Downloaded from saremjrm.com at 1:50 +0330 on Friday February 26th 2021

SJRM SAREM JOURNAL OF REPRODUCTIVE MEDICINE

Sarem Journal of Reproductive Medicine. Volume 5, Issue 1, Spring 2020: 1-9

The role of molecular genetic techniques in COVID-19 diagnosis

ARTICLE INFO

Article Type
Review

Authors

Farkhondeh Behjati[1, 2], PhD*
Leila Javanparast Sheikhani [1], M.Sc
Sara Taghizadeh [1], PhD
Tamouchin Moharrami [1], PhD
Golnoosh Goljah Rad [1], PhD
Aleme Mohammadpour [1],

[1] Sarem Fertility and Infertility Research Center (SAFIR), Sarem Women's Hospital, Iran University of Medical Science (IUMS), Tehran, Iran
[2] Genetics Research Centre, University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran, Iran.

****Corresponding Author***
Address: Sarem Women Hospital, Basij Square, Phase 3, EkbatanTown, Tehran, Iran.
Postal code:1396956111
Phone: +98 (21) 44670888
Fax: +98 (21) 44670432
fbehjati@gmail.com

Article History
Received: April 24, 2020
Accepted: May 25, 2020
e Published: January 4, 2021

ABSTRACT

Background and aims: We have encountered many epidemics such as HIV, SARS and Middle East respiratory syndrome corona viruses, Ebola virus, Zika and recently SARS-Cov-2. All these epidemics resulted from an animal to human transmission, during all these epidemics, absence of rapid and accurate molecular diagnostic testing has threatened the public health. Most tests for early detection of SARS-COV-2 RNA rely on reverse transcription-polymerase chain reaction, but isothermal mediated amplification assays and CRISPER based methods are thriving alternatives. Identification of individuals who have activated antibodies to the SARS COV-2 virus requires serological tests including enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) and lateral flow immunoassay and they can be used as complementary tests in complex cases. This report is an overview of current development in COVID 19 molecular genetic techniques and future improvement and innovation.

Conclusion: There is an ongoing race to develop more efficient laboratory techniques and cost-effective, point-of-care test kits that can be used in large scale. While RT-PCR has been the dominant technique for detection of viral RNA, other nucleic acid assays such as isothermal amplification assays, hybridization microarray assays, amplicon-based metagenomics sequencing, and recently CRISPR-related technologies are also under development.

Keywords: COVID-19, RT-PCR, CRISPER, Isothermal amplification

Copyright© 2020, ASP Ins. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License which permits Share (copy and distribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-Noncommercial terms.

Downloaded from saremjrm.com at 1:50 +0330 on Friday February 26th 2021

نقش تکنیکهای ژنتیک مولکولی در تشخیص COVID-19

فرخنده بهجتی [۱و۲]*، لیلا جوانپرست شیخانی [۱]، سارا تقی زاده [۱]، تموچین محرمی[۱]، گلنوش گل جاه راد[۱]، عالمه محمدپور[۱]

[۱] مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

[۲] مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران

کلید واژه‌ها: COVID-19، RT-PCR، کریسپر، تکثیر ایزوترمال

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۰۵

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۳/۰۵

*نویسنده مسئول: فرخنده بهجتی

چکیده

زمینه ها و اهداف: ما با اپیدمی‌های مکرری از ویروس‌ها همانند کرونا ویروس‌های عامل سندرم‌های تنفسی خاورمیانه، ۲۰۰۹، ویروس ایبولا، ویروس زیکا و ویروس اخیر یعنی COVID-19 رو به رو بوده ایم. همه‌ی این اپیدمی‌ها در اثر انتقال از یک حیوان به انسان رخ داده اند که به صورت محسوس یا غیر محسوس در جمعیت انسانی منتقل شده‌اند و در زمان وجود هریک از این اپیدمی‌ها عدم وجود یک روش تشخیص مولکولی سریع و در دسترس، سلامت عمومی را با خطر مواجه کرده است.

بیشتر آزمایشات برای تشخیص زودرس SARS-CoV-2 به واکنش زنجیره ای پلیمراز معکوس (Reverse transcription polymerase chain reaction) تکیه دارد، اما تستهای بر پایه ی تکثیر ایزوترمال و روش های مبتنی بر CRISPR، گزینه های امیدوار کننده ای هستند. شناسایی افرادی که آنتی بادی های انها علیه ویروسSARS-CoV-2 فعال شده است، نیاز به آزمایش های سرولوژیکی دارند، از جمله سنجش ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم (ELISA) و روش ایمنی سنجی جانبی و این تست ها می توانند تست های مکمل در موارد پیچیده بیماری باشند. این مقاله به بررسی تکنیک های تشخیصی ژنتیک مولکولی COVID-19 می پردازد.

نتیجه‌گیری: رقابت بر سر توسعه ی تکنیکهای آزمایشگاهی کارآمد و مقرون به صرفه و دقیق که قابلیت استفاده در مقیاس های بزرگ را داشته باشند، همچنان ادامه دارد. اگرچه تکنیک RT-PCR یک تکنیک غالب برای شناسایی RNA ویروسی است، سایر تستهای نوکلئیک اسیدی از قبیل تستهای تکثیر ایزوترمال، هیبریدیزاسیون ریز آرایه، تعیین توالی متاژنومیک بر پایه امپلیکون و اخیرا تکنیکهای بر پایه کریسپر نیز در حال توسعه و تکامل هستند.

مقدمه

کرونا ویروس‌ها (COVs) از جمله ویروس هایی هستند که در پستانداران و پرندگان به طور وسیعی مشاهده می‌شوند و عمدتا باعث بروز بیماری های تنفسی، گوارشی، و گاه بیماری های عصبی و یا هپاتیت می شوند.

