جهت تهیه فایل WORD 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

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۳، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۷
صفحات: ۱۲۴-۱۱۵

استفاده از روش PCR در شناسایی گونه‌های مهم بیماری زای کاندیدائی در مبتلایان به کاندیدیازیس حاد

آزاده اسکندری .M.Sc*، سید علیرضا مصباح نمین.Ph.D✍، محمد حسین یادگاری.Ph.D**

چکیده

هدف: شناسائی سریع گونه‌های مهم بیماری‌زای مخمری از جنس کاندیدا در نمونه‌های مبتلایان به کاندیدیازیس حاد با انجام یک بار روش PCR و ارزیابی شیوع آنها

مواد و روش‌ها: ابتدا نمونه‌های استانداردی از گونه‌های مهم کاندیدائی (آلبیکنس،گلابراتا، تروپیکالیس و پاراپسیلوزیس) تهیه سپس DNA آنها استخراج گردید. با استفاده از PCR و تک جفت پرایمر ویژه ژن CHS1 قطعات متفاوتی تکثیر و به دست آمدند که هریک نماینده‌ای از یک گونه کاندیدائی بودند . پس از استاندارد کردن روش، تمام مراحل آزمایشات برای نمونه‌های بالینی مبتلا به کاندیدیازیس حاد به اجرا در آمد.

یافته‌ها: از بیماران مبتلاء به کاندید یازیس حاد ۶۰ نمونه تهیه شد. بررسی‌های ژنوتایپی و فنوتایپی تایید نمود که ۴۸ نمونه از آنها کاندیدا آلبیکنس، ۴ نمونه کاندیدا تروپیکالیس، ۲ نمونه کاندیدا پاراپسیلوزیس و ۱ نمونه گلابراتا بودند. اما در مورد ۵ نمونه باقیمانده که هیچ گونه باندی درروش PCR نداشتند مطالعات فنوتایپی مشخص کرد که ۳ نمونه آنها مربوط به کاندیدا کروزه ای و۲ مورد دیگر آن احتمالا نوع دیگری از کاندیدا مثل دابلی نینسیس بودند .

نتیجه گیری: در این مطالعه نشان داده شد که ۸۳,۳ درصد (۵۵ از ۶۰ نمونه) از نمونه‌های آلوده به عوامل کاندیدائی مذکور، قابل شناسائی با این روش هستند که ۸۰ درصد آنها مربوط به کاندیدا آلبیکنس و مابقی مربوط به سه عامل مهم پاتوژن دیگر کاندیدائی است.

با توجه به اهمیت تشخیص سریع و دقیق این عوامل توسط مراکز درمانی و آزمایشگاههای تشخیص طبی، پیشنهاد می شود قبل از مصرف دارو، غربالگری اولیه برای شناسائی دقیق عوامل پاتوژن و شایع کاندیدائی مثل کاندیدا آلبیکنس را در بیماران مبتلا به کاندیدیازیس حاد را در اولویت قرار دهند، از روش سریع، دقیق و کم هزینه ارائه شده استفاده کنند و نمونه‌های احتمالا" بسیار کم باقیمانده را با همان روش‌های مرسوم فنوتایپی مورد آنالیز قرار دهند. ناگفته نماند که در صورتی که مطالعه جامع تری با نمونه‌های بیشتری انجام شود اهمیت این امر به طور شایسته تری نمایان میگردد.

واژه‌های کلیدی: کاندیدا آلبیکنس،کاندید یازیس، گونه‌های کاندیدایی، تشخیص سریع، PCR

دریافت مقاله: ۸۷/۴/۱۷ پذیرش مقاله: ۸۷/۶/۲۳

✍ نویسنده مسئول: استادیار گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه تربیت مدرس mesbahnamin@yahoo.com
* کارشناسی ارشد قارچ شناسی، دانشگاه تربیت مدرس
** استادیار گروه قارچ شناسی دانشگاه تربیت مدرس

جهت تهیه فایل WORD 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

مقدمه:

کاندید یازیس یکی از مهمترین و شایع‌ترین بیماریهای فرصت طلب در انسان است که عامل ایجاد کننده آن در دسته مخمرها قرار دارد. عفونت به صورت حاد، تحت حاد و مزمن در پوست، ناخن و مخاط ظاهر می شود. عوامل کاندیدایی اکنون جزء چهارمین عفونت منتشر بیمارستانی محسوب می‌شوند (۱). در حال حاضر موارد زیادی در مورد افزایش شیوع گونه‌های کاندیدایی گزارش شده است (۲). فاکتورهایی مانند افزایش استفاده از داروهای سایتوتوکسیک، داروهای جلوگیری کننده از فعالیت ایمنی (که در درمان بیماری‌های بدخیم و خوش‌خیم استفاده می‌شود) و نیز افزایش شیوع بیماری ناشی از کمبود سیستم ایمنی انسان که (ناشی از استفاده وسیع الطیف از آنتی بیوتیک‌ها می‌شود)، در شیوع آن موثر بوده اند (۳). از مسایل دیگر، افزایش میزان عفونت‌های بیمارستانی است که توسط کاندیدیازیس ایجاد می شود که این عفونت‌ها بیشتر توسط جایگزین شدن عوامل کاندیدایی از قبیل گلابراتا، تروپیکالیس، پاراپسیلوزیس، کروزه‌ای است که این گونه‌ها نیز اخیرا" نسبت به داروهای ضد قارچی از قبیل آزول‌ها مقاوم شده‌اند (۵ و۴). همین امر قابلیت ایجاد عفونت در بافت‌های مختلف و امکان بیماری سیستمیک کشنده را فراهم کرده است. حداقل ۱۵۰ گونه از قارچهایی شناسایی شده‌اند که به عنوان پاتوژن برای انسان محسوب می‌شوند ولی اکثر عفونت‌های قارچی توسط مخمرها بخصوص گونه‌های کاندیدایی ایجاد می‌گردد. رایج ترین و مهمترین مخمرهای ایجاد کننده بیماری کاندیدیاریس در برگیرنده کاندیدا آلبیکنس، گلابراتا، تروپیکالیس و پاراپسیلوزیس میباشد (۶). تشخیص سریع و دقیق عوامل کاندیدایی در آزمایشگاههای تشخیص طبی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. آزمایش‌های مورفولوژیکی و فنوتایپی به عنوان تستهای روتین در تشخیص گونه‌های کاندیدایی در آزمایشگاه‌هاست ولی به دلیل مشکلاتی که برخی از این آزمون‌ها دارند اذهان به سمت استفاده از فنون دیگر مولکولی مانند واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) متمرکز شده است. گروه میر هندی و همکاران (۸ و۷) در چند سال گذشته با استفاده از این روش (RFLP- PCR) اقداماتی را در جهت شناسائی انواع مهم گونه‌های مخمری کاندیدائی در ایران انجام داده و گزارش نموده اند. در این تحقیق نیز تلاش شد تا با اقتباس از روش PCR به کار رفته توسط گروه جردن (۹) و انتخاب پرایمرهائی از ژن CHS1، اما بدون استفاده از آنزیم‌های برشگر، ضمن شناسائی دقیق عوامل مهم کاندیدائی در بیماران یاد شده، فراوانی چهارگونه مهم و پاتوژن کاندیدا نظیر کاندیدا آلبیکنس، گلابراتا، تروپیکالیس و پاراپسیلوزیس در بیماران مبتلا به کاندیدیازیس را تعیین نماید. لازم به ذکر است که کیتین از ترکیبات دیواره سلولی کاندیدا است که نقش مهمی را در پاتوژنیسیتی ایفاء می‌نماید و سنتز آن توسط آنزیم کیتین سنتاز صورت میگیرد که ژن CHS1 آن راکد می‌کند.

