

طراحی و به کار گیری روش Multiplex RT-PCR ELISA برای تشخیص عفونت همزمان HIV-1 و HCV

زهرا خانلری^۱، مهرداد روانشاد^{۲*}، منوچهر رسولی^۳، مازیار ضیائیان^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۴- استادیار، گروه ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی استاد البرزی، دانشکده علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ پذیرش: ۸۷/۹/۱۳

تاریخ دریافت: ۸۷/۷/۳۰

چکیده

هدف: علیرغم غربالگری خون‌های اهدایی با روش‌های حساس مبتنی بر شناسایی آنتی‌بادی، همچنان خطر انتقال عفونت‌های ویروسی وجود دارد. بنابراین طراحی روش‌های حساس مبتنی بر شناسایی اسید نوکلئیک مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این تحقیق طراحی روشی حساس‌تر در مرحله شناسایی نسبت به روش‌های معمول و همچنین تشخیص همزمان عفونت‌های ویروس نقص ایمنی اکتسابی تیپ یک و ویروس هپاتیت C در یک نمونه است.

مواد و روش‌ها: پس از طراحی آغازگرها و پرورب‌های اختصاصی دو ویروس و بهینه‌سازی روش واکنش زنجیره‌ای چندگانه، مرحله نشاندار کردن محصول با استفاده از نوکلئوتیدهای متصل به دیگوگسی‌ژنین انجام شد. محصول به دست آمده ابتدا به دو قسمت مجزا تقسیم و پس از وارشست شدن در شرایط قلیایی با پرور اختصاصی مجاور شد. پرورب‌های حاوی بیوتین انتهایی پس از اضافه شدن به پلیت پوشش یافته با استریپ آویدین متصل شدند. پس از شستشو، آنتی‌بادی ضد دیگوگسی‌ژنین متصل به آنزیم آکالان فسفاتاز به چاهک‌ها اضافه شد. در مرحله نهایی شستشو انجام و سویسترا اضافه شد. با استفاده از روش رنگ‌سنگی نمونه‌های مثبت و منفی از نظر عفونت قابل شناسایی هستند.

نتایج: ۳۵ نمونه با روش طراحی شده مورد آزمایش قرار گرفتند، که شامل ۲۷ نمونه مثبت و ۸ نمونه منفی تأیید شده و ۴ نمونه پانل استاندارد بودند. هیچ گونه نتیجه مثبت یا منفی کاذب مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: روش طراحی شده دارای حساسیت و اختصاصیت قابل قبولی برای تشخیص عفونت ویروس نقص ایمنی اکتسابی تیپ یک و ویروس هپاتیت C در دوره پنجره می‌باشد به علاوه امکان کمی کردن روش وجود دارد، که در کنترل بیمار و پایش درمان مفید است. همچنین در کنار حساسیت بسیار بالا هزینه و زمان کمتری برای انجام آزمون نیاز است.

کلیدواژگان: ویروس هپاتیت C، ویروس نقص ایمنی اکتسابی تیپ یک، عفونت همزمان، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه.

۱- مقدمه

تا دهه ۱۹۹۰ غربالگری خون‌های اهدایی و تشخیص انتقال عفونت ناشی از ویروس نقص ایمنی اکتسابی تیپ یک

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱.
Email: ravanshad@modares.ac.ir

قبيل عفونت‌های فرصت‌طلب یا نئوپلاسم (Neoplasm) در بیمار ايجاد می‌شود [۶]. عفونت همزمان HIV بیماری‌های کبدی وابسته به HCV را تسريع می‌کند که شامل يك تغيير سريع‌تر به سمت سيروز و هپاتوكارسيونما در اين بيماران است [۱] همچنین پيشرفت باليني HIV و بروز علائم نشانگان نقص ايمني اكتسائي انساني (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) در افراد داراي عفونت همزمان سريع‌تر از افرادي است که تنها با HIV آلوهه استند [۷]. روش‌های چندگانه (Multiplex) علاوه بر افزایش دقت تشخيص نمونه‌های عفونی و کاهش نتایج منقی کاذب؛ کاهش قابل توجهی از نظر زمان و هزینه خواهند داشت، همچنین این روش دارای قابلیت کمی شدن نیز هست که در كنترل پايش درمان حائز اهمیت است. هدف از این تحقیق طراحی روشی حساس‌تر در مرحله شناسایی نسبت به روش‌های معمول و همچنین تشخيص همزمان عفونت‌های HIV-1 و HCV به‌طور همزمان بوده است.

