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

Short Communication

Molecular Identification of *Corynebacterium minutissimum* in Skin Lesions Suspicious for Erythrasma by the PCR method

Maryam Mohammadi Tashakkori[1], Reza Kachuei[2*], Mahin Safara[3], Zeynab Ahmadi[4]

1- M.Sc. Student, Department of Biology, School of Basic Science, Islamic Azad University, Pishva-Varamin Branch, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Ph.D., Department of Medical Parasitology & Mycology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- M.Sc., Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1435116471, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
Email: kachueiz@yahoo.com

Received: 25/Jan/2014, Accepted: 21/Apr/2014

Abstract

Objective: Erythrasma is a chronic superficial infection of the intertriginous areas. Most laboratories use methylene blue stain and 10% KOH smear to identify *Corynebacterium minutissimum (C. minutissimum)* by direct observation of filamentous bacilli. Occasionally atypical forms can be seen that create problems in diagnosis. This study aims to use the polymerase chain reaction (PCR) method in order to definitively identify *C. minutissimum* as an agent of erythrasma.

Methods: This research was performed during 2013 on 100 skin scrapings suspicious for erythrasma which were obtained from various medical mycology laboratories in Tehran. Samples were tested by three methods - direct examination, culture and PCR. DNA was extracted by the modified phenol-chloroform method after which PCR was performed using designed primers. We sequenced some of the PCR products. The sensitivity and specificity of the PCR method was compared to the direct and culture examinations.

Results: Of the 100 samples, there were 25 positive samples according to PCR analysis, 13 positive by direct examination and 23 that cultured positive. DNA sequencing results showed the presence of *C. minutissimum*. The PCR method in comparison with direct examination had a sensitivity of 100% and a specificity of 86.2%. The study also showed that the PCR method in comparison with culture had a sensitivity of 100% and a specificity of 97.4%.

Conclusion: This study showed that the PCR method in comparison with the direct method and culture had a higher sensitivity in the detection of *C. minutissimum*. The present PCR method confirmed all typical and some of the atypical forms of *C. minutissimum* which indicated the importance of this method in the definitive diagnosis of erythrasma.

Keywords: Erythrasma, *Corynebacterium minutissimum,* PCR

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 17, No 2, Summer 2014, Pages: 83-91

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

مقاله کوتاه

شناسایی مولکولی کورینه باکتریوم مینوتیسیموم در ضایعات پوستی مشکوک به اریتراسما به روش PCR

مریم محمدی تشکری[۱]، رضا کچوئی[۲*]، مهین صف آراء[۳]، زینب احمدی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پیشوا ورامین، تهران، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران
۳- دکتری تخصصی، واحد قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۳۵۱۱۶۴۷۱، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی
Email: kachueiz@yahoo.com

دریافت مقاله: ۹۲/۱۱/۰۵ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۲/۰۱

چکیده

هدف: اریتراسما عفونت سطحی مزمن نواحی چین‌دار بدن است. در حال حاضر عامل اریتراسما را به روش معمول آزمایش مستقیم به‌صورت رنگ‌آمیزی بلودومتیلن یا با پتاس ۱۰ درصد از طریق مشاهده باسیل‌های رشته‌ای دراز تشخیص می‌دهند. در مواردی در بیماران مشکوک به اریتراسما، اشکال غیر معمول مشاهده می‌شود که تشخیص بیماری را دچار مشکل می‌کند. هدف از این مطالعه، معرفی روش PCR به‌منظور تشخیص قطعی کورینه باکتریوم مینوتیسیموم عامل بیماری اریتراسما است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه که در طول سال‌های ۹۲-۹۱ انجام شد، تعداد ۱۰۰ تراشه پوستی مشکوک به اریتراسما، از آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی پزشکی در تهران جمع‌آوری شد، نمونه‌ها به سه روش آزمایش مستقیم، کشت و روش PCR بررسی شد. DNA به روش فنل کلروفرم تغییر یافته استخراج شد و واکنش PCR با آغازگرهای طراحی شده انجام گرفت، سپس تعدادی از محصولات PCR تعیین توالی شد. همچنین حساسیت و اختصاصیت روش PCR با آزمایش مستقیم و کشت مقایسه شد.