مواد و روش‌ها:

تهیه ایزوله‌های کاندیدایی: چهار نوع از ایزوله‌ها از نمونه‌های بالینی تأیید شده به دست آمد (گونه‌های کاندیدا آلبیکنس، گلابراتا، تروپیکالیس و پاراپسیلوزیس). سپس با استفاده از تست‌های فنوتایپی گونه آلبیکنس از سایر گونه‌ها جدا گردید. این تستها شامل تولید کلامیدوکونیدی بر روی محیط کورن میل آگار و توئین ۸۰، تولید لوله زایا و ایجاد کلنی سبز رنگ بر روی محیط کروم آگار بودند.

سپس با استفاده از تست‌های جذب قندی با کیت API-20C گونه‌های غیر آلبیکنس از هم تفکیک داده شدند. همچنین برای تأیید اولیه این گونه‌ها از محیط کروم آگار استفاده گردید. در این محیط کاندیدا گلابراتا دارای کلونی صورتی رنگ، کاندیدا تروپیکالیس دارای کلونی آبی ارغوانی و کاندیدا پاراپسیلوزیس دارای کلونی کرمی رنگ می‌باشند. تعداد ایزوله‌های به دست آمده از بیماران مبتلا به کاندیدیازیس حاد به ۶۰ نمونه از انواع کاندیدیازیس واژن، ناخن، پوست و دهان رسید.

جداسازی DNA از نمونه‌های کشت شده:

ابتداء کشت انبوهی از هر یک از مخمرهای مورد نظر ایجاد گردید. برای این منظور از محیط GYEP استفاده شد. این محیط شامل ۱٪ پپتون، ۳۰٪ عصاره مخمری، ۲٪ گلوکز بود. برای این منظور سوسپانسیونی از هر یک از مخمرهای تأیید شده، تهیه و به این محیط (در حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر) افزوده شد و به مدت ۲ روز در دمای ۲۸°C انکوبه گردید. سپس سلولهای مخمری با سانتریفیوژ

جهت تهیه فایل WORD 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

در دور g ۳۰۰۰ جمع‌آوری و با سرم فیزیولوژی استریل ۳ مرتبه شستشو گردید و در نهایت در ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل به صورت سوسپانسیون درآمده در °C ۲۰- نگهداری شد. برای تهیه DNA از هر گونه کاندیدا به تعداد ۵×۱۰^{۶} - $۱۰^{۶}$ سلول مخمری در هر میلی‌لیتر نیاز بود که این تعداد سلول مخمری با استفاده از شمارش با لام نئوبار به دست آمد. روش غالب در جداسازی DNA در این پژوهش، روش مرسوم فنل- کلروفرم بود، منتهی با این فرق که از پرل شیشه ای برای شکستن دیواره سلولی مخمرها استفاده گردیدکه به شرح ذیل میباشد. : به اندازه حجم مخمر، حدود ۱۰۰ میکرولیتر پرل شیشه ای با قطر ۰/۲ میکرون (۴۰ عدد) استفاده گردید و به آن حدود ۲۰۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده (۲٪ تریتون، ۱٪ SDS، ۱۰۰ میلی مولار NaCl، ۱۰ میلی مولار تریس و یک میلی مولار EDTA با pH ۸) و۲۰۰ میکرولیتر به نسبت حجمی ۱:۱ از فنل و کلروفرم اضافه گردید. پس از ورتکس شدید، با قرار دادن آن هر ۲ دقیقه یک بار بر روی یخ، و افزودن ۲۰۰ میکرو لیتر از محلول TE) تریس و EDTA با pH ۸ (به آن، عمل سانتریفیوژ در دور g ۱۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت و محلول رویی به تیوپ جدید منتقل گردید. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از فنل- کلروفرم به نسبت حجم ۱:۱ به آن اضافه و به آرامی تکان داده شد. مجددا" عمل سانتریفیوژ در همان دور اجرا و محلول روئی آن به تیوپ جدید انتقال داده شد. پس از افزودن ۳ میکرو لیتر استات سدیم ۳ مولار به این محلول، ۱ میلی‌لیتر اتانول مطلق سرد اضافه شد تا DNA تشکیل گردد. برای ایجاد رسوب بیشتر، تیوپ به °C ۲۰- برای چند دقیقه منتقل گردید. سپس عمل سانتریفیوژ در دور g ۱۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. و رسوب حاصل با اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و پس از سانتریفوژ در دور مذکور نهایتا" به رسوب نیمه خشک آن ۲۵ میکرولیتر آب مقطر استریل (ترجیحا" بافر TE) اضافی گردید تا DNA حل شود..

