مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت) دوره ۵ شماره ۳ مهر و آبان ۱۳۹۰، ۸۷-۸۰

ردیابی گونه‌های آسپرژیلوس در نمونه‌های تنفسی(برونکوآلوئولار لاواژ) به روش کشت، اسمیر مستقیم و نِستِد پی سی آر

دکترسید امیر یزدان پرست[۱]، غزاله قندچی[۲]، فریبا حشمتی[۳]،
صنم افشار مقدم[٤]، محمد علی خدادوست[٥]

چکیده

زمینه و هدف: گونه‌های آسپرژیلوس از شایعترین پاتوژنهای قارچی مجاری هوایی به شمار می‌روند. این قارچها در بیماران دارای نقص ایمنی بصورت مهاجم عمل نموده و باتوجه به روند رو به افزایش تعداد این بیماران و همچنین در بیماران داوطلب پیوند اعضاء که با سرکوب شدید سیستم ایمنی مواجه‌اند از اهمیت خاصی برخوردارند. ازاین رو اهمیت عفونت های قارچی و بخصوص آسپرژیلوسی بسیار افزایش یافته و به تبع آن روشهای شناسایی دقیق و سریع این قارچها نیز از اهمیت بسیاری برخوردار شده است.

روش بررسی: روشهای معمول شناسایی قارچها از جمله اسمیر مستقیم، کشت و نمونه‌های پاتولوژیک آنچنان که باید یا سریع نیستند و یا از حساسیت لازم برخوردار نمیباشند. روشهای ایمونولوژیک مانند روشهای ردیابی آنتی بادی و آنتی ژن نیز اگرچه سریع هستند ولی فاقد ویژگی و دقت لازمه‌اند. روشهای مولوکولار از جمله PCR امروزه بشکل بسیار وسیعی به کمک ما آمده‌اند. دراین تحقیق از سه روش اسمیر مستقیم، کشت قارچی و نستد PCR برای شناسائی قارچ کپکی آسپرژیلوس در نمونه‌های تنفسی استفاده شده است.

یافته‌ها: پس از انجام تستها تعداد موارد آسپرژیلوس ردیابی شده توسط پی سی آر در مقایسه با دو روش دیگر بسیار بیشتر بود و در رتبه بعد کشت قارچ موارد بیشتری را نسبت به اسمیر مستقیم مورد شناسائی قرار داد.

نتیجه گیری: پس از انجام تستها تعداد موارد آسپرژیلوس در نمونه های تنفسی توسط PCR در مقایسه با دو روش دیگر بسیار بیشتر بوده و در رتبه بعد کشت قارچ موارد بیشتری را نسبت به اسمیر مستقیم نشان داده است.

واژه‌های کلیدی: گونه‌های آسپرژیلوس، اسمیر مستقیم، نستد PCR، کشت قارچ

* نویسنده مسئول :
دکتر سید امیر یزدان پرست ؛
دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
Email :
Syazdanparast@tums.ac.ir

- دریافت مقاله : اردیبهشت ۹۰ - پذیرش مقاله : آبان ۹۰

مقدمه

آسپرژیلوس‌ها از معضلات مهم کلینیکی در بیماران دارای نقص در سیستم ایمنی می‌باشند(۳-۱). امروزه تعداد این بیماران، بدلیل افزایش موارد پیوند عضو و نیز سرطانها و ایدز رو به افزایش است.

این قارچ‌ها در این بیماران ایجاد آسپرژیلوزیس مهاجم می‌نماید. آسپرژیلوزیس مهاجم نیاز به تشخیص سریع و اولیه دارد. روشهای معمول شناسایی قارچها از جمله اسمیر مستقیم، کشت و نمونه‌های پاتولوژیک آنچنان که باید یا سریع نیستند و یا از حساسیت لازم برخوردار نمی‌باشند(٤-۱).

روشهای ایمونولوژیک مانند روشهای ردیابی آنتی بادی و آنتی ژن نیز اگرچه سریع هستند، اما فاقد

[۱] دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۲] کارشناس ارشد قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۳] کارشناس ارشد میکروب شناسی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[٤] دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[٥] کارشناس ارشد قارچ شناسی آزمایشگاه بیمارستان مسیح دانشوری

Archive of SID
www.SID.ir

ویژگی و دقت لازم هستند و بعضاً در بیماران دارای نقص در سیستم ایمنی که در تولید آنتی بادی مشکل دارند قابل انجام نمی‌باشند(۵و۱).

