شناسایی و افتراق تریکوفیتون‌روبروم و تریکوفیتون‌منتاگروفایتس با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و برش آنزیمی

دکتر سید حسین میرهندی [*]
صادق نوری‌پور سی‌سخت [**]
دکتر محمدرضا شیدفر [***]
دکتر فریده زینی [****]
نیلوفر جلالی‌زند [*****]
فاطمه توکلی [******]

[*] دکترای قارچ‌شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی

[**] کارشناس ارشد قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی

[***] دکترای قارچ‌شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی

[****] دکترای قارچ‌شناسی، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی

[*****] کارشناس آزمایشگاه زیست‌شناسی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز آموزش و تحقیقات بهداشتی اصفهان

[******] کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، بیمارستان امام سجاد(ع)، آزمایشگاه

تاریخ وصول: ۱۳۸۷/۲/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۸/۲۷

مؤلف مسئول: دکتر سید حسین میرهندی
پست الکترونیک mirhendi@tums.ac.ir

چکیده:

مقدمه و هدف: تریکوفیتون‌روبروم و تریکوفیتون‌منتاگروفیتس شایع‌ترین گونه‌های عامل درماتوفیتوزیس در سراسر جهان هستند و شناسایی این دو از نقطه نظر همه‌گیرشناسی و بیماری‌زایی مهم است. روش‌های معمول آزمایشگاهی برای افتراق این دو گونه شامل؛ مشخصات میکروسکوپی، بررسی ظاهر کلنی و تست‌های بیوشیمیایی می‌باشد. روش‌های فوق وقت‌گیر بوده و احتیاج به پرسنل مجرب دارند و با وجود این گاهی هنوز با هم اشتباه می‌شوند. هدف مطالعه حاضر استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و برش آنزیمی برای افتراق ایزوله‌های مرتبط با این دو گونه بوده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی تعداد ۱۰۰ ایزوله درماتوفیتی از بیماران مبتلا به اشکال مختلف درماتوفیتوزیس جدا شد و با بررسی مشخصات مورفولوژیک ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک مورد شناسایی اولیه به عنوان تریکوفیتون‌روبروم/تریکوفیتون‌منتاگروفیتس قرار گرفت. این پژوهش در آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه علوم‌پزشکی تهران در سال ۱۳۸۶ انجام گرفت. استخراج دی‌ان‌آ به روش گلاس بید فنل کلروفورم صورت گرفت و ناحیه ITS1-5.8SrDNA-ITS2 با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تقویت گردید و سپس به کمک آنزیم MvaI مورد هضم اندونوکلئازی قرار گرفت. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و محصول برش آنزیمی روی ژل آگاروز الکتروفورز شده و پس از رنگ‌آمیزی و عکس‌برداری با توجه به الگوهای الکتروفورتیک اختصاصی به دست آمده و با در نظر داشتن نتایج بررسی توالی اسیدهای نوکلئیک مربوطه، گونه‌ها مشخص شد.

یافته‌ها: تست‌های مورفولوژیک به تنهایی قادر به افتراق قطعی دو گونه به ویژه در ایزوله‌های استریل فاقد تولید کونیدی نبود. ایزوله‌های با خواص بینابینی دو گونه نیز با روش‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک به سختی از همدیگر متمایز می‌شدند. پس از بررسی‌های مولکولی مشخص شد که ۴۵ ایزوله متعلق به تریکوفیتون‌روبروم، ۵۴ ایزوله متعلق به تریکوفیتون منتاگروفیتس و یک ایزوله گونه‌ای از فوزاریوم می‌باشد. با انجام تست‌های فیزیولوژیک نتایج مشابه با اندکی تفاوت به دست آمد. همچنین مشخص شد که تست سوراخ کردن مو برای افتراق این دو گونه از یکدیگر، اعتبار بیشتری در مقایسه با تست اوره آز دارد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این بررسی نشان داد که اولاً روش‌های مبتنی بر دی‌ان‌آ علی‌رغم هزینه بالاتر، از قاطعیت و سرعت بیشتری برای افتراق دو گونه تریکوفیتون‌روبروم و تریکوفیتون منتاگروفیتس برخوردار است و ثانیاً این دو گونه در ایران دارای شیوع تقریباً یکسان هستند. این روش‌ها برای شناسایی سایر درماتوفیت‌ها قابل توصیه است.

