خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۹ شماره ۱ بهار ۹۱ (۲۶-۱۹)

مقاله پژوهشی

به کارگیری روش NASBA Real-time با استفاده از Molecular Beacon برای تشخیص ویروس HCV

مهدی پریان[۱]، مهدی فروزنده مقدم[۲]، سمیرا محمدی یگانه[۱]

چکیده

سابقه و هدف

هپاتیت C، شایع‌ترین بیماری ویروسی قابل انتقال از طریق خون، در میان معتادان تزریقی می‌باشد. در مطالعه حاضر یک روش تکثیر اسید نوکلئیک هم‌دما(NASBA) در ترکیب با روش Real-time بر اساس پروب Molecular Beacon برای ردیابی ویروس HCV مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، طراحی جفت آغازگر و پروب برای ناحیه حفاظت شده 5'NCR ویروسHCV به طول ۲۴۱ bp با نرم‌افزارهای اختصاصی انجام شد. در مقایسه با نمونه استاندارد، حساسیت تشخیص حضور RNA ویروس تا ۵۰۰ copies/ml در ۱۰۰٪ موارد قابل آشکارسازی بود.

یافته‌ها

در مطالعه انجام شده، تنها یک نمونه مثبت سرولوژیک از نظر HCV با روش NASBA منفی شد، لذا حساسیت کلینیکی واکنش ۹۶/۶٪ بود. هم چنین توالی‌یابی در پایگاه NCBI Nucleotide Blast نشان داد اختصاصیت آنالیتیکی روش ۱۰۰٪ بوده و با ژنوم هیچ یک از ویروس ها یا توالی ژنوم انسان تداخلی نداشته است. بررسی ۱۰ نمونه منفی از نظر سرولوژی با روش جدید طراحی شده، نشان‌دهنده اختصاصیت کلینیکی ۱۰۰٪ بود.

نتیجه گیری

در نهایت، روش NASBA Real-time به علت داشتن طبیعت هم‌دما، سرعت و تکثیر اختصاصی RNA ، روش بسیار مناسبی بوده و می‌تواند کاربرد وسیعی در تشخیص سریع ویروسHCV در نمونه های پلاسما داشته باشد.

کلمات کلیدی: NASBA ، Real-Time PCR ، ویروس‌های هپاتیت C

تاریخ دریافت : ۹۰/۴/۱۴
تاریخ پذیرش : ۹۰/۷/۱۷

۱ـ دانشجوی PhD بیوتکنولوژی پزشکی ـ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران ـ تهران ـ ایران
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD بیوشیمی بالینی ـ دانشیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

