کاربرد واکنش زنجیره پلیمراز در تشخیص کریپتوکوکوزیس مغزی

سید جمال هاشمی[۱]
ساسان رضایی،[۱] سهام انصاری،[۱*]
روشنک داعی،[۱] فاطمه نوربخش[۲]

۱- گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، ورامین، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، بخش قارچ شناسی پزشکی
تلفن: ۰۹۳۷۵۸۱۳۰۹۸
email: samansari1988@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۱/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به حساسیت کم آزمایش مستقیم با مرکب چین و کشت برای تشخیص منتژیت کریپتوکوکی به‌کار بردن تکنیک‌های حساس لازم می‌باشد. در این مطالعه از روش Polymerase Chain Reaction (PCR) برای تشخیص *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* به‌طور مستقیم از نمونه مایع مغزی نخاعی (Cerebrospinal fluid) استفاده گردید که بتوان توان تشخیصی را در مواردی که روش‌های قارچ‌شناسی ناتوان است افزایش داد. ***روش بررسی:*** مطالعه از نوع توصیفی- مقطعی بوده و تعداد ۲۵ نمونه CSF بیماران دارای علایم مغزی مشکوک به منتژیت کریپتوکوکی که در طول سال ۱۳۸۸به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران فرستاده شده بودند تحت آزمایش مستقیم با مرکب چین، کشت و PCR قرار گرفتند. مرحله دوم کار تهیه دو رقت ۱۰۲ و ۱۰۶ از *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در یک میلی‌لیتر CSF و مقایسه سه روش آزمایش مستقیم، کشت و PCR بوده است. ***یافته‌ها:*** در بررسی میکروسکوپی نمونه‌ها با مرکب چین تنها یک مورد مثبت شد و هم‌چنین آزمایش مستقیم هر دو رقت ۱۰۲ و ۱۰۶ مثبت گردید. نمونه‌ای که آزمایش مستقیم آن مثبت شده بود، کشت آن نیز رشد نمود. کشت هر دو رقت ۱۰۲ و ۱۰۶ نیز مثبت گردید. در بررسی با PCR تنها همان نمونه‌ای که آزمایش مستقیم و کشت آن مثبت شده بود از لحاظ مولکولی مثبت شد. PCR هر دو رقت ۱۰۲ و ۱۰۶ نیز مثبت گردید. ***نتیجه‌گیری:*** روش راه‌اندازی شده (PCR) توانست نمونه‌های کنترل و نمونه مثبت را به خوبی شناسایی نماید.

کلمات کلیدی: کریپتوکوکوزیس مغزی، آزمایش مستقیم، کشت، مایع مغزی نخاعی، Polymerase chain reaction.

مقدمه

کریپتوکوکوزیس (Cryptococcosis) عفونتی است که به‌وسیله قارچ مخمری کپسول‌دار *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* ایجاد می‌شود. بخش اعظم عفونت‌های انسانی در افراد دارای نقص سیستم ایمنی روی می‌دهد.[۱] این عفونت در بیماران ایدزی بسیار شایع می‌باشد و ایدز مهم‌ترین زمینه برای ابتلا به این بیماری می‌باشد.[۲و۳] عفونت به دنبال استنشاق ارگانیسم به وجود می‌آید ولی منتژیت شایع‌ترین تظاهر بالینی آن است که تشخیص داده می‌شود.[۴و۵] برای تشخیص آزمایشگاهی این عفونت به‌طور معمول از آزمایش مستقیم با مرکب چین (India Ink) و کشت استفاده می‌شود. آزمایش مستقیم مایع مغزی نخاعی با استفاده از مرکب چین تنها حدود ۳۰ تا ۸۰ درصد مبتلایان به منتژیت کریپتوکوکی را تشخیص می‌دهد. بنابراین این روش برای تشخیص از حساسیت مطلوبی برخوردار نیست .برای تشخیص قطعی منتژیت کریپتوکوکی لازم است از CSF بیماران کشت به‌عمل آید. از معایب کشت حساسیت کم آن در بیماران غیر ایدزی و زمان طولانی مورد نیاز برای رشد قارچ می‌باشد که این زمان در درمان منتژیت که نیاز به درمان سریع و اختصاصی دارد با اهمیت است.[۱] برای تشخیص منتژیت کریپتوکوکی به‌کار بردن تکنیک‌های آزمایشگاهی حساس‌تر و اختصاصی‌تر به منظور درمان سریع‌تر لازم می‌باشد. در سال‌های اخیر از روش‌های مولکولی (PCR) جهت تعیین بیماری کریپتوکوکوزیس از نمونه‌های بالینی مثل Broncho Alveolar CSF, Lavage (BAL) خون و ادرار استفاده شده است که حساسیت بالایی را از خود نشان داده‌اند.[۶و۷] با توجه به حساسیت بالای PCR، ارزیابی این روش و راه‌اندازی آن در آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-19]

بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران که آزمایشگاه مرجع قارچ‌شناسی در کشور می‌باشد و از تمام بیمارستان‌های تهران نمونه‌های بیماران با علایم مغزی مشکوک به این آزمایشگاه ارسال می‌گردد از اهداف کاربردی این طرح بوده است.

روش بررسی

مطالعه از نوع توصیفی- مقطعی بوده و تعداد ۲۵ نمونه CSF بیماران دارای علایم مغزی مشکوک به منتژیت کریپتوکوکی که در طول سال ۱۳۸۸به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران فرستاده شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند. ۵-۲ میلی‌لیتر مایع مغزی نخاعی (CSF) در بیمارستان گرفته شده و جهت بررسی به آزمایشگاه قارچ‌شناسی ارسال گردید. ما برای انجام کار خود نمونه‌های CSF را در۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و سپس مایع رویی را جدا کرده و حدود نیم میلی‌لیتر ته لوله را برای آزمایش مستقیم با مرکب چین، کشت و استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. مرحله دوم کار تهیه دو رقت ۱۰۲ و ۱۰۶ از *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در یک میلی‌لیتر CSF و مقایسه سه روش آزمایش مستقیم، کشت و PCR بود.

۱- آزمایش مستقیم: برای مشاهده کریپتوکوکوس نئوفورمنس در مایع CSF به روش مستقیم از مرکب چین (India Ink) استفاده می‌شد. برای این کار یک قطره از مایع مغزی نخاعی سانتریفیوژ شده را روی لام ریخته و سپس یک قطره مرکب چین به آن افزوده و به وسیله لام پوشیده می‌شد. به منظور مشاهده *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در زیر میکروسکوپ لام تهیه شده با بزرگ‌نمایی ۱۰ و ۴۰ مورد مطالعه قرار می‌گرفت. در صورت وجود *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در نمونه مورد مطالعه به‌دلیل داشتن کپسول پلی‌ساکاریدی در اطراف ارگانیسم به صورت شفاف و روشن در زمینه تاریک مشخص می‌باشد.

۲- کشت: برای این کار از محیط سابورو دکستروز آگار بدون سیکلوهگزامید استفاده شد. به‌وسیله میکروپیپت در کنار شعله ۱۰۰µl از CSF سانتریفیوژ شده را روی محیط ریخته و به‌وسیله لوپ استریل بر روی تمامی محیط پخش می‌گردید و کمی هم سطح محیط را خراش داده تا در صورت وجود مخمر در نمونه بتواند در محیط نفوذ کرده و رشد کند. تاریخ و شماره بر روی هر یک از پلیت‌ها یادداشت و در حرارت $30^{\circ}C$ نگهداری می‌شدند. محیط‌های کشت داده شده پس از چند روز (۲۰-۵ روز) بررسی می‌گردیدند.

