Archive of SID

مجله علمی - پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز 1389، دوره دوم، شماره ششم، صفحه 46-39

مقایسه تایپینگ مولکولی قارچ های آلرژن *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *فوزاریوم اکسیسپوروم* به روش های Colony PCR و PCR

فاطمه نویسی[1]،منصوربیات[2]،مهردادهاشمی[3]،شهلا رودبار محمدی[4]،سارا سعادتمند[5]

1-دپارتمان ژنتیک،دانشکده علوم پایه،دانشگاه آزاد اسلامی،واحد علوم وتحقیقات،تهران،ایران
2-دپارتمان قارچ شناسی پزشکی و دامپزشکی،دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی،دانشگاه آزاد اسلامی،واحد علوم وتحقیقات،تهران،ایران
3-دپارتمان ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی،واحد پزشکی تهران،تهران،ایران
4-دپارتمان قارچ شناسی ،دانشکده علوم پزشکی،دانشگاه تربیت مدرس، تهران،ایران
5-دپارتمان گیاه شناسی،دانشکده علوم پایه،دانشگاه آزاد اسلامی،واحد علوم وتحقیقات،تهران،ایران
نویسنده مسؤول: دکتر منصور بیات. دپارتمان قارچ شناسی پزشکی و دامپزشکی،دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات، تهران، ایران E.mail:dr_mansour_bayat@yahoo.com

دریافت: 89/5/23 پذیرش: 89/8/5

چکیده

زمینه و هدف: در سالهای اخیر شیوع بیماریهای آلرژیک در کلیه جوامع روند صعودی داشته است. مشخص شده که اسپور و کونیدی قارچ های موجود در هوا در ایجاد فرمهای مختلف آلرژی بویژه آلرژی تنفسی نقش دارند. روش معمول تشخیص آزمایشگاهی قارچ ها، کشت آن ها می باشد که مدت زیادی باید صرف نمود که مشخصات مورفولوژی به طور قطع تعیین کننده گونه باشد. در بهبود بخشیدن حساسیت و ویژگی برای تعیین هویت قارچ های پاتوژن و آلرژی زا روش مولکولی گسترش پیدا کرده است.

روش بررسی: پس از کشت قارچ های آسپرژیلوس و فوزاریوم روی محیط PDA و خرد شدن اسپورهای قارچ ها، DNA استخراج شد که به عنوان الگو در PCR برای تکثیر ژن های Aspf 1 و4و1 Its استفاده گردید. در مرحله بعد همین پروسه در Colony PCR، بدون استخراج DNA صورت پذیرفت.

یافته ها: نتایج PCR نشان داد که هر کدام از پرایمرها الگوی تکثیر یافته متفاوتی را ایجاد کردند و با پرایمر اختصاصی توانستیم دو قارچ را از یکدیگر مجزا کنیم. همچنین نتایج حاصل از دو روش PCR,Colony PCR یکسان بود. با توجه به اینکه تحقیقات سایر محققین بر روی مخمر ها صورت پذیرفته بود، در این مطالعه از قارچ های رشته ای استفاده شد و نتایج یکسانی بدست آمد که با توجه به وقت گیر بودن مرحله استخراج، روش Colony PCR پیشنهاد می شود.

نتیجه گیری: با بهینه سازی روش Colony PCR ، می توان به عنوان روشی مطمئن جهت تشخیص سریع قارچ های فوق در آزمایشگاه های تشخیص طبی با استفاده از روش مولکولی بهره برد.

