تمایز استرین‌های چندگانه ترایکوفایتون روبروم در بیماران مبتلا به اونیکومایکوزیس با استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(P.C.R)

دکتر سیدامیر یزدان‌پرست I

چکیده

درماتوفیت‌ها گروهی از قارچ‌های کراتین دوست هستند که گروه وسیعی از بیماری‌های پوست و ضمایم آن مانند ناخن و مو را ایجاد می‌کنند. عوامل قارچی شامل ۳ دسته میکروسپوروم، ترایکوفایتون و اپیدرموفایتون بوده که در بین آن ها جنس ترایکوفایتون از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد و در حدود ۲٤ گونه آن تاکنون شناخته شده است. علاوه بر آن بررسی‌های مولکولی روی تمایز استرین‌های گونه ترایکوفایتون روبروم در نمونه‌های جمع‌آوری شده در ناخن‌های یکسان از بیماران مختلف مبتلا به اونیکومایکوزیس، نشان‌دهنده وجود چندین استرین متفاوت در این گونه بوده است. در این مطالعه نمونه‌های ناخن از ۱۰ بیمار مختلف مبتلا به اونیکومایکوزیس کشت داده شد و پلیت‌های کشت که دارای ٥ کلنی بودند انتخاب شدند و اسید دی‌اکسی ریبونوکلئیک(D.N.A) آن‌ها به طور جداگانه استخراج شد و نتایج با توجه به مراحل مختلف روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) و براساس خصوصیت اختلاف در تعداد تکرار ژن‌های تولید کننده اسیدریبونوکلئیک ریبوزومی(r R.N.A) در منطقه غیرژنی تجزیه و تحلیل شد. در این مطالعه ۱۰ نمونه از ضایعات ناخن مبتلا به اونیکومایکوزیس در اثر ترایکوفایتون روبروم بررسی شد که تنها در ٦ نمونه، تعداد ۲ استرین مختلف یا بیش‌تر در یک واریته از گونه ترایکوفایتون روبروم مشاهده گردید. براساس یافته‌های این پژوهش پیش‌بینی می‌شود که در تعداد زیادی از عفونت های قارچی ناخن توسط ترایکوفایتون روبروم، استرین‌های گوناگون(Multiple strain) وجود داشته باشد. وجود چنین مسئله‌ای در مطالعات اپیدمیولوژیک مربوط به بیماری‌های قارچی از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: ۱ – ترایکوفایتون روبروم ۲ – اونیکومایکوزیس
۳ – تمایز مولکولی استرین‌ها ۴ – واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مقدمه

درماتوفیت‌ها گروهی از قارچ‌های کراتین دوست هستند که در ۳ دسته اپیدرموفایتون، میکروسپوروم و ترایکوفایتون قرار می‌گیرند و شایع‌ترین تظاهر آن‌ها کچلی پا(پای ورزشکاران)، کچلی ناخن و کچلی تنه و سر می‌باشد.[1] علل عمده کچلی پا در سرتاسر دنیا ترایکوفایتون منتاگروفایتیس و ترایکوفایتون روبروم گزارش

این مقاله در چهاردهمین کنگره بین‌المللی قارچ‌شناسی انسان و حیوان در کشور آرژانتین سال ۱۳۷۹ ارائه شده است.

I) استادیار گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران.

www.SID.ir

شده است.[۲] قارچ‌های درماتوفیت دارای آنزیم‌های پروتئولیتیک به نام کراتوکیناز(Keratokinase) هستند که این آنزیم سبب هضم کراتین شده و قارچ از این ماده و سایر عناصر جهت تغذیه استفاده می‌کند.

از آن جا که کراتین در مو و ناخن و قسمت شاخی پوست وجود دارد این قارچ‌ها به این بخش‌ها حمله کرده و در طبقه شاخی پوست(stratum corneum) کلنی تشکیل می‌دهند. یکی از نتایج تشکیل این کلنی‌ها واکنش میزبان با متابولیت‌های قارچ است که شدت بیماری براساس استرین یا گونه واریته درماتوفیت و حساسیت میزبان به قارچ خاص، متفاوت می‌باشد اما به طور کلی انسان نسبت به این عفونت‌ها تا حدودی مقاوم است.

این قارچ‌ها تنها در سطح بدن ایجاد عفونت می‌کنند و به دلایلی از جمله وجود ماده ضد قارچی آلفا دوماکروگلوبولین(α۲-macroglobulin) در سرم افراد که مانع تولید آنزیم قارچ‌ها می‌شود و نیز بتا گلوبولین(β-globulin) و فراتین(Ferratin) که اثر مهار کننده روی رشد درماتوفیت‌ها دارند، در داخل بدن انسان ایجاد عفونت نمی‌کنند اما به نظر می‌رسد مواد مترشحه از قارچ‌ها سبب ایجاد التهاب و بروز واکنش‌هایی مانند آلرژی، التهاب و اگزما شود. به طور کلی واکنش میزبان تحت تاثیر ایمنی میزبان و گونه‌ها و زیر گونه‌های قارچ بوده و حساسیت نسبت به درماتوفیت‌ها می‌تواند از نوع فوری یا تاخیری باشد که به طور معمول حساسیت فوری در اثر کربوهیدرات قارچ و حساسیت تاخیری در اثر وجود پروتئین قارچ ایجاد می‌گردد.[۳] از نظر منبع عفونت، درماتوفیت‌ها به ۳ شکل انسان دوست(Anthoropophilic)، حیوان دوست (Zoophilic) و خاک دوست (Geophilic) بوده و در عفونت‌های آنتروپوفیل، حمام یا دوش‌های عمومی در کارخانه‌ها یا مکان‌های ورزشی یکی از عوامل اصلی شیوع عفونت‌های ناخن و کشاله ران در جوامع کنونی محسوب می‌شوند.

