شناسایی گونه‌های بیماری‌زای جنس کاندیدا: روش PCR-FSP

سید حسین میرهندی[1*]، حسن آدین[2]
محمد رضا شیدفر[1]، پریوش کردبچه[1]
سید جمال هاشمی[1]، مریم موذنی[3]
لیلا حسین‌پور[1]، علی رضایی مته‌کلایی[3]

۱- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده بهداشت
۲- کارشناس ارشد قارچ‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان
۳- دانشجوی PhD قارچ‌شناسی
دانشگاه علوم پزشکی تهران

* نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی
تلفن: ۸۸۹۵۱۵۸۳
email: mirhendi@tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۰۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۰۵/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: شناسایی کاندیداها از نظر تشخیصی، درمانی، اپیدمیولوژیک و بیولوژیک واجد اهمیت است. در این مطالعه رویکرد جدیدی از متدهای مبتنی بر DNA برای شناسایی کاندیداهای مهم پاتوژن استفاده شد و فقط با انجام واکنش PCR و بدون نیاز به روش‌های بعد از PCR گونه‌های مهم کاندیدا به‌سهولت از یکدیگر متمایز شدند. ***روش بررسی:*** این مطالعه، یک بررسی توصیفی- تجربی و نمونه‌های مورد آزمون شامل استرین‌های استاندارد و ۶۰ ایزوله از بیماران بود. DNAی همه نمونه‌ها به‌روش glass-beads و فنل- کلروفرم استخراج و برای PCR از پرایمرهای ITS1، ITS2، ITS3 و ITS4 که دو قطعه ITS1 و ITS2 را تکثیر می‌نمایند استفاده شد. گونهٔ مخمر با توجه به الگوی الکتروفورتیک حاصله و با در نظر گرفتن اندازه‌های به‌دست آمده از آنالیز سکانس‌ها تشخیص داده می‌شد. ***یافته‌ها:*** با بررسی کامپیوتری ده‌ها توالی مربوط به مخمرهای مختلف، مشخص شد که قطعات ITS1 و ITS2 در هر گونه مخمر اندازه مخصوصی دارند، لذا با تکثیر هر کدام از این قطعات و آنگاه اندازه‌گیری وزن آنها با الکتروفورز می‌توان هویت مخمرها را مشخص کرد. به‌روش فوق گونه‌های بیماری‌زای کاندیداها شامل آلبیکنس، تروپیکالیس، گلابراتا، پاراپسیلوزیس، کروزه‌ای، گیلیرموندی، کفیر، لوزیتانیا و روگوزا به روشنی قابل تشخیص گردیدند ولی افتراق کاندیدا آلبیکنس از کاندیدا دابلینینسیس با این روش میسر نبود. همه ایزوله‌های بالینی با این روش تشخیص داده شدند. ***نتیجه‌گیری:*** در این مطالعه کارایی روشی ساده چه برای شناسایی استرین‌های مخمری استاندارد و چه برای شناسایی ایزوله‌های بالینی، نشان داده شد و به‌نظر می‌رسد که قابل توسعه برای تعیین هویت سایر مخمرها نیز می‌باشد.

کلمات کلیدی: PCR-FSP، کاندیدا، شناسایی، ITS.

مقدمه

کاندیداها (*Candida*) قارچ‌های مخمری مشهوری هستند که موضوع تحقیقات بسیاری در پزشکی، صنعت و بیولوژی می‌باشند. جنس کاندیدا مشتمل بر بیش از ۱۰۰ گونه است و حدود ۱۵-۱۰ گونه باعث بیماری‌های مختلف در انسان می‌شوند. شناسایی کاندیداها از دیدگاه‌های متعددی حائز اهمیت است: ۱- گونه‌های متعددی باعث کاندیدیاز پوست، کاندیدیاز دهان، واژینیت کاندیدیایی، اونیکومایکوز (عفونت ناخن) کاندیدایی و سایر عفونت‌های سطحی می‌شوند. گاهی که به علل مختلف، سیستم ایمنی میزبان دچار ضعف یا نقص می‌شود، کاندیداها عفونت‌های سیستمیک خطرناک و کشنده‌ای در خون یا احشاء داخلی به‌وجود می‌آورند. با پیشرفت دانش پزشکی و بهبود روش‌های درمانی بیماری‌های صعب‌العلاج و افزایش طول عمر بیماران دچار ضعف ایمنی یا بیماری‌های ناتوان‌کننده، متاسفانه شیوع عفونت‌های فرصت‌طلب از جمله عفونت‌های قارچی کاندیدایی رو به افزایش نهاده است.[1و2] لازمه مبارزه، کنترل یا پیشگیری از این عفونت‌ها در وحله اول مستلزم شناسایی عوامل مولد بیماری است. ۲- با کشف داروهای ضد قارچی و کنترل عوامل اصلی عفونت‌های کاندیدایی مثل *C. albicans* گونه‌های دیگری همچون *C. glabrata*، *C. krusei* و *C. lusitania* که به‌طور ذاتی یا اکتسابی نسبت به داروهای ضدقارچی مقاوم بوده یا شده‌اند، بروز و شیوع‌این بیماری‌ها اهمیت بیشتری یافته‌اند.[3] این گونه‌ها که تحت عنوان پاتوژن‌های نوپدید مطرح‌اند، عامل عفونت‌های غیر قابل کنترل در بیمارستان‌ها می‌باشند. شناخت بهتر این عوامل پاتوژن برای درک روابط انگل- میزبان و برای درک پاتوژنز و سپس کنترل عفونت‌های بیمارستانی

