REVIEW ARTICLE

# *A Review on Molecular Typing Methods for Aspergillus Species*

Sadegh Khodavaisy[1,2],
Sassan Rezaie[3],
Mandana Ahmadi[4],
Zahra Hassanpour[5],
Reyhaneh Roshan[6],
Mahsa Falahatinejad[7],
Mehrnaz Mohammad Davoudi[8],
Hamid Badali[9]

[1] Lenturer, Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
[2] PhD Student in Medical Mycology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] PhD Student in Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Shiraz Branch, Shiraz, Iran
[5] MSc in Microbiology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, North of Tehran Branch, Tehran, Iran
[6] MSc in Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran
[7] MSc student in Medical Parasitology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[8] Medical Student, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[9] Assistant Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Invasive Fungi Research Centre, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received December 6, 2014 ; Accepted August 22, 2015)

## *Abstract*

Conidia of *Aspergillus* species are widely distributed and ubiquitous in outdoor and hospital environments. There are high numbers of patients with weakened immune systems, therefore Aspergillus infections are increasing in hospitals. Molecular typing of Aspergillus strains obtained from patients and their environment is an important tool for epidemiological and public health studies. Fingerprinting for *Aspergillus* species especially *fumigatus* and *flavus* adjusted from respiratory samples and environment requires high quality typing methods. In recent years several molecular typing methods have been established for different *Aspergillus* species. These methods are more useful than conventional methods and are of great importance due to being more practically accessible, easy to use, having high ability in diagnosis, repeatable and sensitive to change in one laboratory and between different laboratories, and easy interpretation of data. Today accurate typing methods include Multilocus Sequence Typing (MLST) and micro satellites. In ccurrent review different molecular methods for *Aspergillus* species genotyping are discussed to obtain a better insight into epidemiology of this pathogen.

***Keywords:*** *Aspergillus* species, molecular typing, Epidemiology

**J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(129): 165-180 (Persian).**

Archive of SID

www.SID.ir

مجـلـــه دانـشـگاه عـــلـــوم پـــزشـکـــی مـــازنـــدران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۹ مهر سال ۱۳۹۴ (۱۸۰-۱۶۵)

# مروری بر کاربرد روش‌های تایپینگ مولکولی در گونه های آسپرژیلوس

صادق خداویسی[۱،۲]
ساسان رضایی[۳]
ماندانا احمدی[۴]
زهرا حسن پور[۵]
ریحانه روشن[۶]
مهسا فلاحتی نژاد[۷]
مهرناز محمد داودی[۸]
حمید بدلی[۹]

## چکیده

اسپورهای قارچ آسپرژیلوس به طور گسترده‌ای توسط هوا در محیط پراکنده می‌شوند. به دلیل افزایش تعداد بیماران با سیستم ایمنی ضعیف عفونت‌های ناشی از آسپرژیلوس یک مشکل در حال گسترش در بیمارستان‌ها می‌باشد. تایپینگ مولکولی گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از محیط و ضایعات بالینی دیدگاه‌های جدیدی را در مسائل مهم بهداشت عمومی و اپیدمیولوژیک فراهم می کند. انگشت نگاری گونه‌های آسپرژیلوس به خصوص فومیگاتوس و فلاووس از نمونه‌های تنفسی و از محیط نیازمند تکنیک‌های تایپینگ با قدرت تفکیک بالا می‌باشد. در سال‌های اخیر، روش‌های مولکولی مختلفی برای تایپینگ گونه‌های مختلف آسپرژیلوس توصیف شده است. این روش‌ها از جنبه های تکرار پذیری، جابه جایی، و تبادل اطلاعات تایپینگ بسیار مفید می‌باشند. علاوه بر امکان‌پذیری عملی، استفاده آسان، قدرت شناسایی بالا، تغییرپذیری و تکرارپذیری در آزمایشگاه و میان آزمایشگاه‌های مختلف و تفسیر معتبر و آسان داده‌ها در تکنیک‌های مختلف تایپینگ بسیار مهم هستند. روش‌های دقیق تایپینگ تا به امروز تایپینگ توالی چندلوکوس (MLST) و تایپینگ مبتنی بر میکروستلایت‌ها می‌باشند. در این مطالعه انواع روش‌های مولکولی برای آنالیز ژنوتایپینگ گونه‌های آسپرژیلوس به منظور درک اپیدمیولوژی این قارچ‌های پاتوژن فرصت طلب مورد بحث قرار می گیرد.

**واژه های کلیدی:** گونه‌های آسپرژیلوس، روش‌های تایپینگ، اپیدمیولوژی

## مقدمه

گونه‌های آسپرژیلوس غالبا در خاک، آب، گیاهان درحال فساد و بقایای آلی موجودات زنده وجود دارند. این قارچ به طور گسترده‌ای توانایی تولید اسپور دارد و اسپورها به آسانی توسط هوا در محیط پراکنده می‌شوند(۱). در

**مولف مسئول: حمید بدلی**- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail:badalii@yahoo.com
۱. مربی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۲. دانشجوی دکترای قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴. دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران
۵. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۶. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران.
۷. دانشجویی کارشناس ارشد قارچ شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۸. دانشجوی دکتری حرفه ای، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۹. استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۹/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۳/۹/۱۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۵/۳۱

Archive of SID
www.SID.ir

نتیجه حضور گسترده این قارچ، احتمالا انسان به طور دائم درمعرض اسپورهای آسپرژیلوس قرار دارد. آسپرژیلوس‌ها در افـراد بـا سیسـتم ایمنـی ضـعیف شـده مـی‌توانـد سـبب ایجـاد بیمـاری کشـنده‌ی آسـپرژیلوزیس مهـاجم (Invasive Aspergillosis-IA) شود(۲). به دلیل افزایش تعداد بیماران با پیوند مغز استخوان و یا پیونـد انـدام‌هـای دیگر و هم‌چنین به دلیل درمان با کورتیکواسـتروییدها، IA یـک مشـکل در حـال گسـترش در بیمارسـتان‌هـا مـی‌باشـد(۴،۳). کلـونیزه شـدن آسـپرژیلوس در قسـمت پایینی مجاری تنفسی برای بیمار به خصوص در بیمـاران مبتلا بـه بیمـاری ریـوی مـزمن (مثـل فیبـروز کیسـتیک، بیماری انسدادی مزمن ریه و سـل غیـر فعـال) خطرنـاک می باشـد، زیـرا سـبب عفونـت‌هـای ریـوی پیشـرونده یـا منتشره می‌شود. چندین گونه آسپرژیلوس به عنـوان عوامـل مولد بیماری در انسان شناخته شده‌اند. اکثر عفونـت‌هـای آسپرژیلوزیس مهاجم (حدود ۸۰ درصـد) توسـط گونـه آسپرژیلوس فومیگاتوس ایجاد می‌شـود و دومـین گونـه شایع بیماری‌زا آسپرژیلوس فلاووس و به میـزان کـم‌تـر، آسـپرژیلوس نیجـر و آسـپرژیلوس ترئـوس اسـت(۵). فعالیـت‌هـای سـاختمانی و عملیـات سـاخت و تخریـب سبب افزایش شدید اسپور های قارچی هوا مـی‌شـود کـه به نوبه خود از دلایل اصلی احتمال عفونت‌های ناشـی از آسپرژیلوس در بیمـاران مسـتعد مـی‌باشـد(۶). هـم‌چنـین شـرایط جغرافیـایی از جملـه آب و هـوا از عوامـل مهـم تعیـین‌کننـده شـیوع عفونـت‌هـای ناشـی از آسـپرژیلوس می‌باشد. در کشورهایی با شرایط آب و هوایی خشک و نیمه خشـک ماننـد عربسـتان سـعودی، سـودان و تـونس گونـه آسـپرژیلوس فـلاووس عامـل اتیولـوژیکی اصـلی آسپرژیلوزیس مهاجم می‌باشد(۱۱-۷). شیوع عفونت‌های ناشی از قارچ آسپرژیلوس در بیماران دچار نقص ایمنـی رو به افزایش است. بیماران در بخش‌های اونکولـوژی و ICU از طریق منابع مختلفی به خصوص از طریق دستگاه تنفسی در تماس با گونه‌های آسپرژیلوس هسـتند کـه در صورت عدم پیشگیری، تشـخیص و درمـان بـه موقـع بـه پیشرفت بیماری در این بیماران منجر مـی‌شـود(۷). بقـای بیماران مبتلا به این بیماری به طور کلی کم و در حـدود ۳۰ تا ۵۰ درصـد اسـت کـه اکثـراً بـه علـت عـدم اثبـات تشخیص بیماری در مراحل اولیه آلودگی و عدم شـروع زود هنگام درمان های ضد قارچی می‌باشد. هرچنـد کـه در گذشته موارد بیماری‌های قارچی کشـنده معمـولاً بـه طور تک‌گیـر وجـود داشـت، ولـی امـروزه بـا توجـه بـه افزایش جمعیت بیماران مستعد ابتلا، بـا افـزایش مـوارد عفونت مواجه می‌باشیم(۱۱،۱۰). لذا بررسی توزیع و ارتبـاط بین عوامل پاتوژن و محیطی در بررسی‌های اپیدمیولوژی و همچنـین تعیـین منـابع بیمارسـتانی جهـت کنتـرل و پیشگیری هدفمند عوامل قارچی مفید می‌باشد(۱۳). استفاده از روش‌هـای مولکـولی و تایپینـگ مولکـولی گونـه‌هـا یـا توانایی تشخیص بین ایزوله‌های غیر وابسته به کلنی یـک ابـزار کارآمـد در آزمایشـگاه هـای میکـروب شناسـی و شناسـایی اپیـدمی‌هـای بیمارسـتانی مـی‌باشـد(۱۴). لـذا از مهم‌ترین دلایل استفاده تایپینگ گونه در قـارچ‌شناسـی، مانیتورینـگ بیمـاران و پیگیـری درمـان، آنـالیز بـروز و شیوع مانیتورینـگ محیطـی و مطالعـه اپیـدمیولوژی‌هـای جهانی و منطقه‌ای بیماری‌های قارچی مـی‌باشـد. امـروزه اسـتفاده از روش‌هـای جدیـد بـر پایـه DNA بـه جـای ویژگی‌های فنوتیپی بـه طـور چشـمگیری مـورد اسـتقبال قرار گرفته اسـت(۱۳،۱۲). روش‌هـای تایپینـگ مولکـولی متعـددی از جملـه روش هـای متنـوع انگشـت نگـاری DNA مانند الکتروفورز آنزیم مولتی لوکـوس[1]، RFLP[2] هیبریداسیون DNA هضم شده با اندونوکلئاز با پروب‌هـای DNA[3]، RAPD[4]، استفاده از روش میکروستلایت‌ها[5] و هـم‌چنـین اسـتفاده از روش تایپینـگ در ژن کدکننـده پروتئین‌های سطحی سلول[6] برای بررسـی تنـوع و توزیـع سویه گونه‌های قارچی توسعه پیدا کرده است(۱۸-۱۴). بر این اساس با توجه به اهمیت بالینی عفونت‌هـای ناشـی از

