

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

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

<sup>1</sup> Lenturer, Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

<sup>2</sup> PhD Student in Medical Mycology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>4</sup> PhD Student in Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Shiraz Branch, Shiraz, Iran

<sup>5</sup> MSc in Microbiology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, North of Tehran Branch, Tehran, Iran

<sup>6</sup> MSc in Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

<sup>7</sup> MSc student in Medical Parasitology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>8</sup> Medical Student, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>9</sup> 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 current 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).

## ضروری بر کاربرد روش‌های تایپینگ مولکولی در گونه‌های آسپرژیلوس

صادق خداویسی<sup>۱,۲</sup>

سasan رضایی<sup>۳</sup>

ماندان احمدی<sup>۴</sup>

زهرا حسن پور<sup>۵</sup>

ریحانه روشن<sup>۶</sup>

مهسا فلاحتی نژاد<sup>۷</sup>

مهرناز محمد داوودی<sup>۸</sup>

حمید بدله<sup>۹</sup>

### 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 می‌کند. 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 جنبه‌های تکرار پذیری، جابه جایی، و تبادل اطلاعات تایپینگ بسیار مفید می‌باشند. علاوه بر امکان پذیری 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 تووالی چندلوكوس (MLST) و تایپینگ مبتنی بر میکروستلايت‌ها می‌باشند. در این مطالعه انواع روش‌های مولکولی برای آنالیز ژنو تایپینگ گونه‌های آسپرژیلوس به منظور درک اپیدمیولوژی این قارچ‌های پاتوژن فرصت طلب موردنظر بحث قرار می‌گیرد.

**واژه‌های کلیدی:** گونه‌های آسپرژیلوس، روش‌های تایپینگ، اپیدمیولوژی

### مقدمه

قارچ به طور گسترده‌ای توانایی تولید اسپور دارد و اسپورها به آسانی توسط هوا در محیط پراکنده می‌شوند<sup>(۱)</sup>. در حال فساد و بقایای آلی موجودات زنده وجود دارند. این گونه‌های آسپرژیلوس غالباً در خاک، آب، گیاهان در حالت خشک و بی‌آب وجود دارند.

E-mail: badalii@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** حمید بدله - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پامبر اعظم، دانشکده پزشکی

۱. مری، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۲. دانشجویی 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. دانشجویی 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. دانشجویی دکتری حرفة‌ای، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۹. استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ‌های تهاجمی، دانشکده پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۷/۱۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۵/۳۱

پیشرفت بیماری در این بیماران منجر می‌شود<sup>(۷)</sup>. بقای بیماران مبتلا به این بیماری به طور کلی کم و در حدود ۳۰ تا ۵۰ درصد است که اکثر آبه علت عدم اثبات تشخیص بیماری در مراحل اولیه آلودگی و عدم شروع زود هنگام درمان های ضد قارچی می‌باشد. هرچند که در گذشته موارد بیماری‌های قارچی کشنده معمولاً به طور تک گیر وجود داشت، ولی امروزه با توجه به افزایش جمعیت بیماران مستعد ابتلا، با افزایش موارد عفونت مواجه می‌باشیم<sup>(۱۱,۱۰)</sup>. لذا بررسی توزیع و ارتباط بین عوامل پاتogen و محیطی در بررسی‌های اپیدمیولوژی و همچنین تعیین منابع بیمارستانی جهت کنترل و پیشگیری هدفمند عوامل قارچی مفید می‌باشد<sup>(۱۳)</sup>. استفاده از روش‌های مولکولی و تایپینگ مولکولی گونه‌ها یا توانایی تشخیص بین ایزوله‌های غیر وابسته به کلنی یک ابزار کارآمد در آزمایشگاه‌های میکروب شناسی و شناسایی اپیدمی‌های بیمارستانی می‌باشد<sup>(۱۴)</sup>. لذا از مهم‌ترین دلایل استفاده تایپینگ گونه در قارچ‌شناسی، مانیتورینگ بیماران و پیگیری درمان، آنالیز بروز و شیوع مانیتورینگ محیطی و مطالعه اپیدمیولوژی‌های جهانی و منطقه‌ای بیماری‌های قارچی می‌باشد. امروزه استفاده از روش‌های جدید بر پایه DNA به جای ویژگی‌های فنوتیپی به طور چشمگیری مورد استقبال قرار گرفته است<sup>(۱۳,۱۲)</sup>. روش‌های تایپینگ مولکولی متعددی از جمله روش‌های متنوع انگشت نگاری DNA مانند الکتروفورز آنزیم مولتی لوکوس<sup>۱</sup>، RFLP<sup>۲</sup>، هیریداسیون DNA هضم شده با اندونوکلئاز با پرورب‌های RAPD<sup>۳</sup>،<sup>۴</sup> استفاده از روش میکروستلاتیت‌ها<sup>۵</sup> و هم‌چنین استفاده از روش تایپینگ در ژن کدکننده پروتئین‌های سطحی سلول<sup>۶</sup> برای بررسی تنوع و توزیع سویه گونه‌های قارچی توسعه پیدا کرده است<sup>(۱۴-۱۸)</sup>. بر این اساس با توجه به اهمیت بالینی عفونت‌های ناشی از

