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

فصلنامه
دانش میکروب شناسی
سال دوم، شماره ۵، زمستان ۱۳۸۸

شناسایی منژیت کریپتوکوکوسی به روش رنگ آمیزی، کشت و PCR

محمد حسن شاه حسینی[۲و۱*]، محمد قهری[۳]، شهروز نصرالهی شیرازی[۱]، سارا سعادتمند[۱] و سید احمد حسینی[۴]
۱. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست‌شناسی ۲. دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی ۳. دانشگاه امام حسین، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی ۴. آزمایشگاه رسالت، تهران
E.mail: shahhosseiny@yahoo.com

چکیده

کریپتوکوکوس نئوفورمنس **مخمری کپسول دار و فرصت طلب می باشد که معمولاً افراد دچار نقص سیستم ایمنی را درگیر می کند اما با انتشار جهانی می تواند در افراد سالم نیز بیماری ایجاد کند. عفونت در پی استنشاق قارچ پدیدار گشته و منژیت فرم شایع بالینی بیماری می باشد. روشهای متعددی برای تشخیص این عامل کشنده رایج است اما هیچکدام از این روشها، حساسیت، اختصاصیت و سرعت قابل قبولی را ندارند. بر روی نمونه های مایع مغزی نخاعی ۱۴۰ بیمار مشکوک به منژیت، کشت، رنگ آمیزی و PCR انجام شد. یک روش PCR حساس با استفاده از پرایمرهای ITS1 و CN4 و هدف ژنی 16S rRNA، طراحی و بر روی نمونه های مایع مغزی نخاعی جمع آوری شده از بیماران بکار گرفته شد. نتیجه کشت و رنگ آمیزی(Indian ink) همه نمونه ها منفی بود. در یک نمونه (مربوط به بیمار HIV مثبت که دچار منژیت شده بود) نتیجه PCR مثبت بود. حساسیت PCR در حد ۱۰ ارگانیسم در میلی لیتر *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* ارزیابی شد. آزمون ویژگی با گونه های مختلف کاندیدا و آسپرژیلوس و همین طور باکتری های شایع ایجاد کننده منژیت انجام شد و هیچ محصولی تکثیر نگردید.این مطالعه دلالت بر این موضوع دارد که PCR روشی حساس و قابل اعتماد برای تشخیص سریع *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در نمونه های مایع مغزی نخاعی است.**

واژگان کلیدی: *کریپتوکوکوس نئوفورمنس*، واکنش زنجیره ای پلیمراز، مایع مغزی نخاعی، منژیت.

مقدمه

کریپتوکوکوس نئوفورمنس مخمری فرصت طلب است که از طریق استنشاق گردوغبار آلوده به کونیدیهای زنده قارچ در انسان ایجاد بیماری می کند و معمولاً افراد دچار نقص سیستم ایمنی سلولی را درگیر می نماید (۴-۱). از جمله افرادی که بیشتر در معرض ابتلا به کریپتوکوکوزیس هستند می توان به بیماران HIV مثبت، بیمارانی که پیوند عضو انجام داده اند، بیمارانی که تحت درمان طولانی مدت با داروهای استروئیدی هستند، بیماران سرطانی و بیماران دیابتی اشاره کرد(۵). بیماری به دو شکل ریوی و مغزی (در اثر انتشار از طریق ریه) تظاهر می نماید، با این وجود اشکال مختلف جلدی، مخاطی، استخوانی و احشائی بیماری نیز در اثر انتشار از طریق کانون اولیه ریوی گزارش شده است. گونه بیماریزای انسانی، کریپتوکوکوس نئوفورمنس می باشد که بنا به دلایل ناشناخته ای، حمله به سیستم اعصاب مرکزی را ترجیح می دهد و انتشار معمولاً از طریق عفونت های آشکار یا غیر آشکار ریوی به این مراکز صورت می گیرد. در گرفتاری سیستم اعصاب مرکزی پیدایش مننگوآنسفالیت شایعتر از گرانولوم مغز یا نخاع می باشد وکریپتوکوکوز سیستم عصبی مرکزی در

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

صورت عدم معالجه معمولاً کشنده است.

تحقیقات بسیاری در زمینه تشخیص *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* صورت گرفته است که در برخی از آنها به مقایسه چند روش تشخیصی پرداخته شده است. به عنوان مثال توسط Rappelli و همکاران سه روش کشت، سرولوژی و PCR با هم مقایسه گردید طبق نتایج حاصل از مطالعه Rappelli و همکاران، در تشخیص *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* حساسیت روش های کشت ۶۷٪، سرولوژی ۸۹٪ و PCR ۹۸٪ بدست آمد (۶).

