Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:31 +0330 on Saturday January 20th 2018

مقاله پژوهشی

روش مولکولی ساده برای تایید شناسایی گونه‌های اصلی قارچ‌های کاندیدا، آسپرژیلوس و درماتوفیت

سیدعلی معلم‌زاده[۱]، محمدحسین یادگاری[۲]*، معصومه رجبی بذل[۳]، رضا کچوئی[٤]

تاریخ دریافت 1392/10/17 تاریخ پذیرش 1392/12/15

چکیده

پیش زمینه و هدف: اونیکومایکوزیس توسط درماتوفیت‌ها، مخمرها و کپک‌ها ایجاد می‌شود. جهت شناسایی عوامل مختلف این عفونت که به عنوان یک معضل مهم بهداشتی در جوامع مختلف شناخته شده است باید روش‌های تشخیصی حساس‌تر و نوینی جایگزین روش‌های معمول گردد.

اهداف مشخص این مطالعه شامل اهداف ویژه و کاربردی است که عبارتست از تشخیص صحیح، حساس و سریع عوامل مختلف اونیکومایکوزیس با استفاده از روش مولکولی (از محیط کشت برای راه‌یابی کار روی بالین) و همچنین مقایسه حساسیت و دقت PCR با روش‌های معمول آزمایش مستقیم و کشت و جلوگیری از موارد منفی کاذب که در روش‌های تشخیصی فعلی دیده می‌شود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه یک بررسی توصیفی ـ تجربی بوده که روی نمونه‌های کشت مایع و جامد استاندارد ترایکوفیتون‌ها، مخمر کاندیدا و کپک آسپرژیلوس صورت گرفته است تا راه برای آزمایش مستقیم مولکولی روی نمونه‌های بالینی بیماران فراهم شود. در این آزمایش از آغازگرهای یونیورسال قارچ(ITS1 and ITS4) و اختصاصی ترایکوفایتون روبروم (T-rub) استفاده شد.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر، برای اولین بار در ایران و با استفاده از پروتکل جدید، ظرف ۲ ساعت استخراج مستقیم DNA از نمونه‌های کشت یاد شده صورت گرفت. همچنین مقایسه نتایج روش‌های آزمایشگاهی معمول مثل آزمایش مستقیم و کشت با روش PCR حساسیت و دقت بسیار زیاد آن را نسبت به روش‌های یاد شده به اثبات می‌رساند.

نتیجه‌گیری: این روش می‌تواند در آینده با سرعت و دقتی که دارد جایگزین بسیار مناسب و دقیق روش‌های معمول کشت و آزمایش مستقیم در نمونه‌های بالینی اونیکومایکوزیس باشد.

کلید واژگان: اونیکومایکوزیس، درماتوفیتوزیس، ترایکوفیتون، مخمر، آسپرژیلوس، PCR

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره دوم، ص ۱۱۲-۱۰۵، اردیبهشت ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: ایران، تهران، کد پستی ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۳۵۷۲

Email: yadegarm@modares.ac.ir

مقدمه

اونیکومایکوزیس یا عفونت قارچی ناخن[۵].

اونیکومایکوزیس[۶] یا عفونت قارچی ناخن دلیل اکثر بیماری‌های ناخن است. ۱۸ تا ۴۰درصد تمام تغییرات ناخنی و ۳۰درصد از تمام عفونت‌های قارچی را اونیکومایکوزیس تشکیل می‌دهد که توسط درماتوفیت‌ها، مخمرها و کپک‌ها[۷] ایجاد می‌شود. اونیکومایکوزیس ناشی از درماتوفیت‌ها یا کچلی ناخن[۸] بیشتر در بالغین و نیز در هر دو جنس دیده می‌شود. اونیکومایکوزیس ناشی از مخمرها نیز به کاندیدا آلبیکنس و بعضی از انواع دیگر کاندیداها که ارگانیسم‌های ساپروفیت دستگاه گوارش و مخاطات می‌باشند نسبت داده شده است.

