Archive of SID

تکنیک ایزوترمال NASBA: ابزاری نوین به منظور تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

امیر قائمی
استادیار ، مرکز تحقیقات عفونی و گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

پوریا گیل
گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده فناوریهای نوین، دانشگاه تربیت مدرس

عبدالوهاب مرادی
دانشیار ، مرکز تحقیقات عفونی و گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

علیجان تبرایی
استادیار ، مرکز تحقیقات عفونی و گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

نویسنده مسئول: امیر قائمی
تلفن : 0912-254-9916
پست الکترونیک:
ghaem_amir@yahoo.com

آدرس: گرگان، شصت کلا دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پزشکی

وصول مقاله:89/3/11
اصلاح نهایی:89/10/27
پذیرش مقاله:89/11/20

چکیده

زمینه و هدف *تشخیص صحیح، سریع و مقرون به صرفه بیماریهای واگیر و غیر واگیر، همواره از ضرورتهای درمان موفق بوده است و برای نیل به آن مسیر پرفراز و نشیبی را پیموده است. امروزه با پیشرفت علومی چون بیولوژی مولکولی، ژنتیک و بیوشیمی که با رویکرد بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک خودنمایی می کنند، شاخه جدیدی از طب با عنوان پزشکی مولکولی(Molecular Medicine) در حال شکل گیری است که در سه حیطه تشخیص، پیشگیری و درمان توانسته است سئوالات بیشماری را پاسخگو باشد و به زودی با شناخت پیچیدگیهای بیشتری از بیماریها، راهکارهای مناسبتر و موثرتری را جهت رشد و ارتقای سطح سلامت جامعه بشری کشف خواهد کرد. از اینرو آشنایی با وقایع جدید و به روزسازی روشهای رایج، چه در عرصه تشخیص و چه در عرصه پیشگیری و درمان بیماریها، در جامعه ما نیز ضرورت می یابد .*

در این نوشتار سعی می کنیم تا با معرفی فناوری NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) که توانایی بالایی جهت شناسایی جایگاههای اختصاصی ژنی میکروارگانیسمها و مارکرهای ژنتیکی منحصر به فرد، در سطح ژنوم موجودات مختلف دارد، به نکات و ملاحظات مهمی بپردازیم که برای آسان سازی تشخیص بیماریهای عفونی- همچون بیماری سل -لازم است، و نیز مروری ساده و موجز بر روشهای آزمایشگاهی تشخیص سل خواهیم کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری سل، همواره یکی از عوامل مهم مرگ و میر در جهان بوده است .امروزه شیوع این بیماری در کشورهای در حال توسعه و آمار بالای مرگ و میر ناشی از آن، بسیاری از محققان را برآن داشته تا در جهت شناسایی روشهای مناسبتر برای تشخیص و درمان این بیماری گام بردارند. با شیوع روز افزون بیماریهایی چون سندرم نقص سیستم ایمنی(AIDS) به زودی سل ، مهمترین عامل کشنده انسان در عرصه بیماریهای واگیر شناخته خواهد شد. در این میان، آمار سازمان بهداشت جهانی از مسلولین شناسایی شده در ایران و مرگ و میر ناشی از سل بسیار تکان دهنده است(1و2).

ویژگیهای ساختاری و فیزیولوژیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی آن و در نتیجه، تشخیص بیماری را دشوار ساخته است این باکتری رشد بسیار کندی دارد و ظهور کلونیها در محیط کشت جامد حدود شش الی هشت هفته زمان می برد و بالطبع این مسأله برای بیمار بسیار خطرناک است؛ چرا که تشخیص بیماری سل در مراحل اولیهٔ بیماری اهمیت دارد و پیشرفت بیماری، درمان را با مشکل روبرو می سازد و خطر انتقال به دیگران را افزایش می دهد (2و3). روشهایی که هم اکنون در ایران برای تشخیص بیماری سل متداولند، از دقت و حساسیت چندانی برخوردار نیستند و در عین حال بسیار وقت گیرند .تشخیص اولیهٔ بیماری، مبتنی بر مشاهدهٔ میکروسکوپی باکتریهای مقاوم به اسید در نمونهٔ بیمار با رنگ آمیزی زیل نلسون می باشد که از دقت و حساسیت بسیار پایینی برخوردار است؛ زیرا هنگامی که تعداد باکتری در نمونه ناچیز باشد، این احتمال که در زیر میکروسکوپ دیده نشود، بسیار بالا است (4). از طرف دیگر این روش قادر نیست، حیات میکروارگانیسم را تأیید کند؛ در صورتی که این مسأله در بررسی سیر درمانی بیماران بسیار حائز اهمیت است و به این خاطر، در صورت مثبت شدن نتایج میکروسکوپی، پزشک درخواست کشت باکتری می دهد که بسیار وقتگیر است و تنها در صورتی می توان به موفق بودن درمان، امیدوار بود که نتایج کشت منفی شود.