بررسی کمی و کیفی DNA:

برای تعیین مقدارکمیDNA نمونه‌ها،نسبت طیف جذبی نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ محاسبه گردید که در بیشتر موارد این نسبت بین ۱/۵ تا ۱/۸ به دست آمد که حاکی از خلوص DNA بود. برای تایید کیفیت DNA نیز از روش الکتروفورز روی ژل آگارز با غلظت ۰/۸ درصد و با الکتروواندوسموز کم (LE) استفاده گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

ابتدا روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ۴ نمونه کاندیدای تأیید شده و استاندارد (کاندیدا آلبیکنس، گلابراتا، تروپیکالیس و پاراپسیلوزیس) انجام شد و پس از به دست آوردن الگوی مناسب (شکل ۱)، روش مذکور بر روی نمونه‌های بالینی مورد آزمایش قرار گرفت. برای کنترل منفی نیز از نمونه‌های قارچی تریکو فایتون روبروم که به این روش پاسخ نمی‌دهند استفاده گردید. حجم تمامی واکنش‌های PCR انجام شده در این پژوهش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد و برنامه دمائی در دستگاه ترموسایکلر Eppendorf به شرح ذیل می‌باشد:

دمای °C ۹۴ به مدت ۱ دقیقه، °C ۵۵ به مدت ۲ دقیقه و°C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه برای هر سیکل قرار داده شد. تعداد سیکل‌های مورد نظر در این تست ۳۵ بود.

پرایمرهای مشترک مورد استفاده در این تحقیق به شرح ذیل می‌باشند:

Primer I (F): 5' CGC CTC TTG ATG GTG ATG AT 3'

Primer II (R): 5' TCC GGT ATC ACC TGG CTC 3'

اندازه محصول PCR برای کاندیدا آلبیکنس ۱۲۲ bp، برای کاندیدا تروپیکالیس ۵۱۹ bp، برای کاندیدا گلابراتا ۵۳۵ bp و بالاخره برای کاندیدا پاراپسیلوزیس ۳۱۱ bp بود. نتایج انجام PCR با استفاده ازالکتروفورز ژل آگارز ۲٪ دربافر TBE صورت پذیرفت. این بافر شامل Tris-base (۸۹ میلی مولار)، اسید بوریک (۸۹ میلی مولار) و EDTA (۵ میلی مولار با pH ۸) بود. قبل از بستن ژل، ۴ میکرولیتر از محلول ۰/۰۵ میلی گرم بر میلی لیتر اتیدیوم بروماید به آن افزوده و مخلوط گردید و پس از الکتروفورز، نتایج تحت نور ماورای بنفش (UV) مورد بررسی قرار گرفت.

برای ارزیابی قابلیت و توانائی این روش (PCR) در تفکیک نمونه‌های مخلوط شده از چند عامل کاندیدایی تایید شده، روش مورد نظر برای این نمونه انجام گردید و پس از حصول اطمینان از صحت این امر

(شکل ۴) اقدام به انجام روش فوق بر روی ۶۰ نمونه بالینی به دست آمده از بیماران شد و نتایج حاصله مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج:

در ایـن پژوهـش ۶۰ نمونه بیمار مبتلا به کاندیـد یازیس حاد مورد آزمایـش قرار گرفـت. این نمونه‌ها از کلیه بیمـاران مبتلا به کاندید یازیس حاد، اعم از کاندید یازیس واژن، ناخن، پوسـت و دهان تهیه گردید. بررسـی‌های فنوتایپی و ژنوتایپی بر روی این نمونه‌ها نشان داد که ۴۸ نمونه از نوع کاندیدا آلبیکنس و مابقی آنها شـامل سـایر گونه‌های کاندیدایی هسـتند (شکل ۲). از این ۱۲ نمونه، ۷ نمونه به خوبی تشخیص داده شدند که در شکل ۳ آورده شده است (۱ نمونه مربـوط به کاندیدا گلابراتا، ۴ نمونـه کاندیدا تروپیکالیس و ۲ نمونه کاندیـدا پاراپسـیلوزیس). اما ۵ نمونه دیگر، هیـچ گونه باندی را در روش PCR بر روی ژل نشـان ندادنـد یعنی اینکه باید از گونه‌های دیگر کاندیدایی باشـند. بررسـی فنوتایپ آنها نشـان داد که از این تعداد، سه نمونه مربوط به کاندیدا کروزه ای و دو نمونه دیگر از نظر فنوتایپی مشـابه کاندیدا البیکنس هستند (یعنی در تولید جرم تیوب و کلامیدوکونیدی و همچنین کشـت بر روی محیـط کروم آگار با یکدیگر مشابه بودند). برای تعیین قابلیت تفکیک گونه‌های مختلف کاندیدائی در این روش، تلاش شـد کـه دوگونه کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا پاراپسـیلوزیس به طور مصنوعـی مخلوط و روش مورد نظر روی آنها انجام شود و الگوی الکتروفورزی نمونه‌های PCR شده آنها مورد مطالعه قرار گیرد (شکل ۴). نتایج در حضور نمونه مجزائی

بحث و نتیجه‌گیری:

مخمرهای آنامورف جنس کاندیدا شامل بسیاری از گونه‌های پاتوژنی اسـت که باعـث ایجاد بیماری در انسـان (که طیفـی از عفونتهای سـطحی تا تهاجمی در افراد دارای نقص سیسـتم ایمنی می‌باشند)، می‌شـود. برای بررسـی‌های تشـخیصی، اپیدمیولوژیکی و درمانی، تشخیص دقیق گونه‌های کاندیدایی در نمونه‌های کلینیکی مورد نیاز است. روش‌های روتین برای تشـخیص گونه‌های کاندیدایی شامل مطالعات کلونی، میکروسکوپی، مورفولوژیکی و همچنین واکنشهای بیوشیمیایی مختلف می‌باشد. جذب کربوهیدرات به طور عمده برای تشـخیص گونه‌های کاندیدا ئی و سـایر مخمرهـای مهم کلینیکی استفاده می‌شود.