داروهای موضعی ضد قارچ گروه آزول(Azole)، از موثرترین داروها جهت درمان درماتوفیت هستند. درمان انیکومایکوزیس ناشی از درماتوفیت‌ها با تربینافین (Terbinafine) در ۸۵٪ موارد موفقیت‌آمیز بوده است.[۲]

از دلایل عمده عدم موفقیت(۱۵٪ موارد) می‌توان به عواملی مانند عدم نفوذ دارو به بافت‌های عمقی (Poor pharmacokinetics)، مقاومت به داروهای ضد قارچی(Resistant to antimycotics)، عدم تشخیص صحیح عوامل قارچی در آزمایشگاه(Misdiagnosis)، انواع گونه‌ها، واریته‌ها و استرین‌های قارچی (Mycological Variants)، عوامل سیستمیک (systemic factors) پاسخ‌های میزبان(Host response) و مهم‌تر از همه ساختمان پیچیده و مقاوم آرتروکونیدیا اشاره کرد که تمام آن‌ها می‌توانند سبب عود مجدد بیماری(Relapse/Reinfection) شوند که عود بیماری به‌ویژه در عفونت‌های ناشی از ترایکوفایتون روبروم به‌طور مکرر مشاهده شده است.[۴] در این گونه از ترایکوفایتون اشکال متفاوتی وجود دارد که به‌طور شایعی با آن‌ها مواجه هستیم. کلنی این قارچ در اغلب موارد کرکی سفید بوده و پیگمان پشتی آن قرمز رنگ است.

بعضی از ایزوله‌ها پیگمان سیاهی نیز تولید می‌کنند که در داخل محیط کشت انتشار یافته و تمام آگار موجود در پتری دیش را رنگ می‌کند. کلنی‌های دانه‌دار و کم رشد(Dysgonic) نیز در این گونه دیده شده است.[۵] از نظر اپیدمیولوژیک، تعیین واریته و استرین ترایکوفایتون‌ها و طبقه‌بندی آن‌ها برای جلوگیری از گسترش عفونت از اهمیت زیادی برخوردار است.

در حال حاضر تشخیص آزمایشگاهی گونه‌ها و واریته‌های ترایکوفایتون براساس آزمایش‌های میکروسکوپی و کشت‌های آزمایشگاهی و تست‌هایی مانند سوراخ کردن مو و تعدادی از تست‌های فیزیولوژیکی صورت می‌گیرد که اغلب این تست‌ها بسیار وقت‌گیر بوده و نیاز به مهارت‌های خاص و دقت فراوان در آزمایشگاه دارند بنابراین عجیب به نظر نمی‌رسد که اعلام بعضی از نتایج، هفته‌ها طول بکشد.

Archive of SID
www.SID.ir

امروزه با پیش‌رفت تکنولوژی PCR، سرعت تشخیص آزمایشگاهی درماتوفیت‌ها در حال افزایش است و این روش، تشخیص سریع و شناسایی درماتوفیت‌ها را از مقادیر ناچیز مواد اولیه در ظرف چندین ساعت امکان‌پذیر می‌کند.

به عنوان مثال در یک مطالعه نشان داده شده است که استفاده از آغازگر اتفاقی ۳-ACCCGACCTC-۵ به روش PCR می‌تواند به طور سریع چندین گونه درماتوفیت تریکوفایتون مانند تریکوفایتون روبروم و تریکوفایتون منتاگروفایتیس و تریکوفایتون تونسورانس را از یکدیگر تفکیک کرده و مورد شناسایی قرار دهد و حتی با این روش توانستند واریته‌های مختلف را نیز مشخص کنند. به عنوان مثال تریکوفایتون منتاگروفایتیس واریته اینتردیجیتال (var.Interdigital) و تریکوفایتون منتاگروفایتیس (var.mantagrophytes) براساس خصوصیات باندهای DNA اختصاصی تقویت شده توسط PCR با پرایمر اتفاقی ۳-GAGCCCGACT-۵ قابل تشخیص هستند.[۶]

آزمایش‌های آنتی نوکلئوتید براساس باندهای اختصاصی مشاهده شده، بینش‌هایی را نسبت به ساختار ژنتیکی و عمل‌کردهای ممکن در مورد این نواحی ژنی اشغال شده فراهم می‌کند و روشن است که موجب درک بیش‌تر روابط ژنتیکی بین واریته‌های مختلف تریکوفایتون‌ها می‌شود و تشخیص درماتوفیت‌های انسانی بهتر، دقیق‌تر و سریع‌تر صورت می‌گیرد. متمایز کردن استرین‌های قارچی از طریق روش‌های مولکولی در مورد درماتوفیت‌های انسانی تنها توسط چند نفر از محققان گزارش شده است.[۷] از جمله در مورد تریکوفایتون منتاگروفایتیس[۸] یا تریکوفایتون روبروم یکی از محققان تنها تمایز بسیار ناچیزی را در بین استرین‌های مختلف گزارش نمود و نتیجه‌گیری کرد که تریکوفایتون روبروم نشان‌دهنده یک گونه کلونال است (clonal species).