1. Multilocus Enzyme Electrophoresis
2. Restriction Fragment Length Polymorphisms of total DNA
3. Hybridization of endonuclease digested DNA with DNA probes
4. Random Amplification Of Polymorphic DNA
5. Microsatellite
6. CSP typing

Archive of SID
www.SID.ir

قارچ آسپرژیلوس، مطالعات ژنوتیپی مختلفی به منظور شناسایی و امکان یافتن ارتباط‌های ژنتیکی و اپیدمیولوژیکی میان جدایه‌های محیطی و بالینی هر یک از جدایه‌های آسپرژیلوس صورت گرفته است(۱۶). به منظور تعیین اپیدمولوژی عفونت‌های بیمارستانی و کمک به طراحی روش‌های منطقی کنترل پاتوژن، درک از میزان گسترش پاتوژن و ارتباط آن ضروری می‌باشد. تکنیک‌های تایپینگ همچنین قادرند درک عمیق‌تری از الگوی کلونیزه شدن بیماران فراهم آورند. در صورتی که کلونیزه شدن در مجاری تنفسی توسط یک یا چندین جدایه باشد و یا کلونیزه شدن مرتب تکرار شود، می‌توان آن را با تایپینگ جدایه‌های نمونه‌های خلط متوالی هم مورد ارزیابی قرار داد(۱۴). در این مطالعه روش‌های مولکولی برای آنالیز ژنوتایپینگ گونه‌های آسپرژیلوس به منظور درک اپیدمیولوژی این قارچ‌های پاتوژن فرصت طلب مورد بحث قرار می‌گیرد و برخی مزایا و معایب روش‌های مختلف تایپینگ ذکر می‌شود.

*معرفی جنبه‌های بالینی روش‌های تایپینگ مولکولی*

تکنیک‌های تایپینگ مولکولی به طور چشمگیری جهت ژنوتایپینگ گونه‌های آسپرژیلوس به‌کار گرفته شده است که به تعدادی از این روش‌های کاربردی اشاره خواهد شد. تکنیک RAPD با استفاده از پرایمرهایی با طول حدود ۸ تا ۲۰ جفت باز می‌توانند به چندین جایگاه در ژنوم متصل شوند و تعدادی قطعات تصادفی تشکیل می‌شود. پس از تکثیر قطعات حاصل شده توسط الکتروفورز ژل آگارز جدا می‌شوند. تعداد و اندازه قطعات حاصل شده به تعداد و محل اتصال پرایمرها بستگی دارد و جدایه‌های غیر مرتبط معمولاً الگوی نواربندی متفاوتی را نشان می‌دهند. بررسی تنوع ژنتیکی بر اساس روش RAPD این امکان را می‌دهد تا تنوع ژنتیکی مناسب با توجه به ظرفیت خود برای تولید نشانگر تصادفی از کل ژنوم فراهم شود. در مطالعه Diaz-Guerra و همکاران از تکنیک RAPD به همراه سه پرایمر (R-108, R-151, AP12 h) برای تایپینگ ۱۱ ایزوله آسپرژیلوس فلاووس استفاده شد که قدرت تمایز مطلوبی توسط این روش گزارش گردید و در یک مورد شباهت ژنتیکی بین سویه‌های جدا شده از بیماران و سویه‌های جدا شده از دریچه‌های دستگاه‌های خنک‌کننده هوا در اتاق عمل، منشاء آلودگی بیمارستانی را تایید نمود(۱۹). همچنین در مطالعه Myoken و همکاران از تکنیک RAPD با سه آغازگر PCR مختلف برای تایپینگ ۶ ایزوله آسپرژیلوس فلاووس به دست آمده از بیماران مبتلا به لوسمی با علایم استوماتیت استفاده شد. تجزیه و تحلیل مولکولی نشان داد که سه نمونه آسپرژیلوس فلاووس به دست آمده از سه بیمار یکسان می‌باشد(۲۰). اساس شناسایی تکنیک RFLP شامل بریدن نمونه DNA توسط آنزیم محدود کننده است که می تواند DNA را در مکان‌هایی با توالی‌های کوتاه خاص شناسایی کرده و برش دهد. زمانی که DNA ژنومی جدایه آسپرژیلوس در توالی ۶ جفت بازی هدف توسط آنزیم محدود کننده بریده می‌شود، ممکن است در حدود ۱۰۰۰۰ قطعه مختلف DNA حاصل شود. این قطعات DNA به‌طور متوسط طولی در حدود ۴۰۰۰ جفت باز دارند. اکثر این قطعات قابل شناسایی از یکدیگر نمی‌باشند. این روش برای شناسایی گونه‌های مختلف از هم مناسب می‌باشد اما قدرت شناسایی جدایه‌های غیر مرتبط در یک گونه را دارا نمی‌باشد(۲۱). تکنیک RFLP برای تمایز و بررسی روابط فیلوژنتیکی بین دو گونه مرتبط آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس اوریزه آ استفاده شده است(۲۲).