با توجه به مشکلاتی که عنوان شد، نیاز به روشی سریع، حساس و در عین حال بسیار اختصاصی برای تشخیص بیماری سل و بررسی روند درمان، به شدت احساس می شود.

روشهای تکثیر کننده اسیدهای نوکلئیک:

امروزه روشهای مولکولی، جایگاه ویژه ای در تشخیص بیماریهای مختلف از جمله بیماریهای عفونی یافته اند.
روشهای تکثیر کننده اسیدهای نوکلئیک از فراگیرترین ابزار در فرایندهای تحقیقاتی، پزشکی، پزشکی قانونی و کشاورزی می باشد. یکی از شناخته شده ترین این روشها واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) می باشد که اول بار توسط مولیس در سال 1986 میلادی به جهانیان معرفی گشت. هر واکنش PCR با هیبرید شدن اولیگومرهای آغازگر (Primers) به دو انتهای ´5 و ´3 دو زنجیره واسرشته DNA الگو آغاز می شود و بواسطه عملکرد آنزیم DNA پلیمراز در حضور نوکلئوتیدهای دزوکسی تری فسفات (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) به طویل سازی و ساخت DNA دو رشته ای جدید و اختصاصی می انجامد. با تکرار سیکلهای دمایی بالارونده (Thermal Denaturation) و پائین رونده (Annealing and Extension Temperatures) شرایط مناسب برای تکرار فرایند تولیدی به تکثیر میلیونها قطعه از روی DNA الگوی اولیه منجر می شود (5).

اگرچه PCR به صورت گسترده توسط محققین استفاده می شود، نیازمند به استفاده از دستگاهی است که به شکل گیری سیکلهای دمایی مناسب برای واسرشتگی زنجیره های DNA منجر می شود.

پیشرفتهایی که در سالیان اخیر در مورد زیست شناسی مولکولی سنتز DNA در محیطهای زنده صورت گرفته نشان دهنده این واقعیت است که می توان DNA را در دمای واحدی بدون نیاز به دستگاههای ترموسیکلر تکثیر کرد و بدین ترتیب روشهای متعدد تکثیری همدما (Isothermal) برای تکثیر الگوهای اسید نوکلئیکی در 10 سال گذشته گسترش یافته اند. آنزیم DNA پلیمراز با کمک آنزیمهای

www.SID.ir

Archive of SID

متعددی عمل تکثیر DNA را انجام می دهد بنابراین شناخت این آنزیمها امکان توسعه این روشهای همدما را بوسیله شبیه سازی این مکانیسمها فراهم می آورد(6).

یکی از این روشها تکثیر جایگزینی زنجیره ای (Strand Displacement Amplification) – با حروف اختصاری SDA – است؛ روش SDA مشتمل بر توانایی آنزیمهای اندونوکلئاز تحدیدی (Restriction-Endonuclease) در ایجاد شکاف (Nick) در زنجیره تغییرنیافته DNA الگو است و عملکرد طویل سازی یک آنزیم پلیمراز فاقد ویژگی 3´ اگزونوکلئازی در محل شکاف اولیه به طویل شدن و ساخت زنجیره جدید منتهی می شود. این واکنش با به کار بردن اولیگومرهای آغازگر ضربه زننده (Bumper Primers) تقویت می شود. از این فناوری به صورت اساسی برای تشخیص بیماریهای عفونی چون کلامیدیازیس و سوزاک استفاده می شود. یکی از مزیتهای مهم روش SDA عدم نیاز آن به استفاده از دستگاههای گرانقیمت ترموسایکلر است – اگرچه این روش در تکثیر توالیهای طویل ناکارآمد است(7).

مقاله ای که داون و همکارانش در سال 1996 در مجله کلینیکال میکروبیولوژی به چاپ رساندند، نخستین مطالعه در حجم وسیع به منظور شناسایی باکتری مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در نمونه های خلط بود که حساسیت مناسب این تکنیک را برای شناسایی توبرکولوزیس نشان داد(8).