واژه‌های کلیدی : تریکوفیتون‌روبروم، تریکوفیتون‌منتاگروفیتس، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، آنزیم MvaI

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

درماتوفیت‌ها گروهی از قارچ‌های رشته‌ای با توانایی تهاجم به بافت‌های کراتین دار مو، پوست و ناخن انسان و حیوانات بوده و عفونت‌های حاصله درماتوفیتوزیس نام دارد. درماتوفیتوزیس بسته به محل آناتومیک ضایعه به اشکال مختلف شامل؛ کچلی سر، کچلی کشاله ران، کچلی ناخن، کچلی بدن، کچلی پا، کچلی دست، کچلی صورت و کچلی ریش دیده می‌شود(۱). سه گونه غالب عامل درماتوفیتوزیس در دنیا از جمله ایران تریکوفیتون منتاگروفیتس، تریکوفیتون روبروم و اپیدرموفیتون فلوکوزوم می‌باشند(۴-۲) که اپیدرموفیتون فلوکوزوم با توجه به خصوصیات مورفولوژی ماکروکونیدی و عدم تولید میکروکونیدی به سهولت شناسایی می‌شود، اما دو گونه تریکوفیتون روبروم و تریکوفیتون منتاگروفیتس دارای خصوصیات مرفولوژیک بسیار مشابهی می‌باشند و شناسایی آنها به خصوص برای کلنی‌های پلی‌مورفیک و غیر معمول مشکل می‌باشد. علاوه بر روش‌های معمولی شناسایی و افتراق این دو گونه یعنی کشت و بررسی مشخصات ظاهری و میکروسکوپیک کلنی، سایر روش‌های فیزیولوژیک مثل؛ تست اوره آز، سوراخ کردن مو، تولید پیگمان روی محیط‌های مخصوص، رشد روی محیط‌های هفت‌گانه تریکوفیتون آگار، میزان رشد و تغییر pH محیط بروموکروزل پرپل کازئین گلوکز آگار، جذب سوربیتول و غیره نیز برای افتراق این دو گونه به کار رفته است(۶ و۵). با توجه به مدت زمان طولانی مورد نیاز حداقل ۱۵-۱۰ روز و حداکثر ۴-۳ هفته جهت شناسایی مورفولوژیک گونه درماتوفیت مسبب بیماری در روش‌های معمولی و اهمیت تشخیص سریع‌تر و دقیق‌تر به نظر می‌رسد که روش‌های معتبرتر و سریع‌تری برای افتراق این دو ضروری است. در سال‌های اخیر با افزایش کارایی روش‌های زیست‌شناختی مبتنی بر دی‌ان‌آ[1] مثل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز موفقیت چشمگیری در تشخیص میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا حاصل شده است. اخیراً با بررسی تشابه و اختلاف قطعات خاصی مثل؛ ریبوزومال دی‌ان‌آ، ژن کیتین سنتتاز، توپوایزومراز II و غیره روش‌های جدیدی برای شناسایی دقیق گونه و استرین درماتوفیت‌ها گزارش شده است(۱۲- ۷).

اهداف مورد نظر در این مطالعه در وهله اول بررسی امکان‌شناسایی و افتراق دقیق دو گونه تریکوفیتون‌منتاگروفیتس و تریکوفیتون‌روبروم با استفاده از دو رویکرد فنوتیپیک و ژنوتیپیک و در درجه دوم بررسی میزان شیوع هر کدام از گونه‌ها به نسبت به دیگری در جامعه مورد بررسی بوده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه یک بررسی تجربی برای شناسایی دقیق و سریع دو گونه شایع درماتوفیتی بوده است. از بیماران مشکوک به عفونت‌های درماتوفیتی پوست، مو یا ناخن، مراجعه کننده به دو آزمایشگاه قارچ‌شناسی

1-DNA

Archive of SID

www.SID.ir

دانشگاه علوم پزشکی تهران، نمونه‌برداری شده و پس از انجام آزمایش مستقیم با شفاف‌سازی نمونه‌ها به کمک هیدروکسیدپتاسیم۲۰ـ۱۰ درصد و اطمینان از وجود عفونت درماتوفیتی، نمونه‌ها روی محیط مایکوزیل آگار کشت داده شد و پس از یک تا دو هفته نگهداری در حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد کلنی‌های رشد یافته مورد بررسی قرار گرفت. جهت افتراق دو گونه در مجموع دو گروه از روش‌های مورفولوژیک ـ فیزیولوژیک و مولکولی به اجرا گذارده شد.