واژگان کلیدی: آسپرژیلوس، فوزاریوم ، آلرژی، PCR Colony، PCR

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در سالهای اخیر شیوع بیماریهای آلرژیک در کلیه جوامع روند صعودی داشته و علیرغم از کار افتادگی و مرگ و میر ناشی از این بیماری ها، مکانیسم های مربوطه به آنها هنوز شناخته نشده اند. نقش آلرژن ها در القای پاسخهای نابجا و کنترل نشده ایمنی که علائم بیماری های آلرژیک را به دنبال دارند محرز شده است. به همین دلیل یکی از استراتژیهای درمان این بیماری ها شناسایی آلرژن هایی است که فرد با آنها حساس شده ، تا با احتراز از برخورد با آنها جلوی بروز حملات آلرژیک بعدی و تشدید بیماری گرفته شود (1). کلمه آلرژی اولین بار توسط Von pirquet در سال 1906 به مراحل متغیری در انسان اطلاق شد که توسط یک عامل خارجی در انسان بوجود می آید. پس از اولین مواجهه با یک ماده خارجی (Ag)، تغییراتی در پاسخ های ایمنی اختصاصی بوجود می آید و در نتیجه واکنش به ماده خارجی می تواند زیاد (افزایش حساسیت) و یا کم (بصورت ایمنی) باشد (2). در ایران نیز تظاهرات آلرژیک شایع می باشد ولی آمار دقیقی در مورد میزان شیوع بیماری موجود نیست، با این حال طبق گزارشات موجود بیش از 3 میلیون نفر در کشور گرفتار این بیماری می باشند. مهمترین قارچ های آلرژی زای شایع در خانواده آسکومیست ها قرار دارند. این قارچ ها، شامل آلترناریا، آسپرژیلوس، کلادوسپورریوم ، بوتری تیس سینرا، فوزاریوم ، پنی سیلیوم و ترایکوفایتون ها می باشند (3). جنس آسپرژیلوس شامل 185گونه می باشد، که بیماری زاترین آن گروه *آسپرژیلوس فومیگاتوس* است که عامل اتیولوژیک 80% بیماری های مرتبط با آسپرژیلوس است. بیماری های آسپرژیلوسی از یک فرم خفیف مانند کلنیزه شدن ساپروفیتی در ریه و فرم حد واسط نظیر آسم، سینوزیت آلرژیک، رینیت آلرژیک تا فرمی که زندگی انسان را به مخاطره می اندازد مانند آسپرژیلوزیس سیستمیک مهاجم و آسپرژیلوزیس برونکو پلمونری آلرژیک (ABPA) وجود دارد(4). این گونه قارچ، با ظرفیت اسپورزایی بالا در حد 100-1 اسپور در متر مکعب به قطر کونیدی 4-2 μ از طریق استنشاق وارد مناطق آلوئولی ریه شده و چنانچه از طریق حرکت مژک های راه های تنفسی به بیرون دفع نشود توانایی اتصال به فیبرونکتین و کلاژن تیپ I و IV پارانشیم ریوی را پیدا می کند (5). گونه های مختلف آسپرژیلوس از دیرباز به عنوان آلرژن مطرح بوده اند بطوریکه حتی اسپورهای این قارچ به عنوان اولین آلرژن های هوایی مورد بحث قرار گرفتند(6). دو آنتی ژن 20- 18 کیلودالتونی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بوسیله روش کروماتوگرافی خالص گردیده است. پروتئین های 18, 20, 28, 44, 46 دالتونی توسط کورپ و همکارانش به عنوان اجزای آلرژن *آسپرژیلوس فومیگاتوس* معرفی شده است(7 - 9).

$Aspf_1$ آلرژن اصلی *آ. فومیگاتوس* می باشد که هم در ساختمان کونیدی و هایف وجود دارد و هم جزو آلرژنهای ترشحی می باشد. این آلرژن دارای 149 اسید آمینه و وزن مولکولی 18KDa می باشد و متعلق به خانواده ریبوتوکسین ها است (6). مطالعات متعددی واکنش (Sp- A, Sp-D) را با بخش گلیکوزیله آنتی ژن آلرژن های *آ. فومیگاتوس* نشان داده اند که این واکنش باعث مهار اتصال به IgE اختصاصی و بلوکه شدن ترشح هیستامین از بازوفیل های حساس می شود(10).

$Aspf_1$ یک نقش دوگانه را در پاتوژنز اختلالات مرتبط با *آ فومیگاتوس* بازی می کند:

الف) باعث نفوذ قارچ به وسیله خاصیت سیتوتوکسیستی می شود.

