مقاله مروری

تکثیر RNA با تکنیک NASBA روش مولکولی نوین برای شناسایی بیماری‌های عفونی

ریحانه رمضانی [۱]*، نفیسه سادات فروتن [۲]

۱. استادیار، دکتری نانوبیوتکنولوژی، گروه بیومدیکال، پژوهشکده زنان، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۲. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

***نشانی برای مکاتبه:** تهران، ده ونک، دانشگاه الزهرا، پژوهشکده زنان، گروه بیومدیکال، تلفن: ۸۵۶۹۲۰۹۵(۹۸+) ، re.ramezani@alzahra.ac.ir

دریافت مقاله خرداد نود و شش پذیرش برای چاپ: مرداد نود و شش

چکیده

ابتلا به بیماری‌های عفونی، همواره به عنوان یکی از عوامل مهم مرگ و میر، مطرح بوده است. امروزه شیوع این بیماری‌ها و آمار بالای مرگ و میر ناشی از آن در همه‌گیری‌ها، یک تهدید جهانی برای همه کشورها محسوب می‌شود. این امر سبب شده که بسیاری از تحقیقات پزشکی، در جهت طراحی و راه‌اندازی روش‌هایی ساده و کارآمد در تشخیص و درمان این بیماری‌ها هدایت شوند. در میان این روش‌ها، روش‌های تکثیر هم‌دما به دلیل عدم نیاز به تجهیزات و امکانات گران‌قیمت(ترموسایکلر)، مورد استقبال ویژه‌ای قرار گرفته است. روش NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) علاوه بر هم‌دما بودن واکنش، قابلیت شناسایی RNA و تمایز میکروارگانیسم زنده از مرده را دارا است. به این جهت می‌تواند نقش بسزایی در تشخیص عوامل عفونی و بررسی روند درمان این بیماری‌ها در زمان شیوع، در جوامع مختلف داشته باشد. در این مطالعه مروری، با بررسی گزارشات مختلف در به کارگیری این تکنیک در شناسایی عوامل عفونی بیماری‌زا، به اهمیت و کاربرد این روش مولکولی نوین در اپیدمی‌های عفونی پرداخته شده است. با توجه به مطالعات صورت گرفته و مزایای تکنیک NASBA، می‌توان ادعا نمود که این تکنیک، جهت شناسایی عوامل عفونت‌زا در شرایط بحرانی و اپیدمی، نسبت به PCR کارآمدتر است و به دلیل ساده بودن تکنیک و عدم نیاز به دستگاه ترموسایکلر، قابلیت راه-اندازی در هر آزمایشگاهی را خواهد داشت. امید است با به کارگیری این تکنیک در شبکه آزمایشگاهی کشور و مراکز بهداشت، مشکلات موجود در روند تشخیص و درمان بیماری‌های عفونی برطرف گردد.

کلید واژه‌ها: روش‌های تکثیر هم‌دما، NASBA، بیماری‌های عفونی

مقدمه

امروزه با افزایش میزان شیوع بیماری‌های عفونی در سطح جهان و با پیشرفت دانش در حوزه تشخیص و شناسایی عوامل عفونت زا، انتظار می‌رود روز به روز روش‌های تشخیصی کارآمدتر گسترش پیدا کند. راه-اندازی و استفاده از روش‌های تشخیصی دقیق‌تر، حساس‌تر، آسان‌تر و ارزان‌تر که در تمام آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و در کلیه مناطق کشور قابل اجرا باشد، ضرورتی انکارنشدنی در این راستا محسوب می‌شود. چرا که این امر بر روند تشخیص سریع و انتخاب درمان صحیح بیماری‌های عفونی، از جمله در شرایط بحرانی چون بحران‌های نظامی و در وضعیت اپیدمیک، نقش بسیار مهم و مؤثری خواهد داشت(۱).

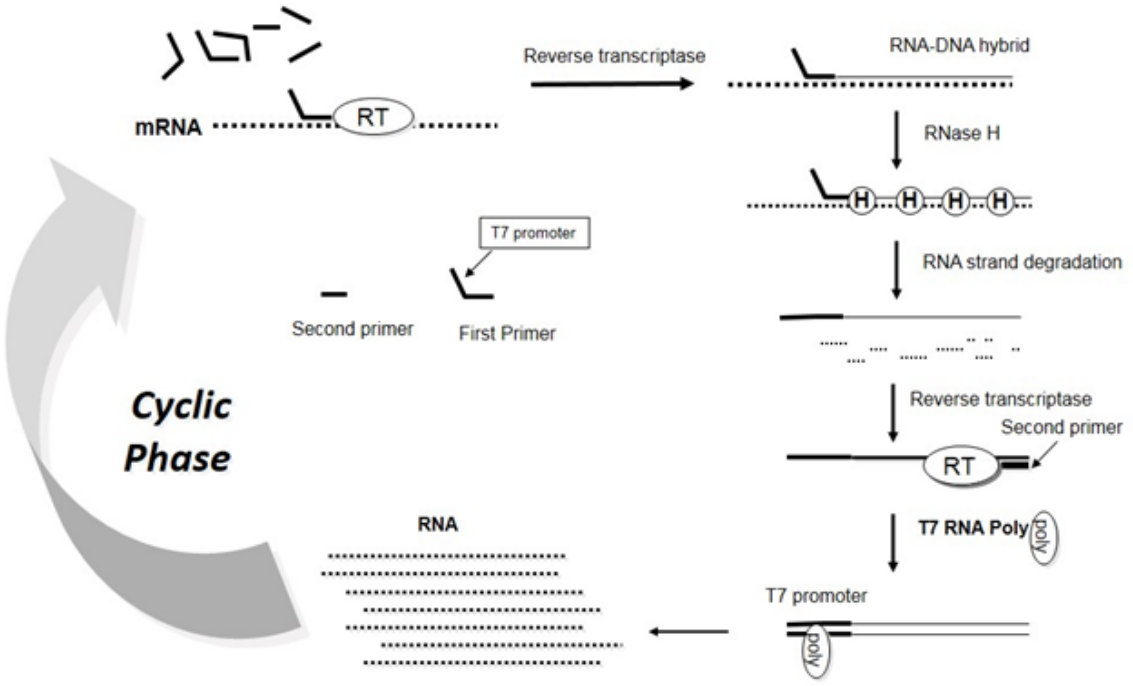
طی سال‌های اخیر توسعه آزمایش‌های مربوط به تکثیر اسیدهای نوکلئیک، پیشرفت چشمگیری داشته و توانسته اطلاعات مهمی در تشخیص و پیش-بینی روند پیشرفت بیماری، تمایز و تشخیص عفونت علامت‌دار از بی-علامت و بررسی اثر درمان علیه عامل بیماری‌زا در اختیار پزشکان قرار دهد(۲). از روش‌های رایجی که در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی برای تکثیر RNA و DNA مورد استفاده قرار می‌گیرد، می‌توان به تکنیک PCR و RT-PCR اشاره کرد که با وجود مزیت‌های فراوان، راه‌اندازی آن‌ها در آزمایشگاه‌های ساده و با امکانات محدود، با چالش‌های جدی روبه‌رو است؛ چنانچه کاربرد این آزمایش‌ها در سطح گسترده به علت گرانی و هزینه‌بر بودن و لزوم استفاده از نیروی متخصص و ماهر، با محدودیت مواجه شده است(۳).تکنیک‌های تکثیر هم-دما، به دلیل سادگی و عدم نیاز به دستگاه ترموسایکلر، امروزه در بین روش‌های تشخیصی مولکولی جایگاه ویژه‌ای یافته‌اند. فناوری تکثیر هم‌دما بر پایه توالی نوکلئیک اسید معروف به NASBA یکی از کارآمدترین این روش‌ها است که امروزه توانسته به واسطه مزیت‌های فراوان تا حدودی جایگزین روش‌های پرهزینه و پیچیده PCR و RT-PCR شود(۴).تکنیک NASBA روشی بسیار حساس و هم‌دما است که به طور خاص با هدف تکثیر RNA طراحی شده است. این روش پتانسیل تشخیص سلول زنده را از طریق تکثیر mRNA حتی در پس زمینه DNA

ژنومی دارد. زمانی که هدف بررسی اثربخشی داروها و نتایج درمان می‌باشد و باید سلول زنده مورد ارزیابی قرارگیرد، RNA به DNA ترجیح دارد. زیرا DNA تا مدت طولانی از سلول مرده، قابل جداسازی است؛ در حالی که بیشتر mRNAها نیمه عمرشان تنها چند دقیقه است و به محض آن‌که سلول، حیات خود را از دست می‌دهد، تمامی mRNA سلول تخریب شده و از بین می‌رود. بنابراین در صورتی که mRNA در سلول شناسایی شود، می‌توان با اطمینان اظهار کرد که سلول زنده است. از تکنیک‌های تکثیری که توانایی شناسایی RNA را دارد و در آزمایشگاه‌ها به کار گرفته می‌شود، می‌توان به روش RT-PCR اشاره کرد(۵). با وجود آنکه این تکنیک از حساسیت و دقت نسبتاً خوبی برخوردار است، ولی همانند تکنیک NASBA قادر نیست، بین رشته الگوی DNA و RNA تمایز حاصل کند و در صورتی که نمونه RNA حاوی آلودگی DNA باشد، نتیجه مثبت کاذب حاصل می‌شود.