برای استخراج دی‌ان‌آ حدود۳۰۰ میکرولیتر پرل شیشه‌ای همراه با ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز و ۳۰۰ میکرولیتر فنل کلروفرم ایزو آمیل (۱،۱) به تیوب پلاستیکی ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه شد. سپس یک قطعه کوچک به اندازه تقریباً ۲۰ میلی‌متر مکعب از کلنی قارچ به تیوب اضافه کرده و مدت ۵ ـ۳ دقیقه به شدت تکان داده شد و به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانترفیوژ شد. مایع رویی جداسازی و با حجم مساوی کلروفورم مخلوط شد. پس از ۵ دقیقه سانترفیوژ مجدداً مایع رویی جدا شد و مقدار ۱/. حجم استات سدیم ۳ مولار وحجم مساوی ایزوپروپانول اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰ ـ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۰ هزار دور در دقیقه سانترفیوژ گردید. مایع رویی را دور ریخته، حدود ۳۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درجه اضافه و بعد از ۵ دقیقه سانترفیوژ، مایع رویی را جدا کرده و به رسوب حاصل بعد از خشک شدن در هوای آزاد ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه افزوده شد و به عنوان دی‌ان‌آ خالص تا زمان لازم در فریز ۲۰ـ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از پرایمرهای یونیورسال قارچ‌ها شامل؛ ITS1:(5-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3) و ITS4:(5-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3) استفاده شد. ۲ میکرولیتر از دی‌ان‌آ استخراج شده از کلنی، مقدار ۲۵ پیکومول از هر کدام از پرایمرها، ۱۲/۵ میکرولیتر از پرمیکس حاوی دی ان تی پی[۱]، بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، آنزیم و سایر مواد لازم و حجم لازم از آب مقطر تا رسیدن به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر افزوده و در دستگاه ترمال سیکلر قرار داده شد. برنامه حرارتی به صورت ۹۵ درجه به مدت ۲ دقیقه یک سیکل، ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۲۵ سیکل و نهایتاً ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه یک سیکل تنظیم شد.

برای هضم آندونوکلئازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[۲] ده میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با ۱/۵ میکرولیتر از بافر مربوط، ۵ واحد آنزیم اموی‌آ یک[۳] (شرکت فرمنتاس ـ لیتوانی) ایران و حجم لازم از آب مقطر تا رسیدن به حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر، به مدت ۲ ساعت در حرارت ۳۷ درجه انکوبه شد. برای قابل رؤیت شدن هر کدام از

1-DNTP
2-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)
3-MvaI

Archive of SID

www.SID.ir

محصول‌های استخراج دی‌ان‌آ، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و برش آنزیمی، دی‌ان‌آ روی ژل آگاروز حاوی ۰/۵ میکروگرم اتیدیوم بروماید به ازای هر میلی‌لیتر ژل انتقال داده شد و با برقراری اختلاف پتانسیل ۱۰۰ ولت به مدت ۶۰ ـ۳۰ دقیقه الکتروفورز انجام شد. محصولات استخراج دی‌ان‌آ روی ژل ۱ درصد، محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل ۱/۵ درصد و محصولات برش آنزیمی روی ژل ۲ درصد الکتروفورز شدند. باندهای دی‌ان‌آ با استفاده از دستگاه ترانس ایلومیناتور مدل یووی‌تک[1] مورد بررسی و در صورت لزوم به وسیله دستگاه یووی‌داک[2] مورد عکس‌برداری قرار گرفت. تشخیص گونه‌ها با استفاده از الگوهای الکتروفورتیک گزارش شده به وسیله میرهندی و همکاران(۱۳۸۶) انجام گرفت(۱۳). برای مطالعه مورفولوژی ایزوله‌ها، همگی نمونه‌ها روی محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار کشت داده شد و کلنی‌ها از جهات مختلف مورفولوژیک بررسی شدند. همچنین همه نمونه‌ها روی لام میکروسکوپی(اسلاید کالچر) کشت داده شد. جهت بررسی توانایی هیدرولیز اوره ۲۱ گرم از پودر اوره آگار بیس را در یک لیتر آب مقطر حل کرده، بعد از اتوکلاو و سرد شدن در حرارت محیط (رسیدن به دمای تقریبی ۴۵ـ۴۰ درجه) ۵۰ میلی‌لیتر کریستال اوره ۴۰ درصد فیلتر شده(واتمن ۴۵) به آن افزوده و در لوله آزمایش تقسیم و به صورت شیب‌دار تهیه شد. ارگانیسم مورد نظر درون محیط فوق تلقیح و در درجه حرارت اتاق نگهداری شد. تغییر رنگ از کهربایی به بنفش بعد از مدت چهار روز نشانه توانایی هیدرولیز اوره بود. جهت بررسی توانایی سوراخ کردن مودر آزمایشگاه، درون پتری دیش شیشه‌ای استریل محتوی آب مقطر، ۳-۲ قطره عصاره مخمر فیلتر شده ۱۰ درصد ریخته و موهای کوتاه و استریل شده را درون پتری‌دیش قرار داده، سپس هر کدام از ایزوله‌های مورد بررسی را به طور جداگانه به پتری دیش تلقیح کرده و در حرارت اتاق انکوبه شد. به فواصل متعدد حداکثر چهار هفته جهت ایجاد سوراخ‌های سه گوش بررسی میکروسکوپی شدند.