Buffington و همکاران از تکنیک RFLP با آنزیم برش‌دهنده *Sma I* برای تمایز گونه‌های آسپرژیلوس فلاووس استفاده کردند که محصولات حاصل از RAPD و آنالیز RFLP سویه های آسپرژیلوس فلاووس مورد آزمایش را به منظور تولید یک پروب DNA برای آنالیز ساترن بلات ترکیب نمودند. بنابراین، درجه بالایی از تمایز در میان انواع سویه ها به دست آمد. بر اساس نتایج

Archive of SID

www.SID.ir

این مطالعه اگرچه تفسیر الگوهای کمپلکس RFLP مشکل است، اما RFLP به عنوان یک سیستم تمایزی با تکرار زیاد معرفی شد(۲۳). تکنیک PCR-RFLP با آنزیم *Hae-III* برای بررسی تفاوت‌های ژنوتیپی موجود در گونه‌های آسپرژیلوس فلاووس عامل عفونت‌های چشمی نیز استفاده شده است(۲۴). Verweji و همکاران جدایه‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس جدا شده از کشت نمونه‌های خلط دو بیمار مبتلا به فیبروز کیستیک را به صورت پی در پی در طی دو سال توسط تکنیک‌های Afut1-RFLP و RAPD آنالیز کردند. انگشت نگاری این نمونه‌ها نشاندهنده سه ژنوتیپ مختلف در ۱۱ نمونه در یک بیمار بود که از میان آن‌ها یک ژنوتیپ غالب بود. در بیمار دیگر حدود ۹ ژنوتیپ مختلف در ۱۲ نمونه مشاهده شد(۲۵). در مطالعه‌ای دیگر، ۶ بیمار مبتلا به فیبروز کیستیک در طی دو سال مورد بررسی قرار گرفتند و ۴۱۲ آسپرژیلوس فومیگاتوس از نمونه های پی در پی خلط این بیماران جدا شد ه که ۵۴ ژنوتیپ خاص با استفاده از روش Afut1-RFLP حاصل گردید. در تمام نمونه‌های ۶ بیمار چندین ژنوتیپ آسپرژیلوس فومیگاتوس یافت شد و بیش‌تر جدایه‌ها به دو بیمار تعلق داشت. از یک بیمار مورد مطالعه، ۱۰ ژنوتیپ مختلف در سال اول شناسایی شد. در حالی که در سال دوم از ۴۰ نمونه متوالی یک ژنوتیپ یافت شد. این بیمار فاقد علایم بالینی آسپرژیلوزیس بود. با این حال در بیمار دیگر با ژنوتیپ غالب در ۹ نمونه خلط، عفونت ریوی نشان داده شد(۲۶). بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک دارای الگوی متفاوتی از کلونیزه شدن جدایه‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس می‌باشند(۲۶)، زیرا آنالیز جدایه‌های پی در پی نشان داد که برخی از بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک ژنوتیپ غالب را نشان می‌دهند و دیگران چندین ژنوتیپ دارند. جداسازی متوالی یک ژنوتیپ خاص در این بیماران لزوماً نشاندهنده بروز آسپرژیلوزیس نمی‌باشد. حضور ژنوتیپ‌های مختلف در جدایه‌های متوالی نیز در بیماران دیگر مثل بیماران دریافت‌کننده پیوند ریه، بیماران آسپرژیلوما و بیماران با آسپرژیلوزیس مهاجم نشان داده شده است(۲۷-۲۹). به طور کلی، تفاوت ژنوتیپ‌ها در جدایه‌های بیماران با آسپرژیلوزیس مهاجم یا آسپرژیلوما کمتر از بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک می‌باشد. لازم به ذکر است که در اکثر مطالعات تعداد جدایه‌ها و یا مدت زمان بین اولین و آخرین جدایه در بیماران با آسپرژیلوزیس مهاجم در مقایسه با بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک کم‌تر می‌باشد. در دو مطالعه، ژنوتیپ‌های جدایه‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس که از نمونه های بافتی عمقی جمع‌آوری شده بودند با ژنوتیپ‌های نمونه‌های تنفسی مقایسه شدند. نتایج کلی نشان داد که نمونه‌های بیمار با منشا غیرتنفسی دارای ژنوتیپ یکسانی می‌باشند. در مقایسه، چندین ژنوتیپ در جدایه‌های منشا گرفته از نمونه های تنفسی شناسایی شد(۳۰، ۳۱). تکنیک AFLP[1] برای اولین بار توسط Vos و همکاران معرفی شد(۳۲). DNA ژنومیک معمولاً توسط دو آنزیم محدود کننده بریده می‌شود که یکی از آن‌ها دارای تعداد برش متوسط و دیگری تعداد برش بیش‌تری می‌باشد. توالی‌های آداپتورها و سایت محدود شده مجاور به عنوان محل‌های اتصال پرایمر برای تکثیر قطعات محدود شده به کار برده می‌شود. به عبارتی قطعات DNA دو رشته‌ای سنتز شده به انتهای چسبناک ایجاد شده متصل می‌شوند تا جایگاه اتصال پرایمر برای واکنش PCR را ایجاد نمایند. سپس قطعات متصل شده با استفاده از دمای بالای annealing در PCR تکثیر می‌شوند. می‌توان با طویل کردن پرایمرها در ناحیه ۳′ توسط یک یا تعداد بیش‌تری نوکلوتید، تعداد قطعات تولید شده را تنظیم نمود. اضافه کردن هر نوکلوتید، تعداد قطعات تکثیر شده را با ضریب ۴ کاهش می‌دهد. پرایمر PCR که دارای تعداد محل برش متوسط می‌باشد توسط رادیواکتیو نشان‌دار می‌شده، اما امروزه پرایمرها توسط عناصر فلورسانس نشان دار می‌شوند تا قطعات با کیفیت بالا در

1. Amplified Fragment Length Polymorphism

Archive of SID
www.SID.ir

الکتروفورز مشاهده شوند(۳۴،۳۳). این روش به طور عمده جهت افتراق گونه یا سویه‌های نزدیک می‌تواند مفید باشد. این مسئله به طور واضح افتراق گونه‌های آسپرژیلوس فلاووس را از آسپرژیلوس پارازیتیکوس نشان می‌دهد و عدم تفاوت ژنوتیپی بین گونه‌های توکسیکوژنیک و غیر توکسیکوژنیک را می‌توان تشخیص داد(۳۵).

در مطالعه Warris و همکاران مجموعه‌ای از ۹۶ جدایه ی بالینی و محیطی آسپرژیلوس فومیگاتوس با استفاده از آنزیم‌های *EcoRI* و *MseI* با سه نوکلوتید انتخابی بررسی گردید. جدایه‌های مختلف می‌توانستند از هم تفکیک شوند. با استفاده از ترکیب آنزیم‌های ذکر شده با نوکلوتیدهای انتخابی دیگر، تنوع ژنتیکی آسپرژیلوس از بخش Flavi و Nigri مورد بررسی قرار گرفت. تمام مطالعات نشان دادند که AFLP روش مناسب تایپینگ است و قادر می‌باشد در سطح گونه و یا پایین‌تر از آن، گروه گونه‌های آسپرژیلوس را تعیین کند(۳۶).

تکنیک PCR–SSCP[1] اولین بار توسط Mondon و همکاران توصیف شد(۳۷). Kumeda و Asao روش SSCP رابا پرایمرهای یونیورسال ITS1 و ITS4 بهینه‌سازی کردند(۳۸). تجزیه و تحلیل PCR-SSCP روشی قابل اعتماد برای تمایز بین گونه‌های کمپلکس آسپرژیلوس فلاووس را ارائه می‌دهد و ساده‌تر و سریع‌تر از برخی روش‌های دیگر بر اساس هیبریداسیون DNA می‌باشد. آنالیز فاصله اندازه‌های بین ژنی (IGS-PCR) یک روش وابسته به PCR است که در آن پرایمرها به ناحیه بین زیر واحد کوچک و بزرگ ریبوزومی ژن RNA متصل می‌شوند. ژنوم قارچ‌ها دارای حدود ۱۰۰ تکرار محافظت شده از این ژن می‌باشد که به صورت پشت سرهم تکرار شده‌اند و نواحی فاصله انداز میان آن‌ها قرار دارد. از آن‌جایی که این نواحی فاصله‌انداز بین ژنی ممکن است در طول خود تفاوت داشته باشند، جدایه‌های غیر مرتبط الگوی نواربندی مختلفی را نشان می‌دهند.