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، تکنیک‌های PCR و RT-PCR وابسته به دستگاه ترموسایکلر هستند و راه‌اندازی آن‌ها در آزمایشگاه‌ها، هزینه هنگفتی به دنبال دارد، در صورتی که در روش های تکثیری هم‌دما همچون NASBA، تمام مراحل واکنش در یک دما ($۳۷^{\circ}C$) صورت می‌گیردو نیازی به دستگاه ترموسایکلر نیست؛ بنابراین راه‌اندازی آن هزینه‌ای برای آزمایشگاه در پی نخواهد داشت. با توجه به محاسن برشمرده برای تکنیک NASBA، می‌توان امید داشت در آینده‌ای نزدیک این تکنیک تکثیر هم‌دما، بتواند برای شناسایی و تعیین کمیت میکروارگانیسم‌ها (حتی آن‌هایی راکه نمی توان به آسانی کشت داد) استفاده شود و به عنوان روش تشخیصی بسیار کارامدی مورد استفاده قرار گیرد(۶ و۷).

NASBA چیست؟

NASBA اولین بار در نشریه Nature، در سال ۱۹۹۱ توسط Compton برای تکثیر RNA معرفی شد(۸) و بعد از آن به دلیل کاربردهای فراوان آن برای شناسایی ویروس‌هایی که ژنوم آن‌ها از جنس RNA است، مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفت(۹). این تکنیک با استفاده از سه آنزیم، Reverse transcriptase، RNase H و T7RNA polymerase، در شرایط تک دما، قادر به تکثیر تعداد زیادی RNA است(۸).



شکل ۱- تصویر شماتیک از نحوه فرآیند تکثیر در تکنیک NASBA

اساس این روش تکثیر، بر پایه رونویسی است(۸). در این روش ابتدا به وسیله آنزیم رونویسی معکوس (RT) و پرایمر اول که دارای یک توالی اضافی مربوط به T_7 پروموتر، یک رشته DNA از روی RNA الگو ساخته می‌شود. محصول این واکنش یک هیبرید DNA-RNA خواهد بود که نسبت به آنزیم RNaseH حساس است و این آنزیم با خاصیت RNase ای خود، RNA متصل به DNA را تخریب کرده و به این ترتیب یک DNA تک‌رشته باقی می‌ماند که پرایمر دوم در این شرایط به آن متصل می‌شود. آنزیم RT در این شرایط با فعالیت DNA Dependent DNA Polymerase خود، DNA تک‌رشته را به DNA دو رشته‌ای (dsDNA) تبدیل می‌کند. این DNA دو رشته‌ای در یک سر خود دارای توالی پروموتری T_7 می‌باشد؛ در نتیجه آنزیم T_7 RNA polymerase با شناسایی ناحیهٔ پروموتری خود، کار رونویسی را انجام داده و تعداد زیادی RNA (حدوداً از هر رشته، ۱۰۰ الی ۱۰۰۰ RNA) تولید می شود(۸). .

حال هر کدام از RNA های سنتز شده، می‌توانند الگو قرار بگیرند و این سیکل مجدداً تکرار شود. چون تمام آنزیم‌هایی که در این فرآیند دخالت دارند، در دمای ^{o}C ۳۷-۴۱ بیشترین فعالیت را از خود نشان می‌دهند، تمام روند این واکنش در این دما صورت می-گیرد و به این خاطر این واکنش جزو روش‌های هم‌دما دسته‌بندی می‌شود(۳و۸).

میزان حساسیت این روش، خیلی بیشتر از PCR است و این باعث می‌شود که به همان نسبت به آلودگی نیز حساس باشد. حدوداً بعد از ۹۰ دقیقه، ما به تعداد نسخهٔ فراوانی از RNA (بیش از $^{۹}۱۰$ کپی) دست می‌یابیم که با روش‌های مختلف قابل شناسایی است. آلودگی با DNA، برای این روش برخلاف روش RT-PCR، مشکل‌زا نخواهد بود، چون در این روش حرارت بالایی اعمال نمی-شود که دو رشتهٔ DNA از هم جدا شوند. در نتیجه DNA ژنومی نمی‌تواند تکثیر یابد(۱۲-۱۰).

طراحی پرایمرها **:**یکی از ویژگی‌های تکنیک NASBA که باعث شده برای تکثیر، نیازی به سیکل‌های حرارتی و دستگاه ترموسایکلر نداشته باشد، تولید نسخه‌های بی‌شمار RNA تک رشته‌ای توسط آنزیم T_7 RNA Polymerase می باشد. به این خاطر لازم است، توالی پروموتری برای این آنزیم به یکی از پرایمرها افزوده گردد. توالی پروموتر T_7 کاملاً برای آنزیم اختصاصی عمل می‌کند، بنابراین باید در انتخاب آن دقت کافی صورت گیرد. این توالی، به توالی پرایمر اول که مستقیماً به RNA تخلیص شده از میکروارگانیسم متصل می‌شود، اضافه می‌گردد. وجود چند بازِ پورینی (آدنوزین و گوانوزین) بین توالی پروموتری و توالی مکمل با رشته RNA الگو، در طراحی پرایمر بسیار ضروری است؛ زیرا این امر باعث افزایش کارایی آنزیم T_7 RNA polymerase در ساخت RNA می-گردد. بنابراین اگر در ابتدای توالی مکمل طراحی شده برای رشته RNA الگو، بازِ آدنین و گوانین وجود نداشته باشد، باید ۴ الی ۶ آدنوزین و گوانوزین (با این ترتیب AGAG) بین توالی پروموتری و توالی مکمل RNA الگو، در طراحی پرایمر وارد گردد؛ در غیر این‌صورت کارایی فعالیت آنزیم و در نتیجه حساسیت تکنیک فوق العاده کاهش می‌یابد(۱۱ و ۱۲).

پرایمر دوم NASBA، که تنها یک توالی مکمل ۱۸ الی ۲۲ نوکلئوتیدی است، به رشته DNA حاصل از رونویسی معکوس رشته RNA الگو، متصل می‌گردد. این پرایمر ساختاری مشابه پرایمرهای PCR دارد و از تمامی نرم‌افزارهایی که برای طراحی پرایمر برای تکنیک PCR استفاده می‌شود، می‌توان برای طراحی این پرایمر هم بهره جست(۱۳).

همانطور که قبلاً اشاره شد، تمامی مراحل واکنش در تکنیک NASBA در دمای پایین صورت می‌گیرد، بنابراین در طراحی پرایمرها باید دقت لازم به کار گرفته شود تا به صورت کاملاً اختصاصی به رشته الگو یا هدف خود متصل شوند. در صورت عدم رعایت این دقت از کارایی تکنیک برای شناسایی اختصاصی توالی هدف کاسته خواهد شد. البته تلفیق تکنیک NASBA با روش-های آشکارسازی همچون روش‌های الکتروشیمیایی (Electrochemiluminescence =ECL)، روش‌های هیبریداسیون مثل ELISA و استفاده از پروب‌های نشاندار شده با رنگ فلورسنت در real-time NASBA، موجب افزایش ویژگی اختصاصی بودن تکنیک می‌شود تا جایی که بر طبق گزارش‌ها، این ویژگی به ٪۱۰۰ می‌رسد(۱۴).

نکته دیگری که لازم است محقق برای طراحی پرایمرها برای تکنیک NASBA مد نظر قرار دهد، اتصال پرایمر اول به رشته RNA تخلیص شده از میکروارگانیسم یا همان رشته RNA الگو می‌باشد. باید مطالعه و دقت کافی لحاظ شود که توالی پرایمر، مکمل توالی RNA باشد؛ در غیر این‌صورت نمی‌تواند به رشته الگو خود متصل شده و در نتیجه شرایط لازم برای عملکرد تکنیک و شروع رونویسی معکوس برای آنزیم reverse transcriptase فراهم نخواهد شد(۹). تکنیک NASBA به دلیل محاسن فراوانی که با خود به ارمغان آورد، ظرف مدت کوتاهی به طور گسترده، در تمامی دنیا مورد مطالعه محققین قرار گرفت. در ادامه به برخی ویژگی‌ها و مزیت‌های این روش در مقایسه با روش‌های مشابه دیگر اشاره می‌شود.

