

مروری بر روش‌های مولکولی مورد استفاده در مطالعات اپیدمیولوژیک عوامل میکروبی

رضا رنجبر M.Sc. و سیدرضا حسینی دوست Ph.D.

آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) - پژوهشکده طب رزمی - مرکز تحقیقات بیولوژی - تهران - ایران

خلاصه

تیپ‌بندی سویه‌های میکروبی جزء لاینفک بررسی‌های اپیدمیولوژیک بیماری‌های عفونی می‌باشد. این فرایند از نظر اپیدمیولوژیکی جهت شناسایی همه‌گیری‌ها، تشخیص منبع عفونت‌ها، ردیابی و شناسایی سویه‌های بیماریزا، بررسی پاتوژن‌های کسب شده بیمارستانی و ارزیابی روش‌های کنترل عفونت از اهمیت بالایی برخوردار است. به‌طور کلی روش‌های تیپ‌بندی به دو دسته عمده روش‌های فنوتیپی و روش‌های ژنوتیپی تقسیم می‌گردند. روش‌های فنوتیپی یا به‌عبارت دیگر روش‌های سنتی شامل آن دسته از روش‌هایی هستند که محصولات بیان یک ژن یا ژن‌های خاصی را جهت اهداف اپیدمیولوژیک دنبال می‌کنند و تغییرپذیری بالایی دارند. روش‌های ژنوتیپی مبتنی بر بررسی ساختار ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها بوده و کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند. در سال‌های اخیر چند تکنیک مولکولی به‌عنوان روش‌های انتخابی برای تیپ‌بندی میکروارگانیسم‌ها ظهور نموده است. این روش‌ها چندین مزیت نسبت به روش‌های سنتی دارند. از جمله این مزایا می‌توان به قدرت افتراق‌دهی بالاتر، کاربرد گسترده‌تر برای انواع مختلف گونه‌های میکروبی و سرعت بالاتر اشاره نمود.

در این بررسی، روش‌های موجود تیپ‌بندی به‌ویژه روش‌های مولکولی با نظر به مبانی تکنیکی و مفاهیمی همچون قدرت افتراق‌دهی، میزان تکرارپذیری، سادگی انجام و غیره بحث و مقایسه شده است.

واژه‌های کلیدی: تیپ‌بندی مولکولی، ریبوتاپیینگ، ژل الکتروفورز در میدان ضربانی، RAPD، PCR

مقدمه

به‌دنبال بروز یک همه‌گیری عفونی چه به‌شکل غیرعمدی و یا عمدی (حملات بیولوژیک و بیوتروریستی)، توجه به ابعاد اپیدمیولوژیک در شناخت عامل ایجاد عفونت، منبع، مخزن و چگونگی نحوه انتقال و انتشار آن و به‌دنبال آن جهت‌دهی اقدامات محافظتی و درمانی بسیار حایز اهمیت است [۱، ۲].

بررسی‌های همه‌گیری‌شناختی به‌ویژه در طی یک حمله بیولوژیک و بیوتروریستی که احتمال به‌کارگیری سویه‌های واجد خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی تغییریافته و غیرمعمول وجود دارد، جهت تعیین عامل به‌کار گرفته شده و افتراق آن با سویه‌های اندمیک و معمول بسیار کمک‌کننده می‌باشند. دستیابی به این مهم امروزه با توسعه روش‌های پیشرفته مولکولی امکان‌پذیر شده است.

۶- سرعت انجام

عبارت از مدت زمان صرف شده جهت آزمایش برای حصول نتیجه می‌باشد.

۷- سادگی تفسیر روش

هر روشی که ویژگی‌های فوق‌الذکر را داشته باشد ایده‌آل می‌باشد ولی باید متذکر شد که هیچکدام از روش‌های موجود واجد تمام این خصوصیات نمی‌باشند. از این‌رو، تاکنون هیچ روش استاندارد طلایی معرفی نشده و در بررسی‌های همه‌گیری‌شناختی، توأم از چند روش استفاده می‌گردد [۵، ۷].

روش‌های تیپ‌بندی مورد استفاده در بررسی‌های اپیدمیولوژیک

به‌طور کلی روش‌های تیپ‌بندی عوامل میکروبی به دو دسته روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی تقسیم‌بندی می‌گردند.