مقدمه

ویروس هپاتیت C ، شایع‌ترین عفونت انتقال یابنده از طریق خون در میان معتادان تزریقی می‌باشد(۲، ۱). شیوه اصلی انتقال HCV در میان این افراد، به اشتراک گذاشتن وسایل تزریقی و استفاده از سرنگ مشترک است. در ایران برنامه‌ای برای کاهش اپیدمی‌های HBV ، HIV و HCV در میان معتادان تزریقی از طریق درمان با متادون و استفاده از سرنگ یک بار مصرف در بسیاری از زندان‌ها آغاز شده است(۷-۲). مهم‌ترین شاخص برای پیش‌بینی پیشرفت بیماری در افرادی که تحت درمان قرار نگرفته‌اند و مبتلا به هپاتیت C می‌باشند، سطح تکثیر RNA ویروسHCV است. هم چنین بهترین شاخص برای بررسی اثرات درمانی در افراد تحت درمان نیز می‌باشد. حضور RNA ویروسی در سرم نوزادان تازه متولد شده به عنوان شاهدی برای انتقال از مادر به نوزاد می‌باشد، زیرا در نتیجه حضور آنتی‌بادی‌های مادری در سرم نوزاد، اختلال و تغییر نتایج آزمایش‌های سنجش آنتی‌بادی دیده می‌شود. 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 کاملاً بهبود یافته از بیماری که دارای آنتی‌بادی IgG ضد HCV می‌باشند، با استفاده از روش‌های ایمونولوژیک وجود ندارد. از این رو استفاده از روش‌های تکثیر اسید نوکلئیک یا NAT(Nucleic Acid Testing) ، برای تشخیص HIV-1 و HCV بسیار مورد توجه قرار گرفته است(۱۱-۸). روش‌های تشخیصی مرسوم از جمله آزمایش‌هایی که براساس سنجش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی(از قبیل الایزا) می‌باشند، حساسیت کمتری نسبت به روش‌های مولکولی از قبیل PCR دارند(۱). بنابراین روش‌های غربالگری مولکولی با کاهش دوره کمون، احتمال خطر انتقال عفونت ویروسی به وسیله انتقال خون و فرآورده‌های خونی را به حداقل می‌رساند و هم چنین غربالگری اهداکنندگان خون به وسیله تکنولوژی تکثیر اسید نوکلئیک، به طور ویژه‌ای خطر انتقال عفونت‌های HCV ، HIV وHBV را در طول تغییر سرمی دوره پنجره (window period) کاهش می‌دهد(۱۳، ۱۲). غربالگری NAT اولین بار به وسیله European Plasma Manufactures در سال ۱۹۹۵ مطرح شد و در پی آن در سال ۱۹۹۹ به وسیله European Agency ، آزمایش حضور ژنوم HCV برای ارزیابی محصولات پزشکی که نیازمند پلاسما می‌باشد، انجام شد. در همین زمان در خیلی از موارد انتقال خون، آزمایش NAT برای HIV-1 ، HCV و برخی موارد دیگر مرسوم شد. بسیاری از مراکز انتقال خون از روش‌های تجاری معتبر و در موارد نادر از روش‌های خانگی اعتبار یافته استفاده می‌کنند. اغلب کیت‌های تجاری بر اساس غربالگری هر دهنده برای تشخیص یک ویروس خاص می‌باشد. با افزایش تعداد ویروس‌های آلوده کننده و قابل انتقال از طریق خون و هم چنین تعداد زیاد نمونه، روش‌های جایگزین دیگر پیشنهاد می‌شود که بر اساس اتوماسیون و تکنولوژی‌های پیچیده و با بازده بالا می‌باشند. شرکت رُوش یک آزمایش PCR چندگانه به صورت Cobas Taq screen multiplex (MPX)، برای ردیابی هم‌زمان چندین ویروس ایجاد کرده است. این روش کیفی بوده و قادر است غربالگری و ردیابی RNA گروه O و M ، HIV-1 ، HIV-2 ، HCV و HBV DNA را در یک نمونه مشخص نماید(۱۳، ۱۲).

NASBA یک روش تکثیر اسید نوکلئیک هم‌دما است که تکثیر یک الگوی RNA را انجام می‌دهد. این روش تکثیر بر اساس رونویسی است. در این روش، ابتدا به وسیله آنزیم رونویسی معکوس(RT) و آغازگر مناسب متصل به آغازگر T7 ، یک رشته DNA از روی RNA الگو، ساخته می‌شود. محصول این واکنش یک هیبرید DNA-RNA خواهد بود که نسبت به آنزیم RNase H حساس است. این آنزیم با خاصیت RNase ای خود، RNA متصل به DNA را تخریب کرده و به این ترتیب یک DNA تک رشته باقی می‌ماند که آغازگر دوم در این شرایط به آن متصل می‌شود. آنزیم RT در این شرایط با فعالیت DNA dependent DNA Polymerase خود، DNA تک رشته را به DNA دو رشته‌ای تبدیل می‌کند. این DNA دو رشته‌ای در یک سرخود دارای توالی آغازگری T7 می‌باشد، در نتیجه آنزیم T7 RNA Polymerase با شناسایی ناحیه آغازگری خود، کار رونویسی را انجام داده و تعداد زیادی RNA تولید می‌شود(حدوداً از هر رشته ۱۰۰ الی ۱۰۰۰

