پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیستم شماره ۸۰ بهمن سال ۱۳۸۹ (۳۴-۴۳)

ارزیابی کمی و بهینه سازی تشخیص DNA آسپرژیلوس فومیگاتوس در نمونه خون با استفاده از تکنیک Real time PCR

مجتبی نبیلی[۱] طاهره شکوهی[۱] سید محمد باقر هاشمی سوته[۲] قاسم جان بابایی[۳]
سید رضا عقیلی[۱] زهرا حسینی خواه[۴]

چکیده

سابقه و هدف : آسپرژیلوزیس مهاجم عفونت فرصت طلب جدی ناشی از گونه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس است که اغلب در افراد دارای نقص سیستم ایمنی رخ می‌دهد. اساساً، تشخیص سریع و زودرس آن، از پیشرفت این عفونت قارچی جلوگیری بعمل می‌آورد. هدف از این مطالعه تعیین کمی و بهینه‌سازی DNA آسپرژیلوس فومیگاتوس در خون با استفاده از تکنیک Real time PCR بود.

مواد و روش ها : پنج میلی‌لیتر خون داوطلب سالم را با رقت‌های مختلفی از کونیدی‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس (10^{6}تا 10^{1}) آلوده شد. استخراج DNA از خون با استفاده از گلوله شیشه‌ای و کیت QIAmp DNA Blood Mini Kit انجام شد. پرایمر و پروب‌های هیبریدیزاسیون برای تکثیر سکانس‌های اختصاصی گونه متعلق به ژن 18S rRNA آسپرژیلوس فومیگاتوس طراحی و با استفاده از روش Real time و تکنیک FRET مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها : تمامی واکنش‌های PCR با DNA دیگر گونه‌های قارچی منفی بودند که نشان‌دهنده اختصاصیت ۱۰۰ درصد این روش بود. آنالیز دمای ذوب آسپرژیلوس فومیگاتوس تنها در یک نقطه حداکثر سیگنال دمایی را با پروب در دمای ^{o}C ۶۹/۱۶ نشان دادکه به تشخیص آسپرژیلوس فومیگاتوس کمک می‌کند. حداقل مقدار DNA (۱۰۰ fg) 10^{1} CFU معادل ۱۰ کونیدی یا سلول در هر واکنش PCR مشخص گردید که نشان‌دهنده حساسیت بالای این روش می‌باشد.

استنتاج : روش Real time PCR با بکارگیری پروب‌های هیبریدیزاسیون دارای اختصاصیت و حساسیت بالا برای اندازه‌گیری بار قارچی جهت تشخیص زودرس و مانیتورینگ درمان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوزیس مهاجم، Quantitative PCR، تشخیص

مقدمه

آسپرژیلوزیس مهاجم(IA: Invasive Aspergillosis) عفونت فرصت طلب جدی ناشی از گونه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس است که اغلب در افراد با ایمنی مختل، خصوصاً در گیرندگان پیوند مغز استخوان و ارگان‌ها، کسانی که برای درمان بدخیمی‌های خونی تحت شیمی درمانی قرار گرفته و دچار نوتروپنی شدند،

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۶۱- ۸۸ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مولف مسئول: طاهره شکوهی- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی E-mail: shokohi.tahereh@gmail.com
۱. گروه قارچ شناسی و انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲. گروه بیوشیمی، بیوفیزیک و ژنتیک، دانشکده پزشکی، و مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۳. گروه داخلی(خون و انکولوژی)، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۴. مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت : ۸۹/۸/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۹/۱۰/۱۵ تاریخ تصویب : ۸۹/۱۰/۳۰

www.SID.ir

مراحل انتهایی بیماری ایدز و بیماری ژنتیکی بنام بیماری گرانولوماتوزمزمن رخ می‌دهد(۲،۱).

عدم تشخیص بموقع، انتشار سریع عفونت و تاخیر در درمان بیماری منجر به عودهای مکرر، افزایش هزینه‌های درمانی و در نهایت مرگ بیمار می‌گردد. یک مورد از این هزینه‌ها، درمان با وریکونازول است که بیش از ۳۰/۰۰۰ دلار هزینه دارد(۱). شیوع آسپرژیلوزیس مهاجم بین ۱ تا ۱۵ درصد است و میزان کشندگی آن اگر تشخیص بیماری به تأخیر بیافتد به بیش از ۹۰ درصد می‌رسد(۳).

