مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
زمستان ۱۳۸۹، دوره دوم، شماره هفتم، صفحه ۱۶-۹

مقایسه آلرژی زایی قارچ های *تریکوفایتون روبروم* و *میکروسپوروم کنیس* در خوکچه هندی و طراحی پرایمر اختصاصی ژن Tri r4

مریم بهرام زاده داعی[۱]، منصوربیات[۲]، فاطمه غفاری فر[۳]، شهلا رودبار محمدی[۴]، ملیحه انتظاری سرکاریزی[۵]

۱- دپارتمان ژنتیک،دانشکده علوم پایه،دانشگاه آزاد اسلامی،واحد علوم وتحقیقات،تهران،ایران
۲- دپارتمان قارچ شناسی پزشکی و دامپزشکی،دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی،دانشگاه آزاد اسلامی،واحد علوم وتحقیقات،تهران،ایران
۳- دپارتمان انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، ،تهران،ایران
۴- دپارتمان قارچ شناسی ،دانشکده علوم پزشکی،دانشگاه تربیت مدرس، تهران،ایران
۵- دپارتمان ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی،واحد پزشکی تهران،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. dr_mansour_bayat@yahoo.com

دریافت: ۸۹/۹/۱۸ پذیرش: ۸۹/۱۲/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: *تریکوفایتون* روبروم که یک قارچ انسان دوست با انتشار وسیع و از عوامل کچلی در انسان می‌باشد، عامل ۸۰٪ تا ۹۳٪ از عفونت‌های درماتوفیتی مزمن یا عودکننده می باشد. پروتئین‌های تریکوفایتون خانواده‌های آنزیمی مختلفی را شامل می شوند که در بیماری زایی قارچی و آلرژی زایی دخالت دارند. ازجمله آلرژن‌های *تریکوفایتون روبروم* ***Tri r 2*** و ***Tri r 4*** می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی آلرژی زایی *تریکوفایتون روبروم* و *میکروسپوروم کنیس* می باشد.

روش بررسی: ابتدا قارچ تریکوفایتون روبروم روی محیط PDA کشت داده شد. سپس کونیدیهای آن توسط PBS استریل جمع آوری گردید. DNA آن استخراج شد وتست PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Tri r 4 صورت گرفت. جهت بررسی آلرژی زایی قارچ های *تریکوفایتون روبروم* و *میکروسپوروم کنیس*، از خوکچه هندی استفاده شد و تست های تزریق زیر جلدی آنتی ژن درماتوفیتی و بررسی های ماکروسکوپی آن صورت گرفت. به منظور تأیید آلرژن بودن قارچ ها IgE به روش الایزا اندازه گیری و در CBC خون خوکچه هندی درصد سلول های خونی و بویژه ائوزینوفیل ارزیابی گردید.

یافته ها: کونیدیها به وسیله تست PCR ویژه Tri r 4 تایید شد. نتیجه بررسی آلرژی زایی نشان داد، در خوکچه ای که *تریکوفایتون روبروم* وارد شده IgE، همچنین ائوزینوفیل و نوتروفیل بیشتری تولید شده است و تفاوت معنی داری با شاهد دارد، در حالیکه در خوکچه ای که *میکروسپوروم کنیس* وارد شده تفاوت معنی داری با شاهد دیده نشد.

نتیجه‌گیری: این تحقیق بیانگر تأثیرات مثبت آلرژن ها در افزایش تیتر IgE، ائوزینوفیل و نوتروفیل می باشد.

واژه‌های کلیدی: *تریکوفایتون روبروم*، *میکروسپوروم کنیس*، PCR ، آلرژی، Tri r4

www.SID.ir

مقدمه

در میان کلیه قارچهای بیماری زای انسانی، تنها در درماتوفیت‌ها رابطه بین انگل و میزبان طی زمان دچار تحول شده و به نوعی با هم سازش یافته اند. این گروه از عفونت‌های قارچی که توسط درماتوفیت‌ها ایجاد می‌شود درماتوفیتوزیس نامیده می‌شود(۱). کشف این مطلب که قارچها می‌توانند عامل بیماری درماتوفیتوزیس باشند به زمانی باز می‌گردد که رابرت رماک ساختارهای میکروسکوپی و غیر طبیعی را در زخم‌های فاوویک پیدا کرد(۲). درماتوفیتوزیس نه تنها یکی از نتایج کلنیزه شدن قارچها می‌باشد، بلکه حاصل واکنش میزبان نسبت به محصولات متابولیک آنها نیز می باشد. شدت این بیماری بستگی به سوش یا گونه‌های درماتوفیت‌ها، حساسیت میزبان به آن قارچ خاص و نیز وضعیت عمومی میزبان دارد(۳). درماتوفیت‌ها همگی کراتینوفیل بوده و برای رشد روی سطوح مو و ناخن و لایه‌های سطحی پوست که واجد اسکلروپروتئینی بنام کراتین هستند، سازش یافته اند. عفونت‌های بافت‌های عمقی با این قارچها نادر است(۴). قارچهای درماتوفیت بر حسب خواص شکل ظاهری (ماکروسکوپی) و ریزبینی (میکروسکوپی) کشت به سه جنس یا ژانر تقسیم شده است: ۱- میکروسپوروم ۲- تریکوفایتون ۳- اپیدرموفایتون (۱). *میکروسپورم کنیس* گونه‌ای است حیوان دوست و مخزن اصلی آن سگ و گربه می باشد، درحالیکه *تریکوفایتون روبروم* یک قارچ انسان دوست با انتشار وسیع بوده و از عوامل کچلی در انسان می‌باشد. ریپون طی تحقیقاتی که به عمل آورد، عفونت مزمن در انسان را اغلب با *تریکوفایتون روبروم* گزارش نمود(۵و۶). جونز در سال ۱۹۸۶ *تریکوفایتون روبروم* را عامل درماتوفیتوزیس که سبب عفونت مزمن می‌شود در انگلستان و ایالات متحده آمریکا گزارش نمود. هانی فین در سال ۱۹۷۴ و جونز در سال ۱۹۷۳ و کامان در سال ۱۹۸۱ در یک بررسی عامل درماتوفیتوزیس مزمن را *تریکوفایتون روبروم* بیان نمودند(۷). درماتوفیت‌ها مانند دیگر قارچها ترکیب آنتی ژنی پیچیده‌ای دارند. ترایکوفیتین نام عمومی برای عصاره آنتی ژنی درماتوفیت‌ها (گونه‌های تریکوفایتون) است و به نظر می‌رسد که محتوی گروهی از آنتی ژن‌هاست.

هر چند مطالعات کلینیکی نشان می‌دهند که تریکوفایتون‌ها در بروز بیماری آلرژیک نقش دارند. این نتیجه حاصل نشد تا دهه ۱۹۹۰ که خالص سازی آلرژن‌ها امکان پذیر شد. تکنیک‌های شیمیایی ایمنی استاندارد و روش‌های کلون کردن مولکولی منجر به تشخیص سریع آنتی ژن‌های دارای ویژگی‌های آلرژیک قوی شد. حساسیت نسبت به آلرژن‌ها از طریق بروز آزمون‌های پوستی IH قابل تشخیص می‌باشد. آلرژن‌ها پروتئین‌ها یا گلیکوپروتئین‌هایی با وزن مولکولی پایین هستند که باعث تحریک تولید آنتی بادی IgE می‌شوند. توانایی اجزا تریکوفایتون در اتصال به آنتی بادی IgE با استفاده از تکنیک‌های متعددی شامل فاز- جامد radioallergosorbent test [RAST] و enzyme linked immunosorbent assay و Western blot) و فاز- مایع (radioimmunoprecipitation) تأیید شده است. حضور آنتی بادی IgE به واسطه بروز ویل و فلر موضعی که ۵ تا ۲۰ دقیقه بعد از تزریق آنتی ژن به پوست ظاهر می‌شود، شناخته می‌شود(۸). گائو و تاکاشیما در سال ۲۰۰۴ سه ژن ساختاری *تریکوفایتون روبروم* رمزکننده actin (bp ۳۴۲۹) و دو آنتی ژن Tri r 2 (۲۹۵۰bp) و Tri r 4 (۳۹۸۸bp) کلون کرده و مشخصات آن‌ها را شناسایی کردند. آن‌ها به ترتیب حاوی شش، چهار و پنج اگزون بودند. به این منظوراز یکی از ایزوله‌های *T. rubrum* کتابخانه ژنی ساخته شد و غربالگری از طریق پروب‌های actin، Tri r 2و Tri r 4صورت گرفت. توالی ژنومی کامل و سازمان یافته این سه ژن شناسایی شد(۹). Tri r 2 و Tri r 4 از مهمترین آلرژن های تریکوفایتون روبروم می باشند. Tri r 2 یک پروتئین ۲۹ کیلو دالتونی، یک سرین پروتئاز است که ۴۱ تا ۵۸ درصد توالی آن با زیر خانواده *سابتیلاز* کلاس *D* هومولوگ است (۱۰). با وجود اینکه Tri r 2 به عنوان عضوی از اعضای خانواده آنزیمی سابتیلاز شناسایی شده، ولی هیچگونه فعالیت آنزیمی نشان نمی دهد. مطالعات قبلی حاکی از آن است که هومولوگ ۲۹ کیلو دالتونی سابتیلاز، Tri r 2 مشتق شده از قارچ درماتوفیت *تریکوفایتون روبروم* خصوصیات ایمونولوژیکی منحصر به فردی را نشان می‌دهد و قادر به القاء واکنش‌های ازدیاد حساسیت فوری (IH) و تأخیری (DTH) می‌باشد.