میکروستلایت‌ها[2] یا تکرارهای کوتاه پشت سرهم (STRs)[3] به فراوانی در ژنوم اکثر موجودات آلی حضور دارند و به ندرت در ژنوم پروکاریوت‌ها یافت می شوند(۳۹). ایزوله‌های مختلف می‌توانند بر اساس تفاوت در تعداد تکرار از یکدیگر متمایز شوند. مارکرهای میکروستلایت‌ها با استفاده از پرایمرهایی که بر اساس توالی‌های انتهای دو طرف آن هستند به آسانی تکثیر می شوند. در صورتی که یکی از پرایمرها توسط فلورسانس نشان دار شده باشد، می توان سایز آن ها را به صورت دقیق و با استفاده از الکتروفورز با قدرت تفکیک بالا تعیین نمود. تعداد تکرارها در هر مارکر را می توان با توجه به اندازه قطعات ارزیابی نمود. تعداد تکرارها در مارکرهای مورد بررسی، برای هر کدام از جدایه‌ها ژنوتیپی را ایجاد می‌کند که این ژنوتیپ‌ها به آسانی با یکدیگر مقایسه می‌شوند(۴۰). مطالعات نشان داده‌اند که تایپینگ براساس میکروستلایت‌ها نتایج واضحی ایجاد می‌نماید(۴۱). از روش وابسته به میکروستلایت‌ها گاهی با عنوان MLP[4]، MSP[5] و یا PMM[6] نیز یاد می‌شود(۴۳،۴۲). در مطالعه Tran-Dinh و Carter هفت میکروستلایت پلی‌مورفیک برای سویه‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس مورد آزمایش قرار گرفت و جستجو برای موتیف‌های میکروستلایت بر روی توالی ژنومی آسپرژیلوس فلاووس کمپلکس انجام گرفت. این ۷ مارکر بر روی ۲۰ جدایه آسپرژیلوس فلاووس و ۱۵ جدایه *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* آزمایش شدند و ۲ تا ۱۱ الل برای *آسپرژیلوس فلاووس* و ۱ تا ۹ الل برای *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* حاصل گردید(۴۴). در مطالعه Bart-Delabess و همکاران با استفاده از تایپینگ میکروستلایت‌ها *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با چهار مارکر مختلف دو نوکلوتیدی، جدایه‌های غیر مرتبط از هم را

1. PCR–Single-Strand Conformation Polymorphism

2. Microsatellites
3. Short Tandem repeats
4. Microsatellite Length Polymorphism
5. Microsatellite Polymorphism
6. Polymorphic Microsatellite Marker

Archive of SID

www.SID.ir

تشـخیص دادنـد. بـا اسـتفاده از مـارکرهـای ایـن گـروه می‌توان ۳۰۰۰۰ ژنوتیپ مختلـف را شناسـایی نمـود(۴۵). Batista و همکـــاران از پرایمرهـــای (GTG) و (GACA) برای محصولات متفاوت تولید و تکثیـر شـده بـه منظـور بررسی اندازه و شدت باند استفاده کردند کـه (GACA) تنوع ژنتیکی بالاتری را نشان داد. نخست در این مطالعـه چهارگونه که به عنوان آسپرژیلوس فلاووس طبقه‌بنـدی شدند الگوی متفـاوتی را نشـان دادنـد کـه باعـث بررسـی مجددشناسـایی طبقـه‌بنـدی آن‌هـا شـد(۴۶). در مطالعـه Hadrich و همکاران از نشـانگر میکروسـتلایت مناسـبی برای تایپینگ ۶۳ ایزوله آسـپرژیلوس فـلاووس اسـتفاده شد. این مطالعه شـامل ترکیبـی از ۱۲ مـارکر موجودکـه دارای قـدرت افتراقـی ۰/۹۷ بـود و ترکیـب ۵ مـارکر (AFLA1،AFLA3،AFLA7، AFM3 و AFM7) کـــه دارای قدرت افتراقی ۰/۹۵۲ بودرا شامل شد. ایزوله‌هـای جدا شده از تونس و مارسـی هاپلوتیـپ‌هـای مجزایـی را که حاکی از ساختار جغرافیـایی بسـیار قابـل تـوجهی در آسـپرژیلوس فـلاووس بـود نشـان دادنـد(۴۷). تکنیـک RAMA[1] بر اساس PCR مـی‌باشـد و از پرایمـرهـایی کـه شامل توالی‌های میکروسـتلایت‌هـا و انکـورهـای مـنحط شده در انتهای ′۵ می‌باشند استفاده می‌کنـد. DNA میـان انتهای دو میکروسـتلایت نزدیـک هـم تکثیـر مـی‌شـود. محصولات PCR حاصل شده توسط الکتروفـورز از هـم جدا می‌شـوند. مـارکر پلـی‌مورفیسـم RAMS بـر اسـاس اختلاف طول در محصولات تکثیر شده میان جدایه‌هـای مختلف می باشد. از آن‌جایی‌کـه نشـان داده نشـده اسـت که قطعات تکثیر شـده توسـط میکروسـتلایت‌هـا احاطـه شده اند، این تکنیک اساسا مقـداری بـا RAPD تفـاوت دارد. از ایـن روش بـرای انگشـت نگـاری ۲۴ جدایـه آســپرژیلوس فومیگــاتوس و ۱۳ جدایــه آســپرژیلوس فلاووس که به ترتیب از ۱۴ و ۱۰ بیمار جدا شـده بودنـد استفاده شده است(۴۸).

در تکنیـک MLST[2] عمومـاً بـه منظـور شناسـایی جدایه‌های گونه‌هـای مختلـف، تـوالی‌هـای نوکلوتیـدی نواحی درونی ۴۰۰ تا ۵۰۰ جفت بـازی از یـک سـری از ژن‌ها (معمولا ۶ تا ۱۰ عـدد) کـه در تمـامی جدایـه‌هـای یک گونه‌ی خاص حضور دارند مقایسه مـی‌شـود. بـرای تمامی توالی‌های خاص، یک شماره اختیاری خاص الـل (معمولاً به ترتیب کشف) تعیین مـی‌شـود. هـر جدایـه بـا استفاده از الل‌ها در هر کدام از لوسی‌هـای housekeeping تعیـین تـوالی شـده شناسـایی مـی‌شـود و بـاهم تشـکیل پروفایل اللی و یا نوع توالی [3](ST) مـی‌دهـد(۴۹). ارتبـاط میان جدایه‌ها با مقایسه پروفایل‌های اللی آشکار می‌شود. جدایـه‌هـای خویشـاوند دارای STsهـای مشـابه و یـا STsهای با تفاوت ناچیز هستند. در حالی که جدایه‌هـای غیر خویشاوند دارای STs هـای غیـر مـرتبط مـی‌باشـند. تکنیـک MLST بـا هـدف قـرار دادن تنـوع موجـود در چنـدین لوسـی housekeeping یـک روش مولکـولی جایگزین MLEE[4] مـی‌باشـد. مزیـت MLST نسـبت بـه MLEE این است که DNA نسبت به پروتئین کـد شـده متغیرتر است (به دلیل موتاسیون‌ها) و لوسی‌های کم‌تری در MLST بررسی می‌شوند(۵۰). تکنیک MLST به طور گسترده‌ای به عنـوان یـک ابـزار رایـج تایپینـگ اسـتفاده می‌شود که امکان مقایسه بین‌المللی جدایـه‌هـا را فـراهم مـی‌کنـد. داده‌هـای MLST در آنـالیزهـای تکـاملی و جمعیـت اسـتفاده مـی‌گـردد و در آن نـرخ نـوترکیبی و موتاسیون تخمین زده می‌شـود. در آسـپرژیلوس سکشـن فومیگـاتی، روش MLST منجـر بـه توصـیف گونـه‌ی پاتوژن جدیدی شد که آسپرژیلوس لنتیلوس از جملـه‌ی آن اسـت(۵۱). تکنیـک MLVA[5] اخیـرا بـه عنـوان یـک روش قدرتمنـد بـرای تعیـین سـاب تایـپ پـاتوژن‌هـای باکتریایی و قارچی و بررسی روابط فیلوژنتیکی در آن‌ها مورد استفاده قرار می گیـرد. اسـاس ایـن روش بـر روی تعیین توالی تکراری پشت سر هـم DNA مـی باشـد. در

1. Random Amplified Microsatellites

2. Multilocus Sequence Typing
3. Sequence type
4. Multilocus Enzyme Electrophoresis
1. Multiple-Locus Variable-number of tandem-repeats Analysis

Archive of SID
www.SID.ir

این روش با شمارش تعداد تکرار مارکرهای VNTR، ارتباط بین سویه‌های مختلف بررسی می‌گردد. از VNTR ها در آنالیز نقشه‌های ژنتیکی و پزشکی قانونی نیز استفاده شده است. اشتباهات مکرر در DNA، مانند تضعیف رشته mispairing، تنوع در تعداد تکرارهای پشت سر هم در میان سویه‌های همان‌گونه را ایجاد می‌کند (۵۳،۵۲).

تکنیک CSP[1] یک روش ساب تایپینگ بوده که با مقایسه سکانس‌های DNA سویه‌ها و بر اساس اختلاف در تعداد و محتوای نواحی تکراری 12bp در ژن کدکننده پروتئین سطحی سلول می‌باشد. تنوع ژنتیکی در توالی تکراری و نواحی کناری، بر اثر حذف، اضافه یا جهش‌های نقطه‌ای در ژن کدکننده CSP ناشی می‌شود. هرچندکه روش CSP typing قدرت تفکیک کم‌تری نسبت به روش microsatlellite دارد، اما کارایی بالاتری نسبت به روش MLST برای قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس را نشان داده است. این روش‌ها به دلیل کارایی آسان، سریع، تکرارپذیری و عدم نیاز به تجهیزات پیچیده آزمایشگاهی و مقرون به صرفه بودن و همچنین از همه مهم‌تر توسط یک پروتکل استاندارد به عنوان روشی کار آمد به کار برده می‌شود که با استفاده از این روش نتایج در بین آزمایشگاه‌های سراسر دنیا قابل انتقال است(۵۴). در جدول شماره ۱ جنبه‌های مختلف به روش‌های مورد استفاده برای تایپینگ ایزوله‌های آسپرژیلوس اشاره شده است.