از بین این گونه ها، آسپرژیلوس فومیگاتوس یکی از معمولترین گونه‌هایی است که از موارد این بیماری جدا شده است(۵،۴). مطالعات اخیر نشان‌دهنده آن است که در این بیماری دیگر گونه‌های آسپرژیلوس مانند آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس ترئوس نیز نقش دارند. این گونه‌ها تا امروز ۹۵ درصد از علل آسپرژیلوزیس تهاجمی را به خود اختصاص داده‌اند(۷،۶). افتراق گونه‌ها بسیار مهم است، زیرا بعضی از گونه‌های آسپرژیلوس مانند آسپرژیلوس ترئوس نسبت به داروهای رایج مانند آمفوتریسین مقاومت بالایی را از خود نشان داده است(۹،۸). تشخیص سریع و زودرس بیماری IA و درمان ضد قارچی مؤثر باعث کاهش میزان مرگ و میر می‌گردد. بنابراین تست‌های تشخیصی سریع و حساسی امروزه در حال بررسی و تکامل است.

روش‌های استاندارد برای تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم (IA) شامل بررسی‌های هیستوپاتولوژیک و کشت نمونه‌های بافتی است اما این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی هستند(۱۰). آزمایشات پاتولوژی بر روی نمونه‌های بافتی بدست آمده از بیوپسی سوزنی یا بیوپسی ترانس برونکیال ریه صورت می‌گیرد ولی متاسفانه ترومبوسیتوپنی شدید و شرایط وخیم کلینیکی که در این بیماران وجود دارد مانع استفاده از این روش‌های تهاجمی می‌گردد(۱۱). روش‌های تشخیصی دیگر نیز مثل کشت خون، کشت نمونه‌های بافتی، کشت از مایع برنکوآلوئولار در IA بندرت مثبت می‌شود و در غالب موارد منفی است و ممکن است زمانی نتیجه کشت مشخص شود که بیماری پیشرفت کرده باشد(۱۰). برای غلبه براین محدودیت‌ها، روش‌های تشخیصی سریع، حساس و با اختصاصیت بالا برای IA بوجود آمد که شامل استفاده از تصاویر رادیوگرافی، تعیین آنتی‌بادی، آنتی‌ژن و شناسایی DNA است(۱۲). یافته مهم تشخیصی در سی‌تی‌اسکن شامل، هاله ضعیف شیشه‌ای اطراف یک ندول مرکزی[1] و ساختار هلالی شکل[2] است که هیچ‌کدام اختصاصی نبوده و در دیگر بیماری‌های ریوی نیز دیده می‌شود. بنابراین نمی‌توان به تنهایی و با استفاده از رادیوگرافی به تشخیص بیماری رسید(۱۳). از آنجایی‌که در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی تولید آنتی‌بادی کم و بسیار محدود است، تشخیص سرولوژیک تعیین آنتی بادی در بیماران IA امکان پذیر نبوده و مناسب نیست(۱۴). در حال حاضر روش‌های مختلف برای تعیین آنتی‌ژن‌های بتا ۱و۳ دی گلوکان و گالاکتومانان وجود دارد که در این میان تعیین گالاکتومانان با استفاده از ELISA[3] تست حساسی برای اغلب بیماران IA می‌باشد. در این روش فقط بیمارانی که در مراحل پیشرفته بیماری هستند تشخیص داده می‌شوندکه این خود نقص بزرگی به شمار می‌رود. مطالعات اخیر نشان داده است که درمان IA باید هر چه زودتر یعنی قبل از بروز علائم و نشانه‌های عفونت شروع گردد(۱۵). روش تعیین آنتی‌ژن گالاکتومانان گاهی اوقات نتایج مثبت کاذبی را به دلایل مختلف نظیر واکنش متقاطع گونه‌های آسپرژیلوس با دیگر قارچ‌ها و باکتری‌ها، درمان با آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و سیکلوهگزامید، آلودگی آزمایشگاهی و مشکلات تکنیکی مثل سلولز سوآپ‌های پنبه‌ای داشته است(۱۷،۱۶).

1. Halo sign
2. Air crescent
3. Enzyme-link immunosorbent assay

Archive of SID
www.SID.ir

بعلاوه میزان بالای مثبت کاذب در گیرندگان پیوند مغز استخوان آلوژنیک تا ۱۰۰ روز بعد از پیوند و همچنین در بیماری پیوند علیه میزبان نیز گزارش شده که ارزش تشخیصی این تست را خدشه‌دار کرده است.