۲- مواد و روش‌ها

۱-۱- طراحی آغازگر (Primer) و پروب (Probe)

نتایج حاصل از همدیفی توالي‌های ايزوله‌های مختلف دو ویروس HCV و HIV توسط نرم‌افزار Mega4 که در مرکز بين‌المللي اطلاعات بیوتکنولوژی (National Center for Biotechnology Information: NCBI) ثبت شده بود نشان داد بهترین ناحیه از نظر حفاظت‌شدگی برای طراحی آغازگر در ویروس HIV-1 زن HIV-1 و gag برای ویروس HCV ناحیه غير کد کننده در انتهای ۵' (Non-coding region: 5'-NCR) است. برای طراحی پروب‌ها از توالي‌های داخلی محصول PCR استفاده شد. اين پروب‌ها در انتهای ۵' خود دارای يك مولکول بيوتين هستند. برای طراحی آغازگرها و پروب‌ها از نرم‌افزارهای Gene Runner، Oligo analyzer3، NCBI Blast و Oligo analyzer4 استفاده شد. بهترین آغازگرها از لحظه رتبه و حساسیت اتصال انتخاب شدند (جدول ۱). با توجه به آغازگرهای طراحی شده طول قطعه تکثیر شده برای ویروس HIV-1 ۱۸۹ نوکلئوتید و برای ویروس

(Human Immunodeficiency Virus Type 1: HIV-1) و ویروس هپاتیت C (HCV) تنها با استفاده از روش‌های سرولوژیک انجام می‌شد [۱]. علیرغم غربالگری خون‌های اهدایی با روش‌های حساس مبتنی بر شناسایی آنتی‌بادی همچنان خطر انتقال عفونت ناشی از انتقال خون وجود دارد [۱]. برای کاهش این خطر روش‌های مبتنی بر اسید نوکلئیک (Nucleic acid tests: NATs) در دهه گذشته مورد توجه قرار گرفته است [۱]. در اين روش‌ها زنوم اين ویروس‌ها مورد شناسایی قرار می‌گيرد. غربالگری‌های زنومی HIV و HCV يك مرحله اصلی برای شناسایی خون‌های جمع‌آوری شده در دوران پنجره و قبل از تغیيرات سرمی، همچنین موارد نادر عفونت‌های خاموش و احتمال آلدگی به واريانت‌های مختلف ویروسی است [۱]. نتایج چندين مطالعه نشان داده است که استفاده از NATs دوره پنجره را از ۹۰ روز به ۱۱ روز برای HIV-1 و HCV کاهش می‌دهد [۲]. با توجه به راههای انتقال، عفونت همزمان HIV/HCV نسبتاً رایج است. در اروپا و آمریکا تقريباً ۲۵ درصد بيماران آلوهه به HIV و ۱۰ درصد از بيماران آلوهه با HCV دارای عفونت همزمان هستند [۳]. تخمین زده می‌شود که ۴ تا ۵ ميليون نفر در سراسر جهان مبتلا به اين عفونت همزمان هستند [۴]. عفونت HCV منجر به هپاتیت مزمن می‌شود و تعداد زيادي از مبتلایان در خطر پيشرفت به سمت هپاتیت مزمن فعال و سيروز (۲۰-۱۰ درصد) هستند، در بعضی كشورها مانند ژاپن عفونت HCV اغلب منجر به كارسيونم کبدی می‌شود. در حدود ۲۵۰۰ نفر سالیانه در آمریکا به‌علت بيماری مزمن کبدی و سيروز فوت می‌کنند که HCV مسئول بخش عمده‌ای از اين موارد است (حدود ۴۰ درصد) [۵]. سير عفونت HIV درمان نشده در حدود يك دهه طول می‌کشد. مراحل بيماري شامل عفونت اوليه، انتشار HIV ویروس به اعضای لنفاوي، عفونت مخفی، ازدياد بروز HIV بيماري باليني و مرگ است [۶]. واکنش ايمني بر عليه HIV يك هفته تا سه ماه پس از عفونت رخ می‌دهد که حضور ویروس در پلاسمرا کاهش می‌دهد و تعداد سلول‌های CD4⁺ افزایش می‌يابد با اين حال پاسخ ايمني قادر نیست به‌طور كامل عفونت را پاک‌سازی کند. در نهايیت علائم عمومي و بيماري واضح باليني از