روشهای ملکولی از جمله PCR امروزه به شکل بسیار وسیعی به کمک ما آمده‌اند. این روشها هم حساسیت لازم و هم ویژگی کافی و نیز سرعت مناسب را دارا هستند. ما در این تحقیق از روش PCR برای شناسائی آسپرژیلوس‌ها در نمونه‌های تنفسی بهره گرفتیم تا فتح بابی برای به کار گیری روش PCR در ردیابی انواع قارچ‌ها و بخصوص آسپرژیلوس باشد. نستد پی سی آر یک روش پی سی آر دو مرحله ای است که برای افزایش حساسیت و اختصاصی بودن پی سی آر به کار می‌رود. این روش حساسیت و ویژگی پی سی آر را به نحو چشمگیری بالا می برد و احتمال تکثیر قطعه مورد نظر را در مقابل قطعات غیر اختصاصی افزایش می دهد. در روش نستد پی سی آر دو مرحله پی سی آر انجام می‌شود. در مرحله اول با استفاده از پرایمرهای فوروارد و ریورس قطعه ای از ژن مورد نظر تکثیر می‌گردد. در مرحله دوم دو پرایمر دیگر طراحی شده که یک قطعه کوچکتر را درون قطعه تکثیر شده در مرحله اول شناسائی کرده و تکثیر می نماید. لذا این روش در تشخیص عفونت‌های مهاجم قارچی در نقص ایمنی استفاده می‌شود و حسن آن این است که به سرعت جنس و گونه قارچ را مشخص می‌کند(۹-۶).

روش بررسی

روشهای مختلف استخراج DNA مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت روشی که در بخش مواد و روشها ذکر گردیده انتخاب شد. در صورتی که از روش PCR به شکل معمول در کلینیک‌های تشخیصی استفاده شود بهتر است از کیت‌های تجاری آماده برای استخراج DNA بهره برداری کرد تا در وقت صرفه جویی گردد.

نمونه: نمونه های تنفسی از بیماران مراجعه کننده به مرکز درمانی مسیح دانشوری جمع آوری گردید. این بیماران برای تشخیص از نظر قارچ به بیمارستان مراجعه کرده بودند.

اسمیر مستقیم: از هر نمونه یک لام اسمیر مستقیم تهیه گردید که پس از فیکساسیون به روش گرم رنگ آمیزی و مشاهده شد.

کشت قارچ: برای هر نمونه کشت قارچ بر روی محیط سابورود دکستروز آگار(پودر از شرکتCONDA LABORATORIES, S.A) انجام شد. پودر مربوطه با توجه به دستورالعمل همراه، در مقدار معینی آب با حرارت دادن حل و سپس اتوکلاو گردیده و پس از خنک شدن تا دمای حدود ۵۰ درجه سانتی گراد به این محیط آنتی بیوتیک جنتامایسین برای جلوگیری از رشد باکتریها اضافه گردید.

استخراج DNA: یک سی سی از نمونه را برداشته در دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و بر روی رسوب حاصل ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده با ترکیب زیر اضافه نموده و به مدت یک شب در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمودیم(۱۱-۱۰).

ترکیب بافر لیز کننده:

-Tris-Hcl, 50 mM
-SDS, 10 %
-Proteinase K, 250 ug/ml

پس از انکوباسیون، به میکروتیوب حاوی نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر NaCl۵ مولار اضافه نموده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس هم حجم محلول درون میکروتیوب(۷۰۰ میکرولیتر) به آن کلروفرم-ایزوآمیل الکل(به نسبت ۱/۲۴) اضافه نموده و ورتکس شد. پس از آن که مخلوط درون میکروتیوب خوب به هم خورد و شیره سفید رنگی حاصل گردید، میکروتیوب ها با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع شفاف رویی را به

www.SID.ir
Archive of SID

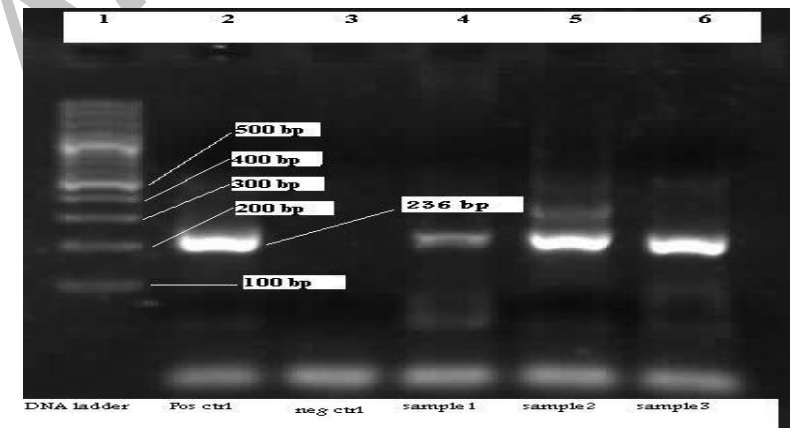
میکروتیوب تمیز دیگری انتقال داده و به نسبت ٦/١٠ حجم، به آن ایزو پروپانول افزوده شد. سپس میکروتیوب ها را سر و ته شد تا کلاف DNA تشکیل گردد و در ادامه میکروتیوب ها در دور ١٤٠٠٠ دور به مدت ١٥ دقیقه سانتریفوژگردید.

به رسوب حاصله ٥٠٠ میکرولیتر اتانول ٧٠٪ افزوده و مرحله سانتریفوژ قبل تکرار شد. مایع الکلی رویی را خارج کرده و رسوب در هوای آزاد یا بلوک گرم کننده قرار داده شد تا خشک شود. باید دقت کرد که DNA نباید بیشتر از حد لازم خشک شود، چون باعث شکسته شدن آن می شود. به رسوب خشک شده DNA ٣٠٠ میکرولیتر DEPC Water اضافه نموده و از آن به عنوان الگو برای PCR استفاده گردید(٩).

در روش nPCR دو مرحله PCR انجام می شود. در مرحله اول با استفاده از پرایمرهای مستقیم (Forward) و معکوس(Reverse)، قطعه‌ای از ژن مورد نظر تکثیر می‌گردد. در مرحله دوم دو پرایمر دیگر طراحی شده که یک قطعه کوچکتر را درون قطعه تکثیر شده در مرحله اول(PCR اول) شناسایی کرده و تکثیر می کند.

برای مرحله دوم(PCR دوم) مقدار کمی از محصول PCR اول(مثلا ٥ul از رقت ١:١٠٠ یا بالاتر) به عنوان الگو استفاده می‌شود که به طور غالب قطعات تکثیر شده PCR اول هستند. چون پرایمرهای PCR دوم هم مشخصاً برای تکثیر قطعه ای از درون محصول PCR اول طراحی شده‌اند، بنابراین احتمال تکثیر قطعات غیر اختصاصی به میزان بسیار بالایی کاهش خواهد یافت. نتایج حاصل از انجام PCR برای نمونه‌های مورد بررسی در این تحقیق بیانگر این حقیقت است که روشهای مولکولی سریعتر و دقیقتر عمل می‌نمایند(تصویر ١).

در این بررسی، PCR بعنوان روش مرجع انتخاب شده و دو روش دیگر بر اساس نتایج آن سنجیده و مقایسه شده است. بر این اساس، روش اسمیر مستقیم نسبت به PCR دارای صحت ٦٧/٩٪و حساسیت ٥/٩٪ و ویژگی ٩٨/٦٪ و ارزش اخباری مثبت: ٦٦/٧٪ و ارزش اخباری منفی: ٦٨٪ می‌باشد. همانگونه که مشاهده می شود روش اسمیر مستقیم دارای ویژگی و صحت خوب اما حساسیت پایینی است و بسیاری از موارد عفونت از دسترس این تشخیص این روش به دور می ماند.



تصویر ١ : نتایج حاصل از انجام PCR بر روی نمونه های مورد بررسی(خطوط شماره۴ و۵ و۶، کنترل منفی(خط شماره۳)و کنترل مثبت(خط شماره ٢)

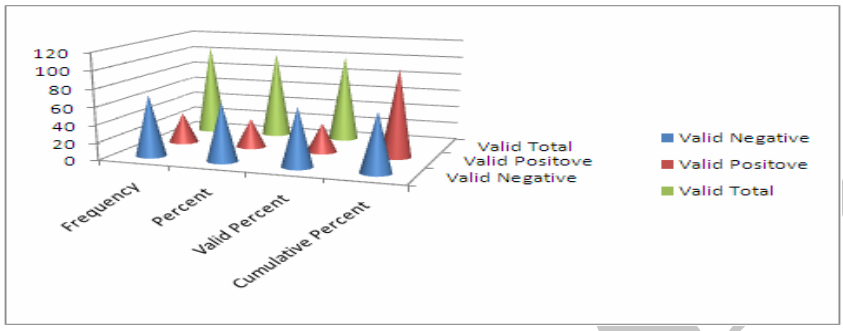
Archive of SID

www.SID.ir

در مورد کشت قارچ نتایج مقایسه به شرح ذیل گزارش شد:

صحت: ۷۱/۸٪، حساسیت: ۲۳/۵٪، ویژگی: ۹۵/۷٪، ارزش اخباری مثبت: ۷۲/۷٪، ارزش اخباری منفی: ۷۱/۷٪.

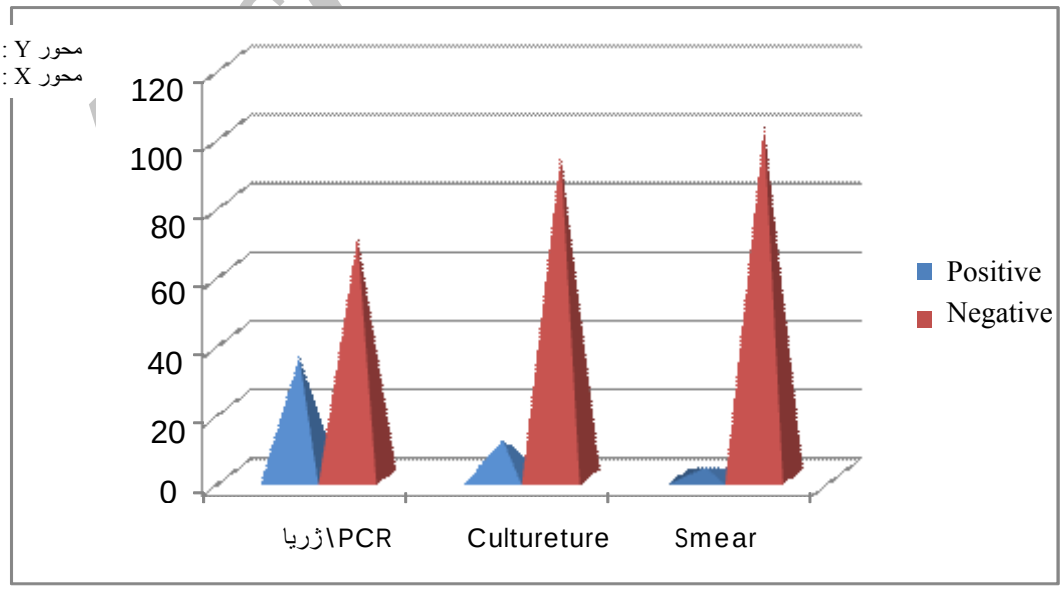
باز هم ملاحظه می‌شود که صحت و ویژگی روش تشخیصی کشت قارچ بالاست، اما حساسیت آن پایین می باشد و بالطبع موارد بسیاری از عفونت‌های قارچی را به روش کشت قارچ نمی‌توان تشخیص داد(تصویر ۲ و۳ و جدول ۱).



تصویر ۲: فراوانی PCR مثبت(درصد)

جدول ۱: درصد فراوانی پی سی آر مثبت

		فراوانی	درصد	درصد معتبر	درصد تجمعی
معتبر	منفی	۷۰	٦٦/۷	٦٦/۷	٦٦/۷
	مثبت	۳۵	۳۳/۳	۳۳/۳	۱۰۰
	کل	۱۰۵	۱۰۰	۱۰۰	



تصویر ۳ : تعداد موارد ردیابی شده توسط هر روش

www.SID.ir

تهیه پرایمرها: پرایمرها برای این تحقیق بر طبق جدول۱ ، انتخاب شده، با نرم افزارهای مناسب مانند Oligo و سایت Medline مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت توسط شرکت آرمین شگرف سنتز گردید(۱۲). با توجه به آنکه از Nested PCR استفاده شد. دو جفت پرایمر برای این کار به کارگرفته شد که یک جفت یعنی AFU7S و AFU7AS برای PCR اول و جفت دیگر یعنی AFU5S و AFU5AS برای PCR دوم مورد بررسی قرار گرفت(جدول۲).

جدول ۲: لیست پرایمر های مورد استفاده در این پژوهش

نام پرایمر	سکانس	تعداد باز
AFU7S	cgg ccc tta aat agc ccg	18 mer
AFU7AS	ga ccg ggt ttg acc aac ttt	20 mer
AFU5S	agg gcc agc gag tac atc acc ttg	24 mer
AFU5AS	ggg **R**gt cgt tgc caa c**Y**c **Y**cc tga	24 mer

انجام PCR: با توجه به مشخصات پرایمرها باید شرایط واکنش PCR تنظیم و بهینه سازی می‌گردید، که این کار در ابتدا انجام شد.

برای این کار ابتدا دمای انیلینگ(Annealing) مناسب تعیین شد و برای این منظور از PCR گرادیانت با محدوده دمایی ٤ درجه سانتی گراد بالاتر و پایین‌تر از Tm پرایمر استفاده شد(۱۳).

سپس واکنش ۲۵ میکرولیتری با استفاده از مواد زیر و در غلظت‌هایی که ذکر می‌گردد، تهیه شد.

1x PCR buffer
1.5 mM MgCl2
200 uM DNTPs
0.5 uM primers
0.25 U Taq DNA Polymerase
200 ng sample DNA
Water up to 25 ul

برنامه PCR برای PCR اول و دوم به شرح ذیل می‌باشد:

94°C 2 دقیقه
30 cycle in:
94°C 1 دقیقه
65°C 1 دقیقه
72°C 1 دقیقه
Final extension:
72°C 5 min

انجام الکتروفورز ژل آگاروز: محصول PCR را در ژل ۲٪ آگاروز الکتروفورز شد. پس از اتمام الکتروفورز ژل را با استفاده از سیستم ژل داکیومنتیشن (Gel-Documentation) مشاهده کرده و از ژل عکسبرداری شد.

یافته‌ها

۱۰۳ نمونه کلینیکی و ۲ نمونه کنترل مثبت و منفی جمع آوری شده و برای آنها تست گذاشته شد. ۳ مورد از نمونه‌های اخذ شده در بررسی‌های میکروسکوپی اسمیر مستقیم، میسلیوم قارچی مشاهده گردید که در یک مورد توسط هیچکدام از روشهای دیگر یعنی کشت و PCR مورد تایید قرار نگرفت. ۱۱ مورد از نمونه های مورد بررسی در کشت قارچ مثبت شدند و کلنی قارچ بر روی محیط سابورود دکستروز آگار به دست آمد.

Archive of SID

www.SID.ir

از این ۱۱ مورد ۳ مورد آسپرژیلوس نایجر، یک مورد آسپرژیلوس فلاووس و بقیه اسپس‌های آسپرژیلوس گزارش گردید. از میان موارد مثبت شده ۹ مورد توسط اسمیر مستقیم مورد تایید قرار نگرفت اما در مورد روش PCR سه مورد از موارد مثبت کشت توسط PCR منفی گزارش گردید.

۳۵ مورد از نمونه های مورد بررسی در این تحقیق در روش PCR مثبت شد. از این میان دو مورد با اسمیر مستقیم و ۳۳ مورد با کشت قارچی مطابقت و همراهی دارد.