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

RNA ساخته می‌شود). حال هر کدام از RNA های ساخته شده می‌توانند الگو قرار بگیرند و این سیکل مجدداً تکرار شود(۱۴). این روش به خصوص برای آشکارسازی ویروس‌های RNA دار، مناسب می‌باشد زیرا دیگر نیازی به مرحله رونوشت‌برداری معکوس به صورت جداگانه ندارد. هدف از این مطالعه، توسعه یک روش NASBA Real-time برای آشکارسازی ویروسHCV بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های کلینیکی:

در یک مطالعه تجربی، در مجموع ۴۰ نمونه پلاسمای مختلف مورد استفاده قرار گرفت که شامل ۳۰ نمونه HCV مثبت بود. به منظور بررسی اختصاصیت این روش راه‌اندازی شده، ۱۰ نمونه که از نظر سرولوژی HCV منفی بودند، نیز مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج RNA:

RNA ویروس از ۱۴۰ میکرولیتر پلاسما به وسیله کیت (کیاژن) Qiamp viral RNA مطابق با دستور شرکت سازنده استخراج شد.

طراحی پروب و آغازگر:

یک جفت آغازگر و پروب MB (Molecular Beacon) برای ویروس HCV بر روی ناحیه 5´NCR طراحی شد. بدین منظور، تمام توالی‌های ثبت شده مربوط به این منطقه از ویروس با استفاده از نرم‌افزار Mega ۴ از سایت NCBI گرفته شد. با استفاده از این نرم‌افزار، در توالی‌های به دست آمده از ویروس هم ردیفی انجام شد تا بهترین منطقه حفاظت شده به دست آید.

سپس توالی‌های انتخاب شده برای بررسی آغازگر و پروب با استفاده از نرم‌افزار(Palo Alto,CA) Beacon designer7 مورد بررسی قرار گرفتند. ساختارهای ثانویه توالی‌های آغازگر و پروب با استفاده از نرم‌افزار Mfold (www.bioinfo.mfold/old/ma) بررسی شدند. آغازگرهای انتخاب شده برایHCV ، قطعه‌ای به طول ۲۴۱ bp از ناحیه 5´NCR را تکثیر می‌نمودند(جدول ۱).

جدول ۱: توالی‌های آغازگر و پروب HCV

F-HCV	5' CATGGCGTTAGTATGAGTG 3'
[A]R-HCV	5' *AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCT* ATC AGG CAG TAC CAC AAG 3'
[B]P-HCV	FAM 5' CCG ATC GCT AGC CGA GTA G(I)G TTG GG GAT CGG 3' BHQ-1

A) حروفی که به شکل ایتالیک نوشته شده توالی آغازگر T7 می‌باشد.

B) حروفی که به شکل زیر خط‌دار می‌باشد ساقه پروب molecular beacon می‌باشد.

I) مخفف باز اینوزین می‌باشد.

ساخت و تهیه پلاسمید HCV:

ساخت پلاسمید HCV با تکثیر قطعه مورد نظر ویروس به وسیله واکنش RT-PCR و اتصال آن قطعه در وکتور PTZ57R/T مطابق دستور کیت(فرمنتاز، T/A cloning kit k1213) بود. قطعه کلون شده مربوط به HCV ، قطعه‌ای به طول ۲۴۱ bp از 5´NCR بود که از PCR بر روی نمونهHCV مثبت به دست آمده بود. پلاسمید HCV با آنزیم ECORI به صورت خطی درآمده، سپس بر روی ژل ۰/۸٪ برده شد و بر اساس سایز دقیق آن قطعه بریده شد. با استفاده از کیت تخلیص از ژل کیاژن ، قطعه مورد نظر بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده از ژل تخلیص شد. سپس با استفاده از نانودراپ، OD پلاسمید خطی قرائت شد. از این پلاسمید خطی شده در واکنش *In vitro* transcription استفاده شد.