**جدول شماره ۱:** بررسی اجمالی جنبه های مختلف روش های مورد استفاده برای تایپینگ ایزوله های آسپرژیلوس

| مزایا و معایب | | تکنیک های تایپینگ |
|---|---|---|
| قدرت افتراقی | محدود | MLST ،SSDP ،RAPD ،RFLP |
| | متوسط | CSP |
| | زیاد | MLVA ،Microsatellites ،AFLP |
| تکرار پذیری | محدود | RAPD ،RFLP |
| | خوب | RAMS ،Microsatellites ،AFLP |
| | عالی | SSDP ،SSDP ،CSP ،MLVA |
| توانایی مبادله پذیری | محدود | RFLP ،RAPD ،RAMS ،Microsatellites ،AFLP |
| | خوب | SSDP ،MLVA |
| | عالی | CSP ،MLST |
| سهولت استفاده | آسان | RAMS ،RAPD ،SSDP ،CSP، |
| | سخت | MLVA ،RFLP ،MLST ،Microsatellites ،AFLP |
| اختصاصی گونه | بله | MLVA ،CSP ،SSDP ،MLST ،Microsatellites |
| | خیر | RFLP ،RAPD ،RAMS ،AFLP |
| تفسیر | آسان | MLVA ،CSP ،MLST ،Microsatellites |
| | سخت | RAMS ،SSDP ،RFLP ،AFLP |

*مقایسه روش‌های تایپینگ مولکولی*

عملکرد روش های تایپینگ می تواند بر پایه انجام پذیر بودن آن‌ها با یکدیگر مقایسه گردد. مزایا و معایب خاص آن‌ها در حیطه کاربرد ، سهولت در مصرف، تغییرپذیری و تکرارپذیری آن ها در آزمایشگاه و میان آزمایشگاه‌های مختلف بررسی می‌شود. اکثر روش‌هایی که در این مقاله ذکر شده‌اند وابسته به PCR می‌باشند و روش‌های وابسته به PCR به مقدار کمی از DNA قابل تکثیر نیاز دارند که به آسانی به دست می‌آید(۴۵). هرچند که RFLP یک روش غیر وابسته به PCR می‌باشد ولی به مقادیر زیادی از DNA با خلوص بالا نیاز دارد که سبب می‌شود این روش زمان‌بر و دشوار شود. چندین روش وابسته به PCR مثل AFLP، CSP، MLST، میکروستلایت‌ها و RAMS به ابزار خاصی برای جداسازی قطعات حاصله تحت شرایط الکتروفورز با تفکیک بالا نیازدارند. از طرف دیگر، روش RAPD را می توان با ابزارهای ارزان قیمت انجام داد و بنابراین به‌طور گسترده‌ای برای تایپینگ جدایه‌های آسپرژیلوس از آن استفاده می شود(۵۵). کلیه تکنیک ها قادر نیستند ژنوتیپ تمامی ارگانیسم‌های مورد بررسی را تعیین نمایند. در مورد RFLP هر دو نوع پروب‌های خاص گونه‌ای و غیر خاص گونه‌ای ارائه شده است که پروب‌های بر اساس توالی های تکرار شونده DNA کروموزومی مثل PAF28 و Afu1 و یا پروب های بر اساس الگوهای RAPD به طور قوی تنها به گونه‌ای متصل می‌شوند که پروب برای آن‌ها طراحی شده است. با این حال، از روش ساترن بلاتینگ همراه با باکتروفاژ M13 نشاندار به منظور تمایز جدایه های چندین گونه ی قارچی از جنس‌های مختلف

1. cell surface protein

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده شده است(۵۶). در مقایسه، روش AFLP برای ژنوم هر موجودی بدون نیاز به اطلاعات توالی آن قابل انجام است. از تکنیک AFLP علاوه بر آسپرژیلوس، برای میکروارگانیسم‌های متنوع دیگری مثلا گیاهان و حیوانات استفاده شده است و تکنیک RAPD برای بسیاری از باکتری‌ها، انگل‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها مورد استفاده قرار گرفته است(۵۷). از روش RAMS برای شناسایی تنوع ژنتیکی گیاهان و حیوانات و اخیرا قارچ‌ها استفاده شده است(۴۸). تکرارپذیری به توانایی تکنیک برای رسیدن به نتایج یکسان در زمان آزمایش تکرار شونده روی یک جایه‌ی خاص اشاره دارد. در مقیاس‌های بزرگ‌تر و جهت مطالعات اپیدمولوژیک طولانی مدت، روش‌های انگشت نگاری ثابتی مورد نیاز است. مهم‌ترین عامل ایجاد ابهام در روش‌های تولیدکننده باند مثل RAPD، RFLP، RAMS، IGS، SSDP و AFLP که تکرارپذیری را تحت تاثیر قرار می‌دهد، شدت تفاوت باندها می‌باشد که احتمالا به دلیل تفاوت‌های اندک در مراحل مختلف کار است و ممکن است بر روی شدت نهایی پیک اثر بگذارد. بر خلاف آن، روش هایی مثل CSP، میکروستلایت‌ها و MLST دارای میزان تکرارپذیری بسیار بالایی می‌باشند(۵۸). Balajee و همکاران در مطالعه‌ای به توصیف ژنومی زیر ساختارهای ایزوله‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس در آمریکای شمالی پرداختند. Balajee و همکاران از سکانس ناحیه ژنی CSP که به طول bp۱۲ و کدکننده پروتئین پروتئین سطحی سلول برای ساب تایپ کردن ۵۵ اپیدمی منتسب به آسپرژیلوس فومیگاتوس از ۶ شیوع عفونت بیمارستانی با منشا آسپرژیلوس مهاجم استفاده کرده و این روش را مناسب برای مطالعات اپیدمیولوژی گزارش کردند(۵۴). جنبه دیگر در ارزیابی روش‌های تایپینگ توانایی آن‌ها در مبادله اطلاعات میان آزمایشگاه‌های مختلف می‌باشد که در نتیجه‌ی تبادل آسان اطلاعات می‌توان ژنوتیپ حاصل شده از تمام جهان را با هم مقایسه کرد که این امر سبب می‌شود تا درک ما از اپیدمولوژی میکروارگانیسم‌ها بهبود یابد. بنابراین، به نظر می‌رسد که روش‌های با دقت بالا مناسب‌تر می‌باشند، زیرا اطلاعات حاصل شده از این روش‌ها را می‌توان در فرمت دیجیتال ساده به طور کامل ارائه داد. برای MLST، برنامه‌ها برای چندین میکروارگانیسم در سایت‌های http://www.mlst.net و http://www.pubmlst.org برای عموم در دسترس قرار دارد و می توان اطلاعات توالی برای الل های MLST را وارد نمود تا از الل ژنوتیپ‌ها و STهای جدایه‌ها مطمئن شد. اطلاعات حاصل شده از تایپینگCSP اجازه می‌دهد تا مجموعه‌ای از اطلاعات واضح حاصل شود که بتوان آن‌ها را میان آزمایشگاه‌ها مبادله کرد(۵۹).

