Original Paper

Multiplex RT-PCR assay for detection of Co-infection HIV-1 and HCV viruses in plasma samples

Paryan M (MSc)*[1], Mohammadi-Yeganeh S (MSc)[1]
Mondanizadeh M (MSc)[2], Khansarinejad B (MSc)[3]

[1]PhD Candidate in Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. [2]PhD Candidate in Molecular Medicine, Department of Molecular Medicine and Genetics, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran. [3]PhD Candidate in Medical Virology, Department of Microbiology and Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Abstract

Background and Objective: HIV-1 and HCV infections especially in co-infected forms are among the most important infections transferred during blood transfusion.The screening of the blood products is valuable for preventing the transmission of infections. The aim of this study was to evaluate multiplex RT-PCR assay for detection of Co-infection HIV-1 and HCV Viruses in plasma samples.

Materials and Methods: This laboratory study was done to evaluate the use of multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of HIV-1 and HCV genomes in plasma samples. The amplified genomes were detectable in 3% agarose gel base on difference in the numbers of nucleotides. The sensitivity and specificity of this assay was determined on healthy and infected subjects whome simultanously exhibit HIV-1 and HCV co-infection using plasma samples.

Results: The specificity results showed that the primers used in this assay have no interaction with each other and other possible interfering agents. The clinical sensitivity and specificity of the assay has been considered as 90% and 100%, respectively.

Conclusion: Multiplex RT-PCR can be used for screening of blood donors due to high sensivity and specificity.

Keywords: HIV-1, HCV, Multiplex, RT-PCR

*** Corresponding Author: Paryan M (MSc), E-mail: mparyan@gmail.com**

Received 22 January 2011 **Revised** 7 June 2011 **Accepted** 25 July 2011

This paper should be cited as: Paryan M, Mohammadi-Yeganeh S, Mondanizadeh M, Khansarinejad B. [Multiplex RT-PCR assay for detection of Co-infection HIV-1 and HCV viruses in plasma samples]. J Gorgan Uni Med Sci. 2012; 14(1): 52-60. [Article in Persian]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان / بهار ۱۳۹۱ / دوره ۱۴ / شماره ۱ (پی در پی ۴۱) / صفحات ۵۲ تا ۶۰

تحقیقی

روش Multiplex RT-PCR در تشخیص عفونت همزمان ویروس‌های HIV-1 و HCV در نمونه‌های پلاسما

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

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران. ۲- دانشجوی دکتری پزشکی ملکولی، گروه پزشکی ملکولی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی همدان. ۳- دانشجوی دکتری ویروس شناسی پزشکی تربیت مدرس ، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک.

چکیده

زمینه و هدف : *از جمله مهم‌ترین عوامل عفونی منتقل شونده از طریق خون، ویروس‌های HIV-1 و HCV می‌باشند. به‌خصوص در حالت عفونت همزمان که از مشکلات بالینی قابل توجه در بیماران مصرف کننده فراورده‌های خونی است. این مطالعه به منظور توسعه روش Multiplex RT-PCR در تشخیص عفونت همزمان ویروس‌های HIV-1 و HCV در نمونه‌های پلاسما انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی به تشخیص همزمان ژنوم دو ویروس HIV-1 و HCV با روش Multiplex RT-PCR با استفاده از ژل آگاروز ۳درصد در ۷۰ نمونه پلاسما در سال ۱۳۸۸ پرداخته شد. نمونه‌های آلوده به ویروسHCV و تمام نمونه‌های منفی از بیمارستان دی تهران و نمونه‌های آلوده به ویروسHIV و همچنین نمونه‌های عفونت همزمان HIV/HCV از بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور تهیه شد. قطعات تکثیر شده از ژنوم ویروس‌ها به‌واسطه اختلاف اندازه قابل تمایز می‌باشند. برای تایید حساسیت و اختصاصیت، این آزمون روی ۲۰نمونه از بیمارانی که به صورت عفونت همزمان به این دو ویروس مبتلا بودند و ۲۰ نمونه طبیعی انجام شد.*

یافته‌ها : *انجام واکنش‌های مختلف روی چندین نمونه بالینی مشخص کرد که پرایمرهای مورد استفاده در این روش هیچ واکنش متقاطع با یکدیگر ندارند. همچنین حساسیت و اختصاصیت این روش به ترتیب ۹۵درصد و ۱۰۰درصد تعیین گردید.*

نتیجه‌گیری : *نتایج این مطالعه نشان‌دهنده حساسیت و اختصاصیت بالای روش Multiplex RT-PCR می‌باشد. لذا پیشنهاد می‌گردد به عنوان روشی مناسب برای غربالگری دهندگان خون مورد استفاده قرار گیرد.*

