# بررسی روشهای مختلف تشخیص سریع گونه های درماتوفیت با استفاده از روش PCR

حسن میرزاحسینی*[۱] ، فاطمه بیات[۲]، مهدی رزاقی ابیانه[۳]

۱. دکترای بیوتکنولوژی، استادیار انستیتو پاستور ایران
۲. لیسانس میکروب شناسی، کارشناس انستیتو پاستور ایران
۳. دکترای قارچ شناسی، استادیار انستیتو پاستور ایران

* نشانی برای مکاتبه: تهران، خیابان پاستور ، پلاک ۶۹ ، کد پستی ۱۳۱۶۴، تلفن و نمابر: ۶۶۴۸۰۷۸۰ ، mirzahoseini@pasteur.ac.ir
دریافت مقاله: تیرماه هشتاد و پنج پذیرش برای چاپ: آبان ماه هشتاد و پنج

## چکیده

**سابقه و هدف:** *امروزه اهمیت بکار گیری پروتکلهای درمانی هدفمند و کارآمد بر علیه آلودگی به گونه های مختلف درماتوفیتها بر پایه تشخیص سریع و دقیق عامل عفونی احساس می شود. در بسیاری از کشورها از روشهای مولکولی متعدد و متنوعی بطور روتین برای تشخیص طیف وسیعی از بیماریهای عفونی سود میبرند. در کشور ما نیز تعدادی از محققین به صورت پراکنده برای تشخیص درماتوفیتها، با بهره گیری از روشهای مولکولی و کلنی های درماتوفیتی رشد کرده از کشت نمونه های پوسته، اقداماتی را صورت داده اند. در این تحقیق ما برای اولین بار در ایران امکان تشخیص مستقیم و سریع این قارچها را با استفاده از روش PCR در نمونه های پوسته و کلنی کشت ۳ تا ۵ روزه پوسته بیمار مورد ارزیابی قرار دادیم. تاکنون این روش در سطح جهان نیز بصورت محدودی مورد آزمایش قرار گرفته است.*

**روش کار:** *در مطالعه حاضر به بررسی روشهای مختلف برای هموژن کردن بافت پوسته بیمار و تخریب دیواره سلولی قارچ همراه با بهینه سازی شرایط تخلیص DNA با استفاده از روشهای متداول و کیتهای آماده اقدام شد. بعلاوه برای انجام PCR پارامترهای مختلفی نظیر استفاده از چند جفت پرایمر، آنزیمهای DNA پلیمراز، تغییر در دماها و زمانهای برنامه PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.*

**یافته ها:** *در این مسیر با موانعی چون دیواره سخت قارچها، مقدار کم DNA قارچی نسبت به کل مقدار DNA تخلیص شده، عوامل مهم و متعدد تاثیر گذار در روند تخلیص DNA و پروسه انجام PCR مواجه شده که برای عبور از آنها راه کارهای مختلفی آزمایش گردید. در نهایت با بهینه سازی شرایط تخلیص DNA و استخراج مقدار قابل توجهی DNA قارچ از مخلوط سه نمونه پوسته بیمار (همه از یک جنس درماتوفیت)، جواب PCR مثبت بدست آمد که البته این روش کار قابل توجیه و اجرا بصورت روتین برای تشخیص درماتوفیتوزیس نمی باشد.*

**نتیجه گیری:** *علی رغم تدابیر اتخاذ شده در این مطالعه به منظور نهادینه سازی استفاده از روش PCR برای تشخیص سریع درماتوفیتها در نمونه پوسته بیمار و نتایج مثبتی هم که حاصل گردید، به نظر میرسد که با توجه به محدودیت مقدار پوسته بیماران و وجود ممانعت کننده های بالقوه برای عملکرد DNA پلیمراز در پوسته بهتر است علاوه بر بررسیهای تکمیلی و بهینه سازی روشها، به جای پوسته از کلنی های درماتوفیتی رشد کرده در مراحل اولیه کشت (کلنی های بسیار جوان) استفاده نمود.*