روش به کار برده شده در این مطالعه روشی است که توسط آن برای اولین بار به استرین‌های مختلف گونه تریکوفایتون روبروم پی برده شده است. در این روش بخشی از روش سی‌جی جکسون و همکاران به کار برده شد.[۹]

این مطالعه نشان داد که عامل جدا شده(تریکوفایتون روبروم) از ضایعات ناخن در یک بیمار مشخص، ممکن است دارای چندین استرین مختلف باشد(Multiple strain) که این مسئله در مطالعات اپیدمیولوژیکی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می‌باشد.

روش بررسی

الف ـ میکروارگانیسم: ایزوله‌های تریکوفایتون روبروم از ناخن ۱۰ بیمار مختلف که مبتلا به اونیکومایکوزیس بودند به‌طور اتفاقی جمع‌آوری شد و هر یک به طور جداگانه روی محیط کشت سابورودکستروز آگار(SDA) کشت داده شد و از هر پلیت کشت، ۵ کلنی انتخاب گردید(تصویر شماره ۱). برای اطمینان از عدم آلودگی ساب کالچر(subculture) تهیه شد و روی محیط SDA در حرارت ۲۷ درجه سانتی‌گراد جهت انجام دادن مراحل بعدی آزمایش، نگه‌داری شد.

تصویر شماره ۱- ۵ کلنی تریکوفایتون روبروم(بیمار شماره ۲) از ضایعات ناخن روی محیط SDA

ب ـ استخراج و تخلیص DNA ایزوله‌های قارچی: ایزوله‌های قارچی تریکوفایتون روبروم به طور جداگانه در

Archive of SID
www.SID.ir

۵۰ میلی‌لیتر آبگوشت سابورو(Sabouraud broth) به مدت ۷ روز در حرارت ۲۷ درجه سانتی‌گراد در داخل دستگاه تکان‌دهنده با قدرت ۱۵۰rpm کشت داده شد. محصول به دست آمده از رشد هایفه توسط ۲ نوبت شست‌وشو با آب مقطر استریل و صاف کردن از صافی مخصوص جمع‌آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. در مرحله بعد به ۳-۲ گرم از هایفه منجمد شده در داخل یک هاون چینی سرد، نیتروژن مایع اضافه گردید و با استفاده از دسته هاون چینی خوب آسیاب شد و به پودر تبدیل گردید سپس ۲۰۰ میلی‌گرم از این پودر در داخل یک لوله میکروفیوژ استریل قرار داده شد و مقدار ۶۰۰ میکرولیتر lysis buffer به آن اضافه گردید که این بافر شامل ۴۰۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ـ تریس(Tris-HCl ،PH=۰/۸)، ۶۰ میلی‌مول EDTA(ethylene diamine tetraacetate)، ۱۵۰ میلی‌مول کلرید سدیم، ۱٪ SDS(Sodium dodecyl sulphate) و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروتئیناز ـ ک (Proteinase K) بوده است.

نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در حالی که گهگاه به هم زده می‌شدند، ۱۰۰ میکرولیتر از سدیم پرکلرات ۵M اضافه شده و برای مدت ۱۵ دقیقه دیگر در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.

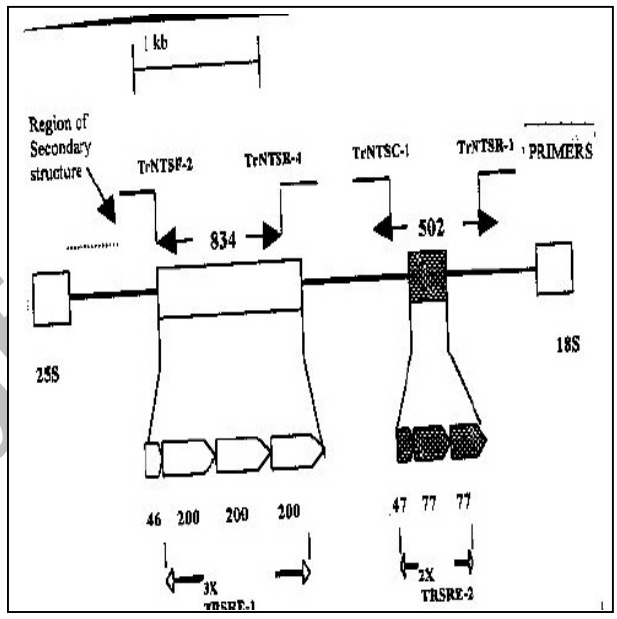
پس از سرد کردن لوله‌ها در داخل یخ، عمل استخراج با اضافه کردن و شست‌وشوی نمونه‌ها با ۵۰۰ میکرولیتر از کلروفرم سرد و بعد ۵۰۰ میکرولیتر از فنل کلروفرم ایزوآمیل الکل(PH=۸، ۱:۲۴:۲۴) و در نهایت ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم ادامه می‌یافت. لایه‌های اضافی تشکیل شده با استفاده از سانتریفوژ با دور ۳۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه تخلیه می‌شد سپس با اضافه کردن ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول سرد ۹۵٪ و ۲ نوبت شست‌وشو با اتانول سرد ۷۰٪، قطعات DNA رسوب می‌کرد که روی کاغذهای مخصوص خشک شده و بعد در ۲۰۰ میکرولیتر از آب مقطر استریل به صورت معلق قرار داده می‌شد(در لوله ۱/۵ میلی‌لیتری میکروسانتریفوژ). برای دقیق بودن آزمایش در تمام مراحل استخراج DNA از کنترل مثبت و منفی استفاده گردید.