روش‌های فنوتیپی

روش‌های فنوتیپی یا به‌عبارت دیگر روش‌های سنتی شامل آن دسته از روش‌هایی هستند که محصولات بیان یک ژن یا ژن‌های خاصی را جهت اهداف اپیدمیولوژیک دنبال می‌کنند. ویژگی‌هایی همچون پروفایل بیوشیمیایی (مدنظر در بیوتایپینگ)، آنتی ژن‌های موجود روی سطح سلول‌های میکروبی (اساس سروتایپینگ)، الگوی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی (آنتی‌بیوگرام)، پروفایل باکتریوفازی (باکتریوفازتایپینگ) و غیره با این روش‌ها قابل بررسی می‌باشند. به‌دلیل آن‌که این ویژگی‌ها مبتنی بر بیان ژن بوده و تحت‌تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند، روش‌های سنتی مبتنی بر این ویژگی‌ها از کارایی پایینی برخوردارند. این روش‌ها گاه در توصیف سیمای اپیدمیولوژیک بیماری‌های عفونی مفید بوده‌اند. مزیت این روش‌ها در سادگی انجام و همچنین در دسترس بودن بعضی مواد و معرف‌های لازم برای انجام آنها می‌باشد. از محدودیت‌های این روش‌ها می‌توان به متغیر بودن نتایج (عدم تکرارپذیری)، پرزحمت بودن آزمایشات، طولانی بودن زمان آزمایش و طیف محدود استفاده آنها اشاره کرد [۵، ۷].

به‌طور کلی روش‌های مورد استفاده در تیپ‌بندی عوامل میکروبی جهت اهداف عملی زیر به‌کار گرفته می‌شوند:

۱- بررسی کانون مشترک بیماری

۲- بررسی انتشار عفونت از یک بیمار به بیمار دیگر

۳- بررسی عفونت اسپورادیک

۴- تعیین هویت تیپ‌های بیماری‌زای عوامل میکروبی

۵- افتراق سویه‌های میکروبی اندمیک از سویه‌های عامل اپیدمی

۶- مونیتورینگ اقدامات درمانی، تعیین الگوی مقاومت و حساسیت

آنتی‌بیوتیکی و نیز بررسی شکست درمان دارویی [۱، ۵].

مفاهیم و معیارهای اساسی در انتخاب روش

در بررسی‌های اپیدمیولوژیک جهت انتخاب یک روش یا روش‌های توأم برای تیپ‌بندی، باید مفاهیم و معیارهای زیر را مدنظر قرار داد.

۱- قابلیت تیپ‌بندی (Typeability)

عبارت از توانایی کسب یک نتیجه مثبت مشخص و واضح برای هر سویه میکروبی می‌باشد که از طریق روش مورد استفاده حاصل می‌گردد.

۲- تکرارپذیری (Reproducibility)

این معیار توانایی کسب نتایج یکسان در پی آزمایشات متوالی روی یک سویه را نشان می‌دهد.

۳- قدرت افتراق‌دهی (Discriminatory power)

این ویژگی به توانایی روش مورد استفاده در افتراق بین سویه‌های مربوط اشاره دارد.

۴- سادگی روش

این خصوصیت پیچیده نبودن روش، ساده بودن آموزش و انجام روش و ارزانی تجهیزات و مواد آن را منعکس می‌کند.

۵- وسعت کاربرد

این ویژگی نشان‌دهنده طیف استفاده از روش برای میکروب‌های متعدد است.

متابولیک می‌باشد. در این شیوه عصاره سلولی روی یک ژل نشاسته‌ای غیر دناتوره الکتروفورز شده و سپس با یک سوبسترای رنگ‌زا رنگ‌آمیزی می‌شود. واریاسیون‌ها در حرکت الکتروفور تیک آنزیم‌ها (الکترومورف) نمایان‌گر جانشینی و تغییرات اسید آمینه‌ای هستند که این جانشینی‌ها واریاسیون‌های ترادف ژن کدکننده آنزیم مورد نظر را نشان می‌دهند. به کمک این تکنیک می‌توان گوناگونی ژنتیکی را ارزیابی و نزدیکی ژنتیکی دو ایزوله را بررسی کرد. این روش بسیار پرزحمت، پرهزینه و تفسیر نتایج آن مشکل می‌باشد [۸، ۹].

۲- الکتروفورز لیپوپلی ساکاریدها

این تکنیک براساس الکتروفورز لیپوپلی ساکارید باکتری‌ها شکل گرفته است. لیپوپلی ساکارید یک قسمت اصلی آنتی‌ژنیک از دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. این ساختار متشکل از مولکول‌های آمفی‌پاتیک بوده که واجد زنجیره‌های جانبی O می‌باشند. زنجیره O معمولاً از قندهای خنثی تشکیل شده است.