کلید واژه‌ها : *RT-PCR ، HCV ، HIV-1 ، روش چندگانه*

---

* نویسنده مسؤول : مهدی پریان ، پست الکترونیکی **mparyan@gmail.com**

نشانی : تهران، سعادت آباد، ۲۴ متری فرهنگ، کوچه دوم شرقی، پلاک ۹، مرکز فناوری بن یاخته ، تلفن ۲۲۱۴۲۹۳۸ -۰۲۱ ، نمابر ۲۲۳۵۱۴۶۰

وصول مقاله : ۸۹/۱۱/۲ ، اصلاح نهایی : ۹۰/۳/۱۷ ، پذیرش مقاله : ۹۰/۵/۳

مقدمه

عفونت همزمان دو ویروس HIV-1 و HCV در اروپا و امریکا نسبتاً شایع بوده و میزان شیوع آن در این مناطق به ترتیب ۲۵درصد و ۱۰درصد می‌باشد (۱و۲). در مطالعه انجام شده در شهر تهران از هر ۱۰ معتاد تزریقی مبتلا به HIV ۹ نفر به هپاتیت C نیز آلوده بودند (۳). در مطالعه دیگری روی معتادان تزریقی شیراز و جنوب ایران به‌ترتیب ۸۱/۱درصد و ۱/۲درصد دارای آنتی‌بادی مثبت برای HCV و HIV بودند (۳). یکی از عوامل اصلی مرگ ومیر در بیماران HIV-1 دارای HCV که با Highly active antiretroviral therapies (HAART) درمان می شوند؛ بیماری کبدی وابسته به HCV می‌باشد. در پاسخ به HAART که اثر منفی در پیشرفت عفونت HIV-1 دارد؛ خطر هپاتوتوکسیسیتی ناشی از HCV افزایش می‌یابد (۴و۵). همچنین عفونت همزمان HIV-1 و بیماری‌های کبدی وابسته به HCV نظیر سیروز و هپاتوکارسینوما در این بیماران نیز به سرعت افزایش می‌یابد (۶). گذشته از عفونت همزمان HCV/HIV-1، این دو ویروس از مهم‌ترین عوامل عفونی منتقل شونده به‌وسیله انتقال خون می‌باشند. از جمله راهکارهای قابل توجهی که تاکنون برای رفع این مشکل ارائه شده و به کاهش میزان انتقال این عوامل عفونی کمک کرده است؛ می‌توان به طراحی آزمایش‌های سرولوژیکی حساس برای غربالگری آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه HIV-1 و HCV اشاره کرد (۷). برای سال‌های متمادی روش‌های سرولوژیکی بیشترین کاربرد را در زمینه تشخیص عفونت‌های ویروسی دارند. عفونت HIV-1 و HCV ممکن است در دوره پنجره (Window Period) انتقال پیدا کنند که در این مرحله عفونت با آزمون های سرولوژیک قابل تشخیص نیست (۸). یکی از محدودیت های دیگر روش های سرولوژی این است که به‌علت وجود آنتی‌بادی مادری، امکان ارزیابی عفونت در نوزادان متولد شده از مادران HCV یا HIV-1 مثبت مقدور نیست (۹و۱۰). علاوه براین، در ارزیابی عفونت ناشی از HCV محدودیت‌های دیگری نیز وجود دارد. از جمله این که امکان تمایز افراد دارای عفونت فعال و افراد کاملاً بهبودیافته از بیماری که دارای آنتی‌بادی IgG ضد HCV می باشند؛ با استفاده از روش های ایمنولوژیک وجود ندارد. برای حل این مشکلات، روش‌های مبتنی بر تکثیر اسیدنوکلئیک NAT (Nucleic Acid Testing) برای شناسایی اسید نوکلئیک ویروس‌ها توسعه یافته‌اند. از جمله مزایای NAT می توان به بررسی مستقیم و اختصاصیت بسیار زیاد آن برای ژنوم یک عامل عفونی، نسبت به روش‌های سرولوژیک یا روش‌های جداسازی ویروس به منظور شناسایی آن اشاره کرد. اگرچه امکان انجام و کارایی بالای NAT برای غربالگری خون‌های اهدایی به اثبات رسیده است؛ با این‌حال استفاده از آن در مقیاس وسیع محدود است که مهم‌ترین دلیل آن هزینه بالاتر روش‌های ملکولی در مقایسه با روش‌های سرولوژیک است (۱۰). برای فایق آمدن به این مشکلات، روش‌های دیگری به عنوان مثال روش چندگانه (Multiplex) برای تشخیص چند ویروس به صورت همزمان توسعه یافته‌اند. از مزایای این روش می‌توان به کاهش هزینه ها و همچنین کاهش زمان موردنیاز برای تشخیص اشاره کرد (۱۳-۱۱). از جمله نوآوری‌های ارائه شده در زمینه NAT می‌توان به روش Multiplex RT-PCR اشاره کرد که با کمک آن امکان تشخیص چندویروس به صورت همزمان و دقت بسیار زیاد امکان‌پذیر می‌شود (۱۸-۱۴). لذا این مطالعه به منظور توسعه روش Multiplex RT-PCR در تشخیص عفونت همزمان ویروس‌های HIV-1 و HCV در نمونه‌های پلاسما انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی به تشخیص همزمان ژنوم دو ویروس HIV-1 و HCV با روش Multiplex RT-PCR با استفاده از ژل آگاروز ۳درصد در ۷۰ نمونه پلاسما آلوده و سالم در سال ۱۳۸۸ پرداخته شد. نمونه‌های آلوده به ویروس HCV و تمام نمونه های منفی از بیمارستان دی تهران و نمونه های آلوده به ویروس HIV و همچنین نمونه های عفونت همزمان HIV/HCV از بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور با حذف اسم و برچسب از روی نمونه‌ها وبا شماره‌گذاری آنها تهیه شد.

