جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

طب‌نظامی
تابستان ۱۳۸۲، شماره ۵ (۲)
صفحات: ۱۶۴-۱۵۷

مروری بر روش‌های مولکولی مورد استفاده در مطالعات اپیدمیولوژیک عوامل میکروبی

رضا رنجبر.M.Sc و سیدرضا حسینی‌دوست.Ph.D

آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(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 میکروب‌ها 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، ریبوتایپینگ، ژل الکتروفوز 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 به‌این مهم امروزه با توسعه روش‌های پیشرفته مولکولی امکان‌پذیر شده است.

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بـه‌طـور کلـی روش‌هـای 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].

مفاهـیم و معـیارهای اساسـی در انـتخاب روش

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

۱- قابلیت تیپ‌بندی(Typeability)

عـبارت از توانایـی کسب یک نتیجه مثبت مشخص و واضح برای هر سـویه میکروبـی مـی‌باشـد کـه از طـریق روش مورد استفاده حاصل می‌گردد.

۲- تکرارپذیری(Reproducibility)

ایـن معـیار توانایـی کسب نتایج یکسان در پی آزمایشات متوالی روی یک سویه را نشان می‌دهد.

۳- قدرت افتراق‌دهی(Discriminatory power)

ایـن ویژگـی بـه توانایـی روش مورد استفاده در افتراق بین سویه‌های مربوط اشاره دارد.

٤- سادگی روش

ایـن خصوصـیت پیچـیده نـبودن روش، سـاده بودن آموزش و انجام روش و ارزانی تجهیزات و مواد آن را منعکس می‌کند.

۵- وسعت کاربرد

ایـن ویژگـی نشـان‌دهـنده طیف استفاده از روش برای میکروب‌های متعدد است.

۶- سرعت انجام

عـبارت از مـدت زمـان صرف شده جهت آزمایش برای حصول نتیجه می‌باشد.

۷- سادگی تفسیر روش

هـر روشـی کـه ویژگی‌های فوق‌الذکر را داشته باشد ایده‌آل می‌باشد ولـی بـاید متذکر شد که هیچکدام از روش‌های موجود واجد تمام این خصوصـیات نمـی‌باشند. از این‌رو، تاکنون هیچ روش استاندارد طلایی معرفـی نشـده و در بررسی‌های همه‌گیری‌شناختی، تواماً از چند روش استفاده می‌گردد[۵، ۷].

روش‌هـای تیـپ‌بـندی مـورد استفاده در بررسی‌های اپیدمیولوژیک

بـه‌طـور کلـی روش‌هـای تیـپ‌بـندی عوامـل میکروبـی به دو دسته روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی تقسیم‌بندی می‌گردند.

روش‌های فنوتیپی

روش‌هـای فنوتیپی یا به‌عبارت دیگر روش‌های سنتی شامل آن دسته از روش‌هایـی هسـتند که محصولات بیان یک ژن یا ژن‌های خاصی را جهـت اهـداف اپیدمـیولوژیک دنبال می‌کنند. ویژگی‌هایی همچون پـروفایل بیوشـیمیایی (مدنظـر در بیوتایپیـنگ)، آنتـی ژن‌های موجود روی سـطح سـلول‌هـای میکروبـی (اسـاس سـروتایپینگ)، الگـوی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی (آنتی‌بیوگرام)، پروفایل باکتریوفاژی (باکتریوفاژتایپیـنگ) و غـیره بـا ایـن روش‌هـا قابل بررسی می‌باشند. بـه‌دلـیل آن‌کـه ایـن ویژگـی‌هـا مبتنـی بر بیان ژن بوده و تحت‌تأثیر شـرایط محیطـی قـرار مـی‌گـیرند، روش‌هـای سـنتی مبتنـی بر این ویژگـی‌هـا از کارآیـی پایینی برخوردارند. این روش‌ها گاهاً در توصیف سـیمای اپیدمـیولوژیک بـیماری‌هـای عفونی مفید بوده‌اند. مزیت این روش‌هـا در سـادگی انجام و همچنین در دسترس بودن بعضی مواد و معـرف‌هـای لازم بـرای انجـام آنهـا مـی‌باشد. از محدودیت‌های این روش‌هـا مـی‌تـوان بـه متغیر بودن نتایج(عدم تکرارپذیری)، پرزحمت بـودن آزمایشات، طولانی بودن زمان آزمایش و طیف محدود استفاده آنها اشاره کرد[۵، ۷].