عفونت ها معمولا از طریق مسیر تنفسی و یا از طریق مدفوع و مسیر دهان منتقل می شوند و عفونت های ایجاد شده می توانند حاد یا مزمن باشند. کرونا ویروس ها معمولاً برای آلوده کردن یک گونه جانوری خاص اختصاصیت یافته اند و انتقال از یک گونه به همان گونه جانوری صورت می‌پذیرد. به لحاظ تاریخی، کرونا ویروس ها به عنوان یک خانواده ویروسی جدید در دهه ۱۹۶۰، در پی کشف چندین پاتوژن جدید تنفسی انسان، رسماً شناسایی و معرفی شدند. این ویروس ها به واسطه دارا بودن ساختار هایی در سطح خود که اسپایک (SPIKE) نامیده می شوند، شناخته می شوند. تقریبا چهل سال پس از شناسایی این گروه از ویروس ها و در اواخر سال۲ ۲۰۰ و اوایل سال ۲۰۰۳ میلادی، یک کرونا ویروس، باعث بروز عوارض تنفسی شدید در انسان شد که به سارس (SARS-CoV) یا سندرم حاد تنفسی معروف شد ظهور ناگهانی SARS باعث شد تا تحقیقات جدیدی برای درک مکانیسم های اصلی تکثیر و بیماری زایی اعضای این خانواده ویروسی با هدف کنترل آنها در جهان آغاز شود. شیوع SARS-CoV باعث ابتلای ۸۰۹۶ نفر و مرگ ۷۹۴ نفرشد و درصد مرگ و میر این ویروس ۹/۸ درصد اعلام شد .پس از آن در سال ۲۰۱۲ ، مجددا ویروسی دیگری از این خانواده در منطقه خاورمیانه و بویژه در عربستان شیوع یافت که مرس (MERS -CoV) نام گرفت و در مجموع ۲۲۶۰ نفر را آلوده و مرگ ومیر ۳۵/۵ درصدی را در انسان موجب شد[۱،۲].

در دسامبر سال ۲۰۱۹، یک دسته از موارد ذات الریه، ناشی از یک β-coronavirus که به تازگی شناسایی شده بود در شهر ووهان استان هوبی کشور چین با علائم سندرم حاد تنفسی و شیوع گسترده و سریع همراه بوده و در طی چند ماه به مرحله همه گیری جهانی رسید. این ویروس هفتمین ویروس از نوع کرونا ویروسها است که در انسان ایجاد بیماری کرده است[۳،۴].

تاکسونومی و سازمان ژنومی

محققان چینی به سرعت یک بیمار مبتلا به SARS-CoV-2 را در ژانویه ۲۰۲۰ قرنطینه کرده و ژنوم ویروس را توالی یابی نمودند[۵]. مطالعات

Downloaded from saremjrm.com at 1:50 +0330 on Friday February 26th 2021

سرعت تولید مثل اولیه‌ی ویروس SARS-Cov-2 را حدود ۲,۲ تخمین زده اند[۳,۶].

کرونا ویروس ها متعلق به خانواده *Coronaviridae* و زیر خانواده *Orthocoronavirinae* هستند و در چهار جنس طبقه بندی می شوند:

- *Alphacoronaviruses (α)*
- *Betacoronaviruses (β)*
- *Gammacoronaviruses (γ)*
- *Deltacoronaviruses (δ)*

کرونا ویروس ها، پوشش دار با ژنوم تک رشته مثبت RNA با طولی در حدود ۲۶ تا ۳۲ هزار جفت باز هستند. یکی از بارز ترین ویژگی این خانواده ویروسی اندازه ژنوم آنها است. کرونا ویروس ها دارای بزرگترین اندازه ژنوم در بین تمامی ویروس های RNA دار هستند. ژنوم این ویروس ها حاوی یک ساختار کلاهک در سر ′۵ و یک دم پلی (A) در سر′۳ است که به آن اجازه می دهد تا به عنوان mRNA برای ترجمه پلی پروتئین های مورد نیاز همانند سازی عمل کند. ژن های replicase پروتئین های غیر ساختاری را رمز گذاری می کنند و دو سوم ژنوم، یعنی در حدود ۲۰kb طول دارند. یک سوم باقی مانده یعنی حدود ۱۰ kb را، ژنهای مرتبط با پروتئین های ساختاری (structural) و یا جانبی (accessory) تشکیل می دهند. ژنوم ویروسی در انتهای′۵ حاوی توالی leader و ناحیه ای غیر کد کننده (UTR) است که شامل چندین ساختار مورد نیاز برای تکثیر و رونویسی RNA است. علاوه براین، در ابتدای هر ژن ساختاری یا جانبی، توالی های تنظیم کننده رونویسی قرار دارند که برای بیان و نیز تنظیم بیان هر یک از این ژن ها ضروری هستند. UTR- ′۳ دارای ساختارهای RNA مورد نیاز برای تکثیر و سنتز RNA ویروسی است. ویروس نو ظهور SARS – CoV-2 گونه جدید از بتا کرونا ویروس ها است که ساختار ژنومی معمول کرونا ویروس ها را شامل پروتئین های ساختاری اسپایک (spike)، پوششی (Envelope)، غشایی (membrane) و نوکلئوکپسید (Neucleocapsid) و همچنین چندین پروتئین جانبی منحصر به فرد را دارا بوده که با سیستم ایمنی ذاتی میزبان تداخل می‌کند[۲,۷]. ژنوم Cov از تعداد متغیری (۱۲-۶)، ORF(open reading frame) تشکیل شده است، دو سوم از RNA ویروسی عمدتا در اولین ORF (ORF1 a/b) قرار گرفته است که دو پلی پروتئین را تحت عنوان pp1a وpp1ab را کد می‌کند در حالی که سایر ORF ها، پروتئین‌های ساختاری را کد می‌کنند[۳,۸].

یافته‌ها حاکی از آن هستند که توالی ژنومی SARS-COV2، ۹۶,۲ درصد مشابه نوع یافته شده‌ی آن در خفاش می‌باشد. براساس نتایج مربوط به توالی‌یابی ویروس و بررسی‌های تکاملی، خفاش‌ها به عنوان میزبان طبیعی ویروس در نظر گرفته شده‌اند که توسط یک حد واسط نا مشخص به انسان منتقل شده است. SARS-COV2 از آنزیم ACE2 که درواقع رسپتور آن است، برای آلوده کردن انسان استفاده می‌کند[۳,۹].