عفونت HIV-1 و HCV در نمونه‌های آلوده قبلاً با کیت HIV Artus و HCV Artus (Qiagen) تشخیص داده شده بود. نمونه‌ها شامل ۲۰ نمونه دارای عفونت همزمان HIV-1 و HCV، ۱۰ نمونه HIV مثبت، ۲۰ نمونه HCV مثبت و ۲۰ نمونه

HIV و HCV منفی از افراد سالم بود. تمامی نمونه‌ها با رعایت نکات ایمنی زیستی به آزمایشگاه منتقل و ارزیابی شدند.

استخراج RNA ویروس‌ها و تخلیص از پلاسما

نمونه‌های خون بیماران در تیوب‌های حاوی EDTA جمع‌آوری شد. نمونه‌ها با دور ۲۵۰۰ rpm به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. پلاسما به دست آمده تا زمان مصرف در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به‌منظور استخراج ژنوم ویروس‌ها با استفاده از کیت QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) و براساس دستورالعمل کیت استخراج صورت گرفت. ستون کیت تخلیص QIAamp به‌طور مؤثری هم DNA و هم RNA را تخلیص می‌کند. حجم نهایی تخلیص ۵۰µl و نگهداری آنها در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد بود.

رونوشت‌برداری معکوس ژنوم ویروس

پس از استخراج و تخلیص ژنوم RNA ویروس‌ها از پلاسمای بیماران، cDNA سازی با استفاده از آنزیم M-MuLV (Fermentas,Germany)، انجام شد. دریک میکروتیوب ۰/۲ ml ، ۵µl از RNA تخلیص شده به ۱µl پرایمر HIV-R (2 µM) و ۱µl پرایمر HCV-R (2 µM) اضافه شد و پس از افزودن آب مقطر عاری از RNase و DNase تا حجم نهایی ۱۲µl، میکروتیوب به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در مرحله بعد بافر آنزیم M-MuLV به‌مقدار ۵µl ، ۲dNTP µl (20U/ µl)، RNase inhibitor ، ۰/۵µl و ۱ µl از آنزیم M-MuLV RT(200U/ µl) اضافه گردید. سپس در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۶۰دقیقه انکوبه شد و توقف واکنش در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه انجام شد.

برای حذف RNA از cDNA های ساخته شده تیمار با آنزیم RNase H به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ سانتی‌گراد انجام شد. cDNA های ساخته شده تا موقع استفاده در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

انجام کلونینگ بر روی قطعات به‌دست آمده از ژنوم دو ویروس HIV-1 و HCV به‌منظور تهیه استانداردها

برای تولید استانداردهایی برای تعیین حساسیت آنالیتیک روش راه‌اندازی شده، ژنوم هر دو ویروس HIV-1 و HCV به‌طور مجزا و با استفاده از کیت T/A vector Cloning * K1213(Fermentase) ، در پلاسمید PTZ57R/T کلون شدند. پس از تخلیص، پلاسمیدها با آنزیم محدودکننده EcoRI (Fermentase) تیمار شدند تا به‌صورت خطی درآیند. پلاسمید خطی بر روی ژل آگارز ۰/۸درصد برده شدند و تخلیص از ژل انجام گردید. غلظت پلاسمید با توجه به OD260 به‌دست آمد و سپس استانداردها براساس تبدیل غلظت به تعداد کپی در میلی‌لیتر مطابق با پروتکل شرکت ABI (Applied Biosystems) تهیه شدند.

برای به‌دست آوردن حساسیت آنالیتیکی روش، رقت‌های ۱۰ برابر کاهش‌یابنده از پلاسمید تهیه گردید که معادل تعداد کپی 10^{2}-10^{6}در میلی‌لیتر بود.

برای بررسی حساسیت و ویژگی کلینیکی از فرمول‌های زیر استفاده شد.