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق از روش PCR برای شناسایی آسپرژیلوس‌ها در نمونه‌های تنفسی بهره گرفته شد تا فتح بابی برای به کار گیری این روشها در تشخیص قارچ‌ها در بیمارستان‌ها باشد. بر روی نمونه‌های مورد بررسی سه روش اسمیر مستقیم، کشت و PCR به کار گرفته شد و در روش اسمیر مستقیم تنها ۳ مورد مثبت مشاهده گردید که یک مورد نه توسط کشت و نه توسط PCR مورد تایید قرار نگرفت. علت این امر را می‌توان خطا در تشخیص میسلیوم در دید میکروسکوپی و یا مربوط نبودن میسلیوم مشاهده شده به آسپرژیلوس دانست. در مورد قسمت دوم مسئله می‌توان گفت که اگر میسلیوم مشاهده شده مربوط به قارچهای رشته‌ای دیگری بوده باشد از آنجا که این قارچها به روند پردازش نمونه قبل از کشت حساس بوده و با خرد شدن میسلیوم‌ها در کشت رشد نمی کنند، احتمال می رود که اجزاء قارچی مشاهده شده مربوط به انها بوده و به علت روند پردازش نمونه از بین رفته‌اند. همچنین اجزاء قارچی مشاهده شده ممکن است مربوط به قارچهایی بوده باشد که در شرایط فراهم شده در این تحقیق توان رشد نداشته‌انـد و برای رشد نیاز به شرایط متفاوتی داشته‌اند که طبـعا در محیط کشت رشد نکرده‌اند.

در کشت ۱۱ نمونه مثبت جدا شد که با بررسی‌های ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک و نیز انجام اسلاید کالچر قارچ آسپرژیلوس تشخیص داده شد. از این ۱۱ مورد فقط دو مورد در اسمیر مستقیم تشخیص قارچ داده شده بود. ولی از این ۱۱ مورد ۹ مورد توسط PCR مورد تایید قرار گرفت. در ۲ موردی که علیرغم رشد آسپرژیلوس در محیط کشت PCR نمونه مربوطه منفی بوده است، دلیل آنرا می‌توان در آلودگی پلیت کشت هنگام یا پس از تلقیح نمونه جستجو کرد. البته خطای PCR و مثبت کاذب را هم نمی‌توان از نظر دور داشت. برای این منظور ما PCR نمونه های مذکور را دوبار دیگر همراه با کنترل مثبت و کنترل منفی تکرار کرده ایم. متاسفانه امکان تکرار کشت بعلت از دست رفتن نمونه ها وجود نداشت.

برای PCR از کنترل منفی به دو شکل استفاده شده است. به عبارت دیگر دو نوع کنترل منفی به کار گرفته شده است. در یک مورد از آب مقطر به عنوان کنترل منفی یا بلانک استفاده شد که به همراه هر PCR یک نمونه بلانک آب مقطر قرار داده شد که این امر باعث شد اگر آلودگی وارد کار شده باشد نمونه بلانک نیز باید مثبت می‌شد. در مورد بعد از DNA یک قارچ سیاه به عنوان کنترل PCR و پرایمر های آن استفاده گردید که هیچگونه باندی در محدوده مورد انتظار مشاهده نشد. پس از انجام PCR تعداد ۳٤ مورد از نمونه‌ها باندهای مربوط به آسپرژیلوس را در محدوده مورد انتظار را نشان داده اند(تصویر ۱).

برای افزایش حساسیت و ویژگی تست از nested PCR استفاده شد که سبب می شود مقادیر کم DNA قارچی در نمونه با دقت و صحت بسیار بالایی ردیابی شود. در مطالعات قبلی از جمله مقاله‌ای که هایتی(۲۰۰۱) چاپ کرده‌اند پی سی آر در دو مورد بر روی نمونه‌های بال(برونکوآلوئولار لاواژ) نتیجه

www.SID.ir
Archive of SID

کشت منفی را مثبت گزارش کرده است و در بقیه موارد با کشت همخوانی داشته است. در این دو مورد هم نتایج بررسی‌های بعدی بر روی بیماران و سیر پیشرفت بیماری، آسپرژیلوزیس را تایید نموده است(۱٤).

