۰ میکرولیتر صورت گرفت.

تشخیص RNA ویروس‌های HIV-1 و HCV با تکنیک NASBA چندگانه (Multiplex):

واکنش NASBA چندگانه در حجم ۲۵ میکرولیتر و بر اساس پروتکل ذکر شده در جدول ۲ انجام شد.

جدول ۲. اجزای لازم برای واکنش Multiplex NASBA

	اجزاء	غلظت
۱	Tris–HCL	۴۰ میکرومول
۲	KCL	۵۰ میکرومول
۳	DTT	۱ میکرومول
۴	Mgcl2	۴ میکرومول
۵	Primer HIF	۲ میکرومول
۶	Primer HIR	۲ میکرومول
۷	Primer HCR	۲ میکرومول
۸	Primer HCF	۲ میکرومول
۹	dNTP	۰/۴ میکرومول
۱۰	NTP	۲ میکرومول
۱۱	DMSO	۱ میکرولیتر
۱۲	BSA	۲/۵ میکروگرم
۱۳	Template HIV	۱ میکروگرم
۱۴	Template HCV	۱ میکروگرم
۱۵	DEPC–treat water	تا ۱۲ میکرولیتر
۱۶	۵ دقیقه در ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در ۴۱ درجه‌ی سانتی‌گراد، سپس افزودن	
۱۷	T7 RNA Polymerase	۲۰ واحد
۱۸	M-Mulv RT	۸ واحد
۱۹	RNase inhibitor	۱۲ واحد
۲۰	انکوبه کردن تیوب در دمای ۴۱ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه	

تعیین حساسیت

ساخت یک RNA مطمئن به عنوان استاندارد برای واکنش NASBA:

برای تعیین حساسیت واکنش از RNAهای حاصل از رونویسی محصولات PCR کلون شده (در وکتور T/A cloning)، به عنوان استاندارد استفاده شد. به منظور تولید استانداردهای RNA، واکنش رونویسی در آزمایشگاه (in vitro-transcription) با استفاده از محصولات PCR کلون شده در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر و با استفاده از کیت TranscriptAid™ T7 high yield transcription kit (Fermentas)، انجام شد (جدول ۳).

جدول ۳. اجزای لازم برای فرایند رونویسی در آزمایشگاه

اجزاء	غلظت
5 x transcription Buffer	۵ میکرولیتر
NTP Mix	۱ میکرومول
RNase inhibitor	۱۲/۵ واحد
T7 RNA Polymerase	۲۰ واحد
PCR Product	۱ میکروگرم
DEPC-Treat water	تا ۵۰ میکرولیتر
انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت	

زدودن DNA از RNA تولید شده در فرایند رونویسی در آزمایشگاه

از آن جایی که DNA وکتور دارای بخش پروموتری می‌باشد، اگر محصولات RNA به دست آمده به طور مستقیم وارد واکنش NASBA شوند، جواب مثبت کاذب خواهیم داشت. از این‌رو باید محصولات به خوبی DNA زدایی شوند. بدین منظور از آنزیم DNase I عاری از RNase برای حذف آلودگی DNA وکتوری استفاده شد. به علت این که فعالیت این آنزیم بسیار زیاد است، حدود ۴ الی ۵ واحد از آنزیم برای این هدف کافی بود. همچنین آنزیم DNase I قادر است DNA دو رشته‌ای را که در حین فرایند

www.mui.ac.ir

NASBA تولید می‌شود نیز تخریب کند. بنابراین باید بسیار دقت شود که این آنزیم به طور کامل از محیط حذف شود تا به DNAهایی که به عنوان مولکول حد واسط در فرایند NASBA عمل می‌کنند، آسیبی نرساند. برای تخریب آنزیم DNase I محصولات واکنش به مدت ۱۵دقیقه در ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. دانسیته‌ی مقدار اندکی از RNAساخته شده بدین روش، با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و از طریق دانسیته‌ی نوری، تعداد مولکول‌های RNA محاسبه گردید.