حساسیت: تعداد مثبت‌های حقیقی تقسیم بر مجموع تعداد مثبت‌های حقیقی به‌علاوه تعداد منفی‌های کاذب

ویژگی: تعداد منفی های حقیقی تقسیم بر مجموع تعداد منفی‌های حقیقی به‌علاوه تعداد مثبت‌های کاذب

تشخیص ژنوم ویروس‌های HIV-1 و HCV به صورت Singleplex RT-PCR

مناطق کاملاً محافظت شده از ژنوم دو ویروس HIV-1 و HCV با هم ردیفی توالی‌ها به‌وسیله نرم‌افزار Mega4 برای طراحی پرایمر انتخاب شد. این مناطق حفاظت شده از ژنوم هر ویروس به گونه‌ای بود که تمام ژنوتیپ‌های دو ویروس ذکر شده را شامل شود و در واکنش Multiplex RT-PCR نیز سازگار باشد. توالی پرایمرهای HIV-1 به‌ترتیب زیر بود.

5' GTA CAG TGC AGG GGA AAG 3'
5' AAC CAG AGI AG(C/T) TTT GCT G 3'

این پرایمرها توالی‌های الیگونوکلئوتیدی ژن pol از HIV-1 را تکثیر می‌کنند.

توالی پرایمرهای HCV به ترتیب زیر بود.

5' CATGGCGTTAGTATGAGTG 3'
5' AA AAC TAT CAG GCA GTA CCA CAA G 3'

این توالی‌های الیگونوکلئوتیدی ناحیه 5'NCR از ژنوم HCV را تکثیر می‌کنند که به ترتیب طول قطعه حفاظت شده مربوط به HIV-1 ۱۷۶ bp و برای HCV ، ۲۴۱ bp می‌باشد.

به منظور بررسی صحت عملکرد روش طراحی شده؛

واکنش RT-PCR انجام شد.

برای انجام واکنش RT-PCR در حجم ۲۵µl که شامل 1XPCR buffer (Fermentas,Germany)، cDNA ۵µl، ۱/۵mM از MgCl2، ۱mM از پرایمرهای HIV-1 یا HCV، ۲۰۰µM dNTP Mix (Fermentas)، ۱ واحد Taq DNA Polymerase (Fermentas)، ۱۰۰ نانوگرم BSA، و آب تا حجم ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. پروفایل دمایی تکثیر شامل واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و به‌دنبال آن ۴۰ چرخه سه‌مرحله‌ای شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به‌مدت ۲۰ ثانیه و طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به‌مدت ۲۵ ثانیه و و در نهایت مرحله طویل شدن انتهایی به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. لازم به ذکر است که تمامی واکنش‌ها در دستگاه ABI (Applied Biosystem) انجام شد.

در نهایت پس از انجام واکنش محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲درصد الکتروفورز شدند تا از تکثیر محصول مورد نظر در واکنش‌های اولیه اطمینان حاصل گردد.

تشخیص ژنوم ویروس‌های HIV-1 و HCV با روش Multiplex RT-PCR

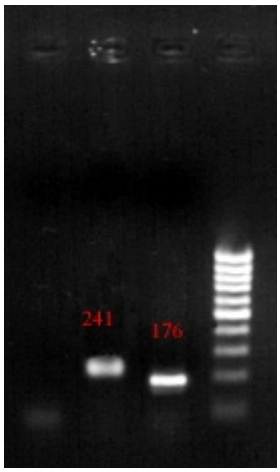
واکنش Multiplex RT-PCR چندگانه در حجم ۵۰µl و براساس پروتکل ذکر شده انجام شد (جدول یک).

جدول ۱ : مواد مورد نیاز برای انجام واکنش Multiplex RT-PCR

ردیف	مواد	میزان
۱	*10XPCR buffer*	*۵ µl*
۲	*Mgcl2(50mM)*	*۵ mM*
۳	*dNTP(10mM)*	*۳۰۰ µM*
۴	*Pimer HCVF*	*۱ mM*
۵	*Pimer HCVR*	*۱ mM*
۶	*Pimer HIVF*	*۱/۵ mM*
۷	*Pimer HIVR*	*۱/۵ mM*
۸	*Taq DNA polymerase*	*۱/۵ Uint*
۹	*cDNA*	*۵ µl*
۱۰	*H2O Nuclease free*	*Upto ۵۰ µl*

یافته‌ها

انجام واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده به‌منظور بررسی تکثیر هریک از توالی‌های HIV-1 و HCV، واکنش RT-PCR به صورت جداگانه بر روی cDNA هریک از ویروس‌های HIV-1 و HCV انجام شد و نتایج حاصله برروی ژل آگارز ۲درصد الکتروفورز شدند. در شکل یک وجود باندی به طول bp ۱۷۶ نشانگر تکثیر توالی مربوط به ویروس HIV-1 است و باند bp ۲۴۱ بر روی ژل آگارز بیانگر تشخیص ویروس HCV می‌باشد.



