مقاله پژوهشی

شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس مهم بیماری‌زا با استفاده از پلی مورفیسم اشکال کانفورماسیونی تک رشته‌های DNA ژن کد کننده rRNA

دکتر کامبیز دیبا[1]، دکتر حسین میرهندی[2]، دکتر محمدرضا خرمی‌زاده[3]، نیلوفر جلالی زند[4]

تاریخ دریافت ۸۷/۵/۲۸ تاریخ پذیرش ۸۸/۷/۱

چکیده

پیش زمینه و هدف: تست مولکولی SSCP[5] روشی بر پایه PCR است که به‌عنوان یکی از شیوه‌های سریع شناسایی قارچ‌ها مورد علاقه قرار گرفته است. این فن در گذشته برای اهدافی غیر از شناسایی میکروارگانیزم‌ها، از جمله در آنالیز موتاسیون‌ها مورد استفاده قرار گرفته است، بعدها در شناسایی و تفکیک بین گونه‌ای برخی اورگانیزم‌ها کاربرد پیدا کرد.

با توجه به قابلیت روش فوق در تعیین اختلافات بین ترادف‌های ژنی از طریق پلی مورفیسم تک رشته‌های DNA بدست آمده از محصولات PCR، در این مطالعه سعی شده است که امکان استفاده از این روش که بی‌نیاز از هضم با آنزیم‌های محدودساز می‌باشد در ایجاد افتراق بین گونه‌ها بررسی شود.

مواد و روش کار: ۲۰۵ ایزوله آسپرژیلوسی در این مطالعه از نمونه‌های بالینی و محیطی چند بیمارستان آموزشی کشور و نمونه‌های بالینی بیماران مراجعه کننده به مرکز قارچ شناسی بدست آمده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. این تعداد با توجه به شیوع یک درصدی عفونت‌های آسپرژیلوسی در میان عفونت‌های قارچی بیمارستانی انتخاب شدند. تمامی جدایه‌های آسپرژیلوسی، در محیط‌های کشت افتراقی آسپرژیلوس‌ها شامل: CYA , CYA20S, MEA و CZA کشت داده شده، با استفاده ازخصوصیات کلنی و جلوه‌های میکروسکوپی شناسایی شدند. در روش مولکولی استخراج DNA به‌روش دستی گلاس بید و فنل - کلروفرم، آمپلیفیکاسیون قطعه ITS2 و دناتوراسیون DNA برای تولید تک رشته انجام گرفت، سپس با استفاده از G-PAGE[6] و عکس‌برداری از باندها الگوهای تفکیکی مقایسه شدند.

یافته‌ها: در طول یک مطالعه ۱۸ ماهه، ۲۰۵ ایزوله آسپرژیلوسی شامل یازده گونه بدست آمد، منابع جداسازی گونه‌ها، نمونه‌های محیطی و بالینی بیمارستانی بودند. ایزوله‌های آسپرژیلوسی ۲۵ درصد از منابع بالینی و ۷۵ درصد از نمونه‌های محیطی بیمارستان‌ها بدست آمدند. در بررسی SSCP که نتیجه آن افتراق بین گونه‌های آسپرژیلوس بود. آسپرژیلوس نیدولانس، آسپرژیلوس فیشری، آسپرژیلوس کوادریسینکتا، (آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس نایجر) در یک گروه، (آسپرژیلوس فلاوس، آسپرژیلوس ترئوس، آسپرژیلوس اوکراسئوس) در گروه دیگر از هم قابل تفکیک هستند.

بحث و نتیجه‌گیری: SSCP به‌عنوان یک روش سریع، کم هزینه و آسان می‌تواند برای شناسایی مهم‌ترین گونه‌های آسپرژیلوس بیماریزای انسان مورد استفاده قرار گیرد، هر چند که به‌دلیل ویژگی پایین روش احتمالا در کاربرد وسیع آن در آزمایشگاه‌های روتین تردید وجود دارد.

کلید واژه‌ها: آسپرژیلوس، شناسایی، پلی مورفیسم

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیستم، شماره سوم، ص ۱۷۱-۱۶۴، پاییز ۱۳۸۸

آدرس مکاتبه: ارومیه، پردیس نازلو، دانشکده پزشکی، تلفن: ۰۴۴۱-۲۷۷۰۹۶۹، همراه: ۰۹۱۲۴۴۶۴۹۷۲

Email: kadiba@umsu.ac.ir

مقدمه

در طی سه دهه گذشته، به‌موازات شیوع بیماری ایدز و برخی بیماری‌های مزمن، همچنین کاربرد روش‌های تهاجمی پزشکی در درمان و تجویز داروهایی که به‌نوعی در اختلال سیستم ایمنی انسان سهیم هستند، شیوع گروهی از عفونت‌های قارچی سیستمیک و فرصت‌طلب از جمله اشکال مختلف آسپرژیلوزیس

[1] استادیار قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (نویسنده مسئول)
[2] دانشیار قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[3] دانشیار ایمونولوژی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
[4] کارشناس آزمایشگاه بیولولوژی مولکولی، انستیتو تحقیقات بهداشتی اصفهان

[5] Single Stand Conformational Polymorphism
[6] Gradient Poly Acryl amide Electrophoresis