Tri r4 یک پروتئین ۸۳ کیلو دالتونی و کراتین دوست بوده که در ایجاد کلنی و بیماری زائی دخالت دارد (۱۱). تا به امروز، تعداد کمی از آلرژن‌های تریکوفایتون شناسایی شده اند. چالشی در شناسایی خصوصیات ذاتی آلرژن‌های تریکوفایتون به وسیله تکنیک‌های ایمنوشیمیایی استاندارد وجود دارد. پیشرفت‌های تکنولوژیکی اخیر پتانسیلی برای شناسایی آنتی ژن‌های جدید

www.SID.ir
Archive of SID

تریکوفایتون که دارای نقش دوگانه در بیماری زایی و بروز آلرژی می‌باشند را فراهم کرده است. چنین آنتی ژن‌هایی هدف‌های جدید را برای درمان عفونت مزمن مرتبط با آلرژی فراهم می‌کنند(۸). در این تحقیق هدف، طراحی پرایمر اختصاصی *تریکوفایتون روبروم* ژن Tri r 4، انجام PCR استاندارد، بررسی های آلرژی زایی این قارچ های *تریکوفایتون روبروم* و *میکروسپوروم کنیس*(با استفاده از تستهای ایمونولوژیکی مثل الایزا IgE، تست پوستی، CBC و بررسی ائوزینوفیلهای سرمی) بود.

روش بررسی

انجام PCR به منظورشناسایی آلرژن Tri r 4 *تریکوفایتون روبروم*: به منظور تهیه کشت تازه از *تریکوفایتون روبروم*، ابتدا ۱۲ گرم از پودر پتیتو دکستروز براث را در ۵۰ سی سی آب مقطر حل کرده، بعد از حرارت دادن و شفاف شدن محیط ۲۵ میلی گرم کلرامفنیکل را در ۵ میلی لیتر الکل ٪۹۰ حل کرده و به محیط کشت اضافه گردید و بعد از اتوکلاوکردن، محیط در داخل پلیت‌های استریل تقسیم گردید. تعداد 10^6 اسپور از ایزوله استاندارد *تریکوفایتون روبروم* به شماره ATCC ۱۱۴۰۴ شمارش و روی محیط پوتیتو دکستروز آگار(PDA) کشت داده شد و در دمای $^{\circ}C$ ۲۷به مدت۱۰ الی ۱۴ روز انکوبه گردید. سپس کونیدی و میسلیوم های آن زیر میکروسکوپ نوری بررسی گردید، سپس نمونه‌ها جمع آوری شد و در داخل میکروتیوب‌ها ریخته شد. در مرحله بعد استخراج DNA از محیط کشت بوسیله کیت ژن پژوهان پویاصورت گرفت(۱۲).

پرایمرهای Forward و Reverse با استفاده از Data base gene bank (ID:AY525330.1) و نرم افزار NCBI Primer Blast طراحی و آنالیز شدند. سپس با استفاده از نرم افزار Gene Runner در قسمت آنالیز Oligo توالی پرایمرها را وارد کرده و Hairpin loops، Dimers، Bulge loops و Internal loops را مورد بررسی تا از نظر کیفیت پرایمرهای طراحی شده تأیید نهایی شود.

Forward primer:
(5'-TTGGGGACTTGCCCGCGTTG-3')
Reverse primer:
(5'-CCAGCAGCCTTAGCGGTGCC-3')

در هر مخلوط PCR به ازای هر نمونه از مواد زیر اضافه می‌شود. به میزان ۲/۵ میکرولیتر بافر پی سی آر X ۱۰، ۰/۷میکرولیترdNTP ۰/۱ میلی مولار، ۱ میکرولیتر پرایمر فوروارد (۱۰ پیکومول) ، ۱ میکرولیتر پرایمر ریورس (۱۰ پیکومول) ،۱/۲میکرولیتر $MgCl_2$ (۰/۲ میلی مولار)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم پلیمراز، ۱/۵میکرولیتر نمونه DNA ، ۱۸ میکرولیتر آب مقطر. در نتیجه حجم نهایی محلول ۳۰ میکرولیتر شد.

پس از مخلوط کردن در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شده و طبق برنامه زیر PCR انجام گرفت. مرحله باز شدن یا واسرشت دو رشته اولیه در دمای $95^{\circ}C$ در مدت زمان ۵ دقیقه ، مرحله باز شدن یا واسرشت دو رشته در دمای $95^{\circ}C$ در مدت زمان ۱دقیقه، مرحله چسبیدن پرایمر ها به هدف در دمای$71^{\circ}C$ در مدت زمان ۱ دقیقه، مرحله ساخت رشته های مکمل هدف در دمای $72^{\circ}C$ در مدت زمان ۱ دقیقه و مرحله ساخت رشته های مکمل هدف نهایی در دمای $72^{\circ}C$ در مدت زمان ۱۰ دقیقه صورت گرفت. به منظور بررسی محصولات PCR به طور کیفی یا نیمه کیفی، محصول بر روی ژل برده شد(۹).