شکل ۱ : الکتروفورز محصولات PCR مربوط به دو ویروس HIV-1 و HCV بر روی ژل آگارز ۲درصد
ردیف۱ : کنترل منفی ، ردیف ۲ : HCV ، ردیف ۳ : HIV-1
ردیف ۴ : مارکر اندازه Fermentas (SM0243)

انجام واکنش Multiplex RT-PCR و تفکیک قطعات مورد نظر از ژنوم ویروس‌ها با استفاده از ژل آگاروز۳ درصد

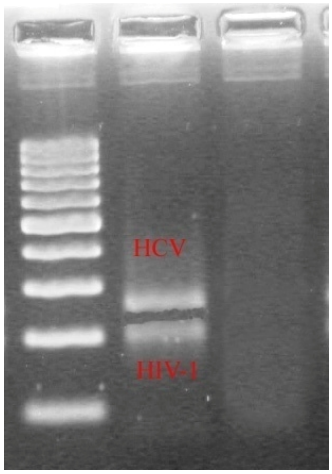
واکنش Multiplex RT-PCR بر روی cDNA سنتز شده از دو ویروس گذاشته شد که در آن تکثیر توالی اختصاصی ویروس‌های HIV-1 و HCV، بر مبنای اندازه منحصر به فرد خود، به راحتی قابل تمایز هستند. نتایج تکثیر چندگانه بر روی ژل آگارز ۳درصد در شکل ۲ نشان داده شده است.

حساسیت واکنش چندگانه

برای تعیین حساسیت آنالیتیک روش راه‌اندازی شده، ۱۰تکرار به‌صورت ۵ تکرار در دو روز مختلف از هر یک از رقت‌های ۵۰۰۰۰۰Copies/ml تا ۱۰۰Copies/ml از پلاسمید مربوط به هر ویروس، در واکنش‌های چندگانه مورد بررسی قرار گرفت و ۱۰۰درصد از رقت‌ها با تعداد کپی ۱۰۰۰Copies/ml در این روش شناسایی شدند. حساسیت آنالیتیک روش طراحی شده در حالت چندگانه برای هر دو ویروس HIV-1 و HCV، ۱۰۰۰Copies/ml در نظر گرفته شد (جدول ۲).

براساس برخی گزارشات که در واکنش چندگانه ممکن است حساسیت واکنش تحت تاثیر غلظت بالای هریک از

الگوها قرار گیرد؛ برای تعیین حساسیت هریک از رقت‌های ۱۰۰۰۰۰Copies/ml تا ۵۰۰Copies/ml از هر ویروس در حضور رقت بالای (10^5 Copies/ml) ویروس دیگر مورد بررسی قرار گرفت. جدول ۳ نشان‌دهنده وجود رقت بالای یک ویروس برروی غلظت‌های مختلف ویروس دیگر می‌باشد که در این واکنش نیز هیچ‌کدام از ویروس‌ها بر غلظت کم ویروس دیگر اثر نداشتند.



شکل ۲ : الکتروفورز محصولات PCR مربوط به واکنش چندگانه برای تشخیص دو ویروس HIV-1 و HCV بر روی ژل آگارز ۳درصد
ردیف۱ : مارکر اندازه Fermentas (SM0243) ، ردیف ۲ : محصول PCR نمونه‌های مالتیپلکس ، ردیف ۳ : کنترل منفی

جدول ۲ : تعیین حساسیت آنالیتیک واکنش Multiplex RT-PCR با نمونه‌هایی دارای تعداد کپی مشخص از پلاسمید

HIV-1 (copies/ml)	HCV (copies/ml)	Replicates
۵۰۰۰۰۰	۵۰۰۰۰۰	۱۰/۱۰
۵۰۰۰۰	۵۰۰۰۰	۱۰/۱۰
۵۰۰۰	۵۰۰۰	۱۰/۱۰
۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰/۱۰
۵۰۰	۵۰۰	۷/۱۰
۲۰۰	۲۰۰	۰/۱۰
۱۰۰	۱۰۰	۰/۱۰

جدول ۳ : تعیین حساسیت واکنش چندگانه دارای غلظت‌های مختلف ژنوم HCV و HIV-1

HIV-1 (copies/ml)	HCV (copies/ml)	HIV-1 and HCV positive replicates
۱۰۰۰۰۰	۱۰۰۰۰۰	۱۰/۱۰
۱۰۰۰۰	۱۰۰۰۰۰	۱۰/۱۰
۱۰۰۰	۱۰۰۰۰۰	۱۰/۱۰
۵۰۰	۱۰۰۰۰۰	۴/۱۰
۱۰۰۰۰۰	۱۰۰۰۰۰	۱۰/۱۰
۱۰۰۰۰۰	۱۰۰۰۰	۱۰/۱۰
۱۰۰۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰/۱۰
۱۰۰۰۰۰	۵۰۰	۵/۱۰