---

[۱] دکترای قارچ شناسی پزشکی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

[۲] دانشیار قارچ شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران (نویسنده مسئول)

[۳] استادیار بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[٤] استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله، تهران، ایران

[۵] Fungal nail infection

[۶] Onychomycosis

[۷] Mold &Yeast

[۸] Tinea unguium

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:31 +0330 on Saturday January 20th 2018

اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌ها هم بیشتر در ناخن‌های پا و توسط کپک‌های مختلف مثل آسپرژلوس[1] ایجاد می‌گردد که جز ساپروفیت‌های خاک به حساب می‌آیند(۱).

روش‌های متداول فعلی تشخیص، مانند آزمایش مستقیم میکروسکوپی و کشت، زمان‌بر بوده و از طرفی وجود احتمال منفی کاذب در این دو روش، جواب‌گوی همه‌گیری این بیماری در بیماران مختلف ازجمله بیماران با دستگاه ایمنی سرکوب شده[2] که به هر دلیلی سیستم ایمنیشان تضعیف شده است نمی‌باشد. تشخیص عفونت ناخن ناشی از مخمرها، کپک‌ها، و درماتوفیت‌ها خصوصاً ترایکوفیتون‌ها از جمله روبروم بسیار دشوار است و می‌تواند درمان را ماه‌ها به تأخیر انداخته و یا در بعضی موارد، امکان دارد به صورت مزمن درآمده و به درمان مقاوم شود. در آزمایش مستقیم میکروسکوپی بین ۲ تا ۱۵ درصد منفی کاذب و تا ۴۰ درصد کشت، منفی گزارش شده است(۲،۳).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[3] روشی است که به طور گسترده در زیست‌شناسی مولکولی بکار برده می‌شود. امروزه با پیشرفت تکنولوژی PCR سرعت تشخیص آزمایشگاهی انواع بیماری‌ها از جمله عفونت‌های قارچی ناخن نیز در حال افزایش است که می‌تواند تشخیص سریع و شناسایی اونیکومایکوزیس را از مقادیر ناچیز مواد اولیه (نمونه بالینی) در ظرف چندین ساعت امکان‌پذیر کند(۸-۴).

روش بکار برده شده در این مطالعه روشی است که برای اولین بار در ایران، عوامل اصلی انیکومایکوزیس یا عفونت قارچی ناخن را به صورت مستقیم از محیط‌های کشت متفاوت مورد بررسی و تشخیص مولکولی قرار می‌دهد که دلایل آن با توجه به مسایل فوق چنین بیان می‌شود:

استفاده از این روش روی محیط‌های کشت استاندارد ترایکوفیتون روبروم، ترایکوفیتون منتاگروفایتیس، کاندیدا و آسپرژیلوس نتیجه فوق‌العاده داشته و می‌تواند در آینده با بهینه سازی بهتر روش، به صورت مستقیم روی نمونه‌های بالینی بیماران کاربرد داشته باشد که از مهم‌ترین هدف تحقیق حاضر می‌باشد. همچنین هرچه سرعت و دقت تشخیص بالا رود، سرعت بهبودی و روند تقویت سیستم ایمنی افراد در معرض خطر عفونت قارچی مانند بیماران ایدزی، سرطانی‌ها، اطفال نارس، دیابتی‌ها و افرادی که انتقال عضو دارند نیز افزایش خواهد یافت(۹).

از آن جایی که بیشترین درگیری قارچی ناخن توسط ترایکوفیتون‌ها و از جمله رویروم ایجاد می‌شود طراحی و ساخت آغازگر اختصاصی روبروم طبق مرجع مورد تایید در ژن بانک NCBI بوده و این آغازگر می‌تواند قطعه‌ای از ترایکوفیتون روبروم را با وزن مولکولی۹۲۳ جفت باز شناسایی نماید(۱۴).

مواد و روش‌ها

چنانچه قبلاً نیز یاد آوری گردید، روش‌های فعلی تشخیص مثل آزمایش مستقیم میکروسکوپی و کشت در عفونت‌های قارچی از جمله ناخن، از معایب و مشکلات مهمی مانند زمان‌بر بودن تشخیص، همراه با موارد بالای منفی کاذب و هزینه‌های هنگفت تشخیص و درمان که با صرف زمان بسیار طولانی به بیمار تحمیل می‌گردد، رنج می‌برد در حالی که این مطالعه یک بررسی کاملاً نوین مولکولی با حساسیت، سرعت و دقت فوق‌العاده بالا، که روی نمونه‌های کشت استاندارد ترایکوفیتون روبروم، ترایکوفیتون منتاگروفایتیس، مخمر کاندیدا و کپک آسپرژیلوس در گروه قارچ شناسی پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس با هدف توصیف مبانی نظری یک روش آزمایشگاهی و راه‌اندازی و استفاده عملی از آن در آینده روی نمونه‌های بالینی بیماران برای شناسایی عوامل مختلف اونیکومایکوزیس مثل درماتوفیت‌ها، مخمرها و کپک‌ها راه‌اندازی و انجام شد.