۱- سرعت بالای واکنش: یکی از محاسن عمده این تکنیک، نسبت به روش کشت میکروارگانیسم، سرعت بالای آن در رسیدن به نتایج تشخیصی قابل اعتماد است. در این تکنیک تکثیر بیش از $^{۹}۱۰$ کپی از RNA تنها ظرف ۹۰ دقیقه صورت می‌گیرد و این امر بسیار با ارزش است. دو عامل در افزایش سرعت این تکنیک نسبت به PCR مؤثر است؛ اول آنکه به دلیل تک دما بودن واکنش در NASBA، نیازی به سیکل‌های دمایی متناوب نیست و به این خاطر زمانی که

نیازی به سیکل‌های دمایی متناوب نیست و به این خاطر زمانی که در PCR برای تغییر دمای دستگاه اتلاف می‌شود، در تکنیک NASBA وجود ندارد و از طرف دیگر، آنزیم T_7 RNA Polymerase که در تکنیک NASBA مسئولیت تولید RNA از DNA دو رشته‌ای را دارد، قادر است از روی هر نسخه DNA، حدود ۱۰۰ الی ۱۰۰۰ نسخه RNA رونویسی کند و این ویژگی هم باعث کاهش زمان تکثیر و هم افزایش حساسیت تکنیک می-گردد(۸و ۱۱).

۲-تک‌دما بودن واکنش: تمامی فرآیند تکثیر در تکنیک NASBA در یک دما (۳۷ °C)، صورت می‌گیرد و این مسأله یکی از محاسن بزرگ این تکنیک به شمار می‌رود. همان‌طور که می‌دانیم لازمه‌ی تکثیر یک قطعه نوکلئیک اسید دورشته‌ای، جدا شدن دورشته از هم و اتصال یک الیگونوکلئوتید، برای آغاز فرآیند همانندسازی است. تا زمانی که دو رشته DNA از هم جدا نشده باشند، تکثیری هم اتفاق نمی‌افتد. در طبیعت و در سلول زنده، آنزیم هلیکاز مسئول این جداسازی است. در تکنیک HAD (Helicase-depended amplification) هم که یکی از روش‌های تکثیر هم‌دما به شمار می‌رود، با الگوبرداری از سلول زیستی و با استفاده از آنزیم هلیکاز تخلیص شده از موجود زنده، فرآیند تکثیر در شرایط آزمایشگاه و مصنوعی صورت می‌گیرد. در روش PCR که اولین و قدیمی‌ترین روش تکثیر اسیدهای نوکلئیک به شمار می‌رود، از حرارت برای جدا شدن دو رشته کمک گرفته می‌شود. به این معنی که با حرارت بالا (۹۴ °C)، دو رشته جدا می‌شوند و سپس با پایین آمدن حرارت به میزان مناسب شرایطی ایجاد می‌شود که قبل از جفت شدن دو رشته با هم، پرایمرها به رشته الگو متصل می‌شوند و سپس در دمای مناسب آنزیم DNA polymerase (۷۲°C) فعالیت همانندسازی و تکثیر شکل می‌گیرد. برای اعمال این دماها به طور متناوب و دقیق، نیاز به دستگاه ترموسایکلر است که هزینه‌ی زیادی در پی خواهد داشت(۸و۱۱).

اما در تکنیک NASBA، از آنزیم RNase H برای جداسازی دورشته استفاده می‌شود. به این ترتیب که بعد از رونویسی معکوس از RNA توسط آنزیم Reverse transcriptase، هیبرید RNA-DNA حاصل توسط آنزیم RNase H شناسایی شده و رشته RNA از این هیبرید، تخریب می‌گردد و به این شکل تک رشته DNA بدون اعمال حرارت بالا به وجود می‌آید. بنابراین لازم نیست برای تکثیر، از سیکل‌های حرارتی متناوبی که در تکنیک PCR به کار گرفته می‌شود، استفاده کرد. هم‌دما بودن تکنیک NASBA، شرایط را برای کارشناسان آزمایشگاه بسیار هموار و ساده می‌کند، بدین شکل که با استفاده از یک بلوک حرارتی ساده و یا انکوباتور در آزمایشگاه، شرایط برای تکثیر اسیدهای نوکلئیک فراهم می‌گردد(۱۱). امید آن می‌رود با راه‌اندازی این تکنیک به طور کارآمد در آزمایشگاه‌های کشور تا اندازه‌ای هزینه تست‌های مولکولی در تشخیص طبی مرتفع شود.۳-سهولت و کم هزینه بودن تکنیک: چنان‌که که ذکر شد، این روش احتیاجی به دستگاه و تجهیزات خاصی ندارد و به این خاطر از نظر هزینه بسیار مقرون به صرفه خواهد بود و از طرف دیگر چون نیازی به سیکل‌های حرارتی نیست، برای راه‌اندازی تکنیک، لازم نیست مراحل بهینه‌سازی و تنظیم دستگاه و سیکل‌های حرارتی صورت گیرد و این امر موجب سهولت کار برای کارشناسان آزمایشگاه خواهد شد(۱۲و۱۳).

۴- تولید RNA تک رشته: همان‌طور که در مباحث قبلی بیان شد، تکنیک NASBA بر اساس رونویسی و تولید RNA بنا شده است و به این خاطر محصولات آن، تعداد بی‌شماری از مولکول RNA است که خود می‌تواند به طور مستقیم در مراحل بعدی تکثیر، به عنوان الگو جهت رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گیرد. این امکان وجود دارد که مولکول‌های تک‌رشته RNA حاصل از تکنیک NASBA را تخلیص کرده و مورد بهره‌برداری قرار داد. محصولات تکنیک NASBA، می‌تواند در قالب پروب‌هایی از جنس RNA برای کارهای تشخیصی بسیار مفید واقع شوند.۵- تکثیر انتخابی RNA در حضور DNA: یکی از مشکلاتی که همیشه محققین در شناسایی مولکول RNA با روش‌های تکثیری با آن مواجه هستند، آلودگی نمونه مورد آزمایش با DNA است. چون مولکول DNA برخلاف RNA بسیار پایدار است و در محلول تخلیص شده از میکروارگانیسم تا مدت‌های طولانی باقی می‌ماند. بنابراین اگر نمونه RNA تخلیص شده حاوی آلودگی DNA باشد، به راحتی با تکنیک PCR، مولکول DNA به جای RNA و یا در کنار آن تکثیر می‌یابد و موجب جواب مثبت کاذب و یا افزایش غیر واقعی حساسیت در نتایج می‌گردد. در سلول‌های یوکاریوتیکی، ژنوم دارای توالی‌های انترونی می‌باشد که در نسخه RNA رونویسی شده داخل سلول، دیده نمی‌شود. بنابراین اگر محقق پرایمرهای خود را طوری طراحی کند که در نواحی حدواسط بین اگزون و انترون ژنوم قرار گیرد، این مشکل برطرف خواهد شد. چون پرایمر برای توالی دو اگزون متوالی طراحی شده است، اگر یک بخش آن بر روی یک اگزون و ناحیه دیگر آن با توالی اگزون مجاور جفت شود، در این-صورت پرایمر نمی‌تواند به ژنوم سلول که حاوی توالی انترون بین این دو اگزون است، متصل شود و مولکول DNA که احیاناً در RNA تخلیص شده قرار دارد، نمی‌تواند تکثیر شود(۱۰). در مورد باکتری‌ها، به دلیل عدم وجود توالی انترون در ژنوم، نمی‌توان این مشکل را به این راحتی برطرف ساخت. بنابراین باید دقت لازم صورت گیرد که RNA تخلیص شده، به هیچ وجه به مولکول DNA آغشته نباشد ولی در عمل همیشه این اتفاق صورت نمی-گیرد و ما شاهد آلودگی DNA خواهیم بود. در تکنیک NASBA به دلیل اعمال حرارت پایین (۳۷ °C)، امکان جداسازی دورشته DNA ژنومی وجود ندارد و بنابراین پرایمر جایگاهی برای اتصال بر روی DNA نمی‌یابد.

حرارت ^{o}C ۶۵ ابتدایی هم که برای باز شدن ساختارهای ثانویه RNA در ابتدای واکنش داده می‌شود، هم نمی‌تواند دو رشته ژنومی را از هم گسسته نماید(۱۰). بنابراین آلودگی DNA برای تکنیک NASBA به هیچ عنوان مشکل‌ساز نخواهد بود.

