خون
دوره ۳ شماره ۴ زمستان ۸۵(۳۱۵-۳۰۹)

راه‌اندازی روش RT-Nested PCR به منظور تشخیص ویروس نقص ایمنی اکتسابی تیپ یک

جواد دوزنده[۱]، دکتر مهرداد روانشاد[۲]، سعید عامل جامه‌دار[۳]، دکتر فرزانه صباحی[۴]

چکیده

سابقه و هدف

ویروس نقص ایمنی اکتسابی تیپ یک(HIV-1) عامل ایجاد کننده سندرم نقص ایمنی اکتسابی انسانی"ایدز" می‌باشد. انتقال بیماری از طریق انتقال خون در دوره پنجره، در مراکز انتقال خون یک معضل جهانی محسوب می‌شود. علاوه بر این، نیاز مبرمی برای تشخیص سریع، حساس و دقیق عفونت HIV-1 قبل از ظهور آنتی‌بادی در بدن فرد آلوده در بیمارستان‌ها و مراکز بهداشتی احساس می‌شود. تشخیص ژنوم ویروس HIV-1 در نمونه‌های مشکوک، باعث جلوگیری از گسترش بیماری در جامعه و شیوع روز افزون بیماری خواهد بود. با استفاده از این روش می‌توان عفونت را در مراحل ابتدایی و قبل از ظهور آنتی‌بادی‌های اختصاصی تشخیص داد. هدف از این پژوهش طراحی روش بسیار حساس و سریع RT-Nested PCR جهت تشخیص عفونت HIV-1 بود.

مواد وروش‌ها

پژوهش انجام گرفته از نوع بنیادی ـ کاربردی بود. روش RT-Nested PCR به منظور جداسازی سکانسی حفاظت شده از بخش ژن gag در ویروس HIV-1 طراحی و به کار گرفته شد. ابتدا با کمک روش ترانس‌کریپتاز معکوس، از روی ژنوم RNA ویروس، cDNA ساخته و پس از آن با روش Nested-PCR با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی و در دو مرحله، قطعه‌ای از ژن مورد نظر ویروس HIV-1 تکثیر داده شد و با کمک الکتروفورز، محصولات PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده با کمک آزمون ANOVA و نرم افزار آماری SPSS تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها

تعداد ۲۵ نمونه سرمی از مراحل مختلف عفونت(شامل مراحل بدون علامت، علامت‌دار و ایدز) و هم‌چنین ۱۵ نمونه پانل استاندارد و ۲۰ نمونه سرمی منفی جمع‌آوری شد و با روش فوق مورد بررسی قرار گرفت. در تمام موارد مثبت، باند مورد نظر بر روی ژل آگارز مشاهده شد، ضمن این که در هیچ کدام از نمونه‌های منفی، باندی مشاهده نگردید.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش، نشان داده شد که روش راه‌اندازی شده دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی جهت تشخیص عفونت ویروس HIV-1 می‌باشد. هم‌چنین با توجه به حساسیت روش، به نظر می‌رسد که ژنوم ویروسی را می‌توان قبل از تغییرات سرمی و ظهور آنتی‌بادی‌ها تشخیص داد و از این رو می‌توان دوره پنجره تشخیص عفونت را کوتاه‌تر کرد.

کلمات کلیدی: PCR دوگانه، RT-PCR، ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسانی تیپ یک، ژن gag

تاریخ دریافت : ۸۴/۱۱/۱۵
تاریخ پذیرش : ۸۵/۱۰/۳۰

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ویروس شناسی ـ دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۲- مؤلف مسؤول: PhD ویروس شناسی ـ استادیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ صندوق پستی ۳۳۱-۱۴۱۱۵
۳- دانشجوی PhD ویروس شناسی ـ دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۴- PhD ویروس شناسی ـ دانشیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