ج ـ گسترش تکثیر DNA با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR): جهت گسترش استرین شماره ۱ ترایکوفایتون روبروم(TRS۱)، در منطقه غیرژنی بین محل آغاز و محل پایان رونویسی(NTS region of T.rubrum) ۲ پرایمر(آغازگر) مورد استفاده قرار گرفت(تصویر شماره ۲) جهت این امر موادی به کار برده شد که عبارت بودند از: ۱- بافر واکنش که شامل PH=۹، ۱۰میلی‌مول Tris-HCl، ۵۰ میلی‌مول KCl و ۱۵۰ میلی‌مول کلرید منیزیم ۰/۵ میلی‌مول بود ۲- از هر یک از دی‌اکسی‌نوکلئوزید تری‌فسفات(dNTP) که ترکیبات پیش‌ساز ساخته شدن DNA بوده و شامل ۳ گروه فسفات پرانرژی می‌باشد ۳- N که یکی از ٤ باز آدنین(A)، گوانین(G)، سیتوزین(C) یا تیمین(T) است. در انتها سوسپانسیون(Q×۱) و نیز ۰/۵ واحد از DNA Taq پلیمراز(ساخت شرکت Quiagen) اضافه شد و ۱۰۰ پیکومول از هر یک از ۲ پرایمر، (۳-GC GAG GAT TAG TGC CAC TTC ۵-)، ٤-TrNTSR و (۳-TGC GCA TCG ATT AAG CGA GTA CGT ۵-)، ۲-TrN TSF ساخت شرکت MWG-Biotech, UK و سپس ۵ میکرولیتر از نمونه DNA مربوط(رقیق شده به صورت ۱:۵۰) اضافه شد به طوری که حجم نهایی هر لوله سانتریفوژ به ۵۰ میکرولیتر برسد.

هم چنین در تمام مراحل آزمایش از کنترل منفی PCR و کنترل مثبت DNA(اهدایی دکتر جکسون) استفاده شد سپس درب مخصوص لوله‌ها گذاشته شده و در داخل ماشین PCR انکوبه گردید. پس از آن واکنش در ۳ مرحله ادامه یافت که عبارت بود از: دناتوره شدن یا تغییر ماهیت(Denaturation) با ایجاد حرارت زیاد، دوگانه شدن(Annealing) زنجیر واحد DNA با سرد کردن و در نهایت گستردگی و باز شدن (Extension) که این مراحل به صورت یک سیکل دناتوره برای مدت ۱ دقیقه در دمای ٩٤ درجه سانتی‌گراد، به دنبال ۳۰ سیکل دناتوره به مدت ۱ دقیقه در حرارت ٩٤ درجه سانتی‌گراد، پرایمر(annealing) به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد، مرحله گستردگی به مدت ۳ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت یک مرحله گسترش

Archive of SID
www.SID.ir

نهایی(Terminal extension) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، واکنش PCR را کامل کرد. در مرحله بعد جدا کردن فرآورده‌های تکرار و تکثیر DNA توسط الکتروفورز و روی آگاروز ژل ۲٪ انجام شد سپس رنگ‌آمیزی با ایتیدیوم بروماید(ethidium bromide) صورت گرفت و در نهایت از باندهای مربوط به قطعات DNA توسط اشعه ماورای بنفش(U.V) عکس‌برداری شد.



تصویر شماره ۲- ساختمان تریکوفایتون روبروم(NcPF۲۹۵) در منطقه غیرژنی(NTS) با استفاده از ۲ پرایمر مشخص

نتایج

خلاصه‌ای از نتایج متمایزسازی استرین‌های چندگانه تریکوفایتون روبروم در بیماران مبتلا به اونیکومایکوزیس با استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در جدول شماره ۱ آورده شده است.

این مطالعه که با روش PCR انجام شد، نشان داد که از تعداد ۱۰ ایزوله تریکوفایتون روبروم به دست آمده از ضایعات یکسان ناخن که هر یک متعلق به بیمار مشخصی بود، ٦ بیمار دارای عفونت همزمان با بیش‌تر از ۱ استرین از تریکوفایتون روبروم بودند. نمونه‌هایی از این تمایزسازی و باندهای تشکیل شده یکسان(هموژن) و نامتجانس(هتروژن) در تصویرهای شماره ۳، ٤و ٥ مشاهده می‌شود. ذکر این نکته لازم است که با استفاده از کنترل‌های منفی PCR و DNA در تمام تست‌ها، هیچ‌گونه باندی مشاهده نشد و نتایج به دست آمده در سیستم PCR، پایدار (Stable) و قابل تجدید و تولید مجدد(Reproducible) می‌باشد. در این آزمایش مولکولی به طور کلی ٤۲٪ از نمونه‌ها نوع(تایپ) ۱(شایع‌ترین نوع در انگلستان) ۳۰٪ نوع ۲، ۱٤٪ نوع ۳، ۸٪ نوع ٤ و ٦٪ نوع ۱۲ تشخیص داده شد.

