# تایپینگ مولکولی

**دکتر میرنژاد**

آگاهی از اصول اپیدمیولوژی جمعیت‌های میکروبی در فیلدهای میکروب شناسی پزشکی، محیطی و کشاورزی مهم است. معرفی سویه‌های باکتریائی که فنوتیپ‌های پاتوژنتیکی مرگ‌آور و بسیار اذیت کننده را نشان می‌دهند، توسعه مقاومت به چند آنتی بیوتیک و کسب روش‌های جدید از انتقال بین ارگانیزم‌های میزبان، فشاری روی محققان جهت کسب شناسائی و مونیتورینگ منشأ و انتشار واریانت‌های ژنتیکی جدا (سویه‌ها) در داخل یک گونه وارد کرده است. کاملاً مشخص است که بهترین فرض در مشخص کردن سویه‌های خاص در کاربرد عملی بیولوژی مولکولی یافت می‌شود. امروزه تکنیک‌های ژنتیک مولکولی مانند PCR، انگشت نگاری اسیدنوکلئیک و آنالیز سکانس DNA کروموزوم باکتری ابزاری مهم در شناسائی باکتری‌ها می‌باشند. با تایپینگ مولکولی می‌توان شیوع عفونت‌های بیمارستانی، شناسائی مخازن آلودگی ناشی از غذا یا انتشار سویه‌های پاتوژنیک گیاهی در محیط و جداسازی ژنوتیپ خاص در کونجوگاسیون با یک باکتری خاص را مشخص کرد و همچنین این روش‌ها به ما آگاهی بیشتر اصول اپیدمیولوژی و تکامل و انتشار بسیاری از بیماری‌های باکتریال را می‌دهند.

از زمان پاستور که فرض‌های اپیدمیولوژیکی در تایپینگ و تمایز باکتری‌ها متکی به روش‌های فنوتیپی و بیوتیپی بود، تمایز اولیه باکتری‌ها و روش‌های طبقه بندی اولیه از روی طبیعت تاکسونومیک باکتری‌ها بسیار گیج کننده بودند. مفاهیم گونه‌های کلاسیک در طبقه بندی باکتری‌ها از ابتدا غیرقابل کاربرد بود و از قرن 20 بود که این مفاهیم برای طبقه بندی تاکسونومیک باکتری‌ها بکار رفت. اخیراً تعاریف گونه‌های مورفولوژی یا کلاسیک با مقایسه سکانس نوکلئوئیدی 16s rDNA به طور کامل مشخص شده است. سویـــــــه‌ها اغلب نشان دهنده تنوع نوکلئوئیدی زیرگونه در ارتباط با بعضی فنوتیپ‌های خاص یا غالب (مانند خصوصیات پاتوژنیسیته) می‌باشد.

بهرحال فرض‌های فنوتیپیک در آزمایشگاه میکروب شناسی هنوز یک سنگر و یک قلعه می‌باشند. امروزه چند تا از این روش‌ها مانند انگشت نگاری متابولیکی نیازمندی‌های تغذیه، آنالیز تفاوت در مقدار اسیدهای چرب و تغییرات ساختمانی در ویژگی‌های مورفولوژیکی متفاوت پیدا شده در سطح باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، بنابراین یک رنگ آمیزی گرم خود به تنهائی راهی را برای شناسائی و تمایز یک باکتری از دیگری باز می‌کند، هرچند هنوز احتیاط‌هابی در ارتباط با این نوع روش‌های تایپینگ کلاسیک که از نظر تاریخی خیلی قدیمی، مشکوک و به سادگی قابل اتکا نمی‌باشند، وجود دارد. تغییرات در روش‌های تایپینگ مولکولی که روی شناسائی ژنوتیپ‌های خاص در میان سویه‌های باکتری‌ها متمرکز شده است انقلابی در مطالعه تنوع سویـــــــــه‌ها و مونیتور کردن شیوع‌های عفونت ایجاد کرده است. این روش‌ها نسبت به روش‌های کلاسیک تیپ بندی دارای چندین فایده از جمله موارد ذیل می‌باشند: نیاز نداشتن به تهیه کشت تک از یک سلول باکتری، افزایش پایداری و حساسیت سنجش و انجام واکنش در زمان کمتر و در نهایت اینکه یک تیپ مولکولی که از انگشت نگاری DNA یا سکانس نوکلئوتید حاصل می‌شود دارای اطلاعات زیادی درباره سویه می‌باشد؛ برای مثال آنالیز انگشت نگاری تکراری با REP ,ERIC و پروب‌های BOX دوازده آمپلیکون (قطعات آمپلی شده) نرمال را در یک سویه خاص نشان می‌دهند.