اهمیت وجود یک روش تشخیص مولکولی کارآمد

از آنجا که COVID-19 طیف وسیعی از تظاهرات بالینی را نشان می دهد، از علائم خفیف مانند آنفولانزا گرفته تا شرایط تهدید کننده حیات، مهم است که تست های تشخیصی کارآمد را در ابتدا انجام شود تا این بیماری از سایر بیماری ها تفکیک شود این مورد از قرنطینه های غیر ضروری افرادی که تست بیماری برای آنها منفی است جلوگیری کرده و مانع از گسترش بیماری توسط افرادی که تست آنها مثبت است، می‌شود. تشخیص زودهنگام به پزشکان این امکان را می دهد که سریعاً مداخلات درمانی را برای بیمارانی که در معرض خطر بیشتری برای عوارض جدی تر ناشی از بیماری COVID-19 هستند را ارائه دهند. تست های پیچیده تری که بر پایه ی توالی یابی ژنوم ویروسی هستند، ابزار اساسی برای تعیین میزان و درجه تنوع جهش های مرتبط با SARS-CoV-2 و همچنین شناسایی گونه های نوظهور ویروس به منظور تهیه واکسن های موثر بر بیماری هستند. تا زمانی که یک واکسن تجاری در دسترس نباشد، شناسایی افراد آلوده به SARS-CoV-2 ، با ظهور و یا بدون ظهور علائم و نیزافرادی که ایمنی ضد ویروسی ایجاد کرده اند، مهم است این امر این امکان را فراهم می کند تا امکان آنالیز قدرت و توان سیستم ایمنی در جمعیت عمومی فراهم شود.

به لحاظ تجاری آزمایش های تشخیصی COVID-19 به دو سته اصلی تقسیم بندی می شوند. دسته اول شامل روشهای مولکولی برای شناسایی RNA ویروسی برپایه‌ی تکنیک های زنجیره ای پلیمراز (PCR) و یا استراتژی های مبتنی بر هیبریدیزاسیون نوکلئیک اسید است. دسته دوم شامل تست های سرولوژیکی و ایمونولوژیکی هستند که تا حد زیادی وابسته به آنتی‌بادی‌ها و یا پروتئین‌های آنتی ژنیکی هستند که توسط افرادی که در معرض ویروس قرار می گیرند تولید می شود [۱۰] (تصویر۱). البته که این دو دسته از آزمایش ها نقش همپوشانی در تشخیص COVID-19 دارند. آزمایش RNA ویروسی افرادی را شناسایی می‌کند که در مرحله حاد عفونت قرار دارند. آزمایش سرولوژیک متعاقباً افرادی را شناسایی می کند که آنتی بادی هایی را علیه ویروس ایجاد کرده اند و می توانند اهداکننده بالقوه پلاسما باشند. همچنین این امکان را فراهم می کند که افراد مبتلا را مورد پیگیری قرار داد و وضعیت سیستم ایمنی آنها را در طول زمان بررسی کرد[۱۰].

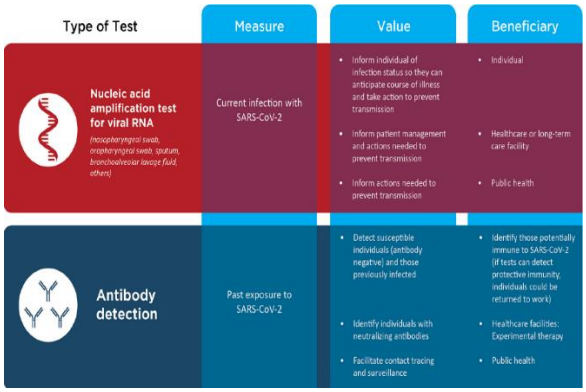
تشخیص به موقع ، درمان مؤثر و پیشگیری کلید مبارزه با COVID-19 هستند. رقابت فعلی بر سر توسعه‌ی کیتهای ازمایشگاهی مقرون به صرفه با قابلیت سرعت بالای تشخیص است.

معرفی روش های تشخیص مولکولی برای شناسایی نوکلئیک اسیدهای ویروسی

SARS-CoV-2 یک ویروس RNA دار تک رشته ای سنس مثبت است و از آنجا که کل توالی ژنتیکی آن در GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data) بار گذاری

Downloaded from saremjrm.com at 1:50 +0330 on Friday February 26th 2021

شده است، شرکت ها و گروه های تحقیقاتی یک طیفی از کیت های تشخیصی را گسترش داده اند. در دسترس بودن توالی ژنتیکی ویروس طراحی پرایمرها و پروبهای مورد نیاز برای توسعه‌ی تستهای خاص را تسهیل کرده است[۱۱]. در این قسمت ما به بررسی روندها و استراتژی های تشخیصی مولکولی COVID-19 مبتنی بر روش های مرسوم و جدید از جمله CRISPR می‌پردازیم.

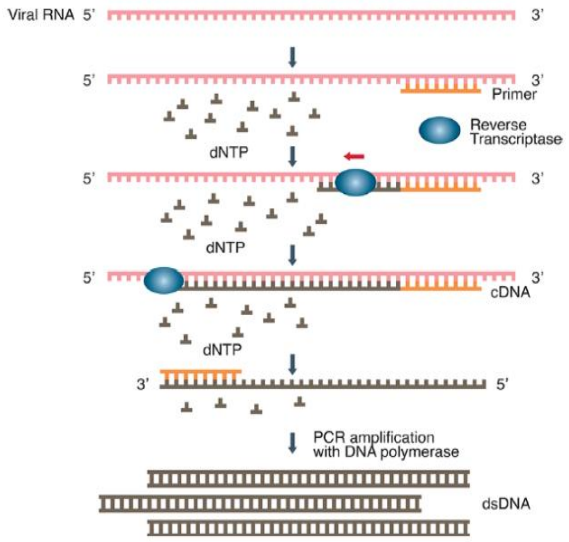


تصویر ۱. تست های مورد استفاده برای تشخیص SARS–CoV-2/COVID-19 [۱۱]