۱۴۰ میکرولیتر از هر نمونه برای استخراج RNA ویروسی توسط کیت تجاری (Qiagen) و طبق روش ارائه شده توسط شرکت سازنده استفاده شد، RNA استخراج شده برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله سنتز cDNA ابتدا ۵ میکرولیتر (۰/۰۵ میکروگرم /۰/۰۱ پیکوگرم) RNA به همراه ۲ میکرولیتر (۰/۰۵ پیکومول) آغازگر اختصاصی آنتی سنس و ۴ میکرولیتر آب مقطر فاقد نوکلئاز در یک میکرولوله اپندورف (Eppendorf) وارد شد و به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت و سپس به سرعت روی یخ قرار داده شد تا ساختارهای ثانویه RNA باز شود، سپس ۴ میکرولیتر بافر X₅، ۲ میکرولیتر (۰/۱ میلی مول) مخلوط dNTP و ۲۰ واحد مهارکننده ریبونوکلئاز (۰/۰۵ میکرولیتر) به میکرولوله اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت سپس ۲۰۰ واحد از آنزیم نسخه بردار معکوس به نام M-MuLV وارد واکنش شد و مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در پایان واکنش محصول به دست آمده به سرعت روی یخ قرار داده شد. محصول این واکنش الگوی مرحله PCR است.

PCR -۳-۲

این واکنش به صورت تک مرحله‌ای انجام شد که در حجم ۵۰ میکرولیتری واکنش بافر آنزیم *Taq* با غلظت ۱X، ۰/۵ میلی مولار نمک کلرید مینیزیوم ($MgCl_2$)، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۰/۲ میکرومولار از هر آغازگر، ۲/۵ واحد آنزیم پلیمراز و ۵ میکرولیتر از محصول مرحله قبل وجود داشتند. این مخلوط در دستگاه ترموسایکلر به این ترتیب قرار گرفت: ۹۵ درجه ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه در: ۹۴ درجه ۵۰ ثانیه، ۶۵ درجه ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۴۰ ثانیه و در نهایت ۳ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد قرار گرفت. محصول این مرحله روی ژل آگارز با غلظت ۲ درصد الکتروفورز و با نور مأموراء بتنفس آگارز مشاهده شد (شکل‌های UV: Ultra violet: ۳-۱).

۲۷۰ HCV نوکلئوتید است.

جدول ۱ توالی آغازگرهای HCV و HIV-1 مورد استفاده در این پژوهش.

| | |
|------------------------------|-----------------------------|
| ACTCCCCCTGTGAGGAACACTACTGTCT | آغازگر جلویی HCV (Forward) |
| GCAAGCACCCTATCAGGCAGTACC | آغازگر برگشتی HCV (Reverse) |
| CAGAAGGAGGCCACCCCACAAGAT | آغازگر HIV |
| TTCCTGCTATGTCACTTCCCCTGG | آغازگر برگشتی HIV |

۲-۲- جمع‌آوری نمونه‌ها، استخراج RNA ویروسی و نسخه‌برداری معکوس

نمونه‌های مورد استفاده به صورت پلاسمای از مرکز تحقیقات AIDS بیمارستان امام خمینی و مرکز تحقیقات گوارش و کبد و پانل استاندارد HCV (جدول ۲) تهیه شد، نمونه‌های بالینی مثبت و منفی قبلًاً توسط روش Real-time PCR و Sequencing تأیید شده بودند (جدول ۳).

جدول ۲ پانل استاندارد استفاده شده با غلاظت‌های مشخص از ژنوم ویروس.

| نیچه (Lot no) | شماره ساخت | غلاظت (IU/ μ l) | |
|---------------|----------------|---------------------|-----|
| ثبت | QS1 1200 04/03 | 5×10^3 | QS1 |
| ثبت | QS2 1200 04/03 | 5×10^2 | QS2 |
| ثبت | QS3 1200 04/03 | 5×10^1 | QS3 |
| منفی | QS4 1200 04/03 | 5×10^0 | QS4 |