روش کار: مقدار مشخصی از نمونه کشت استاندارد ترایکوفیتون روبروم با PTCC 5143 و شماره دست یابی-AY 525329 و استاندارد ترایکوفیتون منتاگروفایتیس با PTCC 5054 (طبق استاندارد مرکز تحقیقات صنعتی ایران) که قبلاً بر روی محیط کشت SCC یا سابورو دکستروز آگار انتی‌بیوتیک دار (Sabouroud Dextrose Agar + Cyclohexamide + Chloramphenicol) و نمونه کشت کپک آسپرژیلوس و مخمر کاندیدا که در محیط سابورو براث[4] ساخت شرکت مرک آلمان کشت داده شده و در شرایط دمایی۳۰ درجه به مدت ۲ تا ۳ هفته انکوبه گردیده بود، برداشت شده و در شرایط کاملاً استریل مطابق با پروتکل جدید روی آن آزمایش مولکولی انجام شد.

آزمایش مولکولی: از هر نمونه کشت، به صورت جداگانه برای آغاز آزمون مولکولی به شرح زیر استفاده شد: استخراج مستقیم DNA از نمونه‌های کشت داده شده فوق و انجام PCR برای تکثیر DNA قارچی با استفاده از آغازگرهای یونیورسال قارچ[5] و اختصاصی روبروم (T-rub) انجام شد(۱۱-۱۰).

استخراج DNA: استخراج مستقیم DNA از محیط کشت جامد و مایع بر اساس روش فنل- کلروفورم جدید به این ترتیب

[1] Aspergillus
[2] Immunosuppressed Patients
[3] Polymerase Chain Reaction: PCR
[4] Sabouroud Broth
[5] ITS4-ITS1 / Universal Primer

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:31 +0330 on Saturday January 20th 2018

انجام شد: با اسکالپل[1] استریل مقداری از قارچ تازه و جوان از رویه کشت برداشت شده و داخل میکروتیوب استریل ۱/۵ ml قرار داده شد. سپس به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج که شامل (۵۰ ملی مول EDTA[2] تریس HCl[3] با (pH=8) و SDS[4] ۱درصد) به اضافه ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K[5] بود به شدت ورتکس[6] و به مدت یک ساعت در دمای مورد نظر انکوبه شد. بعد از طی زمان یاد شده مقدار ۵۰۰ میکرولیتر فنل اشباع (شرکت سیناژن ایران) به آن اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی در اپندورف[7] استریل منتقل و به آن ۵۰۰ میکرولیتر از کلروفورم (شرکت مرک آلمان) افزوده شده و دوباره سانتریفیوژ شد. مایع رویی در میکروتیوب استریل جدید منتقل و یک دهم حجم آن استات سدیم سه مولار با (pH = ۵/۵) و دو برابر حجم نیز الکل سرد مطلق (اتانل ۹۹،۷%) به آن اضافه شد. سپس در سانتریفیوژ یخچال دار قرار داده شد و پس از طی مرحله یاد شده، میکروتیوب خالی و روی رسوب به دست آمده به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰درصد ریخته و مجدداً به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت بعد از خالی نمودن میکروتیوب و خشک نمودن در هوای اتاق رسوب مورد نظر در ۲۵ میکرولیتر بافر TB[8] حل و برای آزمون PCR آماده شد.

برای عمل PCR یک واکنش ۲۵ میکرولیتری در نظر گرفته شد و طبق مراحل زیر و با استفاده از مواد شرکت ویوانتیس مالزی[9] انجام شد: آب مقطر دیونیزه ۸ میکرولیتر، آغازگرهای رفت و برگشت به مقدار ۱/۵ میکرولیتر، MgCL2 به میزان ۰/۵ میکرولیتر، الگو[10] یا نمونه DNA محیط کشت مورد مطالعه ۱ میکرولیتر، مخلوط اصلی[11] ۱۲/۵ میکرولیتر که حجم کلی مواد داخل میکروتیوب استریل به ۲۵ میکرولیتر رسیده و در نهایت مواد فوق با آرامی مخلوط و داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. تمام مراحل یاد شده در شرایط کاملاً استریل و زیر هود مولکولی و در بین ظرف یخ انجام شد.

توالی آغازگرهای یونیورسال به کار گرفته شده در این مطالعه و آغازگرهای اختصاصی ترایکوفیتون روبروم که قبل از استفاده در ژن بانک NCBI[12] ارزیابی شد به صورت زیر بود.

[1] Scalpel
[2] Ethylene diamine tetraacetic acid
[3] Tris HCl
[4] Sodium Dodecyle Sulfate
[5] Proteinase K
[6] Vortex
[7] Eppendorf
[8] Tris Borate Buffer
[9] Vivantis
[10] Template
[11] Master Mix
[12] National Center for Biotechnology Information

ITS1: 5' - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3'
ITS4: 5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3'

T- rub: F- 5' - GCC TGT TGT TCC GCT CAT TCT T - 3'
R- 5' - CGG CTA GGA GGG CGT GGT AGA- 3'

برنامه اجرا شده برای PCR عبارت بود از مرحله اول، حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد با زمان ۵ دقیقه، یک چرخه برای واسرشت سازی اولیه[13]، مرحله دوم، حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد با زمان ۳۰ ثانیه، مرحله سوم با دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد و زمان ۴۵ ثانیه، مرحله چهارم با دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد و زمان یک دقیقه و پانزده ثانیه که جمعاً ۳۵ چرخه برای تکثیر DNA و تکثیر نهایی یا مرحله پنجم با حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد و زمان هفت دقیقه یک چرخه انجام شد که کل این فرایند بیشتر از دو ساعت طول کشید. برای تفکیک قطعات DNA و آگاهی از محصول PCR و نیز قابل رنگ آمیزی و قابل مشاهده نمودن آن‌ها، هر کدام از محصولات PCR روی ژل آگارز به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد. از بافر TBE[14] شامل: EDTA ۰/۵ مولار، بوریک اسید[15] و آب مقطر دیونیزه با (pH= ۸) برای ساخت ژل آگارز ۲درصد و بافر تانک الکتروفورز استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی از اتیدیوم بروماید[16] (سیناژن ایران) با غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر استفاده و سپس ژل مورد نظر در دستگاه ژل داکیومنت[17] قرار داده شد.

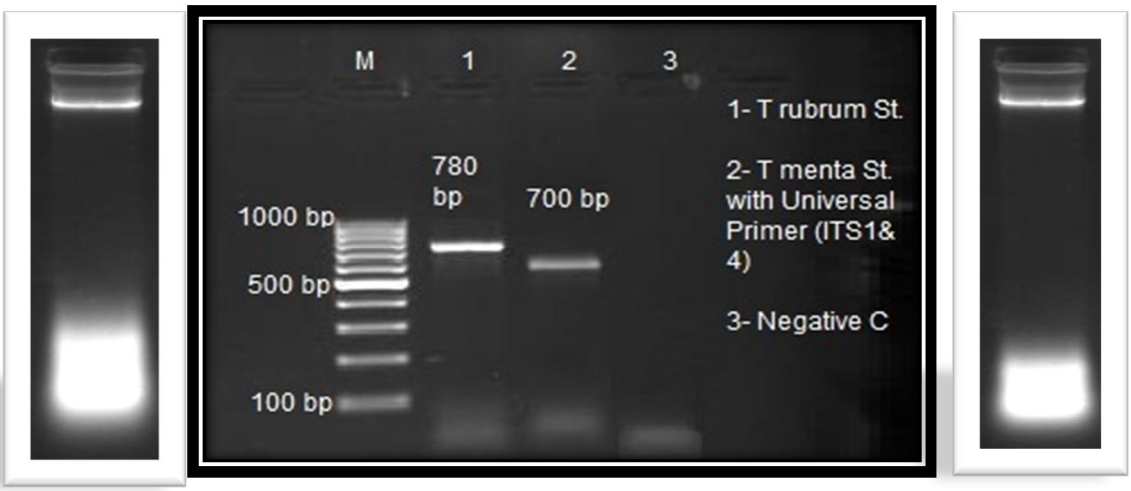
نتایج

با به‌کارگیری از روش‌های متعدد و آخرین گزارشات موجود NCBI در زمینه تشخیص مولکولی عفونت‌های قارچی (۱۸-۱۷-۱۶-۱۵-۱۴-۱۳-۱۲-۱۱-۱۰-۹-۲) و انجام بیش از صد بار استخراج DNA با پروتکل‌های مختلف و تغییراتی که در آن‌ها ایجاد شد، با توجه به اینکه در اکثر گزارشات یاد شده از کیت استفاده شده بود، روش‌های استخراج DNA مقالات فوق نتیجه مطلوبی را در بر نداشت و منفی بود، تا اینکه با مطالعات متعدد گروه تحقیقاتی ما و با ایده گرفتن و تغییرات در تمام موارد فوق و صرف زمان ۸ ماه که نتیجه آن منجر به روش اصلاح شده و بهینه جدید گردید، اولین بار استخراج DNA با زمان ۲۴ ساعت از محیط کشت مایع و جامد قارچ استاندارد روبروم و استاندارد

[13] Initial Denaturation
[14] Tris/Borate EDTA
[15] Boric acid
[16] Ethidium Bromide
[17] Gel Documentation System

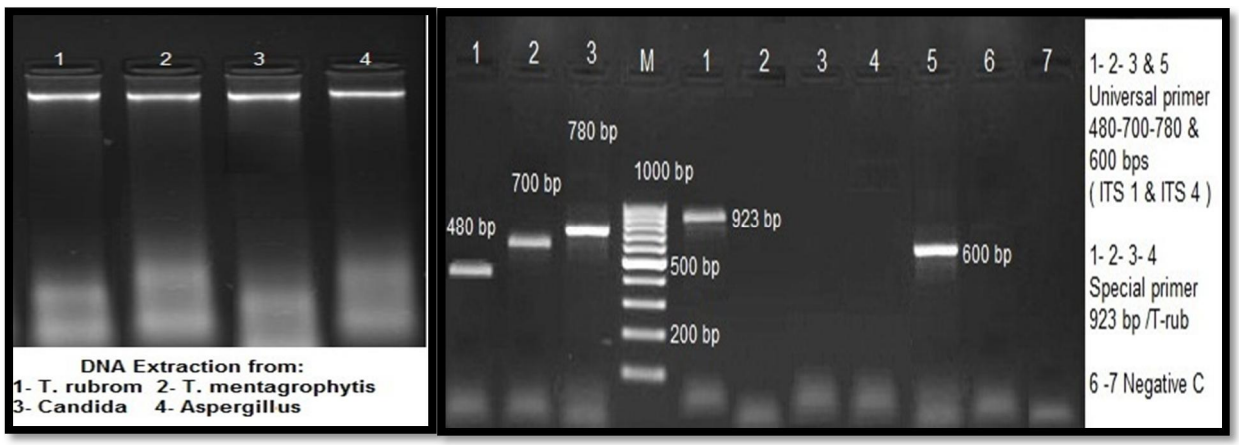
Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:31 +0330 on Saturday January 20th 2018

منتاگروفایتیس با پرایمرهای یونیور سال ITS1-ITS4 انجام گردید. به تعقیب آن در مخر کاندیدا و کپک آسپرژیلوس نیز تست گردید که با موفقیت همراه بود.



شکل (۱): استخراج ۲۴ ساعته DNA از محیط کشت استاندارد ترایکوفیتون روبروم (طرف راست) و منتاگروفایتیس (طرف چپ) و تکثیر PCR که دو نمونه فوق با آغازگر یونیورسال ITS 1 و ITS 4 شناسایی شده‌اند.

سپس بهینه سازی روش از قبیل حذف نیتروژن مایع و تغییرات در دور سانتریفیوژ و دما، ادامه یافت تا اینکه بالاخره در مدت زمان دو ساعت DNA عوامل یاد شده قارچی از قبیل استاندارد ترایکوفیتون روبروم، استاندارد ترایکوفیتون منتاگروفایتیس، مخمر کاندیدا و کپک آسپرژیلوس با موفقیت جداسازی و با تکثیر PCR به تایید رسید.



شکل (۲): استخراج ۲ ساعته DNA از عوامل مختلف Onychomycosis.

PCR با پرایمر یونیورسال(ITS-1 و ITS-4) و پرایمر اختصاصی روبروم (T-rub). از چپ به راست: شماره۱- کاندیدا. شماره۲- استاندارد ترایکوفیتون منتاگروفایتیس. شماره۳- استاندارد ترایکوفیتون روبروم. شماره۱- بعد از نشانگر DNA استاندارد ترایکوفیتون روبروم با پرایمر اختصاصی. شماره‌های ۲،۳ و ۴ با پرایمر اختصاصی روبروم جهت تست اختصاصیت پرایمر. شماره۵- کپک آسپرژیلوس. شماره‌های ۶و۷ کنترل منفی پرایمرها و کنترل مثبت همان نمونه‌های مورد مطالعه بوده است (نمونه بالینی وجود نداشت).

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:31 +0330 on Saturday January 20th 2018

بحث

چنانچه قبلاً نیز یاد آوری گردید روش‌های تشخیصی فعلی (آزمایش مستقیم میکروسکوپی و کشت) معایب اساسی و مهمی دارند مانند نیاز به زمان طولانی برای تشخیص عفونت قارچی ناخن که منفی کاذب را به همراه داشته و به تبع آن هزینه‌های سنگین تشخیص و درمان مکرر را به دنبال خواهد داشت. این مسئله وجوب روش‌های جایگزین و مناسب را از نگاه سرعت، دقت و حساسیت به اثبات می‌رساند چنانچه مزایای یاد شده در تحقیقات و روش‌های مدرن و مولکولی فوق‌العاده بوده و با روش‌های معمول قابل مقایسه نیست.لذا هدف این مطالعه تشخیص در زمان کوتاه با حساسیت و دقت لازم می‌باشد.

گزارش‌های موجود در PubMed و دیگر منابع معتبر دنیا اهمیت تشخیص مولکولی را در عفونت‌های قارچی ناخن به اثبات می‌رساند که به مهم‌ترین آن‌ها به صورت فهرست‌وار اشاره می‌گردد:

در سال ۲۰۰۷ بریلووسکا دابرووسکا[1] توانستند عفونت درماتوفیتی ناخن را با استفاده از PCR چندگانه[2] در مدت پنج ساعت با موفقیت تشخیص دهند. دلیل استفاده از این روش ۵ تا ۱۵ درصد منفی کاذب در آزمایش مستقیم، و ۴۰ درصد منفی در کشت اعلام شد(۲). در سال ۲۰۰۷ گارگ[3] و همکاران با Nested PCR، در بیماران با دستگاه ایمنی سرکوب شده و شیمی درمانی و در سال ۲۰۰۴ رالف[4] و همکاران با Light Cycler PCR، (۹،۱۰) و موارد مشابه دیگر اهمیت تشخیص مولکولی عفونت درماتوفیتی ناخن را نسبت به روش‌های تشخیصی مستقیم میکروسکوپی و کشت به اثبات رساندند(۱۳-۱۱).

هم چنین بیفوس[5] و همکاران در سال۲۰۰۹ توانستند با زمان ۲۴ ساعت آلودگی پنج گونه درماتوفیت را مستقیماً از ناخن‌های مشکوک با ELISA-PCR جدا سازی نمایند. در این تحقیق ذکر شده است که میزان منفی کاذب در روش‌های معمولی کشت و آزمایش مستقیم بالای ۶۰ درصد است(۱۵).

در سال۲۰۱۰، بورگمن و همکاران توانستند ۱۱ گونه درماتوفیت را مستقیماً از نمونه‌های بالینی مبتلا به اونیکومایکوزیس با استفاده از Real Time PCR جداسازی نمایند (۱۹).

در سال ۲۰۱۱ الکساندر و همکاران ۴۹۷۲ نمونه ناخن و پوست را مورد بررسی با Real Time PCR قرار داده و گونه‌های مختلف ترایکوفیتون و دیگر درماتوفیت‌ها را شناسایی نمود(۲۰).

با توجه به موارد ذکر شده که اهمیت روش‌های نوین و مولکولی را نسبت به روش‌های معمول به اثبات می‌رساند، در آن‌ها از اشکال و روش‌های مختلف مولکولی بجای آزمایش مستقیم و کشت استفاده شده است، که از نتیجه مقایسه و مطالعه این تحقیق با موارد فوق نکات زیر به دست می‌آید:

۱- در مطالعه حاضر برای اولین بار استخراج مستقیم DNA از کشت عوامل مختلف قارچی ناخن ناشی از درماتوفیت‌ها مخمرها و کپک‌ها در مدت زمان ۲ ساعت با موفقیت تشخیص و شناسایی گردید که در هیچ یک از موارد بالا با این سرعت دیده نمی‌شود.

۲- تکثیر DNA استخراج شده در این تحقیق با استفاده از PCR معمولی بوده، درحالی‌که در تمام موارد مطالعه شده فوق از روش‌های پرهزینه‌تر استفاده شده است.

۳- کم هزینه بودن و امکان دسترسی به مواد استخراج DNA در ایران و استفاده آسان از این روش در آزمایشگاه‌های معتبر مولکولی از دیگر مزایای این تحقیق نسبت به موارد مشابه آن در خارج از کشور می‌باشد.

۴- سرعت و حساسیت بالای تحقیق حاضر به وضوح نشان می‌دهد که اگر کار و مطالعه بیشتری روی روش به دست آمده از این مطالعه صورت گرفته و بهینه سازی شود، در آینده می‌تواند مستقیماً روی نمونه‌های بالینی ناخن بیماران، استفاده شده و جایگزین بسیار مناسبی به جای روش‌های معمول آزمایشگاهی مانند آزمایش مستقیم و کشت باشد. سرعت و دقت این روش در صورت کاربرد روی بالین، اهمیت آن‌را در بیماران با دستگاه ایمنی سرکوب شده که هر روز خطر احتمال درگیری قارچی از جمله ناخن در آن‌ها بیشتر می‌شود را چند برابر می‌کند(۷-۲).

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله دکترای تخصصی رشته قارچ‌شناسی پزشکی بوده که با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسیده است.

[1] Brillowska-Dabrowsk
[2] Multiplex PCR
[3] Garg
[4] Ralf
[5] Beifuss

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:31 +0330 on Saturday January 20th 2018

References:

1. Zaini F, Mehbod ASA, Emami M. Comprehensive medical mycolog. Tehran: University of Tehran Press; 2004. P.119-170. (Persian)
2. Brillowska-Dabrowska A, Ditte M, Saunte A, Maiken A. Five - Hour Diagnosis of Dermatophyte Nail Infections with Specific Detection of Trichophyton rubrum. Microbol J 2007; 65(6):1200-4.
3. Gräser A, Kuijpers W, Presber S, Hug D. Molecular taxonomy of the T rubrum. Microbol J 2000; 11(2): 3329-36.
4. Tanja V, Melanie S, Knut K, Jens D. Evaluation of Novel Broad-Range Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Human Pathogenic Fungi in Various Clinical Specimens. JCM 2008; 60(4):1919–26.
5. Ercan A, Ali S, Ahmet A, Sutur T, Yildiran K, Zafer K, et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis of Onychomycosis. Eur J Dermatol 2004; (14): 52-5.
6. Marie M, Dubach M, Claire L, Martine F, Chauvin D, Isabelle Le G, et al. Rapid Discrimination among Dermatophytes,spp., and Other Fungi with a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Ribotyping Method. JCM 2008 ; 33(3): 685-69.
7. Michel M, Olympia B, Christophe Z, Barbara C, Marina F, Renato P. Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycosis. J Med Microbiol 2006; (55): 1211-6.
8. Yang X, Sugita T, Takashima M, Hiruma M, Li R, Sudo H, et al. Differentiation of Trichophyton rubrum clinical isolates from Japanese and Chinese patients by randomly amplified polymorphic DNA and DNA sequence analysis of the non-transcribed spacer region of the rRNA gene. J Dermatol Sci 2009;54(1):38–42.
9. Gutzmer R, Mommert S, Küttler U, Werfel T, Kapp A. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. J Med Microbiol 2004;53(Pt 12):1207–14.
10. Garg J, Ragini T, Sanjay S, Anil K, Gula A, Atul G, et al. Evaluation of Pan-Dermatophyte Nested PCR in Diagnosis of Onychomycosis. JCM 2007; 50(11): 3443-5.
11. Vali Q, Kardjeva R, Summerbell T, Kantardjiev D, Devliotou P,Sotiriou N. Forty-Eight-Hour Diagnosis of Onychomycosis with Sub typing of Trichophyton rubrum Strains. JCM 2006; 47(5):1419-27.
12. Garg J, Tilak R, Garg A, Prakash P, Gulati AK, Nath G. Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. BMC Res Notes 2009;2:60.
13. Kong F, Tong Z, Chen X, Tania S, Bin W, Qixuan W, et al. Rapid Identification and Differentiation of Trichophyton Species, Based on Sequence Polymorphisms of the Ribosomal ITS Regions, by Rolling-Circle Amplification. JCM 2008; 22(11): 1192-9.
14. Gupta AK, Singh J, Zaman M. Fast and sensitive detection of T rubrum DNA from the nail by double round PCR. Medmycol 2009;19(22): 443-50.
15. Beifuss B, Bezold G, Gottlöber P, Claudia B, Jeanette W, Martin S. Direct detection of five common Dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR–ELISA technique open to protocol transfer. Blackwell Verlag Germany. GmbH Mycoses 2009; 54(19): 137-45.
16. Kathleen W, Hafer Wilhelm Cruz. Analysis and cloning of Eukaryotic Genomic DNA. United States: Howard Hughes Medical Institute; 2006. P.16.

17. White B, Kumar M, Shukla PK, Anderson V, Goozatti A. Use of PCR Targeting of ITS Regions. J Clin Microbiol 2005; 43(2): 662-8.
18. Berk E, Kuştimur S, Kalkancı A, Oztaş OM. DNA Extraction and Identification of Trichophyton rubrum by Real-Time PCR from direct nail scraping specimens. Mikrobiyol Bul 2011; 45(1):150-8.
19. Bergmans AMC, Vander M, Klaassen A, Andriesse GI, Wintermans RGF. Evaluation of a Single-tube Real-time PCR for Detection and Identification of 11 Dermatophyte Species in Clinical material. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 704–10.
20. Alexander CL, Shankland GS, Carman W, Williams C. Introduction of a Dermatophyte Polymerase Chain Reaction assay to the diagnostic mycology. Br J Dermatol 2011; 164(5):966-72.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:31 +0330 on Saturday January 20th 2018

Original Article

THE SIMPLE MOLECULAR METHOD FOR CONFIRMING IDENTIFICATION OF THE MAIN SPECIES OF FUNGI CANDIDA, ASPERGILLUS AND DERMATOPHYTE

Seyed Ali Moallemzadeh[1], Mohammad Hossein Yadegari[2]*, Masuomeh Rajabi Bazl[3], Reza Kachuei[4]

Received: 7 Jan, 2014; Accepted: 6 Mar, 2014

Abstract

Background & Aims: Onychomycosis is caused by dermatophytes, yeasts, and molds. The term onychomycosis refers to nail infections caused by dermatophyte and non-dermatophyte fungi. The aim of this study was diagnosis of onychomycosis agents and also comparison of the accuracy and sensitivity of PCR to conventional methods such as direct examination and culture.

***Materials & Methods*:** Our descriptive-experimental research is based on the usage of standard solid and liquid cultures of Trichophyton, Candida and Aspergillus for molecular testing on clinical specimens from patients. Universal fungal primers (ITS1 & ITS4) and specific *Trichophyton rubrum* primers (T-rub) were applied in this experiment.

Results: For the first time in Iran using an innovative protocol, direct DNA extraction and PCR confirmation of mediums mentioned above was performed in two hours. Furthermore, better sensitivity and precision of PCR rather than routine laboratory results such as direct examination and culture have been proved.

Conclusion: Due to the high speed and precision of PCR method, it can be a convenient alternative for conventional methods such as direct examination and culture on clinical samples of onychomycosis.

Keywords: Onychomycosis, Dermatophytosis, Trichophyton, Yeast, Aspergillus, PCR

Address: Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, ***Tel***: +98 2182883572
Email: yadegarm@modares.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2014: 25(2): 112 ISSN: 1027-3727

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:31 +0330 on Saturday January 20th 2018

[1] Ph.D, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2] Associate Professor, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (Corresponding Author)
[3] Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Assistant Professor, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran