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

روش PCR-restriction enzyme مبتنی بر پلی مورفیسم DNA ریبوزومی برای شناسایی مهم ترین گونه های درماتوفیت در ایران

دکتر سیدحسین میرهندی[۱]، دکتر محمدتقی هدایتی[۲]، خوشقدم امیدی[۳]، نیلوفرجلالی زند[۳]، مجتبی دیده دار[۴]، پروانه افشار[۴]

۱-استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۲-استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۳- کارشناس آزمایشگاه، ۴- کارشناس ارشد آزمایشگاه

زمینه و هدف : درماتوفیتوز (کچلی) عفونت پوست، مو یا ناخن است که وسیله قارچ‌های کراتین دوست متنوعی موسوم به درماتوفیت‌ها ایجاد می شود. کچلی‌ها، در سرتاسر جهان عفونت‌های شایعی هستند و در تمام نواحی ایران نیز شیوع دارند. روش‌های آزمایشگاهی معمول برای تعیین هویت درماتوفیت‌های مختلف زمان بر است و به قدر کافی دقیق و اختصاصی نیست و لذا یافتن روش‌های معتبرتر و سریع‌تری ضروری است.

روش اجرا : از بیماران مبتلا به کچلی پوست، مو یا ناخن قارچ‌های درماتوفیتی جداسازی و با توجه به خصوصیت‌های میکروسکوپیک و ماکروسکوپیک کلنی‌ها مورد شناسایی قرار گرفتند. DNA ژنومی قارچ‌ها با روش conical grinder استخراج و تخلیص شد. آن گاه ناحیه ITS1-5.8s-ITS2 مربوط به DNA درماتوفیت‌ها با استفاده از پرایمرهای همگانی قارچ‌ها موسوم به ITS1 و ITS4 و به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) تقویت و تکثیر و سپس به کمک آنزیم EcoRII مورد هضم اندونوکلئازی قرار گرفت.

یافته ها : پس از الکتروفورز، محصول های PCR در هر کدام از ایزوله‌ها یک باند به اندازه حدود ۷۵۰-۶۵۰ جفت باز مشاهده شد. الگوی الکتروفورتیک حاصل از هضم اندونوکلئازی محصول های PCR با آنزیم EcoRII ، شناسایی و افتراق درماتوفیت‌های بیماری‌زای شایع شامل تریکوفیتون روبروم، اینتردیجیتال، منتاگروفیتس، تونسورانس، ویولاسئوم، وروکوزوم، شوئن لاینی، میکروسپوروم کانیس، ژیپسئوم و اپیدرموفیتون فلوکوزوم را امکان‌پذیر کرد.

نتیجه گیری : به نظر می‌رسد که این پروفیل PCR-RE، برای افتراق درماتوفیت‌های مهم ابزاری سریع و معتبر باشد و به‌تواند در آزمایشگاه‌های مرجع قارچ‌شناسی برای اهداف تشخیصی و نیز مطالعه های اپیدمیولوژیک در مقیاس وسیع به کار رود.

واژه های کلیدی : درماتوفیت، شناسایی، PCR-restriction enzyme ، EcoRII

وصول مقاله : ۸۵/۱۰/۱۳ پذیرش: ۸۵/۱۲/۳ فصلنامه بیماری های پوست پاییز ۱۳۸۶؛ دوره ۱۰(۳): ۲۱۹-۲۲۸

مقدمه

درماتوفیت‌ها، گروهی از قارچ‌های رشته‌ای (کپکی) هستند که در بافت‌های کراتین‌دار (شاخی) پوست، مو و ناخن انسان و بسیاری از جانوران مستقر می شوند و با ترشح آنزیم‌های پروتئولیتیک (مثل کراتیناز)، از کراتین، به عنوان منبع تغذیه استفاده می کنند. آن‌ها با تولید آنتی‌ژن‌هایی نظیر الاستاز، پاسخ-های التهابی میزبان را برانگیخته و بسته به میزان واکنش میزبان، ویرولانس گونه یا Strain عامل، محل آناتومیکی درگیری و

مؤلف مسوول : دکتر سیدحسین میرهندی -گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
پست الکترونیک : mirhendi@tums.ac.ir

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

عوامل محیطی و موضعی محل درگیری، بیماری‌های متنوعی را ایجاد می‌کنند(۱). درماتوفیت‌ها در پوست و موی سر و صورت، کچلی سر و صورت، در پوست بدون موی بدن، کچلی بدن، کچلی کشاله ران، کچلی پا و کچلی دست و در ناخن‌های پا و دست، کچلی ناخن ایجاد می کنند. گاهی نیز درماتوفیت‌ها از سطح اپیدرم فراتر می روند و نواحی عمیق‌تر زنده، یعنی درم را گرفتار می کنند و مشخصه هایی نظیر کچلی عمیق، کریون، گرانولوما را به بار می‌آورد. درماتوفیتوزها (کچلی‌ها) بیماری‌های شایعی را در همه جای جهان، حتی کشورهای توسعه یافته ایجاد می کند در ایران نیز کچلی مو، پوست و ناخن از جمله عفونت-های شایع در درماتولوژی هستند(۲).