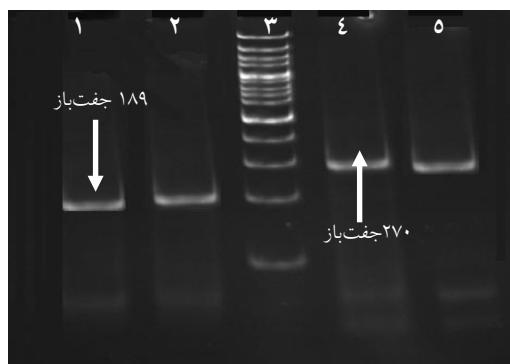
جدول ۳ نتایج بررسی نمونه‌های مورد آزمایش با روش طراحی شده و محاسبه حساسیت و ویژگی.

| تعداد نمونه | وضعیت آلدگی | ثبت | منفی |
|-------------|--------------------|-----|------|
| ۱ | ثبت از نظر HCV | ۹ | ۰ |
| ۲ | ثبت از نظر HIV-1 | ۸ | ۰ |
| ۳ | دارای عفونت همزمان | ۸ | ۰ |
| ۴ | منفی تأیید شده | ۰ | ۱۰ |

پس از جداسازی پلاسمای، به قسمت‌های مختلف تقسیم و در دمای ۸۶-۸۶ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۴-۲ نشاندار شده با PCR با dNTPs دیگوگسیژنین (Digoxigenin)

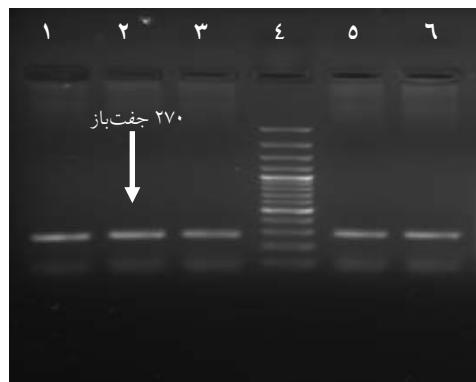
پس از بهینه سازی واکنش چندگانه برای نشاندار کردن محصول PCR از مخلوط dNTPs حاوی دیگوگسیژنین استفاده شد. محصول به دست آمده در این مرحله در ساختمان خود دارای دیگوگسیژنین است. بدلیل وزن دیگوگسیژنین dNTP این محصول نسبت به محصولی که فقط حاوی dNTP معمول است سنگین‌تر است در نتیجه برای تأیید نشاندار شدن محصول واکنش هر دو محصول روی ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید مشاهده شد (شکل ۴).



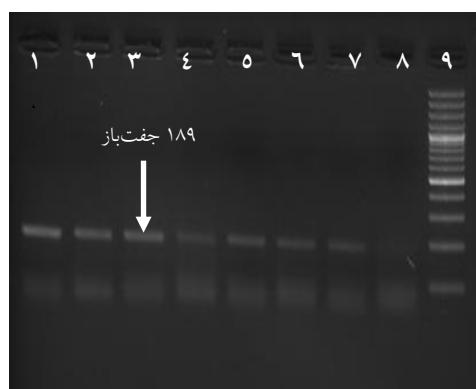
شکل ۴ نشاندار کردن محصول واکنش PCR. نمونه ۱: محصول تکثیر یافته ژنوم HIV نشاندار نشده؛ نمونه ۲: محصول تکثیر یافته ژنوم HIV نشاندار شده؛ نمونه ۳: نشانگر وزنی DNA (100 bp)؛ نمونه ۴: محصول تکثیر یافته ژنوم HCV نشاندار شده؛ نمونه ۵: محصول تکثیر یافته ژنوم HCV نشاندار نشده.

۵-۲ شناسایی محصول نشاندار شده با روش الایزا (Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA)

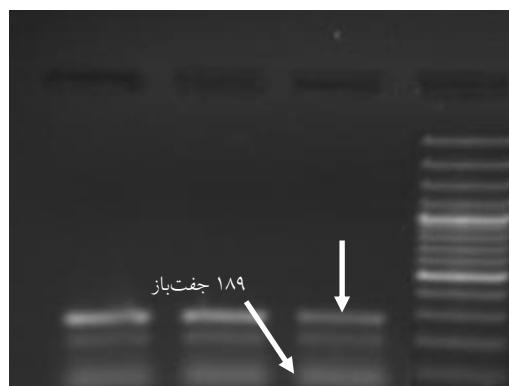
پس از اطمینان از تولید محصول حاوی دیگوگسیژنین با استفاده از کیت Roche PCR ELISA (DIG Detection) طبق برنامه ارائه شده توسط شرکت سازنده محصول نهایی شناسایی شد. به طور خلاصه، محصول دو رشته‌ای PCR و اسربست شد، این مرحله با کمک هیدروکسید سدیم



شکل ۱ محصول نهایی نمونه HCV مثبت. نمونه‌های ۱، ۲، ۳، ۵ و ۶: مثبت؛ نمونه ۴: نشانگر وزنی DNA (100 bp) (جفت‌بازی).