تشخیص مننژیت کریپتوکوکوسی معمولاً با مشاهده سلولهای *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در مایع نخاع و جدا نمودن آن در کشت انجام می شود. به طور کلی روشهای مبتنی بر کشت، تکنیکهای وقت گیر با حساسیت پایین هستند و نیازمند امکانات و تجربه کافی برای تفسیر نتایج می باشند و همچنین روشهای رنگ آمیزی نیز حساسیت لازم را ندارند. روشهای سرولوژیکی که بر مبنای واکنش آنتی ژن - آنتی بادی هستند دارای حساسیت و دقت بالاتری نسبت به دو روش فوق می باشند اما به دلیل بروز واکنشهای متقاطع، امکان وجود جوابهای مثبت کاذب و همچنین منفی کاذب وجود دارد. از این رو برای تشخیص این عامل نیاز به روشی با حساسیت و اختصاصیت و سرعت بالا وجود دارد که محدودیت های روش های فوق را نداشته باشد. در سال های اخیر جهت غلبه بر این مشکلات، روش های تکثیر اسید نوکلئیک مانند واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) توسعه فراوانی یافته است. امروزه روش های تشخیصی بر اساس PCR به دلیل داشتن حساسیت، ویژگی و دقت بیشتر، روشهایی مناسب جهت تشخیص عواملی همچون کریپتوکوکوس نئوفورمنس به شمار می روند که این امر در تحقیقات پیشین نیز به اثبات رسیده است (۹-۷). میزان حساسیت و دقت PCR در شناسایی برخی قطعات خاص ژنوم *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* تا حد زیادی به روش استخراج DNA، ژن هدف، پرایمرهای طراحی شده و روش شناسایی محصول بستگی دارد که در تحقیقات مختلف متفاوت است (۱۰-۱۶). پرایمرهای طراحی شده عموماً جهت بخشهای مشترک ژن 16S rRNA (۱۷)، ژن کپسول(۱۸) و یا هدف های دیگر مانند ژن آنزیم فسفولیپاز (۱۹) طراحی شده است. با این وجود، بخش های به شدت ثابت موجود در توالی ژن rRNA *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* آن را از نظر طراحی پرایمر مخصوص گونه، جذاب نموده است.

هدف مطالعه حاضر، مقایسه روش های کشت، رنگ آمیزی(Indian ink) و PCR جهت شناسایی کریپتوکوکوس نئوفورمنس در نمونه های مایع مغزی نخاعی و بهینه نمودن روش تشخیص کلینیکی مننژیت کریپتوکوکوسی است.

مواد و روش ها

نمونه های مایع مغزی نخاعی ۱۴۰بیمار بیمار مشکوک به مننژیت که از ۵ بیمارستان که دارای بخش HIV، اعصاب و پیوند عضو بودند (۹۲ مورد از بیمارستان بقیه ا.. تهران- ۲۰ نمونه از بیمارستان شریعتی – ۵ نمونه از بیمارستان امام خمینی – ۱۵ نمونه از بیمارستان نمازی شیراز – و ۸ نمونه هم از بیمارستان دستغیب شیراز) مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه ها به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری انتقال یافت و در۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی به آرامی تخلیه گردید و مقداری از رسوب ته لوله را روی لام ریخته و با یک قطره جوهر هندی(مرکب) مخلوط کردیم و پس از قرار دادن لامل روی آن، زیر میکروسکوب مورد بررسی قرار دادیم که در صورت وجود کریپتوکوکوس نئوفورمنس، هاله شفاف و واضحی اطراف سلول مخمری دیده می شود که به آن منظره آسمان پر ستاره را می دهد. همچنین مقداری از رسوب بر روی محیط کشت Niger seed agar (Acumedia Company) کشت گردید و پلیت ها به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند (معمولاً کلنی های کریپتوکوکوس نئوفورمنس در عرض سه روز رشد می کنند).

استخراج DNA از نمونه های مایع مغزی نخاعی

به مقدار باقی مانده رسوب، ۵۰ µL آب مقطر استریل اضافه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده و بلافاصله بعد از حرارت، لوله ها در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی که حاوی DNA استخراج شده می باشد به لوله جدیدی منتقل شد که از این DNA به عنوان الگو در مرحله بعد استفاده

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

کردیم. DNA ژنومی باکتریها و مخمر های دیگر مورد استفاده در این تحقیق نیز به روش جوشاندن استخراج شد. DNA سلول انسانی بوسیله کیت DNG PLUS (سیناژن) به ترتیب زیر استخراج شد.