سیستم تکثیر کننده همدمای دیگر با عنوان تکثیر وابسته به رونویسی (Transcription Mediated Amplification) – با حروف اختصاری TMA – می باشد که در این روش عملکرد آنزیم RNA پلیمراز به ساخته شدن زنجیره های RNA بواسطه ناحیه پروموتری پرایمرهای مصرفی در واکنش می انجامد و با مداخله آنزیم رونویسی معکوس (Reverse Transcriptase)، DNA از RNAهای ساخته شده بوجود می آید و بواسطه عملکرد آنزیم RNase H به واسرشتگی هیبرید DNA-RNA و دورشته ای شدن DNA ساخته شده و تکرار فرایند رونویسی آنزیم RNA پلیمراز و تولید میلیونها رشته RNA اختصاصی سنس و آنتی سنس به صورت تک رشته ای و دورشته ای منجر می شود. این روش بدلیل عدم استفاده از دستگاه ترموسایکلر و انجام کل فرآیند در شرایط همدما به واکنش خودپشتیبانی شونده (Self-Sustained Amplification) نیز شناخته می شود و فقط به ساخت زنجیره هایی از جنس RNA محدود می شود(9).

روش ایزوترمال تکثیری دیگر، تکثیر دایره چرخان (Rolling Circle Amplification) - با حروف اختصاری RCA – می باشد که کپی های متعددی از یک توالی را برای استفاده در پروسه تکثیری DNA در شرایط In vitro بر اساس الگوی In vivo تکثیر دایره چرخان تولید می کند. در این واکنش یک آنزیم DNA پلیمراز، پرایمری را بر روی الگوی دوار طویل می سازد و بصورت تکرار شونده به توالیهای مکمل نمونه الگو منتهی می سازد(10).

در مطالعه ای که در سال 2009 توسط کای و همکارانش به چاپ رسید از روش RCA بمنظور شناسایی میکوباکتریوم توبرکولوزیس بهره گرفته شد. نتایج این مطالعه روش RCA را بعنوان یک روش سریع، ارزان و سهل الوصول به منظور غربالگری مایکوباکتریومهای مقاوم بویژه در کشورهایی با شیوع بالا معرفی نمود(11). روشهای تکثیری دیگر واکنش زنجیره ای لیگاز (Ligase Chain Reaction) – با حروف اختصاری LCR – می باشد که فناوری تکثیر مبتنی بر عنصر کاوشگر (Probe) است و فناوری DNA منشعب (Branched DNA) – با حروف اختصاری bDNA – است که در حقیقت فناوری تقویت کننده سیگنال می باشد(9). در سال 2003 زیسکوولاک و همکاران در مقاله ای در مجله متدهای ویروس شناسی از این روش بعنوان روشی سریع برای شناسایی ویروس انفلوانزا بهره بردند(12).

هر کدام از روشهای تکثیری یاد شده از توانائیهای خاص خود برخوردارند؛ به گونه ای که به عنوان نمونه PCR روش تکثیری می باشد که توانسته است بعنوان مهمترین تکنیک تشخیص مولکولی و فعالیتهای تحقیقاتی مبتنی بر DNA همچنان در جهان بی رقیب باشد. ولی این فناوری در آنالیز