شکل ۲ محصول نهایی نمونه HIV مثبت. نمونه‌های ۱ تا ۸: مثبت؛ نمونه ۹: نشانگر وزنی DNA (100 bp) (جفت‌بازی).



شکل ۳ محصول نهایی نمونه HCV و HIV مثبت. نمونه‌های ۱ تا ۳: مثبت؛ نمونه ۴: نشانگر وزنی DNA (100 bp) (جفت‌بازی).

برای بررسی حساسیت و اختصاصیت این روش ۳۵ نمونه آزمایش شدند، این نمونه‌ها مشکل از ۴ گروه بودند. تشکیل واکنش رنگی نشان‌دهنده نمونه مثبت و عدم آن نشان‌دهنده نمونه منفی است. هیچ‌گونه نتیجه مثبت یا منفی کاذب مشاهده نشد و براساس نتایج به دست آمده حساسیت و اختصاصیت محاسبه شد (جدول ۳). برای تعیین و محاسبه سطح حداقل (cutoff value) (Optical Density: OD) انحراف معیار به میانگین جذب نوری (Optical Density: OD) میانگین ۱ میانگین OD نمونه‌های منفی اضافه شد. با استفاده از فرمول ۱ میانگین OD کنترل منفی‌ها محاسبه شد که عددی برابر با $157/0$ بود. و پس از آن با کمک فرمول ۲ انحراف معیار محاسبه شد که برابر با $127/0$ بود. سه برابر این عدد به میانگین اضافه شد و عدد سطح حداقل به دست آمد که برابر با $2/0$ شد. بنابراین نمونه‌های دارای جذب بالاتر از $2/0$ مثبت و نمونه‌های دارای جذب پایین‌تر از این عدد منفی گزارش شدند.

$$\text{فرمول ۱: } \mu = \frac{\sum x_i}{N}$$

$$\text{فرمول ۲: } SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \mu)^2}{N}}$$

همچنین با بررسی نمونه‌های پانل استاندارد که دارای تعداد کمی ژنوم مشخص بودند نشان داده شد که روش طراحی شده توانایی شناسایی حداقل 50 کپی از ژنوم ویروسی را در هر میلی لیتر خون دارد.

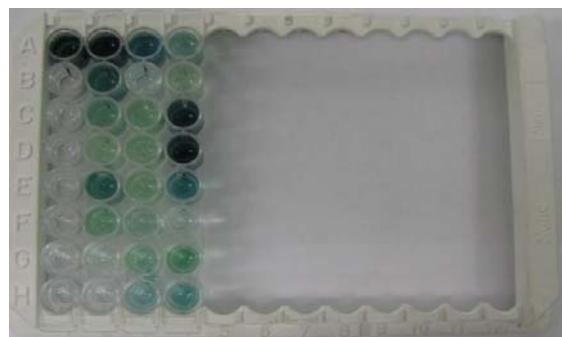
۴- بحث

تخمین زده می‌شود که 4 تا 5 میلیون نفر در سراسر جهان مبتلا به عفونت هم‌زمان HIV-1 و HCV هستند [۴] و با توجه به روش‌های حساس شناسایی عفونت که بر مبنای شناسایی آنتی‌بادی‌های اختصاصی صورت می‌گیرد، همچنان مشکلات تشخیص عفونت در دوره پنجره و تشخیص عفونت متقله از مادر به جنین وجود دارد. بنابراین NATs دارای اهمیت ویژه‌ای است [۸]. روش PCR به دلیل حساسیت بالایی که دارد، روشی انتخابی برای شناسایی حضور اسیدهای نوکلئیک در غلظت‌های پایین در نمونه‌های بیولوژیکی است. نیاز به روشی برای شناسایی