واکنش زنجیره ای پلیمراز معکوس رونویسی(RT-PCR)

RT-PCR براساس این قابلیت که قادر است مقدار اندکی از ماده‌ی ژنتیکی ویروس موجود در نمونه را تکثیر کند، عمل می کند، به عنوان یک تکنیک گلد استاندارد در شناسایی ویروس کووید ۱۹ در نظر گرفته می شود. در حال حاضر آزمایشات RT-PCR معمولاً از نمونه هایی استفاده می کنند که از قسمت فوقانی دستگاه تنفسی با استفاده از سواب جمع آوری شده اند. علاوه بر این، تعداد اندکی از مطالعات نیز با استفاده از سرم، مدفوع ، یا ترشحات چشمی انجام شده اند. (۵-۷) اخیراً آزمایشگاه ژنومیک بالینی روتگرز یک روش مبتنی بر RT-PCR را تحت عنوان Taq Path COVID19-Combo kit توسعه داده است که از نمونه های بزاق جمع آوری شده توسط خود بیمار استفاده می کند، این روش سریعتر بوده و نسبت به سایر روشهای جمع اوری نمونه بیمار متحمل درد کمتری میشود، همچنین خطر کمتری را برای کادر درمان داشته و حجم بیشتری از نمونه را در اختیار می گذارد[۱۰].

همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است ، RT-PCR با تبدیل آزمایشگاهی RNA ژنومی به DNA توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس شروع می شود. این واکنش متکی به آغازگرهای کوچک DNA که توالی های مکمل را در RNA ژنوم ویروسی شناسایی می کند و نیز آنزیم رونوشت بردار معکوس است تا بتواند یک کپی کوچک DNA (cDNA) از RNA ویروسی بسازد. در این واکنش تکثیر در زمان واقعی همانطور که واکنش PCR پیش می رود، مشاهده می‌شود که با استفاده از یک رنگ فلورسنت یا پروبی که با یک مولکول فلئورسنت لیبل شده است و نیز یک خاموش کننده (quencher)، همانند چیزی که در مورد روش TaqMan مشاهده می شود، انجام می‌شود سپس یک سیستم خودکار فرایند تکثیر را برای حدود ۴۰ چرخه تکرار می‌کند تا زمانی که cDNA ویروسی قابل مشاهده باشد و این معمولا با یک سیگنال فلوئورسنت و یا الکتریکی میسر می شود[۱۰،۱۲].



تصویر ۲. واکنش زنجیره ای پلیمراز معکوس RT-PCR . (RT-PCR) یک کپی cDNA از یک بخش خاص از RNA ویروسی ایجاد می کند که به DNA دو رشته ای (dsDNA) تبدیل شده است که بصورت نمایی تکثیر شده است.

RT-PCR به طور مرسوم به عنوان یک واکنش یک مرحله ای یا دو مرحله ای در نظر گرفته می شود. واکنش یک مرحله ای از یک میکروتیوب که شامل پرایمرهای ضروری برای انجام کل واکنش است، استفاده می کند، واکنش دو مرحله ای RT-PCR از بیش از یک میکروتیوب برای انجام جداگانه‌ی واکنشهای رونویسی معکوس و تکثیر استفاده میکند ولی نسبت به واکنش یک مرحله ای انعطاف و حساسیت بالاتری را نشان می دهد، به مواد کمتری جهت آغاز واکنش نیاز دارد و این قابلیت را دارد که بتوان c-DNA را برای سایر اهداف نگهداری کرد(۱۱). به طور معمول روش یک مرحله ای روش ارجح برای تشخیص SARS-CoV-2 است به دلیل آن که قابلیت راه اندازی سریع را دارد و نیاز چندانی به مدیریت نمونه نداشته و سریعا قابل انجام است که درنتیجه ان خطرات مربوط به پیپت کردن و آلودگی طی مراحل رونویسی معکوس و تکثیر کاهش می یابد. تا به امروز اکثر تستهای تشخیصی مولکولی از فناوری RT-PCR استفاده کرده اند که نواحی مختلف ژنوم ویروس را شامل ORF1b و یا ORF8، نوکلئو کپسید(N)، اسپایک (S)، RNA پلیمراز وابسته به DNA (RdRp) یا ژن پوششی (E) را هدف قرار داده اند[۱۳].

اگرچه RT-PCR متداول ترین روش برای شناسایی عفونت های SARS-CoV-2، است، معایبی نیز دارد که از ان جمله می توان نیاز به تجهیزات دقیق آزمایشگاهی و مهارت بسیار بالای پرسنل آزمایشگاه اشاره کرد، ، هم چنین به یک زمان چند روزه برای دریافت نتیجه نیاز است. از این رو

Downloaded from saremjrm.com at 1:50 +0330 on Friday February 26th 2021

تعدادی از شرکت ها و آزمایشگاه ها در سراسر جهان در حال تلاش برای بهبود کارایی فن آوری های RT-PCR و توسعه ی سایر تکنیک ها هستند[۱۰].

تکثیر ایزوترمال نوکلئیک اسید

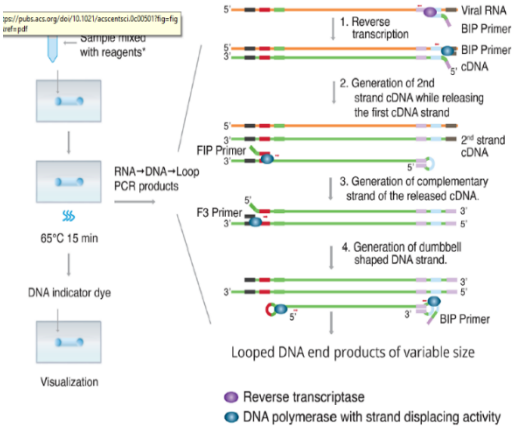
RT-PCR به تغییرات چندگانه درجه حرارت برای هر چرخه نیاز دارد که مستلزم تجهیزات دمایی پیشرفته است[۱۰]. تکثیر ایزوترمال نوکلئیک اسید، یک روش جایگزین است که اجازه ی تکثیر در دمای ثابت را می دهد و نیاز به چرخه ی دمایی را بر طرف میکند. بنابراین چندین روش برپایه ی این اصل توسعه یافته اند.