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]

ضروری است. ۳- اغلب عفونت‌های سیستمیک کاندیدایی ناشی از مهاجم شدن میکرو فلورای طبیعی بدن هستند که در شرایط مستعد تکثیر یافته و عفونت ایجاد کرده‌اند اما در بسیاری از موارد نیز معلوم شده است که منابع خارجی نظیر کادر پزشکی، محلول‌های دارویی و اشیایی مثل کاتترهای داخل وریدی آلوده به قارچ بوده و منشأ بیماری در برخی از طغیان‌های (Outbreaks) بیمارستانی می‌باشند.[۴] شناسایی مخمرها برای درک روابط اپیدمیولوژیک عفونت- محیط و شناخت مخازن، منابع و منشأ بیماری ضروری است. روش‌های متعددی از گذشته تا حال برای تعیین هویت مخمرها و در رأس آنها کاندیداها به‌کار رفته است. این روش‌ها را کلا می‌توان به دو گروه فنوتیپیک و ژنوتیپیک تقسیم نمود. از جمله روش‌های گروه اول عبارت است از: مرفولوژی مخمرها در محیط عصاره مالت آگار، روش‌های جذب و تخمیر قندها (اجرای این روش‌ها بسیار متنوع بوده از متدهای قدیمی کشت در لوله‌های حاوی محیط مایع (روش ویکرهام) تا استفاده از دیسک‌های‌قندی (اگزانوگرافی)، استفاده از کیت‌های تجارتی مثل API و بالاخره روش‌های جدید اتومات مثل سیستم Vitek در تغییر است)، روش‌های سرولوژی (مثل سیستم تجارتی Candida Check)، روش کشت روی محیط‌های رنگ‌زا (مثل CHROMagar Candida) و روش‌های دیگر.[۵و۶] روش‌های‌ژنوتیپی نیز متنوع بوده، از جمله می‌توان به استفاده از پرایمرهای اختصاصی در PCR و multiplex- PCR،[۱] استفاده از پروب‌های اختصاصی هرگونه،[۷] PCR-RFLP،[۸-۱۰] تعیین توالی نواحی ژنی‌خاص[۱۲و۱۱] و real-time PCR[۱۳] اشاره نمود. تمام روش‌های فوق‌الذکر مفید بوده هر کدام مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند. برخی قادر به شناسایی تعداد معدودی از گونه‌های کاندیدا می‌باشند (مثل CHROMagar Candida و Candida Check)، برخی علیرغم قابلیت شناسایی دامنه وسیعی از مخمرها وقت‌گیر و کاربر هستند (مثل روش‌های جذب و تخمیر قندها)، برخی با وجود کارایی‌و اعتبار کافی‌و قابلیت شناسایی‌وسیع مخمرها، بسیار گرانقیمت و غیر قابل کاربرد روزمره در آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی هستند (مثل سیستم Vitek و sequencing)، و بعضی نیز با حساسیت‌های بالا، ویژگی کمتری دارند مثل استفاده از پروب‌های طراحی شده برای شناسایی هر کدام از گونه‌ها. بنابراین هنوز هم روشی معتبر و ساده برای شناسایی مخمرها و از جمله کاندیداها مورد نیاز آزمایشگاه‌های مرجع می‌باشد. ما طی مقالات قبلی یک پروفایل PCR-RFLP را برای شناسایی شایع‌ترین گونه‌های کاندیدایی معرفی کرده‌ایم.[۸] در مطالعه حاضر رویکرد دیگری از متدهای مبتنی بر DNA برای شناسایی کاندیداهای‌مهم پاتوژن استفاده شد. اعتبار این روش براساس توالی کمپلکس ژنی با ارزشی همچون DNAی ریبوزومال[۱۴] استوار بوده و سادگی آن به‌دلیل انجام تنها واکنش PCR و بدون نیاز به روش‌های بعد از PCR مثل RFLP، پروب، تعیین توالی و غیره می‌باشد. گونه‌های مهم و شایع شامل: *C. albicans*، *C. tropicalis*، *C. guilliermondii*، *C. krusei*، *C. kefyr*، *C. glabrata*، *C. parapsilosis*، *C. lusitania* و *C. rugosa* با این روش شناسایی و از یکدیگر متمایز می‌شوند.