**واژگان کلیدی:** ***درماتوفیت، PCR ، پوسته، تخلیص DNA***

### مقدمه

تینه آ یا بیماری کچلی یکی از بیماریهای مشترک انسان و حیوان بوده و معمولا لایه شاخی پوست، مو و ناخنها را درگیر میسازد. عوامل اتیولوژیک بیماری یا همان درماتوفیتها شامل ۳ جنس اپیدرموفیتون، میکروسپروم و ترایکوفیتون می‌باشند. دو جنس میکروسپروم و ترایکوفیتون متشکل از چندین گونه و زیر گونه بوده که تعدادی از آنها برای انسان و حیوانات بیماری زا هستند (۱). از دیدگاه بالینی و در تشخیص میکروسکوپی مستقیم، تعیین جنس و گونه درماتوفیت بسیار مشکل می‌باشد و شناسایی معمول این قارچهای کراتین دوست و کند رشد نیاز به زمان طولانی جهت جداسازی قارچ در کشت نمونه های پوسته در محیطهای اختصاصی دارد (۳-۱). لذا دسترسی به یک تکنیک آزمایشگاهی سریع و دقیق برای شناسایی درماتوفیتها در سطح جنس و گونه بسیار حایز اهمیت است. این امر جهت درمان سریع بیماران با داروی مناسب و دوز دقیق دارو و دوره زمانی استفاده از دارو بسیار مهم میباشد.

Archive of SID
www.SID.ir

بیشتر درماتوفیتهایی که برای انسان پاتوژن بحساب می‌آیند بر اساس شکل کلنی و بررسیهای مورفولوژیکی- میکروسکوپی شامل میزان رشد، رنگ کلنی، اندازه و شکل ماکروکونیدیا و میکروکونیدیا و نیز خواص فیزیولوژیکی نظیر تولید اوره‌آز، تولید آلکالین بر روی محیط کشت bromocresol purple و غیره قابل تشخیص می‌باشند. با توجه به فراوانی تنوع گونه‌ها در بیان این مشخصات فنوتیپیکی، تعیین گونه و زیر گونه در درماتوفیتها اغلب با مشکل همراه است (۴و۵ ). بعلاوه نوع محیط کشت و دیگر شرایط رشد می‌تواند بر روی مورفولوژی میکروسکوپی و ماکروسکوپی درماتوفیتها مؤثر بوده و در مواردی به ویژه در مورد نمونه های ناخن، درماتوفیت توانایی رشد خود را از دست داده و نتیجه منفی کاذب حاصل می شود. بنابراین روشهای مبتنی بر ژنوتایپ دارای ثبات بیشتر بوده و قابل اعتمادتر می‌باشند. لذا امروزه روشهای مولکولی مختلفی برای تعیین گونه و بررسی پلی مورفیسم درماتوفیتها مورد توجه می‌باشند ( ۸-۶). البته عموم محققینی که در این زمینه فعالیت داشته اند از کلنی های کشت پوسته بیماران خود استفاده کرده اند و مقالات نادری در دست است که مستقیما از پوسته بیمار برای تخلیص DNA و سپس PCR آن استفاده شده باشد.

در مطالعه حاضر راه کارهای مختلفی برای بهینه سازی هموژن کردن نمونه پوسته بیمار، شرایط تخلیص DNA قارچ از پوسته و مراحل انجام PCR بررسی گردیده است.

## روش کار

هر روزه تعدادی بیمار مبتلا به ضایعات جلدی مشکوک به درماتوفیتوزیس به بخش قارچ شناسی انستیتو پاستور ایران مراجعه میکنند. مقداری پوسته از محل ضایعات هر بیمار بوسیله یک اسکالپل کند برداشته شده و جهت انجام آزمایشات مختلف در سه قسمت بررسی گردید. بر روی یک لام میکروسکوپی به قسمت اول ۲-۱ قطره هیدروکسید پتاسیم (پتاس) ۲۰٪ افزوده شده و نمونه‌های شفاف شده با پتاس (پتاس سلولهای شاخی را هضم می‌کند اما به ساختار قارچ آسیبی نمی‌رساند) در زیر میکروسکوپ از نظر حضور عناصر قارچی (میسلیوم و آرتروکونیدیوم) بررسی گردیدند. قسمت دوم به منظور جدا سازی و شناسایی درماتوفیتهای مورد نظر در محیطهای عمومی و اختصاصی شامل سابورو دکستروز آگار (SDA) و آگار اختصاصی برای قارچهای بیماریزا کشت داده شدند. قسمت سوم به منظور تخلیص DNA و آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

قبل از شروع مرحله هموژن کردن پوسته و کلنی کشت پوسته ، نمونه ها به مدت حداقل ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه جهت کشتن درماتوفیتها قرار داده شدند. سپس ۳ روش برای خرد کردن و هموژن کردن پوسته مورد امتحان قرار گرفتند:

۱- پوسته ها داخل هاون چینی ریخته شده وبعد از اضافه کردن ازت مایع، با دسته هاون کاملا خرد گردیدند.