لیپوپلی ساکارید را می‌توان با فنل کلروفرم از سلول باکتریایی استخراج نمود. در مرحله الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌امید صورت گرفته و سپس با توجه به وجود قندها در شاخه‌های جانبی پلی ساکارید و همچنین قندهای موجود در هسته مولکول و رنگ‌پذیری این قندها با نقره رنگ‌آمیزی می‌گردد. اختلافات در حرکت الکتروفور تیک مربوط به ساختار و تشکیلات مولکول به‌ویژه زنجیره جانبی است. افتراق دقیق‌تر الگوهای حاصله از طریق تکنیک‌های سرولوژیکی به کمک آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و مونوکلونال امکان‌پذیر است. الکتروفورز لیپوپلی ساکارید روش نسبتاً ساده‌ای جهت ارزیابی ناهمگونی بین سویه‌های یک گونه باکتریایی گرم منفی می‌باشد. به‌عنوان مثال بر پایه تفاوت‌های آنتی‌ژنیک در پلی ساکارید LPS در ویبریولکرا (عامل وبا)، بیش از ۱۳۰ گروه سرولوژیکی شناسایی شده‌اند [۸، ۹].

۳- ایمونوبلاتینگ

در این روش اجزای سلول میکروبی بعد از الکتروفورز به یک غشاء منتقل گردیده و در حضور آنتی‌بادی انکوبه می‌شوند. اتصال آنتی‌بادی

در جدول ۱ به تعدادی از این روش‌ها، مزایا و محدودیت‌های آنها اشاره شده است

روش‌های مولکولی تیپ‌بندی

روش‌های مولکولی تیپ‌بندی خود به دو دسته روش‌های غیرمبتنی بر اسیدهای نوکلئیک و روش‌های مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک تقسیم‌بندی می‌شوند

جدول ۱: مقایسه برخی روش‌های سنتی تیپ‌بندی میکروب‌ها

روش	مزایا	محدودیت‌ها	مدت زمان آزمایش
سروتایپینگ	سادگی انجام	قدرت افتراق دهی پایین، عدم کارایی روش برای برخی عوامل، کسب نتایج مغشوش به دلیل تغییرات آنتی‌ژنیک برخی عوامل، گاهی در دسترس نبودن مواد	از چند دقیقه تا چند ساعت
بیوتایپینگ	سادگی انجام، موجود بودن مواد	کسب نتایج مغشوش به دلیل تغییرات در متابولیسم کربوهیدرات‌ها ناشی از تغییرات بیان ژن	۱-۲ روز
فاژتایپینگ	سادگی انجام	موجود نبودن مواد، عدم کارایی روش برای برخی عوامل، نتایج متغیر	۱ روز
بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی	سادگی انجام، موجود بودن مواد	مقاومت چند دارویی، قدرت پایین افتراق دهی سویه‌ها	۱ روز

الف) روش‌های غیرمبتنی بر اسیدهای نوکلئیک

(Multilocus enzyme electrophoresis) MEE-۱

MEE که روش استاندارد تحقیق پیرامون ژنتیک جمعیت‌های یوکاریوتیک می‌باشد، جهت مطالعه واگرایی ژنتیکی و ساختمان مولکولی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا نیز به کار گرفته شده است. این روش مبتنی بر حرکت الکتروفور تیک مجموعه‌ای از آنزیم‌های

۱- آنالیز پروفایل پلاسمیدی (Plasmid Profile Analysis)

این روش از ابتدایی‌ترین روش‌های تیپ‌بندی ژنتیکی است. از طریق الکتروفورز نمودن پلاسمیدهای استخراج شده و تعیین اندازه و تعداد آنها، به پروفایل پلاسمیدی میکروارگانیسم پی می‌بریم. این روش به‌طور موفقیت‌آمیزی برای آنالیز همه‌گیری‌های عفونت‌های بیمارستانی و عفونت‌های کسب شده در جامعه به‌ویژه برای باکتری‌های رشته‌ای گرم منفی به‌کار گرفته شده است. از مهمترین معایب و محدودیت‌های این روش می‌توان به موارد زیر اشاره کرد

- بعضی ایزوله‌ها فاقد پلاسمید بوده و از این رو، غیرقابل تیپ‌بندی می‌باشند

- از آنجایی‌که پلاسمیدها به‌راحتی از دست‌رفته و یا کسب می‌گردند، پروفایل‌های پلاسمیدی الگوهای پایدار نمی‌باشند.

- اشکال مولکولی مختلف از یک پلاسمید (مانند فرم‌های خطی باز و بسته)، الگوهای مهاجرت الکتروفورتیکی مختلفی ارائه می‌دهند که باعث کسب نتایج مختلف می‌شود.

- ترکیب و محتوی DNA پلاسمیدی به‌خاطر موتاسیون‌زایی ترانسپوزونی، ناپایدار بوده و احتمال کسب نتایج مثبت و منفی کاذب وجود دارد [۵، ۷، ۱۱].