یافته‌ها

جمعاً ۱۰۰ نمونه به عنوان تریکوفیتون منتاگروفایتس/ روبروم جداسازی و بررسی گردید. در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ناحیه ITS کلیه نمونه‌ها با موفقیت تقویت گردید و برای تمامی ایزوله‌ها یک باند به اندازه تقریبی ۷۰۰ـ۶۷۰ جفت باز مشاهده گردید. تصویر ۱ نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ، مربوط به ایزوله‌های تریکوفیتون روبروم و تریکوفیتون منتاگروفیتس را نشان می‌دهد. چنانچه ملاحظه می‌شود دو گونه

1-Uvitec
2-Uvidoc

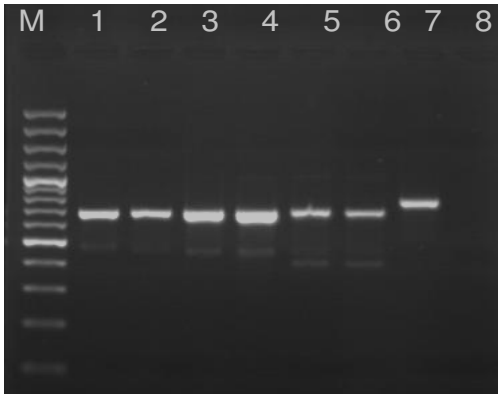
Archive of SID
www.SID.ir

تریکوفیتـون منتاگروفـایتس و تریکوفیتـون روبـروم دارای باند با وزن تقریباً مساوی می‌باشند.

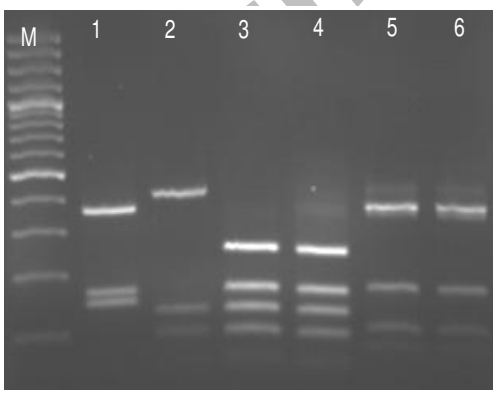
محصول واکـنش زنجیـره‌ای پلـی‌مـراز کلیـه ایزوله‌ها به وسیله آنزیم MvaI برش داده شد و پـس از الکتروفورز روی ژل آگاروز الگوی باندهای حاصل مورد بررسی قرار گرفت

تصویر ۲ الکتروفورز محصولات برش آنزیمی تعدادی از نمونه‌هـا را نـشان مـی‌دهـد. چنانچـه دیـده می‌شود در این مطالعه جمعاً سه الگوی برش آنزیمـی بـــرای تریکوفیتـــون‌منتـــاگروفیتس مـــشاهده شـــد (چاهک‌های ۴ـ۱)، ولی در مورد تریکوفیتون روبـروم تمـام نمونـه‌هـا دارای الگـوی الکتروفورتیـک واحـدی بودند(چاهک۶ و۵).