توزیع و پراکندگی انواع به دست آمده از این آزمایش و از نمونه‌های جمع‌آوری شده شباهت زیادی با مطالعات وسیع‌تر قبلی در منطقه انگلستان داشت.

جدول شماره ۱- تمایز استرین‌های تریکوفایتون روبروم در نمونه ضایعات ناخن مبتلا به اونیکومایکوزیس

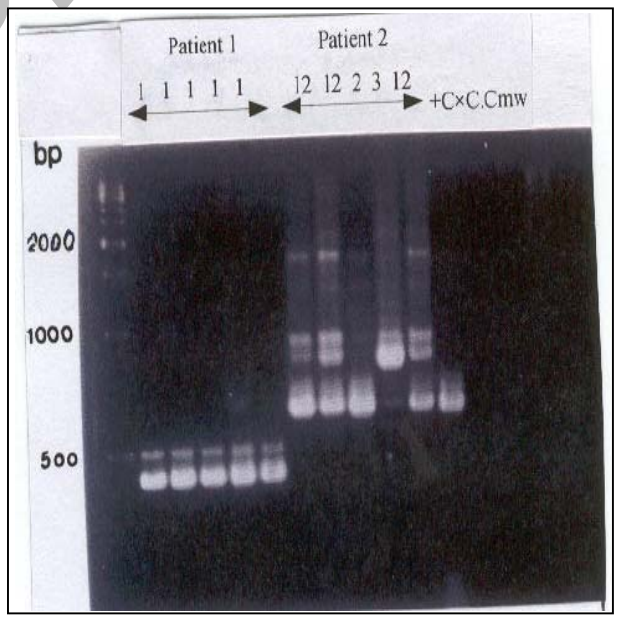
نوع(تعداد کلنی)	مدت زمان تخمینی عفونت	سن(سال) ـ جنس	شماره بیمار
(٥)۱	ناشناخته	٦۱ – زن	۱
۲(۱)، ۳(۱)، ۱۲(۳)	۱ سال یا کم‌تر	۳۹ – مرد	۲
۲(٤)، ۳(۱)	بیش‌تر از ۱ سال	٤٥ – مرد	۳
۳(٤)، ٤(۱)	ناشناخته	۲۳ – زن	٤
٤(۳)، ۲(۲)	۱ سال یا کم‌تر	٥۲ – مرد	٥
(٥)۱	بیش‌تر از ۱ سال	٤۰ – زن	٦
(٥)۲	ناشناخته	٥۱ – زن	۷
(٥)۱	بیش‌تر از ۱ سال	۳٦ – زن	۸
۱(۳)، ۲(۲)	۱ سال یا کم‌تر	۱۹ – زن	۹
۱(۳)، ۲(۱)، ۱۲(۱)	بیش‌تر از ۱ سال	۳٦ – مرد	۱۰

Archive of SID

www.SID.ir

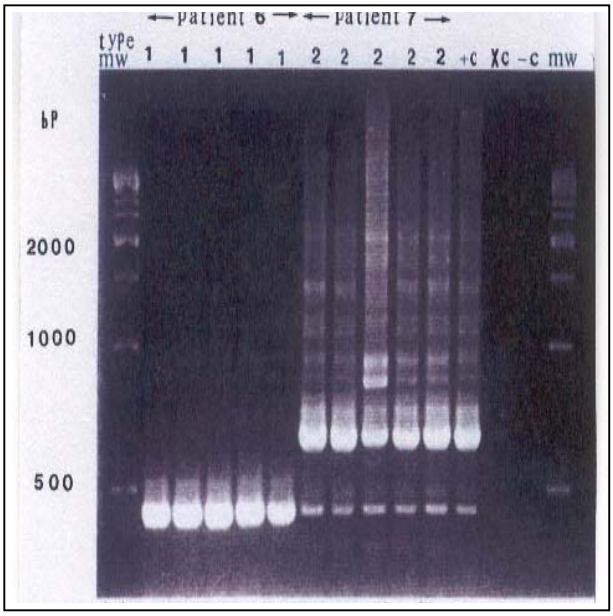
همچنین به نظر نمی‌رسد که ارتباطی بین مدت زمان تخمین زده شده عفونت با تعداد استرین‌ها وجود داشته باشد. توصیف انواع، براساس روش دکتر جکسون[9] انجام شد بدین ترتیب که نوع ۱ بیان کننده یک باند منفرد به اندازه ٤٣٤bp و نوع ۲ به اندازه ۲۰۰bp بزرگ‌تر یعنی به مقدار ٦٣٤bp می‌باشد. (همراه با ۱ باند ضعیف‌تر به اندازه ٤٣٤bp) و نوع ۳، تولید باندی به اندازه ۸٣٤bp (همراه با ۲ باند ضعیف‌تر به اندازه‌های ٦٣٤bp و ٤٣٤bp) می‌کند. باندهای دیگر پیچیده‌تر بوده و به نظر می‌رسد که بیش از ۱ باند قوی داشته باشند.

اندازه این باندها متغیر بوده و از ٤٣٤bp شروع می‌شود و به صورت پلکانی به مقدار ۲۰۰bp به بالا افزایش می‌یابند که جهت تشخیص نوع، نیاز به مهارت خاص می‌باشد. همچنین، ایزوله ترایکوفایتون روبروم نوع ۲ که به عنوان کنترل مثبت DNA در تست‌ها استفاده شد، اهدایی دکتر سی، جکسون بوده است.