درماتوفیت‌ها، متشکل از حدود ۴۰ گونه هستند و مجموعاً در ۳ جنس ترایکوفیتون، میکروسپوروم و اپیدرموفیتون جای می گیرند. جایگاه طبیعی زندگی بعضی از درماتوفیت‌ها خاک است (خاک دوست‌ها) بعضی پارازیت‌های اجباری جانوران (حیوان دوست‌ها) و بعضی نیز پارازیت‌های بافت‌های شاخی انسان است (انسان دوست‌ها) و از فردی به فرد دیگر سرایت می کنند.

شناسایی درماتوفیت‌ها تا سطح گونه، از نقطه نظر تشخیص آزمایشگاهی و برای درمان هر چه به‌تر و مؤثرتر بیماری، از لحاظ اپیدمیولوژیک و اکولوژیک به منظور درک راه‌های انتشار و سرایت بیماری و آن گاه قطع زنجیره‌های انتقال و پیش‌گیری از بیماری و نیز شناسایی عوامل درماتوفیتی بومی هر منطقه و بالاخره ازنقطه نظر زیست‌شناسی‌وتاکسونومی حایز اهمیت است.

روش‌های سنتی شناسایی گونه‌های درماتوفیتی بر اساس ویژگی‌های مرفولوژیک ماکروسکوپیک (خصوصیت پشت و روی کلنی از لحاظ رنگ، شکل، بافت، توپوگرافی و غیره) و میکروسکوپیک (ویژگی های رشته‌ها و عناصر زایشی درماتوفیت‌ها به خصوص اندازه، شکل و نحوه ی آرایش کونیدی ها) در نمونه‌های برداشت شده از کلنی‌ها استوار بوده است. علاوه بر آن بررسی خصوصیت‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک مانند بررسی وجود اوره آز، نیازمندی‌های تغذیه‌ای، رشد روی دانه‌های برنج، توانایی سوراخ کردن مو در آزمایشگاه، بررسی تحمل حرارتی، استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی نظیر Cerael Pablum، Oatmeal agar، Rice grain agar، Christensen's urea agar، Lactritmel agar، Littman oxgall agar، Peptone agar یک درصد، Sabouraud's dextrose agar with NaCl ۵ درصد، Niger seed medium 8، محیط‌های هفت گانه افتراق ترایکوفیتون‌ها، BCP-milk solids-glucose agar و بالاخره مطالعه‌های مربوط به تولیدمثل جنسی درماتوفیت‌ها برای شناسایی گونه‌ها به کار می رفته است(۳). روش‌های مزبور به‌رغم ارزش قابل توجه شان، عموماً وقت گیر و هزینه بر و اصولاً مستلزم کادر قارچ شناسی متبحر هستند. ضمن این که این روش‌ها بسیار متنوع و مختلف و گاهی غیردقیق است و نهایتاً درصد قابل توجهی از ایزوله‌های درماتوفیتی با هویت مبهم ومشکوک باقی خواهد ماند.

در سال‌های اخیر توجه محققان روی روش‌های مبتنی بر اختلاف‌ها و تشابه های مولکول‌های خاصی از DNA قارچ‌ها معطوف شده است(۸-۴). در این روش‌ها تفاوت‌های پایدار و اختصاصی موجود در توالی قطعات DNA مندرج در ژن‌های قارچ‌ها و از جمله درماتوفیت‌ها به طور مستقیم و غیرمستقیم مورد سنجش و آنالیز قرار گرفته و به این ترتیب ارگانیسم مورد نظر تا سطح گونه و حتی زیرگونه شناسایی می شود. دست یابی بشر به تکنولوژی قطعات DNA مورد نظر در لوله آزمایش از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، اهمیت و ارزش روش‌های مولکولی را بیش‌تر کرده است.

در این تحقیق با مطالعه و آنالیز کامپیوتری قطعات ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1)، ITS2 و قطعه ژنی 5.8s موجود در ژن مسوول کد کردن RNA ریبوزومی (ژن

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

موسوم به rDNA) و آن گاه درک نواحی مشابه و متفاوت این قطعه، به تکثیر آن از طریق PCR تنها با یک جفت پرایمر اقدام شده و آن گاه با استفاده از تنها یک آنزیم با اثر محدود و با توجه به الگوی حاصل از پلیمرفیسم حاصل از تأثیر آنزیم‌های محدودالاثر (restriction enzymes) و بررسی وزن قطعات حاصله با استفاده از الکتروفورز، به شناسایی و افتراق آن دسته از درماتوفیت‌ها اقدام شده است که در ایران و جهان شایع هستند. به نظر می‌رسد که معرفی این روش و استفاده از آن در شناسایی درماتوفیت‌های عامل کچلی‌ها که برای اولین بار در ایران صورت گرفت، راه را برای بررسی‌های هر چه دقیق‌تر و فراگیرتر مرتبط با انتشار و اپیدمیولوژی آن‌ها در ایران هموارتر کند.

