Short Communication

Rapid Detection of *Trichophyton rubrum* in Clinical Samples from *Tinea Unguium* using PCR

Seyed Ali Moallemzadeh[1], Mohammad Hossein Yadegari[2*], Parvin Mansouri[3], Masumeh Rajabi Bazl[4], Reza Kachuei[5]

1- Ph.D. Candidate, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Associated Professor, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Dermatology, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5- Assistant Professor, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: yadegarm@modares.ac.ir

Received: 22/May/2012, Accepted: 23/Jul/2012

Abstract

Objective: Dermatophytosis is one of the most common pandemic fungal infections that is a major health problem in cities and villages. This study aims to evaluate PCR sensitivity and accuracy in the detection of nail dermatophytosis compared to conventional direct and culture detection methods, and performs an assessment of *Trichophyton rubrum* in patients suspected of having nail dermatophytosis.

Methods: This experiment was a descriptive-experimental study carried out on 71 nail samples obtained from patients with suspected nail dermatophytosis. All clinical samples of nails or chips were divided into three sections and each section underwent direct examination, culture and molecular tests. In the molecular test, we used fungal rRNA universal primers (ITS1 and ITS4) and *Trichophyton rubrum*-specific primers.

Results: In this study, for the first time in Iran and based on a modified protocol, DNA was directly extracted from tissues of infected nails in less than five hours. Additionally a comparison of the results obtained from routine laboratory methods such as direct examination and culture with PCR verified the high sensitivity and accuracy of PCR compared to the other studied methods.

Conclusion: PCR, as a rapid, accurate method, can be a good replacement for conventional culture and direct examination.

Keywords: Onychomycosis, Dermatophytosis, *Trichophyton rubrum*, PCR

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 2, Summer 2012, Pages: 87-95

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2023-10-02]

مقاله کوتاه

تشخیص سریع و حساس اونیکومایکوزیس در نمونه‌های بالینی مشکوک به درماتوفیتوزیس ناخن (ترایکوفیتون روبروم) با استفاده از روش PCR

سیدعلی معلم‌زاده[1]، محمدحسین یادگاری[2*]، پروین منصوری[3]، معصومه رجبی‌بذل[4]، رضا کچوئی[5]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استاد، بخش پوست، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۵- استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی
Email: yadegarm@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۱/۰۳/۰۲ پذیرش مقاله: ۹۱/۰۵/۰۲

چکیده

هدف: درماتوفیتوزیس یکی از رایج‌ترین بیماری‌های عفونی قارچی است که در حال حاضر به صورت جهان‌گیر درآمده و از مشکلات عمده بهداشتی و درمانی در شهرها و روستاها به حساب می‌آید. اهداف مشخص این مطالعه شامل اهداف آرمانی، کلی، اهداف ویژه و کاربردی است که عبارتست از تشخیص صحیح درماتوفیتوزیس ناخن، مقایسه حساسیت و دقت PCR با روش‌های معمول مستقیم و کشت برای شناسایی عوامل درماتوفیتوزیس ناخن و بررسی ارزیابی تریکوفیتون روبروم در بیماران مشکوک به درماتوفیتوزیس ناخن.

مواد و روش‌ها: این مطالعه یک بررسی توصیفی- تجربی بوده که روی نمونه بالینی ناخن ۷۱ نفر از بیماران مشکوک به درماتوفیتوزیس ناخن صورت گرفت. نمونه‌های بالینی یا تراشه‌های ناخن مشکوک، به سه بخش تقسیم شد که روی هر قسمت آزمایش مستقیم، کشت و مولکولی انجام شد. در آزمایش مولکولی از آغازگرهای یونیورسال قارچ (ITS1 و ITS4) و اختصاصی ترایکوفایتون روبروم (T-rub) استفاده شد.

نتایج: در مطالعه حاضر برای اولین بار در ایران در ظرف کمتر از ۵ ساعت و با استفاده از برنامه و روش اصلاح شده، استخراج DNA از بافت مستقیم ناخن آلوده صورت گرفت. همچنین مقایسه نتایج روش‌های آزمایشگاهی معمول مثل آزمایش مستقیم و کشت با روش PCR حساسیت و دقت بسیار زیاد آن را نسبت به روش‌های یاد شده به اثبات می‌رساند.

نتیجه‌گیری: این روش می‌تواند با سرعت و دقتی که دارد جایگزین بسیار مناسب و دقیق روش‌های معمول کشت و آزمایش مستقیم باشد.

کلیدواژگان: اونیکومایکوزیس، درماتوفیتوزیس، ترایکوفیتون روبروم، PCR

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحات: ۸۷-۹۵

مقدمه

به عفونت درماتوفیتی (Dermatophytic Infection) ناخن‌های دست و پا، اونیکومایکوزیس (Onychomycosis) گفته می‌شود که تعریف جامع‌تری نیز نسبت به کچلی ناخن است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2023-10-02]

گونه‌های مختلف مخمرها، درماتوفیت‌ها و ساپروفیت‌ها (Saprophytes) یا کپک‌ها نیز ایجاد عفونت اونیکومایکوزیس می‌کنند. این بیماری شیوع جهانی داشته و در حال حاضر از مشکلات عمده درمان بیماران آلوده به این ارگانیسم است. روش‌های متداول فعلی مانند آزمایش مستقیم میکروسکوپی و کشت، زمان‌بر بوده و از طرفی وجود احتمال منفی کاذب در این دو روش، جوابگوی همه‌گیری این بیماری در بیماران مختلف از جمله بیماران با دستگاه ایمنی سرکوب شده (Immunosuppressed Patients) که به هر دلیلی سیستم ایمنی‌شان تضعیف شده است نیست [۱، ۲].

داروهای موضعی ضد قارچ یا آزول‌ها (Azols) از مؤثرترین داروها برای درمان درماتوفیت‌ها است. درمان اونیکومایکوزیس ناشی از درماتوفیت‌ها با تربنافین (Terbinafine) در ۸۵ درصد موارد موفقیت‌آمیز بوده است. از دلایل عدم موفقیت ۱۵ درصد موارد می‌توان به عواملی مانند عدم نفوذ دارو به بافت‌های عمقی، مقاومت به داروهای ضد قارچی مانند ترایکوفیتون روبروم (*Trichophyton rubrum*) که به درمان سخت جواب می‌دهد، عدم تشخیص صحیح، انواع گونه‌ها واریته‌ها (Variety) و سویه‌های قارچی، عوامل سیستمیک و پاسخ‌های میزبان و مهم‌تر از همه ساختمان پیچیده و مقاوم آرتروکونیدی‌ها (Arthroconidia) اشاره کرد که تمام آن‌ها می‌تواند سبب عود مجدد بیماری شود که بیماری به‌ویژه در عفونت‌های ناشی از ترایکوفیتون روبروم به طور مکرر مشاهده شده است [۲، ۳].

از نظر اپیدمیولوژیک، تعیین واریته و سویه ترایکوفیتون‌ها و طبقه‌بندی آن‌ها برای جلوگیری از گسترش عفونت از اهمیت زیادی برخوردار است. تشخیص بیماری‌های قارچی همانند سایر بیماری‌های میکروبی بر پایهٔ مشاهدات بالینی و آزمایشگاهی استوار است. شکل ظاهری ضایعات قارچی تا حدودی می‌تواند در تشخیص بیماری کمک کننده باشد اما امکان دارد که در اثر درمان‌های ناقص چنین ضایعاتی تعدیل شده و شکل معمول (Typic) خود را از دست بدهد. در بیماری‌های قارچی عمقی، یافته‌های بالینی کمتر اختصاصی بوده و مشابه سایر بیماری‌های میکروبی است و این امر، تشخیص علت بیماری و نیز درمان مناسب را با مشکل مواجه می‌کند [٤، ٥].

در حال حاضر تشخیص آزمایشگاهی گونه‌ها و واریته‌های ترایکوفیتون براساس آزمایش مستقیم میکروسکوپی و کشت‌های آزمایشگاهی و آزمون‌هایی مانند سوراخ کردن مو و تعدادی از آزمون‌های فیزیولوژی صورت می‌گیرد که اغلب این آزمون‌ها بسیار وقت‌گیر بوده و نیاز به مهارت‌های خاص و دقت فراوان در آزمایشگاه دارد. بنابراین عجیب به نظر نمی‌رسد که اعلام بعضی از نتایج هفته‌ها طول بکشد [٦].

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction: PCR) روشی است که به طور گسترده در زیست‌شناسی مولکولی به‌کار برده می‌شود. امروزه با پیشرفت تکنولوژی PCR سرعت تشخیص آزمایشگاهی انواع بیماری‌ها از جمله درماتوفیتوزیس (Dermatophytosis) نیز در حال افزایش است که می‌تواند تشخیص سریع و شناسایی درماتوفیت‌ها را از مقادیر ناچیز مواد اولیه (نمونه بالینی) در ظرف چندین ساعت امکان‌پذیر کند [۷، ۸].

روش به‌کار برده شده در این مطالعه روشی است که برای اولین بار در ایران، بیماران آلوده به انیکومایکوزیس، یا عفونت قارچی ناخن را به صورت مستقیم مورد بررسی و تشخیص مولکولی قرارمی‌دهد که دلایل آن با توجه به مسایل فوق چنین بیان می‌شود:

تشخیص عفونت ناخن ناشی از ترایکوفیتون‌ها از جمله روبروم بسیار دشوار است و می‌تواند درمان را ماه‌ها به تأخیر انداخته یا در بعضی موارد، امکان دارد به صورت مزمن درآمده و به درمان مقاوم شود. در آزمایش مستقیم میکروسکوپی بین ۲ تا ۱۵ درصد منفی کاذب و تا ٤٠ درصد کشت، منفی گزارش شده است [۲]. آزمون‌های سرولوژی به دلیل واکنش ضعیف آنتی‌ژن-آنتی‌بادی یا عدم پاسخ‌گویی در بیماران شدیداً سرکوب شده ایمنی مانند بیماران ایدزی (Acquired Immunodeficiency

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2023-10-02]

Syndrome: AIDS)، شیمی‌درمانی یا رادیودرمانی و غیره می‌تواند گمراه کننده باشد. همچنین هرچه سرعت تشخیص بالا باشد، سرعت بهبودی و روند تقویت سیستم ایمنی افراد در معرض خطر عفونت قارچی مانند بیماران ایدزی، سرطانی‌ها، اطفال نارس، دیابتی‌ها و افرادی که انتقال عضو دارند نیز افزایش خواهد یافت [۹].

به دلیل موارد یاد شدهٔ بالا که از اساسی‌ترین و مهم‌ترین نکات منفی تشخیص‌های رایج و معمولی مانند کشت و آزمایش مستقیم است، می‌توان دلیل استفاده از روش‌های مدرن و مولکولی را در تشخیص بیماری‌های قارچی از جمله درماتوفیتوزیس بیان نمود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه یک بررسی توصیفی- تجربی بوده که روی نمونه بالینی ناخن ۷۱ نفر از بیماران مشکوک به درماتوفیتوزیس ناخن ارجاعی به گروه قارچ‌شناسی پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس با هدف توصیف مبانی نظری یک روش ابداعی آزمایشگاهی و راه‌اندازی و استفاده عملی از آن برای شناسایی عوامل مختلف اونیکومایکوزیس از جمله تشخیص ترایکوفیتون روبروم در انسان انجام شد. نمونه‌های بالینی به‌دست آمده از ناخن‌های دست یا پای بیماران با توجه به مراحل زیر شناسایی و مطالعه شد:

۱) تهیه پرسشنامه و کسب اطلاعات بالینی بیمار مانند: سن، جنس، سابقه بیماری انیکومایکوزیس، بیماری‌های زمینه‌ای، مصرف داروهای آنتی‌بیوتیک و غیره،

۲) جمع‌آوری نمونه‌های بالینی یا تراشه‌های ناخن مشکوک به انیکومایکوزیس قارچی،

۳) تشخیص آزمایشگاهی (هر نمونه به ۳ بخش تقسیم شده و آزمایش مستقیم، کشت و آزمایش مولکولی روی آن انجام شد.)

الف- آزمایش مستقیم: میزان مشخصی از تراشه ناخن بیمار روی لام قرار داده شد، سپس یک تا دو قطره پتاس (KOH) ٤٠ درصد به آن اضافه شد و به مدت یک ساعت در شرایط مرطوب نگهداری شد تا تراشه‌های ناخن در آن هضم و عامل احتمالی قارچی نمایان شود.

ب- کشت: بخشی از نمونه روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار (Sabouroud Dextrose Agar) آنتی‌بیوتیک‌دار [کلرامفنیکل (Chloramphenicol) + سیکلوهگزامید (Cyclohexamide) یا SCC (Sabouroud Dextrose Agar + Cyclohexamide + Chloramphenicol) ساخت شرکت Merck آلمان] کشت و در شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۳ هفته انکوبه شد.