افزایش یافته است. گونه‌های آسپرژیلوس به‌عنوان عوامل این بیماری‌ها بعضاً با مواردی نظیر، برونکوپولمونری آلرژیک، کراتیت قارچی، عفونت قارچی گوش، سینوزیت‌های نازال و همچنین عفونت‌های مهاجم ریه مرتبط هستند. اشکال اخیر عفونت به‌خصوص در افرادی‌که از نوتروپنی‌های ناشی از شیمی درمانی رنج می‌برند، بسیار خطرناک و تهدیدکننده حیات ظاهر می‌گردند. در این خصوص، یافتن یک روش صحیح، دقیق و به‌موقع برای تشخیص و شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس در نمونه‌های بالینی اهمیت ویژه ای می‌یابد، و می‌تواند در پایش و غربالگری بیماری و اهداف اپیدمیولوژیک موثر باشد. روش‌های مرفولوژیک به تدریج اعتبار خود را از در شناسایی و طبقه‌بندی قارچها و بالاخص آسپرژیلوس‌ها از دست می‌دهند. مضافاً این که این روش‌ها وقت‌گیر بوده و در مواردی که شناسایی آسپرژیلوس‌ها نیازمند سرعت عمل است (نظیر عفونت‌های مهاجم در طغیان‌های Outbreaks آسپرژیلوسی). این روش‌ها کارآیی قابل ملاحظه‌ای ندارند. اخیرا فن‌های مولکولی ساده و با کفایت برای تشخیص و شناسایی عوامل قارچی پاتوژن از جمله گونه‌های آسپرژیلوس مورد استفاده قرار گرفته اند. روش‌های مولکولی به‌طور کلی از سرعت بالا و کفایت خوبی برخوردارند و نیازمند کادر مجرب و صاحب‌نظر آنچنان‌که برای روش‌های مورفولوژیک تاکید می‌گردد، نیستند. از روش‌های مولکولی رایج در شناسایی گونه‌ها می‌توان به: PCR-Sequencing ناحیه ITS[1] (۱)، PCR بر پایه سکانس‌های مکرر (۲)، PCR ایمونو آنزیم اسی (PCR-EIA[2]) (۳)، Nested- PCR با هدف نواحی rDNA[3]- ITS (۴)، SSCP (۵)، و همچنین PCR –RFLP[4] (۶) اشاره نمود که همگی در شناسایی آسپرژیلوس‌ها در سطح جنس و گونه بکار رفته‌اند. روش‌های میتنی بر تعیین سکانس DNA چنان‌که اشاره شدند، با وجود حساسیت بالا به‌لحاظ هزینه بالای انجام آن‌ها، به‌خصوص در سطح وسیع و در آزمایشگاه‌های روتین مقرون به‌صرفه نیستند. روش‌های PCR-RFLP و SSCP از جمله روش‌های سریع و قابل اعتماد می‌باشند که با وجود حساسیت نسبی کمتر، هزینه‌بری روش‌های مولکولی ذکر شده را ندارند و با سهولت بیشتری قابل انجام هستند. در این میان SSCP روش مولکولی بر پایه PCR، به‌عنوان یکی از شیوه‌های سریع شناسایی قارچها مورد علاقه قرار گرفته است. این روش بعلاوه بی‌نیاز از هضم آنزیمی است که در RFLP مشاهده می‌شود، لذا از سهولت، سرعت بیشتری برخوردار است. این فن در گذشته برای اهدافی غیر از شناسایی میکروارگانیزم‌ها، از جمله در آنالیز موتاسیون‌ها مورد استفاده قرار گرفته است، نمونه آن در غربالگری موتاسیون‌های ژن‌های فعال در فیبروز کیستیک و بیماری‌های ژنتیکی دیگر گزارش گردیده است (۷). بعدها این روش برای شناسایی استرپتوکوک‌ها (۸) و سایر باکتری‌ها (۹) قرار گرفت. کاربرد فن سریع SSCP در شناسایی قارچها محدود به قارچهای غیر بیماری‌زای اکتومایکوریزا و فیتوفتورا می‌گردد (۱۱،۱۰). در این مطالعه سعی بر این بود که امکان استفاده از روش بی‌نیاز از هضم SSCP را در ایجاد افتراق بین گونه‌ها از طریق پلی‌مورفیسم تک رشته‌های DNA بدست آمده از محصولات PCR آن‌ها را بررسی نما ییم.

مواد و روش کار

این مطالعه در حیطه تجربی Experimental قرار می‌گیرد که در طول ۱۸ ماه از فروردین ماه ۱۳۸۵ تا شهریور ۱۳۸۶ در مراکز تحقیقاتی وابسته دانشگاه علوم پزشکی تهران و دانشگاه UNE استرالیا انجام گرفته است. مراحل کار پژوهش به‌تفصیل در ذیل به آن پرداخته شده است.

میکروارگانیزم‌ها:

استرین‌های شناسنامه‌دار جهانی از پنج‌گونه آسپرژیلوس عامل بیماری‌های انسان از کلکسیون کشت‌های میکروبی ژاپن (JCM[5]) بدست آمدند، شامل:

A. flavus (JCM 2061), A. fumigatus (JCM 10253), A. niger (JCM 10254), A. nidulans (JCM 10227, A. tereus (JCM 02728).

سویه‌های اصلی از نمونه‌های محیطی بیمارستان‌ها و از کشت‌های مثبت بیماران بستری در چهار بیمارستان آموزشی که به‌طور تصادفی انتخاب شده بودند و همچنین نمونه‌های بالینی ارجاعی به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران بدست آمدند. نمونه‌های محیطی به‌طور عمده از سطوح مختلف اتاق‌های محل بستری بیماران نظیر کف، دیوار، تخت و ترالی‌ها و هوای اتاق، راهروها و محوطه خارجی گرفته شد. نمونه‌برداری با استفاده از سواب و موکت استریل انجام گرفته، بلافاصله در محیط‌های کشت پایه قارچ‌شناسی تلقیح شدند. محیط‌ها به آزمایشگاه قارچ‌شناسی انتقال داده شده در انکوباسیون ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مدت رشد، کلنی‌های آسپرژیلوسی مورد نظر قرار گرفته جداسازی شدند و در محیط‌های کشت افتراقی آسپرژیلوس‌ها شامل: CYA20S[7], CYA[6] و