نتایج: در این تحقیق، از تعداد کل ۱۰۰ نمونه، تعداد ۲۵ نمونه توسط PCR و ۱۳ نمونه توسط آزمایش مستقیم و ۲۳ نمونه توسط کشت از نظر کورینه باکتریوم مینوتیسیموم مثبت شد. نتیجه تعیین توالی وجود این باکتری را تأیید نمود. حساسیت و اختصاصیت روش PCR در مقایسه با آزمایش مستقیم به‌ترتیب ۱۰۰ درصد و ۸۶/۲ درصد بود. همچنین حساسیت و اختصاصیت این روش در مقایسه با کشت به‌ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۷/٤ درصد محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که روش PCR، در مقایسه با روش مستقیم و کشت، حساسیت بالاتری در شناسایی کورینه باکتریوم مینوتیسیموم دارد، روش مولکولی حاضر تمامی نمونه‌هایی که دارای اشکال معمول و شاخص این باکتری بود را تأیید نمود، اما برخی از نمونه‌های دارای اشکال غیر معمول را تأیید و برخی را تأیید ننمود که معرف اهمیت روش مولکولی در تشخیص بیماری و نیاز به این روش در تشخیص اریتراسما ست.

کلیدواژگان: اریتراسما، کورینه باکتریوم مینوتیسیموم، PCR

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، صفحات: ۸۳-۹۱

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

کورینه باکتریوم مینوتیسیموم (*Corynebacterium minutissimum*)، باسیل گرم مثبت، بدون اسپور، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری است و عامل بیماری اریتراسما (Erythrasma) است [۱]. بیماری اریتراسما عفونت مزمن طبقه شاخی پوست بوده که اغلب در نواحی چین‌دار بدن مانند زیر بغل، کشاله ران، ناف، زیر سینه و لای انگشتان به‌صورت لکه‌های مسطح قرمز یا قرمز مسی یا قهوه‌ای، خشک، بدون وزیکول، التهاب و ترشح بوده ولی با خارش خفیف همراه است. شایع‌ترین محل عفونت چین‌های کشاله ران است. بیماری بیشتر در مردان و در نواحی گرم و مرطوب دیده می‌شود [۲، ۳].

این بیماری انتشار جهانی دارد. بیماری در اروپا بیشتر از آمریکا بوده و در ایران در اکثر مناطق به‌خصوص نواحی جنوبی وجود دارد. عدم رعایت بهداشت فردی، ازدیاد رطوبت منجر به تشدید علایم بیماری می‌شود. این بیماری ممکن است با جرب، شپشک عانه، کچلی کشاله ران، درماتیت تماسی و تینه‌آ ورسیکالر (Tinea Versicolor) اشتباه شود. چون بیماران اهمیت زیادی به بیماری خود نمی‌دهند، اغلب موارد مزمن بیماری مشاهده می‌شود. عفونت بین انگشتان پا معمولاً به درمان مقاوم است. عامل بیماری ممکن است همراه با استافیلوکوک (*Staphylococcus*) و سودوموناس (*Pseudomonas*) یا درماتوفیت‌ها (*Dermatophytes*) دیده شود و در نتیجه تشخیص آن از عفونت‌های دیگر که توسط سایر عوامل باکتریایی و قارچی ایجاد می‌شود، دشوار است [۲].

با توجه به این‌که درمان بیماری اریتراسما با بیماری‌های قارچی و دیگر عوامل باکتریایی متفاوت است، بنابراین تشخیص صحیح این بیماری اهمیت دارد. در حال حاضر در اکثر آزمایشگاه‌ها برای تشخیص عامل بیماری اریتراسما از روش معمول آزمایش مستقیم به صورت رنگ‌آمیزی بلودومتیلن (Bleu de méthylène) استفاده می‌شود و در آزمایشگاه‌های تخصصی اغلب بدون رنگ‌آمیزی و با پتاس ۱۰ درصد اقدام به شناسایی کورینه باکتریوم مینوتیسیموم از طریق مشاهده اشکال معمول و شاخص (باسیل‌های رشته‌ای دراز) می‌نمایند. در مواردی در آزمایش مستقیم از طریق رنگ‌آمیزی بلودومتیلن تراشه‌های پوستی بیماران مشکوک به اریتراسما، اشکال غیر معمول [باسیل‌های معمولی، کوتاه و دیفترویید مانند (Diphtheroid)] مشاهده می‌شود که تکنسین‌های آزمایشگاه و حتی بعضی از متخصصین را نیز در تشخیص دچار مشکل می‌نماید و در ارایه گزارش جواب صحیح به پزشک مشکلاتی را فراهم می‌کند.