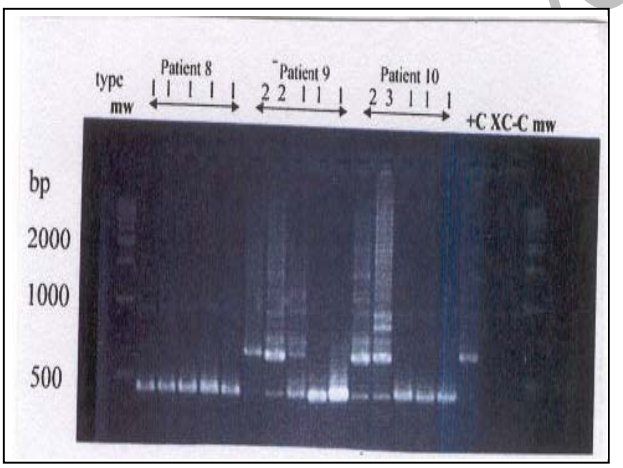
تصویر شماره ۳- تمایز استرین‌های ترایکوفایتون روبروم و تعیین نوع مربوطه در ٥ کلنی مربوط به هر بیمار از نمونه‌های ناخن در ۲ بیمار مختلف مبتلا به اونیکومایکوزیس با روش PCR

- mw: نشان وزن مولکولی، - باند ۱-٥: ت.روبروم(بیمار شماره ۱)، نوع ۱، - باند ٦-۱۰: ت.روبروم(بیمار شماره ۲). به ترتیب نوع ۱۲، ۱۲، ۲، ۳، ۱۲، - باند ۱۱(C+): ت.روبروم LM۱۰۱، کنترل مثبت، نوع ۲، - باند ۱۲(C-): کنترل منفی(استخراج DNA)، - باند ۱۳(xc): کنترل منفی(PCR)



تصویر شماره ۴- تمایز استرین‌های ترایکوفایتون روبروم و تعیین نوع مربوطه در ٥ کلنی مربوط به هر بیمار از نمونه‌های ناخن در ۲ بیمار مختلف مبتلا به اونیکومایکوزیس با روش PCR

- mx: نشان وزن مولکولی، - باند ۱-٥: ت.روبروم(بیمار شماره ٦)، نوع ۱، - باند ٦-۱۰: ت.روبروم(بیمار شماره ۷). نوع ۲، - باند ۱۱(C+): ت.روبروم LM۱۰۱، کنترل مثبت، نوع ۲، - باند ۱۲(C-): کنترل منفی(استخراج DNA)، - باند ۱۳(xc): کنترل منفی(PCR)



تصویر شماره ٥- تمایز استرین‌های ترایکوفایتون روبروم و تعیین نوع مربوطه در ٥ کلنی مربوط به هر بیمار از نمونه‌های ناخن در ۳ بیمار مختلف مبتلا به اونیکومایکوزیس با روش PCR

- mw: نشان وزن مولکولی، - باند ۱-٥: ت.روبروم(بیمار شماره ۸)، نوع ۱، - باند ۱۰-٦: ت.روبروم(بیمار شماره ۹). به ترتیب نوع ۲، ۲، ۱، ۱، ۱، - باند ۱٥-۱۱: ت.روبروم(بیمار شماره ۱۰) به ترتیب تایپ ۲، ۳، ۱، ۱، ۱، - باند ۱٦(C+): ت.روبروم LM۱۰۱، کنترل مثبت، نوع ۲، - باند ۱۷(C-): کنترل منفی(استخراج DNA)، - باند ۱۸۳(xc): کنترل منفی(PCR)

www.SID.ir

بحث

وجود چند استرین مختلف از یک ایزوله ترایکوفایتون روبروم که از ضایعات قارچی ناخن در ۱ بیمار مشخص جدا شده بود، طرح پژوهشی این مطالعه بوده است و روی ۵۰ کلنی متعلق به ۱۰ بیمار مبتلا به اونیکومایکوزیس انجام شد(۵ کلنی از هر بیمار از ناخن یکسان). این مطالعه با این روش خاص برای اولین بار در دنیا گزارش شده است و نتایج آن در سال ۲۰۰۰ در چهاردهمین کنگره بین‌المللی قارچ‌شناسان جهان در بوینوس آیرس(آرژانتین) ارائه گردید که بسیار مورد توجه محققان و قارچ‌شناسان صاحب‌نظر به‌خصوص متخصصان دارویی قرار گرفت. این تحقیق نشان داد که بیماران مبتلا به اونیکومایکوزیس ممکن است در یک زمان مبتلا به چند استرین از یک واریته گونه ترایکوفایتون روبروم باشند. این مطلب شاید توضیحی برای عدم درمان کامل این عفونت‌ها یا درمان طولانی مدت ضایعات درماتوفیتی و مزمن بودن طولانی مدت این بیماری‌ها باشد.

تاکنون چنین تصور می‌شد که عامل درماتوفیتی تنها یک استرین است و دارو جهت استرین مربوطه تجویز می‌شد در حالی که ممکن است استرین‌های مختلف این عامل قارچی، پاسخ‌های مختلفی به درمان دارویی بدهند واز درجه حساسیت متفاوتی برخوردار باشند.