محلول DNG Plus را با قرار دادن در ۳۷ درجه و تکان دادن آرام، کمی گرم کرده، µl ۱۰۰ از نمونه را با µl ۴۰۰ محلول DNG Plus مخلوط نموده و به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه ورتکس گردید. نمونه در این مرحله باید به طور کامل به صورت سوسپانسیون درآید و هر گونه تجمع و یا توده ای، تخریب شده و از بین رود. سپس µl ۳۰۰ ایزوپروپانول را اضافه کرده، ۱۰ مرتبه وارونه نموده و متعاقب آن، لوله ها را در فریزر به مدت ۲۰دقیقه قرار داده و بعد در rpm ۱۲۰۰۰برای مدت ۱۰دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی را به آرامی خالی کرده و تیوب بطور واژگون بر روی دستمال کاغذی قرار داده شد. ml ۱ اتانول سرد ۷۵٪ را به رسوب اضافه کرده و به مدت ۵- ۳ ثانیه ورتکس و سپس در دورrpm ۱۲۰۰۰برای مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ نمودیم. اتانول را کاملاً خالی کرده و رسوب را در ۶۵ درجه خشک کرده، رسوب که محتوی DNA است در µl ۵۰ آب همراه با تکان دادن آرام و قرار دادن در ۶۵ درجه خوب حل گردید. DNA های استخراج شده برای بررسی ویژگی تست PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

پرایمرها و شرایط PCR

پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه، پرایمرهای مخصوص ژن ۱۶S rRNA کریپتوکوکوس نئوفورمنس می باشد (جدول۱).

جدول۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر DNA کریپتوکوکوس نئوفورمنس.

	Sequence(5'---------3')
ITS1	5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'
CN4	5'ATCACCTTCCCACTAACACATT3'

برای انجام واکنش PCR با استفاده از لوله های ۲۰۰ میکرولیتری و با حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر به ترتیب زیر عمل گردید:

۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده با استفاده از پرایمرهای جلویی و عقبی مخصوص ژن 16S rRNA با غلظت نهایی ۰/۴ میکرولیتر (یک میکرولیتر از غلظت ده میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (X ۱۰) (سیناژن)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ($MgCl_2$) (از غلظت ۵۰ میلی مولار(سیناژن))، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰میلی مولار)(سیناژن)و ۰/۳ میکرولیتر آنزیمTaq DNA Polymerase (سیناژن)، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تکثیر یافت. چرخه های حرارتی شامل یک سیکل ۶ دقیقه ای ۹۴ درجه سانتی گراد،۴۰ سیکل متوالی (شامل۹۴درجه سانتی گراد ۳۰ثانیه، ۶۲ درجه سانتی گراد ۳۰ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد ۱دقیقه) و یک سیکل پلیمریزاسیون نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. پس از به پایان رسیدن سیکل های حرارتی، برای مشاهده DNA تکثیر شده از تکنیک الکتروفورز استفاده شد. محصول PCR (۴۱۵جفت باز) در کنار سایز مارکر و کنترل مثبت و منفی، بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد و با استفاده از اتیدیوم بروماید و نور UV بر روی دستگاه ترانس ایلومینیتور، بررسی گردید. در صورت وجود DNA *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در نمونه، باند ۴۱۵ جفت بازی مشاهده خواهد شد که مربوط به قطعه تکثیری در واکنش PCR می باشد.

حساسیت و ویژگی

جهت بررسی حساسیت جفت پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه، رقت هایی از سوسپانسیون *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* با واحد کلنی ساز مشخص (CFU)، تهیه شد و استخراج DNA از این رقت ها به روش جوشاندن انجام گرفت و سپس آزمون PCR بر روی رقت های تهیه شده انجام گرفت. آزمون ویژگی هم با استفاده از تمام میکروارگانیسم های ذکر شده در بخش سوشها، و همچنین DNA سلول انسانی انجام شد. سوش

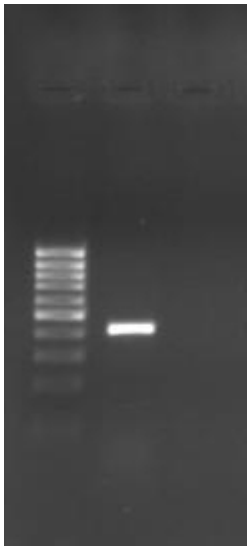
های مورد استفاده در این مرحله از تحقیق عبارت بودند از *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* تهیه شده از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران PTCC، *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا کروزئی*، *کاندیدا کفیر*، *استرپتوکوکوس پنومونیه* و همچنین سلولهای انسانی، که جهت آزمون ویژگی پرایمرهای مورد استفاده در PCR، مورد آزمایش و ارزیابی قرار گرفتند.

توالی یابی

تعیین توالی DNA در دو جهت با استفاده از روش ختم زنجیره (Dideoxy Chain Termination) و بوسیله کمپانی ماکروژن کره انجام گردید.