هر چند که حتی اگر این اتفاق هم می‌افتاد، یعنی دو رشته DNA ژنومی هم از هم جدا می‌شد و پرایمر به DNA متصل می‌گشت، باز هم NASBA قادر نخواهد بود که موجب تکثیر DNA شود. اگر دو رشته DNA به هر دلیلی در حین روند NASBA از هم گسسته شود و پرایمر حاوی توالی T_7 پروموتر به آن متصل گردد، چون شرایطی وجود ندارد تا توالی پروموتری دورشته شود، ساخت RNA هم میسر نخواهد بود و این اتصال نتیجه‌ای در پی نخواهد داشت. همان‌گونه که می‌دانیم زمانی آنزیم T_7 RNA polymerase ناحیه پروموتری خود را شناسایی می‌کند که این ناحیه دو رشته شده باشد(۱۵) و چون این امکان در مورد توالی T_7 پروموتر متصل به پرایمر، زمانی که رشته الگو از جنس DNA است، به وجود نمی‌آید، بنابراین تکثیری هم صورت نخواهد گرفت. پس می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تکنیک NASBA به هیچ شکل، توانایی تکثیر DNA را نخواهد داشت و می‌توان با اطمینان اذعان کرد که آلودگی DNA نمونه مورد بررسی، نمی‌تواند بر روند تکثیر تأثیرگذار باشد.

۶- حساسیت بالای تکنیک: همان‌طور که پیش از این اشاره شد، آنزیم T_7 RNA polymerase از کارایی بالایی برخوردار است و توانایی ساخت ۱۰۰ الی ۱۰۰۰ نسخه RNA از روی یک نسخه DNA دورشته‌ای را دارد. بنابراین میزان کم RNA الگو، به عنوان نمونه اولیه، در شناسایی آن مشکلی ایجاد نخواهد کرد. در برخی گزارشات حساسیت ۹۸ درصدی برای این تکنیک گزارش شده است(۱۶و۱۷).

۷- استفاده مستقیم از نمونه: در مواردی که عفونتی در نمونه‌های زیستی مانند خون، سرم، ادرار و غیره وجود دارد، برای انجام PCR نیاز به تخلیص اسیدهای‌نوکلئیک می‌باشد. اما در روش NASBA به دلیل آنکه پروتئین‌ها و مواد موجود در نمونه‌های جدا شده از بیمار، اثر بازدارندگی بر تکنیک ندارد، می‌توان با حذف مراحل تخلیص، به طور مستقیم بر روی نمونه ادرار، خون، سرم و غیره، تکنیک NASBA را اعمال کرد و به این ترتیب با سهولت به کارگیری تکنیک، سرعت شناسایی عامل بیماری‌زا هم افزایش داد(۱۶).

۸- احتمال وقوع واکنش غیراختصاصی: از معایب این تکنیک نیز می‌توان به احتمال وقوع واکنش‌های غیراختصاصی اشاره کرد، از آنجایی که دمای واکنش بدون خطر تخریب و دناتوراسیون آنزیمی به بیشتر از ۴۱ درجه سلسیوس نمی‌تواند افزایش پیدا کند، ایجاد واکنش‌های غیراختصاصی در NASBA محتمل است(۶و ۱۸ و ۱۹).

در اکثر مطالعات صورت گرفته با به کارگیری روش‌های آشکارسازی مختلف برای محصولات NASBA، این مشکل تکنیک را مرتفع ساخته‌اند. به این ترتیب که محصولات غیراختصاصی محتمل در این روش، با استفاده از این روش‌ها به طور کامل از مراحل شناسایی حذف گردیده و مشکلی برای تشخیص اختصاصی عامل بیماری‌زا در پی نخواهد داشت. از روش‌های آشکارسازی محصولات NASBA می‌توان به روش‌های الکتروشیمیایی (ECL)، هیبریداسیون (ELISA) و پروب‌های نشاندار شده در real-time NASBA اشاره کرد که بنا بر گزارش‌های ارائه شده، اختصاصی بودن تکنیک را گاه تا ۱۰۰ درصد افزایش می‌دهند(۲۰).

کاربرد NASBA

NASBA به عنوان ابزار مولکولی حساس و قابل اعتماد، برای تشخیص ویروس‌ها، باکتری‌ها، جلبک‌های سمی، قارچ‌ها و عوامل بیماری‌زا در حوزه پزشکی، محیط زیست و کنترل کیفیت صنعتی مورد استفاده قرار گرفته است(۲۱). در این مطالعه به طور خاص به کاربردهای NASBA در تشخیص بیماری‌های عفونی پرداخته خواهد شد.

۱-بیماری ایدز، ویروس HIV: از سال ۱۹۹۱ که برای اولین بار توسط Kievits و همکاران از روش NASBA برای تکثیر RNA ویروس HIV-1 استفاده شد [۹] تا امروزه این تکنیک به صورت قابل توجهی توسعه و بهبود یافته است. به طوری که از سال ۱۹۹۵ تکنیک NASBA برای شناسایی و تعیین تعداد ویروس HIV-1 بر اساس روش تشخیصی (ECL) به صورت کیت‌های تجاری در دسترس قرار گرفته است(۶). سنجش بار ویروسی اطلاعات بسیار مهمی از تشخیص بیماری، پیش‌آگهی، نظارت پیشگیرانه و درمانی ارائه می‌دهد. از آنجا که بار ویروسی پلاسما پیشرفت بیماری را بهتر از لنفوسیت‌های CD_4^+ پیش بینی می‌کند، محققان نشان دادند که خطر پیشرفت ایدز و مرگ به طور مستقیم به مقدار ویروس پلاسما بستگی دارد [۲۲]. نسل دوم و حساس‌تر این سنجش *Nuclisens HIV-1 QT* در سال ۲۰۰۳ وارد بازار تجاری شد که می‌توانست غلظت‌های پایین RNA این ویروس را تا ۲۵ نسخه بر میلی لیتر تشخیص دهد. سازمان غذا و داروی امریکا (FDA) نیز سنجش بار ویروسی HIV-1 را با آزمون NASBA از طریق روش *Nuclisens QT* که با هدف ژن *gag* طراحی شده بود، تأیید کرده است(۲). ترکیب NASBA و روش آشکارسازی ELISA (حساسیتی تا ۱۰۰برابر بیشتر از ژل الکتروفورز) یک روش تشخیصی قدرتمند و حساس را ایجاد می‌نماید. شهرابی و همکاران نیز در سال ۱۳۹۰ نشان دادند تلفیق NASBA-ELISA برای تشخیص HIV-1 RNA روشی کارآمد است که نیازمند توسعه و بررسی‌های بیشتر به منظور استفاده در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی می‌باشد(۲۳).