Hurst و همکاران به مقایسه نتایج هفت آزمایشگاه بین‌المللی از یک پنل از آسپرژیلوس فومیگاتوس پرداختند که از یک شیوع آسپرژیلوس مهاجم به دست آمده و از نظر ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفته بود (با متد Afut 1 & STRAf از ناحیه B-tubulin). با وجود تفاوت در روشCSP نتایج حاصل از آن در بین آزمایشگاه‌های مختلف با هم همخوانی داشتند. لذا Hurst و همکاران این روش تایپینگ را مناسب برای آزمایشگاه‌های رفرانس معرفی کردند و قابلیت به اشتراک‌گذاری نتایج با این روش اثبات گردید(۶۰). اطلاعات انگشت‌نگاری دیجیتال در غالب الگو های نواربندی پیچیده‌تر هستند و بنابراین به منظور مبادله اطلاعات دشوار می‌باشند. به علاوه، لازم است دستورالعمل استاندارد توسط تمامی آزمایشگاه ها پیروی شود تا از تفاوت در الگوی نواربندی جلوگیری گردد(۶۱). تمامی روش‌هایی را که در این‌جا به آن‌ها اشاره شد می‌توان در روش‌های وابسته به الگو و روش‌های دقیق دسته‌بندی نمود. در تفسیر نتایج حاصله ممکن است با مشکلات مختلفی مواجه شد. روش‌هایی که برای شناسایی جدایه‌های آسپرژیلوس استفاده می‌شوند بر اساس جدا شدن قطعات DNA با طول‌های متفاوت با الکتروفورز می‌باشند که سبب ایجاد الگوی

Archive of SID
www.SID.ir

پیچیده‌ای از نوارها می‌شود. روش‌های RAPD، RFLP، RAMS، IGS، CSP و AFLP برای انگشت‌نگاری گونه‌های آسپرژیلوس از جمله روش‌هایی هستند که وابسته به الگوی نواربندی می‌باشند. روش‌های دقیق نتایج تایپینگ واضحی را ایجاد می‌کنند. هر چند روش SSCP یک روش دقیق به حساب می‌آید زیرا حضور یا عدم حضور باندها را نشان می‌دهد. با این حال، Lasker نشان داد که برخی از پرایمرهای SSCP ممکن است باندهای ضعیفی ایجاد کنند که سبب می‌شود توانایی دقیق این روش کم‌تر تخمین زده شود(۴۲). همان‌طور که اشاره شد، الگوهایی که با استفاده از روش‌های وابسته به باند ایجاد می‌شوند بسیار پیچیده‌اند زیرا آن‌ها شامل باندهای ضعیف و قوی هستند که سبب می‌شود تفسیر این روش‌ها مشکل شود(۴۵). به منظور مقایسه انگشت نگاری‌های مختلف با یکدیگر و تعیین ارتباط ژنتیکی میان چندین جدایه لازم است از نرم‌افزار های تخصصی کامپیوتری استفاده شود. آنالیز های کامپیوتری معمولاً با استفاده از الگوریتم های وابسته به الگو و یا نوار انجام می‌گیرد. الگوریتم‌های وابسته به نوار که در آن‌ها حضور یا عدم حضور باندهای تکی را نشان می‌دهند نیازمند مشاهده چشمی هستند که سبب می‌شود این روش‌ها دشوار شوند. مزیت روش‌های مبتنی بر میکروستلایت‌ها در مقایسه با روش‌های مبتنی بر باند، توانایی شناسایی ایزوله‌های مخلوط است. ژنوتایپ‌های مختلف در روش‌های مبتنی بر میکروستلایت‌ها بلافاصله با حضور قله‌های متعدد از مارکرهای آنالیز شده با طول‌های مختلف شناسایی می‌شوند. در روش مبتنی بر باند، شناسایی ژنوتایپ‌های مخلوط در صورت امکان بسیار دشوار است(۴۵،۱۴). یک مشکل دیگر برای آنالیز اطلاعات تایپینگ عمومی، تفسیر ذهنی ژنوتایپ به صورت فردی می‌باشد. ثبت ژنوتیپ زمانی که از روش های مبتنی بر باند استفاده می‌شود، وابسته به کاربر می‌باشد. درحالی که نتایج ژنوتیپی حاصل شده از روش‌های دقیق بدون ابهام می‌باشند. متاسفانه در حال حاضر راهنمای جامعی برای تعیین ژنوتیپ برای روش‌های مطرح شده وجود ندارد(۵۶،۴۷). علاوه بر مزایا و معایب امکان عملی و تفسیر تکنیک‌های مختلف، لازم است که قدرت شناسایی تکنیک هم ارزیابی شود. یکی از روش‌هایی که توانایی تفکیک روش انگشت‌نگاری به حدکافی را دارد، مقایسه‌ی اطلاعات به دست آمده از یک روش با اطلاعات حاصل شده از روش متفاوت دیگر انگشت‌نگاری ژنتیکی برای مجموعه‌ای یکسان از جدایه‌ها می‌باشد. برای گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس، مطالعات مختلفی برای مقایسه روش های مختلف تایپینگ انجام شده است(۵۶،۳۶). در دو مطالعه تکنیک‌های RAPD، Afut1-RFLP و MLP با یکدیگر مقایسه شدند. در هر دو بررسی RAPD دارای قدرت تفکیک کم‌تری بود، در حالی که Afut1-RFLP و MLP قابلیت تفکیک برابری داشتند و در مطالعه‌ای دیگر RFLP بهتر عمل کرد(۴۵). نکته‌ای که باید به آن توجه شود این است که انتخاب و طراحی پروب اختصاصی نقش مهمی را در افزایش قدرت تفکیک آنالیز RFLP دارا می‌باشد. در حال حاضر از چندین پروب برای تایپینگ گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس استفاده می شود. اگرچه پروب M13 دارای این مزیت است، به نظر می‌رسد که پروب Afut1 که بر پایه توالی متوسط تکراری گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس می باشد، بهترین تفکیک را میان جدایه‌های غیر مرتبط دارد(۶۲). آنالیزهای AFLP را می‌توان هم برای شناسایی جدایه‌ها تا سطح گونه و هم شناسایی در سطح درون گونه‌ای استفاده کرد و در سکشن Nigri از آسپرژیلوس‌ها از این مورد استفاده شده است. از روش AFLP برای شناسایی ارتباطات اپیدمولوژیک میان ۹۶ جدایه بالینی و محیطی گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس استفاده شده است(۶۳). تکنیک AFLP قادر است بیش‌تر جدایه ها را از هم تفکیک نماید و این امر نشاندهنده‌ی قدرت تفکیک بالای این روش می‌باشد. از روش تایپینگ وابسته به توالی ژن ها می‌توان به منظور شناسایی گونه‌های جدید در سکشن Fumigati استفاده کرد(۵۱). تمایزمیان

Archive of SID

www.SID.ir

جدایه های آسپرژیلوس فومیگاتوس را می توان توسط MLST انجام داد.

Bain و همکاران از ۷ قطعه ژن در مجموعه ۱۰۰ جدایه از منابع مختلف استفاده نمودند. این روش توانست انواع مختلف را در حدود یک سوم تعداد ایزوله های آزمایش شده تشخیص دهد و قدرت تفکیک کم‌تری را نسبت به روش های دیگر دقیق انگشت‌نگاری دارا می باشد. در صورتی که سطح تفاوت نوکلوتیدها به حد کافی برای پاسخ گویی به سوالات اپیدمولوژیکی کافی نباشد، لازم است تا لوسی‌های متغیر بیش‌تری بررسی شوند(۶۴).

de Valk و همکاران و Bain و همکاران اعلام کردند که روش CSP در مقایسه با سایر روش‌های تایپینگ، مثلا میکروستلایت، از قدرت تفکیک کمتری برخوردار است و به عنوان یک روش ابتدایی در تفکیک ایزوله‌های آسپرژیلویس فومیگاتوس کاربرد دارد و از مزایای آن شناخت تنوع زیاد ایزوله‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس می‌باشد(۶۵،۶۴). MLVA در مقایسه با سایر روش‌های فوق یک روش با قدرت تفکیک و تکرار پذیری بالاست که تفسیر آن آسان و از لحاظ هزینه مقرون به صرفه می‌باشد. Guillot و همکاران با استفاده از تکنیک MLVA ارتباط بین ژنوتایپ و شیوع بیماری های ناشی از گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس را در ۲۷۷ نمونه شامل ۶۲ مورد از پرندگان در استان Guangxi در چین، ۹۵ نمونه جمع‌آوری شده در دو مزرعه اردک در فرانسه و ۱۲۰ نمونه محیطی از اطراف مزرعه بوقلمون در فرانسه مورد بررسی قرار دادند. از این تعداد ۲۷۷ نمونه، تعداد ۳۳۰ آسپرژیلوس فومیگاتوس با تعداد پانل ۱۰ VNTRs تایپ شدند. نتیجه این تجزیه و تحلیل، ۲۵۵ ژنوتیپ مختلف را به همراه داشت و فقط ۳۳ ژنوتایپ بین دو ایزوله یا بیش‌تر مشترک بود(۶۶).