تشخیص سـریع این گونه‌ها در آزمایشـگاه‌های تشخیص طبی به عنوان عامل مهمی در درمان افراد مبتلاء به کاندیدیازیس خصوصا" جمعیـت در معرض خطر (high-risk) محسـوب می‌شـود. در طی سال‌های ۱۹۹۰-۱۹۸۶ گونه‌های کاندیدایی به عنوان ششمین عامل شایع عفونتهای بیمارستانی تلقی شده است. در میان عفونتهای خونی بیمارسـتانی، گونه‌های کاندیدایی جزء چهارمیـن عامل طبقه‌بندی می‌گردند. آنها مسـئول ایجاد ۱۰/۲٪ از تمام سپتی‌سـمی‌ها و ۲۵٪ از کل عفونت‌هـای اداری بوده اسـت و۹۰٪ از کل عفونتهای خونی مربوط به نوزادان نارس را تشکیل می‌دهند (۱۰).

بـه عبارت دیگـر، افزایش عفونتهـای کاندیدایی (به جـزء کاندیدا آلبیکنـس) و مقاومت آنها به داروهای ضد قارچی (۱۰) باعث شـده است که سیستم‌های دیگری را برای تشخیص سریع گونه‌ها به جزء کاندیـدا آلبیکنس به جهت درمان دارویی مطرح و به کار گیرند (۱۱ و ۱۲ و ۱۳)

مطالعـات فنوتایپـی، روش‌هـای روتین و عمومی برای تشـخیص کاندیدیازیـس به شـمار می‌آیند. این مطالعات در برگیرندهٔ بررسـی خصوصیـات مورفولوژیـک، فیزیولوژیـک و رنگ زائـی گونه‌های مختلـف کاندیدا میباشـد. روش قابل قبول برای شناسـائی کاندیدا آلبینکس تولید لوله زایا و کلامیدوکونیدی است. برای گونه‌های غیر البیکنس تستهای جذب قندی و انجام آزمایشات تولید جرم تیوپ با اسـتفاده از سرم انسانی، تولید کلامیدوکونیدی بر روی محیط کورن میل آگار و توئین ۸۰ می‌باشند.

اگرچه این روش‌ها تا حدی سـاده، آسـان و حتی کم هزینه هستند ولـی نتایج حاصل از آنها کلی و در بعضـی موارد غیر قابل اطمینان هسـتند. از سـوی دیگر اسـتفاده از این روش‌ها معمـولا" زمان بر بـوده و حصـول نتایج کاذب مثبـت یا منفی در آنهـا اجتناب ناپذیر اسـت به دلیل اینکه در این نوع بررسـی‌ها (فنوتایپی) امکان ایجاد Switching phenotype در گونه‌هـای کاندیدایی وجود دارد (۱۴).

بنابرایـن روش‌های جدیدتـری از فنون مولکولی مـورد توجه قرار گرفته اسـت. البته روش‌های ژنوتایپی همیشه قابل اطمینان‌تر بوده اند، هرچند اسـتفاده از این فنون نیازمند هزینه بیشـتری نسـبت به روش‌های فنوتایپی اسـت ولی صحت، دقت و سرعت آنها غیر قابل انکار می‌باشد.

روش‌هـای مختلف وابسـته به DNA نظیـر کاریوتایپینگ (۱۰و۴) RFLP، Southern hybridization (۱۱و ۸ و۷) و فنونهـای مختلـف دیگر مولکولی (۱۴و۵) برای تشـخیص جنـس کاندیدا در نمونه‌های بالینی مورد اسـتفاده قرار گرفته‌اندکه اکثر آنها گران و پر زحمت می‌باشـند و تنها تعداد کمی قادر به تشخیص بین گونه‌های کاندیدایی غیر کاندیدا آلبیکنس هستند (۱۹و۸ و۷).