روش اجرا

این مطالعه با توصیف خواص مرفولوژیک درماتوفیت‌ها و تحلیل داده‌های کامپیوتری اسیدهای نوکلئیک آن‌ها به منظور راه‌اندازی روشی معتبر برای شناسایی آن‌ها، به اجرا درآمده است. لذا این مطالعه مطالعه ای توصیفی - تحلیلی است.

درماتوفیت‌های مورد مطالعه : قارچ‌های درماتوفیتی شامل ترایکوفیتون‌های روبروم (T. rubrum)، منتاگروفیتس (T. mentagrophytes)، اینتردیجیتال (T. interdigital)، تونسورانس (T. tonsurans)، ویولاسئوم (T. violaceium)، وروکوزوم (T. verrucosum)، شوئن لاینی (T. schoenleinii)، میکروسپوروم‌های کانیس (T. canis) و ژیپسئوم (M. gypseum) و اپیدرموفیتون فلوکوزوم (E. floccosum)، از کشت نمونه‌های گرفته شده از بیماران مبتلا به کچلی‌های پوست، مو و ناخن مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی دانشگاه‌های علوم پزشکی مازندران و تهران جدا شد. این قارچ‌ها با توجه به مرفولوژی میکروسکوپی و ماکروسکوپی کلنی‌ها و در صورت لزوم استفاده از تست‌های بیوشیمیایی یا فیزیولوژیک از جمله تست اوره آز مورد شناسایی قرار گرفتند. درماتوفیت‌های مورد مطالعه روی محیط گلوکز(۲درصد)، پپتون (۱درصد)، آگار(۱/۵درصد) حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سیکلوهگزامید پاساژ داده شد و میسلیوم‌های حاصله برداشت و به تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و تا موقع لزوم برای استخراج DNA در فریزر ۲۰- نگه داری شد.

آنالیز کامپیوتری توالی نوکلئوتیدهای هدف: توالی نوکلئوتیدهای مولکول‌های DNA مربوط به ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 واقع در ژن DNA ریبوزومی، متعلق به Strain های متعددی از درماتوفیت‌ها، موجود در بانک ژن (GenBank) قابل دسترسی در شبکه اینترنت (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/)، با استفاده از نرم‌افزارهای DNASIS و Genetyx از حیث نواحی کاملاً مشابه، نواحی نسبتاً مشابه و نواحی متفاوت مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند. گونه‌های مورد مطالعه و شماره دسترسی اینترنتی مرتبط با استرین‌های مربوط به هر کدام از گونه‌ها در جدول شماره ۱ درج شده است.

از قسمت‌های محافظت شده (Conserved) و مشترک بین درماتوفیت‌های مورد مطالعه یک جفت پرایمر یونیورسال درماتوفیتی با سکانس ITS1-5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' به عنوان پرایمر رفت و ITS4-5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3' به عنوان پرایمر برگشت انتخاب شد.

با مطالعه دقیق نواحی متفاوت (Variable) در گونه‌های مختلف درماتوفیتی و با استفاده از نرم افزارهای فوق‌الذکر حدود ۶۰۰ آنزیم با اثر محدود (Restriction enzyme) مورد آزمون کامپیوتری قرار گرفت و نهایتاً آنزیم EcoRII به عنوان آنزیم مناسب برای افتراق گونه‌ها انتخاب شد. محل برش این آنزیم CCWGG است.

جدول شماره ۱- شماره‌های دسترسی (Accession numbers) بانک ژن (GenBank) مربوط به توالی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 درماتوفیت‌های مختلف، استفاده شده در این تحقیق

گونه درماتوفیت	شماره‌های دسترسی مورد استفاده
ترایکوفیتون روبروم	AJ853746, AM049995, AB194245, Z97993, U18352, AJ270808, AJ270807
ترایکوفیتون منتاگروفیتس	AJ876479, AJ876478, Z98001, Z98000, Z97999, Z97998, Z97997, Z97996, AJ876479, AJ876478, Z97995, Z97994
ترایکوفیتون تونسورنس	AJ853747, AB214318, AB166667, AB166665, AB166664, AB66663, AB094675, AB094674, AB094659, AB094658, Z98008, Z98007, Z98006, Z98005
ترایکوفیتون وروکوزوم	Z98002, Z98003, Z98004, AB058851
ترایکوفیتون ویولاسئوم	AB194246, AM049998, AJ270811
ترایکوفیتون شوئن لاینی	AJ853757, Z98010, Z98011
میکروسپوروم کانیس	AB193649, AB193632, AB193630, AB193612, AB193611, AB193610, AJ000619, AJ000618, AJ000617
میکروسپوروم ژیپسئوم	AJ970150, AJ970141, AJ853774, AB193675, AB193671
اپیدرموفیتون فلوکوزوم	AJ853758,AJ000629