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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 افتراق‌دهی پایین، عدم کارآیی روش برای برخی عوامل، کسب نتایج مغشوش به‌دلیل تغییرات آنتی‌ژنیک برخی عوامل، گاهاً در دسترس نبودن مواد	از چند دقیقه تا چند ساعت
بیوتایپینگ	سادگی انجام، موجودبودن مواد	کسب نتایج مغشوش به‌دلیل تغییرات در متابولیسم کربوهیدرات‌ها ناشی از تغییرات بیان ژن	۲-۱ روز
فاژتایپینگ	سادگی انجام	موجود نبودن مواد، عدم کارآیی روش برای برخی عوامل، نتایج متغیر	۱روز
بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی	سادگی انجام، موجود بودن مواد	مقاومت چند دارویی، قدرت پایین افتراق‌دهی سویه‌ها	۱ روز

الف) روش‌های غیرمبتنی بر اسیدهای نوکلئیک

۱-MEE (Multilocus enzyme electrophoresis)

MEE که روش استاندارد تحقیق پیرامون ژنتیک جمعیت‌های یوکاریوتیک می‌باشد، جهت مطالعه واگرایی ژنتیکی و ساختمان مولکولی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا نیز به‌کار گرفته‌شده است. این روش مبتنی بر حرکت الکتروفورتیک مجموعه‌ای از آنزیم‌های 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 الکتروفورتیک آنزیم‌ها(الکترومورف) نمایان‌گر جانشینی و تغییرات اسید آمینه‌ای هستند که این جانشینی‌ها واریاسیون‌های ترادف ژن کدکننده آنزیم موردنظر را نشان می‌دهند. به‌کمک 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 لیپوپلی‌ساکاریدها

این تکنیک براساس الکتروفورز لیپوپلی‌ساکارید باکتری‌ها شکل گرفته است. لیپو پلی‌ساکارید 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 معمولا از قندهای خنثی تشکیل شده است.

لیپو پلی‌ساکارید را می‌توان با فنل‌کلروفرم از سلول باکتریایی استخراج نمود. در مرحله الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید صورت گرفته و سپس با توجه به‌وجود قندها در شاخه‌های جانبی پلی‌ساکارید و همچنین قندهای موجود در هسته مولکول و رنگ‌پذیری این قندها با نقره رنگ‌آمیزی می‌گردد. اختلافات در حرکت الکتروفورتیک مربوط به ساختار و تشکیلات مولکول به‌ویژه زنجیره جانبی است. افتراق دقیق‌تر الگوهای حاصله از طریق تکنیک‌های سرولوژیکی به‌کمک آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و مونوکلونال امکان‌پذیر است. الکتروفورز لیپوپلی‌ساکارید روش نسبتاً ساده‌ای جهت ارزیابی ناهمگونی بین سویه‌های یک گونه باکتریایی گرم منفی می‌باشد. به‌عنوان مثال بر پایه تفاوت‌های آنتی‌ژنیک در پلی‌ساکارید LPS در ویبریوکلرا (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

ـ 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].

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

این تکنیک مبتنی برالکتروفورز 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 درپی 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 به‌کمک 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 میکروب‌ها، تشخیص را در سطوح مختلف از جمله تشخیص در حد گونه و تحت‌گونه (تاکسونومی)، تشخیص در حد سویه (ردیابی اپیدمیولوژیک) و تشخیص درحد پارامترهای بیومدیکال 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.

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 وعفونت‌های 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 این‌رو، غیرقابل تیپ‌بندی می‌باشند

– از آنجایی‌که پلاسمیدها به‌راحتی از دست‌رفته و یا کسب می‌گردند، پروفایل‌های پلاسمیدی الگوهای پایداری نمی‌باشند.

– اشکال مولکولی مختلف از یک پلاسمید (مانند فرم‌های خطی باز و بسته)، الگوهای مهاجرت الکتروفورتیکی مختلفی ارایه 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 محدودالاثر

در این روش آنزیم‌های محدودالاثر 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 (EcoR1,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 برماید تحت نور UV رویت می‌شوند. در این روش سویه‌های مختلف، پروفایل‌های گوناگون ایجاد می‌کنند.

محدودیت‌های این روش شامل:

ـ مقایسه پروفایل‌های پیچیده مشکل است

ـ امکان مخدوش شدن نتایج به‌دلیل وجود پلاسمیدها وجود دارد [۶، ۷، ۹].