برای جداسـازی گونه‌های کاندیدایـی در نمونه‌های بالینی، تکنیک PCR وابسـته بـه تکثیر ژن خاصـی نظیر اکتین، پروتئین شـوک حرارتی، سیتوکروم P450، لانسترول دی متیلاز و DNA ریبوزومی هسته و میتوکندری (۱۹و۱۸و۱۶-۱۳) به کار برده شده است. در این زمینه در کشـور ایران نیز مطالعات مشابهی صورت گرفته است که منجمله میتوان به دو مقاله گروه میرهندی (۸ و۷) اشاره کرد. آنها در هر دو مطالعه از روش PCR- RFLP استفاده و تلاش نمودند که با به کار گیری این روش و تکثیر نواحی خاصی از ژن rRNA و هضم آنزیمی آن، گونه‌های کاندیدائی نمونه‌های کلینیکی به دسـت آمده از آزمایشگاه‌های قارچ شناسـی دانشکده بهداشت را مورد شناسائی قرار دهند. آنان موفق شـدند ۵ گونه مختلف کاندیدا را با این روش شناسائی کنند و بیشـترین تلاش خود را برای راه اندازی این روش بکار بردنـد و از میزان موفقیت در این امر اطلاعاتی ارائه ندادند. اما آنها اکتفا به این مطلب نمودند که به روشـی سـاده و سـریع برای این منظور دسـت یافته اند. مزایای روش آنهـا مثل محققین دیگر استفاده از تکثیر ژن فعال و همه گیر rRNA و شناسائی تعداد بیشتر گونه‌های کاندیدائی بوده اسـت، اما استفاده از آنزیم برشگر و بدست آوردن نتایج مطلوب از جنبه‌های مختلف از ضعف‌های این شیوه نیز به شمار می‌آید. با توجه به سابقه ای که در این مورد از این همکاران محترم وجود داشت و به منظور کاربردی تر و کم هزینه تر شدن این روش‌ها، توجه ما به سمت اجرای روش PCR با یک پرایمر مشترک و انجـام یک بار PCR و بـدون آنزیم، برای شناسـائی این عوامل پاتوژن سـوق داده شـد با ذکر دو نکته که به شـرح ذیل می‌باشـد. اول آنکه با انجام این روش بر روی نمونه‌های اسـتاندارد تهیه شده از عوامل پاتـوژن کاندیدائی و حصول اطمینان از کاربری آن، بتوان روش را روی نمونه‌هـای بیمـاران مبتلا بـه کاندیدیازیس آزمایش کرد و صحت و سـقم نتایج را با انجام تسـت‌های فنوتایپی نمونه‌ها ارزیابی نمود. دوم آنکه از میزان شـیوع انواع کاندیداهای پاتوژن در میان نمونه‌ها مطلع گردیـد. بنابراین در پژوهش حاضر با اقتباس از روش گروه جـردن از ژن CHS1 برای تکثیر قطعه مورد نظر برای جداسـازی کاندیـدا آلبیکنس و ۳ گونه مد نظر اسـتفاده گردید. کار خوب این گروه همچنین نشـان داد که در این روش هیچ باندی در مورد DNAهای مربوط به سـایر کاندیداها نظیر کاندیدا کروزه‌ای، کاندیدا دابلینینسـیس، کاندیدا لوزیتانیا، باکتـری E.coli، قارچهای رشته‌ای نظیر آسـپارژیلوس و تریکوفایتون روبروم به عنوان یکی از عوامل درماتوفیتی دیده نشده است (۹). دلایل منطقی استفاده از ژن CHS1 به شرح ذیل می‌باشد.

ژن CHS11 بـه عنوان ژن هدف برای تکثیر انتخاب شـد زیرا این ژن هیچ گونه مشـابهتی با ژنهای پستانداران ندارد. همین مسئله به عنوان عامل مهمی جهت عدم ایجاد پاسـخ مثبت کاذب محسـوب می‌شـود (به دلیل اینکـه نمونه‌های بالینی حـاوی مقادیر بالایی از ژنهای انسـانی هسـتند)، بنابراین به کارگیری این ژن در شناسایی این گونه‌ها کاملا" اختصاصی می‌باشـد. همچنین این ژن مربوط به آنزیمی است که مسئول سنتز کیتین، از ترکیبات مهم دیواره سلولی در کاندیدا آلبیکنس، می‌باشـد و زمانـی که کاندیدا آلبیکنس به فرم تهاجمی تبدیل می‌شود سـنتز کیتین در این شرایط افزایش می‌یابد ولی زمانی که به فرم غیر تهاجمی اسـت یعنی حالت مخمر را دارد، میزان کیتیـن در این حالت کمتر اسـت (۱۶). جفت پرایمر انتخاب شده از ژن CHS1 بسیار اختصاصی است و ضمن اینکه دارای هیچ همولوژی در مخمر ساکارومایسـس سرویسـیه نمی‌باشد (۱۷) قادر اسـت با اسـتفاده از روش PCR نمونه‌های مخلوط شده و نا همگن از چنـد عامل مهم و پاتوژن کاندیدایی مذکور در این پژوهش را که تفکیک آن‌ها از یکدیگر مشـکل می‌باشـد شناسائی کند (شکل ۴).

نکته جالبی که وجود دارد اینســت که ردیف بازی ژنوم این ۴ مورد از گونه‌های کاندیدائی (مورد آنالیز این مطالعه) دارای شــباهت‌هائی بودنــد و از همیــن ردیف‌ها برای طراحی پرایمر اســتفاده شــد که محصــول نهائی هریک از این گونه‌هــا دارای اندازه‌های مختلفی در یک بار انجام PCR شده باعث شناسائی این ۴ گونه می شدند.

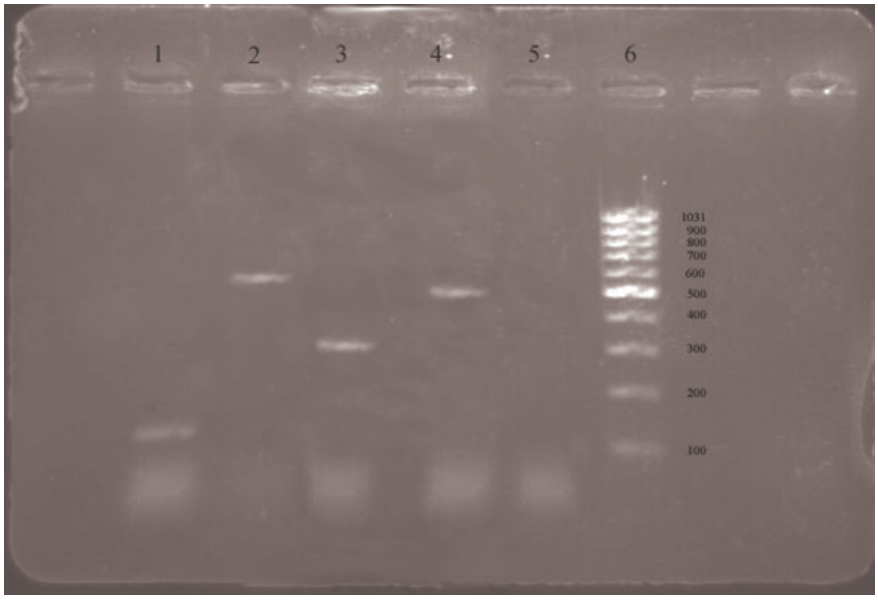
بنابراین به منظور بررسی و تشخیص گونه‌های کاندیدایی، ۶۰ نمونه از بیماران مبتلا به کاندیــد یازیس حاد، اعم از کاندید یازیس واژن، ناخن، پوســت و دهان تهیه شــد. از هر دو روش کشت و فن PCR بر روی نمونه‌های مورد نظر اســتفاده شد و نتایج آنها با هم مقایسه گردید.