۲- بیماری هپاتیتC، ویروس: HCV: ویروس هپاتیت c دارای ژنوم RNA تک رشته است که از دیگر ویروس‌های مهم و شایع در انتقال خون می باشد(۲۴). اولین بار در سال ۱۹۹۴ آزمون NASBA با روش آشکارسازیELGA برای تکثیر HCV RNA بررسی شد(۲۵). ناحیه محافظت شده ’5 غیر کد کننده (Noncoding regions) این ویروس به عنوان هدف برای توسعه بیشتر کمی و کیفی مورد استفاده قرار گرفت. در سال ۱۹۹۹، Damen و همکاران آزمایش کمی NASBA (QT NASBA) جهت تشخیص ویروس HCV را ارزیابی و با آزمون‌های HCV branched DNA (bDNA) (شرکت Chiron) و PCR HCV monitor (شرکت Roche) مقایسه کردند. حساسیت کمی NASBA نشان داد که این تکنیک ۱۰ مرتبه بهتر از سنجش bDNA و قابل مقایسه با HCV monitor بر پایه PCR است. آن‌ها نتیجه گرفتند روش HCV-NASBA-QT یک روش قابل اعتماد برای تشخیصHCV RNA می‌باشد(۲۶).
محمدی یگانه و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای NASBA را در ترکیب با روش Real time براساس پروب Molecular Beacon (MB) برای ردیابی ویروس HCV و HIV-1 مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند این روش به دلیل اختصاصی بودن، حساسیت و سرعت بالا روش مناسبی بوده و می‌تواند کاربرد وسیعی داشته باشد(۲۷). پریان و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ تشخیص همزمان عفونت HIV-1 وHCV را با استفاده از تکنیک NASBA مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند با استفاده از روش NASBA چندگانه می‌توان عفونت همزمان یا منفرد ویروس‌های HIV-1 و HCV را با حساسیت و ویژگی مناسب در نمونه‌های پلاسمای بیماران تشخیص داد(۲۸).
۳- عفونت ناشی از سیتومگالوویروس، ویروسCMV: به دلیل ویژگی‌های CMV، تشخیص این ویروس در مراحل اولیه عفونت، شرط لازم برای درمان ضد ویروسی مؤثر می‌باشد. از آن‌جایی که CMV حامل ژنوم DNA می‌باشد، بیان برخی mRNA های تأخیری می‌تواند به عنوان یک شاخص خاص برای تکثیر ویروس استفاده شود. در سال ۱۹۹۸، Blok و همکاران، *Late pp67(UL65) mRNA* جداشده از گلبول‌های سفید خون بیماران پیوند کلیه را هدف مطالعه با روش NASBA قرار دادند.
حساسیت NASBA در مقایسه با روش آنتی ژنمیا بیشتر بود در حالی که حساسیت کشت سلول و NASBA قابل مقایسه بودند(۲۹). آزمون *Nuclisens CMV pp67* با موفقیت توانست بیماری CMV را در افراد آلوده به HIV، بیماران پیوندی دریافت کننده قلب، ریه و مغز استخوان تشخیص دهد و در روند صحیح درمان مورد استفاده قرار گیرد(۶). دیگر mRNAهای کاربردی CMV که با NASBA تکثیر یافتند *early β2.7 mRNA* و *immediate early UL123 mRNA*بودند. با این حال این mRNAهای هدف، در طول مراحل اولیه آلودگی به CMV بیان می‌شوند و اختصاصی بودن و ارزش پیشگویی مثبت این سنجش پایین تر از سنجش pp67 می‌باشد. در سال ۲۰۰۱ در مطالعه‌ای تکنیک NASBA کمی را برای هر دو *pp67(UL65)* و *IE1(UL123)* در بیماران پیوند کلیه شده بررسی کردند(۱۸). Hebart و همکاران در سال ۲۰۰۲، سنجش *Nuclisens CMV pp67* را جهت تشخیص و نظارت بر عفونت CMV پس از پیوند سلول‌های بنیادی آلوژنیک بررسی کردند. داده‌های ارائه شده به وضوح نشان داد NASBA می‌تواند به تشخیص اولیه عفونت و سنجش کارایی درمان ضدویروسی کمک کند(۳۰).
۴- عفونت ناشی از فلاوی ویروس‌ها: دنگه، نیل غربی، زیکا: NASBA روشی حساس و اختصاصی برای تشخیص ویروس نیل غربی (west-Nile) است که حساسیتی بالاتر از RT-PCR و برابر با TaqMan RT-PCR دارد(۳۱).
تکنیک NASBA برای تشخیص ویروس دنگه نیز به کار رفته است. We و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند NASBA با حساسیتی بالا(۹۸،۵٪) و اختصاصیت ۱۰۰٪ می تواند در تشخیص زود هنگام بیماری عفونی دنگه مؤثر باشد(۱۷). در تحقیقی دیگر که در سال ۲۰۰۲ انجام شده بود روش NASBA برای تشخیص سریع دنگه ویروسی توسعه داده شد و آشکارسازی محصولات NASBA با دو روش ECL و AG (الکتروفورز ژل آگارز) با یکدیگر مقایسه شد(۳۲). اخیراً Pardae و همکاران، ادعا کرده‌اند که روشی سریع و کم هزینه برای تشخیص ویروس زیکا ارائه نمودند. تکنیک به کار گرفته شده در این مطالعه، همان تکنیک NASBA برای تکثیر RNA ویروس می‌باشد(۳۳).
۵- بیماری‌های عفونی ناشی از انتروویروس‌ها: NASBA برای تشخیص انتروویروس‌ها نیز توسعه یافته است. ناحیه محافظت شده 5’ NCR به عنوان هدف به کار می‌رود. این تکنیک می‌تواند *کوکساکی* ویروس‌ها، پولیو ویروس‌ها و اکوویروس‌ها را شناسایی کند. Fox و همکاران در سال ۲۰۰۲ تکنیک NASBA را جهت تشخیص انتروویروس‌ها در نمونه‌های بالینی (مایع مغزی نخاعی، تنفسی و مدفوع) طراحی و ارزیابی کردند و نتایج NASBA را با RT-PCR و کشت ویروسی مقایسه کردند. آن‌ها نتیجه گرفتند NASBA جایگزینی مناسب برای RT-PCR جهت تکثیر حساس و تشخیص توالی انتروویروس‌ها در طیف وسیعی از نمونه-های بالینی است(۳۴). Hong وهمکاران در سال ۲۰۱۲ توانستند با استفاده از روشی جدید از ترکیب NASBA و RDA (آزمون تشخیصی سریع هم‌دما Rapid isothermal detection assay) در شناسایی انتروویروس ۷۱ انسانی، نشان دهند حساسیت بسیار عالی و اختصاصی بودن و راحتی این روش، مناسب برای کاربرد بالینی حتی در آزمایشگاه‌های با امکانات اولیه و محدود می-باشد(۳۵). در مطالعه‌ای دیگر سعیدی نیا و همکاران توسعه

تکنیک‌های NASBA وRT-PCR برای تشخیص کوکساکی ویروس B3 در کشت سلولی و نمونه‌های بافت حیوانی را بررسی کردند. نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های بافت قلب و طحال بدست آمده از حیوان آلوده برای شناسایی ویروس با هر دو تکنیک مثبت بود و NASBA نسبت به RT-PCR دارای مزایای متعددی بود که نشان داد تکنیک جایگزین مناسبی برای تشخیص با حساسیت بالای کوکساکی ویروس B3 می‌باشد(۳۶).

۶- بیماری‌های ویروسی دستگاه تنفسی: سرماخوردگی، عفونت ناشی از ویروس سنسشیال تنفسی، آنفولانزا: با بررسی روش NASBA برای تشخیص رینوویروس‌ها نشان داده شد، این تکنیک حساسیت و اختصاصیت بالایی برای شناسایی RNA رینوویروس‌ها دارد(۳۷). در تحقیق دیگر، تشخیص رینوویروس‌ها با سه روش کشت بافت و RT-PCR و NASBA در کودکان مبتلا به عفونت‌های حاد تنفسی در طول یک فصل زمستان بررسی و با یکدیگر مقایسه شد. نتایج نشان داد NASBA و RT-PCR قابل مقایسه با یکدیگرند و به طور معنی‌داری حساس‌تر از روش کشت ویروس هستند(۳۸). در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای برای اولین بار روش کمیReal time NASBA با کنترل داخلی با استفاده از پروب‌های MB برای تشخیص گزینشی و حساس سروتایپ‌های رینوویروس انسانی توسعه یافت. Sidoti و همکاران نشان دادند با این روش ساده به طور قابل توجهی دقت، صحت و درستی تشخیص افزایش یافته است(۳۹). نتایج مطالعات نشان داده NASBA می‌تواند روشی مناسب برای تشخیص ویروس سنسیشیال تنفسی باشد. در مطالعه‌ای که به منظور بررسی قابلیت استفاده از سه روش تشخیصی تجاری بر مبنای NASBA، RT-PCR و ELISA برای تشخیص ویروسRSV در نمونه‌های بالینی بود، نشان دادند NASBA روشی سریع و حساس‌تر در مقایسه با دو روش دیگر می‌باشد(۴۰).

روش NASBA برای تشخیص ویروس آنفولانزای مرغی H5 رده آسیایی مورد بررسی قرار گرفته و سرعت و اختصاصی بودن بالایی از آن گزارش شده است که می‌تواند مورد استفاده برای تمایز سویه به شدت بیماری‌زاو سویه‌های ضعیف از نظر بیماری‌زایی قرار گیرد(۴۱). NASBA به طور موفقیت‌آمیزی برای تشخیص ویروس آنفولانزای فصلی نوع A و آنفولانزای مرغی نوع H5N1 A و H7N9 ارزیابی شده است(۴۲). همچنین نشان داده شده روش NASBA-ECL برای تشخیص سریع و اختصاصی آنفولانزای مرغی A/H7 می‌تواند به کار گرفته شود(۴۳). استفاده از روش Real time NASBA تجاری جهت تأیید سریع ویروس آنفولانزا A H5N1 در نمونه‌های بالینی نیز اعتبارسنجی و توسعه یافته است(۴۴). تشخیص ویروس آنفولانزای خوکی H_1N_1 نیز توسط روش Real time NASBA مورد ارزیابی قرار گرفته است و نتایج حاکی از اختصاصی بودن و حساسیت بالای این روش بوده است(۴۵). Wang و همکاران روش تغییر یافته‌ای از NASBA به عنوان روشی ساده جهت تشخیص ویروس‌های H1N1 و H3N2 و pH1N1 ارائه داده‌اند(۴۶).