۲- آنالیز DNA کروموزومی از طریق هضم آنزیمی با آنزیم‌های برش‌دهنده محدودالایر

در این روش آنزیم‌های محدودالایر به‌طور آنزیمی، DNA را در نقاطی ویژه که نقطه شناسایی این آنزیم‌ها است، برش می‌دهند. تعداد و اندازه قطعات تحت‌تأثیر ترادف تشخیصی آنزیم، ترکیب و محتوای DNA می‌باشد. آنزیم‌هایی که به‌طور معمول مورد استفاده بوده و دارای مکان‌های برش متعدد هستند مانند (EcoRI, HindIII)، صدها قطعه در اندازه‌های ۵۰ - ۰/۵ کیلو جفت‌باز ایجاد می‌کنند. قطعات حاصله در ژل آگاروز الکتروفورز شده و بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برامید تحت نور UV رویت می‌شوند. در این روش سویه‌های مختلف، پروفایل‌های گوناگون ایجاد می‌کنند. محدودیت‌های این روش شامل:

- آنتی‌ژن از طریق روش‌های ایمونواسی بررسی می‌گردد. این تکنیک ابزار قدرتمندی در آنالیز آنتی‌ژنی و انگشت‌نگاری میکروارگانیسم‌ها است. این روش ارزان و نسبتاً سریع می‌باشد اما به تجربیات خاص جهت تفسیر نتایج نیاز دارد [۹].

۳- آنالیز پروتئین‌های غشاء خارجی و پروتئین‌های کل سلولی (Total cell/OM proteins)

این تکنیک مبتنی بر الکتروفورز پلی‌پپتیدهای موجود در باکتری لیز شده است. از آنجایی‌که پروتئین‌ها توسط ژن‌ها روی کروموزوم باکتریایی رمزدهی می‌شوند، نتایج به‌دست آمده از الکتروفورز این پروتئین‌ها نشانگر ژنوتیپ سویه مورد بررسی خواهد بود [۹].

(ب) روش‌های تیپ‌بندی مبتنی بر ساختارهای ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها

از سال ۱۹۷۵ در پی ابداع و توسعه روش‌های جداسازی، تفکیک و تکثیر اسیدهای نوکلئیک، سیستم‌های مختلف تیپ‌بندی عوامل میکروبی نیز براساس اسیدهای نوکلئیک ظهور نموده‌اند. تنوع ژنتیکی در ساختار DNA عوامل میکروبی که معمولاً بالا بوده و زمینه افتراق آنها را فراهم می‌آورد، این فرصت را ایجاد نموده است که به کمک روش‌های مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک بتوان مطالعات اپیدمیولوژیک را دقیق‌تر، با قدرت افتراق بالاتر، با درجه تکرارپذیری بیشتر، با وسعت کاربرد افزون‌تر و با سرعت بسیار بالاتر نسبت به روش‌های سنتی به انجام رساند [۵، ۱۰].

ویژگی‌های ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها، تشخیص را در سطوح مختلف از جمله تشخیص در حد گونه و تحت‌گونه (تاکسونومی)، تشخیص در حد سویه (ردیابی اپیدمیولوژیک) و تشخیص در حد پارامترهای بیومدیkal مانند ویرولانسیته و مقاومت به داروها مهیا کرده است [۹].

در سال‌های اخیر به‌ویژه طی ده سال گذشته روش‌های مختلف مولکولی مبتنی بر آنالیز ساختار ژنتیکی جهت بررسی‌های اپیدمیولوژیک ابداع و توسعه یافته‌اند. ذیلاً به مهمترین روش‌های مورد استفاده و بیان مزایا و محدودیت‌های آنها می‌پردازیم.

می‌کنند. این شیوه قدرت افتراق‌دهی در حد روش Multilocus enzyme electrophoresis و یا کمتر از آن را دارد. ریبوتایپینگ به مهارت متوسطی نیاز دارد. روش‌های نیمه اتوماتیک مثل Riboprinter Microbial Characterization System TM برای ریبوتایپینگ توسعه یافته‌است [۸-۴ و ۱۶-۱۳].

۵- ژل الکتروفورز در میدان ضربان

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

این تکنیک ابتدا در سال ۱۹۸۴ به‌عنوان ابزاری برای بررسی DNA کروموزومی ارگانسیم‌های یوکاریوتی توصیف شد اما بعداً مشخص گردید که روش فوق‌العاده‌ای برای تیپ‌بندی گونه‌های مختلف میکروبی نیز می‌باشد [۱۷].