روش بررسی

این مطالعه، یک بررسی توصیفی- تجربی بوده، از اردیبهشت تا آذر ۱۳۸۶ در دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی مرکز اصفهان، به‌منظور توصیف مبانی نظری یک روش ابداعی آزمایشگاهی و راه‌اندازی و استفاده‌عملی از آن برای شناسایی مخمرهای کاندیدایی مهم پزشکی انجام شد. نمونه‌های‌مورد آزمون در این مطالعه شامل سه گروه بود: الف) نمونه‌های سکانس‌های ناحیه ITS1 و ITS2 به‌دست آمده از بانک ژن مربوط به استرین‌ها و گونه‌های مختلف مخمری. داده‌های این سکانس‌ها با استفاده از نرم‌افزار DNASIS مورد آنالیز قرار گرفت. ب) استرین‌های کاندیدایی استاندارد یعنی مخمرهای واجد هویت مشخص که گونه آنها توسط مراجع بین‌المللی تائید شده و دارای شماره رفرانس می‌باشند. جدول ۱ لیست این مخمرها و شماره مربوطه را نشان می‌دهد. ج) ایزوله‌های مخمری جدا شده از بیمارانی که مبتلا به عفونت‌های سطحی (پوست، ناخن و مخاط دهان یا واژن) یا عمقی (نمونه‌های ادرار، خلط، بیوپسی) بوده‌اند. کلیه مخمرها پس از کشت روی محیط گلوکز (۴٪)، پپتون (۱٪) و آگار (۱/۵٪) جداسازی و در تیوب‌های حاوی گلیسرول ۲۰٪، در فریزر ۲۰- $^{\circ}C$ نگهداری گردید. انتخاب پرایمرها و DNAی هدف: براساس مطالعات قبلی راجع به‌رشته‌های مختلف DNA در میکروارگانیسم‌های مختلف، ژن مسئول کدکردن RNAی ریبوزومی (rRNA) که به آن rDNA گویند، قطعه مناسبی برای اهداف شناسایی و طبقه‌بندی قارچ‌ها و از جمله مخمرها می‌باشد.[۱۴] پس از آنالیز قطعات مختلف rDNA معلوم شد که قطعات Internal Transcribed Spacer (ITS1) و (ITS2) دارای تنوع کافی برای افتراق گونه‌های مخمری است. لذا از

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]

پرایمرهای ITS1، ITS2، ITS3 و ITS4 که دو قطعه فوق را تکثیر می‌نماید استفاده شد. این پرایمرها در بین قارچ‌ها همگانی بوده و برای تکثیر قطعه هدف برای همه کاندیداها کاربرد دارد. توالی پرایمرها به قرار زیر بود:

ITS1: (5'-TCCGTAGGTGAAC CTGCGG-3')

ITS2: (5'-GC TGCGTTCTTCATCGATGC-3')

ITS3: (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3')

ITS4: (5-TCCTCCGCTTAT TGATATGC-3')