روش استفاده از محیط کشت برای جداسازی عامل بیماری اریتراسما معمول نبوده است و با توجه به سابقه استفاده از محیط‌های کشت بافت همراه با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف توسط برخی محققین در خارج تهیه این محیط‌ها آسان و مقرون به صرفه نیست [٤-٦]. روش‌های مولکولی روش‌های ساده، سریع و در عین حال حساس‌تری در تشخیص میکروارگانیسم‌ها است. مطالعات مولکولی انجام شده روی کورینه باکتریوم‌ها اغلب به روش PCR-RFLP روی دیگر گونه‌های کورینه باکتریوم به‌ویژه کورینه باکتریوم توبرکولوزیس (*Corynebacterium tuberculosis*) صورت گرفته است [۷-۱۳]؛ بر این اساس هدف اصلی این مطالعه طراحی روشی بر اساس PCR است که بتواند به‌طور سریع و دقیق باعث شناسایی کورینه باکتریوم مینوتیسیموم شود و از گزارش موارد منفی و مثبت کاذب جلوگیری نماید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این مطالعه طی ٦ ماه در طول سال‌های ۹۲-۹۱، تعداد ۱۰۰ نمونه تراشه از ضایعات پوستی مشکوک به اریتراسما، از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تخصصی قارچ‌شناسی مراکز بهداشتی و درمانی تهران (شامل آزمایشگاه نور، بیمارستان بقیه ا.. (عج) و واحد قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران) جمع‌آوری شد.

آزمایش مستقیم و کشت

در آزمایش مستقیم از روش معمول رنگ‌آمیزی بلودومتیلن استفاده شد، برای کشت از محیط‌های مولر هینتون آگار (Mueller Hinton Agar) با و بدون آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، بلاد آگار (Blood Agar) و پای مدیا (Pai Media) حاوی آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتوئین (Nitrofurantoin) استفاده شد، از محیط مولرهینتون آگار به‌عنوان یک محیط عمومی، از محیط بلاد آگار به‌عنوان یک محیط غنی و از محیط پای مدیا به‌عنوان محیط انتخابی کورینه باکتریوم‌ها استفاده شد.

روش مولکولی PCR

در روش مولکولی از پوسته‌های نمونه‌برداری شده، استخراج DNA به روش دستی فنل کلروفرم مطابق بورهان (Burhan) و همکاران [١٤] البته با تغییراتی انجام گرفت که در زیر به‌صورت خلاصه آمده است.

استخراج DNA

ابتدا مقدار کمی پوسته به میکروتیوب ١/٥ استریل حاوی ٣٠٠ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل افزوده شد، سپس در ٦٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٣٠ دقیقه انکوبه شد. در ادامه ٣٠٠ میکرولیتر بافر استخراج DNA و پروتئیناز K (به میزان ٥ میکرولیتر) افزوده و یک دقیقه ورتکس (Vortex) شد. جوشاندن محلول حاصل به‌مدت ٣٠ دقیقه، افزودن فنل اشباع و سانتریفوژ با دور ١٢٠٠٠ به‌مدت ١٠ دقیقه مراحل دیگر کار بود. در ادامه نمونه با محلول CI شستشو داده شد، محلول رویی به تیوب جدید منتقل و استات سدیم ٣ مولار و سپس اتانل ١٠٠ درصد سرد افزوده و در فریزر ٢٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از سانتریفوژ با دور ١٢٠٠٠، الکل ٧٠ درصد به رسوب حاصل اضافه و مجدد سانتریفوژ شد و در نهایت رسوب حاصل در بافر TE (Tris-EDTA Buffer) حل شد.

در این بررسی طی آزمایش‌های متعدد و تغییر متغیرهای مختلف اعم از مدت زمان واکنش تلاش شد تا روش فنل کلروفرم معمول بهینه شود.

طراحی آغازگر (Primer)

در این بررسی آغازگر اختصاصی کورینه باکتریوم مینوتیسیموم با نام‌های Minoo-R & Minoo-F با استفاده از دو برنامه نرم‌افزاری MEGA5.03 و Oligo Analyzer برای ناحیه ژنی قطعه ٦٥٩ جفت‌بازی ژن *rpoB* باکتری کورینه باکتریوم مینوتیسیموم طراحی شد، همچنین از آغازگرهای BetF و BetR برای تکثیر قطعه ٢٠٤ جفت‌بازی ژن بتا اکتین موجود در نمونه‌های بالینی به‌عنوان House Keeping ژن استفاده شد (جدول ١).

جدول ١ توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

آغازگر	توالی
Minoo F	5'- AGG CCC CGA ACG GTG AGA TG -3'
Minoo R	5'- ACC GGA GGC GTC GGT CAC G -3'
BetF	5'-CTC AGG AGG AGC AAT GAT CTTG-3
BetR	5'-CTG GGC ATG GAG TCC TGT GG-3

واکنش PCR

واکنش PCR در حجم ٢٥ میکرولیتر و مطابق برنامه زیر صورت گرفت، واسرشت ابتدایی در ٩٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٥ دقیقه و سپس ٣٥ دور واسرشت (٩٤ درجه سانتی‌گراد، ٣٠ ثانیه)، اتصال (٦١ درجه سانتی‌گراد، ٣٠ ثانیه)، گسترش (٧٢ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه) و در ادامه گسترش

نهایی (۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۷ دقیقه) انجام شد.