ب) سبب القاء واکنش های التهابی بوسیله IgE می شود(11).

شناسایی و تشخیص مرسوم قارچ های بیماری زا در آزمایشگاه های میکروبیولوژی بر پایه تست های مورفولوژی می باشد که حساسیت پایین و اختصاصیت ضعیفی دارد و حتی گاهی نیاز به 3 روز و یا بیشتر برای تشخیص نهایی دارد و امکان خطا در آن بالاست (12). در سال های اخیر، روش های بر پایه تشخیص DNA برای بهبود در تشخیص بیماری های قارچی گسترش پیدا کرده است و PCR به عنوان روشی امید بخش که دارای حساسیت و اختصاصیت بالاست، به حساب می آید. استخراج DNA، مرحله اصلی برای تمام روش های مولکولی است که در PCR نیز دیده می شود. روش های مختلفی برای استخراج DNA پیشنهاد شده که می توان بر اساس شکست دیواره سلولی، آن ها را طبقه بندی کرد و شامل لیز دیواره سلولی و.... می باشد، که همگی زمان بر است و گاهی نتایج استخراج و PCR به دلیل استفاده از مواد

www.SID.ir

Archive of SID

شیمیایی و سمی (فنل کلروفرم) در برخی پروتکل ها، رضایت بخش نمی باشد (12). آنا لاو در سال 2008، PCR Colony Multiplex را برای تعیین هویت کشت های قارچی انجام داد، نتیجه این PCR، کاملا موافق هویت فنوتیپی همه کشت های مورد مطالعه بود. این روش سریع و حساس برای تعیین قارچ های پاتوژن گزارش گردید(13).

Colony PCR روشی برای تکثیر قطعه DNA با PCR است که با استفاده از کلنی ارگانیسم و بدون نیاز به استخراج DNA انجام می شود. استخراج DNA نیاز به مواد مختلف و پروسه زمانی طولانی دارد. بنابراین Colony PCR دارای صرفه جویی زمانی و هزینه ای می باشد. از مزایای روش Colony PCR می توان به جلوگیری از ریسک آلودگی در حین استخراج DNA ، صرفه جویی در زمان، استفاده از لوازم و مواد ساده بدون نیاز به پروسه های مختلف برای استخراج DNA و نیاز به حداقل مواد کشت اشاره کرد. حتی با عبور از مرحله استخراج اجازه می دهد، تکثیر سریع و ساده قطعه DNA مطلوب برای پروب مورد استفاده در نوترون به سادگی انجام پذیرد (14). با این روش علاوه بر صرفه جویی در زمان و تشخیص سریع، بهینه سازی روشی جهت انجام کار های مولکولی برای تشخیص سریع قارچ های فوق در آزمایشگاه های تشخیص طبی به دست می آید.

روش بررسی

نمونه‌های قارچی از مرکز تحقیقات قارچ شناسی واحد علوم و تحقیقات دریافت و پس از کشت تازه و انبوه از *آسپرژیلوس فومیگاتوس* به شماره PTCC 5009 و *فوزاریوم اکسیسپوروم* به شماره PTCC 5115، در محیط پوتیتو دکستروز براث و انکوبه کردن آن در دمای 27 °C به مدت 4-3روز، اسپور و میسلیوم *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *فوزاریوم اکسیسپوروم* زیر میکروسکوپ نوری بررسی گردید، سپس نمونه ها جمع آوری شد و در داخل میکروتیوب ها ریخته شد. به دنبال آن استخراج DNA از محیط کشت بوسیله کیت ژن پژوهان پویا انجام گرفت. با توجه به کلاف DNA حاصله مقدار 50-150 µl آب مقطر استریل به ویال اضافه و ویال به مدت نیم ساعت در دمای اتاق نگهداری شده تا DNA در آب حل گردد. سپس مقدار 3 µl از محلول DNA را روی ژل آگاروز 1% برده و OD آن نیز محاسبه گردید. مرحله بعدی، انجام PCR *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با پرایمر های $Aspf_1$ و $Its_{1,4}$ است که در این جا پرایمرهای اختصاصی قادر به شناسایی 656bp از ژن$Aspf_1$ به شماره M83781 با طول 678bp می باشند. توالی پرایمرها به شرح زیر می باشد:

Forward: GTCGCAACCAAATAGGAA
Reverse: CTAAGGCATAATACCCAC

علاوه بر پرایمر اختصاصی، از پرایمر های عمومی Its نیز استفاده می شود ،که قادر به شناسایی قارچ ها می باشند.