در این شیوه ابتدا ارگانسیم به‌طور آنزیمی در پلاگ‌های آگاروز لیز می‌گردد. در مرحله بعد قطعات بزرگ DNA را بعد از هضم کروموزوم با آنزیم‌های برش‌دهنده را از هم جدا می‌کنند. در اینجا برخلاف روش آنالیز DNA کروموزومی از طریق هضم آنزیمی با آنزیم‌های برش‌دهنده که از آنزیم‌های با نواحی برش متعدد استفاده می‌شد، از آنزیم‌های برش‌دهنده‌ای که برش‌های کمتری در طول کروموزوم ایجاد می‌کنند استفاده می‌گردد. در طی الکتروفورز، تفکیک کامل قطعات بزرگ DNA کروموزومی از طریق تغییر جهت دوره‌ای در میدان الکتریکی که توسط ۳ سری الکتروود ایجاد می‌گردد، حاصل می‌شود، به‌طوری‌که ۵ تا ۲۰ قطعه با اندازه‌ای در حدود ۸۰۰ - ۱۰ کیلو جفت باز ایجاد می‌گردند.

رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید و رویت قطعات رنگ‌آمیزی شده تحت نور UV صورت می‌گیرد. این روش یکی از متداول‌ترین تکنیک‌هایی است که با توان بالای افتراق‌دهی برای بسیاری از گونه‌های باکتریایی به کار گرفته شده است به‌طوری‌که اغلب به‌عنوان استاندارد طلایی روش‌های تیپ‌بندی مولکولی در نظر گرفته می‌شود.

محدودیت‌های این روش به شرح زیر می‌باشد:

(الف) تهیه DNA نیاز به چندین بار انکوباسیون طولانی مدت دارد

(ب) نیاز به هزینه نسبتاً بالا و تجهیزات ویژه دارد [۵-۴، ۷، ۱۷].

- مقایسه پروفایل‌های پیچیده مشکل است

- امکان مخدوش شدن نتایج به‌دلیل وجود پلاسמידها وجود دارد [۶، ۷، ۹].

۳- بررسی چند شکلی در قطعات حاصل از هضم با آنزیم‌های محدودالثر از طریق آنالیز ساترن بلات

این روش بر پایه تشخیص تعداد و اندازه‌های مختلف از قطعات بریده شده (با آنزیم با اثر محدود) که واجد یک ترادف کروموزومی خاصی می‌باشند، استوار است. در ابتدا DNA هضم آنزیمی می‌شود و سپس قطعات حاصله روی ژل آگاروز، الکتروفورز می‌گردند. در مرحله بعد، قطعات الکتروفورز شده به یک غشاء منتقل می‌گردند. قطعات خاص مورد نظر از طریق هیبریداسیون با یک کاوش‌گر نشاندار شده شناسایی می‌شوند. به کمک این روش تمام سویه‌هایی که لوکوس متصل‌شونده به کاوش‌گر را در خود حمل می‌کنند، قابل تیپ‌بندی هستند. انتخاب کاوش‌گر و آنزیم محدودالثر برای تفسیر نتایج از اهمیت بالایی برخوردار است. این روش قدرت تکرارپذیری و افتراق‌دهی بالایی دارد [۵، ۷، ۱۲].

۴- ریبوتایپینگ (Ribotyping)

این تکنیک که ابتدا توسط گرمونت و گرمونت (Grimont and Grimont) ابداع گردید [۱۳]، یک آنالیز ساترن بلاتینگ RFLP برای اپرون‌های ریبوزومی (23s rRNA, 16s rRNA) می‌باشد. ترادف ژن‌های ریبوزومی فوق‌العاده محافظت شده‌اند و کاوشگرهای به‌کار گرفته شده در این روش مثل کاوشگر مربوط به E.coli rRNA، با اپرون‌های ریبوزومی بسیاری از گونه‌های باکتریایی هیبرید می‌گردد.

از آنجایی‌که همه باکتری‌ها واجد اپرون‌های ریبوزومی هستند، تماماً با این روش قابل تیپ‌بندی می‌باشند. برخی قطعات حاصل از آنزیم‌های محدودالثر که محافظت شده می‌باشند، برای تعیین هویت در سطح گونه مناسبند. نتایج حاصله پایدار و قابل تکرار هستند. ارگانسیم‌های واجد ۷-۵ اپرون ریبوزومی، ۱۵-۱۰ باند ایجاد

Versalovic و همکاران توصیف گردید [۲۰]. دو سری عمده از عناصر تکراری شامل: عناصر پالیندرمیک خارج ژنی (REP یا Repetitive extragenic palindromic) که اندازه ۳۸ جفت‌بازی دارند و همچنین ترادف‌های ثابت تکراری داخل ژنی انتروباکتریایی (Enterobacterial repetitive intetgenic consensus یا ERIC) که اندازه ۱۲۶ جفت‌بازی دارند، اهداف موردنظر این روش می‌باشند. این روش از قدرت افتراق‌دهی مناسبی در بین سویه‌ها برخوردار است [۲، ۱۹، ۲۱].