تعیین توالی

در این مطالعه محصولات PCR مربوط به نمونه‌های شماره ۲٤ و ۲۵ توسط کیت بیونیر (Bioneer) کره از روی ژل استخراج و از طریق شرکت ایرانی زیست فن آوری پیشگام برای تعیین توالی به کشور کره ارسال شد.

بررسی حساسیت و اختصاصیت روش‌ها

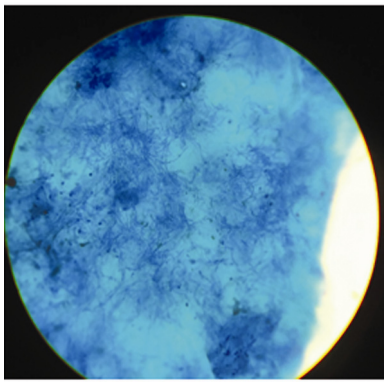
حساسیت و اختصاصیت روش مولکولی PCR در مقایسه با آزمایش مستقیم، همچنین حساسیت و اختصاصیت این روش در مقایسه با کشت مطابق آلتمند و بلاند (Altman & Bland) محاسبه شد [۱۵]. لازم به ذکر است استاندارد طلایی این مطالعه مشاهده باسیل‌های رشته‌ای دراز در آزمایش مستقیم بود که در حقیقت اشکال معمول و شاخص کورینه باکتریوم مینوتیسیموم است.

نتایج

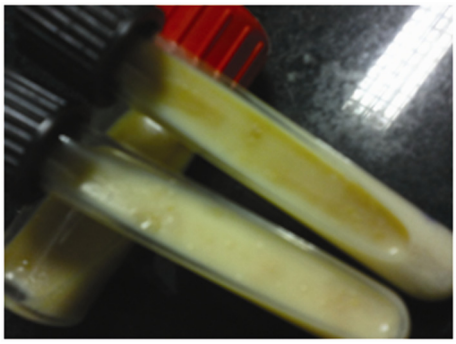
در این تحقیق از تعداد کل ۱۰۰ نمونه، تعداد ۲۵ نمونه (۲۵ درصد) توسط PCR و ۱۳ نمونه (۱۳ درصد) توسط آزمایش مستقیم و ۲۳ نمونه (۲۳ درصد) توسط کشت از نظر کورینه باکتریوم مینوتیسیموم مثبت شد (جدول ۲). شکل ۱ منظره میکروسکوپی کورینه باکتریوم مینوتیسیموم را در لام رنگ‌آمیزی شده با بلودومتیلن نشان می‌دهد. در این بررسی کورینه باکتریوم مینوتیسیموم از محیط‌های کشت مولر هینتون آگار با و بدون آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و محیط بلاد آگار جدا نشد اما از محیط پای مدیا حاوی آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتوین جدا شد. در شکل ۲ کلونی کورینه باکتریوم مینوتیسیموم را در محیط کشت پای مدیا حاوی آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتوین مشاهده می‌کنید.

جدول ۲ مشخصات بیماران مبتلا به اریتراسما همراه با نتایج آزمایش مستقیم (رنگ‌آمیزی بلودومتیلن)، کشت و PCR در بررسی حاضر