استخراج DNA: حدود ۲۰-۱۰ میکرولیتر از میسلیوم‌های برداشت شده از هر کدام از کلنی‌های درماتوفیت‌های مورد مطالعه به تیوب ۱/۵ میلی لیتری اپندرف منتقل و ۳۵۰ میکرولیتر بافر لیز (ده میلی مولار Tris، یک میلی مولار EDTA[pH=8] ، صد میلی مولار NaCl ، دو درصد تریتون X-100 و یک درصد SDS) به آن اضافه شد. نمونه با استفاده از دستگاه خردکننده مخروطی (IEDA Japan ، Conical grinder) طی حدود یک دقیقه خرد و پس از سانتریفوژ در دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، مایع رویی به تیوب جدید منتقل و حجم مساوی از مخلوط فنل-کلروفرم (۱:۱) به آن افزوده شد. پس از ورتکس و سانتریفوژ، مایع رویی با استفاده از کلروفرم مجدداً استخراج و فاز آبی رویی به تیوب جدید منتقل و حجم مساوی از ایزوپروپانول و یک دهم حجم استات سدیم ۳ مولار (pH=5.2) به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ده دقیقه در ۲۰- درجه سانتی گراد انکوبه و آن گاه در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد، رسوب حاصله با الکل ۷۰ درجه شست و شو یافت و رسوب نهایی در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه حل گردیده و تا زمان لازم در فریزر ۲۰- نگه داری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): یک میکرولیتر DNA استخراج شده از درماتوفیت‌ها، ۲۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرها، ۱۰ میکرومولار از هر کدام از نوکلئوتیدهای A،T،G و C، ۱/۲۵ واحد Taq DNA Polymerase و ۵ میکرولیتر بافر PCR به حجم لازم از آب مقطر تا رسیدن به حجم نهایی واکنش به ۵۰ میکرولیتر اضافه و مخلوط شد و در دستگاه ترمال سیکلر مدل Corbett Research (ساخت استرالیا) قرار داده شد. برنامه حرارتی PCR عبارت بود از: ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه یک سیکل، ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، در سی سیکل و نهایتاً ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه. در صورت لزوم محصول های PCR در فریزر یا یخچال نگه داری می‌گردید.

هضم اندونوکلئازی محصول های PCR: ده میکرولیتر ازمحصول PCR با ۱/۵ میکرولیتر بافر مربوط، ۵ واحد آنزیم EcoRII و حجم لازم از آب مقطر تا رسیدن به حجم واکنش

نهایی به ۱۵ میکرولیتر در یک تیوب ۲۰۰ میکرولیتری مخلوط و به مدت ۲ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

الکتروفورز: به منظور قابل رؤیت کردن مولکول‌های DNA هر کدام از محصول های استخراج DNA، PCR و هضم اندونوکلئازی، روی ژل آگارز (نمونه‌های مربوط به استخراج در ژل ۱درصد، نمونه‌های PCR در ژل ۱/۵ درصد و نمونه‌های RE در ژل ۲ درصد) به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه و با برقراری اختلاف پتانسیل معادل ۱۰۰ ولت الکتروفورز شد. ژل آگارز در محلول اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر) به مدت ده دقیقه غوطه‌ور شد و پس از دوبار شست و شو با آب مقطر باندهای DNA با استفاده از ترانس ایلومیناتور مدل Uvitec مورد معاینه و در صورت لزوم با استفاده از Uvidoc مورد عکس برداری دیجیتالی قرار می گرفت.

یافته ها

آنالیز توالی‌های نوکلئوتیدی گونه‌های درماتوفیتی: تمام گونه‌های درماتوفیتی در ابتدای سکانس (که به ناحیه محافظت شده 18S متعلق است)، در انتهای سکانس (که به ناحیه محافظت شده 28S متعلق است) و در اواسط سکانس (که به ناحیه ژنی 5.8S متعلق است) تقریباً مشابه بوده و در گونه‌های مختلف اختلاف ناچیزی دیده شد، ولی در نواحی غیرکد دهی ITS1 و ITS2 با وجود تشابه زیاد، تعداد قابل توجهی از بازهای آلی در گونه‌های مختلف متفاوت است و به عبارت دیگر نوع قابل ملاحظه‌ای دیده می‌شود. همین اختلاف ها برای انتخاب آنزیم مناسب کافی به نظر رسید.