www.SID.ir

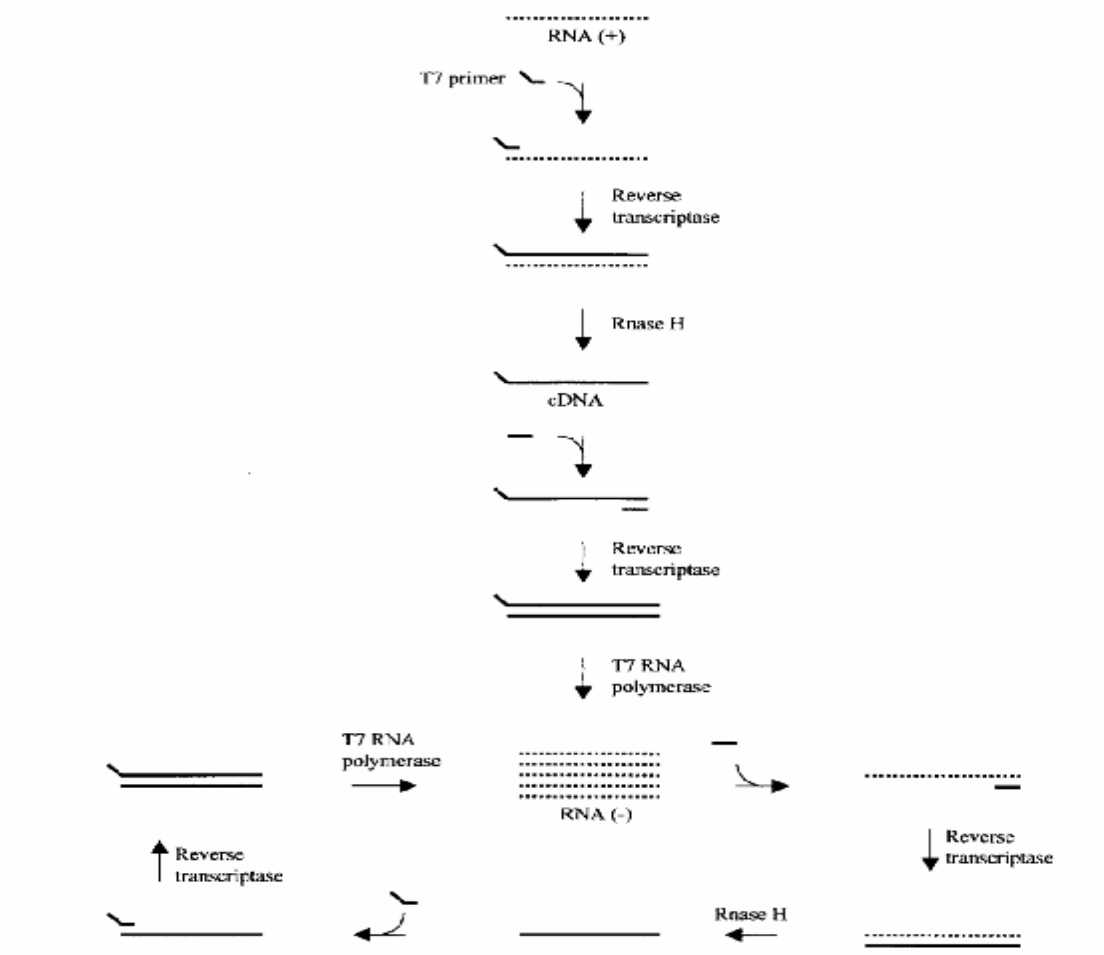
Archive of SID

الگوهای ژنی از جنس RNA و ارزیابی میزان بیان رو نوشتهای ژنی با چالشهای جدی روبرو است و کارآمدی مطلوب را ندارد. از سوی دیگر بدلیل گران بودن دستگاههای ترموسایکلر و مشکلات تکنیکی (مانند تغییرات دمایی چاهکها یا Well to Well Variation) با موارد مثبت و منفی کاذب همراه است و دانشمندان طرفدار روشهای همدما (Isothermal) را به فکر چاره انداخته است(6).

فناوری تکثیری مبتنی بر سکانس ویژه ای از اسید نوکلئیک

از مهمترین روشهای نوین که در آنالیز الگوهای RNA منحصر بفرد عمل می کند و برقراری آن نیازمند وسایل و تجهیزات گرانقیمتی چون ترموسایکلر PCR نمی باشد، فناوری تکثیری مبتنی بر سکانس ویژه ای از اسید نوکلئیک (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) است – با حروف اختصاری NASBA – که اول بار در سال 1988 به جهانیان معرفی گشت و امروزه در فرمت NASBA-ECL در بازار کشورهای جهان اول به فروش می رسد؛ دانش فنی ساخت کیتهای تشخیصی آن در انحصار کمپانی Biomeriux فرانسه می باشد و برای اولین بار در سال 1383 ه.ش با رویکردی نوین توسط گروه بیوتکنولوژی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و تلاش تیم تحقیقاتی این اختراع در کشور اسلامی ایران شناخته شد و شکل گرفت(13).

در این روش تکثیری عناصر مهمی چون کمپلکس آنزیمی ویژه، پرایمرهای با مهندسی ژنتیک خاص، عناصر نوکلئوتیدی از جنس دزوکسی ریبونوکلئیک اسیدی (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) و ریبونوکلئیک اسیدی (ATP, GTP, CTP, UTP)، شرایط بافری ویژه به لحاظ pH و غلظت نمکی و عناصر تسهیل کننده روند پروسه تکثیری دخالت دارند که در تصویر 4-1 شمایی از آن نمایان شده است(9).