ردیف	کد	سن	جنس	شغل	محل ضایعه	آزمایش مستقیم	کشت	PCR
۱	E٤	۳٤	مذکر	نانوا	کشاله ران	+	+	+
۲	E٥	٥۲	مذکر	ورزشکار	کشاله ران	+	+	+
۳	E٦	٥۱	مذکر	کارمند	بین انگشتان پا	+	+	+
٤	E۷	۲۷	مذکر	کارمند	بین انگشتان پا	+	+	+
٥	E۸	٦٦	مونث	خانه‌دار	کشاله ران	+	+	+
٦	E۹	٦٦	مونث	خانه‌دار	زیر بغل	+	+	+
۷	E۱۳	۳۳	مذکر	آزاد	کشاله ران	+	+	+
۸	E۱٦	٥۰	مونث	بازنشسته	بین انگشتان پا	+	+	+
۹	E۲۱	٥۰	مونث	خانه‌دار	بین انگشتان پا	−	−	+
۱۰	E۲٤	٦٤	مونث	بازنشسته	زیر بغل	−	+	+
۱۱	E۲٤-۱	٦٤	مونث	بازنشسته	کشاله ران	−	+	+
۱۲	E۳۱	٤۳	مذکر	آزاد	کشاله ران	+	+	+
۱۳	E٥۲	۳٤	مونث	بازنشسته	کشاله ران	−	+	+
۱٤	E٥۹	۲۰	مذکر	دانشجو	کشاله ران	+	+	+
۱٥	E٦۲	٥٦	مونث	خانه‌دار	بین انگشتان پا	+	+	+
۱٦	E۷٤	٦٤	مونث	خانه‌دار	بین انگشتان پا	−	+	+
۱۷	E۸۲	٦۱	مونث	خانه‌دار	بین انگشتان پا	−	+	+
۱۸	E۸٤	٥۱	مونث	خانه‌دار	بین انگشتان پا	−	+	+
۱۹	E۸٥	۷۱	مونث	خانه‌دار	کشاله ران	−	−	+
۲۰	E۸۷	٥٦	مذکر	بازنشسته	بین انگشتان دست	−	+	+
۲۱	E۸۸	۲۰	مذکر	نجار	کشاله ران	−	+	+
۲۲	E۹۲	۳۳	مذکر	مهندس عمران	کشاله ران	−	+	+
۲۳	E۹۸	٤۰	مونث	خانه‌دار	کشاله ران	−	+	+
۲٤	E۹۹	۳۰	مذکر	کارمند	کشاله ران	+	+	+
۲٥	E۱۰۰	۲٥	مذکر	نظامی	کشاله ران	+	+	+



شکل ۱ منظره میکروسکوپی کورینه باکتریوم مینوتیسیموم در لام رنگ‌آمیزی شده با بلودومتیلن با بزرگنمایی ۱۰۰×

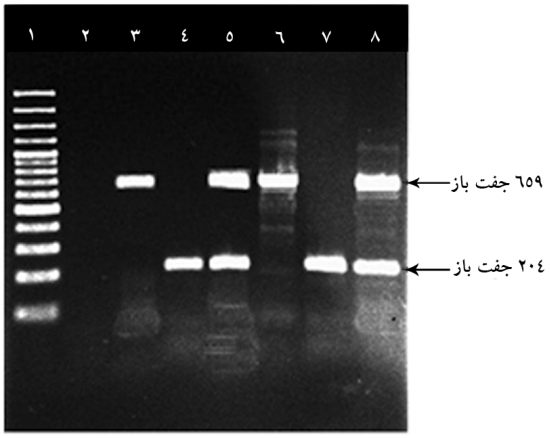


شکل ۲ کلونی کورینه باکتریوم مینوتیسیموم در محیط کشت پای مدیا حاوی آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتوین

جدول ۲ مشخصات بیماران مثبت از نظر اریتراسما را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌کنید اکثر موارد مثبت مربوط به کشاله ران است. حساسیت و اختصاصیت روش مولکولی PCR در مقایسه با آزمایش مستقیم به‌ترتیب ۱۰۰ درصد و ۸٦/۲ درصد بود. همچنین حساسیت و اختصاصیت این روش در مقایسه با کشت به‌ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۷/٤ درصد محاسبه شد.

نتایج ژل الکتروفورز محصولات PCR و Duplex PCR دو نمونه بالینی مثبت (ردیف ۲٤ و ۲۵) با آغازگرهای اختصاصی کورینه باکتریوم مینوتیسیموم و آغازگر بتا اکتین در شکل ۳ آمده است، باند ٦۵۹ جفت‌بازی معرف کورینه باکتریوم مینوتیسیموم است و باند ۲۰٤ جفت‌بازی نشان دهنده ژن بتا اکتین به‌عنوان House Keeping ژن است.

نتایج تعیین توالی معرف وجود کورینه باکتریوم مینوتیسیموم بود (جدول ۳).



شکل۳ نتایج ژل الکتروفورز محصولات PCR و Duplex PCR نمونه‌های بالینی پوسته: چاهک ۱) نشانگر (DNA Ladder ۱۰۰ جفت بازی)، چاهک ۲) کنترل منفی، چاهک ۳) پوسته بالینی ردیف ۲٤ با آغازگرهای اختصاصی کورینه باکتریوم مینوتیسیموم، چاهک ٤) محصول PCR نمونه پوسته بالینی ۲٤ با آغازگرهای بتا اکتین، چاهک ۵) محصول PCR نمونه پوسته بالینی ۲٤ با آغازگرهای اختصاصی و بتا اکتین، چاهک ٦) پوسته بالینی ۲۵ با جفت آغازگرهای اختصاصی، چاهک ۷) محصول PCR نمونه پوسته بالینی ۲۵ با جفت آغازگر بتا اکتین، چاهک ۸) محصول PCR نمونه پوسته بالینی۲۵ با آغازگرهای اختصاصی و بتا اکتین