۷- بیماری پنومونی مایکوپلاسمایی، باکتری مایکوپلاسما پنومونیه: حساسیت و اختصاصیت تکنیک NASBA برای تشخیص *M. pneumoniae* توسط Loens و همکاران ارزیابی شده است. نتایج نشانگر بالابودن حساسیت این روش در تشخیص این باکتری بوده است(۴۷). همچنین این گروه در تحقیقی دیگر از روش Real time-NASBA برای شناسایی این باکتری استفاده کردند، نتایج نشان داد حساسیت تشخیص *M. pneumoniae* در نمونه‌های تنفسی در مقایسه با NASBA ممکن است کمی کاهش یابد، اما استفاده از آزمون Real time در سرعت و سهولت برتر است(۴۸). متعاقباً تشخیص همزمان *M. pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae* و *Legionella spp.* با روش real time multiplex NASBA ارزیابی شد. نتیجه‌های به دست آمده نشان داد، اگرچه حساسیت روش اخیر از روش‌های گذشته کمتر است اما به لحاظ سهولت، سرعت و تعداد نمونه‌هایی که می‌تواند آنالیز شود، ابزار امیدوارکننده‌ای برای تشخیص این سه سویه در نمونه‌های تنفسی می‌باشد(۴۹).

۸- بیماری سل، باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس : تکنیک NASBA به منظور شناسایی اختصاصی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با هدف‌گیری 16SrRNa در سال ۱۹۹۳ انجام گرفته است. نتایج بیانگر این بودند که ترکیب NASBA و ELGA می‌تواند به عنوان ابزاری کارآمد به لحاظ سرعت و سهولت برای شناسایی اختصاصی گونه مایکوباکتریا مورد استفاده قرار گیرد(۵۰). گیل و همکاران در سال ۲۰۰۶ با روش NASBA-ELISA و تکثیر ژن 16SrRNA برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، توانستند کارآمدی سیستم NASBA و اختصاصیت پرایمرها برای شناسایی توبرکلوزیس را مورد تأیید قراردهند. نتایج بدست آمده از نمونه‌های بالینی حساسیت ۸۵,۷٪ و اختصاصیت ۹۶٪ را نشان داد(۱۳). با توجه به این که عوامل متعددی از جمله حساسیت آنالیتیکی روش، حساسیت تکنیک استاندارد (کشت سلول) در تعیین حساسیت یک تکنیک در یک مطالعه دخیل می‌باشند، قائمی و همکاران ترکیب روش NASBA با روش شناسایی کمی میکروپلیت هیبریداسیون را به عنوان روشی حساس در مقیاس با روش‌های مولکولی دیگر گزارش کردند(۱۲).

۹- بیماری آسپرژیلوزیس، قارچ آسپرژیلوس: طی ده‌های گذشته حساسیت و اختصاصیت NASBA برای تشخیص RNA آسپرژیلوس در نمونه‌های خونی ارزیابی شده است(۵۱). Zhao و همکاران نشان دادند Real time NASBA حساسیت بالایی دارد و برای تشخیص آسپرژیلوس مفید است(۵۲). همچنین آن‌ها از روشReal time NASBA برای تشخیص کمی، با دقت و سریع آسپرژیلوس مهاجم ریوی در مایعات ریه و لاواژ برونکوالوئولار (BAL) موش استفاده کردند(۵۳).

۱۰- بیماری مالاریا، انگل پلاسمادیوم فالسیپاروم: آزمون NASBA کمی (QT-NASBA) برای تشخیص *P. falciparum* در نمونه‌های خونی در سال ۲۰۰۰ مشخص کرد، این روش تقریباً ۱۰۰۰ بار حساس‌تر از مشاهده نمونه‌های خونی به وسیله میکروسکوپ است. QT-NASBA می‌تواند برای تشخیص مقدار بسیار ناچیز انگل در مراحل اولیه مالاریا و نظارت بر اثربخشی دارویی مفید باشد [۵۴]. در مطالعه‌ای که توسط Schneider و همکاران در سال ۲۰۰۵ به چاپ رسیده است، تکنیک‌های Real time QT-NASBA و Real time QT-PCR را برای تعیین مقدار انگل *P. falciparum* با یکدیگر مقایسه کردند. نتایج تکنیک QT-NASBA نشان داد که این تکنیک با حفظ اختصاصی بودن و حساسیت در شناسایی، باعث کاهش زمان آنالیز و خطر آلودگی می‌شود. روش Real time QT-NASBA در مقایسه با Real time QT-PCR سریع‌تر است و در مطالعاتی که نیاز به تشخیص حساس و دقیق انگل *P. falciparum* در تعداد زیادی نمونه دارد، ارجح می‌باشد(۲۰). نتایج حاصل از بررسی‌های Mens و همکاران نیز نشان دادReal time QT-NASBA روشی بسیار حساس و اختصاصی برای تشخیص، شناسایی و تعیین مقدار کمی گونه‌های پلاسمادیوم است که می‌تواند به عنوان ابزاری مناسب و مؤثر جهت مطالعات اپیدمیولوژیک و تشخیص و درمان مورد استفاده قرار گیرد(۵۵).

۱۱- بیماری لیشمانیازیس، انگل لیشمانیا: Mugasa و همکاران در سال ۲۰۱۰ از تکنیک NASBA و الیگوکروماتوگرافی برای تشخیص بیماری ناشی از لیشمانیا استفاده کردند. آن‌ها حساسیت و اختصاصیت این روش را به ترتیب ۹۳٫۳٪ و ۱۰۰٪ برای نمونه‌های خون و ۹۸٫۶٪ و ۱۰۰٪ برای نمونه‌های بیوپسی پوست بیماران مبتلا به لیشمانیازیس گزارش کردند(۱۴). Saad و همکاران نیز در مطالعه‌ای دیگر با بررسی تکنیک OC-NASBA در تشخیص لیشمانیازیس جلدی و احشایی حساسیت این روش را بسیار بالا گزارش کردند(۵۶). نیازی و همکاران حساسیت و اختصاصیت روش NASBA را برای تشخیص لیشمانیازیس جلدی بررسی کردند. در این مطالعه روش NASBA و روش RT-PCR برای تشخیص انگل لیشمانیا در نمونه‌های زخم پوستی مشکوک به لیشمانازیس مقایسه شدند که به ترتیب از حساسیت ۸۱ ٪ و ۵۱٪ و اختصاصیت ۱۰۰٪ برخوردار بودند. آن‌ها نتیجه گرفتند روش NASBA با حساسیت و ویژگی بالا به منظور شناسایی لیشمانیوز جلدی کاربرد فراوانی خواهد داشت. آن‌ها ادعا کردند که این روش قابلیت راه‌اندازی و توسعه در همه آزمایشگاه‌ها و مناطق کشور با امکانات محدود و ساده آزمایشگاهی را دارا می‌باشد(۵۷).

بحث

روش‌های تشخیصی در کشور ما، بر پایه مشاهده میکروسکوپی و کشت میکروارگانیسم انجام می‌پذیرد. روش‌های میکروسکوپی از دقت پایینی برخوردار است و کشت میکروارگانیسم‌ها هم بسیار وقت‌گیر خواهد بود، به ویژه در مورد عوامل بیماری‌زای کند رشد مثل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس(۱۲). لذا معرفی تکنیک‌های سریع‌تر و دقیق‌تر در شناسایی بیماری‌های عفونی می‌تواند به بهبود شرایط موجود کشور در حوزه تشخیص بیماری کمک شایان توجهی داشته باشد. لزوم این توجه و ارتقاء روش‌های تشخیصی به ویژه در اپیدمی‌های عفونی جایگاه ویژه‌ای می‌یابد. همچنین بهره‌گیری از روش‌های ساده‌تر در بحران‌های کلان اجتماعی چون جنگ‌های نظامی که همه نوع تجهیزات در دسترس و مهیا نیست، می‌تواند نقش مهمی ایفاء کند.

اگرچه در سالیان اخیر، در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی کشور، به این امر توجه بیشتری شده است و روش‌های مولکولی همانند PCR، در برخی از آزمایشگاه‌ها راه‌اندازی گردیده ولی همچنان این روش‌ها با وجود محاسن بسیار زیاد، مورد استقبال چندانی قرار نگرفته است(۱و۳). روش‌های تشخیص مولکولی، به دلیل برتری‌های بیشمار نسبت به روش‌های سنتی در دنیا توسعه چشمگیری یافته‌اند. در این میان روش PCR یکی از شناخته شده‌ترین و پرکاربردترین این روش‌ها می‌باشد. با وجود مزایای فراوان این تکنیک، از جمله حساسیت و دقت بالا، به دلیل نیاز به سیکل‌های حرارتی متناوب و دستگاه ترموسایکلر، راه‌اندازی آن در هر آزمایشگاهی، هزینه‌های هنگفت و به کارگیری نیروی متخصص و ماهر، به دنبال خواهد داشت(۲۰). بنابراین در بسیاری از آزمایشگاه‌ها با امکانات محدود، شرایط استفاده از این روش مهیا نخواهد شد.