۳-بررسی چند شکلی در قطعات حاصل از هضم با آنزیم‌های محدودالاثر 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. به‌کمک این روش تمام سویه‌هایی که لوکوس متصل‌شونده به کاوش‌گر را در خود حمل می‌کنند، قابل تیپ‌بندی هستند. انتخاب کاوش‌گر و آنزیم محدودالاثر برای تفسیر نتایج از اهمیت بالایی برخوردار است. این روش قدرت تکرارپذیری و افتراق‌دهی بالایی دارد[۵، ۷ ، ۱۲].

٤- ریبوتایپینگ (Ribotyping)

این تکنیک که ابتدا توسط گریمونت و گریمونت (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 محدودالاثر که محافظت شده می‌باشند، برای تعیین هویت در سطح گونه مناسبند. نتایج حاصله پایدار و قابل تکرار هستند. ارگانیسم‌های واجد ۷ – ۵ اپرون ریبوزومی، ۱۵ – ۱۰ باند ایجاد 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 ارگانیسم‌های یوکاریوتی توصیف شد اما بعداً مشخص گردید که روش فوق‌العاده‌ای برای تیپ‌بندی گونه‌های مختلف میکروبی نیز می‌باشد[۱۷].

در این شیوه ابتدا ارگانیسم 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 الکترود 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 به‌کار 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].

۶-روش‌هاي تيپبندي مبتني بر واكنش زنجيره اي پليمراز (PCR)

روشPCR کـه چـند سـال اسـت، بـرای تشخیص مستقیم انواعی از عوامـل میکروبـی در نمونـه‌های بالینی به‌کار گرفته می‌شود، به‌عنوان یـک تکنـیک سـریع نـیز در بیـن تکنیک‌های تیپ‌بندی مولکولی از جایگـاه ویـژه‌ای بـرخوردار شده است. در این روش قسمتی از ترادف مـورد نظـر کـه روی الگـوی اولـیه DNA وجـود دارد، در شـرایط آزمایشـگاهی و به‌طور تصاعدی تکثیر شده تا مقادیر انبوهی از DNA هـدف ایجـاد گـردد. مـراحل مخـتلف دناتوراسیون، اتصال پرایمرها و توسـعه در طـی ۲۰ تـا ۳۰ چرخه متوالی در یک دستگاه ترموسیکلر و به‌مدت ۴ – ۳ ساعت انجام می‌گردد. در مراحل بعد محصولات تکثیر شـده در ژل آگـاروز و یـا پلـی‌اکـریل آمـید الکـتروفورز مـی‌شـوند. رنـگ‌آمـیزی با اتیدیوم برماید و رویت قطعات رنگ‌آمیزی شده تحت نور UV صورت می‌گیرد[۵-۷].

روش‌های تیپ‌بندی مبتنی بر واکنش PCR عمدتاً شامل:

الـف) تـکـنـیـک Random amplified polymorphic DNA

ایـن تکنـیک کـه ابـتداً توسط ویلیام ابداع گردید، گاهاً از آن به‌عنوان روش (AP–PCR یـا Arbitrarily primed PCR) نام برده می‌شود [۱۸]. در واقـع تکنـیک روشی از PCR است که در آن از یک پرایمر کوتـاه (معمـولاً ۱۰ جفـت بـاز) بـرای هیبریداسـیون بـه مکـان‌های تصـادفی کروموزومـی اسـتفاده می‌شود. نتیجاً بعد از انجام چرخه‌های متوالـی، قطعـات بـا اندازه‌های مختلفی حاصل می‌آیند. از آنجایی که تعـداد و محـل مکـان‌های تصادفی در بین سویه‌های مختلف متفاوت می‌باشد، اندازه و تعداد قطعات حاصله روی ژل الکتروفورز نیز متفاوت و افتراق‌دهنده می‌باشند.

از نظـر تئوری این روش برای هر گونه‌ای از ارگانیسم‌ها قابل استفاده اسـت. از محدودیـت‌هـای ایـن روش می‌توان به قدرت افتراق‌دهی و تکرارپذیری پایین آن اشاره کرد[۲، ۷، ۱۵، ۱۹].