پروتکل‌های متعددی برای تشخیص IA متکی بر یافتن DNA آسپرژیلوس بوسیله PCR در نمونه‌های مختلف خون (سرم، پلاسما و خون کامل)، مایع لاواژ برونکوآلوئولار، مایعات حفرات برونش‌ها و بافت‌ها پایه‌گذاری شده است(۱۸). روش‌های PCR معمولی دارای حساسیت بالایی هستند بطوری‌که حتی می‌توانند fg ۱۰ از DNA اختصاصی آسپرژیلوس را تشخیص دهند. اما نمی‌توانند بطور کمی اطلاعاتی را به ما بدهد(۱). مشکلات و نواقص عدیده موجود در End point PCR همراه با نیاز به یک روش PCR که قادر به تعیین دقیق کمی DNA باشد، زمینه‌گشایش عرصه‌ای نوین در تکنیک Real time PCR گردید. همانطور که از معنی واژه بر می‌آید مفهوم Real-time PCR مشاهده لحظه به لحظه یک فرایند می‌باشد. دراین سیستم تشخیصی یک مادهٔ فلورسانت درطی واکنش متناسب با میزان محصولات در هر سیکل ساطع می‌شود و میزان فلورسانت آن توسط یک نمایانگر (Detector) شناسایی و ثبت می‌گردد. روش‌های مختلف سنجش کمی با Real time PCR وجود دارد که سنجش اختصاصی آن با استفاده ازپروب‌های هیدرولیز کننده و هیبرید سازنده صورت می‌پذیرد. در تکنیک Real time PCR با روش FRET[1] از پروب‌های اختصاصی آسپرزیلوس فومیگاتوس استفاده می‌گردد. در این سیستم پروب به صورت دو قطعه مختلف طراحی شده که دو ماده فلورسانت یکی در انتهای ´۵ یکی از پروب‌ها و دیگری در انتهای ´۳ قطعه دیگر پروب قرار می‌گیرد. وقتی که این دو دقیقاً در محل مورد نظر بر روی ژن سازنده 18s rRNA متصل شوند نزدیکی فاصله این دو پروب سبب فعال شدن مواد فلورسانت متصل به آن‌ها و انتقال انرژی و ساطع شدن نور شده که در دستگاه قابل اندازه گیری است. ارزیابی‌های DNA قارچ بصورت کمی با Real time PCR نیاز به دقت بسیار بالایی در بهینه و استاندارد سازی دارد چرا که برای شناسایی ۱ تا ۱۰ کپی از ژنوم (یک کپی ژنوم یا یک CFU قارچ برابر با است ۱۰fg از DNA) در نمونه به حساسیت بالایی نیاز دارد. بعضی محققین(۱۹) حساسیت این روش را در خون کامل بین ۱۰۰fg/ml–۱۰ از DNA آسپرژیلوس و گروهی دیگر (۲۰) این میزان در سرم را ۳۰ fg/ ml و بعضی دیگر آن را بین ۱۰۰fg/ml تا ۱ng/ml گزارش کرده‌اند(۲۱). در این مطالعه بنا داشتیم اختصاصیت و حساسیت شناسایی DNA آسپرژیلوس فومیگاتوس در خون را با استفاده از تکنیک Real time PCR و روش FRET تعیین و بهینه‌سازی نماییم.

مواد و روش ها

برای ارزیابی اختصاصیت و حساسیت این روش از گونه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس (فومیگاتوس، نایجر) و کاندیدا آلبیکانس استاندارد که از موسسه CBS[2] کشور هلند بدست آمده بود استفاده گردید. تمام گونه‌های قارچی بر روی محیط سابرو دکستروز آگار حاوی کلرآمفنیکل (SC) بمدت ۴ روز در ۳۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. به منظور ارزیابی حساسیت روش، مقداری سرم فیزیولوژی استریل در پلیت حاوی کلنی آسپرژیلوس فومیگاتوس ریخته شد و به آهستگی تکان داده شد تا سرم فیزیولوژی با کونیدی‌های که در سطح کلنی وجود دارد مخلوط شود سپس آن‌را داخل لوله‌ای ریخته و کدورت آن را نسبت به کدورت استاندارد نیم مک فارلند مورد سنجش قرار گرفت. کدورت مورد نظر باید به اندازه 1×10^{6}–5×10^{6} CFU باشد. برای این منظور می‌توان به وسیله لام نئوبار

1. Fluorescence resonance energy transfer

2. CBS Fungal biodiversity centre, Utrecht, the Netherlands

Archive of SID
www.SID.ir

کونیدی‌ها را شمرد. پس از آماده کردن این مقدار، رقت‌سازی کونیدی‌ها به نسبت ۱:۱۰رقت داده شد تا ۶ رقت حاصل گردد. رقت‌های تهیه شده از 10^{1} - 10^{6} CFU آماده شد. سپس ۵ میلی لیتر خون از افراد داوطلب گرفته شد و به رقت‌های تهیه شده اضافه گردید. برای ارزیابی اختصاصیت روش، DNA آسپرژیلوس نایجر، کاندیدا آلبیکنس، باکتری و DNA ژنومیک انسانی استخراج گردید.

