

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

مهدی پریان^{1*}، سمیرا محمدی یگانه¹، بهزاد خوانساری نژاد²، مهدیه موندنی زاده³، سعید پریان⁴

- 1- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- 2- دانشجوی دکتری ویروس‌شناسی پزشکی، گروه میکروبی‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- 3- دانشجوی دکتری 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 مولکولی 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 مطالعه ارتباط سنجی در راه اندازی و به کارگیری یک روش Real-time PCR TMA نوین جهت تشخیص هم‌دمای ویروس HIV-1 ارائه شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، ست پرایمر و پروب Molecular Beacon توسط نرم افزارهای اختصاصی و برای یک ناحیه 176 جفت بازی از ژن pol ویروس HIV-1 طراحی شد. برای تعیین حساسیت آنالیتیک واکنش از رقت‌های لگاریتمی 10⁷-10¹⁰ 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 وسیله 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 متقاطع 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 نمونه منفی به وسیله 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 هم‌دمای 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، انستیتو پاستور ایران، گروه بیوتکنولوژی پزشکی

Eami: mparyan@gmail.com

مقدمه

در حال حاضر در سطح جهان، 33 میلیون نفر به ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسان (Human immunodeficiency virus-HIV) مبتلا هستند (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 (4-6).

روش شایع و اصلی تشخیص عفونت HIV-1، ردیابی سرولوژیک آنتی بادی‌های اختصاصی علیه این ویروس در سرم افراد 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، 8-10). 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 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 مایکوپلازما پنومونیه، کلامیدیا پنومونیه و گونه‌های لژیونلا در نمونه‌های تنفسی (12). از این‌رو هدف از این مطالعه 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 مطالعه تجربی، در مجموع از 30 نمونه پلاسما 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، هم‌ردیفی 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

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 (جدول 1).

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.

جدول 1. توالی پرایمرهای مربوط به دو ویروس HIV-1

5' GTACAGTGCAGGGGAAAG 3'	پرایمر رفت
5' AATTCCTAATACGACTCACTATAGGGCCAGAGIAG(C/T)TTTG CTG 3'	پرایمر برگشت
TET-5' GGCGTGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAACGCC 3'-BHQ-1	پروب

جدول 2. اجزای لازم برای واکنش Real-time TMA

غلظت	اجزای واکنش
40 میلی مولار	Tris-HCL
50 میلی مولار	KCL
1 میلی مولار	DTT
3 میلی مولار	Mgcl2
10 پیکومولار	پرایمر فوروارد
10 پیکومولار	پرایمر ریورس
10 پیکومولار	پروب
0/4 میلی مولار	dNTP
0/8 میلی مولار	NTP
5 درصد	DMSO
12 واحد	مهار کننده RNase
8 واحد	آنزیم M-Mulv
20 واحد	آنزیم RNA T7 پلیمرز
جمع آوری شدت افزایش فلورسانس در هر دقیقه	

جدول 3. اجزای لازم برای فرآیند رونویسی در آزمایشگاه

غلظت	اجزای واکنش
5 میکرولیتر	بافر نسخه برداری 5 X
1 میلی مولار	ترکیب NTPها
12/5 واحد	مهار کننده RNase
20 واحد	آنزیم RNA T7 پلیمرز
1 میکروگرم	محصول PCR
تا حجم 50 میکرولیتر	آب حاوی DEPC
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

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 (جدول 2). 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 (Fermentas) انجام گردید (جدول 3).