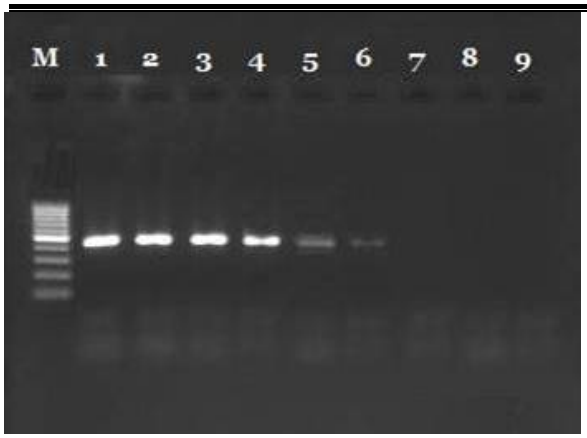
نتایج و بحث

بر روی DNA استخراج شده از سوش کریپتوکوکوس نئوفورمنس (کشت داده شده بر روی محیط کشت اختصاصی)، تست PCR اپتیمایز گردید (شکل۱).



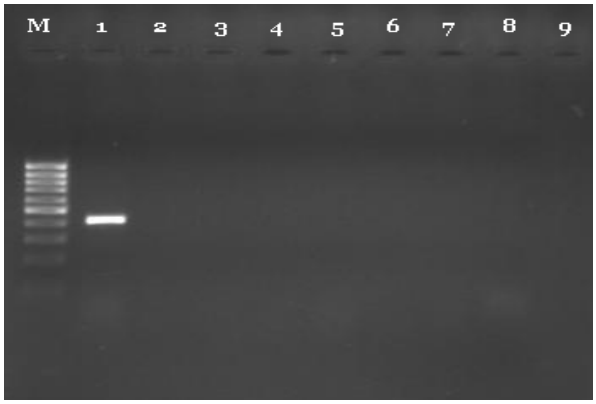
شکل ۱. تست اپتیمایز شده PCR بر روی سوش استانداردکریپتوکوکوس نئوفورمنس. لاین M : سایز مارکر فرمنتاس (100 bp DNA Ladder) ، لاین ۱: تست PCR مثبت، لاین ۲: کنترل منفی.

از طریق تهیه رقت های سری ازکشت این مخمر، و انجام استخراج DNA و تست PCR، حد تشخیص (حساسیت) در حد ۱۰ کپی در نمونه ی مورد آزمایش به دست آمد (شکل۲).



شکل ۲. آزمون حساسیت PCR با استفاده از نمونه های کلنی شمارش شده کریپتوکوکوس نئوفورمنس (CFU مشخص).M: سایز مارکر فرمنتاس (100bp DNA Ladder)، لاین ۱: نمونه کنترل مثبت، لاینهای ۶-۲: حاوی نمونه های مشخص و به ترتیب شامل: ۲ : (۱۰۰۰۰۰CFU)، ۳: (۱۰۰۰۰CFU)، ۴: (۱۰۰۰ CFU)، ۵ : (۱۰۰ CFU)، ۶ : (۱۰CFU)، ۷: (۵CFU)، ۸: (۱CFU)، ۹: نمونه کنترل منفی.

در آزمون ویژگی، هیچ محصول نا خواسته ای با DNA گونه های مختلف کاندیدا، استرپتوکوکوس پنومونیه، استافیلوکووس اورئوس و همین طور DNA انسان دیده نشد (شکل۳).

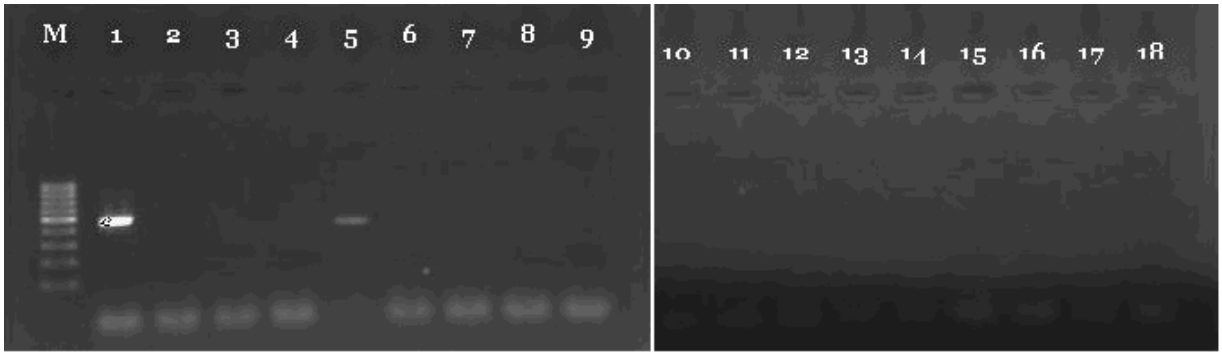


شکل۳. آزمون ویژگی PCR

M: سایز مارکر فرمنتاس (100bp DNA Ladder) ، لاین ۱: نمونه کنترل مثبت، لاین۲: کاندیدا آلبیکنس، لاین۳:کاندیدا گلابراتا، لاین۴:کاندیدا تروپیکالیس، لاین۵:کاندیدا کروزی، لاین۶:کاندیدا کفیر، لاین ۷:استرپتوکوکوس پنومونیه، لاین۸: DNA انسان، لاین۹:کنترل منفی.