این نتایج در واقع تمام تحقیقات اپیدمیولوژی و بالینی را زیر سوال برده است به طوری که نیاز به تجدید نظر در این زمینه احساس می‌شود. روش PCR که در این مطالعه به کار برده شد روشی برای تکثیر توالی‌های برگزیده شده DNA است که توسط آن زنجیره DNA به تعداد زیادی تکثیر پیدا می‌کند و آنزیم DNA پلیمراز(DNA Polymerase) که در همانند سازی DNA دخالت دارد در این روش به کار می‌رود. همراه با این آنزیم تغییرات درجه حرارت نیز نقش مهمی در جدا شدن و پیوند رشته‌های DNA به یکدیگر دارد.

روش مولکولی PCR روشی بسیار حساس و سریع برای مطالعه ژن‌هایی است که رمز DNA یا بخشی از رمز DNA آن‌ها معلوم است. مکانیسم این روش بدین ترتیب است که برای تکثیر DNA عوامل متعددی از جمله آغازگرها (Primers) مورد نیاز هستند که عبارتند از زنجیره‌های کوچکی از نوکلئوتیدها که نسبت به نوکلئوتیدهای DNA مورد آزمایش، همانند می‌باشند یعنی طوری ساخته می‌شوند که بازهای موجود در آن‌ها می‌توانند با بازهای DNA مورد آزمایش اتصال یافته و زنجیره جدیدی از DNA را ایجاد نمایند که مانند زنجیره اصلی عمل می‌کند.

وجود نوکلئوزیدهای چهارگانه(d-NTP) نیز ضروری است و جهت شروع همانندسازی DNA باید آنزیم پلیمراز در محیط باشد تا بتوان با حرارت زیاد زنجیره‌های دوگانه DNA مورد آزمایش را از هم جدا نمود بنابراین آنزیم ذکر شده باید در مقابل حرارت پایدار باشد.

در شروع آزمایش ابتدا توسط حرارت زیاد(دمای حدود ۹۵ درجه سانتی‌گراد) ۲ رشته DNA مورد آزمایش از هم جدا شده(Denaturation) سپس پرایمرها که ۲ عدد هستند هر یک به قسمت ۳ زنجیره‌ها می‌چسبند و با حضور آنزیم پلیمراز، ساخت زنجیره جدید شروع می‌شود(زنجیره‌های مورد آزمایش DNA باید به صورت عکس یکدیگر قرار گرفته باشند و ساخت زنجیره جدید همیشه به شکل ۳ ◄ ۵ است). بدین ترتیب ۲ زنجیره جدید ساخته می‌شود در نتیجه دور اول آزمایش به جای ۲ زنجیره اصلی، ٤ زنجیره DNA موجود است و به همین ترتیب در دورهای بعدی تعداد بیش‌تری زنجیره DNA ساخته می‌شود. به طوری که در عرض چند ساعت هزاران رشته DNA برای آزمایش در اختیار خواهیم داشت.

ذکر این نکته لازم است که درجه حرارت در PCR به طور مرتب در حال تغییر است. به طور مثال برای جداکردن رشته‌های DNA، حرارت حدود ۹۵ درجه سانتی‌گراد به کار می‌رود سپس حرارت به حدود ۵۵ درجه سانتی‌گراد می‌رسد که پرایمرها در این درجه حرارت به رشته اصلی پیوند می‌یابند سپس در حرارت حدود ۷۰ درجه سانتی‌گراد زنجیره‌های جدید ساخته می‌شوند. این مکانیسم در PCR اولین بار توسط Kary Mullis در سال ۱۹۸۵ در کالیفرنیا

Archive of SID
www.SID.ir

ابداع و توضیح داده شد و امروزه در بسیاری از آزمایشگاه‌های معتبر دنیا جهت تکثیر DNA کاربرد دارد به خصوص در امور جنایی، زیرا این روش قادر است که حتی DNA یک تار مو را تکثیر نماید.

امروزه کاربردهای PCR با پیش‌رفت تکنولوژی بیش‌تر شده است که از جمله آن استفاده از این روش در مطالعه حاضر می‌باشد. پژوهش انجام شده اکنون این امکان را فراهم کرده تا تعدادی از سئوالات مهم اپیدمیولوژیک در مورد عفونت‌های ناشی از ترایکوفایتون روبروم ارزیابی گردد.

به عنوان مثال، اکنون می‌توانیم تعیین کنیم که عود بیماری(Relapse) بعد از یک درمان موفقیت‌آمیز به علت Reinfection یعنی تکرار بیماری به علت یک استرین جدید است یا به علت Recrudescence یعنی تکرار عفونت در اثر همان استرین قبلی می‌باشد. یکی از مهم‌ترین تحقیقات اپیدمیولوژی که انجام شدن آن ضروری به نظر می‌رسد این مطلب است که آیا عفونت‌ها در اثر یک استرین یکسان به وجود آمده‌اند یا در اثر چند استرین‌های مختلف؟ این پژوهش جهت مطالعات آتی بسیار با اهمیت به نظر می‌رسد. کاک و همکاران در سال ۱۹۹۹ مطالعه‌ای را در زمینه مقایسه ترایکوفایتون روبروم و ترایکوفایتون منتاگروفایتیس انجام دادند[۸] و با استفاده از روش مولکولی تکثیر DNA و شناسایی مناطق تغییر یافته و پرایمر اتفاقی یا روش RAPD(Random amplified polymorphic DNA) دریافتند که از نظر مولکولی ۲ ایزوله ترایکوفایتون منتاگروفایتیس جدا شده از ۲ بیمار مبتلا تفاوتی با هم نداشته‌اند در حالی که نکته قابل توجه این بود که ۲ ایزوله جمع‌آوری شده از این بیماران که در یک مکان نیز زندگی می‌کردند از نظر ظاهری با هم تفاوت داشتند.