برای بررسی حساسیت کلینیکی روش طراحی شده، ۲۰نمونه دارای عفونت همزمان HIV-1 و HCV مورد ارزیابی قرار گرفت. تعدادکپی هریک از ویروس‌ها در نمونه‌ها همان‌طور که گفته شد؛ حداکثر یک لگاریتم بالاتر از حساسیت آنالیتیک روش بود. به‌عبارت دیگر تعداد کپی ویروس‌ها ۱۰۰۰۰Copies/ml در نظر گرفته شد تا از این طریق بتوان توانایی روش راه‌اندازی شده در شناسایی نمونه‌های دارای تعداد کپی کم‌ویروسی را به چالش کشید. با استفاده از روش طراحی شده ۱۹ نمونه از ۲۰ نمونه برای هر دو ویروس HIV-1 و HCV مثبت شد و یک نمونه تنها نتیجه مثبت را برای HCV نشان داد. از این رو حساسیت کلینیکی روش چندگانه راه‌اندازی شده معادل ۹۵ درصد درنظر گرفته شد.

تعیین ویژگی روش طراحی شده

برای تعیین ویژگی روش راه‌اندازی شده از برخی ویروس‌های منتقل شونده از طریق خون، از جمله ویروس‌های HBV ، HTLV-1 ، HSV-1 ، HSV-2، CMV و EBV و همچنین ۲۰ نمونهٔ منفی که عدم وجود HIV-1 و HCV در آنها با استفاده از روش های سرولوژی و ملکولی تجاری معتبر تأیید شده بود؛ برای انجام آزمون استفاده شد. در روش چندگانه به‌کار گرفته شده، فقط دو ویروس HIV-1 و HCV تشخیص داده شد و پرایمرهای واکنش با هیچ‌یک از ویروس‌ها و نمونه‌های منفی فوق واکنش نداد. از این‌رو ویژگی روش راه‌اندازی شده معادل ۱۰۰درصد درنظر گرفته شد.

بحث

در این مقاله مراحل راه‌اندازی و تأیید یک روش Multiplex RT-PCR برای تشخیص همزمان RNA ویروس‌های HCV و HIV-1 در نمونه‌های پلاسما شرح داده شد. این روش قادر است با حساسیتی مناسب، در زمانی اندک و براساس اندازه قابل افتراق ویروس‌های فوق را از یکدیگر متمایز کند. به منظور طراحی پرایمرهای این واکنش، ازهم‌ردیفی چندگانه نواحی ژنوم این دو ویروس استفاده شد که بیشترین درجه حفاظت‌شدگی را در بین ایزوله‌های مختلف دارا هستند.

اولین روش چندگانه برای تشخیص HIV-1 و HCV

براساس تکثیر جداگانه و تشخیص به‌وسیله فلوسایتومتری بود که این روش پرزحمت و زمان‌بر بود (۱۹). دیگر روش‌های چندگانه نظیر AMPLINAT MPX test (۱۲)، TMA-based assay (۱۱) و Multiplex Real-Time RT-PCR (۲۰) روش‌های حساس برای آنالیز HIV-1 و HCV هستند؛ اما بسیار پرهزینه می‌باشند و نمی توان از آنها به‌عنوان یک روش غربالگری استفاده کرد. در مقابل Multiplex RT-PCR مزایایی نظیر افزایش سرعت از طریق کاهش زمان واکنش‌ها RT-PCR به‌صورت جداگانه، حساسیت بالا، قابلیت انجام واکنش‌ها در حجم انبوه و کاربری آسان و تکرارپذیری واکنش‌ها می‌باشد.

De Crignis و همکاران در سال ۲۰۱۰ یک روش Multiplex Real-time PCR Syber GreenI برای تشخیص همزمان دو ویروس HCV و HIV-1 ارائه نمودند که بر مبنای آنالیز منحنی ذوب می‌باشد. این روش قادر است دو ویروس HIV-1 و HCV را از یکدیگر در نمونه‌های DBS (Dried Blood Spots) متمایز کند (۲۱). اگرچه این روش دارای حساسیت مناسبی می‌باشد؛ ولی نسبت به روش Multiplex RT-PCR بسیار گران‌تر است و این موضوع کاربرد این روش را به‌عنوان یک روش غربالگری معمول تاحدی دچار مشکل می‌نماید.