۲- بعد از اضافه کردن ازت مایع، پوسته ها در حضور شن ریزه شسته شده با اسید (Acid-washed sea sand) در هاون خرد شدند.

۳- ازت مایع با سرنگ به داخل اپندرف حاوی پوسته ریخته شد و سپس با استفاده از سر سرنگ یا میله ای باریک پوسته ها خرد شدند (۹).

برای هموژن کردن کلنی های درماتوفیتی رشد کرده در محیطهای کشت تنها از روش اول استفاده شد.

برای جدا سازی DNA ژنومی از کلنی ها از کیت DNP KIT ساخت شرکت سینا ژن استفاده شد. مراحل کار، بعد از هموژن کردن، مطابق پروتکل ارائه شده بوسیله شرکت مربوطه صورت گرفت. ولی در مورد پوسته، پس از توزین مقدار پوسته، به منظور افزایش راندمان، تغییراتی در پروتکل فوق از جمله در زمانهای انکوباسیون و استفاده از بافرهای مناسبتر برای ازدیاد شدت تخریب دیواره قارچ و نیز سونیکاسیون نمونه های هموژن شده در زمانهای ۴ و ۸ دقیقه اعمال گردید. بعلاوه از کیت دیگری بنام Tissue Genomic DNA Isolation Kit ساخت شرکت کره ای CoreBioSystem نیز سود برده شد. همچنین روش اختصاصی دیگری نیز بکار برده شد ( ۱۰) که نتایج قابل ملاحظه ای را در بر داشت. چون مقدار نمونه پوسته بدست آمده از بیماران بسیار کم بود ( ۱۵ mg-۵) لذا علاوه بر انجام تخلیص DNA بر روی تک تک نمونه ها، در مواردی از مخلوط چند نمونه (حدود ۵۰mg) که در تشخیص مستقیم میکروسکوپی و کشت پوسته یکسان گزارش شده بودند نیز استفاده گردید. بعد از پایان مراحل تخلیص، $OD_{260/280}$ نمونه ها خوانده شده تا غلظت DNA ژنومی ( مخلوط DNA قارچ و سلولهای پوست انسان) بدست آید و سپس بکمک روش ژل الکتروفورز (ژل 1%) معیاری دیگر از کمیت و کیفیت DNA تخلیص شده ارزیابی گردید. مراحل تخلیص DNA بر روی دو نمونه کشت قارچ پیکیا پاستوریس و کاندیدا آلبیکنس، به عنوان کنترل مثبت و نمونه های Escherichia coli و خونهای خرگوش و انسان، به عنوان کنترل منفی، اجرا گردید.

از DNA تخلیص شده از کلنی های کشت داده شده پوسته، نمونه های کنترل مثبت و منفی و نیز پوسته بیماران برای آزمایش PCR استفاده گردید. دو جفت پرایمر ITS1/ITS4 و TR1/TR2 در تکثیر نواحی بشدت حفظ شده ژن کد کننده small ribosomal RNA یا 18S rDNA و بطور دقیقتر ناحیه internal transcribed spacer (ITS) rDNA بکار برده شدند.

TR1 (forward 5′-GTTTCTAGGACCGCC-3′)
TR2 (reverse 5′ -CTCAAACTTCCATCGACTTG′-3′)
ITS1 (forward 5′ -TCCGTAGGTGAACCTGC-3′)
ITS4 (reverse 5′ -TCCTCCGCTTATTGATATG-3′)

شرایط PCR مطابق برنامه پیشنهادی در مقاله رفرانس (۹) شروع شد ولی در مورد نمونه های DNA تخلیص شده از پوسته بیماران تغییرات و تدابیر مختلفی برای بهینه سازی شرایط PCR اتخاذ گردید که عبارتند از:

۱. استفاده از غلظتهای متفاوت DNA پوسته بیمار بعنوان Template.
۲. انتخاب دماهای مختلف Tm (۵۵ ، ۵۸ و ۶۰ درجه سانتیگراد ).
۳. تغییر تعداد سیکلها (۲۵ ، ۳۰ ، ۳۵ و ۴۰ سیکل).
۴. استفاده از ۳ رقت متفاوت پرایمرها ( ۱۰ ، ۲۵ و ۱۰۰ پیکو مول).
۵. از۳ آنزیم متفاوت Taq DNA پلی مراز (سیناژن و Biotools و BIO-RAD ) با حساسیتهای متفاوت نسبت به ممانعت کننده های احتمالی استفاده شد.
۶. یک نمونه DNA تخلیص شده مربوط به کلونیهای کشت داده شده با یک نمونه DNA تخلیص شده از پوسته (هر دو از یک جنس) مخلوط گردیده و PCR گذاشته شد (به منظور بررسی وجود ممانعت کننده های احتمالی از عملکرد DNA پلی مراز).
۷. با توجه به اینکه مقدار قابل توجهی از DNA تخلیص شده از پوسته مربوط به ژنوم انسانی میباشد، از پرایمرهایی که با نمونه DNA تخلیص شده از خون انسان ایجاد باندی جهت بررسی بیماری Cystic Fibrosis) CF) می کنند، استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

بعد از اتمام هر برنامه PCR، نمونه ها روی ژل ۲ درصد آگارز واجد اتیدیوم بروماید Load گردیده و پس از الکتروفورز، مشاهده باندها به وسیله نور UV امکان پذیر می شدند.

در مرحله بعدی بر روی کلنی های کشت پوسته حدود ۲۰ بیمار تخلیص DNA و آزمایشات PCR با استفاده از هر دو جفت پرایمر ITS1/ITS و TR1/TR2 صورت گرفت.

## یافته ها

نتایج PCR نمونه های کلنی کشت پوسته و کنترل مثبت، بدون هر گونه نیاز به تغییر در پروسه های تخلیص DNA و PCR ، مثبت بود ( تصویر ۱) ولی در مورد پوسته جواب منفی بود به عبارت دیگر در الکتروفورز محصول PCR باندی مشاهده نشد. لذا به منظور بدست آوردن محصول بیشتر از پروسه تخلیص DNA، شرایط مختلفی مورد ارزیابی قرار گرفت. همزمان بهینه سازی شرایط PCR نیز در دست اجرا بود. برای تخلیص DNA از پوسته بیماران، از دو کیت متفاوت با نامهای DNP Kit و Tissue Genomic DNA Isolation Kit استفاده شد. نتیجه PCR محصول هر دو کیت منفی بود بنابراین تغییراتی در پروتکل تخلیص DNA با کمک کیت DNP Kit مورد بررسی قرار گرفت. از جمله این تغییرات که به تفصیل در بخش روشهای کار ذکر گردیده میتوان از استفاده از روشهای مختلف هموژن کردن پوسته، تغییر در زمانهای انکوباسیون، سونیکاسیون بافت پوسته هموژن شده، تغییر در بافرها بر اساس روشهای موفق ارائه شده در تعدادی از مقالات و برخی اصلاحات دیگر نام برد.

نتیجه این تغییرات افزایش قابل توجه مقدار DNA تخلیص شده را بدنبال داشت ولی جواب PCR همچنان منفی بود. ازطرف دیگر پارامترهای زیر به منظور بهینه سازی شرایط PCR و رفع موانع احتمالی مورد ارزیابی قرار گرفتند:

- استفاده از غلظتهای متفاوت DNA بیمار بعنوان Template.
- انتخاب دماهای مختلف Tm (۵۵ ، ۵۸ و ۶۰ درجه سانتیگراد ).
- تغییر تعداد سیکلها (۲۵ ، ۳۰ ، ۳۵ و ۴۰ سیکل).
- استفاده از ۳ رقت متفاوت پرایمرها ( ۱۰ ، ۲۵ و ۱۰۰ پیکومول).
- استفاده از۳ آنزیم متفاوت Taq DNA پلی مراز (سیناژن و Biotools و BIO RAD ) با حساسیتهای متفاوت نسبت به ممانعت کننده های احتمالی.
- استفاده از جفت پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص بیماری CF.