۳-. روش مولکولی (PCR)

استخراج DNA از کشت: برای Setup کردن کار از قارچ‌های *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* به عنوان شاهد مثبت و از کاندیدا آلبیکنس به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. به وسیله روش گلاسبید (گوی شیشه‌ای) DNA را از کشت دو روزه دو مخمر فوق با پروتکل زیر استخراج شد:

در یک تیوب ۳۰۰µl از DNA lysis buffer، ۳۰۰ لاندا PCI (فنل کلروفرم ایزو آمیل الکل)، ۳۰۰ لاندا گوی شیشه‌ای ریخته یک لوپ پر از مخمر را درون این تیوب حل شد. تیوب را به مدت پنج دقیقه به شدت با دست تکان داده و به‌مدت پنج دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سوپرناتانت (فاز رویی) را جدا کرده و به تیوب جدید انتقال داده شد. ۳۰۰ لاندا CI (کلروفرم ایزو آمیل الکل) افزوده و ورتکس شد، مجددا به‌مدت پنج دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و فاز رویی جدا کرده و انتقال آن به تیوب جدید، اضافه کردن هم حجم سوپرناتانت، پروپرانولول و یا ۲/۵ برابر آن الکل مطلق، سپس یک دهم حجم سوپرناتانت، استات سدیم ۳ مولار اضافه کرده و آن را ورتکس کرده و در $-20^{\circ}C$ به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. به‌مدت ۱۲ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و سپس مایع رویی دور ریخته و ۳۰۰ لاندا الکل ۷۰٪ افزوده (ورتکس نشود) و پنج دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و مجددا مایع رویی را دور ریخته شد. ۵۰ تا ۱۰۰ لاندا آب مقطر یونیزه دو بار تقطیر اضافه نموده و در $-25^{\circ}C$ نگهداری شد.

استخراج DNA از CSF و CSF رقت‌سازی شده: استخراج DNA از نمونه‌های مایع مغزی نخاعی (CSF) بیماران به‌وسیله کیت استخراج DNA شرکت کیاژن به نام QIA amp DNA Investigator شماره ۵۱۳۰۴ ساخت کشور آمریکا با پروتکل زیر صورت گرفت:

۲۰ میکرولیتر از پروتئاز کیاژن یا پروتیناز K به ته یک میکروفیوژ ۱/۵ میلی لیتری اضافه شد.

۲۰۰µl از نمونه CSF را به این تیوب اضافه کرده و سپس ۲۰۰µl بافر AL را به نمونه افزوده و به‌مدت ۱۵ ثانیه ورتکس نموده و تیوب در $56^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. ۲۰۰µl اتانول (۱۰۰-۹۶) به نمونه اضافه کرده و خوب مخلوط گردید (۱۵ ثانیه ورتکس). محتویات تیوب را به ستون QIA amp اضافه نموده و بعد در ۸۰۰۰

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-19]

دور به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس این ستون را برداشته و به یک تیوب جدید انتقال داده و مواد فیلتر شده دور ریخته شد. با دقت در ستون را باز کرده و ۵۰۰µl بافر AW1 بدون این‌که لبه‌های ستون مرطوب شود به آن اضافه کرده و در ۸۰۰۰ دور به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ نموده و مجددا ستون به یک تیوب جدید وارد گردید. در این مرحله ۵۰۰µl بافر AW2 اضافه کرده و در ۱۴۰۰۰ دور به مدت سه دقیقه سانتریفیوژ شد. دوباره ستون را به یک تیوب جدید انتقال داده و به مدت یک دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ نموده و این به حذف بافر کمک می‌کند. این ستون را به یک تیوب دیگر انتقال داده و ۲۰۰µl بافر AE اضافه کرده و به‌مدت پنج دقیقه در درجه حرارت اتاق انکوبه شد و بعد در ۸۰۰۰ دور به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ گردید.

پرایمرها: جهت آزمایش نمونه‌های فوق با روش مولکولی (PCR) از یک جفت پرایمر ژن اختصاصی URA5 *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* استفاده گردید و پرایمرفور وارد (5 ATG TCC TCC CAA GCC 3) و پرایمر برگشت (5 TTA AGA CCT CTG AAC ACC G 3´CTC) انتخاب شد و این پرایمرها قطعاتی به اندازه ۷۸۰ جفت باز (bp) را فقط در گونه *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* تکثیر می‌کنند.

پروتکل PCR: با پروتکل زیر PCR انجام شد:

۱- ترکیب مواد و مقادیر آن: بافر ۱۰µl=۱۰x. dNTP (دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات)= ۱µl. (کلراید منیزیوم) Mgcl2= ۱µl. پرایمر فوروارد= ۲/۵µl. پرایمر برگشت= ۲/۵µl. DNA= ۸µl. آنزیم Taq polymerase= ۱µl. آب مقطر= ۲۴µl. حجم کل واکنش= ۵۰µl.