مقدمه

طبق آمار موجود، در سراسر جهان به طور متوسط روزانه ۱۳۵۰۰ نفر به تعداد مبتلایان بیماری ایدز(Acquired Immunodeficiency Syndrome(AIDS)) افزوده می‌شود. به این ترتیب تا سال ۲۰۱۰، شمار مبتلایان به این بیماری مهلک از مرز ۴۲ میلیون نفر فعلی به ۷۵ میلیون نفر خواهد رسید. در بیست سال گذشته تاکنون ۲۵ میلیون نفر در دنیا بر اثر ابتلا به این بیماری جان خود را از دست داده‌اند(۳-۱). لذا با توجه به اهمیت بیماری و گسترش روزافزون آن، نیاز به روش‌های تشخیصی با کارآیی بالاتری است تا بتوان از حجم فزاینده مبتلایان به بیماری کاست و یا آن را متوقف کرد.

در حال حاضر مهم‌ترین روش‌های تشخیصی برای تشخیص عفونت HIV-1 شامل روش EIA(Enzyme Immuno Assay) به منظور جستجوی آنتی‌بادی و روش وسترن بلات جهت تایید عفونت می‌باشد(۷-۴).

اهمیت دوره پنجره در سیر بیماری و انتقال عفونت از افراد مبتلا به دیگران، با توجه به بالا بودن بار ویروسی در این مرحله و هم چنین عدم کارآیی آزمایش‌های تشخیصی مبتنی بر جستجوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی، استفاده از روش RT-Nested PCR را به عنوان آزمایش تشخیصی با حساسیت بالا در مقایسه با سایر روش‌ها مطرح می‌نماید.

این پژوهش با هدف طراحی روش RT-Nested PCR با استفاده از آغازگرهای بسیار اختصاصی برای منطقه‌ای از ژن gag ویروس HIV-1 که از مناطق حفاظت شده ژنوم ویروس می‌باشد، انجام گرفت. علاوه بر حساسیت بالا، این روش تشخیصی دارای سهولت کاربرد نیز می‌باشد و از آن به راحتی می‌توان در مراکز تشخیصی استفاده کرد. هم چنین با توجه به این که روش‌های شناسایی مبتنی بر جستجوی آنتی‌بادی برای نوزادان متولد شده از مادران آلوده کارایی ندارد، این روش می‌تواند یک راه مناسب برای تشخیص عفونت نوزادان یاد شده تلقی گردد.

PCR دو گانه(Nested PCR) روشی است که در آن از دو جفت آغازگر برای تکثیر یک قطعه از ژن مورد نظر استفاده می‌شود(۹، ۸، ۴). جفت اول(آغازگرهای خارجی) سکانس مورد نظر را در مرحله اول تکثیر می‌کنند و جفت دوم(آغازگرهای داخلی) به نواحی داخلی محصولات اولیه متصل شده و محصولات را تکثیر می‌کنند، بنابراین حساسیت و اختصاصیت افزایش می‌یابد(۱۰، ۴). هدف عمده این روش آن است که در صورتی که تکثیر نا به جا یا اشتباهی در مرحله اول صورت گرفته باشد، در مرحله دوم دیگر آن سکانس تکثیر نشود، ضمن این که مرحله دوم تاییدی بر صحت محصول تکثیر یافته در مرحله اول خواهد بود(۱۲، ۱۱).

مواد و روش‌ها

طراحی آغازگر:

مطالعه انجام شده از نوع بنیادی ـ کاربردی بود. سکانس مربوط به ژن حفاظت شده gag از بانک ژن به دست آمد. آغازگرهای خارجی و داخلی تکثیر کننده قطعه مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار طراحی آغازگر(Gene Runner) طراحی و انتخاب شد(جدول شماره ۱). با استفاده از این آغازگرها و با توجه به محل اتصال آن‌ها، طول قطعه تکثیر یافته برای دور اول PCR، ۳۳۰ جفت باز و برای دور دوم PCR، ۲۵۰ جفت باز می‌باشد.

جدول ۱: سکانس آغازگرهای خارجی و داخلی برای تشخیص ویروس HIV-1

JDF_1	GAG AGA TGG GTG CGA GAG CGT CAG T	25 nucleotide
JDR_1	TGT TTT GCT CTT CCT CTA TCT TGT C	25 nucleotide
JDF_2	TGG GAG AGC GTC AGT ATT	18 nucleotide
JDR_2	AGG GTT GCT ACT GTA TTA T	19 nucleotide

جمع‌آوری نمونه، استخراج RNA ویروسی و(Reverse RT (Transcription:

نمونه‌های سرمی بیماران HIV-1 مثبت که آزمایش الیزای آن‌ها مثبت شده و آزمایش تاییدی وسترن بلات آن‌ها هم دو بار صحت مثبت بودن آزمایش یاد شده را تایید کرده بود از بیمارستان امام خمینی تهران در مراحل مختلف بیماری(شامل ۱۳ نمونه بدون علامت بیماری، ۴ نمونه علامت‌دار و ۸ نمونه بیماران ایدز، مجموعاً ۲۵ نمونه) و هم چنین ۱۵ نمونه پانل استاندارد(با تیترهای

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

مختلف ژنوم ویروسی) از بانک نمونه‌های انستیتو پاستور ایران تهیه شد. علاوه بر نمونه‌های ذکر شده، از ۲۰ نمونه منفی یاد شده استفاده گردید.

۱۴۰ میکرولیتر از سرم جهت استخراج RNA ویروسی استفاده شد و بقیه به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. استخراج RNA ویروسی توسط کیت استخراج کیاژن انجام گرفت. هم چنین در این پژوهش از روش فنل کلروفرم برای استخراج RNA ویروسی استفاده شد و این دو روش با هم مقایسه شدند و به جهت کیفیت بهتر نتایج در استخراج توسط کیت، این روش ترجیح داده شد.

RNA استخراج شده بلافاصله جهت انجام مرحله ترانس‌کریپتاز معکوس "RT" مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا پنج میکرولیتر RNA ویروسی به همراه شش میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر و یک میکرولیتر آغازگر اختصاصی آنتی‌سنس(با غلظت ۱۰ میلی‌مولار) به یک تیوب اپندورف اضافه شد، سپس تیوب به دستگاه ترموسایکلر(Eppendorf، Gradiant Cycler Master) منتقل گردید و به مدت پنج دقیقه در دمای هفتاد درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، پس از طی این زمان و در مرحله بعد، چهار میکرولیتر بافر آنزیم RT ، بیست واحد آنزیم RT ، بیست واحد آنزیم Rnasin(فرمنتاز) و ۲ میکرولیتر از مخلوط(۰/۲ مولار) دی‌اکسی‌نوکلئوتیدها(سیتاژن، dGTP، dCTP، dTTP، dATP) و یک میکرولیتر $Mgcl_2$ (۱/۵ میلی مولار) به آن اضافه گردید، حجم نهایی به بیست میکرولیتر رسانده شد و مجدداً به دستگاه ترموسایکلر منتقل شد. در این مرحله مخلوط فوق به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس cDNA ساخته شده به عنوان الگو برای مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز:

دور اول PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی 1X PCR بافر، $MgCl_2$(۲ میلی‌مولار)، دو میکرولیتر از cDNA، ۱/۲۵ میکرولیتر از آغازگرهای(۱۰ میلی مولار) JDR1 ، JDF1 ، dNTPs mix ۰/۲۲ میلی مولار و یک واحد آنزیم پلی‌مراز Taq DNA و با افزودن یک قطره روغن معدنی(Mineral Oil) به سطح آن تحت شرایط ذیل انجام گرفت؛

۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل دناچوریشن، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه، آنیلینگ، ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه و اکستنشن، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه و در نهایت یک مرحله اکستنشن نهایی به مدت ۵ دقیقه.