استخراج DNA: بر اساس روش Ramirez همکاران (۲۲) به شرح زیر DNA استخراج گردید. سریال رقت تهیه شده را داخل لوله فالکون ریخته و بافر لیز گلبول قرمز[1](RCLB) (Tris HCl 1.2gr, Sucrose 109.5gr, $MgCl_2$ 1.02gr, Triton X-100 10ml [pH:8]) را به میزان سه برابر آن اضافه و چند بار آن را برعکس کرده سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ °C قرار داده شد. بعد از این مدت آن‌را با دور ۵۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده، مایع بالایی را دور ریخته طوری که pellet در ته لوله فالکون باقی بماند. این عمل را دوباره تکرار شد تا تمامی RBC ها لیز شده و از بین برود. Pellet باقی مانده را داخل میکروتیوب حاوی ۳ گرم گلوله شیشه‌ای (به قطر ۴۲۵-۶۰۰ µm، Germany، Sigma-Aldrich Co) ریخته و به‌مدت ۳ دقیقه میکروتیوب تکان داده و ۲۰۰µl از مایع رویی برداشته و با ۱۸۰ واحد از آنزیم Lyticase (Sigma-Aldrich Co، Germany) به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷°C انکوبه و با استفاده از کیت QIAmp DNA Blood mini kit (Qiagen,Hilden Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده DNA استخراج گردید.

پرایمر و پروب‌های هیبریدسازنده برای تکثیر DNA:

پرایمرها و پروب‌ها بر طبق مطالعات قبلی طراحی(۱۱،۱۷،۲۲،۲۳) و از شرکت Eurofins MWG Operon Bersberg, Germany) خریداری گردید (جدول شماره ۱).

به منظور تکثیر و تعیین گونه آسپرژیلوس از دستگاهی بنام LightCycler-System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) استفاده شد. پرایمرها به مناطق محافظت شده از ژن 18S rRNA قارچ باند می‌شوند. پروب‌ها به سکانس داخلی اختصاصی-گونه متعلق به ژن 18S rRNA آسپرژیلوس فومیگاتوس هیبرید می‌گردند. انتهای ´۵ یکی از پروب‌ها با رنگ فلورسانت LightCycler Red 640 و پروب دیگر در انتهای ´۳ با رنگ Fluorescein نشاندار شده است. در طی مکانیسم FRET رنگ Fluorescein (Donor) بوسیله منبع نوری دستگاه LightCycler برانگیخته می‌گردد. انرژی برانگیخته شده به فلورسانت LightCycler Red 640 که همان ماده فلورسانت پذیرنده (Acceptor) است انتقال یافته و فلورسانت ساطع شده از Acceptor در مرحله Annealing بوسیله دستگاه اندازه‌گیری می‌گردد.

ترکیبات PCR با حجم نهایی ۲۰ µl شامل ۱۷/۴ µl از Master Mix، ۶ µl از آنزیم HS prime Taq DNA polymerase و ۲ µl از نمونه DNA استخراج شده می‌باشد.

دمای Denaturation اولیه به میزان ۹۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه برای یک سیکل تعریف شد. در مرحله دوم دمای Denaturation به میزان ۹۵ °C به مدت ۵ ثانیه، دمای Annealing به میزان ۶۲°C و به مدت ۱۵ ثانیه، دمای Extension به میزان ۷۲ °C به مدت ۲۵ ثانیه برای ۴۵ سیکل تعریف شد. به دنبال آن مرحله منحنی ذوب شامل ۹۰ °C به مدت ۲۰ ثانیه با سرعت انتقال دمایی ۲۰°C بر ثانیه، ۴۵ °C به مدت ۲۰ ثانیه با سرعت انتقال دمایی ۲۰°C بر ثانیه و ۹۰ °C به مدت صفر ثانیه با سرعت انتقال دمایی ۰/۲°C بر ثانیه تعیین گردید.

1. Red cell lysis buffer (RCLB)

Archive of SID

www.SID.ir

هر PCR دارای یک کنترل منفی شامل آب بدون DNA الگو به منظور بررسی آلودگی احتمالی و یک کنترل مثبت شامل DNA قارچ بود. نمونه‌های رقت سریال تهیه شده از DNA ژنومیک قارچ‌هایی که از کشت آسپرژیلوس فومیگاتوس بدست آمده بود (10^1 تا 10^6 برابر با ۱۰ng تا ۱۰۰fg) بعنوان استاندارد گذاشته شد. به منظور اطمینان از تکثیر DNA، الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد نیز انجام شد. برای کنترل طول باندهای تشکیل شده از یک ۱۰۰-bp ladder استفاده شد.

یافته ها

DNA های آسپرژیلوس فومیگاتوس بطور موفقیت‌آمیزی با دستگاه LightCycler تکثیر شدند. تمامی نمونه‌های رقت داده شده که حداقل دارای ۱۰۰CFU/ml از DNA بودند باند ۵۰۰ bp را نشان دادند که این باند تکثیر اختصاصی قارچ را نشان می‌دهد (تصویر شماره ۱).