جهت تشخیص عفونتهای کریپتوکوکوسی در نمونه های مایع مغـزی نخاعـی، از پرایـمرهای اختصاصی ITS1 و

CN4 استفاده شد. آزمون PCR در مورد یک نمونه، مثبت بود (شکل۴)، در حالی که نتیجه کشت و رنگ آمیزی برای تمامی نمونه ها منفی بود. جهت بررسی و تأیید محصول PCR تکثیر شده در نمونه مرضی، قطعه ۴۱۵ جفت بازی توسط تکنیک Sequencing تعیین توالی شد. مقایسه توالی حاصل با سکانس های موجود از طریق برنامه BLAST، مطابقت حدود ۱۰۰ درصد را نشان داد.



شکل ۴. الکتروفورز ژل آگاروز محصول PCR نمونه های مایع مغزی نخاعی بیماران با استفاده از پرایمرهای ITS1 و CN4 .
لاین M: سایز مارکر فرمنتاس (100 bp DNA Ladder) ، لاین ۱: کنترل مثبت، لاین ۴-۲ و ۶-۱۷: نمونه های مایع مغزی نخاعی منفی، لاین ۵: نمونه مایع مغزی نخاعی آلوده به کریپتوکوکوس نئوفرمنس، ستون۱۸: کنترل منفی.

از عواملی که موجب کاهش مورتالیتی، موربیدیتی و نیز کاهش هزینه های بیمارستانی بیماری های عفونی می گردد، تشخیص سریع و دقیق عوامل عفونی می باشد. روش های سنتی مبتنی بر کشت گرچه درمواردی هنوز به عنوان استاندارد طلایی مطرح است ولی عموماً ویژگی های یک روش مطلوب در شناسایی سریع میکروارگانیسم ها و از جمله کریپتوکوکوس نئوفورمنس را ندارند. این مسئله که در روشهای کشت و رنگ آمیزی نتایج منفی کاذب رخ می دهد هم به دلیل حساسیت کم این تست ها، و گاهی نیز ممکن است به دلیل دیر رسیدن نمونه به آزمایشگاه باشد که در این حالت ممکن است سلولهای *کریپتو کوکوس نئوفورمنس* از بین رفته باشند. در روش های کشت و رنگ آمیزی نیاز به سلولهای زنده است، و اگر سلولها به دلایل مختلفی از جمله تعلل در انتقال نمونه به آزمایشگاه مرده باشند، منفی کاذب رخ می دهد. اما در واکنش PCR، چون تنها به ژنوم عامل مورد نظر نیاز است، حتی در صورت وجود سلولهای مرده، نتیجه تست مثبت خواهد شد. این مسئله، حساسیت تست PCR را تا حد زیادی افزایش داده است و دلیلی دیگر برای مناسب بودن این روش به عنوان یک روش تشخیص کلینیکی مطمئن است. از آنجا که مننژیت کریپتوکوکوسی بیماری ای بسیار کشنده است و نیاز به درمان فوری و صحیح دارد، جدا سازی *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* از مایع مغزی نخاعی حائز اهمیت است. لذا تشخیص به موقع این مخمر در افراد مبتلا به نوروکریپتوکوکوزیس نقش مهمی را در کاهش میزان مرگ و میر ناشی از این بیماری دارد. پایین بودن میزان جداسازی *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در ایران در مقایسه با کشورهای دیگر، بیانگر پایین بودن میزان شیوع عفونت های ناشی از این مخمر نمی باشد، بلکه این اختلاف مربوط به اختلاف روش های شناسایی می باشد و تحقیقات نشان داده که هر قدر روش های شناسایی دقیقتر و حساستر باشند، نسبت بالاتری از *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* شناسایی می گردد.

در این مطالعه، طبق تجسسی که در بسیاری آزمایشگاه ها و بیمارستان ها انجام شد، میزان بروز مننژیت کریپتوکوکوسی را بسیار کم ابراز می کردند. تا حدی که در برخی از این بیمارستان ها و آزمایشگاه ها، میزان بروز این بیماری را هر ۱۰ یا ۱۵ سال یک مورد عنوان می کردند. این در حالی است که در طول اجرای این تحقیق(۱ سال) از طریق روش PCR، یک نمونه مثبت بدست آمد. با اینکه تعداد نمونه های مثبت در این تحقیق زیاد نیست، اما توسط روش های کشت و رنگ آمیزی موفق به شناسایی این نمونه نشدیم.