برای به دست آوردن حساسیت روش، رقت‌های لگاریتمی از RNA ساخته شده به صورت فرایند رونویسی در آزمایشگاه تهیه گردید که معادل تعداد کپی ۱۰ تا 10^7 در میلی‌لیتر بود.

یافته‌ها

ویژگی پرایمرهای NASBA چندگانه

ویژگی پرایمرهای NASBA چندگانه به توالی انتخاب شده برای طراحی هر جفت پرایمر بستگی دارد که توالی هر یک از پرایمرهای طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار Nucleotide BLAST، سایت NCBI برای اختصاصیت هر یک از توالی‌ها به عنوان پرایمر مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی ویژگی روش فوق، از ویروس‌هایی مانند HTLV-1، HBV، CMV، HSV-1، HSV-2 و B19 استفاده شد. هیچ یک از این پاتوژن‌ها پس از انجام واکنش مربوط به NASBA، تکثیر قابل مشاهده بر روی ژل نشان نداد که تأییدکننده‌ی ویژگی مناسب این روش بود. از این رو ویژگی این روش معادل ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد.

حساسیت NASBA چندگانه

حساسیت NASBA چندگانه، از طریق رقت‌های لگاریتمی RNA تولید شده با روش رونویسی در آزمایشگاه، بررسی شد. رقت‌های ۱۰۰۰۰۰، ۵۰۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰ کپی در میلی‌لیتر از RNA رونویسی شده به پلاسمای منفی افزوده گردید و پس از تخلیص RNA واکنش NASBA چندگانه انجام شد. از هر رقت تهیه شده ده واکنش به صورت پنج تکرار در دو روز مختلف انجام شد. حساسیت چندگانه‌ی این روش ۱۰۰۰ کپی در میلی‌لیتر برای هر دو ویروس بود. بررسی عدم تداخل حساسیت رقت بالای یک ویروس بر ویروس دیگر نشان داد رقت بالای (10^7 کپی در میلی‌لیتر) یک ویروس در حساسیت تعیین شده بر روی ویروس دیگر اثری نداشت و همچنان ۱۰۰۰ کپی در میلی‌لیتر برای هر دو ویروس به عنوان آستانه‌ی تشخیص تعیین شد (جدول ۴).

واکنش NASBA چندگانه به منظور تشخیص ژنوم HIV-1 و HCV به صورت هم‌زمان

واکنش چندگانه بر روی ۲۰ نمونه‌ی مثبت دارای

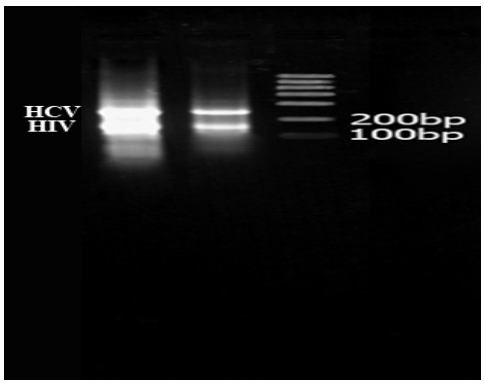
جدول ۴. تعیین حساسیت واکنش **NASBA** (Nucleic acid sequence based amplification) چندگانه

تعداد موارد مثبت HCV چندگانه	تعداد موارد مثبت HIV چندگانه	تعداد موارد مثبت Singleplex	HCV کپی در میلی‌لیتر	تعداد موارد مثبت Singleplex	HIV-1 کپی در میلی‌لیتر
۱۰/۱۰	۱۰/۱۰	۱۰/۱۰	۱۰۰۰۰	۱۰/۱۰	۱۰۰۰۰
۱۰/۱۰	۱۰/۱۰	۱۰/۱۰	۵۰۰۰	۱۰/۱۰	۵۰۰۰
۱۰/۱۰	۱۰/۱۰	۱۰/۱۰	۱۰۰۰	۱۰/۱۰	۱۰۰۰
۸/۱۰	۵/۱۰	۸/۱۰	۵۰۰	۶/۱۰	۵۰۰

www.mui.ac.ir

عفونت هم‌زمان HIV-1 و HCV انجام شد. انتخاب نمونه‌های مثبت به شیوه‌ای بود که پایین‌ترین رقت قابل اندازه‌گیری از نمونه‌ها توسط روش راه‌اندازی شده تعیین گردد.

شکل ۱ نشان دهنده‌ی یک واکنش NASBA چندگانه است که در آن تکثیر توالی‌های اختصاصی ویروس‌های HIV-1 و HCV، بر مبنای سایز قطعه‌ی طراحی شده، به راحتی قابل تمایز هستند. نتایج تکثیر چندگانه بر روی ژل آگارز ۲ درصد همراه با رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید نشان داده شده است.



شکل ۱. الکتروفورز محصولات NASBA چندگانه مربوط به دو ویروس HIV-1 و HCV بر روی ژل آگارز ۲ درصد. ردیف ۱: کنترل منفی، ردیف ۲ و۳ به ترتیب مربوط به NASBA چندگانه و ردیف ۴ مارکر اندازه‌ی bp ۱۰۰ است.

با استفاده از روش طراحی شده، ۱۸ نمونه از بیست نمونه برای هر دو ویروس HIV-1 و HCV مثبت شد و دو نمونه نتیجه‌ی منفی را نشان داد. از این رو حساسیت روش چندگانه‌ی راه اندازی شده معادل ۹۰ درصد در نظر گرفته شد.

بحث

در دهه‌ی اخیر، روش‌های تشخیص مولکولی در جهان پیشرفت بسیاری یافته‌اند و روز به روز روش‌های جدیدتر و با کارایی بیشتری پا به عرصه‌ی تشخیص بیماری‌ها و مطالعات مولکولی می‌گذارند. در بین این روش‌ها، روش‌های تکثیر اسیدهای نوکلئیک، جایگاه ویژه‌ای یافته‌اند. به طور نمونه تست‌های تکثیر اسیدهای نوکلئیک (NAT) برای غربال‌گری دهنده‌گان خون برای ردیابی ویروس هپاتیت C به وسیله‌ی مؤسسه‌ی Paul-Ehrlich (تحت نظارت آزمایشگاه مرجع) در انتقال خون کشور آلمان اجباری شد. با اجباری شدن تست‌های NAT خطر پنهان ماندن ویروس‌های HCV و HIV-1 در دوره‌ی پنجره در دهنده‌گان خون به کمتر از ۱ به ۵۰۰۰۰۰۰ کاهش یافت (۱۳-۱۰). با این حال استفاده از این روش‌ها در مقیاس وسیع محدود است که از دلایل آن می‌توان به هزینه‌ی زیاد و وقت‌گیر بودن اشاره نمود. به منظور کاهش هزینه‌های انجام NAT، تاکنون دو راه حل پیشنهاد شده است: نخست، استفاده از مخلوطی از پلاسمای چند فرد دهنده که در حال حاضر در کشورهای غربی و ژاپن استفاده می‌شود. با این وجود، آزمایش‌های بالینی حاکی از کاهش حساسیت آزمایش به دلیل رقیق شدن نمونه‌های حاوی میزان کم ویروس یا افزایش نتایج مثبت کاذب، هنگام استفاده از اولترا سانتریفوژ به منظور تغلیظ ذرات ویروس می‌باشند (۱۴). همچنین در صورت مثبت بودن یک مخلوط سرمی، تعیین فرد دهنده‌ی سرم مبتلا نیز به زمان زیادی نیاز دارد که این امر با توجه به زمان کم موجود، تهیه‌ی فرآورده‌های خونی را نیز به تأخیر می‌اندازد. روش دیگر، توسعه‌ی یک روش چندگانه برای تشخیص چند ویروس به صورت هم‌زمان است. از مزایای این روش می‌توان به کاهش هزینه‌ها و

همچنین کاهش زمان مورد نیاز برای تشخیص اشاره کرد (۱۵).