بررسی اثرات آلرژی زایی قارچ‌های *تریکوفایتون روبروم* و *میکروسپوروم کنیس* در خوکچه هندی: از آنجایی که دیواره سلولی قارچها می تواند آزاد شدن آلرژن به داخل محلول را کاهش دهد لذا جهت بدست آوردن مقادیر لازم از آلرژن نیاز به تخریب دیواره است. بدین منظور پس از رشد قارچ در محیط سابورودکستروز آگار، توده‌های میسلیومی را جمع آوری کرده و در داخل کاغذ آلومینیوم در تانک ازت قرار داده شد تا فریز شوند. پس از خارج کردن از تانک ازت با دسته هاون روی کاغذ آلومینیوم محتوی توده‌های میسلیومی کوبیده تا دیواره شکسته شده و آلرژن‌ها آزاد شوند. توده‌های میسلیوم بعلت فریز و دفریز شدن دیواره شان شکسته شدند. سپس بافر فسفات PBS استریل دارای$pH=7/4$ را به توده‌های میسلیومی اضافه کرده و بعد ورتکس شد تا کاملاً مخلوط شود.PMSF (آنتی پروتئاز فنیل متیل سولفوتیل فلوراید ۱ میلی مولار) تهیه شد و به مخلوط اضافه شد تا پروتئین‌ها و آلرژن‌ها تخریب نشوند (PMSF در الکل ۷۰ درجه و یا مقداری استون حل می‌شود). سانتریفوژ دور g×۱۳۰۰۰به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد تا پروتئین‌ها از دست نروند. مایع روئی را برداشته و تست برادفورد انجام شد. با توجه به مقدار کم پروتئین ، از تکنیک

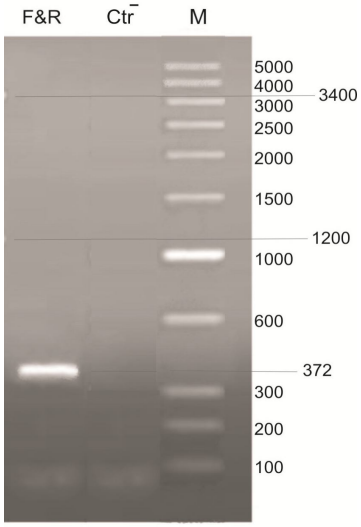
www.SID.ir
Archive of SID

اولترافیلتراسیون استفاده گردید. در این تکنیک از اولترافیلتر ۵۰ متعلق به شرکت MWCO استفاده شد، بدین ترتیب که سوسپانسیون حاصل از مرحله قبل درون غشا اولترافیلتر ۵۰ قرار گرفت. سپس مجدداً مخلوط را در تیوبی ریخته و در سانتریفوژ یخچال دار به مدت ۱۵ دقیقه دور g × ۱۰۰۰۰ قرار گرفت، بخش بالایی اولترافیلتر جهت دیالیز استفاده گردید. به منظور جداسازی نمک و مواد اضافی از پروتئین‌ها، نمونه‌ها مورد دیالیز قرار گرفتند و همچنین تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد صورت گرفت(۱۳).

بمنظور تعیین رقت آستانه پروتئین استخراج شده برای ایجاد آلرژی ابتدا سطح پوست پشت خوکچه هندی با الکل استریل تمیز شده و با استفاده از سرنگهای توبرکولینی یک میلی لیتری به میزان ۵ واحد انسولین، تزریق از غلظتهای پایین شروع شد (۰/۱ تا ۱ میکروگرم) که در غلظت ۱ میکروگرم شوک آنافیلاکسی دیده شد. نهایتاً رقت تصادفی ۰/۴ میکروگرم از پروتئین استخراج شده از عصاره قارچی بدست آمد. مقادیر بدست آمده به عنوان حداقل غلظت بیماری زا در قارچهای مورد پژوهش گزارش شد. به ۴ خوکچه هندی پروتئین استخراج شده از *تریکوفایتون روبروم* و به ۴ خوکچه هندی دیگر *میکروسپوروم کنیس* تزریق شد و ۴ حیوان نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شد (کنترل منفی تزریق بافر فسفات نمکی بود). به حیوانات مورد آزمایش ۰/۴ میکروگرم پروتئین به مدت ۴ هفته، در هر هفته ۱ نوبت تزریق به طریق زیر پوستی و هفته آخر یک تزریق به طریق درون صفاقی صورت گرفت. در محل تزریق ادم موضعی (ویل) و هاله قرمز رنگ اطراف آن به صورت فلر ظاهر شد. سنجش فلر و ادم (ویل) بر حسب سانتی‌متر صورت می‌گیرد و معیار آلرژی‌زایی محسوب می‌شود. برای انجام آزمون‌های سرولوژیکی خون مستقیماً از قلب خوکچه هندی شاهد و تحت تیمار گرفته شد (علت خون گیری از قلب خوکچه هندی نامشخص بودن سیاهرگهای سطحی در این حیوان است). بلافاصله پس از خون گیری مقدار یک میلی لیتر خون حیوان در لوله‌های آغشته به EDTA (برای جلوگیری از انعقاد خون) ریخته شد. حدود یک میلی لیتر خون نیز برای بررسی میزان IgE به روش الایزا گرفته شد. نمونه‌های خون برای شمارش ائوزینوفیل و نوتروفیل و IgE به آزمایشگاه تشخیص طبی فرستاده شدند(۱۳).