## بحث

روش‌های مولکولی مختلفی برای تایپینگ گونه‌های مختلف آسپرژیلوس بیان شده است. تایپینگ مولکولی نمونه‌های جدا شده از محیط زیست و بالینی گونه‌های آسپرژیلوس دیدگاه‌های جدیدی را در مسائل مهم بهداشت عمومی و اپیدمیولوژیک از جمله منابع و راه‌های انتقال، شناسایی گونه‌های بیماری‌زا و یا مقاوم به دارو و ارتباط ژنتیکی گونه‌ها فراهم می کند. بررسی ارتباط سویه‌های جدا شده از بیماران و محیط زیست آن‌ها ابزاری برای درک اپیدمیولوژی قارچ و ثبت منبع پیشگیری از عفونت‌های انسانی است که در ارتباط با سلامت می‌باشد. انگشت‌نگاری جدایه‌های جمع آوری شده ازنمونه‌های تنفسی و محیط نشان می‌دهد که گونه‌های آسپرژیلوس، به خصوص فومیگاتوس و فلاووس، دارای تنوع ژنتیکی گسترده‌ای می‌باشند و نیازمند تکنیک‌های تایپینگ با قدرت تفکیک بالا هستند. روش‌های دارای این معیار شامل RFLP به همراه پروب Afut1 و MLP می‌باشند. جنبه با اهمیت دیگر روش‌های تایپینگ توانایی تکرار پذیری آن‌ها است. روش‌های دقیق تایپینگ مثل MLST و CSP بسیار تکرارپذیر هستند و سبب می‌شوند تا به منظور آنالیز ارتباطات اپیدمولوژیکی میان مقادیر زیادی از جدایه‌ها در طی زمان طولانی واجد شرایط مناسب باشند. متاسفانه تایپینگ CSP و لوسی‌هایی که تاکنون برای MLST توصیف شده‌اند در موقعیت‌های همه‌گیری به منظور شناسایی منبع دقیق آن دارای قدرت شناسایی کافی نمی‌باشند. از روش RAPD بیش از سایر روش‌ها استفاده شده است و دلیل آن این است که این روش به ابزارهای کم‌تری نیاز دارد و برای انجام آن به اطلاعات توالی ژنومی نیازی نیست. در سال‌های اخیر، با تمایل رو به رشد استفاده از روش‌های دقیق تایپینگ برای تمایز بین نمونه‌ها روبرو هستیم. این روش‌ها از جنبه‌های تکرارپذیر، جابه‌جایی، و تبادل اطلاعات تایپینگ بسیار مفید می‌باشند. روش‌های دقیق تایپینگ تا به امروز تایپینگ توالی چندلوکوس (MLST) و تایپینگ مبتنی بر میکروستلایت‌ها می‌باشد و طرح MLST برای تایپینگ آسپرژیلوس فومیگاتوس توسعه یافته است.

Archive of SID
www.SID.ir

## References


1. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L, Chapman SW, et al. The impact of culture isolation of Aspergillus species: a hospital-based survey of aspergillosis. Clin Infect Dis 2001; 33(11): 1824-1833.
2. von Eiff M, Roos N, Schulten R, Hesse M, Zühlsdorf M, van de Loo J. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. Respiration 1995; 62(6): 341-347.
3. Badiee P, Hashemizadeh Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. Indian J Med Res 2014; 139(2): 195-204.
4. Liao Y, Chen M, Hartmann T, Yang RY, Liao WQ. Epidemiology of opportunistic invasive fungal infections in China: review of literature. Chin Med J (Engl) 2013; 126(2): 361-368.
5. Dolezal AL, Shu X, OBrian GR, Nielsen DM, Woloshuk CP, Boston RS. Aspergillus flavus infection induces transcriptional and physical changes in developing maize kernels. Front Microbiol 2014; 5: 384.
6. Anaissie EJ, Stratton SL, Dignani MC, Summerbell RC, Rex JH, Monson TP, et al. Pathogenic Aspergillus species recovered from a hospital water system: a 3-year prospective study. Clin Infect Dis 2002; 34(6): 780-789.
7. Kameswaran M, al-Wadei A, Khurana P, Okafor BC. Rhinocerebral aspergillosis. J Laryngol Otol 1992; 106(11): 981-985.
8. Mahgoub ES. Can Aspergillus flavus cause maduromycetoma? Bull Soc Pathol Exot Filiales 1973; 66(3): 390-395.
9. Mahgoub ES, el-Hassan AM.Pulmonary aspergillosis caused by Aspergillus flavus. Thorax 1972; 27(1): 33-37.
10. Choudhary SV, Koley S, Mallick S, Bose S, Basak S.Proximal subungual onychomycosis caused by Aspergillus flavus in a HIV-positive patient. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2009; 75(4): 410-412.
11. Abdalla MH. Prevalence of airborne Aspergillus flavus in Khartoum (Sudan) airspora with reference to dusty weather and inoculum survival in simulated summer conditions. Mycopathologia 1988; 104(3): 137-141.
12. Bart-Delabesse E, Cordonnier C, Bretagne S. Usefulness of genotyping with microsatellite markers to investigate hospital-acquired invasive aspergillosis. J Hosp Infect 1999; 42(4): 321-327.
13. Vanhee LM, Symoens F, Nelis HJ, Coenye T. Microsatellite typing of Aspergillus fumigatus isolates recovered from deep organ samples of patients with invasive aspergillosis. Diagn Microbiol Infect Dis 2008; 62(1): 96-98.
14. Birch M, Anderson MJ, Denning DW. Molecular typing of Aspergillus species. J Hosp Infect 1995; 30(Suppl): 339-351.
15. Kidd SE, Nik Zulkepeli NA, Slavin MA, Morrissey CO. Utility of a proposed CSP typing nomenclature for Australian Aspergillus fumigatus isolates: Identification of additional CSP types and suggested modifications. J Microbiol Methods 2009; 78(2): 223-226.
16. Klaassen CH, Osherov N. Aspergillus strain typing in the genomics era. Stud Mycol 2007; 59: 47-51.
17. Frye SR, Healy M. Molecular Strain Typing Using Repetitive Sequence–Based PCR.


Archive of SID

www.SID.ir

Advanced techniques in diagnostic microbiology: Springer; 2006. p. 444-471.

18. Symoens F, Bouchara JP, Heinemann S, Nolard N. Molecular typing of Aspergillus terreus isolates by random amplification of polymorphic DNA. J Hosp Infect 2000; 44(4): 273-280.
19. Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Gaztelurrutia L, Navarro JI, Tudela JL. Genetic similarity among one Aspergillus flavus strain isolated from a patient who underwent heart surgery and two environmental strains obtained from the operating room. J Clin Microbiol 2000; 38(6): 2419-2422.
20. Myoken Y, Sugata T, Fujita Y, Kyo T, Fujihara M, Kohara T. Molecular epidemiology of invasive stomatitis due to Aspergillus flavus in patients with acute leukemia. J Oral Pathol Med 2003; 32(4): 215-218.
21. Heinemann S, Symoens F, Gordts B, Jannes H, Nolard N. Environmental investigations and molecular typing of Aspergillus flavus during an outbreak of postoperative infections. J Hosp Infect 2004; 57(2): 149-155.
22. Moody SF, Tyler BM. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of the Aspergillus flavus group: A. flavus, A. parasiticus, and A. nomius. Appl Environ Microbiol 1990; 56(8): 2441-2452.
23. Buffington J, Reporter R, Lasker BA, McNeil MM, Lanson JM, Ross LA, et al. Investigation of an epidemic of invasive aspergillosis: utility of molecular typing with the use of random amplified polymorphic DNA probes. Pediatr Infect Dis J 1994; 13(5): 386-393.
24. Bagyalakshmi R, Therese KL, Madhavan HN. Nucleotide polymorphisms associated with Internal Transcribed Spacer (ITS) regions of ocular isolates of Aspergillus flavus. J Microbiol Methods 2007; 68(1): 1-10.
25. Verweij PE, Meis JF, Sarfati J, Hoogkamp-Korstanje JA, Latgé JP, Melchers WJ. Genotypic characterization of sequential Aspergillus fumigatus isolates from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1996; 34(10): 2595-2597.
26. Neuvéglise C, Sarfati J, Debeaupuis JP, Vu Thien H, Just J, Tournier G, et al. Longitudinal study of Aspergillus fumigatus strains isolated from cystic fibrosis patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997; 16(10): 747-750.
27. Symoens F, Bertout S, Piens MA, Burnod J, Renaud F, Nolard N, et al. A longitudinal study of lung transplant recipients infected with Aspergillus: genetic polymorphism of A fumigatus. J Heart Lung Transplant 2001; 20(9): 970-978.
28. Lair-Fulleringer S, Guillot J, Desterke C, Seguin D, Warin S, Bezille A, et al. Differentiation between isolates of Aspergillus fumigatus from breeding turkeys and their environment by genotyping with microsatellite markers. Journal of Clinical Microbiology 2003; 41(4): 1798-800.
29. Girardin H, Sarfati J, Kobayashi H, Bouchara JP, Latgé JP. Use of DNA moderately repetitive sequence to type Aspergillus fumigatus isolates from aspergilloma patients. J Infect Dis 1994; 169(3): 683-685.
30. de Valk HA, Meis JF, de Pauw BE, Donnelly PJ, Klaassen CH. Comparison of two highly discriminatory molecular fingerprinting assays for analysis of multiple Aspergillus fumigatus isolates from patients with invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 2007; 45(5): 1415-1419.