با اکتفا به مطالعه مشخصات میکروسکوپیک و ماکروسکوپیک کلنی‌های حاصـل از کـشت ایزولـه‌هـا، تنها تعـداد معـدودی از آنهـا افتـراق داده شـد و بقیـه همچنان به عنوان تریکوفیتـون‌روبـروم/ تریکوفیتـون منتاگروفیتس باقی ماندند. در تمام ایزوله‌ها هیـدرولیز اوره به صورت مثبت شدید، مثبت ضعیف و منفی ثبت گردید. از ۹۹ ایزوله مـورد مطالعـه تعـداد ۵۵ ایزولـه دارای اوره‌آز مثبـت شـــدید، ۷ ایزولـــه دارای اوره‌آز مثبت ضعیف و۳۷ ایزوله دارای اوره‌آز منفی بودند که با انجام آزمایش‌های مولکولی ۵۴ ایزوله تریکوفیتون منتاگروفیتس(۴۷ ایزوله مثبت شدید، ۴ ایزولـه مثبـت ضعیف و ۳ ایزولـه منفـی) و ۴۵ ایزولـه تریکوفیتـون روبروم (۸ ایزوله مثبت شدید،۳ ایزوله مثبت ضعیف و ۳۴ ایزوله منفی) تشخیص داده شد. از ۹۹ ایزوله ۵۳ ایزوله دارای تست سوراخ کردن مو مثبت و ۴۵ ایزوله دارای تست سوراخ کردن مو منفی بـود کـه بـا انجـام آزمایش‌های مولکولی تمامی ایزوله‌های دارای توانایی ســوراخ کـــردن مـــو تریکوفیتـــون منتـــاگروفیتس و ایزوله‌های فاقد توانایی سوراخ کردن مو بـه اسـتثنای یک ایزوله که تریکوفیتون منتاگروفیتس تشخیص داده شد، بقیه تریکوفیتون روبروم بودند(جدول ۱).



تصویر ۱: عکس الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مربوط به ناحیه در ایزوله‌های درماتوفیتی؛ شماره ۶ـ۱ ایزوله‌های تریکوفیتـــون‌روبـــروم و تـــــریکوفیتون منتـــــاگـــروفیـتس، شماره ۷ اپیدرموفیتون فلوکوزوم، شماره ۸ کنترل منفی



تصویر۲: عکس الکتروفورز محصول برش آنزیمی؛ شماره ۱ تریکوفیتون منتاگروفیتس الگوی اول (یک نمونه)، شماره ۲ تریکوفیتون منتاگروفیتس الگوی دوم (یک نمونه)، شماره ۳ و ۴ تریکوفیتون منتاگروفیتس الگوی سوم (۵۳ نمونه) و شماره ۵ و ۶ تریکوفیتون روبروم(۴۴ نمونه)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: نتایج تست اوره‌آز و سوراخ کردن مو بر روی ایزوله‌های تریکوفیتون منتاگروفیتس و تریکوفیتون روبروم

نوع تست فیزیولوژیک	نتیجه	تریکوفیتون منتاگروفیتس	تریکوفیتون روبروم
تست اوره‌آز	مثبت شدید	۴۷	۸
	مثبت ضعیف	۴	۳
	منفی	۳	۳۴
تست سوراخ کردن مو	مثبت	۵۳	۰
	منفی	۱	۴۵

بحث و نتیجه گیری

بیماری‌های درماتوفیتی پوست و ضمایم آن همواره در زمره عفونت‌های شایع درماتولوژی بوده و هست، به طوری که حدود ۲۵ــ۲۰ درصد جمعیت دنیا حداقل یک بار در طول عمر به آن مبتلا می‌شوند (۱۴). بیماری‌های قارچی ناشی از درماتوفیت‌ها هم از نظر مسایلی که در جنبه‌های بهداشتی، اقتصادی و گاهی روانی ایجاد می‌کنند و هم به خاطر مشکلاتی که برای خانواده‌های افراد مبتلا یا اجتماعاتی نظیر مهدکودک‌ها، مدارس و سرباز خانه‌ها به وجود می‌آورند حایز اهمیت بسیار هستند. عوامل غالب درماتوفیتوزیس تریکوفیتون منتاگروفیتس و تریکوفیتون روبروم می‌باشند و روش‌های متداول جهت شناسایی و افتراق این دو گونه معمولاً وقت‌گیر (گاهی ۳ تا ۴ هفته) بوده و نیاز به تجربه و مهارت کافی دارند و احیاناً تحت تأثیر عوامل محیطی مثل درجه حرارت، شرایط کشت و غیره قرار می‌گیرند. بنابراین به کارگیری یک روش دقیق و سریع برای افتراق این دو گونه ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق از روش مبتنی بر دی‌ان‌آ در کنار روش‌های متداول استفاده گردید. یافته‌های حاصل از این مطالعه را می‌توان در سه نکته بررسی و تحلیل کرد؛ اول این که روش‌های رایج میکروسکوپی و ماکروسکوپی که در آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی پزشکی انجام می‌شود برای افتراق این دو گونه مکفی نبوده و الزاماً بایستی از روش‌های تکمیلی دیگر سود جست. دوم این که تست‌های سوراخ کردن مو و اوره‌آز حساسیت و ویژگی نسبتاً خوبی برای افتراق این دو گونه داشته و برای آزمایشگاه‌های واجد امکانات معمولی توصیه می‌شود. سوم این که تست‌های فیزیولوژیک علی‌رغم قابلیت‌های انکار ناپذیرشان به خاطر زمان بر بودن‌شان هنوز هم ایده‌آل نبوده و در آزمایشگاه‌های مرجع بایستی جای خود را به روش‌های معتبرتر و سریع‌تری بدهند. با توجه به ارزشی که روش‌های مبتنی بر دی‌ان‌آ به خصوص تکنولوژی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در سال‌های اخیر پیدا کرده است، استفاده از این رویکردها برای افتراق بسیاری از میکروارگانیسم‌ها و از جمله درماتوفیت‌ها گزارش و توصیه شده است. در بین صدها ملکول دی‌ان‌آ شناخته شده، کمپلکس دی‌ان‌آی ریبوزومی از اعتبار