یافته ها

نتایج حاصل از تکثیرDNA *تریکوفایتون روبروم* به روش PCR: محصول PCR همراه با مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ bp روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردید تا محصول PCR بررسی گردید. همانطور که در شکل مشاهده می گردد باند ۳۷۲ bp زمانیکه PCR استاندارد با استفاده از پرایمر اختصاصی Tri r4 انجام گرفت، بدست آمد(شکل ۱).



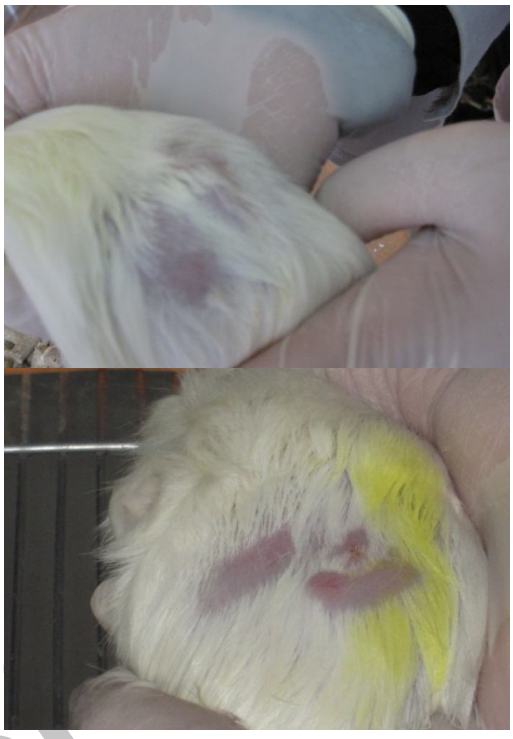
شکل ۱. نتایج حاصل از PCR، DNA *تریکوفایتون روبروم* بااستفاده از پرایمر اختصاصی Tri r 4 .

M: Ladder , F&R:Forward & Rewers (Tri r 4),Ctr⁻ :Negative control

بررسی آلرژی زایی قارچهای *تریکوفایتون روبروم* و *میکروسپوروم کنیس*: تزریق زیر پوستی عصاره‌های قارچی نشان داد که پس از تزریق عصاره، در محل تزریق پس از حدود ۱۵ تا ۳۰ دقیقه تورم و قرمزی ایجاد می‌شود که پس از یک ساعت به مقدار حداکثر می‌رسد. قطر متوسط ویل برای قارچهای *تریکوفایتون روبروم* و *میکروسپوروم کنیس* مقایسه شدند. مشاهدات نشان داد که میانگین قطر ویل در نمونه شاهد ۰/۵سانتیمتر، میانگین قطر ویل در نمونه *تریکوفایتون روبروم* ۳ سانتیمتر و میانگین قطر ویل در نمونه *میکروسپوروم کنیس* ۱ سانتیمتر می باشد. از مقایسه میانگین نمونه‌های شاهد و *تریکوفایتون روبروم* تفاوت معنی داری در سطح $p<0.05$ مشاهده می شود. در حالیکه بین *میکروسپوروم کنیس* و نمونه شاهد تفاوت معنی داری وجود ندارد(شکل ۲).

www.SID.ir
Archive of SID

الف

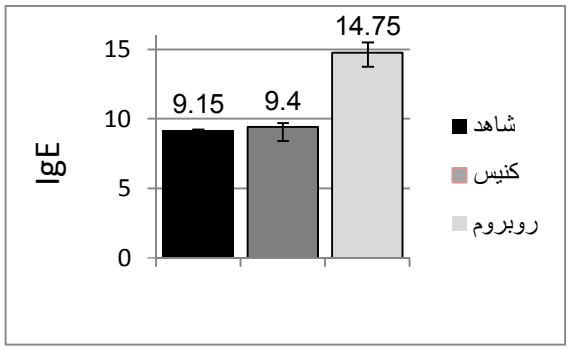


ب

شکل۲. الف- ویل و فلر ایجادشده پس از تزریق قارچ *تریکوفایتون روبروم*. ب- ویل و فلر ایجاد شده پس از تزریق قارچ *میکروسپوروم کنیس*