عموماً روش‌های شناسائی سویه بستگی به 3 استراتژی پایه زیر دارد.

1- آنالیز انگشت نگاری کروموزم با بکارگیری تکنیک‌های آمپلی فیکاسیون اولیگونوکلئوتید (RAPD و REP)

2- قطعات حاصل از RE کروموزم باکتری (RFLP)

3- آمپلی فیکاسیون آنزیمی سکانس‌های ژن تکی و آنالیز سکانس‌های بعدی محصولات PCR ایجاد شده.

بدون شک مهم‌ترین فایده تایپینگ باکتری‌ها زمانی مشخص می‌شود که چندین قطعه از DNA باکتری توسط PCR آمپلی شود. امروزه پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی چند لوکوسی جهت شناسائی چندین خانواده که عناصر تکراری محافظت شده در سراسر کروموزم دارند، بکار می‌رود. این تکنیک‌ها بدون استفاده از مواد رادیواکتیویته و به آسانی با بکار بردن ترموسایکلر و الکترفوروز افقی قابل اجرا می‌باشند. یکی از بزرگترین فایده تیپ بندی

براساس PCR انعطاف پذیری آنها می‌باشد که به ما این اجازه را می‌دهد که در کمیت و کیفیت DNA ژنومی تغییراتی ایجاد نمائیم. آماده سازی جهت انجام PCR می‌تواند به همان سادگی با اضافه کردن سلول کامل مستقیماً به مخلوط واکنش باشد یا اینکه از چندین راه استخراج سریع DNA (معمول یا غیرمعمول) که در عرض چند دقیقه DNA به ما می‌دهد استفاده شود. تکنیک‌های انگشت نگاری براساس PCR که اخیراً در تمایز سویه‌ها بکار می‌روند عبارتند از: rDNA PCR و Rep-PCR نواحی فاصله انداز داخلی 16s-23s (ریبوتایپینگ) و RAPD-PCR.

ارزیابی سویه‌ها بطور مستقیم از سکانس‌های نوکلئوتیدی قدرت یکسانی در حل باکتری خاص دارد و هنگامی که با PCR ژنوم هدف تکی و تکنیک‌های سکانس کننده اتومات کوبل می‌شود اطلاعات ژنوتیپی واضح‌تر و سریع‌تر درباره سویه به ما می‌دهد.

سکانس DNA ریبوزومی در تمایز فیلوژنیکی خانواده‌های دور از هم در یوکاریوت‌ها بسیار مفید می‌باشد. سکانس‌های اجزای کوچک rRNA به طور خاص در حل ارتباط تکاملی داخل شاخه باکتری‌های ارغوانی بسیار مفید و مؤثر است. ارزش تمایزی ژن‌های بکار رفته برای تیپ بندی براساس اسید نوکلئیک سویه‌های متفاوت، اغلب داخل یک سیستم باکتری خاص به صورت تجربی تعیین می‌شود. در بعضی موارد چندین لوکوس متفاوت در کونجوکاسیون با همدیگر به ترتیب سبب افزایش دسترسی در شناسائی سویه‌ها و افزایش تمایز بین دو سویه می‌شوند. عموماً چندین فاکتور داخل ژن‌های کد کننده باکتری که منجر به شناسائی آنها می‌شود به عنوان مارکرهای مولکولی مفید برای تمایز سویه‌ها وجود دارد:

1- میزان تغییرات سکانس نوکلئوتیدها که سکانس‌های اجزای کوچک و بزرگ rDNA را خیلی تغییر می‌دهند.