با توجه به کارائی بسیار بالای روش PCR پیشنهاد می‌شود که در تشخیص عفونت‌های قارچی و آسپرژیلوسی در مراکز درمانی روش تشخیص بر مبنای PCR جهت عفونت های قارچی راه اندازی گردد، به خصوص در مراکزی که عمل پیوند انجام می‌شود و یا مراکزی که در آن بیماران دارای نقص در سیستم ایمنی مراجعه می نمایند. این امر در عفونت های مهاجم آسپرژیلوسی و نیز عفونت‌های داخلی که فاقد علائم خارجی است و نیز نمونه گیری برای کشت و اسمیر مستقیم بدون به کار گیری روشهای invasive در آن ممکن نیست اهمیت حیاتی دارد. همچنین توصیه میشود در مرحله بعد برای مراکزی که دارای معضل عفونت‌های قارچی و مرگ و میر به این علت هستند روش Real Time PCR راه اندازی گردد. این روش علاوه بر مزایای PCR معمول که پیش تر به آنها اشاره شد، دارای محاسن دیگری است؛ از جمله سرعت انجام تست در عرض ۱ ساعت و نیز قابلیت جوابدهی کمی که برای سنجش روند درمان نیز بسیار کاربرد دارد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و از مسئولین و کارکنان آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پیراپزشکی و از مسئولین آزمایشگاه بیمارستان مسیح دانشوری سرکار خانم دکتر محمدی و سرکار خانم دکتر محمد طاهری که در انجام این تحقیق کمکهای بسیار نمودند صمیمانه تشکر می‌نمائیم.

منابع

1. Skladny H, Buchheidt D, Baust C, Krieg Schneider F, Seifarth W, Leib Mösch C, et al. Specific Detection of Aspergillus Species in Blood and Bronchoalveolar Lavage Samples of Immunocompromised Patients by Two-Step PCR. J Clin Microbiol 1999 Dec; 37(12): 3865–71.

2. Cuenca Estrella M, Meije Y, Diaz Pedroche C, Gomez Lomez A, Buitrago MJ. Value of Serial Quantification of Fungal DNA by a Real-Time PCR-Based Technique for Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Patients with Febrile Neutropenia. J Clin Microbiol 2009 Feb; 47(2): 379–84.

3. Dugdale DC, Vyas JM. Aspergillus. 2011. Available at: http://www.nlm.nih.gov /medlineplus /ency /article/001326.htm. 2012.

4. Mycology Society. Aspergillosis. Available at: http://www.aspergillus.org.uk/. 2011.

5. Wikipedia Information. Aspergillus. Available at: http://en.wikipedia.org/wiki/ Aspergillus. 2010.

6. Miller FP, Vandome AF, McBrewster J. Aspergillosis: Fungus, Aspergillus, Allergic bronchopulmonary aspergillosis, Aspergilloma, Spore, Immunodeficiency, Hematopoietic stem cell transplantation. Available at: http://www.aspergillus.org.uk/. 2009.

7. Coen DM. The Polymerase Chain Reaction, Current Protocols in Molecular Biology. USA: John Wiley & Sons; 1992: 1100-15.

Archive of SID

www.SID.ir

8. Fredricks DN, Smith C, Meier A. Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR. J Clin Microbiol 2005 Oct; 43(10): 5122–8.

9. Khodadoost MA, Sabahi F, Behroz MJ, Roustai MH, Saderi H, Arzenani MK, et al. Study of a polymerase chain reaction-based method for detection of herpes simplex virus type 1 DNA among Iranian patients with ocular herpetic keratitis infection. Jpn J Ophthalmol 2004; 48(4): 328–32.

10. Machida M, Gomi K. Aspergillus: Molecular Biology and Genomics. Japan: Caister Academic Press; 2010: 75-100.

11. Embong Z, Wan Hitam WH, Yean CY, Abdul Rashid NH, Kamarudin B. Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratitis. BMC Ophthalmol 2008; 8(1): 7.

12. Melchers Willem JG, Hurk PVD, Belkum AV, Depauw BE, Verweij PE, Hoogkamp Korstanje, et al. General Primer-Mediated PCR for Detection of Aspergillus Species. J Clin Microbiol 1994; 32(7): 1710-7.

13. Mcpherson MJ, Moleer SG. PCR. UK: Bios Scientific Publisher; 2000: 24-42.

14. Hayette MP, Vaira D, Susin F, Boland P, Melin P, Demol P, et al. Detection of Aspergillus Spicies DNA by PCR in Bronchoalveolar Lavage Fluid. Journal Clinical Microbiology 2001 Jun; 39(6): 2338-40.

Archive of SID

www.SID.ir