واکنش In vitro transcription و تهیه استاندارد:

پلاسمید PTZ57R/T چون دارای آغازگر T7 می‌باشد و این آغازگر قوی، قبل از قطعه کلون شده قرار دارد، پس با استفاده از آنزیم(فرمنتاز) T7 RNA Polymerase مطابق با دستور شرکت سازنده، RNA استاندارد به دست آمد(جدول۲). برای از بین بردن پلاسمیدی که در واکنش *in vitro* وجود دارد، هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم (کیاژن) DNaseI و سپس تخلیص RNA با استفاده از تریزول(کیاژن) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. غلظت

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

RNA به دست آمده با استفاده از نانودراپ قرائت شد. سپس رقت‌های لگاریتمی از ۵×۱۰^{۶} تا ۵×۱۰^{۲} به دست آمد. برای پایداری استانداردهای تهیه شده از tRNA به عنوان پایدارکننده با غلظت ۰/۱ mg/mL استفاده شد.

NASBA Real-time:

سیستم(کوربت) Real-time PCR Rotorgene 3000 برای انجام واکنش NASBA Real-time مورد استفاده قرار گرفت. حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر بود. ۱۸ میکرولیتر pre-reaction mixture شامل ۴۰ میلی‌مولار(۸/۵ :pH) Tris-Hcl ، ۵۰ میلی‌مولار KCl ، ۳ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۱ میلی‌مولار از هر dNTP ، ۲ میلی‌مولار از هر NTP ، ۲ میلی‌مولار dTT ،(vol/vol) ۱۵٪ DMSO ، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر(HCV) و ۰/۲ میکرومولار از پروب و ۵ میکرولیتر از RNA ویروس تخلیص شده بود. سپس تیوب به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ ºC به منظور بازشدن ساختمان ثانویه RNA و پس از آن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴۰ºC انکوبه شد. ۲ میکرولیتر از مخلوط آنزیمی که حاوی ۲/۶ میکروگرم از BSA ، ۴۰ IU از پلی‌مراز T7 RNA ، ۸ IU از AMV RT ، ۰/۲ IU RNase H و ۱۲/۵ IU RNasin بود، به لوله افزوده شد. سپس تیوب به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای ۴۱ ºC انکوبه شد. اطلاعات مربوط به شدت افزایش فلورسانس در هر دقیقه جمع‌آوری می‌شد.

تعیین حساسیت و اختصاصیت واکنش NASBA Real-time:

RNA تهیه شده به روش *in vitro* برای ویروس در غلظت‌های مختلف ۵۰ تا ۵×۱۰^{۴} تهیه شد و هم چنین از یک نمونه دارای عفونت HCV استفاده شد، به طوری که میانگین تعداد کپی نمونه دارای HCV ، حاصل از ۳ بار کمیت سنجی مجزا به وسیله کیت‌هایArtus HCV RG ، ۱۵۰۴۱۹۷ copies/mL بود. با استفاده از این نمونه و یک نمونه پلاسمای منفی، رقت‌های ۵×۱۰^{۴} copies/mL تا ۵۰ از ویروس HCV تهیه شد. سپس از هر رقت ۴ تکرار (۲ تکرار در دو روز مختلف) مورد استخراج RNA قرار گرفت و به وسیله روش راه‌اندازی شده بررسی شد تا پایین‌ترین رقت قابل اندازه‌گیری از نمونه‌ها توسط این دو روش تعیین گردد.