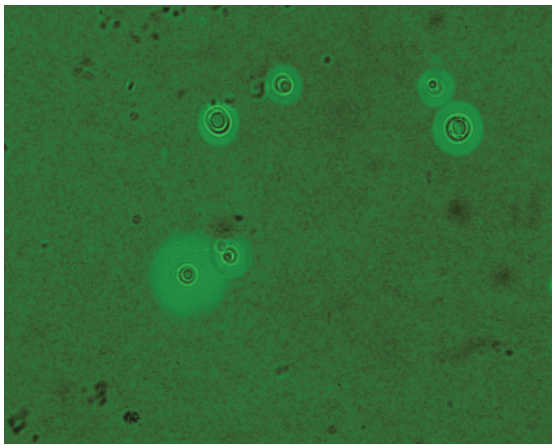
۲- برنامه دمایی: یک سیکل $95^{\circ}C$، پنج دقیقه Initial (denaturation)، ۳۵ سیکل با $94^{\circ}C$، ۳۰ ثانیه جهت جداسازی دو رشته الگو (Denaturation)، $58^{\circ}C$، ۱:۳۰ ثانیه جهت اتصال پرایمرها (Annealing)، $72^{\circ}C$ به مدت دو دقیقه (Extension) و یک سیکل $72^{\circ}C$ به مدت هشت دقیقه (Final extension).

الکتروفورز محصولات PCR: برای الکتروفورز محصولات PCR از ژل آگارز یک درصد استفاده شد. ۱۰µl از محصولات PCR را با ۴µl، DNA Loading Buffer بر روی تکه‌های پارافیلم مخلوط کرده و به آرامی توسط میکروپیپت درون چاهک‌های ژل ریخته و در حفره اول ۸µl مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (bp) اضافه شد. سپس تانک الکتروفورز را به منبع برق با ولتاژ ۸۰ متصل کرده و بعد از حدود یک ساعت ژل را درآورده و در دستگاه ترانس لومیناتور با طول موج ۳۶۵ نانومتر تصویر باندها را روی مانیتور رویت و پس از تنظیمات لازم از آن عکس گرفته و ذخیره گردید.

یافته‌ها

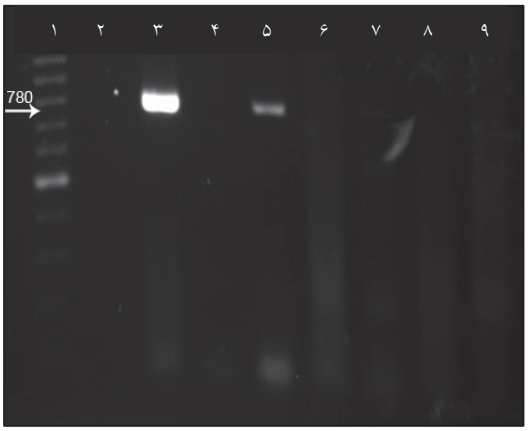
- نتایج آزمایش مستقیم با مرکب چین: در بررسی میکروسکوپی نمونه‌ها با مرکب چین از ۲۵ نمونه CSF تنها یک نمونه که متعلق به یک زن ۲۰ ساله با بیماری زمینه‌ای پمفیگوس بود که مدت زیادی نیز ترکیبات کورتیکواستروییدی مصرف کرده بود مثبت شد و بقیه نمونه‌ها منفی شدند هم‌چنین آزمایش مستقیم هر دو رقت ۱۰۲ و ۱۰۶ مثبت گردید. ۲- نتایج کشت: از کشت نمونه‌های CSF، تنها همان نمونه‌ای که آزمایش مستقیم آن مثبت شده بود کشت آن نیز رشد نمود و بقیه نمونه‌ها منفی شدند. کشت هر دو رقت ۱۰۲ و ۱۰۶ نیز مثبت گردید.