Its_1:TCCGTAGGTGAACCTGCGG
Its_4:TCCTCCGCTTATTGATATGC

مواد مورد نیاز در واکنش PCR به قرار ذیل بود.

Materials	Volume
10X PCR buffer	2.5 µl
dNTP [0/1 mM]	0.5 µl
F1 primer [10 pmol]	1 µl
R1 primer [10 pmol]	1 µl
MgCl2 [0/2 mM]	2 µl
Taq polymerase	0.3 µl
DNA sample	2.5 µl
Distilled water	20 µl
Total	30 µl

واکنش تحت شرایط دناتوراسیون اولیه در دمای 95 درجه سانتی گراد به مدت 12 دقیقه، طویل سازی طی30 سیکل شامل 95 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه، و ادامه طویل سازی 62 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه، مرحله طویل سازی در 72 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه و در نهایت طویل سازی نهایی در 72 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه انجام گرفت.

Colony PCR روشی برای تکثیر قطعه DNA با استفاده از کلنی ارگانیسم است که نیاز به استخراج DNA ندارد. انجام Colony PCR مستقیم از محیط کشت *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *فوزاریوم اکسیسپوروم* با پرایمر های $Its_{1,4}$ صورت گرفت. این مرحله نیز همانند مرحله قبل پیش می رود با این تفاوت که به جای استخراج DNA، مستقیما از کلنی های تشکیل شده روی محیط کشت استفاده می شود و

www.SID.ir

Archive of SID

در زمان نیز صرفه جویی می گردد. در این روش بایستی از کلنی های تازه استفاده شود. بهترین زمان 5-4روز پس از کشت است. به وسیله سر میکروپیپت ،$1mm^3$ از کلنی های فوزاریوم و آسپرژیلوس برداشته شده و در میکروتیوب های جداگانه ریخته شده و به عنوان نمونه DNA، جهت Colony PCR استفاده شد.

ترکیبات واکنش Colony PCR به صورت ذیل می باشد:

Materials	Volume
10X PCR buffer	5µl
dNTP [0/1 mM]	1 µl
F1 primer(Its_1)[10 pmol]	2 µl
R1 primer(Its_4) [10 pmol]	2 µl
MgCl2 [0/2 mM]	2 /5 µl
Taq polymerase	0.3 µl
Colony	$1mm^3$
Distilledwater	18 µl
Total	30 µl

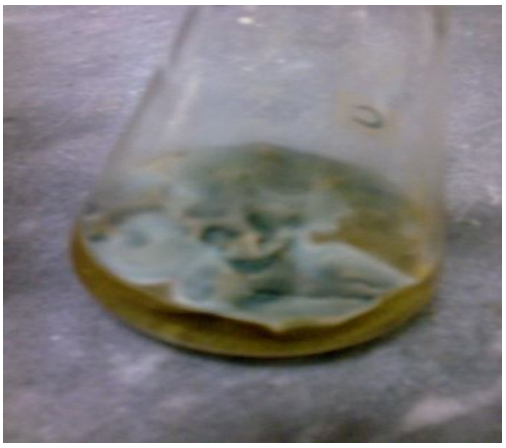
بررسی محصولات PCR

معمول ترین روش برای محصولات PCR، روش ژل الکتروفورز است که از طریق رنگ آمیزی با رنگ اتیدیوم بروماید قابل رویت می باشد. اغلب غلظت هدف در نمونه تهیه شده و واجد الگو مشخص نیست، بنابراین بهتر است که سیستم PCR را با DNA کنترل مثبت، بهینه نمود.