برای تعیین ویژگی آنالیتیکی روش تشخیصی، بررسی صحت اتصال اختصاصی آغازگر و پروب به الگوی مورد نظر در پایگاه NCBI nucleotide BLAST انجام شد. برای تعیین اختصاصیت کلینیکی، ۱۰ نمونه پلاسما که از نظرHCV سرولوژی منفی داشتند و هم چنین چند ویروس انتقال یابنده از طریق خون مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۲: اجزای لازم برای فرآیند رونویسی در آزمایشگاه به منظور تهیه استاندارد از جنس RNA برای سنجش ویروس HCV

غلظت	اجزا
۵ µL	۵ x transcription Buffer
۱ mM	NTP Mix
۱۲/۵ Unit	RNase inhibitor
۲۰ Unit	T7 RNA Polymerase
۱ µg	PCR Product
Up to ۵۰ µL	DEPC-Treat water
انکوباسیون در دمای ۳۷ ºC به مدت ۲ ساعت	

یافته‌ها

حساسیت واکنش NASBA Real-time:

رقت‌های ۵×۱۰^{۴} copies/mL تا۵۰ از نمونه‌هایی که با دو روش بالا تهیه شده بودند، پس از تخلیص به وسیله روش راه‌اندازی شده بررسی شد(جدول۳). RNA ویروسHCV در غلظت ۵۰۰ copies/mL در ۱۰۰٪ موارد آشکارسازی شد. به منظور بررسی حساسیت کلینیکی، ۳۰ نمونه دارای عفونت HCV مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از روش طراحی شده، ۲۹ نمونه از ۳۰ نمونه برای ویروس HCV مثبت شد. از این رو حساسیت کلینیکی روش راه‌اندازی شده معادل۹۶/۶٪ در نظر گرفته شد(جدول ۴).

اختصاصیت واکنش NASBA Real-time:

با استفاده از نرم‌افزار Mega ۴ ، برای تمام ژنوتیپ‌های HCV هم ردیفی انجام شد که توالی‌های آغازگر و پروپ،

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

همولوژی بسیار بالایی را با تمام ژنوتیپ‌های ویروس HCV نشان دادند. هم چنین با استفاده از نرم‌افزار Blast ، GeneBank این توالی‌های آغازگر و پروب با هیچ ژنوم ویروسی و ژنوم انسانی، همولوژی و تداخلی نشان ندادند. به منظور تعیین ویژگی کلینیکی روش، از ۱۰ نمونه منفی که عدم وجود HCV در آن‌ها با استفاده از روش‌های سرولوژی و مولکولی تجاری معتبر تایید شده بود و هم چنین از برخی ویروس‌ها که از طریق خون منتقل می‌شوند مانند(HSV1/2 ، EBV ، CMV ، HBV و HIV-1) استفاده شد. در هیچ یک از موارد، نتیجه مثبتی مشاهده نشد. از این‌رو ویژگی روش راه‌اندازی شده معادل ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد.

جدول ۳: تعیین حساسیت آنالیتیک

تعداد موارد مثبت HCV	HCV (Copies/mL)
۴ از ۴	۵۰۰۰۰
۴ از ۴	۵۰۰۰
۴ از ۴	۵۰۰
۱ از ۴	۵۰

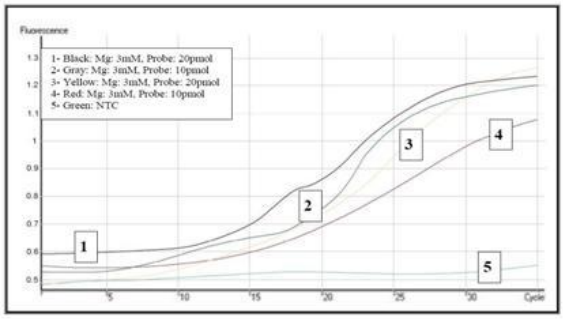
تعیین حساسیت آنالیتیک تست با استفاده از RNA رونویسی شده به دست آمد.