هر چند که مقایسه این مطالعه با مطالعه دکتر کاک و همکاران مشکل به نظر می‌رسد اما می‌توان چنین پیشنهاد کرد که شاید استرین‌های عفونت‌های مربوط به ترایکوفایتون منتاگروفایتیس نسبت به ترایکوفایتون روبروم از نزدیکی بیش‌تری برخوردار باشند(Less heterogeneity). در مورد انتقال عفونت‌های ناشی از ترایکوفایتون روبروم، به نظر می‌رسد که مطالعه طرح احتمال چند استرین بودن (Multiple Strains) گونه‌های مربوط به درماتوفیت‌ها یا عوامل دیگر عفونت‌های قارچی در مطالعات آینده ضروری باشد. از آن جا که ما هنوز از دست‌یابی به یک درمان سریع و مطمئن جهت عفونت‌های حاد اونیکومایکوزیس حتی پس از ماه‌ها درمان به دور هستیم، توجه به این طرح مهم پژوهشی، قادر است که به بسیاری از سئوالات مربوط به عدم موفقیت در درمان(Treatment failure) و نیز عود بیماری (Relapse) پس از درمان کامل، پاسخ دهد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از زحمات و راهنمایی‌های بسیار مفید استاد ارجمند و فقید پروفسور ای. جی. وی. اوانس (Prof.E.G.V.Evans) که در زمان انجام شدن این پروژه رئیس انجمن بین‌المللی قارچ‌شناسان(ISHAM) بودند و نیز دکتر آر. بارتون(Dr. R. Barton) استاد و متخصص بیولوژی مولکولی در دانشگاه لیدز انگلستان و نیز دکتر سی. جکسون(Dr.C.Jackson) به دلیل اهدای نمونه کنترل مثبت DNA از دانشگاه آبررین کمال تشکر را دارم.

منابع

1- Rippon, JW. Medical mycology. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 1988. P. 169-275.

2- Evans, EGV. Causative pathogens in onychomycosis and the possibility of treatment resistance, A review, Journal American Acad. Dermatology 1988; 39(5) Part 3: S32.

3- Graham-Brown, R., Burns T. Lecture notes on dermatology. 1st ed. Oxford: Black well scientific publications; 1990. P. 25.

4- Roberts DT, Evans EGV. Subfungal dermatophytoma complicating dermatophyte onychomycosis. British associtions of dermatologists. British Journal of dermatology. 1998; 138: 189-203.

Archive of SID
www.SID.ir

5- Evans EGV, Richardson MD. Medical mycology, a practical approach, 1st ed. Oxford: IRL Press; 1989. P. 68-71.

6- Liu D, Coloe S, Pedersen J, Baird R. Use of arbitrarily primed PCR to differentiate trichophyton dermatophytes FEMS. Microbiol Lett 1996; 116: 147-50.

7- Soll DR. The ins and outs of DNA finger printing the infectious fungi. Clinical microbiology review 2000; 13(2): 332-70.

8- Kac G, Boughoux ME, Feuilhade De, Chauvin M, Sene S, Derouin F. Genetic diversity among T. Mentagrophytes isolates using random amplified polymorphic DNA method, British Journal of Dermatology 1999; 140: 839-44.

9- Jackson CJ, Barton RC, Evans EGV. Species identification & strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA spacer regions. Journal of Clinical microbiology 1999; 37: 931-6.

Archive of SID

www.SID.ir

Molecular Strain Typing of Trichophyton Rubrum Isolated from Patients with Onychomycosis by Polymerase Chain Reaction(PCR)

S.A. Yazdanparast, Ph.D.[I]

Abstract

Dermatophytes are a group of keratinophilic fungi falling within the genera of epidermophyton, microsporum and trichophyton. The genus trichophyton is particularly important and complex which comprises at least 24 recognised species. Additionally, molecular strain typing of trichophyton rubrum isolated within single nail specimens from patients with onychomycosis indicates involvement of multiple strains. In this study, nail specimens from patients with onychomycosis were cultured and 10 specimens from different patients with 5 colonies per culture plate were selected. Deoxyribonucleic acid(DNA) was extracted from these isolates and subjected to a PCR-based typing method that analysed variations in numbers of repeats in the non-transcribed spacer(NTS) region of the ribosomal ribonucleic acid(rRNA) gene repeats. In 6 out of 10 specimens, there were 2 or more strain types. This suggests that in the majority of cases of fungal nail infections by trichophyton rubrum, multiple strains are involved. This has important implications for epidemiological studies.

Key Words: 1) Trichophyton Rubrum

2) Onychomycosis

3) Molecular Strain Typing

4) Polymerase Chain Reaction(PCR)

Archive of SID

This article was presented in the 14th Congress of ISHAM (Argentina, 2000).

I) *Assistant Professor of Medical Mycology. Department of Parasitology, Mycology section, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Shahid Hemmat Exp.way, Tehran, Iran.*

www.SID.ir