[1] Internal transcript spacer
[2] immune enzyme assay
[3] ribosomal DNA
[4] restriction fragment length polymorphism
[5] Japanese collection for microorganisms
[6] CYA+20%Succrose
[7] Czapek Yeast extract Agar

CZA[1] MEA[2] کشت داده شدند. پس از هفت روز انکوباسیون در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد، شناسایی مورفولوژیک گونه‌ها با استفاده از خصوصیات کلنی‌ها به‌لحاظ میزان رشد، ویژگی‌های ماکروسکوپیک کلنی (شکل، رنگ، بافت، توپوگرافی و غیره) و نیز ویژگی‌های میکروسکوپیک کلنی (رئوس کونیدیائی (conidial heads)، طول و قطر کونیدیوفور، شکل و اندازه وزیکول‌ها، شکل و اندازه فیالیدها، یک ردیفی یا دو ردیفی بودن فیالیدها و شکل و اندازه کونیدی‌ها) انجام گرفت (۱۲).

استخراج DNA:

کشت‌های براث قارچی با تلقیح یک سوزن از کشت هفت روزه آسپرژیلوس‌ها به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت SGB[3] تهیه گردید. سپس در دمای ۳۰ درجه به‌مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت، جمع‌آوری هایفی قارچ پس از این مدت با استفاده از فیلترهای میلی پور (0.45µm) و شستشو با بافر Tris- EDTA و نیز آب مقطر دو بار تقطیر استریل انجام شد. توده‌های میسلیومی به‌نام mycelial mat به فرایند استخراج DNA وارد شده با استفاده از روش گلاس بید[4] - فنل کلروفرم[5] و و کاربرد یک دستگاه آسیاب کوچک به‌نام micro multi mixer برای شکستن سلول‌ها و جداسازی DNA با کاربرد بافر استخراج 1mM EDTA [pH 8.0], 1% SDS[6], 10 mM Tris-HCL [pH (8.0], 100 mM NaCl, 2%, Triton X-100)، محلول فنل - کلروفرم صورت گرفت. در نهایت ترسیب DNA با کمک نمک استات، الکل سرد و سرمادهی انجام شد. ماده ژنتیکی استخراج شده در این مرحله به‌شکل رسوب یا Pellet تشکیل شده است که در انتهای لوله قابل مشاهده بود. برای حذف نمک و الکل با درصد بالا، یک‌بار شستشو با اتانل ۷۰ درصد انجام گردید. و رسوب انتهایی با افزودن ۵۰ میکرولیتر از sterile TE buffer دوباره حل شده در دمای C ° ۲۰- ذخیره شد (۱۳).

تکثیر DNA ی هدف با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR):

۱- انتخاب پرایمرها. ژن کننده RNA ی ریبوزومی (rDNAgene) قطعه مناسبی برای اهداف شناسایی و طبقه‌بندی کپک‌ها و از جمله آسپرژیلوس‌ها است. پس از بررسی و آنالیز کامپیوتری قطعات مختلف rDNA، قطعه ITS2 هم به‌لحاظ این‌که دارای تنوع[7] کافی برای افتراق گونه‌های آسپرژیلوس است و هم قطعه کوچک (250-300 bp) مناسب برای ایجاد اشکال فضایی تک رشته‌های DNA می‌باشد، برای تکثیر انتخاب گردید لذا از پرایمرهای اختصاصی قطعه فوق، (ITS3 وITS4) استفاده شد که توالی پرایمرها به‌صورت زیر می‌باشد.

ITS-3 forward primer: 5'- GCA TCG ATG AAG AAC GCA- 3'

ITS-4 reverse primer: 5'- TCC TCC GCT TAT TTG ATA TGG- 3'

این پرایمرها بخشی از پرایمرهای یونیورسال ITS بوده به‌راحتی از چند شرکت داخلی نماینده Roche خریداری گردید.

۲- شرایط PCR:

برای انجام یک واکنش ۱۰۰ میکرولیتری:

بافر PCR، ۱۰×۵ میکرولیتر، پرایمر رفت (ITS3)) ۵۰ پیکومول، پرایمر برگشت (ITS4) ۵۰ پیکومول، ۴ نوع نوکلئوتید (dNTPs) ۲۰۰ میکرو مولار، آنزیم Taq پلیمراز ۲/۵ واحد، DNA ی الگو ۵ میکرولیتر و آب مقطر دوبار دیو نیزه مخلوط شدند. برنامه حرارتی اعمال شده برای PCR به‌شکل:

مرحله اول دناتوراسیون اولیه: حرارت °۹۵ به‌مدت شش دقیقه یک سیکل، مرحله دوم تکثیر DNA: حرارت °۹۴ به‌مدت ۴۵ ثانیه برای دناتوراسیون[8]، حرارت °۵۶ درجه به مدت یک دقیقه برای چسبیدن پرایمرها (annealing) و حرارت °۷۲ درجه برای تکثیر DNA (extension)، جمعاً ۳۰ سیکل و مرحله سوم، تکثیر نهائی: حرارت °۷۲ به‌مدت پنج دقیقه، پروتکل دمایی PCR را تشکیل می‌داد (۱۳).