2- کد شدن پروتئین حفاظت شده از نظر عملکرد در چندین جنس انتریک سبب شده که این پیشنهاد داده شود که ژن‌ها در گونه‌های نسبتاً دور بطور کامل دست نخورده باقی می‌مانند.

3- مکان فیزیکی ژن روی کروموزم باکتری نشان دهنده تفاوت کروموزمی بین طبقه‌های باکتری دور از هم می‌باشد.

روش‌های ژنتیک مولکولی خودشان را به عنوان ابزارهای قدرتمند جهت شناسائی و دنبال کردن سویه‌های باکتری‌ها مطرح می‌کنند، ولی دارای چندین عیب می‌باشند. نقص‌های مربوط به کاربرد پروب‌های مولکولی و لوکوس مختلف کروموزمی ممکن است در روش‌های مولکولی مشکل ساز شوند. مثلاً ژنی که اغلب برای تمایز یک گونه بکار می‌رود ممکن است فاقد تنوع سکانس ضروری برای تمایز با گونه‌های غیروابسته مربوطه باشد.

تمایز تجربی کارآمدی روش‌های تایپینگ برای گروه خاصی از باکتری بعضی مواقع گران و زمان‌بر می‌باشد. برای مثال سکانس اجزای کوچک rDNA در تمایز گونه‌های سودوموناس خیلی مفید است ولی فاقد اثر مناسب در تمایز گونه‌های انتروباکتریاسه خیلی وابسته مانند گونه‌های توکسیژنیک اشرشیا و سویه‌های گونه اروینیا نکروژنیک می‌باشد.

امروزه با کمک سکانس کردن در بیشتر روش‌ها از مواد نشان‌دار رادیواکتیو استفاده نمی‌شود چون این روش‌ها کارآمد و از نظر اقتصادی مناسب هستند و شناسائی و تمایز ایمن سویه‌های باکتری‌ها را در دامپزشکی، پزشکی یا آزمایشگاه میکروبشناسی کشاورزی فراهم کرده‌اند.

فهمیدن توزیع و ارتباط پاتوژن ضروری است، چرا که تعیین اپیدمیولوژی میکروب و عفونت به طراحی روش‌هائی جهت کنترل پاتوژن کمک فراوان می‌کند. نقش تایپینگ پاتوژن این است که مشخص کند ایزوله‌هائی که از نظر اپیدمیولوژیکی وابسته هستند از نظر ژنتیکی به هم مربوطند یا خیر. در گذشته از ویژگی‌های فنوتیپی مانند بیوتیپ، سروتیپ، باکتریوفاژ یا باکتریوسین تیپ و پروفایل حساسیت به آنتی بیوتیک جهت تایپینگ میکروب‌ها استفاده می‌شد، ولی با پیشرفت روش‌های مولکولی در دو دهه اخیر امروزه آنها در تایپینگ مولکولی بسیار کارآمد شده‌اند. تکنیک‌های مولکولی که برای تایپینگ میکروب‌ها بکار می‌روند عبارتند از PFGE، روش‌های متکی بر برش آنزیمی، آنالیز پلاسمیدها و روش‌های تیپ بندی براساس PCR. بکارگیری روش‌های مولکولی برای تیپ بندی پاتوژن‌ها در ارتباط دهی دقیق بین سویه‌ها و گونه‌ها بسیار اساسی می‌باشد. اثبات

ارتباطات کلون‌های یک پاتوژن به ما این امکان را می‌دهد که منبع آلودگی (انسان یا محیط) را پیدا کرده، سویه‌های عفونی از غیر عفونی را متمایز نموده و در نهایت عود را از عفونت مجدد تفکیک نمائیم.