جدول ۳ توالی قطعه ژن rpoB حاصل از کورینه باکتریوم مینوتیسیموم استخراج شده از بررسی حاضر با آغازگرهای اختصاصی جنس کورینه باکتریوم مینوتیسیموم (Minoo R & F)

GGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGCGTGGGCCTG
TCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCGCGAGCGCATGACTAC
TCAGGATGCAGAGTCGATTACCCCGACCTCCCTGATTA
ACGTCCGTCCGGTTTCTGCTGCCATTCGCGAGTTCTTCG
GTACCTCCCAGCTCTCGCAGTTCATGGACCAGAACAAC
TCCCTGTCTGGTCTGACCCACAAGCGCCGTCTGTCCGC
GCTGGGCCCGGGTGGTCTGTCCCGTGAACGTGCTGGCA
TTGAGGTGCGAGACGTTCACGCTTCGCACTACGGCCGC
ATGTGCCCGATTGAGACCCCTGAGGGTCCGAACATTGG
TCTGATCGGTTCGCTGGCGTCCTACGCTCGCGTCAATG
CTTTCGGCTTCATCGAGACCCCGTACCGCAAGGTTGTG
GACGGCAAGGTCACCGACCAGGTGGAGTACCTCACCG
CCGATGAAGAGGATCGCTACGCCATCGCGCAGGCCGA
GGTGGAGAAGGATGCCGACGGCACCCTGACCGGCGAC
CGCATCGAGGTCCGCCTCAAGGACGGCGATATCGGC

بحث

بیماری اریتراسما بیماری پوستی نواحی چین‌دار بدن است که طی مطالعاتی که در ایران و خارج در کشورهایی چون اسپانیا و ترکیه انجام شده است شیوع بیماری را ۱۳ تا بیش از ٤٠ درصد گزارش نموده‌اند که نشان دهنده اهمیت این بیماری است [١٦-١٨]. تشخیص این بیماری بر اساس مشاهده اشکال معمول و شاخص کورینه باکتریوم مینوتیسیموم است که به روش رنگ‌آمیزی بلودومتیلن صورت می‌گیرد. آنچه باعث شد مطالعه حاضر انجام گیرد وجود مشکلاتی در تشخیص بود، تجربه نشان داده است که در مواردی در آزمایش مستقیم با رنگ‌آمیزی بلودومتیلن عناصر و باسیل‌های دیفترویید مانند دیده می‌شود که تکنسین‌های آزمایشگاه و حتی متخصصین قارچ‌شناسی را نیز در ارایه جواب صحیح دچار مشکل می‌کند. به همین دلیل سه روش آزمایش مستقیم، کشت و روش مولکولی روی ١٠٠ نمونه بالینی مشکوک به اریتراسما بررسی شد.

با توجه به این که دیفترویید‌های فلور ساکن پوست در مواردی در لام مستقیم به وفور یافت می‌شوند، از طرفی کورینه باکتریوم مینوتیسیموم عامل اریتراسما نیز بعضاً به‌صورت اشکال غیر معمول دیده می‌شود که با دیفترویید‌های فلور ساکن پوست غیر قابل افتراق است، بنابراین وجود روشی دیگر در کنار رنگ‌آمیزی بلودو متیلن ضروری به‌نظر می‌رسید. از طرفی؛ کشت نمونه‌های مشکوک به اریتراسما به دلیل سختی‌های خاص خود که در مطالعات مختلف مانند اسمیت (Smith) و همکاران در سال ١٩٦٩، سوریانو (Soriano) و همکاران در سال ١٩٩٥ و کاراکا (Karaca) و همکاران در سال ٢٠٠٨ انجام گرفته است نیاز به محیط‌های کشت خاص دارد و معمول نیست [٤-٦]. بررسی حاضر نیز نشان داد که این میکروارگانیسم را نمی‌توان به راحتی از نمونه بالینی جدا نمود. در این مطالعه محیط‌های کشت مختلفی به‌منظور جداسازی ارزیابی شد که در نهایت از محیط کشت پای مدیا با افزودن آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتویین، برای تأیید آزمایش‌های تشخیصی و جدا سازی این باکتری استفاده شد که تأییدی بر یافته‌های سوریانو بود.