تهیه تک رشته‌های DNA و الکتروفورز به‌روش PAGE:

پس از تکثیر این قطعه می‌بایست از حالت دو رشته‌ای به تک رشته تبدیل می‌شد، لذا با افزودن حجم‌های یکسان، محصول PCR (5µl) و Loading Dye (5 µl) در یک لوله و پس از یک گرمادهی کوتاه (پنج دقیقه در ۹۵ درجه) بلافاصله به حمام یخ منتقل شده تا از اتصال مجدد رشته‌ها (single stranded DNA) در هر صورت ممانعت گردد. تمامی مراحل تست پس از ایجاد تک رشته در شرایط سرمایی چهاردرجه صورت گرفت. در این صورت تک رشته‌های DNA احتملا با تشکیل فرم‌های فضایی متفاوت در فرایند الکتروفورزیس می‌توانست تغییراتی در سرعت حرکت باندها ایجاد نماید. شرایط مطلوب برای SSCP پس از مطالعه مراجع و مقالات دیگران و نیز بررسی حالات و متدهای گوناگون در ارتباط با این هدف، انتخاب گردید و سرانجام modified SSCP با کاربرد ژل گرادیان ۱۲-۶ درصد با بهینه کردن روش پلی اکریلامید ژل

[1] Czapek Dox Agar
[2] Malt Extract Agar
[3] Sabouraud glucose broth
[4] Glass beads
[5] Phenol Chloroform
[6] Sodium Dudcyle Sulfate
[7] variation
[8] denaturation

الکتروفوزیس (G-PAGE) آزمایش شده برای ده گونه استاندارد از میان گونه‌های استاندارد مورد مطالعه:

A. fumigatus, A.flavus, A. niger, A. nidulans, A. terreus, A. ochraceus, A. fischeri

مورد استفاده قرار گرفت. در روش -PAGEG ژل پلی اکریل‌امید در غلظت‌های چهارگانه: ۶ درصد، ۸ درصد، ۱۰ درصد و ۱۲ درصد به‌طور جداگانه تهیه شده به سیستم الکتروفورز عمودی انتقال داده شد. سپس پنج میکرولیتر از مخلوط PCR-product, Loading Dye در ژل تلقیح گردید و به‌دلیل حساسیت اشکال کانفورماسیونی تشکیل شده به گرما، سیستم در دمای یخچال، به یک جریان الکتریکی ضعیف با ولتاژ ۸۰-۶۰ قرار داده شده به آن ۶-۴ ساعت فرصت داده تا باندهای تشکیل شده رنگی برروی ژل از هم جدا شوند. برای رنگ‌آمیزی DNA روش Ethidium Bromide به‌دلیل ایجاد باندهای با وضوح بیشتر نسبت به روش نیترات نقره مورد استفاده قرار گرفت. بدین ترتیب ژل حاوی باند به‌آرامی و با دقت از سیستم ورتیکال تانک جدا شده در ظرف حاوی رنگ اتیدیوم بروماید۰/۰۱ درصد قرار گرفت. ژل نازک پس از ۲۰-۱۵ دقیقه رنگ آمیزی، با آب شستشو داده و به ترانس ایلومیناتور (document UV system gel) منتقل شده تا از باندها عکس‌برداری گردد.

جدول شماره (۱): فراوانی و درصد کلنی‌های جدا شده گونه‌های آسپرژیلوس از نمونه‌های محیطی و بالینی. چنان‌که ملاحظه می‌گردد، بالاترین و پایین‌ترین فراوانی متعلق به گونه‌های آسپرژیلوس فلاوس و آسپرژیلوس نیوئوس می‌باشد.

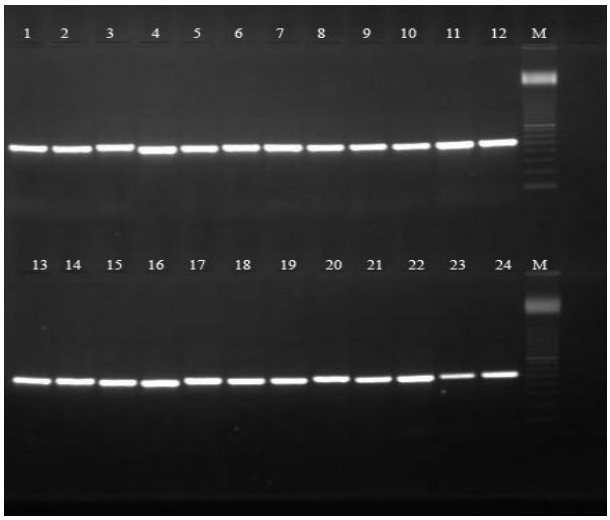
گونه‌ها	تعداد کلنی‌های جدا شده از نمونه‌ها					
	نمونه‌های بالینی		نمونه‌های محیطی		مجموع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
آسپرژیلوس فلاوس	۳۶	۶۹/۲	۷۶	۴۹/۷	۱۱۲	۵۴/۵
آسپرژیلوس نایجر	۴	۷/۷	۶۱	۳۹/۸۵	۶۵	۳۱/۷
آسپرژیلوس فومیگاتوس	۷	۱۳/۶	۱۱	۷/۲	۱۸	۸/۸
آسپرژیلوس نیدولانس	۱	۱/۹	۱	۰/۶۵	۲	۱/۰
آسپرژیلوس ترئوس	۱	۱/۹	۰	۰	۱	۰/۵
آسپرژیلوس کلاواتوس	۱	۱/۹	۱	۰/۶۵	۲	۱/۰
آسپرژیلوس پنی سیلوئید	۰	۰	۱	۰/۶۵	۱	۰/۵
آسپرژیلوس تاماری	۰	۰	۱	۰/۶۵	۱	۰/۵
آسپرژیلوس اوکراسئوس	۱	۱/۹	۰	۰	۱	۰/۵
آسپرژیلوس سوجئی	۱	۱/۹	۰	۰	۱	۰/۵
آسپرژیلوس نیوئوس	۰	۰	۱	۰/۶۵	۱	۰/۵
Total	۵۲	۱۰۰	۱۵۳	۱۰۰	۲۰۵	۱۰۰