امروزه روش‌های تکثیر هم‌دما، روز به روز از استقبال بیشتری برخوردار می‌شوند(۳). زیرا به جهت عدم نیاز به دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر اسیدهای نوکلئیک در این روش‌ها، شرایط راه‌اندازی آن در تمامی آزمایشگاه‌ها و در تمامی مناطق کشور حتی مناطق محروم و کم‌بهره مهیا و امکان‌پذیر است. روش NASBA، یکی از این روش‌های تکثیر هم‌دما است که RNA سلول را مورد شناسایی قرار می‌دهد.

در این روش بدون استفاده از ترموسایکلر، RNA میکروارگانیسم، تکثیر یافته، به نحوی که به راحتی با روش‌های آشکارسازی قابل شناسایی و بررسی خواهد بود. سه آنزیم Reverse transcriptase، RNase H و T7 RNA polymerase مسئول این تکثیر می‌باشند. در ابتدا با استفاده از رونویسی معکوس، یک هیبرید RNA-DNA ایجاد می‌گردد که به راحتی توسط RNase H شناسایی شده و رشته RNA از این هیبرید حذف می‌شود. به این ترتیب بدون اعمال حرارت، یک تک رشته DNA حاصل می‌شود که پرایمر دوم توانایی اتصال به آن را دارد. بعد از دو رشته شدن DNA، آنزیم T7 RNA polymerase توالی پروموتری خود را شناسایی کرده و سنتز تعداد بی‌شماری RNA آغاز می‌شود که هر کدام از آن‌ها مجدداً می‌تواند به عنوان الگو، در اختیار تکنیک قرار گیرند(۸).

براساس مطالعات صورت گرفته، امروزه کیت‌های تشخیصی بر پایه تکنیک NASBA برای ویروس HIV (*Nuclisens CMV pp67)* و ویروس CMV (*Nuclisens CMV pp67)* به طور تجاری در دنیا تولید شده و مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲, ۳۰]. گزارش‌ها حاکی از آن هستند که این تکنیک از حساسیت بسیار زیادی برخوردار است و اکثر مطالعات، حساسیت این تکنیک را بالاتر از ۹۰ درصد اعلام کردند(۵۶). در صورتی که از روش‌های آشکارسازی دقیق از جمله الیگوکروماتوگرافی، الایزا و پروب‌های نشاندار شده با رنگ‌های فلورسنت استفاده شود، اختصاصی بودن تکنیک تا ۱۰۰ درصد هم افزایش می‌یابد(۲۰).

از جمله مزیت‌های دیگر این تکنیک آن است که قابلیت شناسایی انواع مختلف میکروارگانیسم‌ها را داراست و با شناسایی RNA آن ها، قدرت تمایزدهی سلول مرده از زنده را خواهد داشت و به این ترتیب در مواردی که بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عوامل بیماری‌زا، مشکلات فراوانی در امر درمان ایجاد می‌کند، با به کارگیری این تکنیک دست‌یابی سریع و دقیق به الگوی مقاومت میکروارگانیسم امکان‌پذیر خواهد شد(۵).

در مورد ویروس‌هایی همچون HIV که ژنوم ویروس از جنس RNA است، کارایی تکنیک NASBA بیشتر نمایان می‌شود و کیت‌های تشخیصی این ویروس براساس تکنیک NASBA، امروزه دردسترس می‌باشد. در صورت شناسایی mRNAهای تأخیری در ویروس‌ها با استفاده از این تکنیک، می‌توان ویروس فعال از نظر تکثیر را شناسایی کرد و این پدیده در پیگیری روند درمان نقش بسزایی خواهد داشت.

همچنین به دلیل سادگی تکنیک و قابلیت تکثیر چندین نسخه RNA به طور همزمان، به راحتی می‌توان شناسایی چندین میکروارگانیسم مختلف را به طور همزمان و در یک آزمایش مورد بررسی قرار داد و این امر در سرعت و سهولت تشخیص بیماری‌هایی که چندین عامل بیماری‌زا در آن دخیل هستند، از ارزش بالایی برخوردار است(۵۸).

امید است با راه‌اندازی و به‌کارگیری این تکنیک ارزان قیمت، ساده و بسیار کارآمد در آزمایشگاه‌های کشور، مشکلات پیش رو در امر تشخیص و بررسی روند درمان بیماری‌های عفونی در شرایط بحرانی و اپیدمی برطرف گردد و روش‌های تشخیص مولکولی نوین فرصت ورود به عرصه سیستم تشخیصی آزمایشگاه‌های سراسر کشور را بیابند.

REFERENCES

1. Wolcott MJ. Advances in nucleic acid-based detection methods. Clinical Microbiology Reviews. 1992;5(4):370-86.
2. Gullett JC, Nolte FS. Quantitative nucleic acid amplification methods for viral infections. Clinical chemistry. 2015;61(1):72-8.
3. Mothershed EA, Whitney AM. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and future considerations for the clinical laboratory. Clinica Chimica Acta. 2006;363(1–2):206-20.
4. RodrÍGuez-LÁZaro D, HernÁNdez M, D'Agostino M, Cook N .application of nucleic acid sequence-based amplification for the detection of viable foodborne pathogens: progress and challenges. Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology. 2006;14(3):218-36.
5. Keer JT, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. J Microbiol Methods. 2003;53(2):175-83.
6. Fakruddin M, Mazumdar RM, Chowdhury A, Mannan K. Nucleic acid sequence based amplification (NASBA)-prospects and applications. Int J Life Sci Pharma Res. 2012;2:106.

7. Sheridan G ,Masters C, Shallcross J, Mackey B. Detection of mRNA by Reverse Transcription-PCR as an Indicator of Viability in Escherichia coliCells. Applied and Environmental Microbiology. 1998;64(4):1313-8.
8. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. Nature. 1991;350(6313):91-2.
9. Kievits T, van Gemen B, van Strijp D, Schukkink R, Dircks M, Adriaanse H, et al. NASBATM isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. Journal of virological methods. 1991; 35(3): 273-286.
10. Heim A, Grumbach IM, Zeuke S, Top B. Highly sensitive detection of gene expression of an intronless gene: amplification of mRNA, but not genomic DNA by nucleic acid sequence based amplification (NASBA). Nucleic Acids Research. 1998 ; 26(9): 2250–2251.
11. Guatelli JC, Whitfield KM, Kwoh DY, Barringer KJ, Richman DD, Gingeras TR. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(5):1874-8.
12. Ghaemi A, Gill P, Moradi AV, Tabaraei A. NASBA Isothermal Technique: a Novel Tool for Mycobacterium tuberculosis Diagnosis. Medical Laboratory Journal. 2010;4(1):0.-
13. Gill P, Ramezani R, Amiri MV-P, Ghaemi A, Hashempour T, Eshraghi N, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay of nucleic acid sequence-based amplification for molecular detection of M. tuberculosis. Biochemical and biophysical research communications. 2006;347(4):1151-7.
14. Mugasa CM, Laurent T, Schoone GJ, Basiye FL, Saad AA, el Safi S, et al. Simplified molecular detection of Leishmania parasites in various clinical samples from patients with leishmaniasis. Parasites & vectors. 2010;3(1):1.
15. Arnaud-Barbe N, Cheynet-Sauvion V, Oriol G, Mandrand B, Mallet F. Transcription of RNA templates by T7 RNA polymerase. Nucleic Acids Research. 1998;26(15):3550-4.
16. Ezaki T. [RNA amplification from low numbers of bacteria in human blood to solve low sensitivity problem of conventional PCR amplification]. Rinsho Byori. 2006;54(10):1055-8.
17. Wu S-JL, Lee EM, Putvatana R, Shurtliff RN, Porter KR, Suharyono W, et al. Detection of dengue viral RNA using a nucleic acid sequence-based amplification assay. Journal of clinical microbiology. 2001;39(8):2794-8.
18. Deiman B, van Aarle P, Sillekens P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). Molecular biotechnology. 2002;20(2):163-79.
19. Tai JH, Ewert MS, Belliot G, Glass RI, Monroe SS. Development of a rapid method using nucleic acid sequence-based amplification for the detection of astrovirus. Journal of virological methods. 2003;110(2):119-27.
20. Schneider P, Wolters L, Schoone G, Schallig H, Sillekens P, Hermsen R, et al. Real-time nucleic acid sequence-based amplification is more convenient than real-time PCR for quantification of Plasmodium falciparum. Journal of clinical microbiology. 2005;43(1):402-5.
21. Hønsvall BK, Robertson LJ. From research lab to standard environmental analysis tool: Will NASBA make the leap? Water Research. 2016.
22. Mellors JW, Rinaldo Jr CR, Gupta P, White RM. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. Science. 1996;272(5265):1167.
23. Shahrabi M, Forouzandeh M, Sabahi F, Paryan M. Development of NASBA-ELISA technique for detection of HIV-1 RNA. Scientific Journal of Iran Blood Transfus Organ. 2011;8(1):42-51.
24. Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. Nature. 2005;436(7053):933-8.
25. Sillekens P, Kok W, Van Gemen B, Lens P, Huisman H ,Cuypers T, et al. Specific detection of HCV RNA using NASBA as a diagnostic tool. Hepatitis C virus John Libbey Eurotext, Paris, France. 1994:71-82.