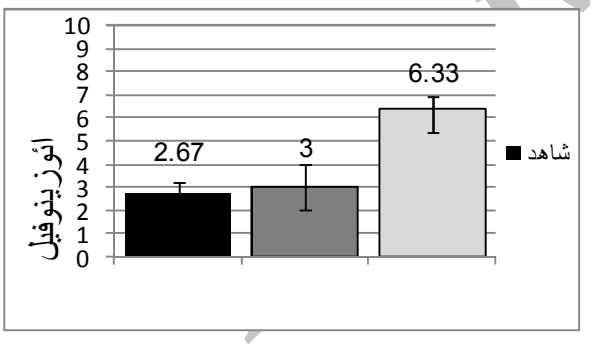
میزان ائوزینوفیل(خون ml /۱۰^{۴}*سلول) در نمونه شاهد ۰/۵۷۷ ± ۲/۶۷، میزان ائوزینوفیل(خونml /۱۰^{۴}*سلول) در نمونه *تریکوفایتون روبروم* ۰/۵۷۷ ± ۶/۳۳ و میزان ائوزینوفیل (خونml /۱۰^{۴}*سلول) در نمونه میکروسپوروم *کنیس* ۱ ± ۳ بدست آمد. میزان نوتروفیل (خونml /۱۰^{۴}*سلول) در نمونه شاهد ۲ ± ۵۰، میزان نوتروفیل (خون ml /۱۰^{۴}*سلول) در نمونه *تریکوفایتون روبروم* ۲ ± ۶۰ و میزان نوتروفیل (خونml /۱۰^{۴}*سلول) در نمونه میکروسپوروم *کنیس* ۲ ± ۵۲ بدست آمد. همچنین میزان IgE (mg/ml) در نمونه شاهد ۰/۰۷ ± ۹/۱۵، میزان IgE (mg/ml) در نمونه *تریکوفایتون روبروم* ۰/۷۸ ± ۱۴/۷۵ و میزان IgE (mg/ml) در نمونه میکروسپوروم *کنیس* ۰/۲۸ ± ۹/۴بدست آمد.

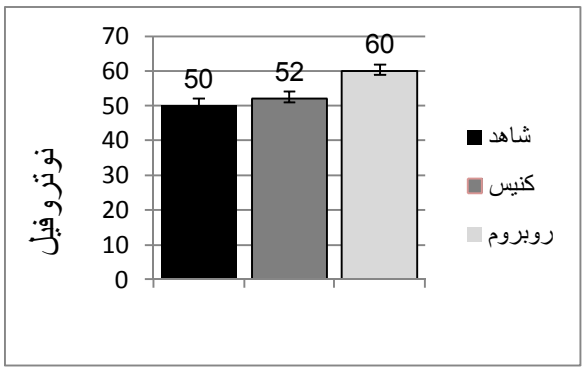
نمودار ۱. میزان میانگین IgE در نمونه‌های شاهد و تیمار($p<0.05$)



بررسی میزان آنتی بادی IgE در سرم خون حیوان نشان می دهد که مقدار این ماده در اثر تزریق قارچ در مقایسه با میزان آن در اثر تزریق بافر فسفات نمکی مقداری افزایش یافته، که بین قارچ میکروسپوروم *کنیس* و بافر این افزایش معنی دار نیست ولی بین *تریکوفایتون روبروم* و بافر معنی دار و در سطح $p<0.05$ است. همچنین بین *تریکوفایتون روبروم* و میکروسپوروم *کنیس* اختلاف معنی دار در سطح $p<0.05$ وجود دارد.

نمودار های ۲ و۳. میزان میانگین نوتروفیل و ائوزینوفیل در نمونه‌های شاهد و تیمار($p<0.05$)





www.SID.ir

با بررسی میانگین میزان ائوزینوفیل‌ها و نوتروفیل‌ها دریافتیم که میزان آن‌ها در اثر تزریق قارچ *تریکوفایتون روبروم* در مقایسه با میزان آن‌ها در اثر تزریق بافر فسفات نمکی تفاوت معنی داری در سطح $p<0.05$ نشان می دهد، در صورتیکه در اثر تزریق قارچ *میکروسپوروم کنیس* این تفاوت در سطح $p<0.05$ معنی دار نمی باشد. بعلاوه اختلاف معنی دار در میزان ائوزینوفیل‌ها و نوتروفیل‌ها در اثر تزریق قارچ *تریکوفایتون روبروم* در مقایسه با *میکروسپوروم کنیس* درسطح $p<0.05$ مشاهده می شود.

