

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

زهرا خانلری<sup>۱</sup>، مهرداد روانشاد<sup>۲\*</sup>، منوچهر رسولی<sup>۳</sup>، مازیار ضیائیانی<sup>۴</sup>

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- استادیار، گروه ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
- ۴- استادیار، گروه ویروس شناسی، مرکز تحقیقات میکروب شناسی 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 پروب‌های اختصاصی دو ویروس و بهینه‌سازی روش واکنش زنجیره‌ای چندگانه، مرحله نشاندار کردن محصول با استفاده از نوکلئوتیدهای متصل به دیگ‌گوسی‌ژنین انجام شد. محصول به دست آمده ابتدا به دو قسمت مجزا تقسیم و پس از واسرشت شدن در شرایط قلیایی با پروب اختصاصی مجاور شد. پروب‌های حاوی بیوتین انتهایی پس از اضافه شدن به پلیت پوشش یافته با استرپت آویدین متصل شدند. پس از شستشو، آنتی‌بادی ضد دیگ‌گوسی‌ژنین متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز به چاهک‌ها اضافه شد. در مرحله نهایی شستشو انجام و سوپسترا اضافه شد. با استفاده از روش رنگ‌سنجی 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. هیچ‌گونه 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 پلیمرز 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 ویروس شناسی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵.  
Email: ravanshad@modares.ac.ir

قبیل عفونت‌های فرصت‌طلب یا نئوپلاسم (Neoplasm) در بیمار ایجاد می‌شود [۶]. عفونت همزمان HIV بیماری‌های کبدی وابسته به HCV را تسریع می‌کند که شامل یک تغییر سریع‌تر به سمت سیروز و هپاتوکارسینوما در این بیماران است [۱] همچنین پیشرفت بالینی HIV و بروز علائم نشانگان نقص ایمنی اکتسابی انسانی (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) در افراد دارای عفونت همزمان سریع‌تر از افرادی است که تنها با HIV آلوده هستند [۷]. روش‌های چندگانه (Multiplex) علاوه بر افزایش دقت تشخیص نمونه‌های عفونی و کاهش نتایج منفی کاذب؛ کاهش قابل توجهی از نظر زمان و هزینه خواهند داشت، همچنین این روش دارای قابلیت کمی شدن نیز هست که در کنترل پایش درمان حائز اهمیت است. هدف از این تحقیق طراحی روشی حساس‌تر در مرحله شناسایی نسبت به روش‌های معمول و همچنین تشخیص همزمان عفونت‌های HIV-1 و HCV به‌طور همزمان بوده است.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- طراحی آغازگر (Primer) و پروب (Probe)

نتایج حاصل از هم‌ردیفی توالی‌های ایزوله‌های مختلف دو ویروس HCV و HIV توسط نرم‌افزار Mega4 که در مرکز بین‌المللی 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 ژن gag و برای ویروس HCV ناحیه غیر کد کننده در انتهای 5' (Non-coding region: 5'-NCR) است. برای طراحی پروب‌ها از توالی‌های داخلی محصول PCR استفاده شد. این پروب‌ها در انتهای 5' خود دارای یک مولکول بیوتین هستند. برای طراحی آغازگرها و پروب‌ها از نرم‌افزارهای Gene Runner، Oligo6، Mega4، Oligo analyzer3 و NCBI Blast استفاده شد. بهترین آغازگرها از لحاظ 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 (Hepatitis C Virus: 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 این روش‌ها ژنوم این ویروس‌ها مورد شناسایی قرار می‌گیرد. غربالگری‌های ژنومی HCV و HIV-1 یک مرحله اصلی برای شناسایی خون‌های جمع‌آوری شده در دوران پنجره و قبل از تغییرات سرمی، همچنین موارد نادر عفونت‌های خاموش و احتمال آلودگی به واریانت‌های مختلف ویروسی است [۱]. نتایج چندین 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 تقریباً ۲۵ درصد بیماران آلوده به HIV و ۱۰ درصد از بیماران آلوده به HCV دارای عفونت همزمان هستند [۳]. تخمین زده می‌شود که ۴ تا ۵ میلیون نفر در سراسر جهان مبتلا به این عفونت همزمان هستند [۴]. عفونت HCV منجر به هپاتیت مزمن می‌شود و تعداد زیادی از مبتلایان در خطر پیشرفت به سمت هپاتیت مزمن فعال و سیروز (۱۰-۲۰ درصد) هستند، در بعضی کشورها مانند ژاپن عفونت HCV اغلب منجر به کارسینوم کبدی می‌شود. در حدود ۲۵۰۰۰ نفر سالیانه در آمریکا به‌علت بیماری مزمن کبدی و سیروز فوت می‌کنند که HCV مسئول بخش عمده‌ای از این موارد است (حدود ۴۰ درصد) [۵]. سیر عفونت HIV درمان نشده در حدود یک دهه طول می‌کشد. مراحل بیماری شامل عفونت اولیه، انتشار ویروس به اعضای لنفاوی، عفونت مخفی، ازدیاد بروز HIV، بیماری بالینی و مرگ است [۶]. واکنش ایمنی بر علیه HIV یک هفته تا سه ماه پس از عفونت رخ می‌دهد که حضور ویروس در پلاسما را کاهش می‌دهد و تعداد سلول‌های CD4<sup>+</sup> افزایش می‌یابد با این حال پاسخ ایمنی قادر نیست به‌طور کامل عفونت را پاک‌سازی کند. در نهایت علائم عمومی و بیماری واضح بالینی از