در مطالعه حاضر نیز مراحل راه‌اندازی و تأیید یک روش Multiplex RT-PCR برای تشخیص همزمان RNA ویروس‌های HIV-1 و HCV در نمونه‌های پلاسما انجام شد. بدین منظور نواحی حفاظت شده از ژنوم هر دو ویروس برای طراحی پرایمر استفاده شد. ارزیابی غلظت کلرید منیزیم و پرایمرها و آنزیم Taq pol انجام شد. زیرا عوامل اساسی در حساسیت و اختصاصیت واکنش هستند. آنالیز واکنش Multiplex RT-PCR براساس الکتروفورز محصولات واکنش برروی ژل آگاروز ۳درصد می‌باشد که به‌طور اختصاصی تکثیر یا عدم تکثیر توالی هدف را مشخص می کند. الکتروفورز محصول واکنش RT-PCR دو ویروس HIV-1 و HCV به ترتیب وجود باندی به طول ۱۷۶ bp نشانگر تکثیر توالی مربوط به ویروس HIV-1 و باند ۲۴۱ bp بر روی ژل آگارز بیانگر تشخیص ویروس HCV می باشد (شکل۲)؛ که این اختلاف دوباند جداگانه بر روی ژل به‌وجود آورده و امکان تمایز دو ویروس را در این وضعیت بدون هیچ ابهامی امکان‌پذیر می کند. این روش قادر است با حساسیتی مناسب و براساس اندازه قطعات برروی ژل آگاروز۳درصد ویروس های فوق را از یکدیگر متمایز کند. برای طراحی پرایمرها، از هم‌ردیفی چندگانه ژنوم این دو ویروس از نرم‌افزار Mega4 استفاده شد تا بتوانیم بهترین مناطق حفاظت شده را در بین ژنوتیپ‌های مختلف به‌دست آوریم. همچنین آنالیز پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار BLAST انجام شد تا این توالی‌های الیگونوکلئوتیدی هیچ همولوژی با دیگر ویروس‌ها و ژنوم انسان نداشته باشند. حساسیت آنالیتیکی این روش برای HIV-1 و HCV، ۱۰۰۰ Copies/ml در نظر گرفته شد. این حدآستانه تشخیص، حساسیت و کارایی خوب این روش را نشان می‌دهد. زیرا تعداد کپی ویروس در عفونت حاد برای HIV-1 و HCV به‌ترتیب بین 10^2 تا 10^5Copies/ml و 10^4< Copies/ml می‌باشد. به‌علاوه این روش برای مراحل ابتدای عفونت به HIV-1 و HCV کارآیی لازم را نیز دارد. به منظور محاسبه حساسیت آنالیتیک، از قطعات کلون شده دو ویروس در T/A وکتور و تهیه رقت‌های مختلف از پلاسمید با تعداد کپی مشخص استفاده شد. در این مورد برای به حداقل رساندن خطا در محاسبه تعداد کپی پلاسمیدها از میانگین حاصل از سه بار کمیت سنجی مجزا، توسط یک کیت تجاری معتبر، در سه روز مختلف استفاده شد. لازم به ذکر است که در طی این سه بار کمیت سنجی، ضریب تغییرات حاصله برای هر ویروس همواره کمتر از ۵درصد بود که این مسأله مؤید تخمین نسبتاً تکرارپذیر تعداد کپی پلاسمیدها است. به‌علاوه با بررسی برروی ۲۰ نمونه HIV-1 و HCV مثبت و ۲۰ نمونه افراد سالم، حساسیت و ویژگی کلینیکی این روش به ترتیب ۹۵ و ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد که بیانگر توانایی روش راه‌اندازی شده در تشخیص بیمارانی با تعداد کپی کم ویروس‌های فوق در پلاسمای خود است.

یکی از ویژگی‌های روش راه‌اندازی شده مقرون به صرفه‌تر بودن آن نسبت به روش‌های تک‌گانه است. از آنجایی که در این روش از یک واکنش RT-PCR دوگانه (Duplex RT-PCR) برای تکثیر همزمان این دو عامل عفونی

استفاده می‌شود؛ با استفاده از اجزا و مخلوط یک واکنش منفرد و تنها با افزودن الیگونوکلئوتیدهای بیشتر، می‌توان وجود یا عدم وجود این دو عامل عفونی را در نمونه موردنظر تشخیص داد. بنابراین قسمت عمده‌ای از هزینه‌هایی که در انجام دو واکنش مجزا نظیر مواد و اجزای مصرفی مخلوط RT-PCR (از جمله آنزیم، بافر، نوکلئوتیدها و سایر افزودنی‌ها)، تیوپ‌های واکنش، الکتروفورز، هزینه‌های پرسنلی و استهلاک دستگاه‌ها مورد نیاز است؛ نصف می‌گردد. از این رو عنوان می شود که با توجه به حساسیت و ویژگی مناسب، استفاده از این روش نسبت به استفاده از دو واکنش منفرد جداگانه از نظر اقتصادی و زمانی مقرون به صرفه‌تر است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان دهنده حساسیت و اختصاصیت بالای روش Multiplex RT-PCR می‌باشد که با توجه به ارزان بودن نسبی آن؛ پیشنهاد می گردد به عنوان روشی مناسب برای غربالگری دهندگان خون مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات همه همکاران محترم به‌ویژه آقای دکتر سیامک میراب سمیعی مسؤول بخش ملکولی بیمارستان دی تهران و آقای دکتر کیهان آزادمنش رئیس بخش ویروس‌شناسی انستیتو پاستور ایران که در تهیه نمونه و رهنمودهای علمی ما را یاری نمودند؛ کمال تشکر و قدردانی را می‌نماییم.

References

1. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. N Engl J Med. 1992 Dec; 327(27):1899-905.