Archive of SID
www.SID.ir

31. Denning DW, Clemons KV, Hanson LH, Stevens DA. Restriction endonuclease analysis of total cellular DNA of Aspergillus fumigatus isolates of geographically and epidemiologically diverse origin. J Infect Dis 1990; 162(5): 1151-1158.
32. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 1995; 23(21): 4407-4414.
33. Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Savelkoul PH, Buffing N, van der Bijl MW, Woudenberg J, Lindeboom JA, et al. Amplified fragment length polymorphism analysis of human clinical isolates of Mycobacterium haemophilum from different continents. Clin Microbiol Infect 2009; 15(10): 924-930.
34. Fry NK, Savelkoul PH, Visca P. Amplified fragment-length polymorphism analysis. Methods Mol Biol 2009; 551: 89-104.
35. Montiel D, Dickinson MJ, Lee HA, Dyer PS, Jeenes DJ, Roberts IN, et al. Genetic differentiation of the Aspergillus section Flavi complex using AFLP fingerprints. Mycol Res 2003; 107(Pt 12): 1427-1434.
36. Warris A, Klaassen CH, Meis JF, De Ruiter MT, De Valk HA, Abrahamsen TG, et al. Molecular epidemiology of Aspergillus fumigatus isolates recovered from water, air, and patients shows two clusters of genetically distinct strains. J Clin Microbiol 2003; 41(9): 4101-4106.
37. Mondon P, Brenier MP, Symoens F, Rodriguez E, Coursange E, Chaib F, et al. Molecular typing of Aspergillus fumigatus strains by sequence-specific DNA primer (SSDP) analysis. FEMS Immunol Med Microbiol 1997; 17(2):95-102.
38. Kumeda Y, Asao T. Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of Aspergillus section Flavi. Appl Environ Microbiol 1996; 62(8): 2947-2952.
39. Puers C, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Schumm JW. Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01[AATG]n and reassignment of alleles in population analysis by using a locus-specific allelic ladder. Am J Hum Genet 1993; 53(4): 953-958.
40. Skowasch K, Wiegand P, Brinkmann B. pMCT 118 (D1S80): a new allelic ladder and an improved electrophoretic separation lead to the demonstration of 28 alleles. Int J Legal Med 1992; 105(3): 165-168.
41. Badali H, Vaezi A, Haghani I, Yazdanparast SA, Hedayati MT, Mousavi B, et al. Environmental study of azole-resistant Aspergillus fumigatus with TR34/L98H mutations in the cyp51A gene in Iran. Mycoses 2013; 56(6): 659-663.
42. Lasker BA. Evaluation of performance of four genotypic methods for studying the genetic epidemiology of Aspergillus fumigatus isolates. J Clin Microbiol 2002; 40(8): 2886-2892.
43. Bart-Delabesse E, Humbert JF, Delabesse E, Bretagne S. Microsatellite markers for typing Aspergillus fumigatus isolates. J Clin Microbiol 1998; 36(9): 2413-2418.
44. Tran-Dinh N, Carter D. Characterization of microsatellite loci in the aflatoxigenic fungi Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. Mol Ecol 2000; 9(12): 2170-2172.
45. Bart-Delabesse E, Sarfati J, Debeaupuis JP, van Leeuwen W, van Belkum A, Bretagne S, et al. Comparison of restriction fragment length polymorphism, microsatellite length

Archive of SID

www.SID.ir

polymorphism, and random amplification of polymorphic DNA analyses for fingerprinting Aspergillus fumigatus isolates. J Clin Microbiol 2001; 39(7): 2683-2686.

46. Batista PP, Santos JF, Oliveira NT, Pires AP, Motta CM, Luna-Alves Lima EA. Genetic characterization of Brazilian strains of Aspergillus flavus using DNA markers. Genet Mol Res 2008; 7(3): 706-717.
47. Hadrich I, Makni F, Ayadi A, Ranque S. Microsatellite typing to trace Aspergillus flavus infections in a hematology unit. J Clin Microbiol 2010; 48(7): 2396-2401.
48. Guarro J, Solé M, Castany R, Cano J, Teixidó A, Pujol I, et al. Use of random amplified microsatellites to type isolates from an outbreak of nosocomial aspergillosis in a general medical ward. Med Mycol 2005; 43(4): 365-371.
49. Taylor JW, Fisher MC. Fungal multilocus sequence typing--it's not just for bacteria. Curr Opin Microbiol 2003; 6(4): 351-356.
50. Urwin R, Maiden MC.Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol 2003; 11(10): 479-487.
51. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. Aspergillus lentulus sp. nov., a new sibling species of A. fumigatus. Eukaryot Cell 2005; 4(3): 625-632.
52. Nadon CA, Trees E, Ng LK, Møller Nielsen E, Reimer A, Maxwell N, et al. Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. Euro Surveill 2013; 18(35): 20565.
53. Dehghan P, Bui T, Campbell LT, Lai YW, Tran-Dinh N, Zaini F, et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of clinical isolates of Aspergillus flavus from Iran reveals the first cases of Aspergillus minisclerotigenes associated with human infection. BMC Infect Dis 2014; 14: 358.
54. Balajee SA, Tay ST, Lasker BA, Hurst SF, Rooney AP. Characterization of a novel gene for strain typing reveals substructuring of Aspergillus fumigatus across North America. Eukaryot Cell 2007; 6(8): 1392-1399.
55. Lin D, Lehmann PF, Hamory BH, Padhye AA, Durry E, Pinner RW, et al. Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of Aspergillus fumigatus. J Clin Microbiol 1995; 33(6): 1596-1601.
56. Loudon KW, Burnie JP. Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of Aspergillus fumigatus. J Clin Microbiol 1995; 33(12): 3362-3363.
57. Gruteke P, van Belkum A, Schouls LM, Hendriks WD, Reubsaet FA, Dokter J, et al. Outbreak of group A streptococci in a burn center: use of pheno-and genotypic procedures for strain tracking. J Clin Microbiol 1996; 34(1): 114-118.
58. Baird RE, Trigiano RN, Windham G, Williams P, Kelley R, Abbas HK, et al. Comparison of aflatoxigenic and nonaflatoxigenic isolates of Aspergillus flavus using DNA amplification fingerprinting techniques. Mycopathologia 2006; 161(2): 93-99.
59. Jolley KA, Chan MS, Maiden MC. mlstdbNet-distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. BMC Bioinformatics 2004; 5: 86.
60. Hurst SF, Kidd SE, Morrissey CO, Snelders E, Melchers WJ, Castelli MV, et al. Interlaboratory reproducibility of a single-locus sequence-based method for strain typing of Aspergillus fumigatus. J Clin Microbiol 2009; 47(5): 1562-1564.
61. Savelkoul PH, Aarts HJ, de Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, et al. Amplified-

Archive of SID
www.SID.ir

fragment length polymorphism analysis: the state of an art. J Clin Microbiol 1999; 37(10): 3083-3091.

62. Chazalet V, Debeaupuis JP, Sarfati J, Lortholary J, Ribaud P, Shah P, et al. Molecular typing of environmental and patient isolates of Aspergillus fumigatus from various hospital settings. J Clin Microbiol 1998; 36(6): 1494-1500.
63. Perrone G, Mulè G, Susca A, Battilani P, Pietri A, Logrieco A. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of Aspergillus carbonarius, Aspergillus tubingensis, and Aspergillus niger strains isolated from grapes in Italy. Appl Environ Microbiol 2006; 72(1): 680-685.
64. Bain JM, Tavanti A, Davidson AD, Jacobsen MD, Shaw D, Gow NA, et al. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus Aspergillus fumigatus. J Clin Microbiol 2007; 45(5): 1469-1477.
65. de Valk HA, Meis JF, Curfs IM, Muehlethaler K, Mouton JW, Klaassen CH. Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of Aspergillus fumigatus isolates. J Clin Microbiol 2005; 43(8): 4112-4120.
66. Wang DY, Hadj-Henni L, Thierry S, Arné P, Chermette R, Botterel F, et al. Simple and highly discriminatory VNTR-based multiplex PCR for tracing sources of Aspergillus flavus isolates. PLoS One 2012; 7(9): e44204.

Archive of SID

www.SID.ir