HCV ۲۷۰ نوکلئوتید است.

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

ACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCT	آغازگر جلویی HCV (Forward)
GCAAGCACCTATCAGGCAGTACC	آغازگر برگشتی HCV (Reverse)
CAGAAGGAGCCACCCACAAGAT	آغازگر جلویی HIV
TTCCTGCTATGTCACTTCCCCTGG	آغازگر برگشتی HIV

## ۲-۲- جمع‌آوری نمونه‌ها، استخراج RNA

### ویروسی و نسخه‌برداری معکوس

نمونه‌های مورد استفاده به صورت پلازما 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 قبلاً توسط روش Real-time PCR و Sequencing تأیید شده بودند (جدول ۳).

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

نتیجه	شماره ساخت (Lot no)	غلظت (IU/μl)	
مثبت	QS1 1200 04/03	$5 \times 10^3$	QS1
مثبت	QS2 1200 04/03	$5 \times 10^2$	QS2
مثبت	QS3 1200 04/03	$5 \times 10^1$	QS3
منفی	QS4 1200 04/03	$5 \times 10^0$	QS4

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

تعداد نمونه	وضعیت آلودگی	مثبت	منفی
گروه ۱	مثبت از نظر HCV	۹ (۱۰۰ درصد)	۰
گروه ۲	مثبت از نظر HIV-1	۸ (۱۰۰ درصد)	۰
گروه ۳	دارای عفونت همزمان	۸ (۱۰۰ درصد)	۰
گروه ۴	منفی تأیید شده	۰ (۰ درصد)	۱۰ (۱۰۰ درصد)

پس از جداسازی پلازما، به قسمت‌های مختلف تقسیم و در دمای ۸۶- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

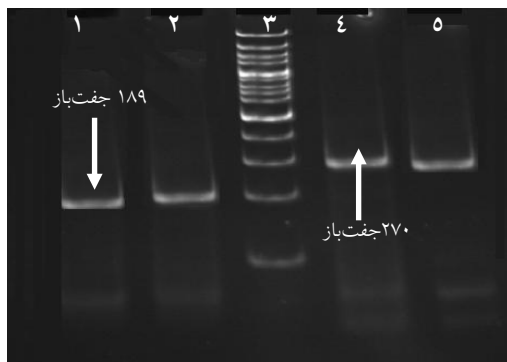
۱۴۰ میکرولیتر از هر نمونه برای استخراج RNA ویروسی توسط کیت تجاری (Qiagen) و طبق روش ارائه شده توسط شرکت سازنده استفاده شد، RNA استخراج شده برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله سنتز cDNA ابتدا ۵ میکرولیتر (۰/۵ میکروگرم-۰/۱ پیکوگرم) RNA به همراه ۲ میکرولیتر (۲۰ پیکومول) آغازگر اختصاصی آنتی‌سنس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

### ۲-۳- PCR

این واکنش به صورت تک مرحله‌ای انجام شد که در حجم ۵۰ میکرولیتری واکنش بافر آنزیم Taq با غلظت ۱X، ۰/۵ میلی‌مولار نمک کلرید منیزیم (MgCl<sub>2</sub>)، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۰/۲ میکرومولار از هر آغازگر، ۲/۵ واحد آنزیم پلیمرز 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 سانتی‌گراد قرار گرفت. محصول این مرحله روی ژل آگارز با غلظت ۲ درصد الکتروفورز و با نور ماوراء بنفش (Ultra violet: UV) مشاهده شد (شکل‌های ۱-۳).

## ۲-۴- PCR با dNTPs نشاندار شده با دیگوکسی ژنین (Digoxigenin)

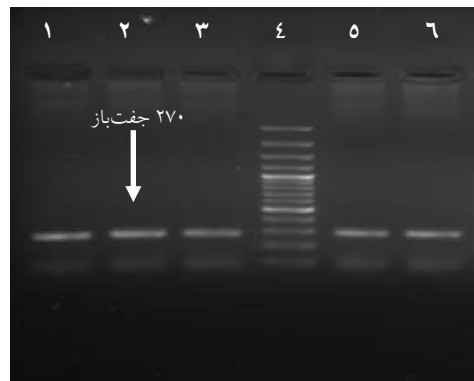
پس از بهینه‌سازی واکنش چندگانه برای نشاندار کردن محصول PCR از مخلوط حاوی دیگوکسی ژنین استفاده شد. محصول به دست آمده در این مرحله در ساختمان خود دارای دیگوکسی ژنین است. به دلیل وزن دیگوکسی ژنین این محصول نسبت به محصولی که فقط حاوی dNTP معمول است سنگین تر است در نتیجه برای تأیید نشاندار شدن محصول واکنش هر دو محصول روی ژل پلی‌اکریل‌آمید الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) با اشعه UV مشاهده شد (شکل ۴).



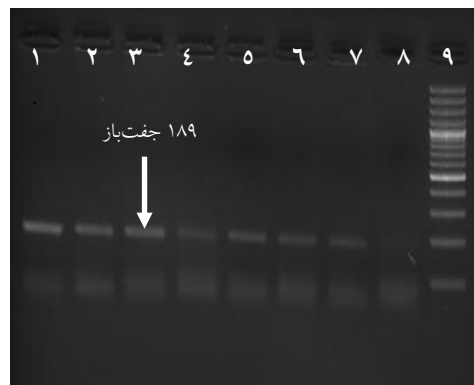
شکل ۴ نشاندار کردن محصول واکنش PCR. نمونه ۱: محصول تکثیر یافته ژنوم HIV نشاندار نشده؛ نمونه ۲: محصول تکثیر یافته ژنوم HIV نشاندار شده؛ نمونه ۳: نشانگر وزنی DNA (۱۰۰ جفت‌بازی)؛ نمونه ۴: محصول تکثیر یافته ژنوم HCV نشاندار شده؛ نمونه ۵: محصول تکثیر یافته ژنوم HCV نشاندار نشده.

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

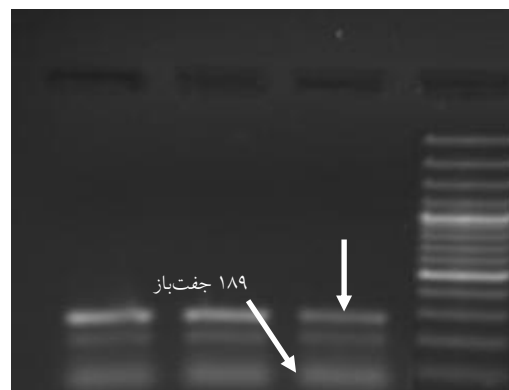
پس از اطمینان از تولید محصول حاوی دیگوکسی ژنین با استفاده از کیت (Roche PCR ELISA (DIG Detection) و طبق برنامه ارائه شده توسط شرکت سازنده محصول نهایی شناسایی شد. به‌طور خلاصه، محصول دو رشته‌ای PCR واسرشت شد، این مرحله با کمک هیدروکسید سدیم



شکل ۱ محصول نهایی نمونه HCV مثبت. نمونه‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ مثبت؛ نمونه ۶: نشانگر وزنی DNA (۱۰۰ جفت‌بازی).



شکل ۲ محصول نهایی نمونه HIV مثبت. نمونه‌های ۱ تا ۸ مثبت؛ نمونه ۹: نشانگر وزنی DNA (۱۰۰ جفت‌بازی).



شکل ۳ محصول نهایی نمونه HIV و HCV مثبت. نمونه‌های ۱ تا ۳ مثبت؛ نمونه ۴: نشانگر وزنی DNA (۱۰۰ جفت‌بازی).

برای بررسی حساسیت و اختصاصیت این روش ۳۵ نمونه آزمایش شدند، این نمونه‌ها متشکل 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)، ۳ انحراف معیار به میانگین جذب نوری (Optical Density: OD) نمونه‌های منفی اضافه شد. با استفاده از فرمول ۱ میانگین OD کنترل منفی‌ها محاسبه شد که عددی برابر با ۰/۱۵۷ بود. و پس از آن با کمک فرمول ۲ انحراف معیار محاسبه شد که برابر با ۰/۱۲۷ بود. سه برابر این عدد به میانگین اضافه شد و عدد سطح حداقل به دست آمد که برابر با ۰/۲ شد. بنابراین نمونه‌های دارای جذب بالاتر از ۰/۲ مثبت و نمونه‌های دارای جذب پایین‌تر از این عدد منفی گزارش شدند.

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

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

همچنین با بررسی نمونه‌های پانل استاندارد که دارای تعداد کپی ژنوم مشخص بودند نشان داده شد که روش طراحی شده توانایی شناسایی حداقل ۵۰ کپی از ژنوم ویروسی را در هر میلی‌لیتر خون داراست.

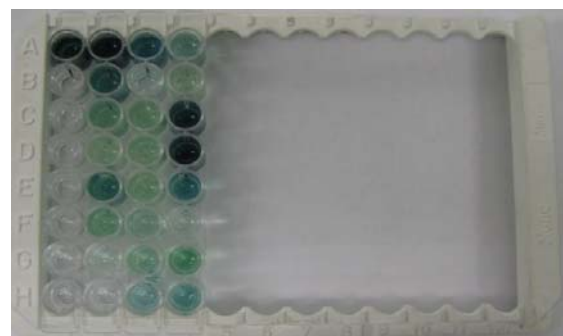
#### ۴- بحث

تخمین زده می‌شود که ۴ تا ۵ 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 منتقله 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 ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شد، سپس محصول تک رشته‌ای با پروب اختصاصی دورگه (Hybrid) شد و دورگه حاصل به چاهک‌های پوشش یافته با استرپتین آویدین (Streptavidin) به مدت ۳ ساعت در دمای ۵۵ درجه و دور ۲۴۰ در دقیقه اضافه شد که توانایی اتصال به بیوتین قرار گرفته در سر ۵ پروب را دارد. شناسایی دیگوسگی ژنین قرار گرفته در زنجیره به وسیله آنتی‌بادی ضد دیگوسگی ژنین که با آنزیم آلکالن فسفاتاز (Alkaline phosphatase) متصل است، انجام شد، زمان لازم برای این اتصال ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد است. اضافه کردن سوبسترای آنزیم آلکالن فسفاتاز و ایجاد محصول رنگی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. رنگ حاصل در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (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 باندها ۱۸۹ نوکلئوتیدی مربوط به ویروس HIV-1 و باندها ۲۷۰ نوکلئوتیدی مربوط به ویروس HCV روی ژل آگارز انجام شد (شکل‌های ۱-۳). سپس محصول واکنش نشاندار و مجدداً 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.



- [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](http://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. 22<sup>nd</sup> 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. 22<sup>nd</sup> 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. Dose 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.