جهت استخراج DNA مطابق روشی که قبلا توصیف شده،[15] یک لوپ باکتریولوژی (حدود ۱۰ میلی‌متر مکعب) از کلنی تازه برداشت و به تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری اپندرف منتقل و ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز شامل ۱۰۰ میلی‌مولار تریس (pH 8)، ۱۰ میلی‌مولار EDTA (pH 8)، ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl، ۱٪ SDS، ۲٪ Triton X-100، ۳۰۰ میکرولیتر مخلوط فنل- کلروفرم (۱:۱) و حدود ۲۰۰ میکرولیتر پرل‌های شیشه‌ای (glass-beads) به قطر یک میلی‌متر اضافه گردید و مدت سه دقیقه با دست به‌شدت تکان داده شد. آنگاه پنج دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفوژ و مایع رویی به تیوب جدید منتقل و ۴۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد و پس از سانتریفوژ مجدد و انتقال مایع رویی به تیوب جدید مقدار یک حجم ایزوپروپانول سرد و ۱٪ حجم استات سدیم سه مولار (pH: 5.2) اضافه کرده و پس از ده دقیقه نگهداری در ۲۰- °C، مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شده و پس از شستشوی رسوب حاصله با الکل ۷۰ درجه نهایتاً در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید و تا موقع استفاده در فریزر ۲۰- °C نگهداری شد. PCR: برای انجام موفق PCR، پس از انجام آزمایش‌های متعدد سرانجام مواد زیر با غلظت‌های ذکر شده برای انجام یک واکنش ۲۵ میکرولیتری استفاده شد: بافر PCR ۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای رفت (ITS3 و ITS1) و برگشت (ITS4 و ITS2) ۲۵ پیکومول، چهار نوع نوکلئوتید (dNTPs) ۲۰۰ میکرومولار، آنزیم Taq polymerase ۱/۲۵ واحد، DNAی الگو یک میکرولیتر (حدود ۱۰ نانوگرم)، آب مقطر دیونیزه حجم لازم تا رسیدن به حجم کلی ۲۵ میکرولیتر. برنامه اجراء شده برای PCR عبارت بود از: حرارت ۹۵°C به‌مدت شش دقیقه یک سیکل برای دناتوراسیون اولیه، حرارت‌های ۹۴°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶°C درجه به‌مدت یک دقیقه و ۷۲°C درجه به‌مدت ۴۵ ثانیه، جمعاً ۳۰ سیکل برای تکثیر DNA و تکثیر نهایی در حرارت ۷۲°C به‌مدت پنج دقیقه یک سیکل. به‌منظور تفکیک قطعات DNA، آگاهی از اندازه محصول PCR و نیز قابل رنگ‌آمیزی و قابل رویت کردن آنها، هر کدام از محصولات PCR روی ژل آگارز الکتروفورز گردید. بافر TBE (۰/۰۹ مولار تریس، ۰/۰۹ مولار اسید بوریک و دو میلی‌مولار EDTA، pH: 8.3) جهت ساخت ژل و پر کردن تانک به‌کار رفت. نمونه‌ها به‌کمک جریان الکتریسیتهٔ مستقیم با ولتاژ ۱۰-۵ ولت به‌ازای هر سانتیمتر طول ژل الکتروفورز گردیده و با رنگ اتیدیوم بروماید به غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رنگ‌آمیزی و با طول موج ۳۱۲ نانومتر و با استفاده از ترانس الومیناتور مشاهده و به‌طریق دیجیتال عکس‌برداری شد. در این تحقیق در مورد هر کدام از نمونه‌های استاندارد یا ایزوله‌های بالینی، ابتدا هر نمونه در دو تیوب جداگانه (یکی حاوی جفت پرایمر ITS1 و ITS2 و دیگری حاوی جفت پرایمر ITS3 و ITS4) PCR شده و آنگاه از هر تیوب ۱µl برداشت شده و با یکدیگر مخلوط و حاصل اختلاط روی ژل آگارز ۲٪ الکترو فورز می‌گردید. گونهٔ مخمر با توجه به الگوی الکترو فورتیک حاصله و با در نظر گرفتن اندازه‌های به‌دست‌آمده از آنالیزسکانس‌ها معلوم می‌شد.

یافته‌ها

آنالیز سکانس‌های مربوط به مخمرها: پس از بررسی ده‌ها سکانس مربوط به قطعات ITS1 و ITS2 در مخمرهای مختلف و نیز بررسی مقالاتی که به بررسی توالی‌های قطعات پرداخته‌اند، مشخص شد که جز در موارد معدود، در اغلب مخمرها اندازه قطعات ITS1 و ITS2 یا هر دو در مخمرها منحصر به فرد بوده و به‌عبارت دیگر هر مخمر اندازه مخصوص به‌خود را دارد و مشخص شد که ناحیه ITS1 در برخی مخمرها نسبتاً مشابه یا دارای اندازه نزدیک به‌هم و در برخی دیگر دارای اندازه متفاوت هستند. این موضوع در مورد ناحیه ITS2 نیز مصداق دارد. جدول ۲ اندازه‌های مربوط به نواحی ITS1 و ITS2 در کاندیداهای بیماری‌زای مختلف را نشان می‌دهد. نتیجه اینکه از هر کدام از قطعات ITS1 و ITS2 به‌تنهایی می‌توان در شناسایی فقط برخی کاندیداها سود جست. بدین معنی که با تقویت هر کدام از این قطعات به‌روش PCR و آنگاه اندازه‌گیری وزن آنها با الکتروفورز می‌توان بعضی کاندیداها را شناخت ولی بعضی دیگر همچنان مجهول باقی می‌مانند. لذا تصمیم بر این شد که هر کدام از قطعات، جداگانه و در واکنش متفاوت، PCR شده ولی هنگام الکتروفورز، هر دو قطعه

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]

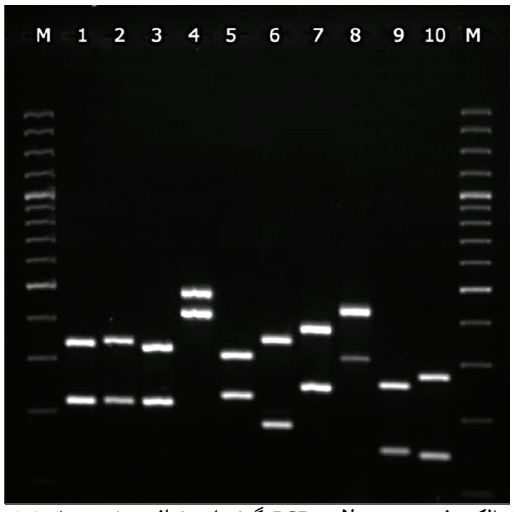
جدول- ۱: استرین‌های قارچی به‌کار رفته در مطالعه حاضر