نتیجه حضور گستردۀ این قارچ، احتمالاً انسان به طور دائم در معرض اسپورهای آسپرژیلوس قرار دارد. آسپرژیلوس‌ها در افراد با سیستم ایمنی ضعیف شده می‌تواند سبب ایجاد بیماری کشنده‌ای آسپرژیلوزیس مهاجم (Invasive Aspergillosis-IA) شود<sup>(۲)</sup>. به دلیل افزایش تعداد بیماران با پیوند معز استخوان و یا پیوند اندام‌های دیگر و هم‌چنین به دلیل درمان با کورتیکواستروییدها، IA یک مشکل در حال گسترش در بیمارستان‌ها می‌باشد<sup>(۳,۴)</sup>. کلوزنیزه شدن آسپرژیلوس در قسمت پایینی مجاری تنفسی برای بیمار به خصوص در بیماران مبتلا به بیماری ریوی مزمن (مثل فیروز کیستیک، بیماری انسدادی مزمن ریه و سل غیر فعال) خطرناک می‌باشد، زیرا سبب عفونت‌های ریوی پیشرونده یا منتشره می‌شود. چندین گونه آسپرژیلوس به عنوان عوامل مولد بیماری در انسان شناخته شده‌اند. اکثر عفونت‌های آسپرژیلوزیس مهاجم (حدود ۸۰ درصد) توسط گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس ایجاد می‌شود و دومین گونه شایع بیماری‌زا آسپرژیلوس فلاووس و به میزان کمتر، آسپرژیلوس نیجر و آسپرژیلوس ترئوس است<sup>(۵)</sup>. فعالیت‌های ساختمانی و عملیات ساخت و تخریب سبب افزایش شدید اسپورهای قارچی هوا می‌شود که به نوبه خود از دلایل اصلی احتمال عفونت‌های ناشی از آسپرژیلوس در بیماران مستعد می‌باشد<sup>(۶)</sup>. هم‌چنین شرایط جغرافیایی از جمله آب و هوا از عوامل مهم تعیین کننده شیوع عفونت‌های ناشی از آسپرژیلوس می‌باشد. در کشورهایی با شرایط آب و هوایی خشک و نیمه خشک مانند عربستان سعودی، سودان و تونس گونه آسپرژیلوس فلاووس عامل اتیولوژیکی اصلی آسپرژیلوزیس مهاجم می‌باشد<sup>(۷-۱۱)</sup>. شیوع عفونت‌های ناشی از قارچ آسپرژیلوس در بیماران دچار نقص ایمنی رو به افزایش است. بیماران در بخش‌های اونکولوژی و ICU از طریق منابع مختلفی به خصوص از طریق دستگاه تنفسی در تماس با گونه‌های آسپرژیلوس هستند که در صورت عدم پیشگیری، تشخیص و درمان به موقع به

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

(R-108, R-151, AP12 h) برای تایپینگ ۱۱ ایزووله آسپرژیلوس فلاووس استفاده شد که قدرت تمایز مطلوبی توسط این روش گزارش گردید و در یک مورد شبهت ژنتیکی بین سویه‌های جدا شده از بیماران و سویه‌های جدا شده از دریچه‌های دستگاه‌های خنک کننده هوا در اتاق عمل، منشاء آلودگی بیمارستانی را تایید نمود<sup>(۱۹)</sup>. همچنین در مطالعه Myoken و همکاران از تکنیک RAPD با سه آغازگر PCR مختلف برای تایپینگ ۶ ایزووله آسپرژیلوس فلاووس به دست آمده از بیماران مبتلا به لوسومی با عالیم استوماتیت استفاده شد. تجزیه و تحلیل مولکولی نشان داد که سه نمونه آسپرژیلوس فلاووس به دست آمده از سه بیمار یکسان می‌باشد<sup>(۲۰)</sup>. اساس شناسایی تکنیک RFLP شامل بریدن نمونه DNA توسط آنزیم محدود کننده است که می‌تواند 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 به طور 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<sup>(۲۱)</sup>. تکنیک RFLP برای تمایز و بررسی روابط فیلوزنیکی بین دو گونه مرتبط آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس اوریزه آ استفاده شده است<sup>(۲۲)</sup>. RFLP و همکاران از تکنیک Buffington برش‌دهنده *Sma I* برای تمایز گونه‌های آسپرژیلوس RAPD فلاووس استفاده کردند که محصولات حاصل از آزمایش RFLP سویه‌های 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 سویه‌ها به دست آمد. بر اساس نتایج

قارچ آسپرژیلوس، مطالعات ژنتیکی مختلفی به منظور شناسایی و امکان یافتن ارتباط‌های ژنتیکی و اپیدمیولوژیکی میان جدایه‌های محیطی و بالینی هر یک از جدایه‌های آسپرژیلوس صورت گرفته است<sup>(۱۶)</sup>. به منظور تعیین اپیدمیولوژی عفونت‌های بیمارستانی و کمک به طراحی روش‌های منطقی کنترل پاتوژن، در ک از میزان گسترش پاتوژن و ارتباط آن ضروری می‌باشد. تکنیک‌های تایپینگ همچنین قادرند در ک عمیق تری 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 متواالی هم مورد ارزیابی قرار داد<sup>(۱۴)</sup>. در این مطالعه روش‌های مولکولی برای آنالیز ژنو تایپینگ گونه‌های آسپرژیلوس به منظور در ک اپیدمیولوژی این قارچ‌های پاتوژن فرصت طلب مورد بحث قرار می‌گیرد و برخی مزايا و معایب روش‌های مختلف تایپینگ ذکر می‌شود.

معرفی جنبه‌های بالینی روش‌های تایپینگ مولکولی تکنیک‌های تایپینگ مولکولی به طور چشمگیری جهت ژنو تایپینگ گونه‌های آسپرژیلوس به کار 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

دریافت کننده پیوند ریه، بیماران آسپرژیلوما و بیماران با آسپرژیلوزیس مهاجم نشان داده شده است(۲۶-۲۹). به طور کلی، تفاوت ژنتیپ‌ها در جدایه‌های بیماران با آسپرژیلوزیس مهاجم یا آسپرژیلوما کمتر از بیماران مبتلا به فیروز 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 فیروز کیستیک کمتر می‌باشد. در دو مطالعه، ژنتیپ‌های جدایه‌های آسپرژیلوموس فومیگاتوس که از نمونه‌های بافتی عمقی جمع آوری شده بودند با ژنتیپ‌های نمونه‌های تنفسی مقایسه شدند. نتایج کلی نشان داد که نمونه‌های بیمار با منشا غیرتنفسی دارای ژنتیپ یکسانی می‌باشند. در مقایسه، چندین ژنتیپ در جدایه‌های منشا گرفته از نمونه‌های تنفسی شناسایی شد(۳۰، ۳۱). تکنیک AFLP 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 آدپتورها و سایت محدود شده مجاور به عنوان محل‌های اتصال پرایمر برای تکثیر قطعات محدود شده به کار برده می‌شود. به عبارتی قطعات DNA رشته‌ای ستز 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<sup>۳</sup> توسط یک یا تعداد بیشتری نوکلوتید، تعداد قطعات تولید شده را تنظیم نمود. اضافه کردن هر نوکلوتید، تعداد قطعات تکثیر شده را با ضریب<sup>۴</sup> کاهش می‌دهد. پرایمر PCR که دارای تعداد محل برش متوسط می‌باشد توسط رادیواکتیو نشان دار می‌شده، اما امروزه پرایمرها توسط عناصر فلورسانس نشان دار می‌شوند تا قطعات با کیفیت بالا در

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 ژنتیپی موجود در گونه‌های آسپرژیلوموس فلاووس عامل عفونت‌های چشمی نیز استفاده شده است(۲۴). Verweji و همکاران جدایه‌های آسپرژیلوموس فومیگاتوس جدا شده از کشت نمونه‌های خلط دو بیمار مبتلا به فیروز 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 ژنتیپ مختلف در ۱۱ نمونه در یک بیمار بود که از میان آن‌ها یک ژنتیپ غالب بود. در بیمار دیگر حدود ۹ ژنتیپ مختلف در ۱۲ نمونه مشاهده شد(۲۵). در مطالعه‌ای دیگر، ۶ بیمار مبتلا به فیروز کیستیک در طی دو سال مورد بررسی قرار گرفتند و ۴۱۲ آسپرژیلوموس فومیگاتوس از نمونه‌های پی در پی خلط این بیماران جدا شده که ۵۴ ژنتیپ خاص با استفاده از روش Afut1-RFLP حاصل گردید. در تمام نمونه‌های ۶ بیمار چندین ژنتیپ آسپرژیلوموس فومیگاتوس یافت شد و بیشتر جدایه‌ها به دو بیمار تعلق داشت. از یک بیمار مورد مطالعه، ۱۰ ژنتیپ مختلف در سال اول شناسایی شد. در حالی که در سال دوم از ۴۰ نمونه متوالی یک ژنتیپ یافت شد. این بیمار فقد علایم بالینی آسپرژیلوزیس بود. با این حال در بیمار دیگر با ژنتیپ غالب در ۹ نمونه خلط، عفونت ریوی نشان داده شد(۲۶). بیماران مبتلا به فیروز کیستیک دارای الگوی متفاوتی از کلونیزه شدن جدایه‌های آسپرژیلوموس فومیگاتوس می‌باشند(۲۶)، زیرا آنالیز جدایه‌های پی در پی نشان داد که برخی از بیماران مبتلا به فیروز کیستیک ژنتیپ غالب را نشان می‌دهند و دیگران چندین ژنتیپ دارند. جداسازی متوالی یک ژنتیپ خاص در این بیماران لزوماً نشاندهنده بروز آسپرژیلوزیس نمی‌باشد. حضور ژنتیپ‌های مختلف در جدایه‌های متوالی نیز در بیماران دیگر مثل بیماران

1. Amplified Fragment Length Polymorphism

میکروستلایت‌ها<sup>۲</sup> یا تکرارهای کوتاه پشت سرهم<sup>۳</sup> (STRs) به فراوانی در ژنوم اکثر موجودات آلی حضور دارند و به ندرت در ژنوم پروکاریوت‌ها یافت می‌شوند.<sup>(۳۹)</sup> ایزوله‌های مختلف می‌توانند بر اساس تفاوت در تعداد تکرار از یکدیگر تمایز شوند. مارکرهای میکروستلایت‌ها با استفاده از پرایمرهایی که بر اساس توالی‌های انتهایی دو طرف آن هستند به آسانی تکثیر می‌شوند. در صورتی که یکی از پرایمرها توسط فلورسانس نشان دار شده باشد، می‌توان سایز آن‌ها را به صورت دقیق و با استفاده از الکتروفورز با قدرت تفکیک بالا تعیین نمود. تعداد تکرارها در هر مارکر را می‌توان با توجه به اندازه قطعات ارزیابی نمود. تعداد تکرارها در مارکرهای مورد بررسی، برای هر کدام از جدایه‌ها ژنتیکی را ایجاد می‌کند که این ژنتیپ‌ها به آسانی با یکدیگر مقایسه می‌شوند.<sup>(۴۰)</sup> مطالعات نشان داده‌اند که تایپینگ<sup>۴</sup> بر اساس میکروستلایت‌ها نتایج واضحی ایجاد می‌نماید.<sup>(۴۱)</sup> از روش وابسته به میکروستلایت‌ها گاهی با عنوان<sup>۵</sup> MLP، MSP<sup>۶</sup> و یا PMM<sup>۷</sup> نیز یاد می‌شود.<sup>(۴۲،۴۳)</sup> در مطالعه Tran-Dinh و Carter هفت میکروستلایت پلی‌مورفیک برای سویه‌های آسپرژیلوس فلاؤوس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس مورد آزمایش قرار گرفت و جستجو برای موتیف‌های میکروستلایت بر روی توالی ژنومی آسپرژیلوس فلاؤوس کمپلکس انجام گرفت. این ۷ مارکر بر روی ۲۰ جدایه آسپرژیلوس فلاؤوس و ۱۵ جدایه آسپرژیلوس پارازیتیکوس آزمایش شدند و ۱۱ الی ۲۱ برای آسپرژیلوس فلاؤوس و ۱۱ الی ۲۰ برای آسپرژیلوس پارازیتیکوس حاصل گردید.<sup>(۴۴)</sup> 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

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

در مطالعه Warris و همکاران مجموعه‌ای از ۹۶ جدایه‌ی بالینی و محیطی آسپرژیلوس فومیگاتوس با استفاده از آنزیم‌های *MseI* و *EcoRI* 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.<sup>(۳۶)</sup> تکنیک PCR-SSCP<sup>۸</sup> اولین بار توسط Mondon و Kumeda Asao روش SSCP همکاران توصیف شد.<sup>(۳۷)</sup> ITS4 و ITS1 بهینه‌سازی را با پرایمرهای یونیورسال ITS4 و ITS1 PCR-SSCP روشی قابل کردن.<sup>(۳۸)</sup> تجزیه و تحلیل PCR-SSCP روشی است که در 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 ریزوزومی ژن RNA متصل می‌شوند. ژنوم قارچ‌ها دارای حدود ۱۰۰ تکرار محافظت شده‌اند و نواحی فاصله انداز میان آن‌ها قرار دارد. از آن جایی که این نواحی فاصله انداز بین ژنی ممکن است در طول خود تفاوت داشته باشند، جدایه‌های غیر مرتبط الگوی نواربنده مختلفی را نشان می‌دهند.

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

1. PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism

در تکنیک<sup>۲</sup> MLST عموماً به منظور شناسایی جدایه‌های گونه‌های مختلف، توالی‌های نوکلوتیدی نواحی درونی ۴۰۰ تا ۵۰۰ جفت بازی از یک سری از ژن‌ها (معمولًا ۶ تا ۱۰ عدد) که در تمامی جدایه‌های یک گونه خاص حضور دارند مقایسه می‌شود. برای تمامی توالی‌های خاص، یک شماره اختیاری خاص ال (معمولًا به ترتیب کشف) تعیین می‌شود. هر جدایه با استفاده از ال‌ها در هر کدام از لوسی‌های housekeeping تعیین توالی شده شناسایی می‌شود و باهم تشکیل پروفایل الی و یا نوع توالی<sup>۳</sup> (ST) می‌دهد.<sup>(۴۹)</sup> ارتباط میان جدایه‌ها با مقایسه پروفایل‌های الی آشکار می‌شود. جدایه‌های خویشاوند دارای STs های مشابه و یا های با تفاوت ناچیز هستند. در حالی که جدایه‌های غیر خویشاوند دارای STs های غیر مرتبط می‌باشند. تکنیک MLST با هدف قرار دادن تنوع موجود در چندین لوسی housekeeping یک روش مولکولی جایگزین<sup>۴</sup> MLEE می‌باشد. مزیت MLST نسبت به MLEE این است که DNA نسبت به پروتئین کد شده متغیرتر است (به دلیل موتاسیون‌ها) و لوسی‌های کم تری در MLST بررسی می‌شوند.<sup>(۵۰)</sup> تکنیک MLST به طور گسترده‌ای به عنوان یک ابزار رایج تایپینگ استفاده می‌شود که امکان مقایسه بین‌المللی جدایه‌ها را فراهم می‌کند. داده‌های MLST در آنالیزهای تکاملی و جمعیت استفاده می‌گردد و در آن نرخ نوترکیبی و موتاسیون تخمین زده می‌شود. در آسپرژیلوس سکشن فومیگاتی، روش MLST منجر به توصیف گونه‌ی پاتوژن جدیدی شد که آسپرژیلوس لنتیلوس از جمله‌ی آن است.<sup>(۵۱)</sup> تکنیک MLVA<sup>۵</sup> اخیراً به عنوان یک روش قدرتمند برای تعیین ساب تایپ پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی و بررسی روابط فیلوزنیکی در آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. اساس این روش بر روی تعیین توالی تکراری پشت سر هم DNA می‌باشد. در

تشخیص دادند. با استفاده از مارکرهای این گروه می‌توان ۳۰۰۰۰ ژنوتیپ مختلف را شناسایی نمود.<sup>(۴۵)</sup> Batista و همکاران از پرایمرهای (GTG) و (GACA) برای محصولات متفاوت تولید و تکثیر شده به منظور (GACA) بررسی اندازه و شدت باند استفاده کردند که (GACA) تنوع ژنتیکی بالاتری را نشان داد. نخست در این مطالعه چهار گونه که به عنوان آسپرژیلوس فلاووس طبقه‌بندی شدند الگوی متفاوتی را نشان دادند که باعث بررسی مجدد شناسایی طبقه‌بندی آن‌ها شد.<sup>(۴۶)</sup> در مطالعه Hadrich و همکاران از نشانگر میکروستلایت مناسبی برای تایپینگ<sup>۶</sup> ایزوله آسپرژیلوس فلاووس استفاده شد. این مطالعه شامل ترکیبی از ۱۲ مارکر موجود که دارای قدرت افترacci<sup>۷</sup> ۹۷٪ بود و ترکیب ۵ مارکر (AFM3, AFLA7, AFLA3, AFLA1) که دارای قدرت افترacci<sup>۸</sup> ۹۵٪ بود را شامل شد. ایزوله‌های جدا شده از تونس و مارسی هاپلوتیپ‌های مجزایی را که حاکی از ساختار جغرافیایی بسیار قابل توجهی در آسپرژیلوس فلاووس بود نشان دادند.<sup>(۴۷)</sup> تکنیک RAMA<sup>۹</sup> بر اساس PCR می‌باشد و از پرایمرهایی که شامل توالی‌های میکروستلایت‌ها و انکورهای منحظر شده در انتهای<sup>۱۰</sup> می‌باشند استفاده می‌کند. DNA میان انتهای دو میکروستلایت نزدیک هم تکثیر می‌شود. محصولات PCR حاصل شده توسط الکتروفورز از هم جدا می‌شوند. مارکر پلی‌مورفیسم RAMS بر اساس اختلاف طول در محصولات تکثیر شده میان جدایه‌های مختلف می‌باشد. از آن جایی که نشان داده نشده است که قطعات تکثیر شده توسط میکروستلایت‌ها احاطه شده‌اند، این تکنیک اساساً مقداری با RAPD تفاوت دارد. از این روش برای انگشت نگاری ۲۴ جدایه آسپرژیلوس فومیگاتوس و ۱۳ جدایه آسپرژیلوس فلاووس که به ترتیب از ۱۴ و ۱۰ بیمار جدا شده بودند استفاده شده است.<sup>(۴۸)</sup>

2. Multilocus Sequence Typing

3. Sequence type

4. Multilocus Enzyme Electrophoresis

1. Multiple-Locus Variable-number of tandem-repeats Analysis

1. Random Amplified Microsatellites

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

نکات های تایپینگ	مزایا و معایب	قدرت اخراجی
MLST,SSDP,RAPD,RFLP	محدود	
CSP	متوسط	
MLVA,Microsatellites,AFLP	زیاد	
RAPD,RFLP	محدود	تکرار پذیری
RAMS,Microsatellites,AFLP	خوب	
SSDP,SSDP,CSP,MLVA	عالی	
RFLP,RAPD,RAMS,Microsatellites,AFLP	محدود	توانایی مبالغه پذیری
SSDP,MLVA	خوب	
CSP,MLST	عالی	
RAMS,RAPD,SSDP,CSP	آسان	سهولت استفاده
MLVA,RFLP,MLST,Microsatellites,AFLP	سخت	
MLVA,CSP,SSDP,MLST,Microsatellites	بله	اختصاصی گونه
RFLP,RAPD,RAMS,AFLP	خرير	
MLVA,CSP,MLST,Microsatellites	آسان	
RAMS,SSDP,RFLP,AFLP	سخت	تفصیل

می باشد و روش های وابسته به PCR به مقدار کمی از DNA قابل تکثیر نیاز دارند که به آسانی به دست می آید(۴۵). هرچند که RFLP یک روش غیر وابسته به PCR می باشد ولی به مقادیر زیادی از DNA با خلوص بالا نیاز دارد که سبب می شود این روش زمان بر و دشوار شود. چندین روش وابسته به PCR مثل MLST، AFLP، CSP، میکروستلایت ها و RAMS به ابزار خاصی برای جداسازی قطعات حاصله تحت شرایط الکتروفورز با تفکیک بالا نیاز دارند. از طرف دیگر، روش RAPD را می توان با ابزارهای ارزان قیمت انجام داد و بنابراین به طور گسترده ای برای تایپینگ جدایه های آسپرژیلوس از آن استفاده می شود(۵۵). کلیه تکنیک ها قادر نیستند ژنوتیپ تمامی ارگانیسم های مورد بررسی را تعیین نمایند. در مورد RFLP هر دو نوع پروب های خاص گونه ای و غیر خاص گونه ای ارائه شده است که پروب های بر اساس توالي های تکرار شونده DNA کروموزومی مثل PAF28 و Afu1 و یا پروب های بر اساس الگوهای RAPD به طور قوی تنها به گونه ای متصل می شوند که پروب برای آنها طراحی شده است. با این حال، از روش ساترن بلاستینگ همراه با باکتروفائز M13 نشاندار به منظور تمايز جدایه های چندین گونه ای قارچی از جنس های مختلف

این روش با شمارش تعداد تکرار مارکرهای VNTR ارتباط بین سویه های مختلف بررسی می گردد. از VNTR ها در آنالیز نقشه های ژنتیکی و پزشکی قانونی نیز استفاده شده است. اشتباہات مکرر در DNA، مانند تضعیف رشته mispairing، تنوع در تعداد تکرارهای پشت سر هم در میان سویه های همان گونه را ایجاد می کند (۵۳،۵۲).

تکنیک CSP<sup>۱</sup> یک روش ساب تایپینگ بوده که با مقایسه سکانس های DNA سویه ها و بر اساس اختلاف در تعداد و محتوای نواحی تکراری 12bp در ژن کد کننده پروتئین سطحی سلول می باشد. تنوع ژنتیکی در توالی تکراری و نواحی کناری، بر اثر حذف، اضافه یا جهش های نقطه ای در ژن کد کننده CSP ناشی می شود. هرچند که روش CSP typing قدرت تفکیک کمتری نسبت به روش microsatellite دارد، اما کارایی بالاتری نسبت به روش MLST برای قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس را نشان داده است. این روش ها به دلیل کارایی آسان، سریع، تکرار پذیری و عدم نیاز به تجهیزات پیچیده آزمایشگاهی و مقرر به صرفه بودن و همچنین از همه مهم تر توسط یک پروتکل استاندارد به عنوان روش کار آمد به کار برده می شود که با استفاده از این روش نتایج در بین آزمایشگاه های سراسر دنیا قابل انتقال است(۵۴). در جدول شماره ۱ جنبه های مختلف به روش های مورد استفاده برای تایپینگ ایزوله های آسپرژیلوس اشاره شده است.

#### مقایسه روش های 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، تغییر پذیری و تکرار پذیری آنها در آزمایشگاه و میان آزمایشگاه های مختلف بررسی می شود. اکثر روش هایی که در این مقاله ذکر شده اند وابسته به PCR

1. cell surface protein

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> برای عموم در دسترس قرار دارد و می‌توان اطلاعات توالی برای ال‌های MLST را وارد نمود تا از ال ژنوتیپ‌ها و ST‌های جدایه‌ها مطمئن شد. اطلاعات حاصل شده از تایپینگ CSP اجازه می‌دهد تا مجموعه‌ای از اطلاعات واضح حاصل شود که بتوان آن‌ها را میان آزمایشگاه‌ها مبادله کرد.<sup>(۵۹)</sup>. 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 متD از ناحیه Afut 1 & STRAf از ناحیه (B-tubulin). با وجود تفاوت در روش CSP نتایج حاصل از آن در بین Hurst آزمایشگاه‌های مختلف با هم همخوانی داشتند. لذا همکاران این روش تایپینگ را مناسب برای آزمایشگاه‌های رفرانس معرفی کردند و قابلیت به اشتراک گذاری نتایج با این روش اثبات گردید.<sup>(۶۰)</sup>. اطلاعات انگشت‌نگاری دیجیتال در غالب الگوهای نواربندی پیچیده‌تر هستند و بنابراین به منظور مبادله اطلاعات دشوار می‌باشند. به علاوه، لازم است دستورالعمل استاندارد توسط تمامی آزمایشگاه‌ها پیروی شود تا از تفاوت در الگوی نواربندی جلوگیری گردد.<sup>(۶۱)</sup>. تمامی روش‌هایی را که در این جا 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

استفاده شده است.<sup>(۵۶)</sup>. 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 مثل گیاهان و حیوانات استفاده شده است و تکنیک RAPD برای بسیاری از باکتری‌ها، انگل‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها مورد استفاده قرار گرفته است.<sup>(۵۷)</sup>. از روش RAMS برای شناسایی تنوع ژنتیکی گیاهان و حیوانات و اخیراً قارچ‌ها استفاده شده است.<sup>(۴۸)</sup>. تکرارپذیری به توانایی تکنیک برای رسیدن به نتایج یکسان در زمان آزمایش تکرار شونده روی یک جدایه‌ی خاص اشاره دارد. در مقیاس‌های بزرگ‌تر و جهت مطالعات اپیدمولوژیک طولانی مدت، روش‌های انگشت‌نگاری ثابتی مورد نیاز است. مهم‌ترین عامل ایجاد ابهام در روش‌های تولید‌کننده باند مثل IGS، RAMS، RFLP، AFLP و SSDP که تکرارپذیری را تحت تاثیر قرار می‌دهد، شدت تفاوت باند‌ها می‌باشد که احتمالاً به دلیل تفاوت‌های اندک در مراحل مختلف کار است و ممکن است بر روی شدت نهایی یک اثر بگذارد. بر خلاف آن، روش‌هایی مثل CSP، میکروستلایت‌ها و MLST دارای میزان تکرارپذیری بسیار بالای می‌باشند.<sup>(۵۸)</sup>. 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 bp ۱۲ و کدکننده پروتئین پروتئین سطحی سلول برای ساب تایپ کردن ۵۵ اپیدمی منتسب به آسپرژیلوس فومیگاتوس از ۶ شیوع عفونت بیمارستانی با مشا آسپرژیلوس مهاجم استفاده کرده و این روش را مناسب برای مطالعات اپیدمیولوژی گزارش کرده‌اند.<sup>(۵۴)</sup>. 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 در کم از

تعیین ژنوتیپ برای روش‌های مطرح شده وجود ندارد(۴۷،۵۶). 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 حد کافی 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 روش‌های مختلف تایپینگ انجام شده است(۳۶،۵۶). در MLP و Afut1-RFLP و RAPD دو مطالعه تکنیک‌های RAPD دارای Afut1-RFLP با یکدیگر مقایسه شدند. در هر دو بررسی RAPD 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 می‌شود. اگرچه پروب M13 دارای این مزیت است، به نظر می‌رسد که پروب Afut1 که بر پایه توالی متوسط تکراری گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس می‌باشد، 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 اپیدمولوزیک میان ۹۶ جدایه بالینی و محیطی گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس استفاده شده است(۶۳).

تکنیک AFLP قادر است بیشتر جدایه‌ها را از هم تفکیک نماید و این امر نشاندهنده قدرت تفکیک بالای این روش می‌باشد. از روش تایپینگ وابسته به توالی ژن‌ها می‌توان به منظور شناسایی گونه‌های جدید در سکشن Fumigati استفاده کرد(۵۱). تمایز میان

پیچیده‌ای از نوارها می‌شود. روش‌های RAPD، AFLP و IGS، RAMS گونه‌های آسپرژیلوس از جمله روش‌هایی هستند که وابسته به الگوی نواریندی می‌باشند. روش‌های دقیق تایج 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 پرایمراهای SSCP ممکن است باندهای ضعیفی ایجاد کنند که سبب می‌شود توانایی دقیق این روش کمتر تخمین زده شود(۴۲). همان‌طور که اشاره شد، الگویی 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 انگشت‌نگاری‌های مختلف با یکدیگر و تعیین ارتباط ژنتیکی میان چندین جدایه لازم است از نرم‌افزارهای تخصصی کامپیوتری استفاده شود. آنالیزهای کامپیوتری معمولاً با استفاده از الگوریتم‌های وابسته به الگو 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 میکروستلاتیت‌ها در مقایسه با روش‌های مبتنی بر باند، توانایی شناسایی ایزوله‌های مخلوط است. ژنوتایپ‌های مختلف در روش‌های مبتنی بر میکروستلاتیت‌ها 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،۴۶). یک مشکل دیگر برای آنالیز اطلاعات تایپینگ عمومی، تفسیر ذهنی ژنوتایپ به صورت فردی می‌باشد. ثبت ژنوتایپ زمانی که از روش‌های مبتنی بر باند استفاده می‌شود، وابسته به کاربر می‌باشد. در حالی که تایج ژنوتایپ حاصل شده از روش‌های دقیق بدون ابهام می‌باشند. متأسفانه در حال حاضر راهنمای جامعی برای

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 می‌کند. 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 از نمونه‌های 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 اپیدمیولوژیکی میان مقادیر زیادی از جدایه‌ها در طی زمان طولانی وارد شرایط مناسب باشند. متاسفانه تایپینگ CSP و لوسي‌هایی 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 روپرتو هستیم. این روش‌ها از جنبه‌های تکرارپذیر، جابه‌جایی، و تبدال اطلاعات تایپینگ بسیار مفید می‌باشند. روش‌های دقیق تایپینگ تا به امروز تایپینگ توالی چندلوکوس (MLST) و تایپینگ مبتنی بر میکروستلاتیت‌ها می‌باشد و طرح MLST برای تایپینگ آسپرژیلوس فومیگاتوس توسعه یافته است.

جدایه‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس را می‌توان توسط MLST انجام داد.

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

Valk و همکاران de Bain و همکاران اعلام کردند که روش CSP در مقایسه با سایر روش‌های تایپینگ، مثلاً میکروستلاتیت، از قدرت تفکیک کمتری برخوردار است و به عنوان یک روش ابتدایی در تفکیک ایزوله‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس کاربرد دارد و از مزایای آن شناخت تنوع زیاد ایزوله‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس می‌باشد(۶۵,۶۶). MLVA در مقایسه با سایر روش‌های فوق یک روش با قدرت تفکیک و تکرار پذیری بالاست که تفسیر آن آسان و از لحاظ هزینه مقرن به صرفه می‌باشد. Guillot و همکاران با استفاده از تکنیک MLVA ارتباط بین ژنوتاپ و شیوع بیماری های ناشی از گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس را در ۲۷۷ نمونه شامل ۶۲ مورد از پرنده‌گان در استان Guangxi در چین، ۹۵ نمونه جمع آوری شده در دو مزرعه اردک در فرانسه و ۱۲۰ نمونه محيطی 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 ژنوتاپ مختلف را به همراه داشت و فقط ۳۳ ژنوتاپ بین دو ایزوله یا بیشتر مشترک بود(۶۶).

## بحث

روش‌های مولکولی مختلفی برای تایپینگ گونه‌های مختلف آسپرژیلوس بیان شده است. تایپینگ مولکولی

## 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, Zühlksdorf 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.

- 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-Fullerenger 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.

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, Horres 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. Mondron 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]<sub>n</sub> 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

- 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, Reubaet 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, Duij B, Otsen M, et al. Amplified-

- 
- 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.