ج) RFLP ویژه لوکوس بر پایه PCR

در این روش لوکوس ژنتیکی ویژه‌ای که از طریق PCR با پرایمرهای ویژه‌ای تکثیر می‌گردد، به کمک آنزیم‌های برش‌دهنده محدودالانتر ویژه‌ای مورد بررسی RFLP قرار می‌گیرد. قطعات DNA برش‌خورده در مرحله بعد روی ژل آگاروز یا پلی‌اکریل آمید، جدا شده و الگوهای هضم آنزیمی تحت رنگ‌آمیزی اتیدیوم برمایند و نور UV رویت می‌گردند. نمونه‌ای از این روش، استفاده از PCR جهت تکثیر ژن‌های مربوط به اپرون rRNA است که موسوم به PCR - Ribotyping می‌باشد [۲].

د) AFLP

این روش مرکب از انگشت‌نگاری DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز می‌باشد. این تکنیک بر پایه تکثیر انتخابی از یک زیر مجموعه قطعات DNA است که توسط آنزیم‌های محدودالانتر ایجاد شده‌اند. در بیشتر موارد DNA باکتریایی تحت برش آنزیم‌هایی مثل MseI و EcoRI قرار گرفته و سپس به یک رابط (Linker) متصل می‌شوند. در داخل رابط مکان‌های محدودالانتر برای آنزیم‌ها و هم ترادف‌هایی خاص اتصال پرایمرها وجود دارد. در این حالت تکثیر انتخابی صورت می‌گیرد. برای رویت الگوهای حاصله به یکی از پرایمرها یک نشان‌گر رادیواکتیو یا فلورسنت متصل می‌گردد. شناسایی محصولات از طریق رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برمایند نیز امکان‌پذیر است. این روش قدرت تکرارپذیری مناسب داشته ولی قدرت افتراق‌دهی آن از Rep-PCR و PFGE کمتر است. این تکنیک از

۶- روش‌های تیپ‌بندی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

روش PCR که چند سال است، برای تشخیص مستقیم انواعی از عوامل میکروبی در نمونه‌های بالینی به کار گرفته می‌شود، به‌عنوان یک تکنیک سریع نیز در بین تکنیک‌های تیپ‌بندی مولکولی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار شده است. در این روش قسمتی از ترادف مورد نظر که روی الگوی اولیه DNA وجود دارد، در شرایط آزمایشگاهی و به‌طور تصادفی تکثیر شده تا مقادیر انبوهی از DNA هدف ایجاد گردد. مراحل مختلف دناتوراسیون، اتصال پرایمرها و توسعه در طی ۲۰ تا ۳۰ چرخه متوالی در یک دستگاه ترموسیکلر و به مدت ۳-۴ ساعت انجام می‌گردد. در مراحل بعد محصولات تکثیر شده در ژل آگاروز و یا پلی‌اکریل آمید الکتروفورز می‌شوند. رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برمایند و رویت قطعات رنگ‌آمیزی شده تحت نور UV صورت می‌گیرد [۵-۷].

روش‌های تیپ‌بندی مبتنی بر واکنش PCR عمدتاً شامل:

الف) تکنیک Random amplified polymorphic DNA

این تکنیک که ابتدئاً توسط ویلیام ابداع گردید، گاهی از آن به‌عنوان روش (AP-PCR یا Arbitrarily primed PCR) نام برده می‌شود [۱۸]. در واقع تکنیک روشی از PCR است که در آن از یک پرایمر کوتاه (معمولاً ۱۰ جفت‌باز) برای هیبریداسیون به مکان‌های تصادفی کروموزومی استفاده می‌شود. نتیجتاً بعد از انجام چرخه‌های متوالی، قطعات با اندازه‌های مختلفی حاصل می‌آیند. از آنجایی که تعداد و محل مکان‌های تصادفی در بین سویه‌های مختلف متفاوت می‌باشد، اندازه و تعداد قطعات حاصله روی ژل الکتروفورز نیز متفاوت و افتراق‌دهنده می‌باشند.

از نظر تئوری این روش برای هر گونه‌ای از ارگانسیم‌ها قابل استفاده است. از محدودیت‌های این روش می‌توان به قدرت افتراق‌دهی و تکرارپذیری پایین آن اشاره کرد [۲، ۷، ۱۵، ۱۹].