یافته ها

نتایج حاصل از کشت آسپرژیلوس فومیگاتوس و فوزاریوم اکسیسپوروم: ایزوله های استاندارد *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بعد از حدود یک هفته روی محیط PDA رشد و کلنی های سبز یشمی، کرکی، مخملی و گاهی چین دار و در زیر میکروسکوپ میسلیوم های با تیغه میانی حاوی کونیدیوفورهای کوتاه که در انتها به صورت وزیکول در آمده و کونیدی های کروی مشاهده و در مورد *فوزاریوم اکسیسپوروم*، میسلیوم های پنبه ای، پراکنده و گاهی متراکم با رنگ سفید، بنفش کمرنگ و در زیر میکروسکوپ ماکروکونیدی ها بصورت یک توده در سطح کلنی مشاهده گردید (شکل 1و2).

شکل 1. فوزاریوم اکسیسپوروم



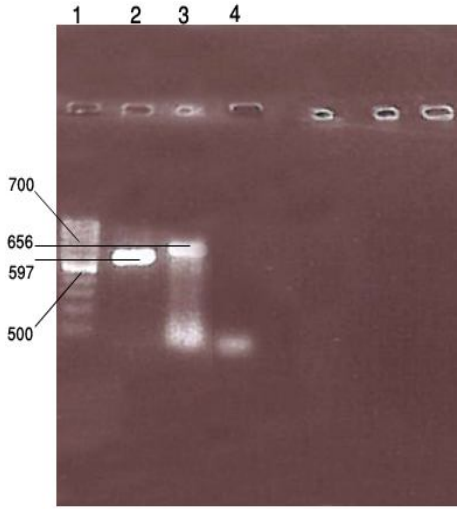
شکل 2. آسپرژیلوس فومیگاتوس

نتایج حاصل از تکثیرDNA با روش PCR : نمونه DNA *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن Aspf 1 و یکبار نیز با استفاده از پرایمر های عمومی $Its_{1,4}$، بافر واکنش PCR، Taq polymerase ، MgCl2، dNTP ،PCR شد. محصولPCR همراه با مارکر با وزن مولکولی 100 bp روی ژل آگاروز 1% ، الکتروفورز گردید تا محصول PCR بررسی گردد. باند 656 bp حاصل از PCR *آسپرژیلوس فومیگاتوس* است که با قطعه Aspf 1 مورد نظر، مطابقت داشت و باند597bp حاصل از *PCR آسپرژیلوس فومیگاتوس*، با قطعه Its مورد نظر، مطابقت داشت. در ضمن از کنترل منفی در تمام PCR ها استفاده شد(شکل 3).

www.SID.ir

Archive of SID

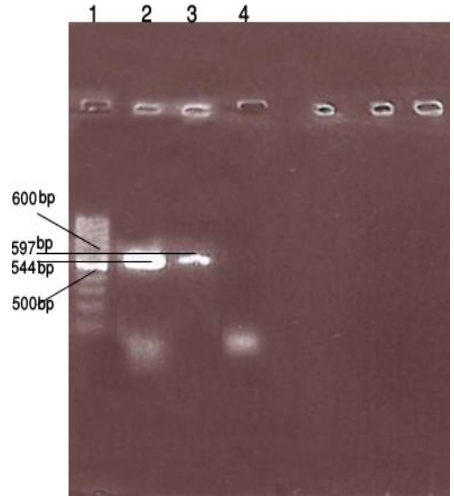
پرایمر $Aspf_1$ (بانک ژنM83781.1) به ژن آسپرژیلوس از نوکلئوتید شماره 9 متصل شده است. پرایمر $Its_{1,4}$ (بانک ژن Gu205082.) به ژن آسپرژیلوس از نوکلئوتید شماره 3 متصل شده است.



شکل 3. نتایج حاصل از PCR ،DNA آ.فومیگاتوس با دو پرایمر. ستون 1:سایز مارکر ، 2: PCR با$Its_{1,4}$ (597 bp)، 3: PCR با $Aspf_1$ (656 bp)،4: کنترل منفی.