یافته‌ها

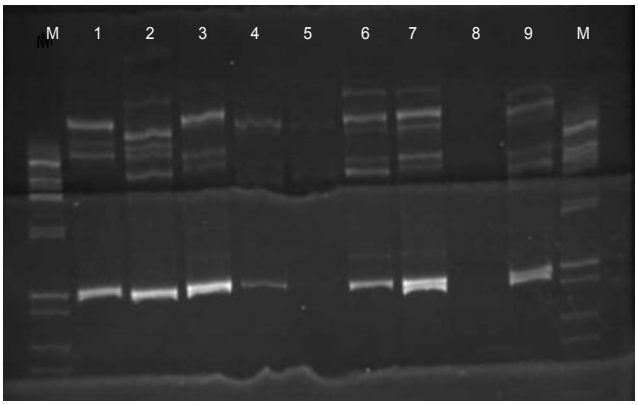
در طول این مطالعه ۱۸ ماهه، ۲۰۵ ایزوله آسپرژیلوسی شامل ۱۱ گونه بدست آمد، منابع جداسازی گونه‌ها، نمونه‌های محیطی و بالینی بیمارستانی بودند. ایزوله‌های آسپرژیلوسی ۲۵ درصد از منابع بالینی و ۷۵ درصد از نمونه‌های محیطی بیمارستان‌ها بدست آمدند. بالاترین فراوانی گونه‌ها متعلق به: A. flavus (54.5%)، A. niger (31.7%)، A. fumigatus (8.8%) بودند. ایزوله‌های بالینی به‌تفکیک نمونه‌ها عبارت بودند از: ۲۷ مورد تراشه‌های ناخن، هشت مورد ترشحات سینوسی، ۹ مورد اگزودای گوش خارجی، سه مورد خلط و مایع BAL و یک مورد بیوپسی بافتی. به‌همین ترتیب ایزوله‌های آسپرژیلوس بیمارستانی شامل: ۴۴ ایزوله محیط‌های داخلی بیمارستان (Indoor) و ۱۶۱ مورد ایزوله‌های محوطه خارجی بیمارستانی(Outdoor) می‌گردید. تمامی ایزوله‌های آسپرژیلوسی با روش مورفولوژیک بررسی مشخصات کلنی و میکروسکوپی کشت بر روی چهار محیط کشت افتراقی تشخیص داده شدند.

در بررسی SSCP، آمپلیفیکاسیون با استفاده از پرایمرهای ITS3 و ITS4 قطعات کوتاهی در حدود bp ۳۰۰-۲۵۰ در ناحیه ITS2 را نتیجه داد. چنان‌که در شکل یک ملاحظه می‌گردد، تفاوت واضحی بین گونه‌ها از نظر طول باندهای PCR قبل از فرایندهای گرمادهی و سرد کردن مشاهده نمی‌گردد. نتایج الکتروفورزعمودی محصول SSCP بر روی ژل پلی‌اکریل آمید، پس از رنگ آمیزی به دو روش نیترات نقره و اتیدیوم بروماید در دو شکل ۲و۳ به‌ترتیب نمایان می‌باشد. چنان‌که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد، الگوی تشکیل

باندها، به‌دلیل حساسیت فوق العاده بالای این رنگ آمیزی که حتی باندهای غیراختصاصی (non specific bands) به‌وضوح دیده می‌شوند، قادر به تفکیک بین گونه‌ها نمی‌باشد. در اصلاحاتی که به‌وسیله نویسندگان این مقاله در روش PAGE انجام گرفت، از ژل گرادیان (۱۲-۶ درصد) به‌جای ژل همگن استفاده گردید که نتیجه آن افتراق بین گونه‌های آسپرژیلوس به‌ترتیبی می‌باشد که در

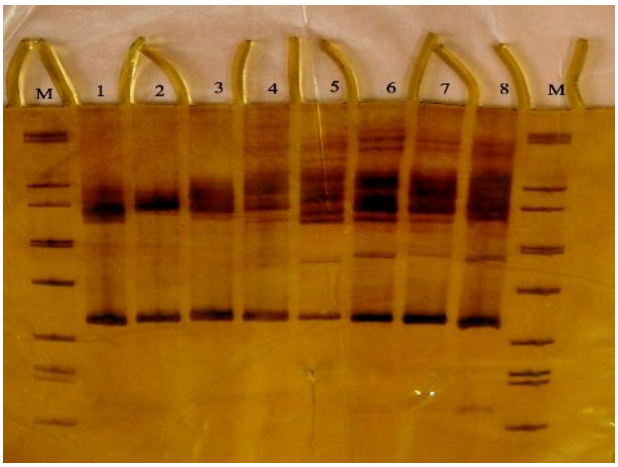


شکل شماره (۱): باندهای تشکیل شده حاصل از الکتروفورزیس افقی محصولات PCR ناحیه ژنی ITS2 مربوط به سویه‌های آسپرژیلوس مورد بررسی. این باندهای کاملا یکسان و مشابه قبل از فرآیند SSCP ملاحظه می‌شود.



شکل شماره (۳): تصویر الکتروفورز به‌روش PAGE Gradient محصولات PCR قطعه ITS2 متعلق به گونه‌های آسپرژیلوس مورد بررسی پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید. در این شکل به‌ترتیب از چپ به‌راست باندهای SSCP گونه‌های آسپرژیلوس فیشری (۱)، آسپرژیلوس نیدولانس (۲)، آسپرژیلوس کوادریسینکتا (۳)، آسپرژیلوس فومیگاتوس(۴)، آسپرژیلوس نایجر(۵)، آسپرژیلوس فلاووس (۶)، آسپرژیلوس ترئوس(۷)، آسپرژیلوس کلاواتوس (۸)، آسپرژیلوس اوکراسئوس (۹) قابل مشاهده است. باند M مربوط به مارکر استاندارد bp ۱۰۰ می‌باشد.