جدول ۴: حساسیت و اختصاصیت واکنش NASBA Real-time

	مثبت از نظر ویروس HCV	منفی از نظر ویروس HCV
تعداد کل نمونه	۳۰	۱۰
نتایج مثبت	۲۹	۰
نتایج منفی	۱	۱۰
حساسیت	٪۹۶/۶	
اختصاصیت		٪۱۰۰

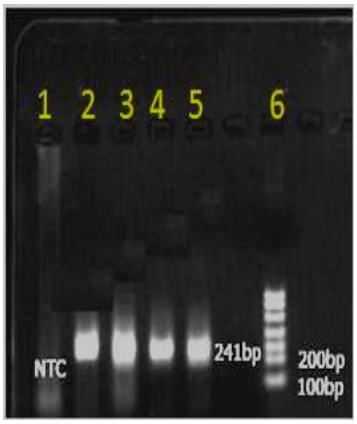
طراحی آزمایش:

واکنش NASBA Real-time برای این مطالعه به صورت کیفی، حضور RNA ویروس HCV را ردیابی می‌کند. برای آشکارسازی ویروس، پروب Molecular Beacon با یک توالی منحصر به فرد در لوپ و هم چنین رنگ فلورسانس FAM به عنوان فلورفور مورد استفاده قرار گرفت. اطلاعات مربوط به شدت افزایش فلورسانس در هر دقیقه جمع‌آوری می‌شد(شکل ۱). نتایج بعد از تکثیر بر روی ژل آگارز ۲٪ همراه با رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید(µg/mL ۰/۵) نشان داده شده است. وجود باند با طول bp ۲۴۱، بیانگر تکثیر ویروس HCV می‌باشد(شکل۲).



شکل ۱: نمودار تکثیر و شدت فلورسانس NASBA Real-time بر حسب دقیقه

۱- ۳ میلی‌مول Mg ، ۲۰ میکرومول پروب. ۲- ۳ میلی‌مول Mg ، ۱۰ پیکومول پروب. ۳- ۳ میلی‌مول Mg ، ۲۰ پیکومول پروب. ۴- ۳ میلی‌مول Mg ، ۱۰ پیکومول پروب. ۵- NTC



شکل ۲: الکتروفورز محصولات NASBA بر روی ژل آگارز ۲٪ ، ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۵-۲: محصول NASBA نمونه‌های HCV مثبت، ستون ۶: مارکر RNA اندازه ۱۰۰ bp

بحث

به کارگیری روش‌های مولکولی مانند RT-PCR برای سنجش کمی بعضی از ویروس‌ها که مرحله‌ای از چرخه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

تکثیر آن‌ها به صورت پرووِیروس می‌باشد، ممکن است خطا ایجاد کند زیرا در این روش‌ها علاوه بر RNA که میزان تکثیر ویروس را نشان می‌دهد، پرووِیروس که DNA است را نیز تکثیر می‌کند. از دیگر معایب RT- PCR، وابستگی به سیکل‌های حرارتی جهت تکثیر اسید نوکلئیک بوده و بنابراین نیاز به دستگاه ترموسیکلر دارند، لیکن در بسیاری از آزمایشگاه‌ها به علت دارا بودن هزینه بالا و نیاز به تکنسین ماهر، PCR انجام نمی‌شود. روش‌های تکثیر و آشکارسازی RNA مانند NASBA ، مقرون به صرفه بوده، در زمان کم انجام می‌شود و مشکل چندین مرحله‌ای بودن و امکان آلودگی روش‌هایی مانند RT-PCR را حل می‌کنند(۱۵، ۱۴). روش NASBA Real-time با استفاده از پروب‌های MB بسیار آسان و راحت انجام می‌شوند. MB ها، اولیگونوکلئوتیدهای تک‌رشته‌ای هستند که دارای ساختار ساقه و لوپ (Stem-loop) می‌باشند. توالی پروب دارای قسمتی به نام لوپ می‌باشد که مکمل توالی هدف است و ساقه یک توالی کوتاه در دو انتهای پروب است که با آن مکمل می‌باشد. یک فلوروفور در انتهای'5 پروب و یک خاموشگر در انتهای '3 ، بخش‌های دیگر این پروب هستند. MB موجود در واکنش، تشکیل یک ساختار مشابه سنجاق سر(hair pin) می‌دهد. توالی ساقه، فلوروفور را در نزدیک خاموشگر نگاه داشته و موجب خاموش شدن فلوروفور به وسیله FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) می‌شود. وقتی MB به توالی هدف خود اتصال می‌یابد، تغییرات فضایی پیدا کرده که موجب جدایی فلوروفور و خاموشگر می‌شود و در نتیجه آن، فلوروفور از خود نور ساطع می‌کند. پروب‌هایی که به شکل سنجاق سر می‌باشند، دارای اختصاصیت بسیار بالاتری نسبت به پروب‌های خطی هستند که علت آن، حضور ساقه در این پروب‌ها می‌باشد. قدرت تکثیر NASBA قابل مقایسه و یا در برخی موارد بهتر از PCR است. موفقیت روش NASBA در آشکارسازی mRNA های مختلف و RNA چندین ویروس و باکتری به اثبات رسیده است(۱۷، ۱۶).

گزارش‌های محدودی از به کارگیری این روش برای تشخیص هم زمان ارگانیسم‌ها به صورت چندگانه، موجود می‌باشد. در مطالعه انجام شده توسط جین و همکارانش از روش NASBA چندگانه برای تشخیص ویروس‌های روده‌ای عامل مسمومیت غذایی استفاده شد(۱۸). در مطالعه دیگری لو و همکاران از این روش برای ردیابی ویروس‌های عامل عفونت دستگاه تنفسی استفاده کردند(۱۴). هم چنین در تحقیق دیگری که توسط لوئنز و همکارانش انجام شده، از روش Real-time NASBA چندگانه برای ردیابی مایکوپلاسما پنومونیه، کلامیدیا پنومونیه و گونه‌های لژیونلا در نمونه‌های تنفسی استفاده شده است(۱۵). روش‌های تشخیصی بر اساس متدولوژی NASBA برای چندین ویروس دیگراز جمله HIV-1 ، سیتومگالوویروس، انتروویروس و پاراآنفولانزا گزارش شده است. در زمینه استفاده از این روش برای تکثیر ویروس HCV ، هنوز گزارشی وجود ندارد.

نتیجه‌گیری

ترکیب دو سیستم Real-time و NASBA ، یک ابزار قابل انعطاف‌پذیر را در تشخیص عفونت HCV ایجاد می‌کند که به علت سهولت انجام و عدم نیاز به تجهیزات گران‌قیمت، دارای حساسیت و اختصاصیت بالا می‌باشد. به علاوه این سنجش روشی مفید و سریع برای تشخیص عفونت‌های مختلف در نمونه‌های پلاسمای بیماران می‌باشد و آن را می‌توان برای ارزیابی عفونت‌های ویروسی در انتقال خون و نیز آزمایشگاه‌های تشخیصی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت‌های مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام پذیرفته است. هم چنین از آزمایشگاه بیمارستان دی و خانم دکتر حوری رضوان و آقای دکتر شهرام سمیعی به خاطر همکاری و تهیه نمونه کمال تشکر و قدردانی را داریم.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

References :

1- 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; 33(2): 240-7.
2- Adjei AA, Armah HB, Gbagbo F, Ampofo WK, Quaye IK, Hesse IF, *et al*. Prevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus and syphilis among prison inmates and officers at Nsawam and Accra, Ghana. J Med Microbiol 2006; 55(Pt 5): 593-7.
3- Eshrati B, Asl RT, Dell CA, Afshar P, Millson PM, Kamali M, *et al*. Preventing HIV transmission among Iranian prisoners: initial support for providing education on the benefits of harm reduction practices. Harm Reduct J 2008; 5: 21.
4- Falster K, Kaldor JM, Maher L. Hepatitis C virus acquisition among injecting drug users: a cohort analysis of a national repeated cross-sectional survey of needle and syringe program attendees in Australia, 1995-2004. J Urban Health 2009; 86(1): 106-18.
5- Lines R, Jurgens R, Stover H, Kaliakbarova G, Laticevschi D, Nelles J, *et al*. Dublin Declaration on HIV/AIDS in Prisons in Europe and Central Asia. Prison health is public health. Dublin, Ireland, February 23, 2004. Can HIV AIDS Policy Law Rev 2004; 9(1): 41-5.
6- Shafer KP, Hahn JA, Lum PJ, Ochoa K, Graves A, Moss A. Prevalence and correlates of HIV infection among young injection drug users in San Francisco. J Acquir Immune Defic Syndr 2002; 31(4): 422-31.
7- Taylor A, Goldberg D, Hutchinson S, Cameron S, Fox R. High risk injecting behaviour among injectors from Glasgow: cross sectional community wide surveys 1990-1999. J Epidemiol Community Health 2001; 55(10): 766-7.
8- Rockstroh JK, Spengler U. HIV and hepatitis C virus co-infection. Lancet Infect Dis 2004; 4(7): 437-44.
9- Cassol S, Salas T, Gill MJ, Montpetit M, Rudnik J, Sy CT, *et al*. Stability of dried blood spot specimens for detection of human immunodeficiency virus DNA by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30(12): 3039-42.
10- England K, Thorne C, Newell ML. Vertically acquired paediatric coinfection with HIV and hepatitis C virus. Lancet Infect Dis 2006; 6(2): 83-90.
11- Li CC, Beck IA, Seidel KD, Frenkel LM. Persistence of human immunodeficiency virus type 1 subtype B DNA in dried-blood samples on FTA filter paper. J Clin Microbiol 2004; 42(8): 3847-9.
12- 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.
13- 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.
14- 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.
15- 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.
16- Park C, Kwon EY, Shin NY, Choi SM, Kim SH, Park SH, *et al*. Evaluation of nucleic acid sequence based amplification using fluorescence resonance energy transfer (FRET-NASBA) in quantitative detection of Aspergillus 18S rRNA. Med Mycol 2011; 49(1): 73-9.
17- Zhao Y, Park S, Warn P, Shrief R, Harrison E, Perlin DS. Detection of Aspergillus fumigatus in a rat model of invasive pulmonary aspergillosis by real-time nucleic acid sequence-based amplification . J Clin Microbiol 2010; 48(4): 1378-83.
18- Lamhoujeb S, Fliss I, Ngazoa SE, Jean J. Evaluation of the persistence of infectious human noroviruses on food surfaces by using real-time nucleic acid sequence-based amplification. Appl Environ Microbiol 2008; 74(11): 3349-55.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2012; 9(1):19-26

Original Article

Application of a NASBA Real-time assay using molecular beacon for detection of HCV virus

Paryan M.[1], Fourozandeh moghadam M.[2], Mohammadi-Yeganeh S.[1]

[1]Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tahran, Iran
[2]Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Hepatitis C is the most common viral disease among intravenous drug users transmitted mainly through blood transfusion. In this study, we used an isothermal nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) in combination with a molecular beacon probe-based real-time assay for detection of HCV.

Materials and Methods

In this experimental study, the conserved 5'NCR region with the length of 241 bp was used for probe and primers design. In comparison with the standard, RNA virus detection sensitivity of the method was 100 percent for up to 500 copies/ ml.

Results

No serological positive sample was detected with this assay; the clinical sensitivity of reaction was 96.6%. NCBI Nucleotide Blast showed 100% analytical specificity and no cross was observed with viruses or human genome. Investigation of 10 serological negative samples showed the clinical specificity to be 100%.

Conclusions

In summary, due to its isothermal nature, its speed, and its use for RNA specific amplification, NASBA real-time assay will have broad applications for the rapid detection of HCV in plasma samples.

Key words: NASBA, Real-Time PCR, Hepatitis C Viruses

Received: 5 Jul 2011
Accepted: 9 Oct 2011

Correspondence: Forouzandeh M. PhD of Clinical Biochemistry. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University.
P.O.Box: 14115-331, Tehran, Iran. Tel: (+9821)82883861; Fax: (+9821) 82883861
E-mail: *foroz@modares.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]