۳- نتایج روش مولکولی: در مرحله Setup کردن کار با استفاده از DNA کشت، الکتروفورز محصول PCR باند مورد نظر را در bp۷۸۰ تشکیل داد. سپس محصولات PCR حاصل از DNA استخراج شده از CSF الکتروفورز گردید که تنها همان نمونه‌ای که آزمایش مستقیم و کشت آن مثبت شده بود باند مورد نظر را تشکیل داد و از لحاظ مولکولی مثبت شد و بقیه نمونه‌ها منفی گردیدند. PCR هر دو رقت ۱۰۲ و ۱۰۶ نیز مثبت گردید.



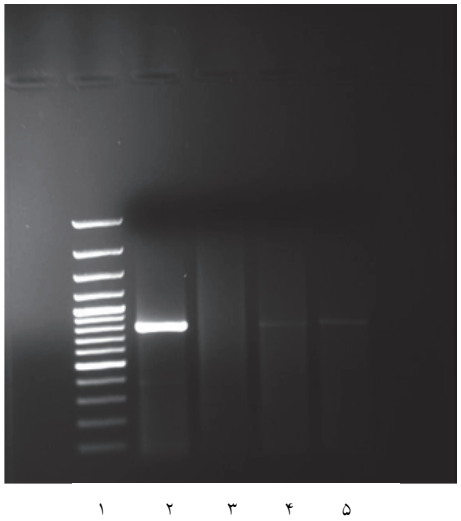
شکل- ۱: تصویر میکروسکوپی شکل مخمر *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* کپسول‌دار با مرکب چین در نمونه بالینی (CSF).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-19]



شکل- ۲: نتایج PCR حاصل از نمونه‌های CSF پس از الکتروفورز

۱- مارکر ۱۰۰ جفت بازی (bp) ۲- شاهد منفی (نمونه حاصل از کشت *کاندیدا آلبیکنس* که هیچ باندی مشاهده نگردید. ۳- شاهد مثبت (نمونه حاصل از کشت *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* که باند مورد نظر را در ۷۸۰ bp تشکیل داد)، ۴ و ۶ و ۷ و ۸ و ۹- نمونه‌های CSF منفی که هیچ باندی را تشکیل ندادند ۵- نمونه CSF مثبت که آزمایش مستقیم و کشت آن نیز مثبت شده بود و باند مورد نظر در ۷۸۰ bp تشکیل داد.



شکل- ۳: نتایج PCR حاصل از رقت‌های ۱۰۲ و ۱۰۶ پس از الکتروفورز

۱- مارکر، ۲- شاهد مثبت، ۳- شاهد منفی، ۴- رقت ۱۰۲، ۵- رقت ۱۰۶. هر دو رقت ۱۰۲ و ۱۰۶ باند مورد نظر را در ۷۸۰ bp تشکیل دادند.

بحث

به‌دلیل حساسیت کم آزمایش مستقیم با مرکب چین و زمان طولانی مورد نیاز برای رشد قارچ در محیط کشت برای تشخیص منتژیت کریپتوکوکی به کاربردن تکنیک‌های حساس‌تر و اختصاصی‌تر به منظور درمان سریع لازم می‌باشد.[۷] در مطالعه حاضر روش PCR جهت تشخیص *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* به‌طور مستقیم از نمونه‌های CSF با هدف توسعه یک روش جدید تشخیصی مورد ارزیابی قرارگرفت. در مواردی امکان دارد که سلول کامل قارچ وارد مایع مغزی نخاعی نشود و فقط DNA و دیگر ترکیبات آن در CSF وجود داشته باشد که در این موارد PCR می‌تواند در تشخیص کمک کننده باشد. در این بررسی از روش PCR ساده به دلیل سریع‌تر بودن و کم هزینه‌تر بودن جهت تشخیص بیماری استفاده گردید.