شکل ۳ نمایان است. چنان‌که مشهود است، گونه‌های آسپرژیلوس نیدولانس، آسپرژیلوس فیشری، آسپرژیلوس کوادرسینکتا، (آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس نایجر) در یک گروه، (آسپرژیلوس فلاوس، آسپرژیلوس ترئوس، آسپرژیلوس اوکراسئوس) در گروه دیگر از هم قابل تفکیک هستند. در ادامه با کاربرد این تست برای تمامی سویه آسپرژیلوسی مورد بررسی، نتایج بدست آمده با نتایج حاصل از روش مورفولوژی مقایسه گردید که با بهره گرفتن از تست آماری MC.Nemar اختلاف معنی‌داری بین دو روش مشاهده نگردید.



شکل شماره (۲): تصویر الکتروفورز بروش PAGE محصولات PCR گونه‌های مورد مطالعه آسپرژیلوسی پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره. چنان‌که ملاحظه می‌گردد با وجود باندهای غیراختصاصی فراوان، افتراق بین گونه‌ها: آسپرژیلوس فیشری (۱)، آسپرژیلوس نیدولانس (۲)، آسپرژیلوس کوادریسینکتا (۳)، آسپرژیلوس فومیگاتوس(۴)، آسپرژیلوس نایجر(۵)، آسپرژیلوس فلاووس (۶)، آسپرژیلوس ترئوس(۷)، آسپرژیلوس اوکراسئوس (۸) غیرممکن است.

بحث

روش‌های مولکولی در دهه اخیر تا حدود زیادی توانسته‌اند ضعف روش‌های مورفولوژی برای شناسایی سریع و آسان قارچ‌های بیماری‌زا از جمله آسپرژیلوس‌ها را جبران نمایند. می‌توان به جرأت اظهار داشت که بهترین روش برای شناسایی و تفکیک ارگانیسم‌ها از یکدیگر تعیین توالی[1] ژن‌های خاص است که متأسفانه این روش هزینه بالای مواد مورد نیاز و ماشین‌های پیچیده آزمایشگاهی نظیر آنالیزگر ژنتیکی[2] را می‌طلبد (۱). به‌همین ترتیب روش‌های PCR-EIA و Nested PCR نیز به‌منظور شناسایی و تفکیک گونه‌های آسپرژیلوس مورد استفاده قرار گرفته اند اما با وجود این

[1] Sequencing
[2] Genetic Analyzer

از کارایی پایین‌تری از روش‌های مبتنی بر سکانس DNA برخوردارند (۳،۲). روش دیگر بر پایه RFLP, PCR است که به‌خوبی برای شناسایی قارچ‌ها از جمله آسپرژیلوس‌ها بکار برده شده است، ضمن این‌که از حساسیت و ویژگی مطلوب برخوردار است. در مطالعات دیگران (۶) و مطالعه قبلی ما (۱۳) به‌عنوان یک روش نسبتاً سریع و آسان توصیف گشته است. اما بایستی توجه داشت که آن روش نیازمند طراحی و خرید آنزیم‌های محدود ساز می‌باشد که گاهاً گران و زمان‌بر است. در حالی‌که به‌عقیده ما روش مولکولی SSCP بی‌نیاز از کاربرد آنزیم‌های محدودساز می‌باشد. در واقع SSCP از سریع‌ترین و آسان‌ترین فن‌های مولکولی بر پایه PCR می‌باشد که اخیراً به‌منظور شناسایی و تفکیک میکرواورگانیزم‌ها استفاده شده است (۵). در واقع تنها مزیت دو روش اخیر نسبت به DNA Sequencing کم هزینه بودن و سهولت استقرار در یک آزمایشگاه تشخیص می‌باشد.

در مطالعه ما، روش SSCP مبتنی بر تغییرات مرفولوژی فضایی لوکوس ITS2 در ناحیه ژنی rDNA مورد استفاده قرار گرفت تا بتواند یک الگوی افتراقی مناسب برای شناسایی و تفکیک گونه‌های آسپرژیلوس بیماریزا فراهم سازد. ژن کد کننده RNAی ریبوزومی شامل قطعات ژنی زیر می‌باشد:

18 S - SS rDNA[1], (ITS1), 5.8S rDNA, Internal Transcribed Spacer (ITS2), 28S -LS rDNA[2]

که به لحاظ تنوع ترادف ژنی قطعه‌ای مناسب برای افتراق بین گونه‌ای آسپرژیلوس‌ها و سایر ارگانیزم‌ها تعبیر شده است. اما بایستی توجه داشت که این قطعه ژنی دارای طولی بلند (570-630bp) در میان گونه‌های آسپرژیلوس است که آن را برای استفاده در روش SSCP نامناسب می‌سازد چرا که در این روش نیاز به استفاده از قطعات کوتاه (100-300bp) جهت تهیه تک رشته‌ها (single stranded DNA) وجود دارد. به‌همین دلیل ما قطعه کوچک ITS2 (در حدود 250-300 bp) را جهت تکثیر با PCR انتخاب کردیم. نتیجه این تکثیر چنان‌که در تصویر گرفته شده از ژل الکتروفورز افقی مشاهده می‌شود (شکل ۱) حاکی از یک همسانی بین طول باندهای تشکیل شده محصول PCR قطعه کوچک ITS2 در گونه‌های مختلف آسپرژیلوس می‌باشد. لذا تنها با PCR ناحیه انتخابی قادر به افتراق گونه‌ها نیستیم. گرچه Melchers (۱۴) با کاربرد یک پرایمر عمومی برای تقویت ژن‌های کد کننده ITS-r RNA موفق به شناسایی گونه‌هایی از جنس آسپرژیلوس شد، اما در مطالعه اخیر الگوی افتراقی مشخصی که شامل باندهای کاملا مشخص و متنوع باشد توصیف نگشته است.