تعــداد ۵۵ نمونه ازکل نمونه‌ها با این روش شناســائی شــدند (یعنی ۸۳,۳ درصد) کــه با نتایج آزمون‌های فنوتایپی مطابقت داشــتند. از میــان آنها ۴۸ مورد مربوط به (که بیشــترین قدرت بیماریزائی را در میان دیگر مخمرها با شــیوع بالائی دارد، همچنانکه در این مطالعه این میزان شــیوع به ۸۰ در صد می‌رسد)، ۱ نمونه مربوط به کاندیدا گلابراتا (که مقاوم به آزول‌ها و بعد از کاندیدا آلبیکنس دومین عامل جــدا شــده از عفونت‌های زیر جلــدی و تهاجمی هســتند)، ۴ نمونه کاندیدا تروپیکالیس (به عنوان دومین عامل کاندیدمیا محســوب می شــود و جداســازی آن در عفونت‌های کاندیدائی عمیق امکان پذیر اســت) و ۲ نمونه کاندیدا پاراپســیلوزیس (که یــک گروه از این نوع کاندیدا از نظر کلینیکی اهمیت بیشــتری دارد) شناســائی شــدند. ۵ نمونه باقی مانده،پس از انجام عمل PCR.، هیچ گونه باندی بر روی ژل تشــکیل ندادند که بیان کننده وجود ســایر گونه‌های کاندیدایی بود. در این مرحله با انجام مطالعات فنوتایپی مشــخص شــد که سه نمونه از آنها مربوط به کاندیدا کروزه ای اســت اما در مورد دو نمونه آخر، احتمال وجود فنوتایپ‌های مشابه کاندیدا البیکنس مانند کاندیدا اســتلاتوییده و یا دابلی نینســیس تشخیص داده شد که هر دو گونه تولید جرم تیوب می‌نماینــد. از طرف دیگر کاندیدا البیکنس و دابلی نینسیس نیز در شرایط مشابه ایجاد کلامیدوکونیدی می‌کنند. کاندیدا استلاتوییده و کاندیدا البیکنس نیز دارای رنگ کلونی مشابه بر روی محیط کروم آگار هســتند (سبز روشــن) در صورتی که رنگ کلونی کاندیدا دابلی نینســیس بر روی این محیط ســبز تیره اســت. شاید بتــوان گفت که یکی از روش‌های تفریق کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دوبلینینسیس (به ویژه اینکه تستها ی فنوتایپی در این گونه‌ها مشابه هســتند) استفاده از این روش PCR باشــد. با این حال نمی‌توان به طور قطعی از روی شــواهد فنوتایپی نظیر آنچــه ذکر گردید، پی به گونه مورد نظر برد و از نظر ژنوتایپی نیز چون با پرا یمر CHSI وارد عمل نشــده است ممکن اســت به عنوان گونه دیگر از کاندیدا تلقی شوند که بررسی‌های دیگری برای تایید ژنوتایپ آن لازم بود که در این تحقیق به این مطلب پرداخته نشد.

از مزایــای اســتفاده از این فن و روش، زمان مناســب برای تکمیل آزمایش اســت. یعنی میتوان با توجه به شــیوع بــالای گونه کاندیدا آلبیکنــس در میان نمونه‌هــای گزارش شــده (و در این تحقیق ۸۰ درصد) ابتدا با اســتفاده از ایــن روش PCR در مدت زمان کوتاهی (حداکثر ۸ ساعت)، ۴ گونه مهم کاندیدائی بیماری‌زا را در نمونه‌های بالینی شناســائی و غربال نمود. ســپس برای نمونه‌های باقیمانده و شناسائی نشــده که اغلب نادرند و شیوع بسیار پائینی دارند مطالعات فنوتایپی را مد نظر قرار داد. این امر در تشــخیص زود هنگام عوامل بیماری زای مخمرهای پاتوژن کاندیدائی بســیار حائز اهمیت است. در حالــی که در روش‌های مرســوم آزمایشــگاهی، مدت زمان لازم برای اســتفاده از روش کشــت در مورد نمونه‌های غیر خونی به طور میانگیــن ۲ تا ۳ روز برای انکوباســیون، در مورد نمونه‌های خونی ۲ تا ۷ روز و برای رشــد کاندیدا، همین زمان برای ایجاد کشت خالص مورد نیاز می‌باشــد. مدتی نیز برای تشخیص ایزوله کاندیدا آلبیکنس صرف می‌شــود و ۳-۲ روز نیز زمان لازم است تا با استفاده از تست جذب قندی و اســتفاده از کیــت API-20C، گونه‌های غیر کاندیدا آلبیکنس تشخیص داده شوند.

از مزایــای دیگری کــه این پژوهش در اســتفاده از این فن و روش مطرح می کند این اســت که دارای مراحل مختلف و پیچیده نیست. نیازی به استفاده از چندین نوع پرایمر، استفاده از فن nested-PCR یا آنزیم‌های محدود کننده یا روش‌های دیگر جهت تشخیص نیست و فقط با یک جفت پرایمر اختصاصی این فن قابل اجراء می‌باشد.