ردیف	قارچ	منبع تهیهٔ قارچ	شمارهٔ استرین
۱	*C. albicans*	ATCC	۱۰۲۶۱
۲	*C. albicans*	ATCC	۱۰۲۳۱
۳	*C. albicans*	ATCC	۹۰۰۲۹
۴	*C. albicans*	ATCC	۲۴۴۳۲
۵	*C. albicans*	ATCC	۹۰۰۲۸
۶	*C. kefyr*	TIMM	۰۰۳۰۰
۷	*C. glabrata*	ATCC	۹۰۰۳۰
۸	*C. glabrata*	CBS	۱۳۸
۹	*C. tropicalis*	ATCC	۰۷۵۰
۱۰	*C. tropicalis*	TIMM	۰۳۱۳
۱۱	*C. krusei*	ATCC	۶۲۵۸
۱۲	*C. krusei*	TIMM	۳۴۰۴
۱۳	*C. parapsilosis*	ATCC	۲۲۰۱۹
۱۴	*C. parapsilosis*	ATCC	۹۰۰۱۸
۱۵	*C. guilliermondii*	ATCC	۹۰۵۸
۱۶	*C. guilliermondii*	TIMM	۳۴۰۰
۱۷	*C. rugosa*	TIMM	۱۸۱۴
۱۸	*C. lusitania*	TIMM	۱۴۳۹
۱۹	*C. dubliniensis*	CBS	۲۷۴۷

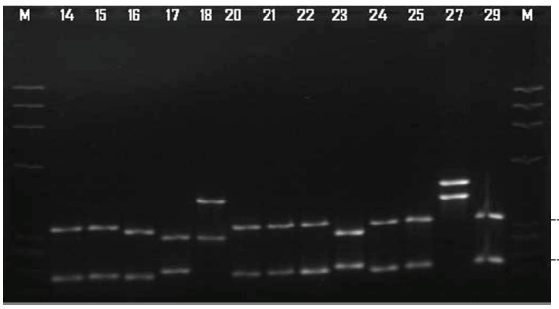
جدول- ۲: اندازه قطعات نواحی ITS1 و ITS2 در مهمترین گونه‌های کاندیدا

گونه کاندیدا	اندازه ناحیه ITS1	اندازه ناحیه ITS2
Candida rugosa	۱۴۱	۲۷۰
Candida lusitaniae	۱۴۵	۲۵۱
Candida krusei	۱۸۱	۳۴۴
Candida dubliniensis	۲۱۴	۳۴۳
Candida albicans	۲۱۴	۳۴۰
Candida tropicalis	۲۱۴	۳۲۷
Candida parapsilosis	۲۲۵	۳۰۹
Candida guilliermondii	۲۴۳	۳۷۴
Candida kefyr	۳۰۵	۴۲۷
Candida glabrata	۴۷۵	۴۱۳

متعلق به یک مخمر خاص با یکدیگر مخلوط و با هم الکتروفورز شود تا تفاوت یا تشابه قطعات مربوط به مخمرها یک‌جا مورد بررسی قرار گیرد. بدین ترتیب هم در وقت و مواد مصرفی آزمایشگاهی صرفه‌جویی می‌شود و هم اینکه نه تنها هر کدام از قطعات به‌خودی خود و به‌تنهایی قابل بررسی است، بلکه مجموعه دو نوار DNA به‌عنوان یک الـگو برای آنالیز طولی قطعه و در نهایت شناسایی مخمر مورد بررسی قرار می‌گیـرد. ایـن الگو برای هر کدام از گونه‌ها، خاص



شکل- ۱: الکتروفورز محصولات PCR گونه‌های‌مختلف مخمری (استاندارد) با استفاده از پرایمرهای ITS1-ITS2 و ITS3-ITS4. محصولات دو PCR مخلوط و الکتروفورز شدند. شماره‌های۱ تا ۱۱ عبارتند از: کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا دابلینینسیس، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا کروزه‌ای، کاندیدا گیلیرموندی، کاندیدا کفیر، کاندیدا لوزیتانیا، کاندیدا روگوزا. ردیف M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (شرکت Fermantase)



شکل- ۲: ژل الکتروفورز PCR نمونه‌های بیماران M: مارکر وزن مولکولی ۹

همان گونه است. به‌عبارت دیگر مجموع دو باند با اندازه خاص، الگویی به‌دست می‌دهد که با کمی دقت و با مراجعه به اندازه قطعات (جدول ۲)، می‌توان گونه مربوطه را باز شناخت. آنچه ذکر شد مبنای تئوریک کار بود که البته بایستی در عمل مورد آزمون قرار می‌گرفت. پس از اجرای عملی PCR، با استفاده از روش مذکور در فوق، نتایج حاصله عملاً با آن چه که از اطلاعات کامپیوتری انتظار می‌رفت، مطابقت داشت. شکل ۱ الکتروفورز مخلوط محصولات PCR نواحی ITS1 و ITS2 متعلق به مخمرهای مختلف استاندارد روی ژل آگارز را نشان می‌دهد. چنانچه ملاحظه می‌شود، اندازه محصولات PCR (اندازه باندها) دقیقاً منطبق با داده‌های جدول ۲ است. شکل ۲ نیز مخلوط