ب) تـکـنـیـک Rep - PCR

ایـن روش بـر پایـه تکثـیر تـرادف تکـراری از DNA روی ژنـــوم ارگانیسـم مـورد نـظـر اسـتـوار اسـت کـه ابـتدا توسـط Versalovic و همکـاران توصـیـف گردیـد[۲۰]. دو سـری عمده از عناصـر تکـراری شـامـل: عـناصـر پالیـنـدرومـیـک خـارج ژنـی (REP یـا Repetitive extragenic palindromic) کـه انـدازه ۳۸ جـفـت‌بـازی دارنـد و هـمچنـیـن تـرادف‌هـای ثـابـت تـکـراری داخـل ژنـی انـتـروباکـتریـایـی (ERIC یا Enterobacterial repetitive intetgenic consensus) کـه انـدازه ۱۲۶ جفت‌بازی دارند، اهداف موردنظر این روش می‌باشند. ایـن روش از قدرت افتراق‌دهی مناسبی در بین سویه‌ها برخوردار است [۲ ، ۱۹ ، ۲۱].

ج) RFLP ویـژه لـوکـوس بـر پـایـه PCR

در ایـن روش لوکـوس ژنتیکـی ویـژه‌ای کـه از طـریق PCR بـا پرایمـرهای ویـژه‌ای تکثـیر مـی‌گردد، به‌کمک آنزیم‌های برش‌دهنده محدودالاثـر ویـژه‌ای مـورد بررسـی RFLP قـرار مـی‌گـیرد. قطعات DNA بـرش خـورده در مرحله بعد روی ژل آگاروز یا پلی‌اکریل آمید، جـدا شده و الگوهای هضم آنزیمی تحت رنگ‌آمیزی اتیدیوم برماید و نـور UV رویـت مـی‌گـردند. نمونـه‌ای از این روش، استفاده از PCR جهـت تکثـیر ژن‌هـای مـربوط بـه اپرون rRNA است که موسوم به PCR - Ribotyping می‌باشد[۲].

د) AFLP

ایـن روش مرکب از انگشت‌نگاری DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مـی‌باشـد. ایـن تکنـیک بـر پایـه تکثیر انتخابی از یک زیر مجموعه قطعـات DNA اسـت که توسط آنزیم‌های محدودالاثر ایجاد شده‌اند. در بیشتر موارد DNA باکتریایی تحت برش آنزیم‌هایی مثل MseI و EcoRI قـرار گرفته و سپس به یک رابط (Linker) متصل می‌شوند. در داخـل رابط مکان‌های محدودالاثر برای آنزیم‌ها و هم ترادف‌هایی خـاص اتصال پرایمرها وجود دارد. در این حالت تکثیر انتخابی صورت مـی‌گـیرد. بـرای رویـت الگوهـای حاصـله بـه یکـی از پرایمرها یک نشـان‌گر رادیواکتیو یا فلورسنت متصل می‌گردد. شناسایی محصولات از طـریق رنـگ‌آمـیزی بـا اتـیدیوم برماید نیز امکان‌پذیر است. ایـن روش قـدرت تکـرارپـذیـری منـاسـب داشـته ولـی قـدرت افـتراق‌دهـی آن از Rep-PCR و PFGE کمـتر است. این تکنیک از

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 ابتداً این روش به‌عنوان ابزاری برای تیپ‌بندی ویروس‌ها مطرح شد، با این حال، اخیراً جهت بررسی‌های اپیدمیولوژیک مولکولی بیماری‌های حاصله از باکتری‌ها نیز به‌کار 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 PFGE, Rep- PCR 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 تکثیری 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 اپیدمی‌دهنده عوامل میکروبی، تمایز سویه‌های میکروبی به‌کار گرفته شده در همه‌گیری‌های عمدی (مدنظر در حملات بیوتروریستی) 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 تغییرپذیر می‌باشند، بر بررسی ترادف تغییرناپذیر یا کمترتغییرپذیر ژنی میکروارگانیسم هدف استوار بوده و کمتر تحت‌تأثیر 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 تغییریافته ژنتیک، روش‌های تیپ‌بندی جدید که کوچکترین تغییرات و موتاسیون‌ها را شناسایی می‌نمایند جهت تمایز سویه‌های میکروبی به‌کار 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 به‌کار گرفته شده است. این روش ساده و ارزان است، لیکن تکرارپذیری نتایج پایین است[۵، ۷، ۱۱]. روش‌های ساترن بلات از DNA کروموزومی (مانند ریبوتایپینگ و RFLP و غیره) که بر پایه برش DNA کروموزومی از طریق آنزیم‌های محدودالاثر 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

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].

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 تواماً دو یا بیش از دو روش با هم به‌کار 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 Yolken 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 Cockkayne E(1995). Molecular methods for microbial identification and typing.1est ed.Chpman&Hal, P: 14– 17.

9- 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.

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, Colleran 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 perpectives. 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.