همان‌طور که در بالا نیز اشاره شد به دلیل سختی کار کشت، در بررسی حاضر از روش مولکولی نیز که روشی ساده‌تر و سریع‌تر است استفاده شد. خامیس (Khamis) و همکاران در سال ٢٠٠٤ توالی ژن rpoB را برای طراحی آغازگر عمومی با هدف شناسایی گونه‌های مختلف کورینه باکتریوم به روش PCR-RFLP به‌کار بردند [٧].پاوان (Pavan) و همکاران در سال ٢٠١٢ با استفاده از این ژن، به شناسایی کورینه باکتریوم توبرکلوزیس در گوسفندان به روش PCR-RFLP پرداختند [٨]. در بررسی حاضر نیز از توالی ژن rpoB برای طراحی آغازگر اختصاصی کورینه باکتریوم مینوتیسیموم استفاده شد.

در این مطالعه به‌منظور استخراج DNA کورینه باکتریوم مینوتیسیموم از نمونه‌های بالینی پوسته از روش دستی فنل کلروفرم استفاده شد. طی بررسی‌های انجام شده در ادبیات دنیا اکثر مطالعات از کیت‌های تجاری به این منظور استفاده می‌کنند، لیکن فقط یک گزارش از بورهان و همکاران در سال ٢٠٠٢ وجود دارد که از این روش به‌منظور استخراج DNA کورینه باکتریوم توبرکلوزیس آلوده کننده گوسفند و بز استفاده شده است [١٤] در بررسی حاضر طی آزمایش‌های متعدد و تغییر متغیرهای مختلف روش فنل کلروفرم معمول بهینه شد و ژنوم کورینه باکتریوم مینوتیسیموم با غلظت مناسب و طی ٤ ساعت استخراج شد؛ بنابراین نسبت به مطالعه بورهان و همکاران این برتری را دارد.

در این تحقیق حساسیت روش PCR در مقایسه با دو روش آزمایش مستقیم و کشت ١٠٠ درصد بود که نشان از اهمیت و حساسیت بالای این روش است. استاندارد طلایی در این تحقیق مشاهده عناصر و باسیل‌های رشته‌ای بلند (اشکال معمول و شاخص) در رنگ‌آمیزی بلودومتیلن بود و مشاهده اشکال غیر معمول و صرفاً دیدن باسیل‌های کوتاه به‌عنوان منفی تلقی شد، بر این اساس اختصاصیت روش مولکولی در مقایسه

با آزمایش مستقیم ۸۶/۲ درصد تعیین شد.

بررسی حاضر و به‌خصوص روش مولکولی تمامی نمونه‌هایی که دارای اشکال معمول و شاخص کورینه باکتریوم مینوتیسیموم بودند را تأیید نمود؛ اما این روش برخی از نمونه‌های دارای اشکال غیر معمول را تأیید و برخی را تأیید ننمود که معرف اهمیت روش مولکولی در تشخیص بیماری و نیاز به این روش در تشخیص اریتراسما ست.

در این مطالعه بعضاً اشکال باسیلی کوتاه پیوسته به یکدیگر و حتی کوکسی‌های رشته‌ای مانند استرپتوکوکوس (*Streptococcus*) نیز در آزمایش مستقیم (به دو روش رنگ‌آمیزی و روش پتاس ۱۰ درصد) به‌صورت باسیل‌های رشته‌ای دیده می‌شد که با بی‌دقتی ممکن بود به‌صورت مثبت کاذب کورینه باکتریوم مینوتیسیموم گزارش شود که باید مورد توجه قرار گیرد.

همان‌طور که در بالا اشاره شد مطالعات مولکولی انجام شده اکثراً مربوط به دیگر گونه‌های کورینه باکتریوم بوده است و روش شناسایی مولکولی به‌کار رفته به‌صورت PCR-RFLP بوده است [۷-۱۳] و طی بررسی‌های انجام شده مطالعه مولکولی به‌طور خاص در راستای شناسایی کورینه باکتریوم مینوتیسیموم و تشخیص بیماری اریتراسما انجام نگرفته است، در حقیقت بررسی حاضر اولین بررسی تشخیص مولکولی بیماری اریتراسما در ایران و خارج از کشور است.

با توجه به سرعت، دقت و حساسیت بالای روش‌های مولکولی بهتر است در آینده از آن‌ها در تشخیص کورینه باکتریوم مینوتیسیموم در آزمایشگاه‌ها، مراکز درمانی و تحقیقاتی استفاده شود. همچنین با توجه به گزارش موارد عفونت خارج جلدی شامل باکتریمی (Bacteremia)، مننژیت (Meningitis)، پریتونیت (Peritonitis) و ... توسط این گونه طی سال‌های اخیر، می‌توان از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده در این مطالعه، برای تشخیص کورینه باکتریوم مینوتیسیموم در دیگر نمونه‌های بالینی مانند خون، CSF (Cerebrospinal Fluid) و ... استفاده کرد [۱، ۱۹-۲۱].