نتایج حاصل از تکثیرDNA با روش Colony PCR:

کلونی های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *فوزاریوم اکسیسپوروم* با استفاده از پرایمرهای عمومی $Its_{1,4}$، PCR شد. نتایج این Colony PCR را در شکل 4 مشاهده می کنیم. در شکل زیر دو باند از نظر شفاف بودن با هم متفاوت هستند. علت آن استفاده از مقادیر متفاوت از کلونی این دو قارچ است.



شکل 4. نتایج حاصل از Colony PCR آ.*فومیگاتوس* و *فوزاریوم اکسیسپوروم* با پرایمر عمومیIts .

ستون 1: سایز مارکر ، 2: Colony PCR فوزاریوم (544 bp -HM043738.1) ، 3: Colony PCR آسپرژیلوس (597 bp -GU205082.1) ، 4: کنترل منفی.

بحث

قارچ های ساپروفیت به میزان فراوانی در طبیعت پراکنده هستند. این قارچ ها غالبا از راه تنفس وارد سیستم تنفسی می شوند. یکی از موارد شایع این بیماری ها، آلرژی نسبت به آنتی ژن های مختلف و متنوع می باشد. از بین عوامل آلرژی زا، قارچ ها اهمیت فوق العاده ای دارند، زیرا تماس با آن ها از طریق استنشاقی اجتناب ناپذیر است. واکنش های آلرژیک ناشی از قارچ ها نسبت به آلرژی ناشی از گرده های گیاهی قسمتهای پایین تر مجاری تنفسی را درگیر می کند. از بین گونه های متنوع و شایع موجود در طبیعت، آسپرژیلوس شناخته شده ترین و شایع ترین مولد آلرژی در انسان می باشد. *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با ظرفیت اسپورزایی بالا در حد 100-1 اسپور در متر مکعب با قطر کونیدی 2-4 µ از طریق استنشاق وارد مناطق آلوئولی ریه می شود. این قطر کم یکی از خصوصیات شاخص *آسپرژیلوس فومیگاتوس* است که کمک به ورود آن به سیستم تنفسی می کند. طبق گزارشات، آلرژی زایی قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* به خاطر حضور ژن $Aspf_1$ است. $Aspf_1$ آلرژن اصلی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* است که هم در ساختمان کونیدی و هایف وجود دارد و هم جزو آلرژن های ترشحی می باشد (5). این ویژگی یکی دیگر از خصوصیات شاخص *آسپرژیلوس فومیگاتوس* است که اهمیت این آلرژن را نشان می دهد.

در سال های اخیر، روش های بر پایه DNA برای بهبود در تشخیص بیماری های قارچی گسترش پیدا کرده است و PCR به عنوان روشی امید بخش که دارای حساسیت و اختصاصیت بالاست نام برده می شود. استخراج DNA، مرحله اصلی برای تمام روش های مولکولی است که شامل PCR نیز می باشد. PCR، روش مفیدی در قارچ شناسی برای تشخیص بیماری های مربوط به قارچ ها است که مراحل مختلفی شامل آماده سازی DNA و استخراج آن دارد. روش های مختلفی برای استخراج DNA پیشنهاد شده که می توان بر اساس شکست دیواره سلولی، آن ها را طبقه بندی کرد که شامل لیز دیواره

www.SID.ir

Archive of SID

سلولی می باشد،که همگی زمان بر است و گاهی نتایج استخراج و PCR به دلیل استفاده از مواد شیمیایی و سمی (فنل کلروفرم) در برخی پروتکل ها ، رضایت بخش نمی باشد (15). برای کاهش هزینه و زحمت و زمان PCR و برای جلوگیری از ریسک آلودگی در حین استخراج DNA و برای رفع نیاز از مواد لازم برای استخراج ، پیشنهاد شده از Colony PCR استفاده شود (12).