تصویر1. نحوه انجام پروسه تکثیری NASBA

www.SID.ir

Archive of SID

در این روش ابتدا اولیگومر DNA پرایمری حاوی ناحیه پروموتری (فاژهای T7, T3, SV40) در انتهای ´5 بر روی نمونه RNA الگو قرار می گیرد و جزء Reverse Transcriptase کمپلکس آنزیمی با خاصیت RNA-dependent DNA polymerase زنجیره مکمل از جنس DNA را سنتز می نماید. سپس جزء Rnase H کمپلکس آنزیمی وارد عمل می گردد و رشته RNA هیبرید بدست آمده DNA-RNA را با خاصیت ریبواندونوکلئازی خود خرد می کند و زمینه مناسب برای قرارگیری اولیگومر DNA پرایمر دوم بر روی DNAتک رشته ای باقیمانده فراهم می آید. مجددا جزء Reverse Transcriptase کمپلکس آنزیمی با ویژگی DNA- dependent DNA polymerase به سنتز زنجیره مکمل از جنس DNA و کامل شدن سنتز ds cDNA می پردازد که به عنوان مهمترین الگوی ساخت زنجیره های آنتی سنس یا سنس RNA الگوی اولیه با ویژگی و عملکرد رونوشت برداری آنزیم T7 RNA polymerase کمپلکس آنزیمی از ناحیه پروموتری منتهی می گردد. هر کدام از رشته های RNA تازه سنتز شده مجددا می توانند این روند را تا به انتها ادامه دهند و به شکل گیری پروسه ای بسیار قدرتمند برای سنتز میلیونها یا میلیاردها رونوشت از الگوی اولیه بیانجامد. (13و 14).

در سالهای اخیر روشهایی که وجود اسیدهای نوکلئیک باکتریها را در نمونه ها شناسایی می کنند، بخاطر حساسیت و سرعت بالایشان بسیار مورد توجه بوده اند.

RNA ریبوزومی 16S(16S rRNA) یک هدف بسیار مناسب به منظور شناسایی اختصاصی مایکوباکتریومها محسوب می گردد. این نوع RNA یکی از اجزای ریبوزومهای پروکاریوتی می باشد نخستین دلیل اینست که 16S rRNA حاوی توالیهایی می باشد که امکان شناسایی مایکوباکتریومها را در سطح گونه فراهم می آورد. مزیت دوم این ژن فراوانی تعداد کپی های این rRNA در سلولها می باشد. که این ویژگی سبب منحصر به فرد شدن این ژن برای فرایند شناسایی و تشخیص مایکوباکتریوم می گردد. قابلیت تکثیری روش NASBA برای RNA بستر لازم را برای تکثیر بالای این مولکول فراهم می سازد و می تواند نوید بخش یک تکنیک بسیار حساس برای تشخیص مایکوباکتربومها در سطح گونه باشد (4). در مطالعه ای که در سال 2006 توسط گیل و همکاران انجام گرفت با تکیه بر ژنrrs مایکوباکتریوم توبرکولوزیس که 16S rRNA را کد می نماید، پرایمرهایی طراحی شد که قطعه 580 نوکلئوتیدی از RNA را تکثیرمی نمایند. این نواحی دارای بخشهای اختصاصی گونه می باشد که با طراحی پروبهایی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس تشخیص داده شد. نتایج بدست آمده در این مطالعه کارآمدی سیستم ناسبا و اختصاصیت جفت پرایمرها برای شناسایی توبرکولوزیس را مورد تایید قرار داد. اختصاصیت این سیستم بوسیله آنالیز RNA استخراج شده از E.coli و مخمر بوسیله پرایمرهای مورد اشاره مورد تایید قرار گرفت. با بررسیهایی که بر روی نمونه های کلینیکی و مقایسه نتایج NASBA-ELISA با نتایج کشت صورت گرفت، حساسیت 85/6 و اختصاصیت 95/5 گزارش گردید(13). حساسیت 85/6 گزارش شده برای ناسبا در این مطالعه، در مقایسه با حساسیت 90/8 کشت گزارش شد. این در حالیست که برای PCR حساسیت بین 74 تا 100 در مطالعات مختلف گزارش شده است. با توجه به اینکه عوامل متعددی از جمله حساسیت آنالیتیکی روش، حساسیت تکنیک استاندارد (کشت سلولی) در تعیین حساسیت یک تکنیک در یک مطالعه دخیل می باشند، در نهایت نویسندگان این مقاله ترکیب روش ناسبا با روش شناسایی کمی میکروپلیت هیبریداسیون را بعنوان روشی حساس در قیاس با روشهای مولکولار دیگر گزارش کردند.