ج- آزمایش مولکولی: هر نمونه طبق برنامه برای انجام آزمون مولکولی به شرح زیر آماده شد: استخراج مستقیم DNA از بافت مشکوک ناخن و انجام PCR برای تأیید DNA قارچی عامل اونیکومایکوزیس با استفاده از آغازگرهای یونیورسال (Universal Primers) قارچ (ITS1 و ITS4) و اختصاصی روبروم (T-rub) [۱۰، ۱۱] با توجه به این‌که عوامل آلوده کننده ناخن شامل درماتوفیت‌ها مخمرها و ساپروفیت‌هاست (گرچه این تحقیق دنبال بیشترین عامل آلوده کننده ناخن یعنی ترایکوفیتون روبروم بوده است.).

استخراج DNA: نحوه استخراج مستقیم DNA از تراشه‌های ناخن مشکوک و آلوده براساس روش و برنامه فنل- کلروفرم اصلاح شده جدید به این ترتیب انجام شد: با اسکالپل (Scalpel) کند مقداری از بافت ناخن و زیر ناخن به صورت پودر جدا و داخل میکروتیوب استریل ۱/۵ میلی‌لیتر قرار داده شد (مقداری از این تراشه‌ها نیز برای آزمایش مستقیم میکروسکوپی و کشت در محیط SCC آماده شد). سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج که شامل [۵۰ میلی‌مول EDTA- تریس HCl (Ethylenediaminetetraacetic acid- Tris HCl) با pH=۸ و SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ۱ درصد] به اضافه ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K (Proteinase k) بود به شدت ورتکس (Vortex) و به مدت یک ساعت در دمای مورد نظر انکوبه شد. بعد از طی زمان یاد شده مقدار ۵۰۰

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2023-10-02]

میکرولیتر فنل اشباع (شرکت سیناژن، ایران) به آن اضافه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی در اپندورف (Eppendorf) استریل منتقل و به آن ۵۰۰ میکرولیتر از کلروفورم (شرکت Merck، آلمان) افزوده شده و دوباره سانتریفوژ شد. مایع رویی در میکروتیوب استریل جدید منتقل و یک دهم حجم آن استات سدیم سه مولار با (pH=۵/۵) و دو برابر حجم نیز الکل سرد مطلق به آن اضافه شد. سپس در سانتریفوژ یخچال‌دار قرار داده شد و پس از طی مرحله یاد شده میکروتیوب، خالی و روی رسوب به‌دست آمده به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد ریخته و مجدداً به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت بعد از خالی نمودن میکروتیوب و خشک نمودن در هوای اتاق رسوب مورد نظر در ۲۵ میکرولیتر بافر TB (Tris Borate Buffer) حل و برای آزمون PCR آماده شد. برای عمل PCR یک واکنش ۲۵ میکرولیتری در نظر گرفته شد و طبق مراحل زیر و با استفاده از مواد شرکت Vivantis مالزی انجام شد: آب مقطر دیونیزه ۸ میکرولیتر، آغازگرهای رفت و برگشت به مقدار ۱/۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ به میزان ۰/۵ میکرولیتر، الگو (Template) یا نمونه DNA ناخن مورد مطالعه ۱ ماکرولیتر، مخلوط اصلی (Master Mix) ۱۲/۵ میکرولیتر که حجم کلی مواد داخل میکروتیوب استریل به ۲۵ میکرولیتر رسید و در نهایت مواد فوق با آرامی مخلوط و داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. تمام مراحل یاد شده در شرایط کاملاً استریل و زیر هود مولکولی و در بین ظرف یخ انجام شد. توالی آغازگرهای یونیورسال به‌کار گرفته شده در این مطالعه و آغازگرهای اختصاصی روبروم که قبل از استفاده در ژن بانک NCBI (National Center for Biotechnology Information) ارزیابی شد به صورت زیر بود.

ITS1: 5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3'.

ITS4: 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3'

T-rub: F- 5'- GCC TGT TGT TCC GCT CAT TCT T- 3'.

T-rub: R- 5'- CGG CTA GGA GGG CGT GGT AGA- 3'

یادآوری می‌شود که طراحی و ساخت آغازگر اختصاصی روبروم طبق مرجع مورد تأیید در ژن بانک NCBI بوده و این آغازگر می‌تواند قطعه‌ای از تریکوفیتون روبروم را با وزن مولکولی ۹۲۳ جفت‌باز شناسایی نماید [۱۰].