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]

محصولات PCR قطعات ITS1 و ITS2 در تعدادی از مخمرهای جداشده از نمونه‌های جداشده از بیماران نشان می‌دهد. با مقایسه اندازه نواحی ITS1 و ITS2 مندرج در جدول ۲ با باندهای موجود در تصویر، در می‌یابیم که ستون‌های شماره ۱۴، ۱۵، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۴، ۲۵، و ۲۹ نشان‌دهنده *C. albicans*، ستون‌های شماره ۱۷ و ۲۳ حاکی از *C. parapsilosis*، ستون ۱۶ مربوط به *C. tropicalis* و ستون ۱۸ متعلق به *C. kefyr* می‌باشد. در ستون ۲۷ با مقایسه اندازه باندهای دو ناحیه موجود در تصویر الکتروفورز با اعداد نواحی ITS1 و ITS2 جدول ملاحظه می‌شود که اندازه باندها با اعداد ۴۱۳ و ۴۷۵ تطبیق دارد که این اندازه‌ها متعلق به *C. glabrata* می‌باشند.

بحث

در مطالعه حاضر رویکرد جدیدی از روش‌های مولکولی PCR-based برای افتراق گونه‌های بیماری‌زای کاندیدا مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه تفاوت سایز مولکول‌های ITS1 و ITS2 در گونه‌های مختلف مبنای افتراق کاندیداها بوده، الگوی الکتروفورتیک مخلوط دو مولکول روی ژل آگارز منجر به تشخیص گونه شده است. یک قطعه DNA هدف، به‌عنوان ابزاری برای تعیین هویت میکروارگانیسم‌ها در سطح گونه، وقتی می‌تواند مفید و حتی ایده‌آل باشد که اولاً توالی آن قطعه (یا قطعات) در اعضای وابسته به یک گونه خاص (مثلاً ایزوله‌های *C. albicans*) که از بیماران مختلف، محیط‌های متفاوت یا نواحی جغرافیایی دور از یکدیگر جدا شده‌اند، حداقل تغییر توالی و به‌عبارت دیگر حداقل تنوع را دارا باشد تا بتوان به آن قطعه اعتماد کرد و ثانیا برای تشخیص و تفکیک سهل‌تر گونه‌ها لازم است که اختلاف توالی‌های مزبور در اعضای متعلق به گونه‌های مختلف (مثلاً *C. albicans* و *C. parapsilosis*) هرچه بیشتر بوده و حداکثر variation را دارا باشد. به بیان دیگر هرچه تنوع درون گونه‌ای در توالی یک قطعه خاص کمتر باشد و از سوی دیگر هرچه تنوع بین گونه‌ای در آن قطعه بیشتر باشد، آن قطعه برای اهداف شناسایی، طبقه‌بندی، فیلوژنیک و نیز اهداف ردیابی اختصاصی در تشخیص بیماری‌های عفونی، معتبرتر است. در بین جمیع ژن‌ها یا رشته‌های DNA که تا به‌حال در میکروارگانیسم‌های مختلف پاتوژن بررسی و شناخته شده‌اند، احتمالاً نواحی ITS1 و ITS2 موجود در DNA ریبوزومی (کمپلکس ژنی مسئول رمزدهی RNAی ریبوزومی) واجد شرایط فوق‌الذکر بوده و لذا قطعات هدف مناسبی برای طراحی روش‌های مختلف ژنوتیپی در تشخیص میکروارگانیسم‌ها است.[۱۴] در مطالعه حاضر پس از بررسی بیوانفورماتیک داده‌های نوکلئوتیدی قطعات فوق‌الذکر در گونه‌های بیماری‌زای مختلف متعلق به جنس کاندیدا معلوم شد که نواحی ITS1 و ITS2 نه تنها از لحاظ ترتیب نوکلئوتیدها در گونه‌های مختلف با یکدیگر تفاوت دارند بلکه از حیث تعداد نوکلوتید نیز به‌طور قابل ملاحظه‌ای متفاوتند و همین تفاوت در اندازه (طول) مولکول‌ها مدنظر تحقیق جاری بوده است. اختلاف‌طول مولکول‌های ITS1 و ITS2 در گونه‌های‌مختلف کاندیداها به‌طور اخص و در مخمرها به‌طور اعم، از چندین سال قبل در پژوهش‌های مختلف مد نظر بوده و از آن برای تفکیک گونه‌ها استفاده شده است.[۱۷و۱۶و۱۴و۱] یافته‌های آنالیز توالی‌ها در مطالعه حاضر با نتایج مطالعات قبلی به‌ویژه گزارش Chen مطابقت دارد.[۱۲] در آن مطالعات همواره از روش‌های پرهزینه، وقت‌گیر و پیچیده‌ای نظیر تعیین توالی[۱۶و۱۲] یا الکتروفورز موئینه[۱۷و۱۶] برای درک این تفاوت طول و از آنجا تعیین گونه استفاده شده است. برخی از این مطالعات ناحیه ITS1[۱۴] و برخی نیز ناحیه ITS2[۱۲و۱۱] را برای این منظور مد نظر داشته‌اند. ایده کلی و بنیادی مطالعه حاضر نیز ناظر بر همین تفاوت‌هاست، منتها اولاً به‌جای استفاده از آن روش‌ها که در کشور ما مقرون به‌صرفه و گاهی مقدور نیست، از روش متداول و ساده الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شده است که روشی بسیار ساده و ارزان‌قیمت و تقریباً سریع است و ثانیاً به‌جای استفاده از فقط یکی از نواحی ITS1 یا ITS2، هر دو این قطعات به‌طور همزمان مورد سنجش و اندازه‌گیری قرار گرفته‌اند. Fujita و همکاران از مجموع ناحیه ITS1-ITS2 و ناحیه ITS2 به‌تنهایی در یک سیستم Mutiplex- PCR استفاده کردند که با توجه به مشکلات تکنیکی موجود در آن، در مطالعه ما استفاده نشد.[۱۸] در سیستم معرفی‌شده در بررسی حاضر هر نمونه مخمر در دو تیوب مجزا، یکی حاوی پرایمرهای تقویت‌کننده قطعه ITS1 (پرایمرهای ITS1 و ITS2) و دیگری حاوی پرایمرهای تقویت‌کننده قطعه ITS2 (پرایمرهای ITS3 و ITS4)، PCR شده و محصولات PCR هر دو تیوب با یکدیگر مخلوط و الکترفورز می‌شوند. پس از رنگ‌آمیزی ژل و رؤیت باندها، به‌ازای هر نمونه دو نوار DNA یکی متعلق به مولکول ITS1 و دیگری متعلق به مولکول ITS2 مشاهده می‌شود. پس از اندازه‌گیری وزن این دو باند(از روی