تکثیر ایزو ترمال با واسطه لوپ (RT-LAMP)

RT-LAMP به عنوان یک تست جایگزین سریع و مقرون به صرفه برای تشخیص SARS-Cov-2 گسترش یافته است. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، RT-LAMP به ۴ پرایمر خاص برای ژن یا ناحیه ی هدف نیاز دارد تا حساسیت را افزایش داده و LAMP را با یک مرحله رونویسی معکوس به منظور شناسایی RNA ترکیب می کند. محصول این تکثیر می تواند به وسیله فوتومتری مشاهده شود که میزان کدورت ایجاد شده به وسیله منیزیم را اندازه می گیرد. این واکنش را می توان در زمان واقعی به وسیله ی اندازه گیری میزان کدورت یا نور فلورسانس با استفاده از رنگ های اینترکاله شونده مورد بررسی قرار داد. از آنجا که آزمایش تشخیصی RT-LAMP در زمان واقعی به حرارت و بررسی بصری نیاز دارد، سادگی و حساسیت این تکنیک آن را به یک کاندید امیدوار کننده برای شناسایی ویروس تبدیل کرده است[۱۴].

تعداد اندکی از تستهای مولکولی در دسترس برای شناسایی SARS-CoV2 از تکنیک RT-LAMP استفاده می کنند. این تست سریع است (۱۳ دقیقه یا کمتر) و برای تشخیص RNA ویروسی از سواب های دستگاه تنفسی فوقانی استفاده میکند، اما محدود به یک نمونه در هر ران است[۱۰].

تست RT-LAMP پیشنهادی توسط ژانگ و همکاران، از ریورس ترانسکریپتاز برای تبدیل RNA ویروسی به cDNA استفاده می کند که متعاقبا توسط DNA پلیمراز وابسته به DNA برای تشخیص سریع کلرومتریک با یک رنگ متصل شونده به DNA تکثیر می‌شود . این آنزیم یک DNA پلیمراز هدایت شده به وسیله RNA در این سیلیکو است که به یک آپتامر که فعالیت RTx را زیر ۴۰ درجه سانتیگراد مهار می کند، متصل می‌شود. LAMP کلریمتریک در شناسایی RNA ویروسی در لیزهای سلولی در سطوح تقریبی ۴۸۰ کپی RNA موثر است و یک روش سریع و ساده جهت جایگزینی با RT-PCR است[۱۰].



تصویر۳. تکثیر معکوس با واسطه لوپ (loop-mediated isothermal amplification)

تکثیر با واسطه واسطه رونویسی (Transcription-Mediated Amplification) (TMA))

TMA یک تک لوله انحصاری برای تکثیر ایزوترمال است که در مرحله ی پس از همانند سازی رتروویروسی برای تکثیر نواحی خاصی از DNA یا RNA با کارایی بیشتری نسبت به RT-PCR مورد استفاده قرار می گیرد. در این روش از یک ترانسکریپتاز معکوس رتروویروسی و RNA پلیمراز T7 استفاده می‌شود و برای شناسایی نوکلئیک اسیدها از چندین پاتوژن مورد استفاده قرار می‌گیرد. پلتفرم Panther Hologic's fusion این قابلیت را دارد که هردو مراحل مربوط به RT-PCR و TMA را انجام دهد[۱۰].

به دلیل کارایی بالای آن (حداکثر ۱۰۰۰ تست در ۲۴ ساعت)، یک روش متمایز بوده و این قابلیت را دارد که به طور همزمان سایر ویروس های تنفسی شایع که علائم آن با COVID-19 هم پوشانی دارد را با استفاده از همان نمونه بیمار مورد بررسی قرار دهد. مرحله اول شامل هیبریدیزاسیون RNA ویروسی به یک پروب خاص و اولیگونوکلئوتیدهایی است که شامل پرایمر پروتومر T7 هستند ، که بر روی میکرو ذرات مغناطیسی به دام می افتند. سپس RNA هدف به دام افتاده که با پروموتور T7 هیبرید شده است، به یک cDNA رونویسی میشود. متعاقبا فعالیت RNaseH مربوط به ترنسکریپتاز معکوس، رشته RNA هدف را از داپلکس RNA-cDNA جدا کرده و فقط یک تک رشته c-DNA باقی می‌ماند، که شامل پروموتور T7 می باشد. از یک پرایمر اضافی جهت ایجاد DNA دو رشته ای استفاده می‌شود. که متعاقبا توسط RNA پلیمراز T7 به امپلیکونهای RNA تبدیل می‌شود. این امپلیکونهای جدید RNA سپس وارد فرایند TMA می‌شوند و این تکثیر نهایی بیلیونها امپلیکون RNA را در کمتر از یک ساعت ایجاد می‌کند. فرایند شناسایی با استفاده از هیبرید شدن نوکلئیک اسید تک رشته ای به امپلیکون RNA انجام می‌شود. این فرایند وابسته به یک فلوروفور و خاموش کننده است. وقتی نوکلئیک اسید

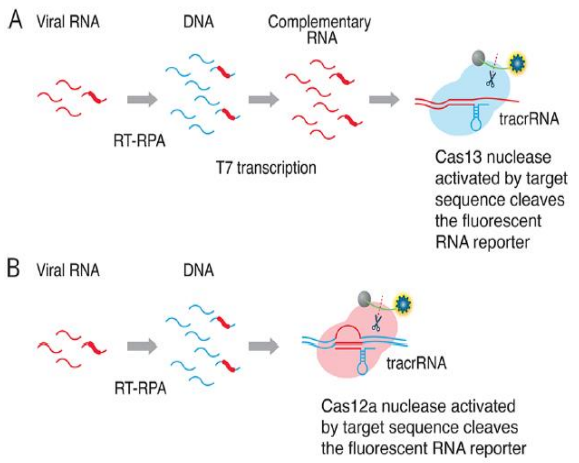
Downloaded from saremjrm.com at 1:50 +0330 on Friday February 26th 2021

با RNA تک رشته ای هیبرید می‌شود، فلوئوفور این قابلیت را دارد که در اثر برانگیخته شدن، سیگنال ایجاد کند[۱۰].