در نهایــت با توجه به نتایج حاصــل از این مطالعه که با به کارگیری فقط یک پرایمر مشــترک در روش PCR موفق به شناسائی ۴ گونه کاندیدائــی پاتوژن مهــم در مبتلایان به کاندیدیازیــس حاد گردید غربالگری اولیه برای شناسائی دقیق عوامل پاتوژن و شایع کاندیدائی



شـکل ۱. نتایج حاصل از PCR نمونه‌های اسـتاندارد و تأیید شـده گونه‌های کاندیدائی بر روی ژل ۲٪ آگارز در الکتروفورز با قطعات متفاوت که به شـرح ذیل می‌باشد:

شماره ۱: کاندیدا آلبیکنس، طول قطعه bp ۱۲۲ می‌باشد.

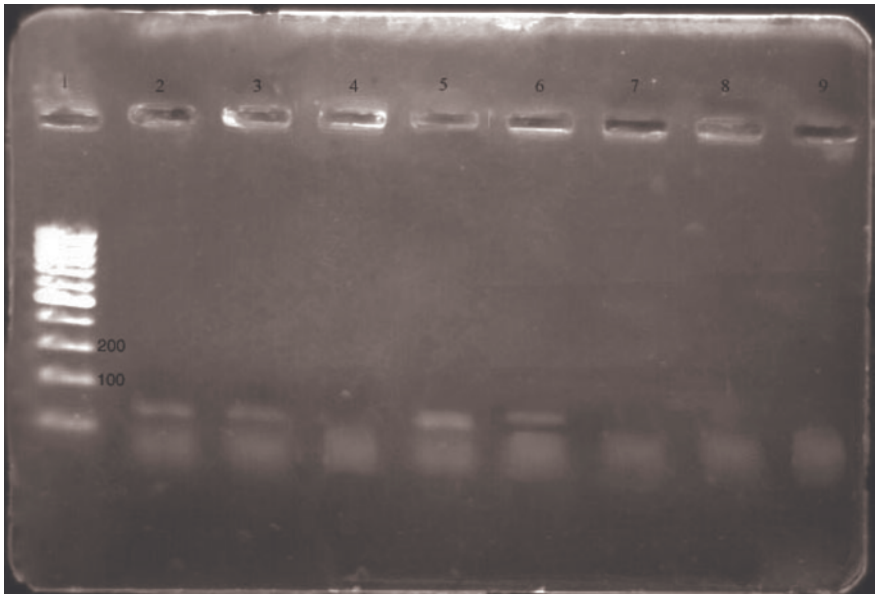
شماره ۲: کاندیدا گلابراتا، طول قطعه bp ۵۳۵ می‌باشد.

شماره ۳: کاندیدا پاراپسیلوزیس، طول قطعه bp ۳۱۱ می‌باشد.

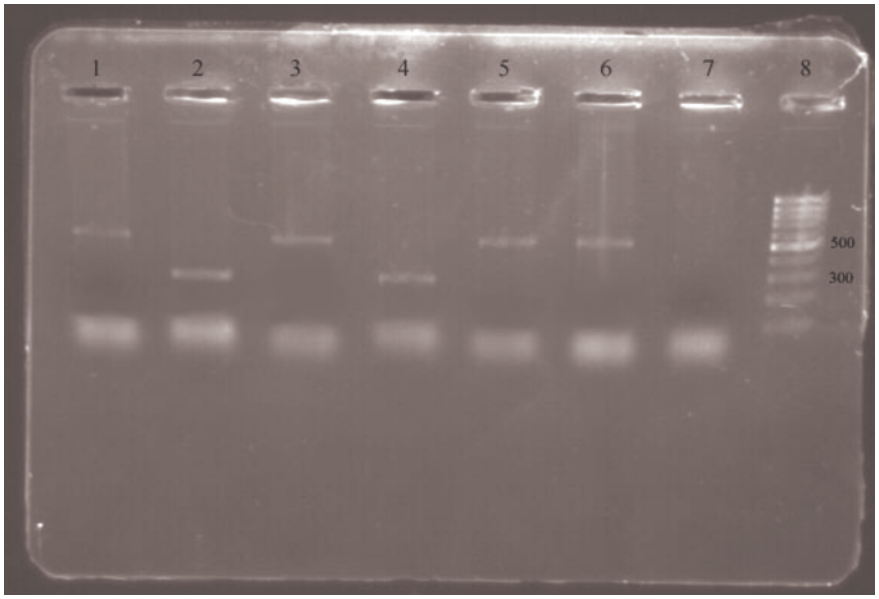
شماره ٤: کاندیدا تروپیکالیس، طول قطعه bp ۵۱۹ می‌باشد.

شماره ۵: کنترل منفی

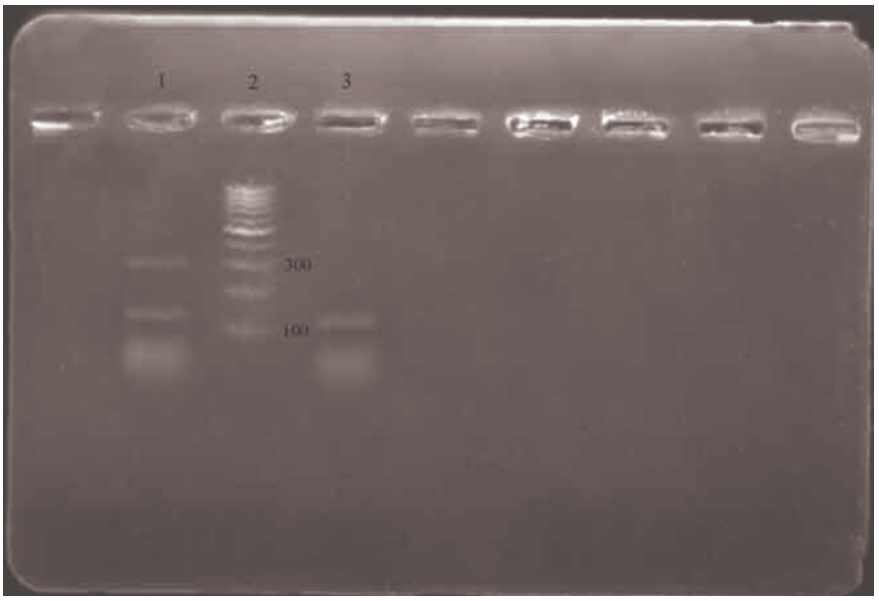
شماره ٦: 100 bp DNA ladder marker



شـکل۲. نتایج حاصل از PCR نمونه‌های بالینی بر روی ژل ۲٪ آگارز در الکتروفورز : شـماره ۲,۳,۵,٦ همگی دارای الگوی ژنوتایپی کاندیدا آلبیکنس می‌باشـند. در شماره ٤,۷,۸ هیچ گونه باندی مشاهده نشده است پس نشان میدهد که این کاندیدا جزء ٤ کاندیدای مد نظر نیست. شماره ۱ مارکر و شماره ۹ کنترل منفی است. ژل آگارز ۲٪ است



شـکل ۳. نتایج حاصل از PCR نمونه‌های بالینی بر روی ژل ۲٪ آگارز در الکتروفورز : نمونه‌های بالینی شـماره ۱,۳,۵,٦ همگی کاندیدا تروپیکالیس می‌باشـند و دارای طول قطعه bp ۵۱۹ هسـتند. همچنین نمونه‌های شـماره ۲,٤، با توجه به نمونه‌های تأیید شـده، کاندیدا پاراپسـیلوزیس با طول قطعه bp ۳۱۱ می‌باشند. شماره ۷، کنترل منفی (نمونه قارچ تریکو فایتون روبروم) و شماره ۸ مارکر استاندارد است. ژل آگارز ۲٪ می‌باشد.



شکل ٤. الگوی الکتروفورزی نمونه‌های PCR شده دوگونه کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا پاراپسیلوزیس که به طور مصنوعی مخلوط شده اند. شماره‌های ۱ دو باند تفکیک شده با طول قطعات bp۱۲۲ و bp۳۱۱ نشان می‌دهد. شماره ۲ مارکر و شماره ۳ نمونه کاندیدا آلبیکنس است.

مثل کاندیدا آلبیکنس را به مراکز درمانی پیشنهاد می دهد که بدین ترتیب نمونه‌های آلوده بسـیار کمتری از نوع کاندیدای بیماری زای نـادری باقی می‌مانند که میتـوان از طریق مطالعات فنوتایپی آنها را مورد آنالیز قرار داد.

نتایـج حاصل از PCR بر روی نمونه‌هـای بالینی و تعیین نوع گونه

References

1. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of Candida albicans. Trends Micro Rev 2001; 9: 327-35.

2. Silverman J, Vazquez JA, Sobel JD, Zervos MJ. Comparative in vitro activity of antiseptics and disinfectants versus clinical isolated of Candida species. Inf Cont Hosp Epid 1999; 20: 676-84.

3. Anaissie E, Paetznick V, Bodey GP. Fluconazole Susceptibility of Candida albicans: Microtiter method that is independent of inoculum's size, temperature and time of reading antimicrobial Agents. Chemother 1991; 35: 1641-6.

4. Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. Rapid identification of Candida species with species-specific DNA probes. JCM 1998; 36: 3260-5.

5. Ahmad S, Kan Z, Mustafa AS, Khan ZV. Seminested PCR for diagnosis of candidemia. J Clin Microbial 2002; 40: 2483-9.

6. Horowiz BJ. Mycotic vulvoaginitis: a board overview. J obstet Gynecol 1991; 165: 1188-92.

7. Mirhendi SH, Kordbacheh P, Pezeshki M Khorramizadeh MR. Simple and rapid identification of most medically important candida species by PCR restriction enzyme method. Acta Medica Iranica 2003; 41: 79-83.

8. Mirhendi SH, Kordbacheh P, Kazemi B, Samiei S, Pezeshki M, Khorramizadeh MR. A PCR-RFLP Method to Identification of the Important Opportunistic Fungi: Candida Species, Cryptococcus neoformans, Aspergillus famigatus and Fusarium solani. Iranian J Publ Health 2001; 30, 103-6.

9. Jordan JA. PCR identification of four medically Candida species. J Clin Mic 1994; 32: 1962-7.

10. Einsele H, Hebart H, Roller G, Muller CA. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. J Clin Microbial 1997; 35: 1353-60.

11. Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. Rapid identification of candida species with specific DNA probes J clin Microbiol 1998; l36: 3260-5.

12. Campin AC, Matteno RC. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of candidiasis by amplification of an HSP gene fragment. J Med Mic 1993; 39: 233-8.

13. Morace J, Sangvinettio M, Posteraro B. Identification of various medically candida species by PCR-restriction enzyme analysis. J clin Mic 1997; 35: 667-72.

14. Fujita SI, Lasker BA, Lott TJ, Morison CJ. Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA form candida species in blood. J Clin Mic 1995; 33: 962-7.

15. Hagnes KA, Westerneng TJ, Fell JW. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. J Med Vet 1995; 33: 319-25.

16. Van Deventer AJ, Goessens VHF, Belkum AV, Verbrugh HA. Improved detection of candida albicans

by PCR in blood of neutropenic mice with systemic candidasis. J clin Mic 1995; 33: 625-8.

17. Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of Aspergillus species using internal transcribed spacer region 1 and 2. J Clin Mic 2000; 38: 1510-5.

18. Chen YC, Eisner CJ, Katter M, Barrett K, kafe KS. Identification of Medically important yeasts using PCR based detection of DNA sequence polymorphism in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. J Clin Mic 2000; 38: 2302-10.

19. Buchman TG, Rossier M, Merz G, Charache P. Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification. Surgery 1990; 108: 308-74.