(NaOH) و به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق انجام شد، سپس محصول تک رشته‌ای با پروب اختصاصی دورگه (Hybrid) شد و دورگه حاصل به چاهک‌های پوشش یافته با استریت آویدین (Strepavidin) به مدت 3 ساعت در دمای 55 درجه و دور 240 در دقیقه اضافه شد که توانایی اتصال به بیوتین قرار گرفته در سر^۵ پروب را دارد. شناسایی دیگوگسی ژنین قرار آنژیم آلkaline فسفاتاز (Alkaline phosphatase) متصل است، انجام شد، زمان لازم برای این اتصال 30 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد است. اضافه کردن سوبیسترای آنژیم آلkaline فسفاتاز و ایجاد محصول رنگی در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه انجام شد. رنگ حاصل در طول موج 405 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (FAX stat) قرائت شد.

۳- نتایج

پس از بهینه‌سازی روش PCR برای هر یک از ویروس‌ها و ادغام دو روش با یکدیگر، بهینه‌سازی روش چندگانه و بررسی باند 189 نوکلئوتیدی مربوط به ویروس HIV-1 و باند 270 نوکلئوتیدی مربوط به ویروس HCV روی ژل آگارز انجام شد (شکل ۳-۱)، سپس محصول واکنش نشاندار و مجددآ با روش الکتروفورز تأیید شد (شکل ۴). در مرحله بعد روش شناسایی محصول نشاندار بهینه و نمونه‌های مورد نظر با روش طراحی شده، مورد آزمایش و بررسی قرار گرفتند (شکل ۵).



شکل ۵ شناسایی نمونه‌های مثبت و منفی با روش ELISA. چاهک‌های تیره نشان‌دهنده نمونه مثبت و چاهک‌های فاقد رنگ نشان‌دهنده نمونه‌های منفی است. نمونه A1: کنترل مثبت، نمونه B1: کنترل منفی.

استفاده از پروب‌های اختصاصی در مرحله دورگه‌سازی و ELISA ویژگی روش نسبت به روش RT-PCR معمول افزایش می‌یابد و بنابراین در مراحل بهینه‌سازی نیازی به تعیین توالی محصول واکنش برای تأیید تکثیر قطعه مورد نظر وجود ندارد.

همچنین حساسیت بالای واکنش آنزیم و آنتی‌بادی موجب افزایش حساسیت روش در مرحله شناسایی می‌شود. علاوه بر موارد ذکر شده، این روش به دلیل همزمان کردن تشخیص دو عفونت ویروس از نظر زمان و هزینه نسبت به روش‌های PCR دارای PCR-ELISA است. روش PCR دارای قابلیت کمی شدن برای تعیین بار ویروس در نمونه‌ها را دارد. طبق بررسی‌های انجام گرفته و براساس پانل استاندارد روش طراحی شده قادر به شناسایی ۵۰ کپی از ژنوم ویروس در هر میلی‌لیتر بود. در مطالعه‌ای که در گذشته انجام شده است [۱۱] روش طراحی شده دارای حساسیت شناسایی ۱۰ کپی در هر میلی‌لیتر بود که نسبت به پژوهش حاضر دارای حساسیت بالاتری بود ولی روش طراحی شده قادر به شناسایی ژنوتیپ‌های بیشتری نسبت به تحقیق گذشته است. با توجه به این که حساسیت مناسب در روش‌های تشخیصی و بالینی بر پایه ژنوم ویروس، حداقل ۳۰۰ کپی از ژنوم در هر میلی‌لیتر در هر یک از عفونت‌های HCV و HIV-1 است، بنابراین روش طراحی شده دارای حساسیت قابل قبول و در حد انتظار است [۱۲].

۵- تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی و دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی که در انجام این طرح پژوهشی حمایت علمی و مالی نموده‌اند، تقدیر و تشکر می‌شود.

محصولات تکثیر یافته PCR که دارای حساسیت، اختصاصی و ارزیابی قابل مشاهده باشد موجب ترکیب PCR با ELISA شد [۹]. PCR-ELISA در ابتدا برای آنالیز مستقیم محصول نشاندار شده استفاده شد، اما برای افزایش حساسیت و اختصاصیت شناسایی یک مرحله دورگه‌سازی با پروب‌های اختصاصی به آن اضافه شد [۱۰، ۹]. با توجه به موارد و مزایای ذکر شده و همچنین تجربیات گذشته سایر محققان [۱۱] از روش PCR-ELISA در این پژوهش استفاده شد.