تشخیص های مبتنی بر استفاده از کریسپر

تکرارهای خوشه ای بین ژنی پالیندرومی کریسپر یک خانواده از توالی های نوکلئیک اسیدی هستند که در ارگانیسم های پروکاریوتی مانند باکتری ها یافت شده اند. این توالی ها می توانند به وسیله ی یک دسته از آنزیم های باکتریایی که آنزیم های مرتبط با کریسپر نامیده میشوند، شناسایی و بریده شوند برای مثال Cas9، Cas12 و Cas13. آنزیم های خاصی از خانواده Cas12 و Cas13 می توانند برای هدف قرار دادن و بریدن توالی RNA ویروسی برنامه ریزی شوند.

دو شرکت Mammoth Biosciences و Sherlock Biosciences که توسط بنیان گذاران کریسپر تاسیس شده اند، به طور مستقل بر روی احتمال استفاده از ویرایش ژنی توسط کریسپر برای شناسایی SARS-Cov-2 تحقیق میکنند. روش SHERLOCK که به وسیله‌ی Sherlock Biosciences توسعه یافته است، از Cas13 استفاده میکند که قادر است است توالی های RNA گزارشگر را در پاسخ به یک RNA هدایتگر ویژه SARS-CO2 برش بزند. تست تشخیصی مربوط به Mammoth Biosciences بر برش RNA گزارشگر توسط Cas12a تکیه دارد که به طور اختصاصی توالی مربوط به ژنهای E و N را شناسایی کرده و به دنبال آن تکثیر ایزوترمال ناحیه‌ی هدف انجام شده و منجر به مشاهده ی ان با استفاده از یک فلوئوفور میشود[۱۰،۱۵]. این روشهای مبتنی بر کریسپر همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است به ابزار پیچیده ای نیاز نداشته و با استفاده از نوارهای کاغذی، وجود ویروس بدون از دست رفتن حساسیت و اختصاصیت قابل تشخیص است. این تست ها از نظر زمانی و از نظر هزینه مقرون به صرفه بوده و در کمتر از یک ساعت قابل انجام هستند.



تصویر ۴- دو روش جایگزین مبتنی بر کریسپر برای شناسایی RNA ویروسی
A، تست SHERLOCK و B، تست DETECTOR

تکثیر به روش دایره غلطان (Rolling Circle Amplification)

یک روش ایزوترمال دیگر روش دایره غلطان (RCA) است که توجه زیادی را در دسته تستهای مبتنی بر تشخیص نوکلئیک اسیدی به خود جلب کرده است، زیرا این روش قادر است ۱۰۹ سیگنال تکثیر را در هر دور در کمتر از ۹۰ دقیقه ایجاد کند. RCA از این جهت دارای مزیت است که می‌تواند در شرایط ایزوترمال و با حداقل مواد انجام شود و همچنین از ایجاد نتایج مثبت کاذب که روشهای مبتنی بر PCR با آن مواجه می‌شوند جلوگیری میکند. یک روش RCA تشخیصی SARS-COV در دوفاز جامد و مایع برای آزمایش نمونه های دستگاه تنفسی مورد استفاده قرار گرفت[۱۶]. این روش هنوز به عنوان یک روش تشخیصی SARS-CoV-2 توسعه نیافته است.

هیبریدیزاسیون نوکلئیک اسید با استفاده از میکرو آرایه (Nucleic Acid Hybridization Using Microarray)

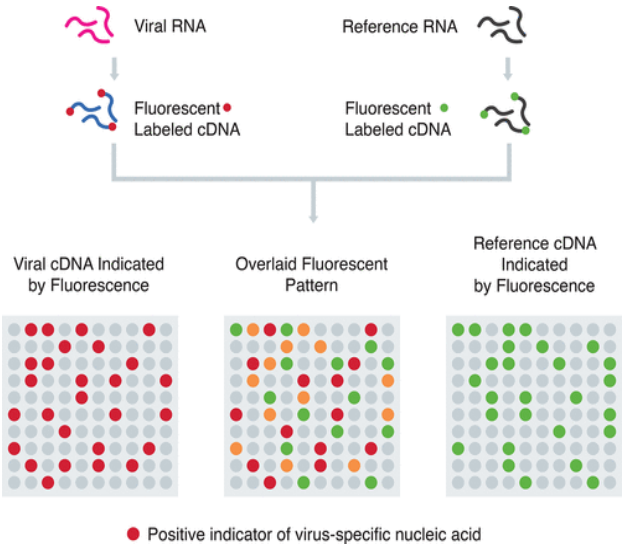
هیبریدیزاسیون اسید نوکلئیک با استفاده از روش ریزآرایه برای تشخیص سریع و با کارایی بالای اسیدهای نوکلئیک SARS-CoV استفاده شده است. همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است این روشها تکیه بر تولید cDNA از RNA ویروسی، رونویسی معکوس و به دنبال ان نشانه دار کردن cDNA با پروبهای خاص دارند. cDNA های نشان دار شده سپس در داخل چاهک هایی که در دارای اولیگو نوکلئوتیدهای تثبیت شده در سطوحشان هستند، قرار می‌گیرند. بعد از اینکه نوکلئوتیدهای متصل نشده شسته شدند، سیگنالی منوط بر حضور نوکلئیک اسید ویروسی تولید می‌شود[۱۰،۱۷]. تستهای مبتنی بر ریز آرایه درشناسایی جهش های مرتبط با SARS-CoV کارامد بوده و برای شناسایی ۲۴ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی(SNP) مرتبط با جهشهای نواحی ژن اسپایک(S) SARS-CoV با دقت ۱۰۰ درصد به کار می رود[۱۰،۱۸]. قابلیت شناسایی گونه های نوظهور SARS- CoV همانطور که پاندمی COVID 19 گسترده تر می‌شود، اهمیت می یابد و روشهای تشخیصی مبتنی بر ریز آرایه یک پلتفرم را برای تشخیص سریع گونه های جدید ایجاد شده در نتیجه تنوع ژنتیکی را فراهم میکند. اگرچه یکی از معایب مربوط به تکنیک ریز آرایه هزینه بالای ان است، یک نوع تکنیک آرایه ی اولیگونوکئوتیدی غیر فلوئورسنت با قابلیت شناسایی گونه های چند گانه کرونا ویروس ها با حساسیتی برابر R.TPCR گسترش یافته است[۱۹]. علاوه بر این از یک پلتفرم پورتابل تشخیصی بر اساس چیپهای ریز آرایه برای تشخیص نوکلئیک اسیدهای ویروس های MERS همانند آنفولانزا استفاده شده است[۲۰].