Archive of SID

www.SID.ir

بالایی برخوردار است(۱۰ و ۸) و همین مولکول مدنظر در این تحقیق بوده است. این مولکول از بخش‌های متفاوتی تشکیل شده است که در بین آنها بخش‌های ITS1 و ITS2 دارای ویژگی‌های ایده‌آل برای تفکیک گونه‌های قارچ‌ها از جمله درماتوفیت‌ها است و به همین جهت در مطالعات متعددی از آن استفاده شده است(۱۰ و ۸). از سوی دیگر بین صدها آنزیم که برای هضم اندونوکلئازی به کار می‌رود MvaI ، آنزیم بسیار مناسبی برای افتراق درماتوفیت‌ها به نظر رسید. در مطالعات قبلی الگوهای الکتروفوتیک ناحیه ITS1 و ITS2 پس از برش با آنزیم MvaI بررسی و نشان داده شده است(۱۳). در مطالعه حاضر تمرکز روی دو تریکوفیتون مهم و شایع که از نظر فنوتیپیک بسیار به هم شبیه هستند می‌باشد. یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که برای تریکوفیتون روبروم تنها یک الگو وجود دارد و به راحتی می‌توان آن را شناخت، ولی برای تریکوفیتون منتاگروفیتس ۳ الگو و شاید بیشتر وجود دارد و برای شناسایی آن باید دقت نمود. هم چنین یافته‌های این مطالعه حاکی از این است که تست‌های اوره‌آز و سوراخ کردن مو نیز هر چند قادر به تفکیک ۱۰۰ درصد و بدون تردید این دو گونه نمی‌باشد، ولی لااقل در آزمایشگاهای فاقد امکانات لازم برای روش‌های مولکولی می‌تواند تا حدود زیادی مفید باشد. تست‌های مولکولی انجام شده روی ایزوله‌های مشکوک به تریکوفیتون ـ روبروم منتاگروفیتس نشان داد که ۴۵ درصد ایزوله‌ها تریکوفیتون روبروم و ۵۵ درصد تریکوفیتون منتاگروفیتس می‌باشد. این موضوع حاکی از فراوانی نسبتاً مساوی این دو گونه به عنوان عوامل درماتوفیتی جدا شده از بیماران می‌باشد. این موضوع از نقطه‌نظر همه‌گیرشناسی حایز اهمیت است. اگر چه گزارش‌های متعدد و متنوعی در رابطه با شناسایی گونه‌های درماتوفیتی با استفاده از روش‌های مولکولی در کشورهای پیشرفته انجام شده است(۱۲-۷). در مطالعات انجام شده یک سری گونه مشکوک به تریکوفیتون‌روبروم و تریکوفیتون منتاگروفیتس وجود داشته است که قادر به شناسایی دقیق گونه آنها نشده‌اند و تحت عنوان گونه بینابینی تریکوفیتون منتاگروفیتس و تریکوفیتون روبروم گزارش شده‌اند(۱۸ــ ۱۵)، در صورتی که در این مطالعه با به کارگیری روش‌های مولکولی هیچ گونه‌ای به عنوان بینابینی تلقی نشد. قدم بعدی این تحقیق آزمایش تعداد بیشتری نمونه از نقاط مختلف کشور است تا بدین وسیله وضعیت اتیولوژیک و اپیدمیولوژیک این گروه از بیماری‌های شایع پوست در کشور بیشتر و بهتر روشن شود. هدف دیگر این است که با توجه به این که تریکوفیتون منتاگروفیتس دارای منابع انسانی و حیوانی متفاوتی است با بررسی دقیق‌تر سه الگوی الکتروفورتیک تریکوفیتون منتاگروفیتس و برقراری ارتباط آنها با منابع مختلف، زنجیره‌های انتقال بیماری بهتر روشن شده و بدین طریق راه کنترل و پیشگیری بیماری در سطح جامعه هموارتر گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