ب) تکنیک Rep - PCR

این روش بر پایه تکثیر ترادف تکراری از DNA روی ژنوم ارگانسیم مورد نظر استوار است که ابتدا توسط

اپیدمی‌دهنده عوامل میکروبی، تمایز سویه‌های میکروبی به کار گرفته شده در همه‌گیری‌های عمدی (مدنظر در حملات بیوتوریستی) از سویه‌های اندمیک جامعه، مونیتورینگ اقدامات درمانی، تعیین الگوی مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی و بررسی شکست درمان دارویی می‌باشد. در انتخاب روش یا روش‌های تیپ‌بندی باید به قدرت تیپ‌بندی، تکرارپذیری، قدرت افتراق‌دهی، سادگی روش، وسعت کاربرد، سرعت انجام و سادگی تفسیر روش توجه نمود [۵، ۷].

در سال‌های اخیر چندین تکنیک مولکولی به‌عنوان روش‌های انتخابی برای تیپ‌بندی میکروب‌ها ظهور نموده‌اند. روش‌های مولکولی جدید بر خلاف روش‌های فنوتیپی که مبتنی بر بررسی ویژگی‌های ظاهری و تغییرپذیری می‌باشند، بر بررسی ترادف تغییرناپذیر یا کمتر تغییرپذیر ژنی میکروارگانیسم هدف استوار بوده و کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند. این روش‌ها نسبت به روش‌های سنتی واجد قدرت افتراق‌دهی بالاتر، کاربرد گسترده‌تر برای انواع مختلف گونه‌های میکروبی و سرعت بالاتر می‌باشند [۵، ۱۰]. امروزه با توجه به بالا گرفتن خطر و تهدید به‌کارگیری عوامل میکروبی غیرمعمول و تغییر یافته ژنتیک، روش‌های تیپ‌بندی جدید که کوچکترین تغییرات و موتاسیون‌ها را شناسایی می‌نمایند جهت تمایز سویه‌های میکروبی به کار گرفته شده از سویه‌های اندمیک قابل توسعه می‌باشند.

آنالیز پلاسمیدی، از روش‌های ابتدایی است که جهت بررسی ارتباط سویه‌های مسئول ایجاد همه‌گیری‌ها، تعیین منبع و نحوه انتقال عفونت و بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به کار گرفته شده است. این روش ساده و ارزان است، لیکن تکرارپذیری نتایج پایین است [۵، ۷، ۱۱]. روش‌های ساترن بلات از DNA کروموزومی (مانند ریپوتاپیپینگ و RFLP و غیره) که بر پایه برش DNA کروموزومی از طریق آنزیم‌های محدودالایر و سپس بلات نمودن قطعات حاصل از برش و رویت آنها استوار می‌باشند، ابزارهای مناسبی برای بررسی‌های اپیدمیولوژیکی بوده و تکرارپذیری بالایی دارند [۲، ۵، ۶]. روش‌های انگشت‌نگاری مبتنی بر PCR مثل AP - PCR, REP-PCR, RAPD, ERIC PCR از سرعت

Rep - PCR پرزحمت‌تر است اما نسبت به PFGE از سرعت خیلی بالاتری برخوردار است. این روش سطح وسیعی از پلی‌مرفیسم را با قدرت تکرارپذیری بالا و باندهای یک شکل ایجاد می‌کند [۲، ۵، ۲۲].

ه) تکنیک ترادف‌یابی (Sequencing)

این روش مبتنی بر ترادف‌یابی قسمت‌هایی از ژنوم ارگانیسم موردنظر است. اگرچه ابتدا این روش به‌عنوان ابزاری برای تیپ‌بندی ویروس‌ها مطرح شد، با این حال، اخیراً جهت بررسی‌های اپیدمیولوژیکی مولکولی بیماری‌های حاصله از باکتری‌ها نیز به کار گرفته شده است [۶]. در مواردی همچون تیپ‌بندی ویروس‌ها، این روش استاندارد طلایی محسوب می‌گردد. روش‌های جدید ترادف‌یابی، از پرایمرهای نشاندار شده با مواد فلورسنت استفاده می‌کنند که پیشرفت واکنش به‌صورت لحظه‌ای (Real time) قابل بررسی است. برخلاف روش‌هایی مثل Rep-PCR, PFGE و یا RAPD، آنالیز کل کروموزوم با این روش امکان‌پذیر نمی‌باشد، بلکه قسمت خیلی کوچکی از ژنوم که بین سویه‌های باکتریایی و قارچی مختلف است، ترادف‌یابی می‌گردد. جهت تعیین هویت و تیپ‌بندی عوامل میکروبی که کشت آنها مشکل است، این روش انتخابی می‌باشد. به‌طور کلی این روش پرهزینه بوده و به مهارت خیلی بالایی نیاز دارد [۶].