توالی یابی متاژنومیک بر پایه ی امپلیکون

این روش تشخیصی برای شناسایی SARS-CoV-2 است که بریک رویکرد دوگانه شامل استفاده از تعیین توالی برپایه امپلیکون علاوه برتعیین توالی متاژنومیک تکیه دارد. تعیین توالی متا ژنومیک اساسا برای تعیین میکروبیوم افراد آلوده استفاده می‌شود. این روش این قابلیت را دارد که به سرعت هم ویروس SARS-Cov-2 و هم سایر پاتوژن هایی را که

Downloaded from saremjrm.com at 1:50 +0330 on Friday February 26th 2021

منجر به ایجاد عفونتهای ثانویه ای می‌شوند که علایم COVID 19 را تشدید می کنند، شناسایی کند. توالی یابی بر پایه امپلیکون امکان ردیابی علایم بیمار ، بررسی اپیدمیولوژی مولکولی و مطالعه تکامل ویروس را امکان پذیر می‌کند. رویکردهای متاژنومیکی شامل Sequence-independent single primer amplification (SISPA) امکان بررسی هایی را درواگرایی توالی ویروس فراهم می‌کند. این تکنیک کمک می‌کند تا بتوان سرعت جهش و همچنین نوترکیبی های احتمالی ان را با سایر کرونا ویروسهای انسانی مورد بررسی قرار دارد که این مورد در تهیه واکسن و میزان کارایی آنتی ویروسی آن حائز اهمیت است. تکنیک های تعیین توالی بر اساس امپلیکون و متاژنومیک MinION توسط More و همکاران برای توالی یابی سریع (۸ ساعت) ژنوم SARS-Cov-2 وسایر میکروبیوم های موجود در سواب های مجاری تنفسی از بیماران مبتلا به بیماری استفاده شد[۲۱]. این گروه در روش امپلیکون محور ۱۶ پرایمری را که به نواحی حفاظت شده ژنوم ویروس متصل می‌شوند را به منظور تکثیر متوالی قطعات ۱۰۰۰bp با نواحی همپو شان ۲۰۰ bp انتخاب کردند. سپس این پرایمرها برای ایجاد ۳۰ امپلیکون از c-DNA مورد استفاده قرار گرفته و در نهایت توسط MinIOn توالی یابی شدند. یک روش تعیین توالی بر اساس تعیین توالی نسل بعد به وسیله شرکت ایلومینا توسعه یافته است که نه تنها قابلیت این را دارد وجود گونه های مختلف کروناویروس را تشخیص دهد، بلکه قابلیت تشخیص ارگانیزم های پاتوژن موجود در نمونه های پیچیده را نیز دارد.



تصویر۵. هیبریدیزاسیون نوکلئیک اسید با استفاده از ریز آرایه. cDNA ویروسی و cDNA رفرنس با استفاده از لیبل های فلئورسنت مختلف ترکیب شده و در داخل چاهک های ریزآرایه پوشانده شده با پروب های خاص DNA قرار می گیرند [۱۰].

بحث و نتیجه گیری

در حالی که به لحاظ علمی روشهای مولکولی مختلفی برای شناسایی نوکلئیک اسید های ویروسی ارائه شده است، بیشتر تشخیص های کنونی تکیه بر استفاده از RT-PCR و تکثیر ایزوترمال نوکلئیک اسید دارند. به دلیل وجود نیاز ضروری برای تشخیص COVID-19 تولید کنندگان، آزمایشگاه های تجاری و آزمایشگاه های مولکولی می‌توانند از FDA در خواست تایید برای تستهایشان را جهت مقاصد تشخیصی بکنند. تستهایی که مجوز FDA را دریافت می‌کنند، باید به لحاظ آنالاتیکی تایید شوند و تحت شرایط ایده ال و با استفاده از نمونه های مثبت و کنترل های منفی تایید شده توسعه یافته باشند.

از ۱۱۲ تست مولکولی در دسترس ۹۰ درصد از تکنولوژی PCR یا RT-PCRT، ۶ درصد از تکنولوژی های مربوط به تکثیر ایزو ترمال، ۲درصد از تکنولوژی های هیبریدیزاسیون و ۲ درصد نیز نیز از تکنیکهای بر پایه CRISPER استفاده می‌کنند. برخی از این تست ها کارایی بالایی(high-throughput) داشته و قادرند نتیجه را در زمان کوتاهی ارائه دهند و بنابراین در خواست برای اینگونه تست ها زیاد است.

در حالی که طی ماه های پیشین شاهد توسعه ی سریع کیتهای تشخیصی برای COVId-19 بوده ایم، رغابت برای یافتن تکنیکهای آزمایشگاهی کارآمد تر، مقرون به صرفه تر و دقیق تر همچنان ادامه دارد. این مقاله مروری بر روشهای ژنتیکی مولکولی موجود برای تشخیص COVID-19 بود. در حالی که تکنیک RT-PCR تکنیک غالب مورد استفاده برای شناسایی عفونت ویروسی است، سایر تکنیکه از قبیل تکثیر ایزوترمال، تستهای هیبریدیزاسیون ریز آرایه ، توالی یابی متاژنومیک بر پایه امپلیکون و تکنولوژی های نوظهور برپایه CRISPER نیز در حال توسعه هستند.