حساسیت و ویژگی

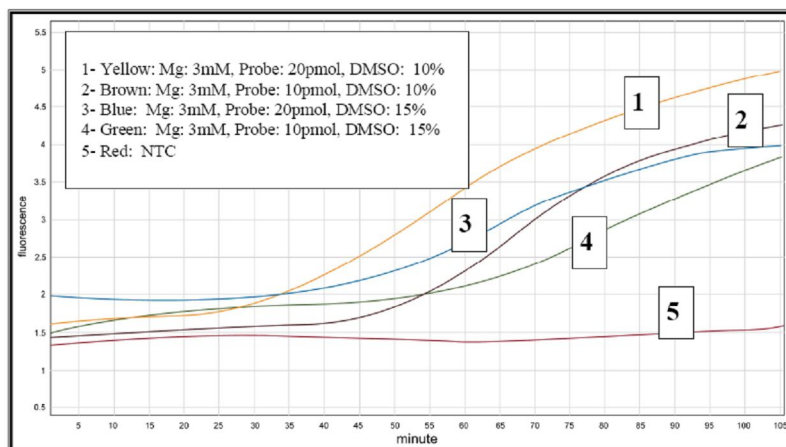
جهت تعیین حساسیت کلینیکی در مجموع از 30 نمونه HIV-1 مثبت استفاده شد. برای تعیین ویژگی آنالیتیک روش تشخیصی، علاوه بر بررسی صحت اتصال اختصاصی پرایمرها به الگوی مورد نظر در پایگاه NCBI nucleotide BLAST، از چند نمونه ژنوم ویروس‌های منتقل شونده از طریق خون از قبیل HCV، HTLV-1، HHV-8، HHV-6، B19، VZV، EBV، HSV-2، HSV-1 و HBV استفاده شد و به منظور تعیین ویژگی کلینیکی از 20 نمونه 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 آرشو آزمایشگاه بیمارستان دی تهران به دست آمدند.

یافته‌ها

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

زدایی شوند. بدین منظور از آنزیم DNase (Fermentas) عاری از RNase برای حذف آلودگی DNA و کتوری 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 دمای 70 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 کپی 10^7 - 10^{10} در میلی‌لیتر بود.



شکل 1. نمودار افزایش فلورسانس Real-time TMA

به منظور بررسی حساسیت کلینیکی نیز، 30 نمونه 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 نمونه منفی که عدم وجود HIV-1 در آنها با استفاده از روش های سرولوژی و ملکولی تجاری معتبر تأیید شده بود، انجام شد. در هیچ یک از موارد نتیجه 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-time TMA برای تشخیص ویروس HIV-1 پرداختیم. هدف انجام چنین مطالعه‌ای، شناسایی و پایش ویروس HIV-1 انتقال یابنده در جمعیت و فراهم نمودن ایزاری 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 درجه 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 ویروس در 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

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 مقطاعی با سایر عوامل مداخله کننده احتمالی وجود ندارد. برای بررسی عملی ویژگی آنالیتیک این روش، از ویروس‌هایی مانند HCV، HIV-1، HSV-2، CMV، EBV، HBV، 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 تأییدکننده 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 پلاسما 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.

جدول 4. 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

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 تهیه 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.

میلی لیتر بوده و از این رو کمتر از حد تشخیص تست راه اندازی شده می باشد.

این تکنیک در مطالعات دیگری از جمله آیل و همکاران در سال 2003 برای تمایز ایزوله های C و C² ویروس HIV-1 مورد استفاده قرار گرفت (16). هم چنین دی بار و همکاران در سال 2001 تستی برای تشخیص HIV-1 طراحی نمودند که علاوه بر تشخیص ویروس قادر به تمایز ایزوله های آن نیز بود. حساسیت این روش 1000 کپی در میلی لیتر 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 میلی لیتر گزارش شد که این نشان دهنده حساسیت بالای روش طراحی بود (18). از دیگر مزایای این تکنیک می توان به اختصاصیت بسیار زیاد به دلیل استفاده از کاوش گر اختصاصی توالی های اسید نوکلئیکی هدف با استفاده از رنگ فلوروسنت اشاره کرد. در این تحقیق سعی شد تا کاوش گر اختصاصی مربوط به توالی کاملاً حفاظت شده ویروس HIV-1، طراحی و با رنگ فلوروسنت نشاندار شود. استفاده از این کاوشگر تشخیص ویروس HIV-1 را به صورت کاملاً اختصاصی امکان پذیر می سازد.

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 می باشد. در کنار حساسیت و اختصاصیت بالا، آسان بودن و آنالیز سریع (حدود دو ساعت) از مزایای عمده این تکنیک می باشد. به علاوه این سنجش روش مفید و سریع برای آشکار سازی عوامل پاتوژن در نمونه های مختلف بیماران می باشد. هم چنین از آن می توان برای ارزیابی عفونت های ویروس HIV-1 در غربالگری واحدهای خونی استفاده کرد و آن را جایگزین روش های سنتی غربالگری در انتقال خون ساخت.

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*, *Chlamydia 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.