استخراج DNA از نمونه‌های CSF به‌وسیله کیت استخراج DNA شرکت کیاژن به نام QIA amp DNA Investigator ساخت کشور آمریکا انجام شد که پروتکل ساده و سریعی داشت و نسبت به روش‌های دستی استخراج DNA مراحل انجام آن کمتر و سریع‌تر بود. مطالعات قبلی از روش‌های مختلفی مثل گوانیدین تیوسیانات جهت استخراج DNA از CSF استفاده شده است.[۶و۸و۹] پرایمرها را از ناحیه ژنی URA5 *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* انتخاب گردید که اختصاصی بودن آن را به وسیله DNA *کاندیدا آلبیکنس* ارزیابی نمودیم و حساسیت آن را با DNA کشت *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* بررسی کرده که باند مورد نظر را در ۷۸۰ bp تشکیل داد. در مطالعات قبلی از ناحیه‌های ژنی ITS و S ۵/۶ هم جهت تکثیر DNA استفاده شده بود.[۱۰و۱۱] Rappelli اولین بار در سال ۱۹۹۸ از روش Nested- PCR جهت تشخیص منتژیت کریپتوکوکی به‌طور مستقیم از مایع CSF استفاده نمود که همان مواردی را که با آزمایش مستقیم و کشت تشخیص داده بود با PCR نیز مثبت شد[۱۰] که از این نظر نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نتایج Rappelli مطابقت داشت. در مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۴ توسط Paschoal صورت گرفت ۵۶ نمونه CSF که قبلا بیماری کریپتوکوکوزیس آن‌ها ثابت شده بود را با سه روش کشت، آزمایش مستقیم با مرکب چین و PCR مورد ارزیابی قرار داد که PCR با حساسیت ۹۲/۹٪ به عنوان حساس‌ترین روش و بعد از آن آزمایش مستقیم حساسیت ۸۵/۷٪ و کشت حساسیت ۷۶/۸٪ را نشان داد.[۱۱] Saha در سال ۲۰۰۹ روش‌های تشخیصی PCR، Latex Agglutination Test (LAT)، Enzyme Immunoassay (EIA)، آزمایش مستقیم با مرکب چین و کشت را جهت تشخیص کریپتوکوکوزیس از نمونه‌های بالینی CSF، ادرار و سرم با هم مقایسه نمود که در روش PCR جهت استخراج DNA از کیت ساخت شرکت کیاژن، USA استفاده کردند و ناحیه ۱۸s را جهت تکثیر DNA به‌کار بردند. PCR، LAT، EIA

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-19]

حساسیت یکسان و بالاتری نسبت به آزمایش مستقیم با مرکب چین و کشت نشان دادند.[۱۲] از آن‌جایی که تاکنون در ایران مطالعه‌ای در این زمینه انجام نپذیرفته بود، لذا ما بر آن شدیم تا برای اولین بار از روش PCR جهت تشخیص منتژیت کریپتوکوکی به طور مستقیم از مایع CSF بیماران مشکوک استفاده نموده و آن‌را ارزیابی نماییم. در این مطالعه ۲۵ نمونه CSF مشکوک توسط سه روش آزمایش مستقیم با مرکب چین، کشت و PCR بررسی گردید. تنها در یک مورد که آزمایش مستقیم و کشت مثبت شد PCR نیز مثبت گردید و مواردی که کشت و آزمایش مستقیم آن‌ها منفی بود PCR نیز منفی گردید. هم‌چنین با دو رقت ۱۰۲ و ۱۰۶ مخمر *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در یک میلی‌لیتر CSF را با سه روش فوق بررسی نمودیم که کشت، آزمایش مستقیم و PCR هر دو رقت مثبت گردید. در این مطالعه مواردی را که آزمایش مستقیم و کشت مثبت نشان داد PCR نیز آن‌ها را تشخیص داد. روش راه‌اندازی شده (PCR) توانست نمونه‌های کنترل و نمونه مثبت را به خوبی شناسایی نماید. بنابراین می‌توان از روش PCR نیز در تشخیص کریپتوکوکوس مغزی استفاده کرد.