در مطالعات مشابه که از تکنیک کشت به همراه روش های مولکولی دیگر مثل روش PCR استفاده شده، نشان داده شده است که تکنیک کشت وقت گیر و دارای نتایج منفی کاذب زیادی می باشد. در مواردی هم که درمان پیش از نمونه گیری انجام شود، نتیجه ی کشت منفی گزارش می گردد. لذا برای تعیین هویت کریپتوکوکوس نئوفورمنس، روش کشت دارای نتایج ضعیفی بوده و بنابراین کاربرد روشهای مولکولی همچون PCR در اولویت است. همچنین در تحقیقاتی که در آنها به مقایسه روش های سرولوژیکی که برای تشخیص *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* استفاده می شود (LA,TA, IFA) با روش های مولکولی همچون PCR پرداخته اند، این امر که روش های مولکولی همچون PCR دارای حساسیت و اختصاصیت بیشتری است به وضوح نشان داده شده است(۲۰).

در تحقیقات مختلف روشهای مختلفی برای استخراج DNA به کار گرفته شده است از جمله می توان به استفاده کیتهای تجاری مانند QIAGEN(۲۱) BreedenLab، (۲۲)، استفاده از بافر لیز کننده(۲۳)، روش یخ زدن/ جوشاندن(۲۴) اشاره کرد. مطالعاتی که در آن به مقایسه روشهای مختلف استخراج DNA کریپتوکوکوس نئوفورمنس در تشخیص مولکولی پرداخته اند نادر است. در مطالعه حاضر از روش جوشاندن ساده در مورد نمونه های بالینی با نتایج مطلوب استفاده گردید.

بخش های مختف از ژنوم کریپتوکوکوس نئوفورمنس مانند ژن ۱۶S rRNA(۱۷)، ژن کپسول پلی ساکاریدی (۱۸) و ژن آنزیم فسفولیپاز(۱۹)، جهت تعیین هویت آن بوسیله ی PCR و تحت پروتکل ها و تکنیک های مختلف، مورد استفاده واقع شده است. در این مطالعه به دلیل اختصاصی بودن و همین طور توالی ثابت ژن ۱۶ S rRNA، این ناحیه از ژنوم به عنوان هدف تکثیر استفاده گردید. در این مطالعه، مناسب بودن پرایمرهای ITS1 و CN4 جهت تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمنس در نمونه های مایع مغزی نخاعی ثابت گردید. شرایط بهینه شده ی این مطالعه صرفاً موجب تولید محصول اختصاصی با درجه ی بالایی از ویژگی و حساسیت و بدون هیچ محصول نا خواسته ای گردید. اگرچه تعداد نمونه های مثبت در این مطالعه زیاد نمی باشد، اما با به کار بردن تست PCR، وجود کریپتوکوکوس یا دست کم ژنوم آن در نمونه مایع نخاع مورد آزمایش که آزمایشهای مستقیم میکروسکپی و کشت بر روی آن منفی بود، مشخص گردید و به این وسیله نشان داده شد که میزان بروز مننژیت کریپتوکوکوسی، بیش از میزانی است که معمولاً گزارش می شود. که این مسئله به علت حساسیت کم تست هایی است که به منظور تشخیص این مخمر به کار می روند. نتایج این تحقیق نیز صحت این مسئله را تأیید می کند زیرا با وجود اینکه در این تحقیق تنها یک نمونه مثبت بدست آمد اما توسط روشهای کشت و رنگ آمیزی موجود، موفق به شناسایی کریپتوکوکوس نئوفورمنس نشدیم، ولی از طریق روش PCR، یک نمونه مثبت که مربوط به بیمارHIV مثبتی که در فاز حاد بیماری بود شناسایی شد و از آنجا که مننژیت کریپتوکوکوسی در صورت عدم درمان صحیح و به موقع شدیداً کشنده است، نمی توان این امر که روش های مبتنی بر کشت دارای حساسیت کمتری هستند را خصوصاً در مورد چنین بیماری کشنده ای نادیده گرفت. در تحقیقات مشابه دیگری که از روش های رنگ آمیزی، کشت و PCR برای تشخیص این مخمر استفاده کرده بودند، تعداد نمونه های مثبت PCR را بیشتر از روش کشت و رنگ آمیزی نشان می دهند که این امر بیانگر حساسیت و دقت بیشتر روش PCR نسبت به روش های کشت و رنگ آمیزی می باشد(۲۷).

مقایسه روشهای مختلف PCR، به دلایل: اختلاف در جمع آوری نمونه، روشهای استخراج، حجم نمونه، ژن هدف، پرایمر، پارامترهای مربوط به سیکل حرارتی و روش شناسایی، دارای مشکلات خاص خود می باشد(۲۶،۲۵). بنابر این فقدان یک روش ثابت برای ارزیابی متدهای مختلف به کار رفته، مقایسه بین آنها را مشکل کرده است. در نتیجه نیاز به یک روش استاندارد و حساس جهت ارزیابی روشهای مختلف، کاملاً احساس می شود.