تکنیک NASBA که در اواسط سال ۱۹۹۹ استفاده شد، به طور شاخصی به عنوان ابزار تشخیصی برای RNA ویروس‌ها به خصوص دو ویروس HIV و HCV به صورت کیفی و کمی مورد استفاده قرار گرفت (۱۶). روش‌های مرسوم که بر اساس تشخیص آنتی‌ژن بودند، نسبت به این روش‌های مولکولی از جمله PCR (Polymerase chain reaction) دارای حساسیت کمتری هستند. با این حال امکانات انجام PCR در هر آزمایشگاهی به خصوص در مناطق محروم موجود نمی‌باشد و همچنین نیازمند هزینه‌ی بالا و اپراتور ماهر است (۱۷). ولی تکنیک NASBA در مقایسه با PCR، دارای حساسیت بیشتری می‌باشد؛ چرا که تکثیر RNA به صورت مستقیم و بدون نیاز به مرحله‌ی cDNAسازی انجام می‌شود. همچنین در این روش به دستگاه ترموسایکلر نیازی نیست (۱۸).

گزارش‌های محدودی از به کارگیری این روش برای تشخیص همزمان ارگانیسم‌ها به صورت چندگانه، موجود می‌باشد. در مطالعه‌ی انجام شده توسط Jean و همکاران (۱۹)، از روش NASBA چندگانه برای تشخیص ویروس‌های روده‌ای عامل مسمومیت غذایی استفاده شد. در مطالعه‌ی دیگری Lau و همکاران (۷) از این روش برای ردیابی ویروس های عامل عفونت دستگاه تنفسی استفاده کردند. تنها در یک مطالعه که توسط Loens و همکاران (۲۰) انجام شد، از روش Real-time NASBA چندگانه برای ردیابی مایکوپلاسما پنومونیه، کلامیدیا پنومونیه و گونه‌های لژیونلا در نمونه های تنفسی استفاده شد. همچنین از این روش برای شناسایی، کمیت سنجی و ژنوتایپینگ ویروس HIV-1 استفاده شده است. در مطالعه‌ایی که توسط Ayele و همکاران انجام شد، از این روش برای ژنوتایپینگ و تمایز ژنوتیپ‌های c و c' ویروس HIV-1 با پروب Molecular beacon استفاده شد (۲۱). در مطالعه‌ی Mohlala و همکاران نیز از این روش برای ردیابی ویروس HIV-1 در مایع آمینوتیک در طول دوره‌ی حاملگی استفاده شد (۲۲).

در مطالعه‌ی حاضر به توسعه‌ی تکنیک NASBA چندگانه برای تشخیص دو ویروس HIV-1 و HCV پرداختیم. منطق انجام چنین مطالعه‌ای، شناسایی و پایش ویروس‌های HIV-1 و HCV انتقال یابنده در جمعیت و فراهم نمودن ابزاری مناسب جهت تشخیص امکان حضور همزمان دو ویروس در یک فرد بود. این روش قادر است با حساسیتی مناسب، و بر اساس سایز قطعات بر روی ژل آگاروز ۲ درصد ویروس‌های فوق را از یکدیگر متمایز کند. به منظور طراحی پرایمرهای این واکنش، از هم‌ردیفی چندگانه‌ی نواحیی از ژنوم این دو ویروس استفاده شد که بیشترین درجه‌ی حفاظت‌شدگی را در بین ایزوله‌های مختلف دارا هستند. بررسی حساسیت و ویژگی پرایمرهای طراحی شده نشان داد که تنها قادر به شناسایی ویروس‌های HIV-1 و HCV هستند و هیچ گونه واکنشی با ژنوم عوامل ویروسی دیگر ندارند. تشخیص بیمارانی با تعداد کپی کم ویروس‌های فوق در پلاسما، در تشخیص عوامل عفونی مهمی همچون HIV-1 و HCV بسیار حایز اهمیت است. حساسیت این روش برای هر دو ویروس HIV-1 و HCV یکسان بود و ۱۰۰۰ کپی در میلی‌لیتر تعیین شد. همچنین حساسیت روش