References

1. Chayakulkeeree M, Perfect JR. Diagnosis Of Cryptococcosis. In: Maertens JA, Marr KA, editors. Diagnosis of Fungal Infections. New York: Informa Health Care; 2007. p. 239-66.
2. Hajjeh RA, Conn LA, Stephens DS, Baughman W, Hamill R, Graviss E, et al. Cryptococcosis: population-based multistate active surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus-infected persons. Cryptococcal Active Surveillance Group. *J Infect Dis* 1999;179(2):449-54.
3. Lortholary O, Poizat G, Zeller V, Neuville S, Boibieux A, Alvarez M, et al. Long-term outcome of AIDS-associated cryptococcosis in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS* 2006;20(17):2183-91.
4. D'Souza CA, Hagen F, Boekhout T, Cox GM, Heitman J. Investigation of the basis of virulence in serotype A strains of Cryptococcus neoformans from apparently immunocompetent individuals. *Curr Genet* 2004;46(2):92-102.
5. Fernandes Ode F, Costa TR, Costa MR, Soares AJ, Pereira AJ, Silva Mdo R. Cryptococcus neoformans isolated from patients with AIDS. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000;33(1):75-8.
6. Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol* 1995;33(11):2913-9.
7. Imwidthaya P, Poungvarin N. Cryptococcosis in AIDS. *Postgrad Med J* 2000;76(892):85-8.
8. van Burik JA, Schreckhise RW, White TC, Bowden RA, Myerson D. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Med Mycol* 1998;36(5):299-303.
9. Bialek R, Weiss M, Bekure-Nemariam K, Najvar LK, Alberdi MB, Graybill JR, et al. Detection of Cryptococcus neoformans DNA in tissue samples by nested and real-time PCR assays. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(2):461-9.
10. Rappelli P, Are R, Casu G, Fiori PL, Cappuccinelli P, Aceti A. Development of a nested PCR for detection of Cryptococcus neoformans in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1998;36(11):3438-40.
11. Paschoal RC, Hirata MH, Hirata RC, Melhem Mde S, Dias AL, Paula CR. Neurocryptococcosis: diagnosis by PCR method. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2004;46(4):203-7.
12. Saha DC, Xess I, Biswas A, Bhowmik DM, Padma MV. Detection of Cryptococcus by conventional, serological and molecular methods. *J Med Microbiol* 2009;58(Pt 8):1098-105.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-19]

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 4, July 2011: 231-236

Application of Polymerase Chain Reaction (PCR) In the diagnosis of neurocryptoccosis

Seyyed Jamal Hashemi PhD.[1]
Sasan Rezaei PhD.[1]
Saham Ansari MSc.[1*]
Roshanak Daie PhD.[1]
Fatemeh Noorbakhsh PhD.[2]

1-Department of Medical Mycology, School Of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Microbiology, Islamic Azad University, Varamin, Varamin, Iran.

*Corresponding author: Department of Medical Mycology, School of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Poursina St., Keshavarz Blvd., Tehran, Iran.
Tel: +98-937-5813098
email: samansari1988@gmail.com

Received: February 08, 2011 Accepted: April 18, 2011

Abstract

***Background*:** In the last two decades, cryptococcosis has been gaining a distinct public health importance due to the growing number of AIDS cases. Considering the low sensitivity of direct examination with India ink and culture, use of sensitive techniques is crucial in the diagnosis of cryptococcal meningitis. Polymerase Chain Reaction (PCR) can be used to directly detect *Cryptococcus neoformans* in CSF samples to increase the diagnostic power in cases where conventional methods are unable to detect the organism.

***Methods*:** In this cross-sectional study, CSF samples were obtained from 25 patients suspected of having neurocryptococcosis. The patients were referred to the Medical Mycology Laboratory of the School of Public Health affiliated to Tehran University of Medical Sciences from March 2009 to February 2010. Three different methods, direct India ink examination, culture and PCR were used to evaluate the CSF samples. Two 102 and 106 of *Cryptococcus neoformans* dilutions in 1ml of CSF were prepared and examined by the three methods. In PCR method, two primer pairs were selected to amplify the *Cryptococcus neoformans* URA5 gene. The sequences of primers were for A, B, C and D serotypes.

***Results*:** Only in one case PCR, as well as direct examination and culture were positive. All the other samples were negative in PCR, direct examination or culture. Both CSF dilutions were positive in the three tests in the mentioned patient and the positive control.

Conclusion: PCR method can efficiently identify both control and positive samples of *Cryptococcus neoformans*.

Keywords: Cerebrospinal fluid, cryptococcosis, culture, direct, examination, polymerase chain reaction.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-19]