بحث

درماتوفیتوزیس شایعترین عفونت قارچی در سراسر جهان محسوب می‌شود (۱۴). پیشینه ارتباط بین بیماری‌های آلرژیک و درماتوفیتوزیس مزمن به بیش از ۷۰ سال بر می گردد(۸). شناسایی خصوصیات مولکولی و ایمنولوژیکی آلرژن‌های تریکوفایتون چشم اندازی را نسبت به مکانیسم‌های ایمنی که پاسخ‌های ایمنی دوگانه در برابر تریکوفایتون را کنترل می‌کنند، ایجاد می‌کند(۸). تریکوفایتون روبروم متداولترین پاتوژنی است که باعث درماتوفیتوزیس می‌شود و تقریباً ۸۰٪ موارد انیکومایکوزیس گزارش شده ناشی از این قارچ می‌باشد. مطالعات در زمینه ساختار، بیان و تنظیم ژنی T. rubrum بعلت طبیعت غیر تهاجمی این قارچ نسبتاً محدود می‌باشد(۹). *تریکوفایتون روبروم* دو نوع پروتئین Tri r4 (۸۳ KDa) و Tri r2 (۲۹ KDa) تولید می‌کند که می‌توانند پاسخ‌های IH و DTH را القاء کنند. توصیف عملکرد آلرژن‌های تریکوفایتون در بیماری زائی قارچی براساس خصوصیات توالی آنها نشان داد که نقش آنزیمی دارند. به هر حال جزئیات عملکرد آنزیمی آلرژن‌های تریکوفایتون هنوز آنالیز نشده است و این امکان وجود دارد که نه تنها در ایجاد درماتوفیتوزیس بلکه در بروز پاسخ‌های التهابی آلرژیک درون مجرای تنفسی نقش داشته باشند(۸). ایجاد موتان‌های دارای حذف در گونه‌های قارچی که فاقد بیان ژن‌های خاص می‌باشند امروزه یک روش متداول می‌باشد. آنالیز گونه‌های تریکوفایتون که در آن‌ها، Tri r 2 و Tri r 4 یا هومولوگ‌های آن‌ها بیان نمی شوند، چشم اندازی را نسبت به اهمیت این آنتی ژن‌ها به عنوان هدف در پاسخ‌های سلول T و پاسخ‌های سلول B (مانند IgE وIgG) همچنین نسبت به عملکرد بیولوژیکی آن‌ها در بافت زنده ایجاد می‌کند.

به هر حال شناسایی هدف‌های مولکولی مناسب برای درمان یک چالش بزرگ می‌باشد(۱۵).

تکنولوژی PCR روشی ساده و سریع است که در صورت عدم اطلاع از توالی نوکلئوتیدی اختصاصی، قادر به تعیین پلی مورفیسم DNA اختصاصی گونه یا اختصاصی سویه درماتوفیت‌ها براساس الگوی باندهای ایجاد شده بر روی ژل الکتروفورز است. PCR اغلب جهت تکثیر یک توالی شناخته شده DNA بکار می رود (۱۶). اگر چه ابداع تکنولوژی DNA نوترکیب در دهه ۱۹۹۰، شناسایی آلرژن‌های دیگر را تسهیل کرد اما بنظر می‌رسد که هنوز آلرژن‌های دیگری باقی مانده اند تا شناسایی شوند. بعلت طولانی بودن دوره درمان درماتوفیت ها و ناشناخته بودن عامل آلرژن در بیماری های آلرژیک پوستی، شناسایی و معرفی شاخص هایی جهت تشخیص صحیح و به موقع و در مراحل ابتدایی شروع بیماری،کمک ارزنده و قابل توجهی به بیمار و پزشک و خط درمانی می کند. در نتیجه این مطالعه در راستای چنین هدفی به معرفی آلرژن Tri r 4 پرداخت که می تواند شاخص جدیدی در تشخیص به موقع درماتوفیت ناشی از *T.rubrum* باشد. از آنجائیکه مواد آلرژن در محیط فراوان می باشند، لذا ابتلا به بیماری های آلرژیک موجب پیچیدگی تشخیص برای پزشک و طولانی بودن دوره درمان می شود، از این رو تشخیص به موقع و سریع آلرژن در درمان بیماری نقش کاملاً اساسی دارد و استفاده از یک شاخص تشخیصی که بتوان با آن با قطعیت و اطمینان بیشتر به تشخیص پرداخت از اهم موضوعات پزشکی می باشد.