این تغییرات نیز به جز در موارد معدودی که باند ضعیفی مشاهده شد نتیجه دیگری در بر نداشت.

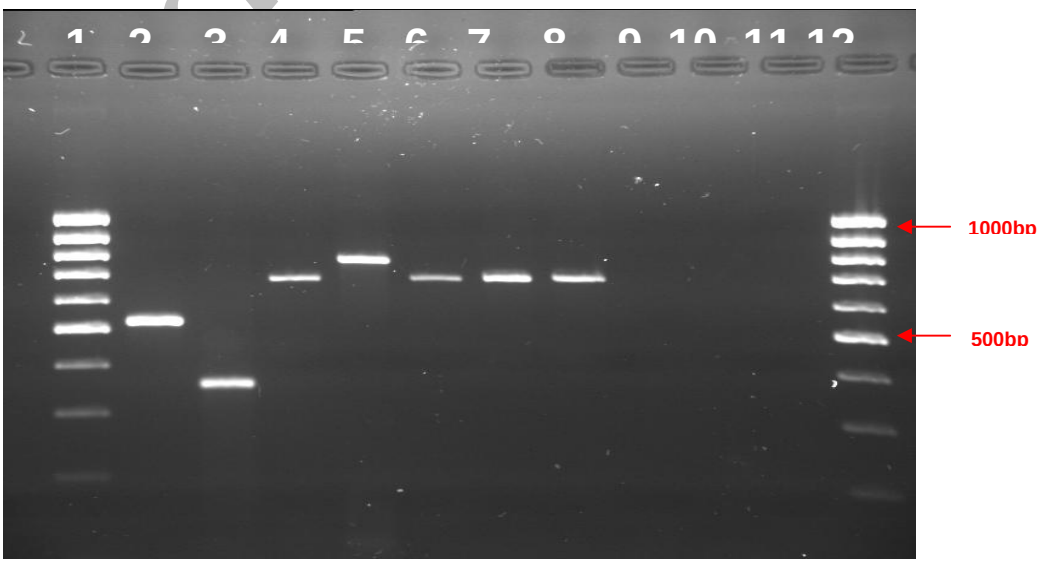
بعد از انجام آزمایشات فوق و عدم حصول جواب قابل قبولی از PCR نمونه پوسته بیماران، از پروتکل دیگری برای تخلیص DNA از بافت پوسته بیمار استفاده شد (۱۰).

مقدار DNA حاصله در این روش بسیار قابل توجه بود (حدود 200 µg/mL dsDNA ) با اینحال جواب PCR تعدادی از نمونه ها منفی بود ولی هنگامی که سه نمونه پوسته بیمار را که بر اساس تشخیص میکروسکوپی و کشت، یکسان بودند را با هم مخلوط کرده (حدود ۵۰mg) و تخلیص DNA نمودیم، جواب PCR مثبت شد (تصویر۲). تکرار این پروسه با سه نمونه دیگر نیز جواب مثبت به همراه داشت اما در عمل این کار منطقی نبوده و نتیجه آن قابل گزارش کردن نیست. تکرار آزمایشات نتایج مشابهی را بدنبال داشت.

علی رغم یافته های متفاوتی که در مورد نمونه های پوسته بدست آمد، نتایج تخلیص DNA و آزمایشات PCR کلنی های کشت پوسته کلیه بیمارانی که تا کنون مورد بررسی قرار گرفته اند (حدود ۲۰ بیمار) در مورد هر دو جفت پرایمر ITS1/ITS4 و TR1/TR2 مثبت بود (تصویر ۳).

**تصویر ۱: الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل ۲٪:**

ستونهای ۱و۱۲: سایز مارکر؛ ستون ۲: Candida albicans ؛ ستون ۳: Pichia pastoris ؛ ستون ۴: T.tonsurans ؛ ستون ۵: E. Fluccosum ؛ ستون ۶: T. verrucosum ؛ ستون ۷: T.mentagrophytes؛ ستون ۸: T. rubrum؛ ستون ۹: اشریشیا کلی؛ ستون ۱۰: خون خرگوش؛ ستون ۱۱: خون انسان.