و) سایر تکنیک‌های تیپ‌بندی مبتنی بر PCR

روش‌های تکثیر QB، سیستم تکثیر ترانسکریپت (TAS)، 3SR، NASBA، CFLP و غیره از جمله روش‌های سریعی می‌باشند که در سال‌های اخیر توسعه یافته‌اند.

نتیجه‌گیری و بحث

اصولاً از نظر اپیدمیولوژیکی، اهمیت تیپ‌بندی سویه‌های میکروبی در بررسی کانون مشترک بیماری، بررسی انتشار عفونت از یک بیمار به بیمار دیگر، بررسی عفونت اسپورادیک، تعیین هویت تیپ‌های بیماری‌زای عوامل میکروبی، افتراق سویه‌های اندمیک از سویه‌های

در خاتمه متذکر می‌شویم هرکدام از روش‌های موجود دارای مزایا و محدودیت‌هایی می‌باشند. لذا تاکنون هیچ روشی به‌عنوان استاندارد طلایی معرفی نشده است. از این‌رو، در بررسی‌های همه‌گیری شناختی باید توأمأ دو یا بیش از دو روش با هم به کار گرفته شوند.

منابع

- 1- Maslow J, Mulligan ME(1996). Epidemiologic typing systems. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 17: 595- 604.
- 2- Olive DM and Bean PA (1999). MINIREVIEW: Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*; 37: 1661-1669.
- 3- Fujino T, Sekiguchi J, Kawana A, et al(2000). Molecular epidemiology of methicillin-resistant staphylococcus aureus in a Tokyo hospital in 2002. *Jpn J Infect Dis*; 55: 210 – 3.
- 4- Arbeit RD(1995). Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: Murray P. R., Baron E J, Pfaller M. A, Tenover F C, and Tenover R. H. *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. ASM Press, Washington D C, p: 190-208
- 5- Tenover F C, Arbeit R.D, and Goering R.V (1997). How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Control Hosp Epidemiol*; 18: 426-39.
- 6- Maurer J J (2000). Understanding the molecular methods for typing bacteria:What does PFGE, RFLP, or BRENDA mean?. *The Poultry Informed Professional. Issue*; 34:1-6.
- 7- <http://www.msu.edu/course/fsc/840/lect-2.pdf>
- 8-Towner KJ, and Cockayne E(1995). *Molecular methods for microbial identification and typing*. 1st ed.Chpman&Hal, P: 14- 17.
- 9- [http // WWW. Mzcp, zoonoses.gr/chania/Lectures/Typing/TypingSystemsDoc.doc](http://WWW.Mzcp.zoonoses.gr/chania/Lectures/Typing/TypingSystemsDoc.doc)
- 10-Tenover F C, Arbeit R D, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R et al. (1994). Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol*; 32: 407 – 415.
- 11- Schaberg DR, Tompkins LS, Falkow S.(1981). Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*; 13: 1105 – 8.
- 12-Sambrook J, Russell DW(2001). Maniatis T.Molecular cloning- a laboratory manual . 3th ed. Vol 1. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbr Press, P: 3.31.

مناسبی برخوردار بوده ولیکن تکرارپذیری پایینی دارند[۲، ۵]. آنالیز ژنوم کروموزومی از طریق روش PFGE با این‌که پرزحمت و گران است ولی در حال حاضر یکی از بهترین روش‌های تیپ‌بندی است چرا که واجد قدرت افتراق‌دهی و تکرارپذیری بالا است[۲، ۵، ۶، ۹، ۱۷].

- 13-Grimont F, and Grimont PAD(1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction pattern as potential taxonomic tools. *Annales de l'Institut Pasteur microbiologie*;137B:165-75.
- 14- Barry T, Collieran G, Glennon M, Dunican L K, and Gannon F (1991). The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl*; 1: 51 – 56.
- 15- Struelens M J (1998). Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: Current issues and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*; 93: 581 – 585.
- 16- Stull T L, Lipuma J J, and Edlind T D (1988). A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. *J Infect Dis*;157: 280 – 286.
- 17- Schwartz DC, and Cantor CR(1984). Separation of yeast chromosomesized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*; 37: 67 – 75.
- 18- Williams J G, Kubelik A.R., Livak K J, Rafalsky J A, and Tingey SV(1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Res*; 18: 6531– 6535.
- 19- Caetano-Anolles G, Bassam B J, and Gresshoff P M (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers.*Bio/Technology*; 9: 553 – 557.1893.
- 20- Versalovic J, Koeuth T, and Lupski J R (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*; 19: 6823 – 6831.
- 21- Woods C R, Versalovic J, Koeuth T, and Lupski J R. (1993). Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. *J Clin Microbiol*; 31: 1927 – 1931.
- 22- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee TV, Hornes M., Frijters A, et al(1995). AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*; 21: 4407 –4414.