در این تحقیق جهت بهینه سازی، از روش Colony PCR با پرایمر های عمومی $Its_{4,1}$ استفاده گردید. از مزایای روش Colony PCR می توان به صرفه جویی در زمان، استفاده از لوازم و مواد ساده بدون نیاز به پروسه های مختلف برای استخراج DNA و نیاز به حداقل مواد کشت اشاره نمود. Mirhendi، در سال Colony PCR 2007 را سریع ترین راه در مقایسه با PCR برای تکثیر مخمر گزارش داد و اعلام کرد، این روش قابل اعتمادی برای تست های تشخیصی است. نتایج حاصل از Cao Muqing و همکارانش در سال 2008 با Colony PCR بر روی *Chlamydomonas*، تأییدی بر مطالعه حاضر است. در این تحقیق نیز با استفاده از قارچ های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *فوزاریوم اکسیسپوروم* مشخص گردید که Colony PCR تستی دقیق و قابل اعتماد جهت شناسایی قارچ های مورد نظر می باشد. با پرایمر اختصاصی $Aspf_1$، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در باند 658 bp مشاهده گردید و با پرایمر عمومی $Its_{4,1}$، *فوزاریوم اکسیسپوروم* در باند 544 bp مشاهده و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در باند 597 مشاهده گردید. نکته قابل توجه این است که کلونی که برداشته می شود، حتی المقدور کمترین مقدار باشد. علت آن این است که هر چه مقدار کلونی زیاد باشد، تجمع بالا رفته و در نتیجه DNA ها از هم باز نخواهد شد و پرایمر ها نمی توانند Annealing خوبی داشته باشند، پس باند شفافی مشاهده نخواهد شد. این نتایج نیز منطبق با نتایج حاصل از Mirhendi و همکاران در سال 2007 می باشد.

نتیجه گیری

افزایش تعداد بیمارانی که تحت درمان با داروهای ایمونوساپرسیو و کموتراپی هستند یا مبتلا به نقص ایمنی اکتسابی یا مادر زادی می باشند از مشکلات جدی است. میزان مرگ و میر عفونت های فرصت طلب قارچی مانند آسپرژیلوزیس نیز افزایش یافته است.

طیف هیچ یک از عفونت های شناخته شده قارچی به اندازه عفونت هایی که تحت عنوان آسپرژیلوزیس خوانده می شوند وسیع نمی باشد و تمام انواع عفونت، انتشار جغرافیایی بسیار گسترده داشته و در سراسر جهان دیده می شود که اصلی ترین عامل اتیولوژیک آن *آسپرژیلوس فومیگاتوس* می دانند. لذا بررسی وتشخیص این قارچ در خون یکی از اهداف تحقیق بود.

روش معمول در تشخیص آزمایشگاهی قارچها، کشت و مشاهدات بعد از آن، براساس خصوصیات مرفولوژیکی است که دشوار بوده و روزها تا هفته ها وقت ، برای جداسازی و کشت نیاز دارد. در بهبود بخشیدن این امر، برای تعیین هویت قارچ های پاتوژن و آلرژی زا روش زیست شناسی مولکولی گسترش پیدا کرده است. در سال های اخیر ، روش های بر پایه تشخیص DNA، برای بهبود در تشخیص بیماری های قارچی گسترش پیدا کرده است و PCR به عنوان روشی امید بخش که دارای حساسیت و اختصاصیت بالاست نام برده می شود. استخراج DNA ، مرحله اصلی برای تمام روش های مولکولی است که شامل PCR نیز می باشد. روش های مختلفی برای استخراج DNA پیشنهاد شده که همگی زمان بر است و گاهی نتایج استخراج و PCR به دلیل استفاده از مواد شیمیایی و سمی (فنل کلروفرم) در برخی پروتکل ها ، رضایت بخش نمی باشد. از مزایای روش Colony PCR که در این تحقیق مورد استفاده قرارگرفت، می توان به صرفه جویی در زمان، استفاده از لوازم و مواد ساده بدون نیاز به پروسه های مختلف برای استخراج DNA و نیاز به حداقل مواد کشت اشاره نمود. در این تحقیق نیز با استفاده از قارچ های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *فوزاریوم اکسیسپوروم* ، مشخص گردید که Colony PCR تستی دقیق و قابل اعتماد جهت شناسایی قارچ های مورد نظر می باشد.