[1] Small Subunit ribosomal DNA
[2] Large Subunit ribosomal DNA

روش SSCP قبلاً برای افتراق سایر میکروارگانیزم‌ها مورد استفاده قرار گرفته و نتایج متفاوتی به‌لحاظ ارزش کاربرد در بر داشته است، به‌طور مثال، در ارتباط با گونه‌های باکتریال استرپتوکوک بکارگیری این روش در افتراق بین گونه‌ای نتیجه‌ای در بر نداشت و عدم موفقیت روش به‌دلیل انتخاب ناحیه ژنی کامل ITS که توده مولکولی بزرگی را تشکیل می‌دهد ذکر گردیده است (۱۵). همان‌طور که قبلا توضیح داده شد انتخاب ناحیه کوچک ITS2 در مطالعه حاضر این مشکل را تا حدود زیادی مرتفع نموده است. از طرفی در مطالعه‌ای دیگر، سه ناحیه کوچک در داخل منطقه ژنی 16S ژن rDNA مربوط به باکتری‌های دیگر مورد مطالعه قرار گرفت که نتیجه مطلوبی شامل ۴۷ الگوی افتراقی را در بر داشته است (۱۶). PCR-SSCP با کاربرد ژن rDNA قبلا در مورد قارچ‌های دیگر از جمله اکومایکوریزال‌ها (۱۷)، فیتوفتوراها (۱۸) و برخی قارچ‌های فرصت طلب بیماری‌زا (۱۹) از جمله آسپرژلیوس‌های گروه فلاوی مورد استفاده قرار گرفته است. در مورد اخیر ناحیه ژنی انتخابی با عنوان قطعه 197bp از منطقه ژنی 18S-rDNA معرفی شده است و با کاربرد این روش یک الگوی افتراقی برای سه گونه آسپرژیلوس: A. fumigatus, A. flavus, A. niger گزارش شده است. در مطالعه ما کاربرد ناحیه ژنی ITS2 در داخل منطقه ژنی rDNA که در گونه‌های مختلف سایزی حدود 250-300 bp داراست، ما را قادر ساخت تا افتراق بین سه گروه از آسپرژیلوس‌ها شامل هشت گونه مختلف را فراهم سازیم.

در این روش، با دناتوره کردن DNA تکثیر یافته در مرحله گرمادهی، رشته‌های تک DNA ایجاد می‌شوند و با توجه به ناپایدار بودن پیوندهای گسسته، تمایل زیادی به اتصال‌های درون رشته‌ای و حتی چسبیدن مجدد آن‌ها وجود دارد. در بهترین شرایط از نظر تامین سرمای ۴-۰ درجه سانتی‌گراد، از بهم پیوستن دو رشته تا حدود زیادی ممانعت شده پیوندهای درون رشته‌ای منجر به تولید اشکال فضایی می‌گردد. با توجه به اندازه بزرگ اشکال کانفورماسیونی، در منافذ ژل الکتروفورز، بدام افتاده و حرکت طبیعی آن‌ها براساس وزن به‌سمت پایین ژل صورت نمی‌گیرد بلکه بسته به حجم و شکل فضایی (conformational figures) تک رشته‌های DNA تشکیل باند می‌دهند. در واقع تک رشته‌های DNA در ژل به‌صورت باندهای سنگین مشاهده می‌گردند هرچند که این سنگینی باند کاذب است و مربوط به اشکال بدام افتاده در ژل می‌باشد. به‌طور کلی در الکتروفورز محصولات تکثیر یافته، بر روی ژل پلی اکریل آمید (PAGE) هم باندهای دو رشته‌ای مربوط به دو رشته‌های مجددا به‌هم پیوسته و هم باندهای مربوط به تک رشته‌ها که معمولاً سنگین‌تر از باندهای دو رشته‌ای هستند، قابل تشخیص هستند.

در مطالعه ما روش الکتروفورزی PAGE با رنگ‌آمیزی ژل از نوع silver nitrate برای تک رشته‌های ایجاد شده متاسفانه به‌دلیل ازدیاد باندهای غیراختصاصی و دو رشته‌ای از قابلیت کمی در افتراق لازم بین باندها برخوردار بود (شکل ۲). در واقع رنگ‌آمیزی نیترات نقره برای نمایان ساختن باندهای DNA روشی فوق‌العاده حساس باشد و به‌همین دلیل تعداد فراوان باندهای ایجاد شده مانع تشخیص دقیق باندهای اصلی تک رشته‌های DNA گردد. در عین حال روش اتیدیوم بروماید برای پس رنگ آمیزی post staining ژل ران شده با ترکیب روش تغییر یافته تهیه ژل نتایج بهتری را عاید نمود.