نتیجه گیری

سیستم‌های تکثیر بر پایه نسخه‌برداری، نقاط قوت متعددی دارند از جمله عدم نیاز به ترموسایکلر، کنتیک سریع و نهایتا محصول RNA تک رشته‌ای که نیاز به دناتوره شدن قبل از شناسایی ندارد. همچنین محصول RNA ناپایدار که ماحصل روش ناسبا می باشد، به کاهش ریسک آلودگی کمک می کند. محدودیت‌های این روش شامل ضعف اجرا در مورد DNA هدف و نگرانی در مورد پایداری کمپلکس RNA - DNA می‌باشد . در نهایت بنظر می رسد که روش ناسبا را

www.SID.ir

Archive of SID

مـی تـوان روشـی سـریع و مـوازی بـا روشـهای تـشخیص بیوشیمیایی مطرح کرد. این در حالی است که این روش بـسیار سـریع تـر و در زمـانی کوتـاهتر قـادر بـه شناسـایی مـی باشـد. بطوریکه در محدوده زمانی 5 ساعت قادر به شناسایی مایکوباکتریومها در نمونه هـای بیولوژیـک اسـت و عـلاوه بـر ایـن، بـسیاری از شاخـصهای لازم بـرای تـشخیص مولکـولی مناسب مثل حساسیت، اختصاصیت و سرعت بالا را نیـز فـراهم می آورد.

References

1-Currie CS, Floyd K, Williams BG, Dye C. *Cost, affordability and cost-effectiveness of strategies to control tuberculosis in countries with high HIV prevalence.* BMC Public Health. 2005; 5: 130–143.

2- Glassroth J .*Tuberculosis 2004: challenges and opportunities*. Trans Am Clin Climatol Assoc. 2005;116:293-308

3- Dye C, Williams BG .*Criteria for the control of drug-resistant tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 97(14):8180-8185.

4) Seaman T, Trollip A, Mole R, Albert H. *The use of a novel phage based technology as a practical tool for the diagnosis of tuberculosis in Africa*. Afr J Biotech. 2003; 2: 40–45.

5) Eisenstein M. *DNA cloning and amplification; Breaking the cycle.* Nature Methods 2004; 1: 1–6

6- Gill P, Ghaemi A .Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2008;27(3):224-43.

7- Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP. *Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique.* Nucleic Acids Res. 1992 ; 20(7):1691-1696.

8- Down JA, O'Connell MA, Dey MS, Walters AH, Howard DR, Little MC, etal . *Detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens by strand displacement amplification of DNA.* J Clin Microbiol . 1996; 34(4):860-5.

9- Cho EJ, Yang L, Levy M, Ellington AD. *Using a deoxyribozyme ligase and rolling circle amplification to detect a non-nucleic acid analyte, ATP.* J Am Chem Soc. 2005 :23;127(7):2022-2023.

10-van der Vliet GM, Schukkink RA, van Gemen B, Schepers P, Klatser PR. *Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) for the identification of mycobacteria.* J Gen Microbiol . 1993; 139(10):2423-2429.

11- Cai L, Kong F, Jelfs P, Gilbert GL, Sintchenko V. *Rolling circle amplification and multiplex allele-specific PCR for rapid detection of katG and inhA gene mutations in Mycobacterium tuberculosis*. Int J Med Microbiol . 2009; 299(8):574-581.

12- Szymkowiak C, Kwan WS, Su Q, Toner TJ, Shaw AR, Youil R. *Rapid method for the characterization of 3' and 5' UTRs of influenza viruses.* J .Virol Methods. 2003; 107(1):15-20.

13- Gill P, Ramezani R, Amiri MV, Ghaemi A, Hashempour T, Eshraghi N, etal . *Enzyme-linked immunosorbent assay of nucleic acid sequence-based amplification for molecular detection of M. tuberculosis* . Biochem Biophys Res Commun . 2006; 347(4):1151-7.

14- Schoone GJ, Oskam L, Kroon NC, Schallig HD, Omar SA .*Detection and quantification of Plasmodium falciparum in blood samples using quantitative nucleic acid sequence-based amplification.* FileJ Clin Microbiol. 2000; 38(11):4072-4075.

www.SID.ir