برنامه اجرا شده برای PCR عبارت بود از مرحله اول؛ حرارت ۹٤ درجه سانتی‌گراد با زمان ۵ دقیقه، یک چرخه برای واسرشت‌سازی اولیه (Initial Denaturation)، مرحله دوم؛ حرارت ۹٤ درجه سانتی‌گراد با زمان ۳۰ ثانیه، مرحله سوم با دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد و زمان ٤۵ ثانیه، مرحله چهارم با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و زمان یک دقیقه و پانزده ثانیه که جمعاً ۳۵ چرخه برای تکثیر DNA و تکثیر نهایی یا مرحله پنجم با حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۷ دقیقه یک چرخه انجام شد که کل این فرایند بیشتر از دو ساعت طول کشید. برای تفکیک قطعات DNA و آگاهی از محصول PCR و نیز قابل رنگ‌آمیزی و قابل مشاهده نمودن آن‌ها، هرکدام از محصولات PCR روی ژل آگارز به مدت ٤۵ دقیقه الکتروفورز شد. از بافر TBE (Tris/Borate/EDTA) شامل EDTA ۰/۵ مولار، بوریک اسید (Boric acid) و آب مقطر دیونیزه با pH=۸ برای ساخت ژل آگارز ۲ درصد و بافر تانک الکتروفورز استفاده شد. همچنین برای رنگ‌آمیزی از اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) (سیناژن، ایران) با غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده و سپس ژل مورد نظر در دستگاه ژل داکیومنت (Gel Documentation System) قرار داده شد. در این مطالعه به ازای هر بار آزمون PCR برای تشخیص DNA نمونه‌های بالینی بیماران از سوش استاندارد ترایکوفیتون روبروم با (PTCC ۵۱٤۳) و (شماره دستیابی AY-525329) که در ژن بانک NCBI ثبت شده است و همچنین برای تأیید اختصاصیت آغازگر اختصاصی روبروم از سوش استاندارد ترایکوفیتون متاگروفایتیس (*Trichophyton mentagrophytes*) با PTCC ۵۰۵٤ طبق استاندارد مرکز تحقیقات صنعتی ایران و مخمر کاندیدا (*Candida*) استفاده شد و برای هر آغازگر کنترل منفی نیز گذاشته شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2023-10-02]

نتایج

با استفاده از یک برنامه نسبتاً قدیمی که برای استخراج انواع سلول‌های پستانداران"به جز قارچ و ناخن" به‌کار رفته بود [۱۲]، اولین بار استخراج DNA به روش فنل کلروفرم با زمان ۲٤ ساعت از قارچ استاندارد روبروم انجام شد. با توجه به موفقیت‌آمیز بودن این روش در قارچ روبروم، کار دشوار و طاقت فرسایی در طول یک سال گذشته روی ناخن‌های سالمی که به صورت تجربی با سوش استاندارد آلوده می‌شد انجام شد که باز در ناخن‌های آلوده تجربی نتیجه منفی بود. سرانجام پس از نزدیک صد بار استخراج DNA و PCR که با تغییرات اساسی (شامل تغیرات دمایی و دور سانتریفوژها) در برنامه یاد شده همراه بود این مهم در مدت زمان ٤۸ ساعت به‌دست آمد. پس از راه‌اندازی طرح روی نمونه‌های ناخن آلوده تجربی، کار روی نمونه‌های بالینی به صورت مستقیم از بیماران ارجاعی یاد شده شروع شد که ابتدا ٤۸ ساعته انجام شد. پس از دومین تغییرات تدریجی در برنامه شامل حذف نیتروژن مایع و غیره، در مدت زمان‌های ۲٤ و ۱۸ و ۱۲ و ۸ و در آخر با زمان ۵ ساعت و نیم و با استفاده از روش دستی (بدون استفاده از کیت‌های تشخیصی) تشخیص انواع آلودگی قارچی ناخن یا اونیکومایکوزیس با عوامل مختلف از جمله ترایکوفیتون روبروم با موفقیت انجام شد که نتایج منحصر به فردی را از نظر زمان و سرعت تشخیص و حساسیت بالا نشان می‌دهد و می‌توان ادعا کرد که در نوع خود در ایران و منطقه بی‌نظیر و در جهان کم‌نظیر است.

از مجموع ۷۱ نفر تعداد ۲۳ نفر مرد و ٤۸ نفر خانم بود (۳۳ درصد مرد و٦۷ درصد زن) که ۲۵ نفر این‌ها درگیری ناخن دست و ٤٦ نفر نیز آلودگی ناخن پا (۳۵ درصد ناخن دست و ٦۵ درصد ناخن پا) داشته‌اند.

از مجموع ۷۱ نفر در آزمایش مستقیم ۳۲ نفر درماتوفیت، ۸ نفر مخمر (٥٦ درصد مثبت) و ۳۱ نفر منفی (٤٤ درصد) گزارش شد.

نتایج کشت در محیط SCC از مجموعه ۷۱ نفر فقط ۸ مورد روبروم و ۳ نفر منتاگروفایتیس، ۳ مورد مخمر رودوترولا (*Rhodotorula*)، ۷ نفر کاندیدا (۳۰ درصد مثبت) و ۵۰ مورد باقیمانده نیز منفی (۷۰ درصد) به‌دست آمد.

شکل ۱ PCR نمونه‌های ناخن آلوده شده تجربی؛ **چاهک ۱)** نشانگر DNA، **چاهک‌های ۲ و ۳)** نمونه‌های آلوده شده با استاندارد منتا و کاندیدا با آغازگر ITS1 و ITS4، **چاهک ٤)** استاندارد روبروم با آغازگر اختصاصی T-rub، **چاهک ۵)** استاندارد منتا با آغازگر اختصاصی روبروم (برای بررسی اختصاص بودن آغازگر) که باندی مشاهده نمی‌شود، **چاهک‌های ٦ و ۷)** کنترل منفی آغازگرها

همچنین از مجموع ۷۱ نمونه بالینی بیماران، ٤۱ نفر با آغازگر اختصاصی روبروم (T-rub) مثبت (۵۸ درصد) و٦۵ نفر نیز با آغازگر یونیورسال قارچ (ITS1 و ITS4) (۹۱ درصد) مثبت شدند که باندهای به‌دست آمده با آغازگر یونیورسال، اکثراً همتراز و هم وزن کنترل مثبت استاندارد منتاگروفایتیس و مخمر کاندیدا است (شکل ۱ و ۲).

یادآوری می‌شود که برای شناسایی و تعیین گونه باندهای مذکور می‌توان از آغازگرهای اختصاصی درماتوفیت یا مخمر کمک گرفت که هدف این تحقیق نیست. نتایج فوق به وضوح نشان می‌دهد که اگر روش به‌دست آمده از مطالعه حاضر به جای روش‌های معمول آزمایشگاهی به‌کار گرفته شود، تحول شگرفی در امر تشخیص و درمان بسیار مشکل عفونت‌های قارچی ناخن یا اونیکومایکوزیس به وجود خواهد آمد. سرعت و دقت این روش اهمیت آن را در بیماران با دستگاه ایمنی سرکوب شده که هر روز خطر احتمال درگیری قارچی از جمله ناخن در آن‌ها بیشترمی‌شود، چند برابر می‌کند [۲، ۷].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2023-10-02]

شکل ۲ نمونه‌های بیماران؛ **چاهک ۱ و ۸)** DNA نشانگر، **چاهک‌های ۲ و ۳)** نمونه بیمار ۱: با آغازگر یونیورسال قارچ و اختصاصی روبروم، **چاهک‌های ٤ و ۵)** نمونه بیمار ۲: PCR با آغازگر یونیورسال مثبت، اختصاصی روبروم منفی، **چاهک‌های ٦ و۷)** کنترل منفی آغازگرها، **چاهک‌های ۹ و ۱۰)** نمونه بیمار ۳: PCR با اختصاصی روبروم منفی با آغازگر یونیورسال مثبت (با توجه به هم‌وزن بودن باند چاهک ۹ با باندهای کنترل مثبت کاندیدا و استاندارد متاگروفایتیس، احتمالاً بیمار عفونت مختلط کاندیدا و درماتوفیت داشته است)، **چاهک ۱۱)** کنترل مثبت کاندیدا، **چاهک ۱۲)** کنترل مثبت استاندارد ترایکوفیتون روبروم، **چاهک ۱۳)** استاندارد متاگروفایتیس با آغازگر یونیورسال

بحث

تاکنون روش مولکولی گزارش شده برای تشخیص اونیکومایکوزیس نسبتاً محدود بوده که در اغلب آن‌ها از روش PCR معمولی به مراتب کمتر و بیشتر از اشکال تغییر یافته PCR استفاده شده است که به مهم‌ترین مقالات موجود در این باره به صورت فهرست‌وار اشاره می‌شود: براساس آخرین گزارش‌های موجود در PubMed و مجله‌های معتبر دنیا، در سال ۲۰۰۷ بریلووسکا-دابرووسکا (Brillowska-Dabrowska) و همکاران توانستند عفونت درماتوفیتی ناخن را با استفاده از PCR چندگانه (Multiplex PCR) در مدت پنج ساعت با موفقیت تشخیص دهند [۲]. دلیل استفاده از این روش ۵ تا ۱۵ درصد منفی کاذب در آزمایش مستقیم و ٤۰ درصد منفی در کشت اعلام شد. همچنین بیفوس (Beifuss) و همکاران در سال ۲۰۰۹ توانستند با زمان ٢٤ ساعت آلودگی پنج گونه درماتوفیت را مستقیماً از ناخن‌های مشکوک با ELISA-PCR جداسازی نمایند. در این تحقیق ادعا شده که میزان منفی کاذب در روش‌های معمولی کشت و آزمایش مستقیم بالای ٦۰ درصد است [۱۳]. در سال ۲۰۰۷ گارگ (Garg) و همکاران با Nested PCR، در بیماران با دستگاه ایمنی سرکوب شده و شیمی‌درمانی و گوتزمر (Gutzmer) و همکاران در سال ۲۰۰٤ با Light Cycler PCR [۹، ١٤] و موارد مشابه دیگر اهمیت تشخیص مولکولی عفونت درماتوفیتی ناخن را نسبت به روش‌های تشخیصی مستقیم میکروسکوپی و کشت به اثبات رساندند [۱۵-۱۷].

در مطالعه حاضر نیز برای اولین بار می‌توان در ظرف کمتر از ٦ ساعت (۵ ساعت نیم) و با استفاده از برنامه و روش اصلاح شده جدید، استخراج DNA از بافت مستقیم ناخن آلوده و تأیید PCR، انواع کچلی ناخن که ناشی از درماتوفیت‌ها مخمرها و کپک‌ها است را با موفقیت تشخیص و شناسایی نمود. همچنین مقایسه نتایج روش‌های آزمایشگاهی معمول مثل آزمایش مستقیم و کشت با روش PCR حساسیت و دقت بسیار زیاد آن را نسبت به روش‌های یاد شده به اثبات می‌رساند. روش به‌کار برده شده در این مطالعه روشی است که برای اولین بار در ایران، بیماران مبتلا به انیکومایکوزیس، یا عفونت قارچی ناخن را به صورت مستقیم مورد بررسی و تشخیص مولکولی قرار می‌دهد.

با توجه به مطالب یاد شده فوق، امتیازات این تحقیق نسبت به موارد یاد شده مشابه آن به شرح زیر است:

۱) ساده و در دسترس بودن امکانات و مواد لازم برای انجام آزمون در ایران،

۲) به صرفه و اقتصادی بودن طرح نسبت به موارد کار شده بالا و حساسیت و دقت زیاد با توجه به این‌که با PCR معمولی جواب می‌دهد،

۳) حذف نیتروژن مایع که در اکثر مطالعات مولکولی برای

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2023-10-02]

خرد کردن قارچ یا بافت مورد نظر و آماده‌سازی مرحله استخراج DNA از بافت دیده می‌شود،

٤) از همه مهم‌تر سرعت فوق‌العاده این تحقیق است که می‌توان ظرف کمتر از ٦ ساعت انواع آلودگی قارچی را با حساسیت بالا در بافت‌های مختلف از جمله بافت آلوده ناخن تشخیص داد.

پس می‌توان ادعا کرد که روش و مطالعه حاضر جزء جدیدترین تحقیق‌هایی است که در جهان با استفاده از روش PCR روی نمونهٔ مستقیم بالینی ناخن، نقش درماتوفیت‌ها از جمله ترایکوفیتون روبروم را در عفونت اونیکومایکوزیس قارچی مورد تشخیص و ارزیابی قرار می‌دهد. حال با توجه به نکات ممتاز بالا اگر مراحل انجام آزمون به صورت کیت تشخیصی در آمده و در دسترس آزمایشگاه‌های مولکولی قارچی قرار گیرد، می‌تواند منجر به تحولی بزرگی در تشخیص و درمان عفونت‌های قارچی از جمله اونیکومایکوزیس شود و صرفه‌جویی قابل توجهی در وقت و هزینه صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله دکتری تخصصی رشته قارچ‌شناسی پزشکی بوده که با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسیده است.

منابع

[1] Kanbe T. Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. Mycopathologia 2008; 166(5-6): 307-17.

[2] Brillowska-Dabrowska A, Saunte DM, Arendrup MC. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. J Clin Microbiol 2007; 45(4): 1200-4.

[3] Gräser Y, Kuijpers AFA, Presber W, Hoog GS. Molecular Taxonomy of the *Trichophyton rubrum* Complex. J Clin Microbiol 2000; 38(9): 3329-36.

[4] Vollmer T, Störmer M, Kleesiek K, Dreier J. Evaluation of Novel Broad-Range Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Human Pathogenic Fungi in Various Clinical Specimens. J Clin Microbiol 2008; 46(6): 1919-26.

[5] Arca E, Saracli MA, Akar A, Yildiran ST, Kurumlu Z, Gur AR. Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis. Eur J Dermatol 2004; 14(1): 52-5.

[6] Machouart-Dubach M, Lacroix C, Feuilhade de Chauvin M, Gall IL, Giudicelli C, Lorenzo F, Derouin F. Rapid Discrimination among Dermatophytes, *Scytalidium* spp., and Other Fungi with a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Ribotyping Method. J Clin Microbiol 2001; 39(2): 685-90.

[7] Monod M, Bontems O, Zaugg C, Léchenne B, Fratti M, Panizzon R. Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. J Med Microbiol 2006; 55(Pt 9): 1211-6.

[8] Yang X, Sugita T, Takashima M, Hiruma M, Li R, Sudo H, Ogawa H, Ikeda S. Differentiation of Trichophyton rubrum clinical isolates from Japanese and Chinese patients by randomly amplified polymorphic DNA and DNA sequence analysis of the non-transcribed spacer region of the rRNA gene. J Dermatol Sci 2009; 54(1): 38-42.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2023-10-02]

[9] Gutzmer R, Mommert S, Küttler U, Werfel T, Kapp A. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. J Med Microbiol 2004; 53(Pt 12): 1207-14.

[10] Gupta AK, Zaman M, Singh J. Fast and sensitive detection of Trichophyton rubrum DNA from the nail samples of patients with onychomycosis by a double-round polymerase chain reaction-based assay. Br J Dermatol 2007; 157(4): 698-703.

[11] Kumar M, Shukla PK. Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. J Clin Microbiol 2005; 43(2): 662-8.

[12] Elgin SCR, Weston-Hafer E, Cruz W. Investigating a Eukaryotic Genome: Cloning and Sequencing a Fragment of Yeast DNA. 2006; Available at http://www.nslc.wustl.edu/elgin/genomics/bio3055/yeastcloninglab06.pdf.

[13] Beifuss B, Bezold G, Gottlöber P, Borelli C, Wagener J, Schaller M, Korting HC. Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR-ELISA technique open to protocol transfer. Mycoses 2011; 54(2): 137-45.

[14] Garg J, Tilak R, Singh S, Gulati AK, Garg A, Prakash P, Nat G. Evaluation of Pan-Dermatophyte Nested PCR in Diagnosis of Onychomycosis. J Clin Microbiol 2007; 45(10): 3443-5.

[15] Kardjeva V, Summerbell R, Kantardjiev T, Devliotou-Panagiotidou D, Sotiriou E, Gräser Y. Forty-Eight-Hour Diagnosis of Onychomycosis with Subtyping of *Trichophyton rubrum* Strains. J Clin Microbiol 2006; 44(4): 1419-27.

[16] Garg J, Tilak R, Garg A, Prakash P, Gulati AK, Nath G. Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. BMC Res Notes 2009; 2: 60.

[17] Kong F, Tong Z, Chen X, Sorrell T, Wang B, Wu Q, Ellis D, Chen S. Rapid identification and differentiation of Trichophyton species, based on sequence polymorphisms of the ribosomal internal transcribed spacer regions, by rolling-circle amplification. J Clin Microbiol 2008; 46(4): 1192-9.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2023-10-02]