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]

مارکر مولکولی و چه بهتر در حضور گونه‌های استاندارد) و با توجه به جدول سایزهای مولکول‌ها در مخمرهای مختلف (جدول ۲) گونه کاندیدای مجهول به‌راحتی تشخیص داده می‌شود. در این روش تنها با دو واکنش PCR با پرایمرهای غیراختصاصی که می‌تواند به‌طور همزمان استفاده شود و پس از الکتروفورز روی ژل آگارز معمولی و بدون استفاده از هیچگونه عملیات مولکولی post-PCR نظیر RFLP، Sequencing، Capillary Electrophoresis و غیره تعیین هویت ایزوله‌ها در حد گونه امکان‌پذیر می‌باشد. همان‌طور که در جدول ۲ و شکل ۱ دیده می‌شود با کاربرد پرایمرهای یونیورسال مذکور در قسمت روش‌ها، تفکیک دو گونه *C. albicans* و *C. dubliniensis* از یکدیگر مقدور نمی‌باشد. این دو مخمر در مولکول‌های مذکور در تعداد نوکلئوتید انگشت‌شماری اختلاف دارند که در ژل آگارز قابل تفکیک نیستند. لذا بایستی پرایمرهای دیگری در DNA هدف دیگری برای تفکیک این دو در نظر گرفته شود تا بتوان از روی اندازه محصولات PCR، و یا از روی الگوی RFLP[۱۹] آنها را تفکیک نمود. توسعه روش ارائه شده در این مطالعه در راستای تعیین هویت تعداد بیشتری از گونه‌های مخمری، هدف بعدی ماست. در این مطالعه اندازه قطعات حاصل از PCR با دو جفت پرایمر عمومی (که برای همه گونه‌های مخمری و حتی همه قارچ‌ها واجد آمپلیکون است)، ملاک افتراق گونه‌های مهم پاتوژنیک کاندیدا قرار گرفته است. این روش ساده که برای اولین بار در جهان و ایران انجام می‌گیرد تحت عنوان PCR-Fragment Size Polymorphism (PCR-FSP) نامگذاری شده و کارایی آن، چه برای شناسایی استرین‌های مخمری استاندارد و چه برای شناسایی ایزوله‌های بالینی، نشان داده شد. این متد به‌عنوان یک روش جدید، مطمئن، سریع و ارزان در تشخیص گونه‌های پاتوژن کاندیدا در آزمایشگاه‌های مرجع توصیه می‌شود.