در نهایت پس از درک اشکالات موجود در روش های کشت و مورفولوژی و مشاهده سرعت عمل بالا، حداقل میزان کشت، عدم نیاز به پروسه های استخراج DNA در Colony PCR ، محققین این روش را به عنوان یک تست سالم و دقیق با کارایی بالا جهت تمامی قارچ های رشته ای مولد آلرژی توصیه می نمایند، همچنین در این تحقیق بواسطه استفاده از خون ، جهت استخراج DNA در زمینه قارچی جوابهای بسیار مناسبی گرفته شد که تا کنون در هیچ تحقیقی استفاده از خون صورت نپذیرفته بود.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. John M. Norvell, MD, Daniel Venarske, MD, Donna S. Hummell, MD. *Eosinophilic esophagitis: an allergist's approach.* 2007; 98(3): 207-215.
2. CHHAJER B. *Allergy*. Diamond Pocket Books (P) Ltd. 2005; 6-8.
3. Horner WE, Helbling A, Salvaggio JE, Lehrer SB. *Fungal Allergens*. Clinical Microbiology Reviews. 1995; 8(2): 161-179.
4. Crameri R, Hemmann S, Ismail C, Menzl G, Blaser K. *Disease-specific recombinant allergens for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis*. International Immunology. 1998; 10(8):1211-1216.
5. Latge JP. *The pathobiology of aspergillus fumigatus*. Trends Microbiol. 2001; 9:13-47.
6. Portnoy J, Chapman J , Burge H, Muieleberg M, Solomon W. *Epicoccum allergy, Skin reaction patterns and spore/mycelium disparities recognized by IgG and IgE ELISA inhibition*. Ann Allergy. 1987; 59: 39-43.
7. Oliveria E, Giavina-Bianchi P, Fonseca ST, Kalil J. *Allergic diagnosis remains a challenge*. Respiratory Medicine. 2007; 101, 2352-2357.
8. Priyadarsiny P, Swain PK, Sarma PU. *Exppression and characterization of Asp f1, an immunodominant allergen/antigen of A fumigatus in insect cell*. Mol Cell Biochem. 2003; 252:157-163.
9. Crameri R, Limacher A, Weichel M, Glaser AG, Zeller S, Rhyner C. *Structural aspects and clinical relevance of Aspergillus fumigatus antigens*. Allergens Medical Mycology. 2006; 44: 261-267.
10. Madan T, Kishore U, Singh M, Strong P, Clark H, Hussain EM, Reid KB, *Sarma PU. Surfactant protein A and D protect mice against pulmonary hypersensitivity induce by Aspergillus fumigatus antigens and allergens*. J Clin Invest. 2000, 1107-475.
11. Purkayastha S, Madan T, Shah A, Krishnamurthy HG, Sarma PU. *Multifunctional antigene of A.fumigatus and specific antibodies*. Appl Biochem Biotechnol. 2000; 83:271-283.
12. Alshahni M, Koichi M, Yamada T, Satoh K, Ishihara Y. *Direct colony PCR of several Medically important fungi using Ampdirect Plus.* Jpn J Infect Dis. 2009; 62:164-167.
13. Anna Lau, Tania C, Okcha L, Keith S, Catriona H. *Colony Multiplex-Tandem PCR for Rapid, Accurate Identification of [10] Fungal Cultures* .J Clin Microbiol. 2008; 46: 4058-4060.
14. Muqing Cao, Yu Fu, Yan Guo, Junmin Pan. *Chlamydomonas (Chlorophyceae) Colony PCR.* Protoplasma. 2008; 235:107–110
15. Mirhendi H, Diba K, Rezaei A, Jalalizand N, Hosseinpur L, Khodadadi H. *Colony PCR Is a Rapid and Sensitive Method for DNA Amplification in Yeasts.* Iranian Journal of Public Health. 2007; 36: 40-44.

www.SID.ir