تعدادی از عفونت‌ها ناشی از میکروب‌های کومنسال می‌باشند، بنابراین این مهم است که تعیین کنیم که آیا این ایزوله جدا شده از فرد بیمار سویه پاتوژن می‌باشد یا اینکه سویه کومنسال سبب عفونت شده است. همچنین با تیپ بندی می‌توان گفت که یک فرد اگر دچار عفونت مجدد شده است در اثر عود بیماری است یا اینکه توسط سویه‌ای غیر از سویه ایجادکننده عفونت اولیه آلوده شده است. همچنین اگر عفونت ناشی از عود باشد این روش‌ها نشان می‌دهند که رژیم درمانی اولیه مؤثر نبوده و درمان جایگزین باید انجام بگیرد.

امروزه با استفاده از تیپ بندی مولکولی در بیمارستان‌ها از شیوع بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی ممانعت می‌شود و از این نظر به اقتصاد و سلامت جوامع مختلف کمک شایانی می‌گردد.

**ویژگی‌های روش‌های تایپینگ:**

تعدادی ویژگی مهم مانند روش‌های بکار رفته استاندارد، اختصاصیت، حساسیت، عینی و عملی بودن برای شمای تیپ بندی موفق در نظر گرفته می‌شود. همه سیستم‌های تایپینگ باید خصوصیات قابلیت تیپ بندی، تکرار پذیری، قدرت تمایز و آسانی در اجرا و گزارش دهی و ارزان قیمت بودن را داشته باشند. قابلیت تیپ بندی به توانائی تکنیک در طراحی نتیجه مشخص (تیپ) هر ایزوله برمی‌گردد. با روش‌های فنوتیپی بسیاری از ایزوله‌ها غیر قابل تیپ بندی هستند، ولی همین ایزوله غیرقابل تیپ بندی در روش‌های مولکولی تا حدودی تیپ بندی می‌شوند. تکرار پذیر بودن روش‌ها به تکرار آزمایش توسط افراد مختلف و گرفتن نتایج یکسان برمی‌گردد. تکرار پذیری ضعیف به تغییرات تکنیک در روش یا تغییرات بیولوژیک در طی پاساژهای in vivo یا in vitro ارگانیزم مورد بررسی مربوط می‌شود. قدرت تمایز تکنیک به توانائی تکنیک در متمایز کردن ایزوله‌های غیر وابسته از نظر اپیدمیولوژی (به طور ایده‌آل هر تیپ متفاوت) برمی‌گردد. عموماً روش‌های فنوتیپی قدرت تمایز کمتری نسبت به روش‌های ژنوتایپی دارند. بیشتر روش‌های مولکولی نیازمند مواد و

ابزارهای گران قیمت می‌باشند ولی براحتی یاد گرفته می‌شوند و به آسانی برای انواع گونه‌ها قابل اجرا هستند؛ به عبارت دیگر روش‌های فنوتیپی از نظر کارکنان و مواد ارزان‌تر هستند، ولی قدرت تمایز کمی دارند. برای مثال آنتی سرم‌های ضد سالمونلا که در سروتایپینگ آن بکار می‌رود برای ارگانیسم‌های گرم مثبت قابل استفاده نیست.

**روش‌های فنوتایپینگ:**

اولین روشی که برای شناسائی و تیپ بندی ارگانیسم‌ها بکار رفت براساس خصوصیات فنوتیپی بود. یکی از تکنیک‌هائی که خیلی زیاد بکار می‌رفت بیوتیپینگ یا تمایز سویه‌ها براساس خواصی مانند تفاوت در واکنش‌های بیوشیمیائی و مرفولوژی تحمل به محیط‌های متفاوت بود که امروزه هم تا حدودی استفاده می‌شود. اغلب بیوتایپینگ برای کمک به تعیین گونه‌های میکروارگانیسم‌ها براساس توانائی آنها در مصرف مواد در محیط‌های رشد متفاوت و انجام واکنش‌های شیمیائی خاص می‌باشد، همچنین ممکن است اغلب آنها برای جداسازی گروه‌های گونه‌های خاص ناشی از تفاوت‌های بیوشیمیائی در میان ارگانیسم‌ها استفاده شوند. امروزه بیوتایپینگ در آزمایشگاه‌ها با بکارگیری سیستم‌های اتوماتیک که برای تمایز و شناسائی گونه‌ها طراحی شده است، اجرا می‌گردد. این روش اغلب فاقد قدرت تمایز است، چرا که تغییرات در میان ژن‌ها و جهش‌ها خواص بیولوژیکی میکروارگانیسم‌ها را تغییر می‌دهد.

تست‌های حساسیت آنتی بیوتیکی که یک تجربه عمومی در آزمایشگاه میکروبشناسی بالینی است، نوعی تایپینگ فنوتیپی می‌باشند. نتایج آنتی بیوگرام نشان می‌دهد که الگوی مقاومت یا حساسیت ارگانیسم به عوامل ضد میکروبی در آزمایشگاه چگونه است. امروزه تست‌های حساسیت ضد میکروبی به طورتیپیک با روش‌های میکرودولوشن براث اتومات یا دیسک دیفوژن اجرا می‌شود. قابل توجه است که روش دیسک دیفوژن فاقد روش اتوماسیون در اجرا می‌باشد. در بیشتر مطالعات اپیدمیولوژیکی آنتی بیوگرام ارزش محدودی دارد، چرا که ایزوله‌هائی که از نظر ژنتیکی و اپیدمیولوژیکی به هم مربوط نیستند، ممکن است دارای یک نوع الگوی

حساسیت باشند، در حقیقت در تعدادی حالت‌ها تفاوت روش ژنوتایپینگ برای مطالعه توزیع این فنوتیپ‌های مقاوم به مواد ضد میکروبی در محیط‌های بیمارستانی استفاده می‌شود.

تست‌های سروتایپینگ از یک سری آنتی‌بادی برای جداسازی آنتی‌ژن‌های سطحی باکتری که تغییرات آنتی‌ژنیکی را از خود نشان می‌دهند، استفاده می‌کنند. روش‌های سروتایپینگ برای دهه‌ها برای گروه بندی و طبقه بندی تعدادی از گونه‌های باکتری‌های پاتوژن بکار می‌رفت و برای تیپ بندی سالمونلاها، لژیونلاها، شیگلاها و استرپتوکک پنومونیه هنوز مورد استفاده قرار می‌گیرد. غالباً سروتایپینگ در تمایز سویه‌های داخل گونه‌های پاتوژن‌های بیمارستانی مانند کلبسیلا و سودوموناس دارای ارزش اپیدمیولوژیکی می‌باشد. راه‌های مختلفی برای جداسازی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی بکار می‌رود، ولی مهم‌ترین راه آگلوتیناسیون آنتی‌ژن– آنتی‌بادی می‌باشد که در آن سوسپانسیون سلول باکتری با مجموعه‌ای از آنتی‌بادی مخلوط می‌شود. براساس الگو آگلوتیناسیون سروتیپ مشخص می‌شود. برای ارگانیسم خاص مانند استرپتوکک پنومونیه از تست گوالانک استفاده می‌شود. اشکال این تیپ بندی فقدان آنتی‌سرم‌های خاص و مشکلات در استاندارد سازی روش‌های متفاوت می‌باشد.

در باکتریوفاژ تایپینگ الگوی باکتری‌ها براساس حساسیت یا مقاومت به فاژهای مختلف مشخص می‌شود.

باکتریوفاژ تایپینگ در اجرا و دسترسی به فاژهای فعال از نظر بیولوژیکی با مشکل مواجه است، ولی برای بعضی از باکتری‌ها مانند استافیلوکک اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و گونه‌های سالمونلا هنوز مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش هم وقت‌گیر بوده و هم قدرت تکرار پذیری پائین دارد، همچنین به سختی استاندارد می‌شود.

باکتریوسین تایپینگ براساس تولید پروتئین خاص از باکتری‌ها است که مانع رشد گونه‌های هتروژنیک به باکتری تولید کننده می‌شود و مانند باکتریوفاژ تایپینگ در اجرا و دسترسی به باکتریوسین با مشکل مواجه است، ولی هنوز برای تیپ بندی سودوموناس آئروژینوزا بکار می‌رود، بعلاوه فرض‌های مشابهی برای گونه‌های کاندیدا (کاندیدا آلبیکس) مطرح می‌باشد.