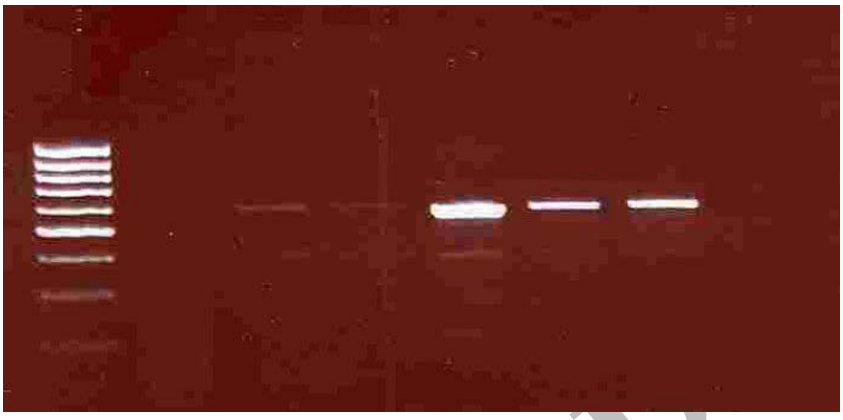





Archive of SID
www.SID.ir

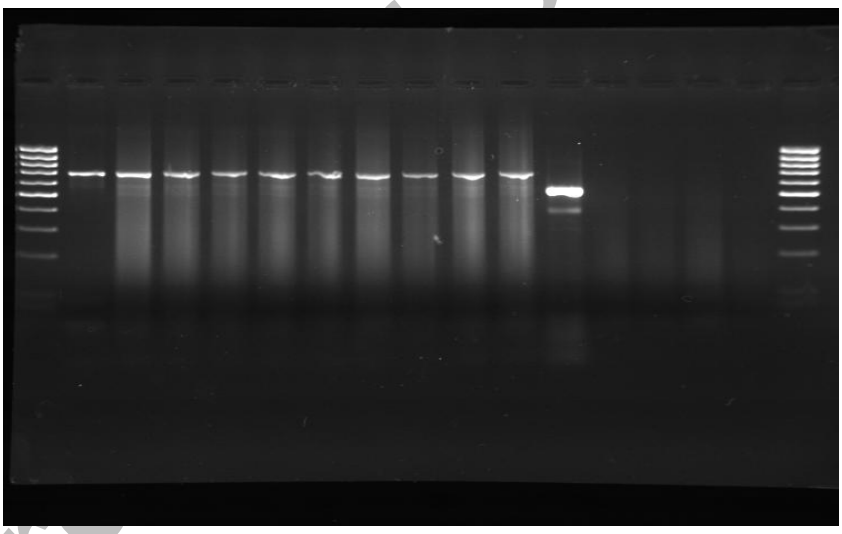
**تصویر ۲: الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل ۲٪:**

ستون ۱: سایز مارکر؛ ستونهای ۲، ۳ و ۴: چند نمونه پوسته بیمار که به صورت انفرادی تخلیص DNA شده بودند؛ ستون ۵: نمونه کلنی کشت یک نمونه پوسته بیمار؛ ستون ۶: مخلوط سه نمونه پوسته بیمار؛ ستون ۷: مخلوط سه نمونه پوسته بیمار دیگر.



**تصویر ۳: الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل ۲٪:**

ستونهای ۱ و ۱۷: سایز مارکر؛ ستونهای ۲ تا ۱۱: نمونه های مختلف کلنی کشت ۳ تا ۵ روزه پوسته بیمار؛ ستون ۱۲: Candida albicans؛ ستون ۱۳تا ۱۶: به ترتیب نمونه های E.coli ، خون خرگوش ، خون انسان و نمونه فاقد DNA الگو (کنترلهای منفی).



## بحث

قارچها گروهی از ارگانیسم‌ها هستند که عفونتهای ناشی از آنها به ویـژه در سالیان اخیر به دلیـل افـزایش جمعیـت افـراد مبـتلا بـه نقـایص ایمنـی و استفاده گسترده از روشهای شیمی درمانی و آنتی‌بیوتیکهای وسیع الطیـف به شدت افزایش یافته است (۱۱).

از آنجایی که تشخیص سریع و اختصاصی عفونتهای درماتوفیتی، بـویژه بـا توجه به جنسها و گونه‌های عامل بیماری، امکان اعمال پروتکلهای درمـانی ضد قارچی را بطور جهت‌دار و با کفایت فراهم خواهد کرد، طراحـی و بکـار گیری تکنیکهای سریع، دقیق و حسـاس در ایـن رابطـه بسـیار ضـروری و اجتناب ناپذیر خواهد بود. در همـین راسـتا و بـدلیل مشـکلات موجـود در تشخیص روتین قارچها، بکارگیری تکنیکهای مولکولی با ویژگی بـالا بـویژه تکنیکهای مبتنی بر آنالیز مولکولی DNA در سالهای اخیر گسترش یافته است (۹-۶).

تحقیق حاضر نیز با توجه به شیوع نسبتاً بالای درماتوفیتوزیس در ایران بـا هدف بررسی امکان بکار گیری تکنیک PCR جهت تشـخیص سـریع و بـا کفایت درماتوفیتها و بطور مستقیم در نمونه‌های پوسته بیمار و نمونه هـای کشت پوسته و مقایسه آنها با نتایج میکروسکوپی مستقیم پوسـته و کشـت برنامه ریزی شده است.

نتایج بدست آمده طی این تحقیق از یـک طـرف حـاکی از جوابهـای قابـل قبول از PCR مربـوط بـه DNA تخلـیص شـده از کلنـی کشـت پوسـته بیماران بوده (تصویر ۳) ولی از طـرف دیگـر تکـرار ناپـذیر بـودن آزمـایش PCR بر روی DNA تخلیص شده از پوسته بیمـاران را، بـا وجـود مـوارد مثبت مشاهده شده، نشان میدهد. در این خصوص مباحـث مختلفـی قابـل طرح است که به اختصار به آنها میپردازیم.



www.SID.ir

با توجه به سطح بالای بهداشت در کشورهای پیشرفته و احتمالا تعداد محدودتر بیماران مبتلا به درماتوفیتوزیس در این کشورها، مقالات چاپ شده در زمینه تشخیص سریع درماتوفیتها با استفاده از پوسته بیماران بسیار نادر میباشد و عموم تحقیقات صورت گرفته بر روی درماتوفیتها حول محور بررسیهای مولکولار اپیدمیولوژیکی با استفاده از کلنی های کشت قارچها می باشد. البته این احتمال نیز وجود دارد که آنها نیز همانند ما نتایج قابل قبولی از PCR نمونه های پوسته بیماران بدست نیاورده باشند.

در تعدادی از مقالات احتمال وجود ممانعت کننده هایی (inhibitor) از عمل DNA پلی مرازها بخصوص در DNA تخلیص شده از پوسته گزارش شده است (۱۲ و ۱۳)، که بر این اساس دو آزمایش مختلف طراحی و اجراء گردید. نتایج این آزمایشات وجود ممانعت کننده ها را تایید نکرد ولی مسلما برای تایید نهایی موضوع بررسیهای جامعتر لازم است.

استفاده از روشهای گوناگون با قدرت تخریبی بالا به منظور تخریب دیواره سخت قارچ، احتمال خرد شدن DNA را نیز بهمراه خواهد داشت. این احتمال زمانی قوت میگیرد که در الکتروفورز DNA تخلیص شده تعدادی از نمونه ها هیچ باندی مشاهده نگردید. شکستگیهای متعدد در DNA ژنومی در هنگام تخلیص DNA مقوله ای اثبات شده است لکن میزان وقوع این شکستگیها ارتباط مستقیمی با روش بکار برده شده برای تخلیص DNA دارد.

مقدار نمونه پوسته تهیه شده از بیماران متنوع بوده و در موارد بسیاری مقدار آن بقدری ناچیز است که احتمال استحصال مقدار مناسب DNA تقریبا نامحتمل است. از طرف دیگر مقدار میسلیومهای قارچ در نمونه های پوسته نسبت به سلولهای پوست بیمار مسلما قابل توجه نبوده و در نتیجه مقدار DNA قارچ نسبت به کل DNA تخلیص شده ناچیز میباشد. نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر نشان داد که این مشکل مهمترین عامل تاثیر گذار بر روی آزمایش PCR بوده و البته پس از اصلاح روش تخلیص DNA، تنها هنگامی که ۳ نمونه پوسته با هم مخلوط شدند و حجم قابل ملاحظه ای از پوسته (حدود ۵۰mg) جمع گردید، جواب PCR مثبت بدست آمد. در حالیکه نمونه هایی که به صورت انفرادی با همین روش DNA آنها تخلیص شده بود، جواب آزمایش PCR آنها منفی بود.

ماحصل این مباحث گویای وجود مانع یا موانعی بر سر راه نتیجه گیری از آزمایشات صورت گرفته بر روی نمونه های پوسته است که نیازمند بررسیهای دقیقتر و جامعتر میباشد. از سوی دیگر نتایج بدست آمده از PCR کلنی های کشت پوسته بیماران کاملا معنی دار بوده و مقایسه این نتایج با نتایج مشاهدات میکروسکوپی مستقیم و کشت پوسته مطابقت دارد.

در هر حال نکته قابل توجه اینست که عموم روشهای مورد استفاده در این تحقیق برای تخلیص DNA از قارچ قابل اطمینان است ولی استفاده از تکنیکهایی با تکنولوژی پیشرفته تر برای حصول نتیجه مطلوبتر از تخلیص DNA از پوسته بیماران درماتوفیتوزیسی با توجه به خصوصیات این نمونه ها ازجمله مقادیر کم آنها (اندازه زخم محدود بوده و امکان نمونه برداری بیشتر وجود ندارد) پیشنهاد میشود. البته استفاده از تکنیکهای پیشرفته تر باید متضمن تخریب حداقل DNA باشد. در این میان بکار گیری روشهای پیشرفته تر PCR نظیر Real Time PCR که در هر زمان بتوان هر گونه تغییر در مقدار محصول PCR را ردیابی کرد، توصیه می گردد تا بتوان ناتوانیهای روش ژل الکتروفورز را در ردیابی مقادیر ناچیز DNA جبران کرد.

با توجه به نتایج این تحقیق و به منظور تسریع در رسیدن به جواب جهت پاسخگویی احتمالی به بیمار، میتوان اقدام به برداشت کلنی کشت پوسته طی روزهای سوم تا پنجم (بسته به گونه درماتوفیت) و تخلیص DNA و انجام PCR نمود که البته این پروتکل در دست اجراء بوده و نتایج اولیه رضایتبخشی حاصل گردیده است.

## REFERENCES


1. Weitzman, I. and Summerbell, R. C. The Dermatophytes. Clinical Microbiology Review. 1995, 8: 240-259.
2. Rippon, J. W. Medical Mycology; The pathogenic fungi: and the pathogenic actinomycetes. Third Edition, Harcourt Brace Jovanovich, Inc., New York, 1988.
3. Howard, D. H. Fungi pathogenic for human and animals. Part B: Pathological and detection. Marcel Dekker, Inc., New York, 1983, pp: 267-271.
4. Evans, EGV. and Richardson, M.D. Medical Mycology: A practical approach, Oxford University press, New York, 1989.
5. McGinnis, M.R. Laboratory hand book of medical Mycology, Academic Press, Inc., New York, 1988.
6. Graser, Y., El Fari, M., Presber, W. and Tietz, H. Identification of common dermatophytes (Trichophyton, Microsporum, Epidermophytin) using polymerase chain reaction. Br. J. Dermatology. 1998, 138: 576-82.




Archive of SID
www.SID.ir

7. Faggi, E., Pini, G,. Campisi, E., Bertellini, C., Difonzo, E., Mancianti, F. Application of PCR distinguish common species of dermatophytes. J. Clinical Microbiology. 2001, 39(9): 3382-3385.

8. Martin, C., et al. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. J. Clinical Microbiology. 2000, 38(10): 3735-3742.

9. Turin, L., Riva, F., Galbiati, G. and Gainelli, T. Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. European J. Clinical Investigation. 2000, 30: 511-518.

10. Biase, F. H., et al. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissue. Genet. Mol. Biol. 2002, 25 (3): 1-5.

11. Anaissie, E. J., et al. Clinical Mycology. Elsevier Science, New York, 2003.

12. Yamamoto, Y. PCR in diagnosis of infection: detection of bacteria in cerebrospinal fluids. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2002, May: 508-514.

13. Loeffler, J., Hebart, H., Bialek, R., Hagmeyer, L., Schmidt, D., Serey, F.P. and et al. Contaminations occurring in fungal PCR assays. J. Clinical Microbiology. 1999, Apr. 1200-1202.

Archive of SID

www.SID.ir