NASBA چندگانه با وجود غلظت بالای یکی از دو ویروس اندکی کاهش می‌یابد، ولی این تفاوت غلظت تأثیری در حساسیت آنالیتیک ندارد. حساسیت و ویژگی این روش به ترتیب ۹۰ و ۱۰۰ درصد تعیین شد.

تکنیک NASBA به علت کم هزینه بودن، سهولت انجام، عدم نیاز به تجهیزات گران قیمت و اپراتور ماهر و همچنین دارا بودن حساسیت و ویژگی بالا می‌تواند به عنوان روشی مناسب برای ردیابی و غربال‌گری هم‌زمان چندین عامل پاتوژن در نمونه‌های مختلف به کار برده شود و به خوبی می‌توان این روش را جایگزین روش‌های سنتی غربال‌گری در انتقال خون نمود.

در کنار حساسیت و اختصاصیت بالا، کم هزینه و آسان بودن از مزایای عمده این تکنیک می‌باشد. به علاوه این سنجش روشی مفید و سریع برای غربال‌گری عفونت‌های هم‌زمان HIV-1 و HCV در نمونه‌های پلاسمای بیماران می‌باشد و آن را می‌توان برای اررزیابی عفونت‌های ویروسی در غربال‌گری واحدهای خونی در انتقال خون و نیز آزمایشگاه‌های تشخیصی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات همه‌ی همکاران محترم به ویژه جناب آقای دکتر سیامک میراب سمیعی مسؤول بخش مولکولی بیمارستان دی و جناب آقای دکتر کیهان آزادمنش رئیس بخش ویروس شناسی انستیتو پاستور ایران، که در تهیه‌ی نمونه و رهنمودهای علمی مارا یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. J Clin Virol 2005; 34(4): 233-44.
2. Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. Nature 2005; 436(7053): 933-8.
3. Kilmarx PH. Global epidemiology of HIV. Curr Opin HIV AIDS 2009; 4(4): 240-6.
4. 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. J Virol 2011; 85(1): 86-97.
5. Allain JP. Will genome detection replace serology in blood screening for microbial agents? Baillieres Best Pract Res Clin Haematol 2000; 13(4): 615-29.
6. Barbara JA, Garson JA. Polymerase chain reaction and transfusion microbiology. Vox Sang 1993; 64(2): 73-81.
7. Lau LT, Feng XY, Lam TY, Hui HK, Yu AC. Development of multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of human respiratory tract viruses. J Virol Methods 2010; 168(1-2): 251-4.
8. Leone G, van SH, van GB, Kramer FR, Schoen CD. Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA. Nucleic Acids Res 1998; 26(9): 2150-5.
9. Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, Kroes AC, Claas EC. 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. J Clin Microbiol 2004; 42(4): 1564-9.
10. Schmidt M, Pichl L, Jork C, Hourfar MK, Schottstedt V, Wagner FF, et al. Blood donor screening with cobas s 201/cobas TaqScreen MPX under routine conditions at German Red Cross institutes. Vox Sang 2010; 98(1): 37-46.
11. Coste J, Reesink HW, Engelfriet CP, Laperche S, Brown S, Busch MP, et al. Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology: update to 2003. Vox Sang 2005; 88(4): 289-303.
12. Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, et al. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. N Engl J Med 2004; 351(8): 760-8.
13. Hourfar MK, Jork C, Schottstedt V, Weber-Schehl M, Brixner V, Busch MP, et al. Experience of German Red Cross blood donor

www.mui.ac.ir

services with nucleic acid testing: results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus. Transfusion 2008; 48(8): 1558-66.