حساسیت روش Real time PCR :

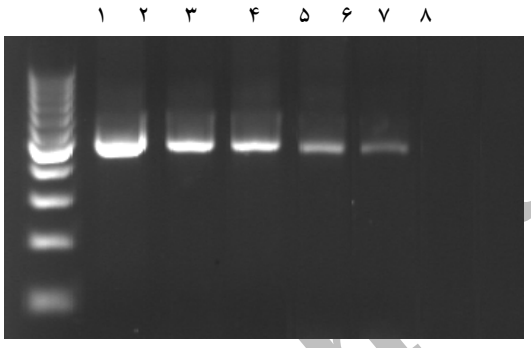
حساسیت تست با استفاده از روش FRET، با سریال رقت تهیه شده (10^1 تا 10^6 کونیدی آسپرژیلوس فومیگاتوس) که با خون افراد داوطلب سالم مخلوط شده بود مورد ارزیابی قرار گرفت. تمامی نمونه‌های رقت سریال بطور موفقیت‌آمیزی با افزایش سیگنال فلورسانس در طی تکثیر با پروب بوسیله روش Real time PCR تکثیر گردیدند. حداقل مقداری از DNA، ۱۰ کونیدی یا سلول (10^1 CFU) معادل ۱۰۰ fg در هر واکنش PCR مشخص گردید که نشان‌دهنده حساسیت بالای این روش می‌باشد (تصویر شماره ۲).

اختصاصیت روش Real time PCR:

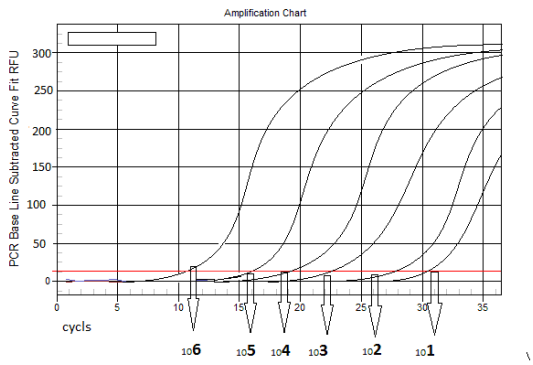
تمامی واکنش‌های PCR با DNA دیگر گونه‌های قارچی نظیر آسپرژیلوس نایجر، کاندیدا آلبیکانس، باکتری و DNA ژنومیک انسانی منفی بودند که نشان‌دهنده اختصاصیت ۱۰۰ درصد این روش بود. آنالیز دمای ذوب آسپرژیلوس فومیگاتوس تنها در یک نقطه حداکثر سیگنال دمایی را با پروب Asp.fum نشان داد. این نقطه ذوب برای آسپرژیلوس فومیگاتوس ۶۹/۱۴°C بود (تصویر شماره ۳).

جدول شماره ۱ : توالی پرایمر و پروب تهیه شده برای تکثیر DNA (5′ – 3′)

Primer:
ASP-F(5'-ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG-3')
ASP-R(5'-CCGATCCCTTAGTCGGCATAG-3')
Asp. fum Probe:
LC640 Red 5'-TGA GGT TCC CCA GAA GGA AAG GTC CAG C 3'-Phosphate
5'-GTT CCC CCC ACA GCC AGT GAA GGC -3' fluorescein



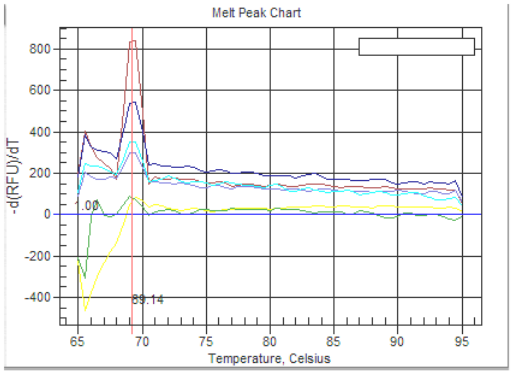
تصویر شماره ۱ : ۱- ۱۰۰bp-ladder، ۲- (10^6CFU(۱۰ng)، ۳- (10^5CFU(۱ng)، ۴- (10^4CFU(۱۰۰ng)، ۵- (10^3CFU(۱۰ng)، ۶- (10^2CFU(۱ng)، ۷- (10^1CFU(۱۰۰ng)، ۸- آب مقطر استریل



تصویر شماره ۲: نتایج تکثیر کمی Real time PCR نمونه های رقت سریال DNA آسپرژیلوس فومیگاتوس با پروب و FRET