کارایی این تست ها نیز به طور قابل توجهی در حال افزایش است و تست های جدیدتر در مراحل مختلف تاییدشان توسط FDA هستند همچنین کیتهای تشخیصی دقیق تر و با سرعت جوابدهی بیشتر و بدون نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی پیچیده در حال توسعه هستند. ضرورت تشخیص سریع و دقیق SARSCov-2 یک امر حیاتی در سیستم سلامت جهانی بوده و از زمان پیدایش این پاندمی در حال تکامل و گسترش بوده است. همچمنین تستهای سرولوژیکی و ایمونولوژیکی در افراد آلوده بدون علائم و دارای علائم و افرادی که تماس نزدیک با این بیماران دارند، تقاضای بالایی دارند. علاوه بر اینکه این تستها مکمل تستهای مولکولی ژنتیک به ویژه در موارد مشکوک هستند، این نوع از تستها اطلاعات ارزشمندی را در مورد نحوه ی عملکرد سیستم ایمنی در اختیار می‌گذارند و متعاقب ان میتوانند در کارآزمایی های بالینی مربوط به تهیه واکسن نقش مهمی داشته باشند. نتایج حاصل از این تستها می تواند در ارزیابی های اپیدمیولوژیک کمک کننده باشد، هر چند گمانه زنی هایی در مورد حساسیت و اختصاصیت تستهای سرولوژیک وجود دارد.

به طور خلاصه پیشرفت قابل توجهی در زمینه توسعه تستهای تشخیصی صورت گرفته هر چند سوالات و چالشهایی دراین رابطه هنوز مطرح هستند. تلاشها در سطح جهانی برای تسهیل و توسعه تستهای جدید در

Downloaded from saremjrm.com at 1:50 +0330 on Friday February 26th 2021

حال انجام است و موسسات مختلفی در حال پشتیبانی از این کوشش ها جهت تولید و تایید روشهای تشخیصی جدید هستند. به نظر می‌رسد با توسعه دانش در این زمینه تکنولوژی های تشخیص جدیدی در آینده ظهور کنند.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از کلیه متخصصان و پزشکانی که بیماران را به آزمایشگاه سیتوژنتیک ارجاع دادند، از پرسنل آزمایشگاه سیتوژنتیک بیمارستان صارم وخانواده های ارجاعی کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تاییدیه اخلاقی:

این طرح مورد تایید کمیته اخلاق (IEC) مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صارم قرار گرفت

تعارض منافع:

در این مطالعه تعارض منافع وجود نداشت.

منابع مالی:

این طرح با پشتیبانی مالی مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صارم انجام پذیرفت.

منابع

1. Wang Z, Dai Z, Pan Y, Wu S, Li Z, Zuo C. Biochemical and Biophysical Research Communications E3 ubiquitin ligase DTX4 is required for adipogenic differentiation in 3T3-L1 preadipocytes cell line. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2017;492(3):419–24. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.083
2. Особенности Использования Фразеологизмов В Эпопее «Красное Колесо» А. И. Солженицына(На Материале Узла 1 «Август Четырнадцатого» И Узла 2 «Октябрь Шестнадцатого»). Вестник Российского Университета Дружбы Народов Серия Вопросы Образования Языки И Специальность. 2015;2(3):1–8.
3. Guo Y, Cao Q, Hong Z, Tan Y, Chen S, Jin H, et al. The origin , transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. 2020;1–10.
4. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. Nat Med. 2020;26(4):450–2.
5. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- research that is available on the COVID-19 resource centre - including this for unrestricted research re-use a. 2020;(January).
6. Riou J, Althaus CL. Pattern of early human-to-human transmission of Wuhan 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), December 2019 to January 2020. 2020;(December 2019):1–5.
7. Whelan J, Editors MWM, Walker JM. Mitochondria IN Series Editor. 2015. 1–23 p.
8. Song Z, Xu Y, Bao L, Zhang L, Yu P, Qu Y, et al. From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. Viruses. 2019;11(1).
9. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature [Internet]. 2020;579(7798):270–3. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7
10. Carter LJ, Garner L V., Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. ACS Cent Sci. 2020;591–605.
11. Patel R, Babady E, Theel E, Storch G, Pinsky B, George K, et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 COVID-19. MBio. 2020;11(2):1–5.
12. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. Biotechniques. 2008;44(5):619–26.
13. Wong ML, Medrano JF. One-Step Versus Two-Step Real- Time PCR. 2005;39(1):75–85.
14. Escher C, Lochmüller H, Fischer D, Frank S, Reimann J, Walter MC, et al. Reverse protein arrays as novel approach for protein quantification in muscular dystrophies. Neuromuscul Disord [Internet]. 2010;20(5):302–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2010.02.017
15. Davies K, Barrangou R. COVID-19 and the CRISPR Community Response. Cris J. 2020;3(2):66–7.
16. Wang B, Potter SJ, Lin Y, Cunningham AL, Dwyer DE, Su Y, et al. Rapid and sensitive detection of

Downloaded from saremjrm.com at 1:50 +0330 on Friday February 26th 2021

severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification. J Clin Microbiol. 2005;43(5):2339–44.

17. Chen Q, Li J, Deng Z, Xiong W, Wang Q, Hu YQ. Comprehensive detection and identification of seven animal coronaviruses and human respiratory coronavirus 229E with a microarray hybridization assay. Intervirology. 2010;53(2):95–104.
18. Guo X, Geng P, Wang Q, Cao B, Liu B. Development of a single nucleotide polymorphism DNA microarray for the detection and genotyping of the SARS coronavirus. J Microbiol Biotechnol. 2014;24(10):1145–454.
19. De Souza Luna LK, Heiser V, Regamey N, Panning M, Drexler JF, Mulangu S, et al. Generic detection of coronaviruses and differentiation at the prototype strain level by reverse transcription-PCR and nonfluorescent low-density microarray. J Clin Microbiol. 2007;45(3):1049–52.
20. Cots JM, Alós J, Bárcena M, Boleda X. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . 2020;(January).
21. Moore SC, Penrice-randal R, Alruwaili M, Dong X, Pullan ST, Carter DP, et al. 1,4,12. 2020;1–15.