14. Jarvis L, Becker J, Tender A, Cleland A, Queiros L, Aquiar A, et al. Evaluation of the Roche cobas s 201 system and cobas TaqScreen multiplex test for blood screening: a European multicenter study. Transfusion 2008; 48(9): 1853-61.

15. Ohhashi Y, Pai A, Halait H, Ziermann R. Analytical and clinical performance evaluation of the cobas TaqScreen MPX Test for use on the cobas s 201 system. J Virol Methods 2010; 165(2): 246-53.

16. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. Nature 1991; 350(6313): 91-2.

17. Storch GA. Rapid diagnostic tests for influenza. Curr Opin Pediatr 2003; 15(1): 77-84.

18. Shan S, Ko LS, Collins RA, Wu Z, Chen J, Chan KY, et al. Comparison of nucleic acid-based detection of avian influenza H5N1 with virus isolation. Biochem Biophys Res Commun 2003; 302(2): 377-83.

19. Jean J, D'Souza DH, Jaykus LA. Multiplex nucleic acid sequence-based amplification for simultaneous detection of several enteric viruses in model ready-to-eat foods. Appl Environ Microbiol 2004; 70(11): 6603-10.

20. 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. J Clin Microbiol 2008; 46(1): 185-91.

21. Ayele W, Baar MP, Goudsmit J, Kliphuis A, Tilahun T, Dorigo-Zetsma W, et al. Surveillance technology for HIV-1 subtype C in Ethiopia: an env-based NASBA molecular beacon assay to discriminate between subcluster C and C'. J Virol Methods. 2005; 130(1-2): 22-9.

22. Mohlala BK, Tucker TJ, Besser MJ, Williamson C, Yeats J, Smit L, et al. Investigation of HIV in amniotic fluid from HIV-infected pregnant women at full term. J Infect Dis 2005; 192(3): 488-91.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29, No 172, 4th week, March 2012 Received: 21.12.2011 Accepted: 16.2.2012

Simultaneous Diagnosis of HIV-1 and HCV Infections by Nucleic Acid Sequence-Based Amplification

Mahdi Paryan[1], Samira Mohammadi-Yeganeh[1], Behzad Khansarinejad[2], Mahdieh Mondanizadeh[3]

Abstract

Background: Due to some problems of serological assays in diagnosis of patients infected with HIV-1 and HCV, the use of molecular assay has become widely accepted. However, molecular assays have a major drawback of high cost and dependency to expensive thermocycler instruments.

Methods: This research described the development of a multiplex nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) assay for the simultaneous or single detection of HIV-1 and HCV genomes in plasma samples. The sensitivity and specificity of this assay has been evaluated using several clinical samples.

Findings: The results showed that the primers used in this assay did not have any interactions with each other or with other possible interfering agents. The analytical sensitivity of this assay for both HIV-1 and HCV was calculated as 1000 copies/ml. The clinical sensitivity and specificity of the assay were considered as 90% and 100%, respectively.

Conclusion: The developed multiplex NASBA assay can be used for simultaneous or single detection of HIV-1 and HCV viruses with a suitable sensitivity and specificity. Due to easy application, multiplexity, and no need to thermocycler instruments, this assay can be used as a low cost method in laboratories with limited instruments.

Keywords: NASBA**,** HIV-1, HCV, Multiplex

[1] PhD Student of Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute, Tehran, Iran
[2] PhD Student of Virology, Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[3] PhD Student of Molecular Medicine, Department of Genetics, School of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
Corresponding Author: Mehdi Paryan, Email: mparyan@gmail.com