با وجود مراقبت های زیاد و فضاسازی مناسب جهت تکنیکهای تکثیری همچون PCR، باز امکان آلودگی با DNA در سیستم تشخیص مولکولی وجود دارد که در نتیجه باعث پاسخ مثبت کاذب می گردد. بنابر این با بکار بردن کنترل های مناسب (کنترل مثبت، منفی و یا نوعاً کنترل درونی) در مراحل مختلف استخراج DNA، تکثیر

و مرحله ی تشخیص، کمک شایانی به کاهش آلودگی و نشان دادن آن می نماید. مقایسه بین لابراتواری نیازمند کنترل کیفی در تکنیک های تکثیر اسید نوکلئیک در شرایط آزمایشگاه می باشد. برای حل مشکل آلودگی، فضاسازی مناسب امری ضروری است که باعث کاهش نتایج مثبت کاذب می گردد. در ضمن برای انجام روشهای مولکولی مانند PCR نیاز به تجهیزات آن می باشیم. در این بررسی سعی شد با فضاسازی مناسب و به کارگیری تجهیزات مقتضی هر بخش، ریسک آلودگی و خصوصاً مثبت های کاذب را با توجه به کنترل های مثبت و منفی کاملاً از بین ببریم.

به طور کلی می توان گفت روشهای کلاسیک تشخیصی، به دلایل محدودیت های ذاتی(صرف وقت زیاد، معمولا" حساسیت کم، نیاز به مهارت و تجربه زیاد و همین طور مراحل دشوار و پر زحمت) فاقد معیارهای یک روش ایده آل جهت شناسایی کریپتوکوکوس نئوفورمنس است. ولی روشهای مولکولی همچون روشهای تکثیر اسیدنوکلئیک در شرایط آزمایشگاه، به دلیل پتانسیل بالقوه و بالفعل، کاربرد فراوانی در تشخیص عواملی همچون کریپتوکوکوس نئوفورمنس دارند. نتایج این مطالعه به طور روشنی دلالت بر این نکته دارد که سنجش PCR بر مبنای سکانس های ژن ۱۶S rRNA، یک تکنیک ارزشمند و قابل اعتماد جهت شناسایی کریپتوکوکوس نئوفورمنس در مایع مغزی نخاعی می باشد.

تقدیر و تشکر

به این وسیله ازهمکاری های صمیمانه خانم دکتر مسلمی جهت set up تکنیک مولکولی، آقای رضا داورزنی سوپروایزر آزمایشگاه رسالت و خانم بیرقی کارشناس آزمایشگاه رسالت که در فراهم آوردن امکانات عملی و فنی این تحقیق، نویسندگان مقاله را یاری دادند و همچنین از خانم آقا پور از بیمارستان شریعتی، خانم آریا از بیمارستان نمازی، آقای دکتر سلطان پور و خانم مجیدی از بیمارستان بقیه ا... که نمونه های مایع مغزی نخاعی مربوط به بیماران را در اختیار گذاشتند، و از آقای محمد جبلی جهت امور کامپیوتری، تقدیر و تشکر به عمل می آید.

منابع

1- Lui G., Lee N., Tso Y. K., Lam E., Chau S., Lai R., Cockram C. S. (2006). Cryptococcosis in apparently immunocompetent patient. QJMed. **99**(3): 143-151.

2- Chen J., Varma A., Diaz M. R., Litvintseva A. P., Wollenberg K. K., Kwon-Chung K. J. (2008). Cryptococcus neoformans Strains and Infection in Apparently Immunocompetent Patients, China. Emerging Infectious Diseases. **14**(5):755-762.

3- Kralovic S.M., Rhodes J.C. (1998). Utility of routine testing of bronchoalveolar lavage fluid for cryptococcal antigen. J. Clin. Microbiol. **36**:3088-3089.

4- Diaz M. R., Fell J. W. (2005). Use of a suspension Array for Rapid Identification of the Varieties and Genotypes of the Cryptococcus neoformans Species Complex. J Clin Microbio. **43**(8): 3662-3672.

5- Bialek R., Weiss M., Bekure K. (2002). Detection of Cryptococcus neoformans DNA in Tissue Samples by Nested and Real-Time PCR Assays.Clinical and Vaccine Immunology. **9**(2): 461-469.

6- Rappelli P., Are R., Casu G., Fiori P. L., Cappuccinelli P., Aceti A. (1998). Development of a nested PCR for detection of Cryptococcus neoformans in cerebrospinal fluid. J.Clin. Microbiol. **36**: 3438-3440.