2. Sherman KE, Rouster SD, Chung RT, Rajicic N. Hepatitis C Virus prevalence among patients infected with Human Immunodeficiency Virus: a cross-sectional analysis of the US adult AIDS Clinical Trials Group. Clin Infect Dis. 2002 Mar; 34(6):831-7.

3. Hosseini M, SeyedAlinaghi S, Kheirandish P, Esmaeli Javid G, Shirzad H, Karami N, et al. Prevalence and correlates of co-infection with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in male injection drug users in Iran. Arch Iran Med. 2010 Jul; 13(4):318-23.

4. Michaels SH, Clark R, Kissinger P. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med. 1998 Aug;339(6):405-6.

5. Sulkowski MS, Mast EE, Seeff LB, Thomas DL. Hepatitis C virus infection as an opportunistic disease in persons infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis. 2000 Apr; 30(Suppl 1):S77-84.

6. Sulkowski MS, Moore RD, Mehta SH, Chaisson RE, Thomas DL. Hepatitis C and progression of HIV disease. JAMA. 2002 Jul; 288(2):199-206.

7. Greub G, Ledergerber B, Battegay M, Grob P, Perrin L, Furrer H, et al. Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. Lancet. 2000 Nov; 356(9244):1800-5.

8. Monga HK, Rodriguez-Barradas MC, Breaux K, Khattak K, Troisi CL, Velez M, et al. Hepatitis C virus infection-related morbidity and mortality among patients with human immunodeficiency virus infection. Clin Infect Dis. 2001 Jul; 33(2):240-7

9. García-Samaniego J, Rodríguez M, Berenguer J, Rodríguez-Rosado R, Carbó J, Asensi V, et al. Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients with chronic hepatitis C. Am J Gastroenterol. 2001 Jan;96(1):179-83.

10. Kornman MT, Laparc G, Benson K. Nucleic acid amplification testing: the new infectious disease testing method for donor blood. Cancer Control. 1999 Oct;6(5):504-508.

11. Giachetti C, Linnen JM, Kolk DP, Dockter J, Gillotte-Taylor K, Park M, et al. Highly sensitive multiplex assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus RNA. J Clin Microbiol. 2002 Jul;40(7):2408-19.

12. Meng Q, Wong C, Rangachari A, Tamatsukuri S, Sasaki M, Fiss E. Automated multiplex assay system for simultaneous detection of hepatitis B virus DNA, hepatitis C virus RNA, and human immunodeficiency virus type 1 RNA. J Clin Microbiol. 2001 Aug;39(8):2937-45.

13. Mine H, Emura H, Miyamoto M, Tomono T, Minegishi K, Murokawa H, et al. High throughput screening of 16 million serologically negative blood donors for hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type-1 by nucleic acid amplification testing with specific and sensitive multiplex reagent in Japan. J Virol Methods. 2003 Sep;112(1-2):145-51.

14. Berry N, Herrera C, Cranage M. Detection, quantification, and characterisation of HIV/SIV. Methods Mol Biol. 2011;665:133-60.

15. Goire N, Freeman K, Tapsall JW, Lambert SB, Nissen MD, Sloots TP, et al. Enhancing gonococcal antimicrobial resistance surveillance: a real-time PCR assay for detection of penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae by use of noncultured clinical samples. J Clin Microbiol. 2011 Feb;49(2):513-8.

16. Josko D. Molecular virology in the clinical laboratory. Clin Lab Sci. 2010 Fall; 23(4):231-6.

17. Wei X, Youngpairoj AS, Garrido C, Zahonero N, Corral A, de

Mendoza C, et al. Minority HIV mutation detection in dried blood spots indicates high specimen integrity and reveals hidden archived drug resistance. J Clin Virol. 2011 Feb;50(2):148-52.

18. Weidner J, Cassens U, Göhde W, Sibrowski W, Odaibo G, Olaleye D, et al. An improved PCR method for detection of HIV-1 proviral DNA of a wide range of subtypes and recombinant forms circulating globally. J Virol Methods. 2011 Mar;172(1-2):22-6.

19. Defoort JP, Martin M, Casano B, Prato S, Camilla C, Fert V. Simultaneous detection of multiplex-amplified human immunodeficiency virus type 1 RNA, hepatitis C virus RNA, and hepatitis B virus DNA using a flow cytometer microsphere-based hybridization assay. J Clin Microbiol. 2000 Mar;38(3):1066-71.

20. Vargo J, Smith K, Knott C, Wang S, Fang C, McDonough S, et al. Clinical specificity and sensitivity of a blood screening assay for detection of HIV-1 and HCV RNA. Transfusion. 2002 Jul; 42(7):876-85.

21. De Crignis E, Re MC, Cimatti L, Zecchi L, Gibellini D. HIV-1 and HCV detection in dried blood spots by SYBR Green multiplex real-time RT-PCR. J Virol Methods. 2010 Apr;165(1):51-6.