یافته‌های این مطالعه نشان داد که روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز همراه با برش آنزیمی، در مقایسه با روش‌های فنوتیپیک از دقت بالاتری برخوردار بوده و نتیجه نهایی با سرعت بیشتری (طی یک روز کاری) قابل دستیابی است. هم‌چنین معلوم شد هر دو گونه تریکوفیتون منتاگروفیتس و تریکوفیتون روبروم از عوامل شایع درماتوفیتوز در ایران هستند و از فراوانی تقریباً یکسان برخوردار هستند.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از زحمات و همکاری پرسنل آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت تهران، مرکز آموزش و تحقیقات بهداشتی اصفهان، آزمایشگاه بیمارستان امام سجاد(ع) یاسوج و سایر کسانی که در اجرای این تحقیق ما را یاری رساندند صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نماییم.

Archive of SID

www.SID.ir

Identification and Differentiation of Trichophyton Mentagrophytes and T.rubrum by Polymerase Chain Reaction and Enzymatic Digestion

Mirhendi H[*], Nooripour Sisakhet S[**], Shidfar MR[***], Zaini F[****], Jalalizand N[*****], Tavakoli F[******].

[*]Associate Professor of Medical Mycology, Department of Parasitology & Medical Mycology, School of Public Health & Institute of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[**]MSc in Medical Mycology, Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Medicine, Yasouj University of Medical Sciences, Yasouj, Iran
[***]Assistant Professor of Medical Mycology, Department of Parasitology & Medical Mycology, School of Public Health & Institute of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[****]Professor of Medical Mycology, Department of Parasitology & Medical Mycology, School of Public Health & Institute of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[*****]BSc in Molecular Biology, Department of Molecular Biology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[******]BSc in Medical Laboratory Sciences, Department of Laboratory, Emam Sajad HospitalSchool, Yasouj University of Medical Sciences, Yasouj Iran

KEYWORDS:
Trichophyton Mentagrophytes, Trichophyton Rubrum, PCR, Enzyme MvaI

Received:10/2/1387
Accepted:27/8/1387

CorrespondingAuthor: Mirhendi SH
Email: mirhendi@tums.ac.ir

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Trichophyton rubrum and T. mentagrophytes are most common causative agents of dermatophytosis in the world. Differentiation of these species is important from the epidemiological and pathological point of view. Conventional methods including macroscopic and microscopic morphology and biochemical tests are time-consuming (in some cases it takes 3-4 weeks), laborious and still sometimes insufficient to identify these agents. The aim of this study was to use polymerase chain reaction followed by enzymatic digestion for differentiation of these 2 species.

Materials & Methods: In this descriptive–experimental study one hundred strains were isolated from patients with dermatophytosis. Preliminary identification was done by morphological methods. DNA was isolated and purified by glass-bead methods and ITS1-5.8SrDNA-ITS2 region was amplified by PCR and the amplicon was digested by the restriction enzyme MvaI. The products were visualized after agarose gel electrophoresis and staining. Differentiation of the species was based on sequence analysis and the electrophoretic patterns.

Results: Morphological tests were not able to definitely differentiate the two tested species, especially for isolates with intermediate features. Using molecular methods, it was found that 45 isolates are T. rubrum and 54 are T. mentagrophytes. One isolate was Fusarium spp. Physiological tests were confirmed the results except for 4 isolates. It was also found that hair perforation test is more reliable than urease test for differentiation of these two species.

Conclusion: We found that DNA-based method, although expensive, is a fast and reliable method for differentiation of T. rubrum and T. mentagrophytes. The frequency of mentioned species was almost similar in the tested isolates. The method is recommended for differentiation of other dermatophytes.