طبق مطالعات انجام گرفته روش Real-time حساسیتی مشابه PCR-ELISA نشان داده است [۹]. همچنین نشان داده شده است که حساسیت روش RT-PCR با مرحله شناسایی با روش ELISA، به میزان ده برابر افزایش می‌یابد [۱۰]. اخیراً روش‌های بسیاری بر مبنای PCR-ELISA برای شناسایی ویروس‌ها، باکتری‌ها، تک‌یاخته‌ها و قارچ‌ها در نمونه‌های بالینی، غذا و محیطی نظیر HIV و ویروس هپاتیت B (Hepatitis B Virus: HBV) و روتاویروس در نمونه‌های مدفع طراحی شده است [۹]. در این پژوهش آغازگرهای طراحی شده برای شناسایی ویروس 2f، 2e، 2c، 2b، 2a، 1c، 1b، 1a، 2f، 2e، 2c، 2b، 2a، 1c، 1b، 1a، 6k، 6j، 6i، 6h، 6g، 6f، 6e، 6d، 6c، 6b، 6a، 5a، 3c، 2k این ویروس را شناسایی کنند، همچنین آغازگرهای طراحی شده برای شناسایی ویروس HIV-1 زیرنوع‌های G، F2، E، C، B، A، H و I را شناسایی می‌کنند. براساس آنالیزهای انجام گرفته و مقایسه روش طراحی شده با مطالعات گذشته نشان داده شده که آغازگرهای طراحی شده دارای رتبه بالاتر، بهتر و قادر به شناسایی تعداد ژنوتیپ‌های بیشتری نسبت به مطالعات گذشته هستند [۱۱]. همچنین در این تحقیق و در روش PCR-ELISA معمول به دلیل

۶- منابع

- [1] Koerner K, Cardoso M, Dengler T, Kerowgan M, Kubanek B. Estimated risk of transmission of hepatitis C virus by blood transfusion. Vox Sang 1998; 74(4): 213–6.
- [2] Gallarda JL, Dragon E. Blood screening by nucleic acid amplification technology: current issues, future challenges. Mol Diagn 2000; 5(1): 11–22.

- [3] Gibellini D, Gardini F, Vitone F, Schiavone P, Furlini G, Re MC. Simultaneous detection of HCV and HIV-1 by SYBR Green real-time multiplex RT-PCR technique in plasma samples. *Mol Cell Probes* 2006; 20(3-4): 223–9.
- [4] Lahijani Sh, Taylor LE. HIV-HCV Coinfection Update. 2006; www.hcvadvocate.org.
- [5] Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. Editors: Foltin J, Ransom J, Lebowits H, Holton B. 22nd Edition, United States, McGraw-Hill, 2001; p: 403-17.
- [6] Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. Editors: Foltin J, Ransom J, Lebowits H, Holton B. 22nd Edition, United States, McGraw-Hill, 2001; p: 516-29.
- [7] Piroth L, Duong M, Quantin C, Abrahamowicz M, Michardiere R, Aho LS, Grappin M, Buisson M, Waldner A, Portier H, Chavanet P. Does hepatitis C virus co-infection accelerate clinical and immunological evolution of HIV-infected patients? *AIDS* 1998; 12(4): 381-8.
- [8] Saldanha J, Lelie N, Heath A. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaborative Study Group. *Vox Sang* 1999; 76(3): 149–58.
- [9] Musiani M, Venturoli S, Gallinella G, Zerbini M. Qualitative PCR-ELISA protocol for the detection and typing of viral genomes. *Nat Protoc* 2007; 2(10): 2502-10.
- [10] Wang E, Paessler S, Aguilar PV, Carrara AS, Ni H, Greene IP, Weaver SC. Reverse transcription-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection and differentiation of alphavirus infections. *J Clin Microbiol* 2006; 44(11): 4000–8.
- [11] Adami V, Falasca E, Dorotea L, Malangone W, Astori G, Marini L, Biffoni F, Rinaldi C, Degrassi A, Pipan C. Qualitative multiplex RT-PCR for simultaneous detection of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus in plasma samples. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(12): 1075–80.
- [12] Hecht FM, Busch MP, Rawal B, Webb M, Rosenberg E, Swanson M, Chesney M, Anderson J, Levy J, Kahn JO. Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection. *AIDS* 2002; 16(8): 1119-29.