26. Damen M, Sillekens P, Cuypers H, Frantzen I, Melsert R. Characterization of the quantitative HCV NASBA assay. Journal of virological methods. 1999;82(1):45-54.
27. Mohammadi-Yeganeh S, Paryan M, Samiee SM, Kia V, Rezvan H. Molecular beacon probes–base multiplex NASBA Real-time for detection of HIV-1 and HCV. Iranian journal of microbiology. 2012;4(2):47.
28. Paryan M, Forouzandeh Moghadam M, Kia V, Mohammadi Yeganeh S, Raz A, Mirab Samiee S. A Simple and Rapid Method for the Detection of HIV-1/HCV in Co-Infected Patients. Iranian Journal of Biotechnology. 2013;11(2):74-9.
29. Blok MJ, Goossens VJ, Vanherle SJ, Top B, Tacken N, Middeldorp JM, et al. Diagnostic value of monitoring human cytomegalovirus late pp67 mRNA expression in renal-allograft recipients by nucleic acid sequence-based amplification. Journal of clinical microbiology. 1998;36(5):1341-6.
30. Hebart H, Rudolph T, Loeffler J, Middeldorp J, Ljubicic T, Jahn G, et al. Evaluation of the NucliSens CMV pp67 assay for detection and monitoring of human cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. Bone marrow transplantation. 2002 ;30(3):181-7.
31. Lanciotti R, Kerst A, Allen B. Development of a NASBA based assay for the rapid detection of west nile virus. American journal of tropical medicine and hygiene. 2000;62(3; SUPP):481.-
32. Usawattanakul W, Jittmittraphap A, Endy TP ,Nisalak A, Tapchaisri P, Looareesuwan S. Rapid detection of dengue viral RNA by nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). Dengue bulletin. 2002;26:125-30.
33. Pardee K, Green AA, Takahashi MK, Braff D, Lambert G, Lee JW, et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components. Cell. 2016;165(5):1255-66.
34. Fox JD, Han S, Samuelson A, Zhang Y, Neale ML, Westmoreland D. Development and evaluation of nucleic acid sequence based amplification (NASBA) for diagnosis of enterovirus infections using the NucliSens® Basic Kit. Journal of clinical virology. 2002;24(1):117-30.
35. Hong M, Kong H, Xing W, Fu W, Cao L, Qi S, et al. New molecular diagnosis method combined with nucleic acid sequence-based amplification and probe amplification in rapid detection of Enterovirus 71. African Journal of Microbiology Research. 2012;6(48):7459-63.
36. Saeedinia A, Shamsara M, Zeinoddini M, Sadeghi V, Maghsoudi N. Evaluation of nucleic acid sequence based amplification (NASBA) and Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction for detection of coxsackievirus B3 in cell culture and animal tissue samples. Iranian Journal of Biotechnology. 2008;6(4):222-8.
37. Samuelson A, Westmoreland D, Eccles R, Fox JD. Development and application of a new method for amplification and detection of human rhinovirus RNA. Journal of virological methods. 1998;71(2):197-209.
38. Loens K, Goossens H, De Laat C, Foolen H, Oudshoorn P, Pattyn S, et al. Detection of rhinoviruses by tissue culture and two independent amplification techniques, nucleic acid sequence-based amplification and reverse transcription-PCR, in children with acute respiratory infections during a winter season. Journal of clinical microbiology. 2006;44(1):166-71.
39. Sidoti F, Bergallo M ,Terlizzi ME, Alessio EP, Astegiano S, Gasparini G, et al. Development of a quantitative real-time nucleic acid sequence-based amplification assay with an internal control using molecular beacon probes for selective and sensitive detection of human rhinovirus serotypes. Molecular biotechnology. 2012;50(3):221-8.

40. Tillmann RL, Simon A, Müller A, Schildgen O. Sensitive commercial NASBA assay for the detection of respiratory syncytial virus in clinical specimen. PLoS One. 2007;2(12):e1357.
41. Collins RA ,Ko L-S, So K-L, Ellis T, Lau L-T, Yu ACH. Detection of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza subtype H5 (Eurasian lineage) using NASBA. Journal of virological methods. 2002;103(2):213-25.
42. Vemula SV, Zhao J, Liu J, Wang X, Biswas S, Hewlett I. Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans. Viruses. 2016;8(4):96.
43. Collins RA, Ko L-S, Fung K-Y, Chan K-Y, Xing J, Lau L-T, et al. Rapid and sensitive detection of avian influenza virus subtype H7 using NASBA. Biochemical and biophysical research communications. 2003;300(2):507-15.
44. Moore C, Telles J-N, Corden S, Gao R-B, Vernet G, Van Aarle P, et al. Development and validation of a commercial real-time NASBA assay for the rapid confirmation of influenza A H5N1 virus in clinical samples. Journal of virological methods. 2010;170(1):173-6.
45. Ge Y, Cui L, Qi X, Shan J, Shan Y, Qi Y, et al. Detection of novel swine origin influenza A virus (H1N1) by real-time nucleic acid sequence-based amplification. Journal of virological methods. 2010;163(2):495-7.
46. Wang J, Tai W, Angione SL, John AR, Opal SM, Artenstein AW, et al. Subtyping clinical specimens of influenza A virus by use of a simple method to amplify RNA targets. Journal of clinical microbiology. 2013 ; 51(10): 3324–3330.
47. Loens K, Ursi D, Ieven M, Van Aarle P, Sillekens P, Oudshoorn P, et al. Detection of Mycoplasma pneumoniae in spiked clinical samples by nucleic acid sequence-based amplification. Journal of clinical microbiology. 2002;40(4):1339-45.
48. Loens K, Ieven M, Ursi D, Beck T, Overdijk M, Sillekens P, et al. Detection of Mycoplasma pneumoniae by real-time nucleic acid sequence-based amplification. Journal of clinical microbiology. 2003;41(9):4448-50.
49. 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. Journal of clinical microbiology. 2008 ; 46(1): 185–191.
50. Gabrielle M, Schukkink RA, van Gemen B. Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) for the identification of mycobacteria. Microbiology. 1993;139(10):2423-9.
51. Loeffler J, Hebart H, Cox P, Flues N, Schumacher U, Einsele H. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification ofAspergillus RNA in Blood Samples. Journal of clinical microbiology. 2001;39(4):1626-9.
52. 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. Journal of clinical microbiology. 2010;48(4):1378-83.
53. Zhao Y, Perlin DS. Quantitative detection of Aspergillus spp. by real-time nucleic acid sequence-based amplification. Fungal Diagnostics: Methods and Protocols. 2013:83-92.
54. Schoone GJ, Oskam L, Kroon NC, Schallig HD, Omar SA. Detection and Quantification of Plasmodium falciparumin Blood Samples Using Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. Journal of clinical microbiology. 2000;38(11):4072-5.
55. Mens PF, Schoone GJ, Kager PA, Schallig HD. Detection and identification of human Plasmodium species with real-time quantitative nucleic acid sequence-based amplification. Malaria journal. 2006;5(1):80.
56. Saad AA, Ahmed NG, Osman OS, Al-Basheer AA, Hamad A, Deborggraeve S, et al. Diagnostic accuracy of the Leishmania OligoC-TesT and NASBA-Oligochromatography for diagnosis of leishmaniasis in Sudan. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(8):e776.

57. Niazi A, Koohsar F, Ghaffarifar F, Ziaei-Hezarjaribi H, Mesgarian F, Jorjani O. Sensitivity and Specificity of Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Method for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. Medical Laboratory Journal. 2014;8(2):20-6.
58. Jean J, D'Souza DH, Jaykus L-A. Multiplex Nucleic Acid Sequence-Based Amplification for Simultaneous Detection of Several Enteric Viruses in Model Ready-To-Eat Foods. Applied and Environmental Microbiology. 2004;70(11):6603-10.