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) که شرایط آزمایشگاهی انجام این مطالعه را فراهم نمودند تشکر می‌شود.

منابع

[1] Dalal A, Likhi R. *Corynebacterium minutissimum* bacteremia and meningitis: a case report and review of literature. J Infect 2008; 56(1): 77-9.

[2] Habif TP. Superficial and fungal infections. In: Habif TP, (Editor). Clinical Dermatology. 5th ed. St. Louis, Mo: Mosby Elsevier, 2009.

[3] Millett CR, Hapern AV, Reboli AC. Bacterial Diseases. In: Bolognia JL, Jorizzo JL, Schaffer JV, (Editors). Dermatology. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Mosby Elsevier, 2012.

[4] Smith RF. A medium for the study of the ecology of human cutaneous diphtheroids. J Gen Microbiol 1969; 57(3): 411-7.

[5] Soriano F, Zapardiel J, Nieto E. Antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species and other non-spore-forming gram-positive bacilli to 18 antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(1): 208-14.

[6] Karaca S, Kulac M, Cetinkaya Z, Demirel R. Etiology of foot intertrigo in the District of Afyonkarahisar, Turkey: a bacteriologic and mycologic study. J Am Podiatr Med Assoc 2008; 98(1): 42-4.

[7] Khamis A, Raoult D, La Scola B. *rpo*B gene sequencing for identification of *Corynebacterium*

species. J Clin Microbiol 2004; 42(9): 3925-31.

[8] Pavan ME, Robles C, Cairó FM, Marcellino R, Pettinari MJ. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase β-subunit gene (*rpo*B). Res Vet Sci 2012; 92(2): 202-6.

[9] Mothershed EA, Cassiday PK, Pierson K, Mayer LW, Popovic T. Development of a real-time fluorescence PCR assay for rapid detection of the diphtheria toxin gene. J Clin Microbiol 2002; 40(12): 4713-9.

[10] Pacheco LG, Pena RR, Castro TL, Dorella FA, Bahia RC, Carminati R, Frota MN, Oliveira SC, Meyer R, Alves FS, Miyoshi A, Azevedo V. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. J Med Microbiol 2007; 56(Pt 4): 480-6.

[11] Schuhegger R, Lindermayer M, Kugler R, Heesemann J, Busch U, Sing A. Detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains by a novel real-time PCR. J Clin Microbiol 2008; 46(8): 2822-3.

[12] Guimarães Ade S, Dorneles EM, Andrade GI, Lage AP, Miyoshi A, Azevedo V, Gouveia AM, Heinemann MB. Molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates using ERIC-PCR. Vet Microbiol 2011; 153(3-4): 299-306.

[13] Retamal P, Ríos M, Cheuquepán F, Abalos P, Pizarro-Lucero J, Borie C, Gutierrez J. Host associated polymorphisms in the *Corynebacterium pseudotuberculosis rpo*B gene sequence. Vet Microbiol 2011; 151(3-4): 400-3.

[14] Cetinkaya B, Karahan M, Atil E, Kalin R, De Baere T, Vaneechoutte M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. Vet Microbiol 2002; 88(1): 75-83.

[15] Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. BMJ 1994; 308(6943): 1552.

[16] Nasrollahi Omran A, Hashemi SJ, Hashemi F. Epidemiology of superficial and cutaneous mycosis in 5500 suspected patients in Tehran. Tehran Univ Med J 2010; 68(1): 45-53. (Persian)

[17] Morales-Trujillo ML, Arenas R, Arroyo S. Interdigital erythrasma: clinical, epidemiologic, and microbiologic findings. Actas Dermosifiliogr 2008; 99(6): 469-73.

[18] Inci M, Serarslan G, Ozer B, Inan MU, Evirgen O, Erkaslan Alagoz G, Duran N. The prevalence of interdigital erythrasma in southern region of Turkey. J Eur Acad Dermatol Venereol 2012; 26(11): 1372-6.

[19] Ahmad NM, Ahmad KM. *Corynebacterium minutissimum* pyelonephritis with associated bacteraemia: a case report and review of literature. J Infect 2005; 51(5): e299-303.

[20] Aperis G, Moyssakis I. *Corynebacterium minutissimum* endocarditis: a case report and review. J Infect 2007; 54(2): e79-81.

[21] Ahmad NM, Ahmad KM. *Corynebacterium minutissimum* pyelonephritis with associated bacteraemia: a case report and review of literature. J Infect 2005; 51(5): e299-303.