طراحی PCR-RE مناسب، برای افتراق درماتوفیت‌ها: تمامی توالی‌ها مربوط به هر کدام از گونه‌های درماتوفیت‌ها به طور مجازی (دیجیتالی) مورد هضم اندونوکلئازی تک تک آنزیم‌های محدودالاثر (Restriction enzymes) قرار گرفت. بسیاری از آنزیم‌ها در همه یا بعضی از درماتوفیت‌ها هیچ محل برشی نداشتند. بسیاری از آنزیم‌ها نیز گرچه در آن‌ها محل های برش زیادی داشتند ولی این محل‌ها در درماتوفیت های مختلف آن قدر متفاوت نبود که برای افتراق آن‌ها کمک کننده باشد. تنها تعداد معدودی از آنزیم‌ها از لحاظ محل برش (Cutting Site) در نواحی ITS1 و ITS2 آن قدر متنوع بودند که بتوان از آن‌ها برای افتراق و شناسایی درماتوفیت سود جست. از بین همه ی آنزیم‌ها، نهایتاً آنزیم EcoRII برای این منظور برگزیده شد.

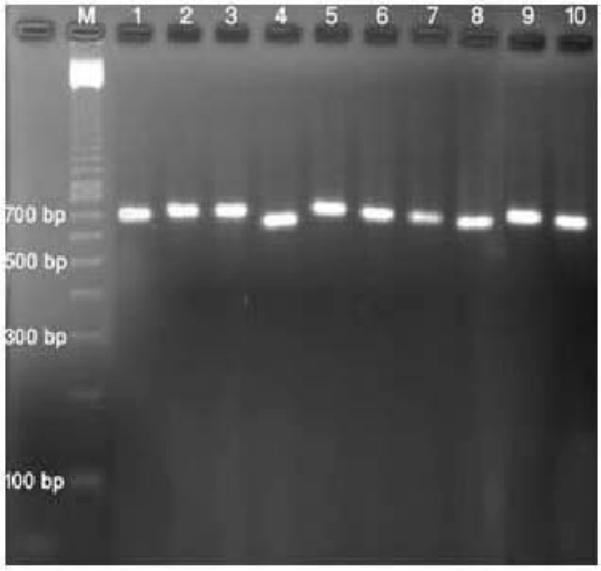
جدول شماره ۲، طول قطعات مربوط به قطعه ITS1-5.8S-ITS2 مرتبط با هر کدام از گونه‌های مهم درماتوفیتی که با توجه به پرایمر مورد نظر انتخاب شده‌اند و نیز قطعات حاصل از هضم اندونوکلئازی پس از استفاده از آنزیم EcoRII در مورد هر کدام از گونه‌ها را نشان می‌دهد. چنان چه ملاحظه می‌شود ناحیه ITS در تمام درماتوفیت‌های مورد مطالعه دارای وزن مولکولی تقریباً یکسان (بین ۶۷۰ تا ۷۵۸ جفت باز) است، ولی پس از برش با آنزیم EcoRII، برحسب محل برش آنزیم، قطعات متفاوتی به دست می‌آید. این تفاوت‌های طولی مولکول ها مبنای افتراق گونه‌ها با روش PCR-RE است.

تصویر شماره ۱، الکتروفورز محصول های PCR مربوط به گونه های شایع درماتوفیت‌های پاتوژن را نشان می‌دهد. چنان چه ملاحظه می‌شود اندازه قطعات در حدود ۷۰۰ جفت باز است و با آن چه که از آنالیز کامپیوتری سکانس‌های مندرج در GenBank به دست آمد (جدول شماره ۲) کاملاً تطابق دارد.

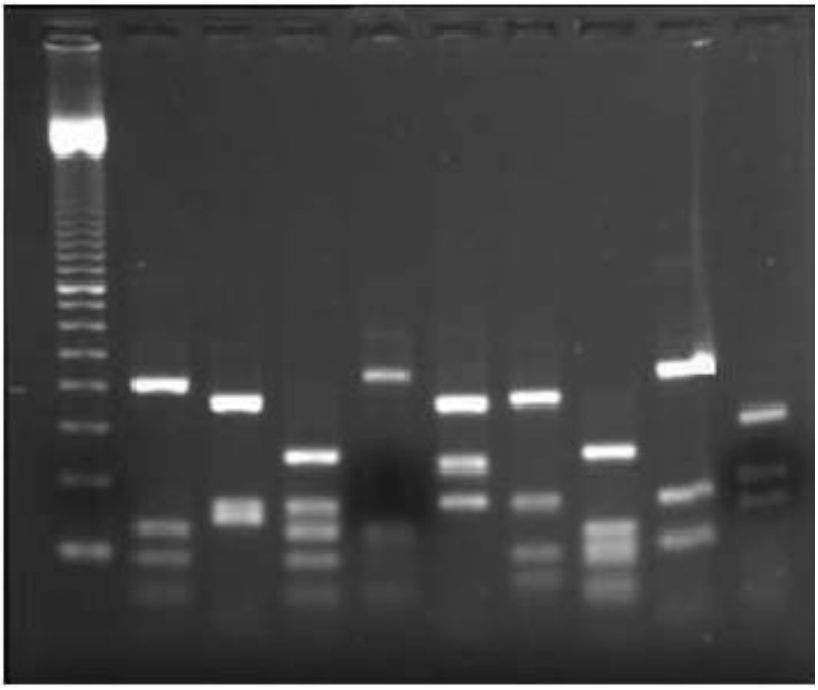
تصویر شماره ۲، الکتروفورز محصول های DNA مربوط به گونه‌های شایع درماتوفیت‌ها پس از هضم محصول های با آنزیم اندونوکلئازی EcoRII را نشان می‌دهد. چنان چه مشاهده می شود، اندازه ی باندها و شکل کلی و الگوی هر کدام از گونه‌ها طوری است که با کمی دقت و با در نظر داشتن اندازه دقیق قطعات (جدول شماره ۲) می‌توان گونه درماتوفیت را باز شناخت. الگوی PCR-RE در مورد گونه‌ی تریکوفیتون روبروم و تریکوفیتون ویولاسئوم بسیار شبیه به یکدیگر است و بایستی برای افتراق آن‌ها دقت کرد.

جدول شماره ۲- اندازه قطعات DNAی مربوط به ناحیه ITS هر کدام از گونه‌های درماتوفیتی با پرایمرهای ITS1 و ITS2 قبل و بعد از هضم اندونوکلئازی با آنزیم محدودالاثر EcoRII. همان طور که ملاحظه می‌شود ترایکوفیتون منتاگروفیتس دارای ٦ الگو و میکروسپوروم کانیس دارای ۲ الگوی RE متفاوت می‌باشد.

گونه درماتوفیت	اندازه مولکول بر حسب جفت باز	اندازه محصولات پس از برش با آنزیم بر حسب جفت باز
ترایکوفیتون روبروم	۶۹۲	۱۶۴،۳۶۸،۶۵،۹۵
ترایکوفیتون منتاگروفیتس	۶۲۶	۱۸۲،۲۴۷،۱۲۴،۵۰،۱۴،۹
	۷۰۷	۴۲۸،۱۲۴،۵۰،۱۰۵
	۷۰۵	۱۸۰،۲۴۷،۱۲۴،۵۰،۱۰۴
	۷۰۰	۱۷۹،۳۶۰،۲۰،۱۴۱
	۷۰۵	۴۲۸،۱۲۴،۵۰،۱۰۳
	۷۱۴	۵۵۴،۲۰،۴۵،۹۵
ترایکوفیتون تونسورنس	۶۸۳	۵۳،۱۰۲،۲۵۱،۱۲۴،۵۰،۱۰۳
ترایکوفیتون ویولاسئوم	۶۷۰	۱۶۴،۳۶۸،۲۰،۴۵،۷۳
ترایکوفیتون شوئن لاینی	۶۸۵	۴۰۶،۱۲۴،۵۲،۱۰۳
ترایکوفیتون وروکوزوم	۶۷۶	۵۱۷،۲۰،۱۳۹
اپیدرموفیتون فلوکوزوم	۷۵۸	۲۰۹،۳۶۱،۲۰،۱۶۸
میکروسپوروم ژیپسئوم	۶۶۶	۱۷۹،۲۸۹،۳۳،۱۹،۱۴۶
میکروسپوروم کانیس	۷۳۷	۴۴۱،۱۶۵،۱۳۱ ۴۴۱،۱۶۵،۲۸،۱۰۳



تصویر شماره ۱- الکتروفورز محصول های PCR حاصل از تکثیر مولکول‌های ناحیه ITS در rDNA ی درماتوفیت‌های شایع با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 روی آگارز ۱/۵ درصد. نمونه‌های ۱۰-۱ به ترتیب عبارتند از : تریکوفیتون اینتردیجیتال تریکوفیتون. منتاگروفیتس، میکروسپوروم کانیس، اپیدرموفیتون فلوکوزوم، تریکوفیتون وروکوزوم، تریکوفیتون روبروم، تریکوفیتون تونسورانس، میکروسپوروم ژیپسئوم، تریکوفیتون ویولاسئوم و تریکوفیتون شوئن لاینی، نمونه M مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی



تصویر شماره ۲- الکتروفورز محصول های PCR قطعه ITS گونه‌های شایع درماتوفیت‌ها روی آگارز ۲ درصد پس از هضم محصولات با آنزیم EcoRII ، نمونه‌های ۱۰-۱ از چپ به راست به ترتیب عبارتند از: مارکرمولکولی ۱۰۰ جفت بازی، تریکوفیتون منتاگروفیتس واریته منتاگروفیتس، تریکوفیتون منتاگروفیتس واریته اینتردیجیتال، تریکوفیتون منتاگروفیتس واریته دیگر، تریکوفیتون شوئن لاینی، اپیدرموفیتون فلوکوزوم، تریکوفیتون روبروم، تریکوفیتون تونسورانس، میکروسپوروم کانیس و میکروسپوروم ژیپسئوم

بحث

شناسایی، طبقه بندی و تاکسونومی سنتی درماتوفیت‌ها بر اساس مرفولوژی آن‌ها است و هم چون سایر کپک‌ها و خلاف مخمرها، فیزیولوژی و تغذیه، در این خصوص نقش چندانی نداشته است. پس از ابداع تکنولوژی PCR مطالعه‌های متعددی برای افتراق درماتوفیت‌ها با استفاده از این تکنیک اجرا شد. استفاده از پرایمرهای تصادفی در روش RAPD-PCR از جمله قدیمی‌ترین این روی کردها است(۱۰و۹). Liu و همکاران وی با استفاده از ۴ پرایمر تصادفی برای افتراق ۲۵ گونه درماتوفیت یک الگوی RAPD معرفی کردند(۸). این روش اشکال‌های خاص خود نظیر کم بودن قابلیت تکرار و مشکل بودن آنالیز نتایج را داراست. جدیدترین و معتبرترین تکنیک برای شناسایی ارگانیسم‌ها استفاده از تعیین توالی (Sequencing) مولکول های DNA است. پرواضح است که این کار به رغم دقت و اعتبار عالی، معمولاً وقت‌گیر و پرهزینه است و لذا تنها می توان قطعات با اندازه کوچک را تعیین توالی کرد. از جمله قطعات DNA بسیار با ارزش برای اهداف تاکسونومیک، فیلوژنیک و اپیدمیولوژی مولکولی، DNAی ریبوزومی (rDNA) است. این ناحیه دارای بخش‌های مختلفی است که بعضی مانند 18S ، 28S ، 5.8S در رمزدهی (Coding) نقش داشته و بعضی نیز نظیر ITS1 ، ITS2 و IGS به عنوان فضاانداز بین ژن‌ها مطرح هستند و نقش ژنی آن‌ها هنوز مشخص نشده است(۱۱). با این وجود قطعات مزبور به عنوان ابزار مولکولی برای مطالعه های تاکسونومی ارزش بالایی دارند. نواحی ITS1 و ITS2 در بسیاری مطالعه‌ها و در مورد بسیاری قارچ‌ها از جمله درماتوفیت‌ها (۱۴-۱۲) تعیین توالی شده است. علاوه بر rDNA، ژن کیتین سنتاز نیز برای این اهداف به کار رفته است. همان طور که در فوق اشاره شد، تعیین توالی به

واسطه هزینه بالا و وقت مورد نیاز برای تست‌های روتین کلینیکی و برای مطالعه‌های اپیدمیولوژیک مفید نیست و لذا هنوز برای شناسایی درماتوفیت‌ها نیاز به روش معتبر و سریع و ساده احساس می کند. از جمله این روش‌ها که تا حدود زیادی معایب تعیین توالی را ندارد، بلکه بعضی محاسن آن را دارا است، PCR-RE است که در مطالعه حاضر از آن استفاده شده است. برای طراحی سیستیم PCR-RE به منظور افتراق گونه‌ها، تنوع توالی‌ها در گونه‌های مختلف ضروری و مهم ولی از طرفی دیگر، وجود تنوع بین strainهای وابسته به یک گونه خاص نامطلوب و مزاحم است. به عبارت دیگر تنوع بین گونه‌ای (inter-species variation) مطلوب ولی تنوع درون گونه ای (inter-species variation) نامطلوب است. لذا لازم بود تنوع درون گونه‌ای درماتوفیت‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرد. این کار به کمک یکی از نرم‌افزارهای رایج در بیوانفورماتیک (DNASIS) در این تحقیق صورت پذیرفت. به جز ترایکوفیتون منتاگروفیتس، خوش بختانه توالی مربوط به سایر گونه‌ها به قدر کافی ثابت و غیرمتغیر بود.

در پژوهش حاضر مجموعه ITS1-5.8S-ITS2 برای بررسی درماتوفیت‌ها در یک سیستم PCR-RE به عنوان قطعه هدف مورد استفاده قرار گرفته است. علت این انتخاب این است که این مجموعه در دو طرف به ژن‌های 18S و 28S متصل و قطعات مزبور بسیار محافظت شده هستند و در تقریباً همه ی درماتوفیت‌ها مشابه‌اند و لذا برای انتخاب یک جفت پرایمر همگانی مناسب اند. این پرایمرها به ITS1 و ITS4 موسوم اند. از سوی دیگر نواحی ITS1 وITS2 دارای نواحی متغیر (واریابل) هستند که برای انتخاب آنزیم یا آنزیم‌هایی مناسب برای افتراق گونه‌ها مناسب اند(۱۱). سیستم PCR-RE با استفاده از نواحی ITS در مطالعه‌های دیگری هم به کار رفته است که از جمله آن‌ها می‌توان به مقاله های Mochizuki (۱۵) و Jackson (۶) اشاره کرد. منتها در مطالعه حاضر گونه های رایج در ایران که با فراوانی بیش تری از بیماران جدا می‌شوند، مدنظر گرفته شد. در مطالعه حاضر برای جداسازی DNA از روش سریع اما با کیفیت بالاتر استفاده شد به طوری که اکثریت قریب به اتفاق مورد DNA با موفقیت و با کمیت و کیفیت مطلوب استخراج و تخلیص شد. حسن این روش یکی سرعت عمل به خاطر حذف بسیاری از مراحل معمول استخراج، است و دیگری صرفه اقتصادی به خاطر هم زمان کردن بسیاری مراحل متعدد در یک مرحله است.

در این مطالعه هم چنین انتخاب آنزیم‌های با اثر محدود برای شکستن محصول PCR به طور آگاهانه و بر اساس توالی نوکلئوتیدها صورت گرفت. در بسیاری از مطالعه‌ها برای انتخاب آنزیم معمولاً از روش آزمون و خطا استفاده می‌کنند، یعنی لیستی از آنزیم‌های متفاوت را عملاً برای برش محصول‌های PCR به کار می‌گیرند تا سرانجام آنزیم نسبتاً مطلوبی به دست آید ولی در مطالعه حاضر با استخراج حجم زیادی از سکانس‌ها در رابطه با درماتوفیت‌های مختلف، آنزیمEcoRII انتخاب شد. این آنزیم قطعات ITS را در درماتوفیت‌های مختلف طوری برش می‌دهد که پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد در مورد هر کدام از نمونه‌ها ، اوزان مختلفی از DNA به دست و در مجموع الگوهای PCR-RE مناسبی ارایه می‌دهد و لذا همین آنزیم برای افتراق درماتوفیت‌ها برگزیده می شود (جدول شماره ۲ و تصویر شماره ۲).

نویسندگان، در مطالعه‌های دیگر از ژن‌های مختلف مندرج در rDNA و از سیستم DNA bases-PCR-RE و برای افتراق گروه‌های دیگری از قارچ‌های پاتوژن استفاده کرده‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به افتراق گونه‌های شایع کاندیدا (۱۶)، افتراق تمام گونه‌های شناخته شده مالاسزیا(۱۷) و افتراق C. albicans از C. dubliniensis (۱۸) اشاره کرد که از نقطه نظر فیزیولوژیک و مرفولوژیک فوق‌العاده به هم شبیه هستند.

استفاده از این روش‌ها در کشور ما به خصوص در میدان قارچ‌شناسی پزشکی تقریباً جدید است و لذا اجرای موفق طرح هایی از این دست می‌تواند در حل بعضی از معضل ها و پرسش های بهداشتی، پزشکی و اپیدمیولوژیک کشور راه گشا باشد.

References

1-Kwong-Chung KJ, Bennett JE (eds). Medical mycology. Philadelphia**:** Lea and Febiger, 1992.

2-Khosravi AR, Aghamirian MR, Mahmoudi M. Dermatophytoses in Iran. Mycoses. 1994; 37: 43-48.

3-Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 240-59.

4-Graser Y, el-Fari M, Presber W, et al. Identification of common dermatophytes (Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton) using polymerase chain reactions. Br J Dermatol 1998; 138: 576-82.

5-He G, Li J, Ding J, Tan Z. Identification of common species of dermatophytes by PCR-RELP. Immunol 2001; 45: 209-16.

6-Jackson CJ, Barton RC, Evans EG. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. J Clin Microbiol 1999; 37: 931-36.

7-Leclerc MC, Philippe H, Gueho E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. J Med Vet Mycol 1994; 32: 331-41.

8-Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. J Med Microbiol 2000; 49: 493-97.

9-Mochizuki T, Sugie N, Uehara M. Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes. Mycoses 1997; 40: 405-9.

10-Zhong Z, Li R, Li D, Wang D. Typing of common dermatophytes by random amplification of polymorphic DNA. Jpn J Med Mycol 1997; 38: 239-46.

11-Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. Med Mycol 2002; 40: 87-109.

12-Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T, et al. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 resions, J Clin Microbiol 1999; 37: 920-24.

13-Makimura K, Tamura Y, Murakami A, et al. Cluster analysis of human and animal pathogenic Microsporum species and their teleomorphic states, Arthroderma species, based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1. Microbiol Immunol 2001; 45: 209-16.

14-Yoshida E, Makimura K, Mirhendi H, et al. Rapid identification of Trichophyton tonsurans by specific PCR based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS)1 region. J Dermatol Sci 2006; 42: 225-30.

15-Mochizuki T, Tanabe H, Kawasaki M, et al. Rapid identification of Trichophyton tonsurans by PCR-RFLP analysis of ribosomal DNA regions. J Dermatol Sci 2003; 32: 25-32.

16-Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important Candida species. Jap J Med Mycolog 2006; 47: 225-29.

17-Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, et al. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 Malassezia species. J Microbiol Methods 2005; 61: 281-84.

18-Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, et al. Differentiation of Candida albicans and Candida dubliniensis using a single enzyme PCR-RFLP method. Jpn J Infect Dis 2005; 58: 235-37.