نتایج ما از روش تغییر یافته الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریل آمید تغییر یافته با عنوان PAGE گرادیان که از یک ژل با غلظت‌های متوالی ۱۲-۶ درصد بهره می‌برد، حاکی از این است که سیستم مذکور قادر به شناسایی هشت گونه از شایع‌ترین آسپرژیلوس‌های بیماری‌زای انسان در پنج الگوی مختلف می‌باشد. این الگوها شامل تفکیک گونه‌های آسپرژیلوس نیدولانس، آسپرژیلوس فیشری، آسپرژیلوس کوادرسینکتا، (آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس نایجر) در یک گروه، (آسپرژیلوس فلاوس، آسپرژیلوس ترئوس، آسپرژیلوس اوکراسئوس) می‌گردد(شکل ۳). با توجه به محدودیت گونه‌های مورد بررسی در این مطالعه به‌طور قطع نمی‌توان در مورد قدرت شناسایی روش برای سایر گونه‌های آسپرژیلوس بیماری‌زا قضاوت نمود اما می‌توان گفت که این فن قادر است گونه‌های بیماری‌زای شایع آسپرژیلوس را در گروه‌های چندتایی تفکیک نماید. بعلاوه، روش مولکولی SSCP قادر است گونه‌های آسپرژیلوس بیماری‌زا را در مدت زمانی حدود ۳۶-۴۸ ساعت شناسایی نماید. بنابراین SSCP به‌عنوان یک روش برتر از نظر سرعت و سهولت برای شناسایی حداقل مهم‌ترین گونه‌های آسپرژیلوس بیماری‌زای انسان نسبت به روش کلاسیک شناسایی آسپرژیلوس‌ها یا روش مورفولوژیک که شناسایی تعداد زیادی از گونه‌های آسپرژیلوس را در مدت زمانی حدود ۷-۱۰ روز امکان پذیر سازد مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر

از پروفسور کویچی ماکیمورا، از دانشگاه تیکیو(Teikyu) ژاپن، به‌خاطر رهنمودها و در اختیار گذاشتن سویه‌های استاندارد آسپرژیلوسی کمال تشکر را داریم. و با قدردانی از زحمات آقای نوروزی‌نژاد و خانم‌ها: امیدی و حسین‌پور که در تهیه سویه‌های بالینی آسپرژیلوس مارا یاری نمودند، قابل ذکر است که این مطالعه بخشی از طرح پژوهشی مصوب در معاونت پژوهشی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران بوده است.

References:

1. Pryce TM, Palladino S, Price DM, Gardam DJ, Murray RJ. Rapid identification of fungal pathogens in BacT/Alert, BacTec and BBL MGIT media using polymerase chain reaction and DNA sequencing of the internal transcribed spacer regions. J Diag Microbiol Infec 2006; 54(4):289-97.
2. Healy M, Reece K, Walton D, Kontoianis DP. Identification to the species level and differentiation between strains of Aspergillus clinical isolates by automated repetitive-sequence-based PCR. J Clin Microbiol 2004; 42(9):4016-24.
3. de Aguirre L, Hurst SF, Choi JS. Rapid differentiation of Aspergillus species from other medically important opportunistic molds and yeasts by PCR-Enzyme Immunoassay. J Clin Microbiol 2004, 42(8):3495-504.
4. Zhao J, Kong F, Li R, Wang D. Identification of Aspergillus fumigatus and isolated species and related species by Nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer region. J Clin Microbiol 2001, 39(6):2281-6.
5. Yuko K, Tsutomu A. Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified Ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of Aspergillus section Flavi. J Appl Environ Microbiol 1996; 62: 2947-52.
6. Martinez-Culebras PV, Ramon D. An ITS-RFLP method to identify black Aspergillus isolates responsible for contamination in grapes and wine. Int J Food Microbiol 2007; 113: 147-53.
7. Leichti-Gallati S, Schneider V. Two buffer PAGE system- based SSCP/HD analysis: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis and other human

genetic disease. J Europ Human Genetics 1999; 7: 590-98.

8. Diego M, Giovanni R, Guglielmetti S, Daffonchio D. 16S–23S rRNA intergenic spacer region sequence variation in Streptococcus thermophilus and related dairy streptococci and development of a multiplex ITS-SSCP analysis for their identification. J Microbiol 2003; 149: 807–13.
9. Widjojoatmdjo MN, Fluit AD. Molecular identification of bacteria by fluorescence- based PCR- single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. J Clin Microbiol 1995; 33(10): 601-6.
10. Hortal S, Pera J, Galipiennso L. Molecular identification of the edible ectomycorrhizal fungus Lactarius delicious the symbiotic and extra radical mycelium stages. J Biotechnol 2006; 126 (2): 123-34.
11. Kong P, Hong CX, Tooley PW, Ivors K. Rapid identification of Phytophtora ramorum using PCR- SSCP analysis of ribosomal DNA ITS-1. J Lett Appl Microbiol 2004; 38(5): 433-9.
12. Klich M. Identification of common Aspergillus species. Utrecht, The Netherlands, Centraalbureeu voor Schmmelcultures; 2002.
13. Mirhendi H, Diba K, Kodbacheh P, Jalalizand N. Identification of pathogenic Aspergillus species by a PCR-restriction enzyme method. J Med Microbiol 2006; 56: 1568-70.
14. Meletiadis J, Melchers WJ, Meis JF, Van Den Hurk P, Jannes G, Verweij PE. Evaluation of a polymerase chain reaction reverse hybridization line probe assay for the detection and identification of medically important fungi in bronchoalveolar lavage fluids. Med Mycol 2003; (41):65–74.
15. Diego M, Giovanni R, Guglielmetti S, Daffonchio D. 16S–23S rRNA intergenic spacer region sequence variation in Streptococcus thermophilus and related dairy streptococci and development of a multiplex ITS-SSCP analysis for their identification. J Microbiol 2003, 149: 807–13.
16. Myra NW, Fluit AD. Molecular identification of bacteria by fluorescence-based PCR-single–strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. J Clin Microbiol 1995;33: 2601- 6.
17. Hortal S, Pera J, Galipiennso L. Molecular identification of the edible ectomycorrhizal fungus Lactarius delicious the symbiotic and extra radical mycelium stages. J Biotechnol 2006;126(2): 123-34.
18. Kong P, Hong CX, Tooley PW, Ivors K. Rapid identification of Phytophtora ramorum using PCR- SSCP analysis of ribosomal DNA ITS-1. J Lett Appl Microbiol 2004; 38(5): 433-9.
19. Walsh T, Francesconi A, Kasai M. PCR and single strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. J Clin Microbiol 1995, 2; 3216-20.