سپس محصول دور اول PCR به میزان ۴/۶ رقیق[1] گردید و به عنوان الگویی برای دور دوم PCR استفاده شد. مواد و شرایط دور دوم به قرار زیر است:

بافر ۱/۱۵X PCR، $MgCl_2$(۱/۵ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر از محصول رقیق شده دور اول، ۱/۲۵ میکرولیتر(۱۰ میلی مولار) از آغازگرهای JDF_2 ، JDR_2 ، ۰/۲mix dNTPs میلی مولار و به همراه یک واحد آنزیم پلی‌مراز Taq DNA را در یک تیوب ۲۰۰ میکرولیتری اپندورف مخلوط کرده، یک قطره روغن معدنی به سطح آن اضافه شد، سپس دور دوم با برنامه ذیل انجام شد:

۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل مراحل دناچوریشن، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه آنیلینگ، ۴۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه اکستنشن، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مرحله اکستنشن نهایی.

ژل الکتروفورز:

۱۰ میکرولیتر از محصول دور دوم PCR با یک میکرولیتر از بافر نمونه‌گذاری ۱۰X مخلوط گردید و روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید منتقل شد. پس از آن ژل در بافر TBE 1X به مدت یک ساعت در ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز گردید. با پایان یافتن زمان الکتروفورز، ژل به دستگاه داک منتقل شد و با اشعه UV باندها مشاهده و تصویر آن ثبت گردید.

تجزیه تحلیل اطلاعات:

اطلاعات و نتایج مربوط به نمونه‌های مثبت و نمونه‌های پانل استاندارد(علاوه بر اطلاعات اختصاصی قابل انتظار تحلیل آن)، به همراه نمونه‌های منفی با استفاده از شاخص‌های ضریب همبستگی پیرسون، رگراسیون

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

ANOVA و با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳ تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها

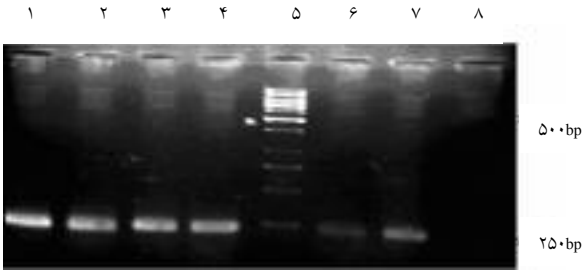
RT-Nested PCR طراحی شده، بر روی ۲۵ نمونه سرم HIV-1 مثبت مربوط به بیماران آلوده و هم چنین ۱۵ نمونه پانل استاندارد انجام شد. علاوه بر آن، کارآیی این روش روی ۲۰ نمونه سرم منفی تایید شده، مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس مجموع نتایج به دست آمده میزان حساسیت و ویژگی روش طراحی شده محاسبه گردید(جدول شماره ۲).

جدول ۲: حساسیت و ویژگی روش RT-Nested-PCR طراحی شده

نمونه‌های مورد مطالعه	نتایج به دست آمده از روش RT-Nested-PCR طراحی شده		
	مثبت	منفی	مثبت/منفی کاذب
نمونه‌های مثبت(۲۵)			
افراد فاقد علامت(۱۳)	۱۳	۰	۰
افراد دارای علامت(۴)	۴	۰	۰
بیماران ایدز(۸)	۸	۰	۰
نمونه‌های منفی تایید شده(۲۰)	۰	۲۰	۰
پانل استاندارد(۱۵)			
مثبت(۱۱)	۱۱	۰	
منفی(۴)	۰	۴	
مجموع نتایج (حساسیت و ویژگی)	(۱۰۰)۴۶	(۱۰۰)۲۴	(۰)۰

در تمام نمونه‌های سرمی مثبت، باند مورد نظر مشاهده گردید ضمن این که در هیچ کدام از نمونه‌های منفی باندی مشاهده نشد. در نمونه‌های مثبت هم هیچ باند غیر اختصاصی مشاهده نشد(شکل ۱).

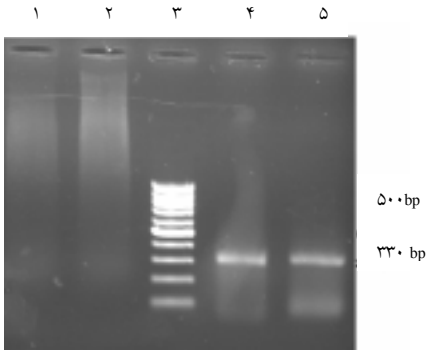
مطالعات انجام گرفته بر روی نمونه‌های پانل استاندارد و رقیق‌سازی آن‌ها نشان داد، روش طراحی شده توانایی تشخیص نمونه‌هایی را به عنوان مثبت دارد که حداقل دارای ۵۰۰ کپی ژنوم ویروس در هر میلی‌لیتر باشند.



شکل ۱: مربوط به محصول نهایی واکنش PCR در دور دوم

چاهک شماره یک، دو، سه، چهار و شش: نمونه های بیماران مورد مطالعه
چاهک شماره هفت کنترل مثبت
چاهک شماره هشت کنترل منفی
چاهک شماره پنج مارکر وزنی DNA

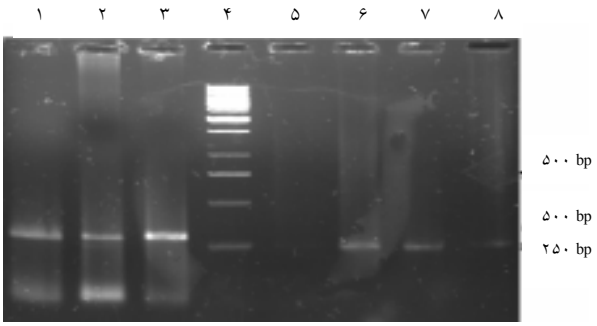
ذکر این نکته ضروری است که در این روش، در تمام نمونه‌های مثبت پس از آن که محصولات دور اول روی ژل آگارز برده شد، یک باند bp ۳۳۰ نسبتاً واضح قابل مشاهده بود و در نمونه‌های منفی هیچ گاه این باند مشاهده نگردید(شکل‌های ۲ و ۳). هم چنین در این پژوهش مشاهده گردید که در مراحل بهینه‌سازی(optimization) واکنش‌های PCR دوگانه، میزان برداشت الگو جهت انجام دور دوم، تاثیر به سزایی در نتیجه نهایی واکنش دارد.



شکل ۲: مربوط به محصول نهایی واکنش PCR در دور اول

چاهک شماره یک کنترل منفی
چاهک شماره دو کنترل منفی
چاهک شماره سه مارکر وزنی DNA
چاهک شماره چهار کنترل مثبت
چاهک شماره پنج نمونه بیمار

www.SID.ir
Archive of SID
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com



شکل ۳ : مربوط به مقایسه محصولات نهایی دور اول و دوم و اندازه آن‌ها

چاهک‌های شماره یک، دو، هفت و هشت مربوط به نمونه‌های بیماران
چاهک‌های شماره سه و شش مربوط به کنترل مثبت
چاهک شماره پنج مربوط به کنترل منفی
چاهک شماره چهار مربوط به مارکر وزنی DNA

بهینه‌سازی برای مشاهده میزان کم ژنوم ویروسی در نمونه بالینی نقش اساسی و بسیار مهمی دارد. لذا در این مطالعه رقت‌های مختلف محصولات مرحله اول ومقادیر متفاوت یون‌های $MgCl_2$ و KCl در دو مرحله مورد بررسی قرار گرفت و بهترین غلظت برای انجام آزمایش بر روی نمونه‌های سرمی انتخاب گردید. در نتایج به دست آمده از این تحقیق، غلظت بهینه $MgCl_2$ برای دور اول و دوم به ترتیب ۲ و ۱/۵ میلی مولار بود و برای KCl موجود در بافر PCR به ترتیب ۱/۲۵ و ۱/۱۵ میلی مولار به دست آمد.

بحث

با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد روش RT-Nested-PCR طراحی شده دارای حساسیت و اختصاصیت بالا در مقایسه با روش‌های متداول تشخیص ویروس HIV-1 باشد(۱۳، ۱۲).

نکته مهم در مورد تشخیص عفونت ویروس HIV-1 مربوط به انتقال عفونت در دوره پنجره است(۱۴، ۱۳، ۵، ۳). چنانچه روشی بتواند این مرحله از عفونت را شناسایی کند، از اهمیت به سزایی در تشخیص و درمان بیماری برخوردار خواهد بود. روش‌هایی که بر اساس تشخیص حضور آنتی‌بادی ضد HIV-1 می‌باشند، دارای این نقیصه هستند(۹، ۸، ۵). به نظر می‌رسد روش طراحی شده نسبت به روش‌های سنجش آنتی‌بادی، فاقد این نقیصه باشد.

در حال حاضر افق‌های امیدوارکننده‌ای پیش روی محققان در ارتباط با روش‌های تشخیصی ویروس HIV-1 می‌باشد. روش جدید RT-PCR این قابلیت را دارد که به طور متوسط ۱۲ تا ۱۵ روز قبل از تشکیل آنتی‌بادی(در دوران پنجره)، ژنوم ویروس را در خون بیماران نشان دهد که از اعتبار و ارزش بالایی برخوردار است(۱۲، ۹). با توجه به هزینه‌های بسیار بالای روش Real time PCR و نیاز به تجهیزات بسیار پیشرفته، این روش محدود به مراکز تحقیقاتی است و در اغلب مراکز تشخیصی قابل انجام نمی‌باشد و لذا باید از روش‌های PCR که کم هزینه‌تر هستند به عنوان جایگزین مناسب استفاده نمود.

RT-Nested-PCR طراحی شده در این پژوهش در مقایسه با روش‌های تجاری موجود دارای حساسیت بالا و هزینه‌های بسیار کم‌تر است و سهولت انجام آن، از امتیازات این روش محسوب می‌گردد. با توجه به این که در این آزمون از روش Nested و هم چنین از ژن ویژه‌ای از ویروس "gag" که فوق‌العاده در بین انواع ژنوتیپ‌های ویروس حفاظت شده می‌باشد استفاده شده لذا حساسیت و ویژگی روش نسبت به آزمایش‌ها و روش‌های موجود بسیار افزایش و بهبود یافته است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش به نظر می‌رسد از روش فوق می‌توان در مراکز تشخیصی به عنوان روش کمکی در تشخیص استفاده نمود و علاوه بر آن می‌توان دوران پنجره را کوتاه‌تر کرد. علاوه بر موارد ذکر شده، از این روش می‌توان در تشخیص آلودگی یا عفونت نوزادان متولد شده از مادران آلوده به HIV(با توجه به عبور آنتی‌بادی اختصاصی از جفت) نیز استفاده نمود. مجموع این موارد باعث می‌شود که بیماری در مراحل ابتدایی تشخیص داده شود تا از گسترش عفونت جلوگیری کند و فرصت راه‌کارهای درمانی مناسب را فرا روی پزشکان و بیماران قرار دهد(۱۵، ۴).

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

References:

1- http://www.us.unaids.org/highband/projects/start-plan. html
2- http://www.iaari.hbi.ir/icid/
3- http://www.insite.ucsf.edu./akb/1994/index.htmlpcr.html
4- Meng Q, Wong C, Rangachari A, Tamatsukuri M, Fliss E, Cheng L, et al. Automated multiplex assay system for simultaneous detection of Hepatitis B virus, Hepatitis C virus RNA and Human Immunodeficiency Virus type 1 RNA; JCM 2001: 39(8): 2937-2945.
5- Wen J, Zhang X, Cheng Z, Liu H, Zhou Y, Zhang Z, et al. A visual DNA chip for simultaneous detection of Hepatitis B virus, Hepatitis C virus and Human Immunodeficiency virus type 1. Biosensors and Bioelectronics 2004;19: 685-692.
6- Rogers YH, Jiang-Baucomp, Hang ZJ, Bogdanof V, Anderson S, Boyce-Jacino MT. Immobolization of ligonucleotides on to a glass support via disulfide bonds: a method for preparation of DNA microarrays. Annual. Biochem 1999;266(1): 23-30.
7- Westin L, Xu X, Miller C, Wang L, Edman CF, Nernberg M. Anchored multiplex amplification on a microeletronic chip array. Nat Biotechnol 2000; 18(2): 199-204.
8- Albert J, Fenyo EM. Simple sensitive, and specific detection of Human Immunodeficiency Virus type 1 in clinical specimen by polymerase chain reaction with PCR. JCM 1990; 28(7): 1560-1564.
9- Coutllee F, Yang BZ, Bobo L, Mayur K, Yolken R, Viscidi R. Enzyme immuno assay for detection of hybrides between PCR amplified HIV-1 DNA and RNA probe: PCR-ELA. AIDS Res. Hum. Retroviruses 1990; 6(6): 775-784.
10- Schmunis GA, Zicker F, Pinheiro F, Brandling-Bennett D. Risk of transfusion-transmitted infectious diseases in central and south America. Emerg. Infect. Dis 1998; 4:(1); 5-11.
11- Abravy K, Esping C, Hoenle R, Gorzowski J, Perry R, Kroegerp, et al. Performance of a multiplex quantitative PCR assay for detection of Human Immunodeficiency Virus type 1(HIV-1) group M sub types, group O, and HIV-2. JMC 2000; 38(2): 716-723.
12- http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/nested PCR html
13- Rehmen FN, Audeh M, Abrams ES, Hammond PW, Kenney M, Boles TC. Immobolization of acrylamide-modified oligonucleotides by co-polymerization. Nucleic acid Res 1999; 27(2): 649-655.
14- Cohen OJ, Fauci AS. Pathogenesis of HIV-1 infection. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 4 th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2001: 2043-2094.
15- Gibellini D, Vitone F, Gori E, Lalac M, Re M. Quantitative detection HIV-1 viral load by SYBR green real-time RT-PCR technique in HIV-1 seropositive patients. JVC 2004; 115: 183-189.

Archive of SID

www.SID.ir

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

Development of a sensitive RT-Nested PCR for detection of HIV-1

Douzandeh J.[1](MS), Ravanshad M.[1](PhD), Amel Jamehdar S.[1](MS), Sabahi F.[1](PhD)

[1]Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) is the causative agent of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) in man and diagnosis of HIV-1 genome in suspicious specimens is of special importance. Viral transmission through blood and blood products during the window period is considered to be an important concern. In addition, the employment of rapid, sensitive and accurate techniques is highly necessary for diagnosis of HIV-1 prior to antibody production in infants born from infected mothers. In the present study, a sensitive and rapid RT-Nested PCR to detect viral genome has developed.

Materials and Methods

In this study, a sensitive RT-Nested PCR technique for detection of a conserved HIV-1 "gag gene" sequence was developed. By using a specific primer pair, the fragment was amplified in two rounds of PCR. In order to confirm positive results, the developed technique was applied to standard Iranian panel as well as to positive specimens from different infection and disease categories in which reactivity was proven by confirmatory HIV-1 tests (ELISA and western blot).

Results

Thirty five sera from different stages of the disease as well as 15 standard Iranian panels and 20 negative control sera were collected and tested by the developed technique. In positive cases, a specific band was observed on agarose gel electrophoresis, while no band could be detected for negative control sera.

Conclusions

In this study, it was demonstrated that the developed HIV-1 RT-Nested PCR has a high sensitivity and specificity for diagnosis of HIV-1 infection. It has the advantage of viral genome detection prior to seroconversion and can be easily applied to detect HIV-1 infection during the window period.

Key words: Nested PCR, RT-PCR, HIV-1, Gag gen
SJIBTO 2007; 3(4): 309-315

Received: 16 Feb 2006
Accepted: 19 Sep 2006

*Correspondence:*Ravanshad M. PhD of Virology. Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University. P.O.Box: 14115-331, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88011001; Fax: (+9821) 88013030
E-mail: *ravanshad@modares.ac.ir*

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com