Archive of SID

www.SID.ir



تصویر شماره ۳: نمودار دمای ذوب برای آسپرژیلوس فومیگاتوس

بحث

علی‌رغم پیدایش داروهای ضد قارچی جدید نظیر اکینوکاندین‌ها و تری آزول‌های جدید، عفونت آسپرژیلوزیس مهاجم هنوز هم یکی از علت‌های اصلی مرگ و میر در بیماران دارای ایمنی ناکارآمد می‌باشد(۲۴). در برخی از مطالعات، مرگ و میر در اثر عفونت آسپرژیلوزیس مهاجم به بیش از ۳۰ درصد و حتی تا ۹۰ درصد هم گزارش شده است که اگر تشخیص به تعویق بیافتد آمار بالاتری از مرگ و میر را خواهیم داشت(۲۵). روش های تشخیصی سنتی برای IA غیر حساس و وقت‌گیر بوده و باعث افزایش مرگ و میر بیماران می‌گردد. همچنین علائم بالینی و رادیولوژی اغلب غیر اختصاصی هستند. اگر چه استفاده از گالاکتومانان و بتا ۱ و۳ دی گلوکان در بیماران در معرض خطر برای تشخیص عفونت‌های قارچی تهاجمی تسهیلاتی را فراهم آورده است(۲۶) اما پیشرفت‌های اخیر در روش‌های بر پایه DNA برای حساسیت، اختصاصیت و تسریع تشخیص عفونت قارچی مهاجم در نمونه‌های مختلف بالینی دارای قابلیت و توانایی کامل‌تری بوده و در نهایت موجب بهبود نتایج بالینی می‌گردد(۵،۶،۸،۲۷). در عفونت آسپرژیلوزیس مهاجم هنگامی که اسپورها استنشاق می‌شوند و در آلوئول‌های ریه جایگزین می‌شوند ممکن است فرمی از هایف هم بوجود بیاید. DNA قارچ (اسپور و یا هایف) ممکن است در این مرحله با علائم بالینی و بدون هیچ شواهدی از بیماری به جریان خون راه یابد. گسترش آسپرژیلوس از طریق جریان خون به ارگان‌های داخلی ممکن است به مدت طولانی قبل از بروز علائم بالینی ایجاد شود. بنابراین تشخیص باید در مراحل ابتدایی یعنی قبل از بروز علائم و نشانه‌های بالینی انجام گردد(۱۱). در سال‌های اخیر پیشرفت‌هایی در زمینه روش‌های مولکولی از جمله Real time PCR حادث شده است که منجر به تشخیص سریع و زودرس بیماری IA می‌شود(۲۲). مطالعه حاضر حساسیت و اختصاصیت این روش را برای شناسایی کمی نمونه‌های خون آلوده شده با رقت‌های سریال کونیدی با دستگاه LightCycler مورد ارزیابی قرار داد تا در صورت مطلوب و استاندارد بودن بتوان از این روش برای تشخیص نمونه‌های بالینی استفاده گردد. روش Real time PCR با توجه به اندازه‌گیری کمی بار قارچی که ارتباط معنی‌دارتری را با وضعیت بالینی جهت پیگیری درمان دارد، نسبت به روش PCR معمولی بسیار ارجح‌تر است. بطور مثال در مطالعه O'Sullivan و همکاران(۲۸) در یک مدل تجربی مبتلا گشته به بیماری IA با استفاده از Real time PCR نشان دادند که بعد از درمان با آمفوتریسین B افت واضحی در میزان DNA آسپرژیلوس فومیگاتوس (۱۰ log) در مقایسه با کنترل‌های درمان نشده در نمونه‌های ریه مدل تجربی مشاهده می‌گردد. در این مطالعه همچنین از خون کامل که ارجحیت آن نسبت به سرم و پلاسما در مطالعات مختلفی گزارش شده بود،استفاده گردید(۲۰). روش‌های مختلفی برای استخراج DNA از خون با غلظت بالا وجود دارد. Griffiths و همکاران روش‌های مختلف استخراج DNAرا مورد ارزیابی قرار دادند و بهترین روش برای استخراج قارچ از نمونه‌های بالینی نظیر خون را استفاده توام از گلوله‌های شیشه‌ای، آنزیم‌های شیمیایی نظیر Lyticase و کیت استخراج Qiagen، گزارش کردند(۲۹). در مطالعه حاضر از همین روش استفاده گردید. روش Real time PCR نسبت به

Archive of SID

www.SID.ir

روش‌های دیگر همانند Nested PCR بعلت انجام کار در فضای بسته با احتمال آلودگی کمتر همراه می‌باشد(۱). از دیگر مزایای این روش قابل مشاهده بودن لحظه به لحظه واکنش و نتایج آن است که امکان بررسی فرآیند تکثیر را در هر زمان از کار می‌دهد. بدین ترتیب امکان بهینه‌سازی واکنش که مناسب‌ترین غلظت DNA و پرایمر و همچنین تعداد سیکل لازم برای تکثیر را بدست می‌دهد، فراهم می‌شود. از آنجایی‌که روند PCR قابل مشاهده می‌باشد امکان قطع واکنش در زمان دلخواه نیز مهیا شده و در صورت عدم تکثیر و یا رفتن به فاز سکون[1] می‌توان به واکنش خاتمه داد و از اتلاف وقت و انرژی پرهیز نمود. روش PCR کمی با استفاده از روش کمی مطلق[2] و نسبی[3] میزان دقیق و نسبی الگوی اولیه DNA قابل اندازه‌گیری است. در این روش واکنش‌ها سریعتر اتفاق می‌افتد و زمان کمتری صرف می‌گردد. محدودهٔ تشخیصی[4] آن بالاتر از PCR معمولی است. حتی اختلاف کمتر از ۲ برابر را هم نشان می‌دهد(۳۰). این تکنولوژی هنگامی‌که توالی هدف اختصاصی موجود باشد، پروب داخلی یک سیگنال فلورسانت را در هر سیکل تکثیر PCR ساطع می‌کند و اندازه‌گیری مقدار بوسیله مقایسه نمونه استاندارد شناخته شده در همان سنجش بدست می‌آید. یکی از روش‌های انجام PCR کمی استفاده از Real time PCR با روش FRET است. در این سیستم طراحی پروب‌های هیبرید سازنده اختصاصی بوده به گونه‌ای که در صورت تفاوت در حد حتی یک نوکلیوتید به DNA متصل نمی‌شود و فلورسانس ساطع نمی‌گردد(۳۰). در این مطالعه برای ارزیابی اختصاصیت این روش با دستگاه LightCycler ، DNA دیگر گونه‌های قارچی نظیر آسپرژیلوس نایجر، کاندیدا آلبیکانس، باکتری و DNA انسانی مورد استفاده قرار گرفت. تمام PCRها با دیگر قارچ‌ها و نمونه انسانی منفی بودند که نشان‌دهنده اختصاصیت ۱۰۰ درصد پروب‌های هیبریدیزاسیون بود که نتایج به دست آمده با نتایج سایر محققین کاملاً مشابهت داشت(۲۲،۳۱). حساسیت روش Real time PCR در این مطالعه، بسیار بالا در حد fg ۱۰۰ برابر با ۱۰ کونیدی آسپرژیلوس در یک میلی‌لیتر خون کامل بود که در مقایسه با مطالعه دیگران حساسیت بالاتری را نشان داد(۲۴-۱۷). در مطالعه Simonneau و همکاران تشخیص مقدار fg۱۰-۱ از کونیدی‌های آسپرژیلوس تلقیح شده به بطری‌های کشت خون ظرف مدت ۲۴ ساعت گزارش شده است. این در حالی است که بندرت کشت‌های خون از نمونه‌های بالینی مثبت گشتند که احتمالاً به دلیل فاگوسیته شدن عناصر قارچی توسط ماکروفاژها و ایجاد اجزاء قارچی غیر قابل رشد بوده است(۳۲). Hummel و همکاران درمطالعه‌ای قارچ را بصورت داخل وریدی به موش تزریق کردند که بعد از ۳ روز درحالی‌که نتیجه کشت خون منفی بود، نتیجه روش PCR مثبت گزارش گردید(۳۳). مطالعات مختلفی حساسیت و اختصاصیت بالایی را در تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم با روش Real time PCR نشان دادند(۳۶-۳۴). در این مطالعه ما قادر به راه‌اندازی یک روش سریع، حساس و اختصاصی Real time PCR برای شناسایی معمولترین گونه آسپرژیلوس در نمونه خون شدیم. مطالعات بیشتر برای ارزیابی دقیق کاربرد این روش در مطالعات اپیدمیولوژیکی و در تشخیص معمول کلینیکی ضروری بنظر می‌رسد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله مراتب قدردانی وسپاس خود را از همکاری صمیمانه و حمایت‌های مالی معاونت محترم تحقیقات و فناوری و کلیه همکارانشان ابراز داشته و در ضمن متذکر می‌گردد که این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد قارچ‌شناسی آقای مجتبی نبیلی از دانشگاه علوم پزشکی مازندران می‌باشد.

1. Plateau
2. Absolute Quantification
3. Relative Quantification
4. Detection Range

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Ferns RB. Evaluation of the role of real-time PCR in the diagnosis of invasive aspergillosis. Leuk Lymphoma 2006; 47(1): 15-20.
2. Hebart H, Loffler J, Meisner C, Serey F, Schmidt D, Bohme A, et al. Early detection of aspergillus infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. J Infect Dis 2000; 181: 1713-1719.
3. Latge JP. Aspergillus fumigatus and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 310-350.
4. Spiess B, Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Seifarth W, Zeilfelder U, et al. Development of a LightCycler PCR assay for detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* DNA in clinical samples from neutropenic patients. J Clin Microbiol 2003; 41: 1811-1818.
5. Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimen. J Clin Microbiol 1998; 36: 1169-1175.
6. Wald A, Leisenring W, Van Burik JA, Bowden RA. Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. J Infect Dis. 1997; 175(6):1459-1466.
7. Saugier-Veber P, Devergie A, Sulahian A, Ribaud P, Traore F, Bourdeau-Esperou H, et al. Epidemiology and diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in bone marrow transplant patients: results of a 5 year retrospective study. Bone Marrow Transplant 1993; 12: 121-124.
8. Walsh TJ, Petraitis V, Petraitiene R, Field-Ridley A, Sutton D, Ghannoum M, et al. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. J Infect Dis 2003; 188: 305-319.
9. Graybill JR, Hernandez S, Bocanegra R, Najvar LK. Antifungal therapy of murine *Aspergillus terreus* infection. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 3715-3719.
10. Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L, Pagliari G, Fianchi L, Mele L, et al. Comparison of Real-Time PCR, conventional PCR, and Galactomannan antigen detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology Patients for diagnosis of Invasive pulmonary aspergillosis. J Clin Microbiol 2003; 41: 3922-3925.
11. Klingspor L, Jalal S. Molecular detection and identification of Candida and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 745-753.
12. Wheat JL. Approach to the Diagnosis of Invasive Aspergillosis and Candidiasis. Clin Chest Med 2009; 30: 367-377.
13. Quindós G. New microbiological techniques for the diagnosis of invasive mycoses caused by filamentous fungi. Clin Microbiol Infect 2006; 12 (Suppl 7): 40-52.
14. Maertens J, Theunissen K, Lodewyck T, Lagrou K, Van Eldere J. Advances in the serological diagnosis of invasive *Aspergillus* infections in patients with haematological disorders. Mycoses 2007; 50(Suppl 1): 2-17.
15. Hope W, Walsh T, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet Infect Dis 2005; 5: 609-622.

Archive of SID

www.SID.ir

16. Mennink-Kersten MA, Klont RR, Warris A, OpdenCamp HJ, Verweij PE. Bifidobacterium lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in *Aspergillus* antigen detection. Lancet 2004; 363: 325-327.
17. Faber J, Moritz N, Henninger N, Zepp F, Knu M. Rapid detection of common pathogenic *Aspergillus* spp. by a novel real-time PCR. Mycoses 2009; 52: 228-233.
18. Buchheidt D, Hummel M. *Aspergillus* polymerase chain reaction (PCR) diagnosis. Med Mycol 2005; 43(Suppl 1): S139-145.
19. Costa C, Costa J, Desterke C, Botterel F, Cordonnier C, Bretagene S. Real-Time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 2002; 40: 2224-2227.
20. Loeffler J, Hebart H, Brauchle U, Schumacher U, Einsele H. Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR. J Clin Microbiol 2000; 38: 3830-3833.
21. Challier S, Boyer S, Abachin E, Berche P. Development of a Serum-Based Taqman Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. J Clin Microbiol 2004; 42: 844-846.
22. Ramírez M, Castro C, Palomares JC, Torres MJ, Aller AI, Ruiz M, et al. Molecular detection and identification of *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. Mycoses 2008; 52: 129-134.
23. Lo¨effler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagmeyer L, Schumacher U, et al. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the Light Cycler system. J Clin Microbiol 2000; 38: 586-590.
24. Denning DW. Invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 1998; 26: 781-803.
25. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, et al. Voriconazole vs. amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. N Engl J Med 2002; 347: 408-415.
26. Becker MJ, de Marie S, Willemse D, Verbrugh HA, Bakker- Woudenberg IA. Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model. J Clin Microbiol 2000; 38: 1434-1438.
27. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. J Clin Microbiol 1997; 35: 1353-1360.
28. O'Sullivan CE, Kasai M, Francesconi A, Petraitis V, Petraitiene R, Kelaher AM, et al. Development and validation of a quantitative real-time PCR assay using fluorescence resonance energy transfer technology for detection of *Aspergillus fumigatus* in experimental invasive pulmonary aspergillosis. J Clin Microbiol 2003; 41: 5676-5682.
29. Griffiths L, Anyim M, Doffman S, Wilks M. Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR. J Med Microbiol 2006; 55: 1187-1191.
30. Real-Time PCR Applications Guide. Bio-Rad Laboratories, Inc. www.bio-rad.com2006.
31. 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 inmunocompromised patients by two-step PCR. J Clin Microbiol 1999; 37: 3865-3871.
32. Simonneau E, Kelly M, Labbe AC, Roy J, Laverdierem M. What is the clinical

Archive of SID

www.SID.ir

significance of positive blood cultures with *Aspergillus* sp. In hematopoietic stem cell transplant recipients? A 23 year experience. Bone Marrow Transplant 2005; 35: 303-306.

33. Hummel M, Baust C, Kretschmar M, Nichterlein T, Schleiermacher D, Spiess B, et al. Detection of *Aspergillus* DNA by a nested PCR assay is superior to blood culture in an experimental murine model of invasive aspergillosis. J Med Microbiol 2004; 53: 803-806.
34. Suarez F, Lortholary O, Buland S, Rubio MT, Ghez D, Mahe V, et al. Detection of Circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by Real-Time PCR Assay of Large Serum Volumes Improves Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis in High-Risk adult Patients under Hematologic Surveillance. J Clin Microbio 2008; 46: 3772-3777.
35. Wengenack N, Binnicker M. Fungal molecular diagnosis. Clin Chest Med 2009; 30: 391-408.
36. Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, et al. Use of Real-Time PCR on Blood Samples for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. Clin Infect Dis 2001; 33: 1504-1512.

Archive of SID

www.SID.ir