7- Prariyachatigul C., Chaiprasert A., Meevootisom V. (1996). Assessment of a PCR technique for the detection and identification of Cryptococcus neoformans. Journal of Medical & Veterinary Mycology; **34**: 251-258.

8- Haynes K. A., Sullivan D. J., Coleman D. C., Clarke J.K. (1995). Involvement of Multiple Cryptococcus neoformans Strains in a Single Episode of Cryptococcosis and Reinfection with Novel Strains in Recurren Infection Demonstrated by Random Amplification of Polymorphic DNA and DNA Fingerprinting. J Clin Microbiol. **33**: 99-102.

9- Raimondi A., Ticozzi R., Sala G., Grazia Blotti M. (2007). Genotype-based differentiation of the Cryptococcus neoformans serotypes by combined PCR-RFLP analysis of the capsule-associated genes CAP10and CAP 59. Medical Mycology. **45**: 491-501.

10- Mcfadden D. C., Casadevall. (2001). Capsule and melanin synthesis in Cryptococcus neoformans. Medical Mycology. **39:** 19-30.

11- Mitchell T.G., Freedman E.Z., White T., Taylor J.W. (1994). Unique oligonucleotide primers in PCR for identification of Cryptococcus neoformans. J. Clin. Microbiol. **32**: 253-255.

12- Kwon-Chung K.J., Varma A. (2006). Do major species concepts support one,two or more species within Cryptococcus neoformans. FEMS Yeast Res. **6**: 574–584.

13- Saag M. S., Graybill R. J., Larsen R. A., Pappas P. G., Perfect J. R., Powderly W. G., Sobel J. D., Dismukes W. E. (2000). Practice guidelines for the management of cryptococcal disease.Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. **30**: 710–718.

14- Goldman D. L., Khine H., Abadi J., Lindenberg D. J., Pirofski L., Niang R., Casadevall A. (2001). Serologic evidence for Cryptococcus neoformans infection in early childhood. Pediatrics; 107: E66. E66.

15- Kralovic S.M., Rhodes J.C. (1998). Utility of routine testing of bronchoalveolar lavage fluid for cryptococcal antigen. J Clin Microbiol. **36**: 3088–3089.

16- Chen S., Sorrell T., Nimmo G., Speed B., Currrie B., Ellis D., et al. (2000). Epidmiology and host-and variety-dependent characteristics of infection due to Cryptococcus neoformans in Australia and New Zealand. Clin Infect Dis. **31**: 499–508.

17- Paschoal R. C., Hirata M. (2004). Neurocryptococcusis: DIAGNOSIS BY PCR METHOD. Rev. Inst.Med.trop.S.Paulo. **46**(4): 203-207.

18- Chang Y. C., Kwon-Chung K. J. (1999). Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, CAP10, of Cryptococcus neoformans. J Bacteriol. **181**: 5636-5643.

19- Anastasia P., Litvintseva, Lori Kestenaum, Rytas V. (2005). Comparative Analysis of Environmental and Clinical Population of Cryptococcus neoformans. Journal of Clin Microbiol. 43(2): 556-564.

20- Dolan C. S., Immaculata X., Ashutosh B.I., Dipankar M., Bhowmik V. (2009). Detection of Cryptococcus by conventional, serological and molecular methods. J Med Microbiol.; **58**:1098-1105.

21- Mitchell T.G., Perfect J.R. (1995). Cryptococcosis in the era of AIDS—100 years after the discovery of Cryptococcus neoformans. Clin. Microbiol. Rev. **8**: 515-548.

22- Kwon-Chung K. J., Edman J. C., Wickes B.L. (1992). Genetic association of mating types and virulence in Cryptococcus neoformans. Infect. Immun. **60**: 602-605.

23- Stephen C., Lester S., Black W., Fyfe M., Raverty S. (2002). Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. Can. Vet. J. **43**: 792-794.

24- Brandt M.E., Hutwagner. Klug L. C., Baughman S., Rimland D. E., Graviss A., Hamill R. J., Thomas C., Pappas P.G., Reingold A. L., R. W. (1996). Pinner and the Cryptococcal Disease Active Surveillance Group. Molecular subtype distribution of Cryptococcus neoformans in four areas of the United States. J. Clin. Microbiol. **34**: 912-917.

25- Trilles L., Lazera M., Wanke B., Theelen B., Boekhout T. (2003). Genetic characterization of environmental isolates of the Cryptococcus neoformans species complex from Brazil. Med. Mycol. **41**: 383-390.

26- Meyer W., Castañeda A., Jackson S., Huynh M., Castañeda E. (2003). Molecular typing of IberoAmerican Cryptococcus neoformans isolates. Emerg. Infect. Dis. **9**: 189-195.

27- Tanaka K., Miyazaki T., Maesaki S. et al. (1996). Detection of Cryptococcus neoformans gene in patients with pulmonary cryptococcosis. J Clin Microbiol. **34**: 2826–2828.