References

1. Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeaupuis JP, et al. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med Mycol* 1998; 36 Suppl 1: 249-57.
2. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New Engl J Med* 2003; 348: 1546-54.
3. Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaissie EJ, et al. Importance of Candida species other than Candida albicans as opportunistic pathogens. *Med Mycol* 1998; 36 Suppl 1: 156-65.
4. Merz WG, Hay RJ. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 10th ed. London: Hodder Arnold Publishers; 2005.
5. Del Castillo L, Bikandi J, Nieto A, Quindós G, Sentandreu R, Pontón J. Comparison of morphotypic and genotypic methods for strain delineation in Candida. *Mycoses* 1997; 40: 445-50.
6. Verweij PE, Breuker IM, Rijs AJ, Meis JF. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. *J Clin Pathol* 1999; 52: 271-3.
7. Fujita SI, Lasker BA, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR- amplified DNA from Candida species in blood. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 962-7.
8. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important Candida species. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2006; 47: 225-9.
9. Pinto PM, Resende MA, Koga-Ito CY, Ferreira JA, Tendler M. rDNA-RFLP identification of Candida species in immunocompromised and seriously diseased patients. *Can J Microbiol* 2004; 50: 514-20.
10. Williams DW, Wilson MJ, Lewis MA, Potts AJ. Identification of Candida species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *Clin Microbiol* 1995; 33: 2476-9.
11. Lott TJ, Burns BM, Zancope-Oliveira R, Elie CM, Reiss E. Sequence analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) from yeast species within the genus Candida. *Curr Microbiol* 1998; 36: 63-9.
12. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, et al. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2302-10.
13. Maaroufi Y, De Bruyne JM, Duchateau V, Georgala A, Crokaert F. Early detection and identification of commonly encountered Candida species from simulated blood cultures by using a real-time PCR-based assay. *J Mol Diagn* 2004; 6: 108-14.
14. Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol* 2002; 40: 87-109.
15. Yamada Y, Makimura K, Merhendi H, Ueda K, Nishiyama Y, Yamaguchi H, et al. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. *Jpn J Infect Dis* 2002; 55: 122-5.
16. De Baere T, Van Keerberghen A, Van Hauwe P, De Beenhouwer H, Boel A, Verschraegen G, et al. An interlaboratory comparison of ITS2-PCR for the identification of yeasts, using the ABI Prism 310 and CEQ8000 capillary electrophoresis systems. *BMC Microbiol* 2005; 5: 14.
17. Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1846-51.
18. Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3617-22.
19. Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Yamada T, Sugita T, Yamaguchi H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 Malassezia species. *J Microbiol Methods* 2005; 61: 281-4.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]

Tehran University Medical Journal; Vol. 66, No. 9, Dec 2008: 639-645

Identification of Pathogenic *Candida* Species: PCR-Fragment Size Polymorphism (PCR-FSP) Method

Mirhendi S.H.[1*]
Adin H.[2]
Shidfar M.R.[1]
Kordbacheh P.[1]
Hashemi S.J.[1]
Moazeni M.[3]
Hosseinpur L.[1]
Rezaie Matehkolaie A.[3]

1- Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Public Health
2- MsPH in Medical Mycology, Golestan University of Medical Sciences and Health Services
3- PhD student, Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Public Health

Tehran University of Medical Sciences

Received: April 16, 2008 Accepted: August 04, 2008

Abstract

Background: The clinical importance of yeast infections has increased in recent decades. There are 10-15 pathogenic *Candida* species. The current morphological and physiological methods for identification of *Candida* species are generally not easy to interpret and may be expensive or time-consuming. In the present study, we introduce and use a new approach for the identification and differentiation of medically important yeast species of *Candida*. In this method, size polymorphism of the internal transcribed spacer regions, ITS1 and ITS2, of the ribosomal DNA in various *Candida* species is used as the basis of species recognition.

Methods: The genomic DNA of 31 standard strains and 60 clinical isolates was extracted and PCR-amplified using two primer pairs (ITS1-ITS2 and ITS3-ITS4) separately. Both PCR products were mixed and analyzed after standard agarose gel electrophoresis. The species of the tested yeasts were identified by the electrophoretic patterns of the mixed PCR products of each sample, comparing the data obtained from the sequence analyses of ITS1 and ITS2 molecules.

Results: By this method, with the exception of *C. albicans* and *C. dubliniensis*, we were able to clearly differentiate nearly all common pathogenic *Candida* species, including *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. gulliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. lusinaniae* and *C. rugosa.* All standard and clinical strains were identified correctly, without expensive methods such as sequencing and capillary electrophoresis.

Conclusion: It seems that the PCR-FSP method introduced in this study is the easiest molecular approach for the identification of a wide range of pathogenic *Candida* species and is applicable for diagnostic and epidemiological purposes in reference laboratories.

Keywords: PCR-FSP, *candida*, identification, ITS.

* Corresponding author: Dept. of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health and Institute of Public Health Researches, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, 14155-6446, IRAN
Tel: +98-21-88951583
email: mirhendi@tums.ac.ir

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]