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCES:

1.Richardson M.Fungal infection diagnosis and management. 3rd ed. Massachusetts: Blakwell; 2003; 80-107.
2.Richad I. The Dermatophytes. Clinical Microbiology Reviews 1995; 8(2): 240–259.
3.Khosravi AR. Dermatophytoses in Iran. Mycoses 1994; 37:43-8.
4.Falahati M, Akhlaghi L, Rastegar Lari A, Alagheband R. Epidemiology of Dermatophytoses in an Area South of Tehran, Iran. Mycopathologia 2003;156: 279-87.3
5. Sinski JT, Van Avermaete D, Kelley LM. Analysis of tests used to differentiate Trichophyton rubrumfrom Trichophyton mentagrophytes. Journal of Clinical Microbiology 1981; 13(1) : 62-5.
6.Rezusta A, Rubio MC, Alejandre MC. Differentiation between Trichophyton mentagrophytes and rubrumby Sorbitol Assimilation. Journal of Clinical Microbiology 1991; 29(1): 219-20.
7.Kamiya A, Kikuchi A, Tomita A, Kanabe A. PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase 2 gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. Journal of Dermatological Scienc 2004; 34: 33 - 5.
8.Makimura K, Mochizuki T, Hasegawa A, Uchida K, Saito H, Yamaguch H. Phylogenetic classification of trichophyton mentagrophytes complex strains based on DNA sequences of nuclearRibosomal internal Transcribed spacer 1 regions. Journal of Clinical Microbiology 1998; 3: 2629–30.
9.Kanbe T. Suzuki Y, Kamiya A, Mochizuki T, Fujihiro M, Kikuchi A. PCR-based identification of common dermatophyte species using primer sets for the DNA topoisomerase 2 genes. Journal of Dermatological Science 2003; 32:151-61.
10.Yoshida E, Makimura K, Mirhendi H, Kaneko T, Hiruma M, Kasai T, 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 Science 2006; 42: 225-30.
11.Liu D. Aplication of PCR to identification of dermatophyte fungi. J Med Microbiol 2000; 49: 493-7.
12. Brillowska- Dabrowska A, Marie Saunte D, Cavling Arendrup M. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of Trichophyton rubrum. Journal of Clinical Microbiology 2007;45(4):1200–4.
۱۳.میرهندی سید حسین، هدایتی محمدتقی، امیدی خوشقدم، جلالی‌زند نیلوفر، دیده‌دار مجتبی، افشار پروانه. روش PCR-RE مبتنی بر پلی مورفیسم DNA ریبوزومی‌برای شناسایی مهم‌ترین گونه‌های درماتوفیت ایران. فصلنامه بیماری‌های پوست۱۳۸۶؛ دوره ۱۰، شماره۳ : ۲۸ـ۲۱۹.
۱۴.آقامیریان محمدرضا، کشاورز داوود، جهانی هاشمی حسن. بررسی درماتوفیتوزیس در مراجعین به درمانگاه پوست بیمارستان بوعلی سینا قزوین. دو فصل نامه طب جنوب ۱۳۸۵ ؛ سال نهم ، شماره ۲: ۸۱ـ۱۷۵.
۱۵.مشیر محمد، طباطبایی آذردخت، پوراسلامی محمد، شمشیری احمدرضا. بررسی انواع عفونت‌های قارچی در بیماران مراجعه کننده به درمانگاه پوست مجتمع آموزشی درمانی حضرت رسول اکرم (ص). مجله دانشگاه علوم پزشکی ایران ۱۳۸۰؛ سال هشتم، شماره ۲۶:۴۷۱ ـ۴۶۶ .
۱۶.یزدانی‌کچوئی‌زاده میترا. بررسی تست‌های مورد استفاده در افتراق T. mentagrophytes از T. rubrum و تعیین انواع T. mentagrophytes. پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته قارچ‌شناسی پزشکی. تهران: دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۶۷ـ۱۳۶۶.
۱۷.بادامی ناصر. ارزیابی متدهای تشخیصی T. mentagrophytes و T. rubrum . پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم بهداشتی در رشته پاتوبیولوژی پزشکی. تهران: دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۵۲ـ۱۳۵۱.
۱۸.امیر امین‌محمدی اکرم. تعیین الگوی جذب قندها جهت تشخیص انواع بینابینی T. mentagrophytes وT. rubrum . پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته قارچ‌شناسی پزشکی. تهران: دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۶ـ۱۳۷۵.

Archive of SID

www.SID.ir