جونز و همکاران در سال ۱۹۸۶ نشان دادند که مکانیسم سیستم ایمنی باعث درماتوفیتوزیس مزمن شده و در چنین حالتی ظرفیت سنتز IgE بیشتر می‌شود(۷). همچنین سوجگارد و لوستین در سال ۱۹۸۵ با استفاده از روش crossed radio-immunoelectrophoresis پی به وجود آنتی بادی IgE اختصاصی در ۸ بیمار مبتلا به عفونت *تریکوفایتون روبروم* بردند، در حالیکه سطح آنتی بادی IgE توتال در حد نرمال بود. از سوی دیگر در سرم ۱۰ بیمار مبتلا به کچلی همراه با التهاب در نتیجه قارچ های *میکروسپوروم کنیس* ، *تریکوفایتون منتاگروفایتیس* و *تریکوفایتون وروکوزوم* و همچنین در ۶ فرد کنترل غیر آلوده سطح آنتی بادی IgE اختصاصی افزایش نیافت(۱۰). این تحقیق بیانگر تأثیرات مستقیم آلرژن ها در افزایش تیتر آنتی بادی IgE می باشد.

www.SID.ir
Archive of SID

در این مطالعه از مدل خوکچه هندی با وزن مولکولی ۲۵۰ کیلوگرم تهیه شده از موسسه رازی استفاده شد و تزریق قارچ های *تریکوفایتون روبروم* و *میکروسپوروم کنیس* به منظور بررسی میزان آلرژی زایی این دو قارچ صورت گرفت. زیرا این حیوان به آسانی در اثر تزریق آنتی ژن حساس می شود. در این مطالعه با توجه به مناسب بودن وضعیت پوست در ناحیه پشت حیوان و همچنین قابل دسترس بودن جهت تزریق و اندازه گیری واکنش های پوستی، این ناحیه جهت تزریق در نظر گرفته شد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج می توان بیان نمود *تریکوفایتون روبروم* سبب *افزایش IgE در سرم و آلرژی زایی* می شود که این مساله با افزایش ائوزینوفیل‌ها و نوتروفیل‌ها نیز تایید شد، در صورتیکه در اثر تزریق قارچ *میکروسپوروم کنیس* این نتایج مشاهده نگردید.

References

1- Behzadi P, Behzadi E. *Medical Mycology Laboratory diagnostic techniques pathogenic dermatophytes*. Kamale Danesh Press. Tehran, Iran; 2002; 18-35.
2- Ajello L, Hay JR. *Jopley and Wilson's microbiology and microbial infections.* Ninth edition, London, Sydney and Auckland Oxford University Press Inc. 1998; 215-217.
3- Zeini F, Mahbod ASA, Masoud E. *Comprehensive Medical Mycology*. Tehran University Press; 1998; 50-65.
4- Mahon CR, Manuselis G. *Text book of diagnostic microbiology*. Second edition. Saunders W B; 2000; 201-241.
5- Beneke SE, Rogers LA. *Medical mycology manual with human mycoses monograph*. Forth edition. Burgess publishing company. Minne apolis. 1980; 101-114.
6- Rippon JW. *Medical mycology (The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes).* Third edition. 1988; 22-45.
7- Jones HE. *Cells mediate immunity in the immunopathogenesis of dermatophytosis.* Acta Dermato Venerol. 1986; 121:73-83.
8- Woodfolk JA. *Allergy and dermatophytes.* Clinical microbiology reviews. 2005; 18: 30- 43.
9- Girgis SA, El-Fakkar NM, Badr H. *Genotypic identification and antifungal susceptibility pattern of dermatophytes isolated from clinical specimens of dermatophytosis in Egyptian patients.* Egyptian Dermatology Online Journal. 2006; 2.2:5-23.
10- Srejgaard E, Lowenstein H. *Trichophyton rubrum specific IgE serum in patients with chronic T.rubrum infection as demonstrated by crossed radio immune electrophoresis.* Denmark. Acta. Dermato. Venereolgica. Supp. 1985; 120:72-75.
11- Woodfolk JA, Sung SJ, Benjamin DC, Lee JK, Platts-Mills TAE. *Distinct human T cell repertoires mediate immediate and delayed-type hypersensitivity to the Trichophyton antigen, Tri r 2.* J. Immunol. 2000; 165: 4379-4387.
12- Jackson C, Barton R, Glyn E and Evans V. *Species Identification and Strain Differentiation of Dermatophyte Fungi by Analysis of Ribosomal-DNA Intergenic Spacer Regions.* Journal of Clinical Microbiology. 1999; 37:931-936.
13- Venturini J, Rossi-Ferreira R, Arruda MSP. *Production of Trichophyton mentagrophytes antigens and their characterization in mice*. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.2008; 14:3.
14- Faggi E, Pini G, Campisi E, Bertellini C, Difonzo E, Mancianti F. *Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes.* J Clin Microbiol. 2001; 39: 3382–3385.
15- Woodfolk JA, Wheatley LM, Piyasena RV, Benjamin DC, Platts-Mills TAE. *Trichophyton antigens associated with IgE antibodies and delayed type hypersensitivity.* J. Biol. Chem. 1998; 273: 29489-29496.
16- Gao J, Takashima A. *Cloning and characterization of trichophyton rubrum genes encoding actin,Tri r 2 and Tri r 4.* Journal of Clinical Microbiology. 2004; 42:3298-3299.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir