تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی – ملکولی
دوره پنجم، شماره هفدهم، زمستان ۱۳۹۳

Research Article
مقاله تحقیقی

تشخیص مولکولی فوزاریوم سولانی در نمونه‌های مشکوک به کراتیت هرپسی

آتوسا فردوسی [۱*] ، محمد حسن شاه حسینی [۲و۳] ، منصور بیات [۴] ، سید جمال هاشمی [۵]، محمد قهری [۶]

۱. دانشجوی دکتری ، گروه تخصصی پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. مؤسس، مؤسسه ایرانیان ژن فناور (IGF) ، تهران، ایران
۴. دانشیار، گروه تخصصی پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۵. استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۶. استاد یار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم و مهندسی، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: فوزاریوم سولانی می‌تواند به صورت توام در کراتیت‌های هرپتیک حضور یابد. به‌علاوه نمای بالینی این دو کراتیت به‌علت تشابه، باعث خطای تشخیص تمایزی می‌شود. هدف این مطالعه تشخیص حضور فوزاریوم سولانی در نمونه‌های مشکوک به کراتیت هرپتیک به‌عنوان عامل اصلی یا عفونت همراه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ۱۰۰ نمونه DNA استخراج شده، از موارد بالینی مشکوک به کراتیت هرپتیک (شامل ۶۵ نمونه منفی از نظر عفونت HSV ، و ۳۵ نمونه مثبت) انتخاب گردید. به‌منظور تشخیص فوزاریوم سولانی در این نمونه‌ها، تست PCR با پرایمرهای اختصاصیffuso1 و rfuso2 و ژن هدف سیتوکروم بی میتوکندریایی با محصول ۳۳۰ bp بهینه گردید. ویژگی و حساسیت تست مورد ارزیابی قرار گرفت و محصول PCR به روش T/A Cloning کلون گردید.

یافته‌ها: در میان ۶۵ نمونه منفی از جهت HSV ، دو نمونه از نظر فوزاریوم سولانی مثبت بوده و محصول ۳۳۰ bp در آن‌ها تکثیرشد. حساسیت تست در حد یک کپی از DNA فوزاریوم سولانی و ویژگی آن ۱۰۰٪ تعیین گردید.

بحث: نتایج تست PCR نشان داد که برخی از کراتیت‌های مشکوک به هرپتیک، ناشی از فوزاریوم سولانی می‌باشد.

نتیجه‌گیری: تشخیص دقیق عامل اتیولوژیک در موارد تشابه نمای بالینی و نیز در عفونت‌های توام از طریق روش‌های مولکولی میسر است.

کلمات کلیدی : کراتیت ، *فوزاریوم سولانی*، پی سی آر، هرپس سیمپلکس ویروس

مقدمه

کراتیت یا عفونت چرکی قرنیه چشم ، در جهان یکی از اصلی ترین عواملی است که باعث تاری دید ، نابینایی و یا حتی از دست دادن کامل چشم می‌شود.خصوصاً زمانی که در تشخیص دقیق و درمان ارگانیسم مسبب ، تأخیر و خطا وجود داشته باشد، پیامدهای این عفونت بعضاً غیر قابل جبران خواهد بود. عامل عفونت کراتیتی بسته به شرایط اقلیمی و جغرافیایی و نیز فاکتورهای خطری که بیمار با آن مواجه بوده است، متفاوت می‌باشد. در طی سه دهه اخیر شیوع کراتیت‌های قارچی رشد فزاینده‌ای داشته است و دلیل اصلی آن عوامل زمینه‌ساز و ریسک فاکتورهایی است که در پرونده اکثر بیماران جلب توجه می‌نماید (۱،۲). ارگانیسم‌های قارچی عامل ۱/۲ درصد تا ۶۲ درصد از موارد عفونت‌های کراتیتی بوده اند

*نویسنده مسئول : آتوسا فردوسی
پست الکترونیکی:Atousaferdousi@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۶/۲۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۱/۳۰

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.8.2]

(3,4,5,6,7,8) وفوزاریوم شایع‌ترین جنس عامل مایکو کراتیت است که اکثراً در نواحی حاره و تحت حاره از چشم ایزوله می‌گردد (2,4,17,21). گونه‌های فوزاریوم به‌طور شایع در خاک، اکوسیستم‌های آبی نظیر دریاها و رودخانه‌ها ، گیاهان و بقایای مواد آلی در حال فساد یافت می‌شوند. برخی از این گونه‌ها پاتوژن گیاهی هستند و برخی دیگر به صورت ساپروفیت در محیط حضور دارند. شایع‌ترین گونه جنس فوزاریوم که هم‌چنین در میان گونه‌های این جنس از بیشترین ویرولانس نیز برخوردار می‌باشد، فوزاریوم سولانی است (21).)فوزاریوم سولانی علاوه بر این که می‌تواند به تنهایی عامل کراتیت باشد ، در برخی دیگر از موارد می‌تواند به‌صورت عفونت مخلوط و توأم همراه با باکتری‌های جنس استرپتوکوکوس و استافیلوکوکوس و یا ویروس هرپس سیمپلکس در ضایعات قرنیه چشم یافت شود (۴،۶،۸). نمای بالینی کراتیت‌های قارچی بسیار پلی مرفیک می‌باشد. در مراحل اولیه ضایعات به شکل زخم‌های دندریتیک در قرنیه ظاهر می‌شوند، که بسیار شبیه زخم‌های دندریتیک ناشی از هرپس سیمپلکس ویروس است. در نتیجه گاهی در تشخیص تمایزی این دو عامل خطا بروز می‌کند و داروهای آنتی ویرال و یا کورتیکواستروئیدی به بیمار تجویز می‌گردد. در این شرایط نه تنها بهبودی در وضعیت بیمار مشاهده نمی‌شود، بلکه حتی شرایط رو به وخامت می‌رود. در این موارد حتی اگر عامل ضایعه هرپس سیمپلکس ویروس باشد، با مصرف داروهای استروئیدی شرایط برای حضور عوامل قارچی نیز فراهم می‌گردد و در صورتی که تشخیص خطا بوده و عامل کراتیت، ارگانیسم قارچی باشد، با مصرف داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی ، زمینه برای رشد وسیع‌تر قارچ و گسترش ضایعه کاملاً مهیا می‌گردد (۴،۶،۸،۱۴). بنابراین شناسایی سریع و دقیق عامل عفونت ، و تشخیص قطعی این که آیا ارگانیسم‌های دیگری نیز به عنوان عوامل همراه در عفونت حضور دارند یا خیر، در روند درمان بسیار تعیین کننده خواهدبود. تشخیص بر مبنای روش‌های مرسوم نظیر کشت و مشاهده میکروسکوپی با موانع متعددی مواجه می‌باشد. زیرا میزان نمونه‌ای که می‌توان از تراشه‌های قرنیه به‌دست آورد بسیار ناچیز بوده، و بعضاً ممکن است حضور ارگانیسم در این حجم جزئی از نمونه قابل پیگیری نباشد و عامل اتیولوژیک در حیطه دید میکروسکوپی ظاهر نشود. از سوی دیگر چون زمانی در حدود ۳ الی ۷ روز برای رشد کلنی و پدیدار شدن ماکروکنیدی‌های دوکی شکل به عنوان کلید تشخیص جنس فوزاریوم، لازم است، در روند تشخیص بر اساس کشت و به دنبال آن در فرایند درمان تأخیر زیادی بروز می‌نماید (9,12,17,20). به‌علاوه چنانچه عفونت از نوع توام ویروسی و قارچی باشد، با روش‌هایی نظیر کشت و مشاهده میکروسکوپی نمی‌توان حضور همزمان این عوامل را شناسایی نمود. تکنیک‌های مولکولی نظیر PCR علاوه بر سرعت و دقت، این امکان را فراهم می‌آورند تا در زمانی کوتاه بتوان وجود چندین عامل اتیولوژیک را به‌صورت همراه در نمونه‌های مشکوک مورد بررسی قرار داد (4,5,7,9,19). هدف این مطالعه طراحی و بهینه کردن تکنیک PCR اختصاصی و بررسی کاربرد آن برای تشخیص حضور فوزاریوم سولانی در نمونه‌های کراتیتی مشکوک به هرپس سیمپلکس ویروس می‌باشد. حضور این ارگانیسم هم در نمونه‌هایی که با تست PCR از نظر هرپس سیمپلکس ویروس مثبت و هم در نمونه‌هایی که با این تست از نظر HSV منفی بوده‌اند، بررسی شده‌است، تا بتوان احتمال وجود عفونت همراه و نیز احتمال خطای تشخیصی در اثر تشابه نمای بالینی ضایعه را بطور همزمان مورد بررسی و ارزیابی قرارداد.

روش کار

تهیه نمونه: ۱۰۰ نمونه DNA استخراج شده از تراشه زخم‌های قرنیه مشکوک به کراتیت هرپسی متعلق به اورژانس بیمارستان تخصصی چشم پزشکی فارابی جمع آوری گردید. ۳۵مورد از این نمونه های DNA با روش PCR از نظر HSV مثبت، و ۶۵ نمونه دیگر با این روش از نظر ویروس HSVمنفی بوده اند. DNA در کلیه این نمونه‌ها با روش DNG استخراج گردیده است.

تهیه سوش استاندارد و استخراج DNA از سوش استاندارد:

ابتدا سوش لیوفلیزه و استاندارد فوزاریوم سولانی متعلق به کلکسیون قارچها و باکتری‌های صنعتی ایران PTCC NO.5284، در محیط سابرو دکستروز در یک دوره انکوباسیون هفت روزه، ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع برداشته شد و در دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله ، در ۱۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل به حالت سوسپانسیون درآمد. سپس DNA آن با روش DNG-plus استخراج گردید.

پرایمرهای ویژه PCR و ژن هدف:

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.8.2]

دو پرایمر اختصاصی گونه فوزاریوم به نام‌های ffuso1 و rfuso2 برای این منظور در نظر گرفته شد (۵). پرایمر ffuso1 با ترادف (5'-CTC TGT TAA TAA TGC AAC TC-3') و پرایمر rfuso2 با ترادف (5'-TGG TAC TAT AGC TGG AGG A-3') با محصول ۳۳۰ bp انتخاب گردید و ژن سیتوکروم بی میتوکندریایی (mt cyt b) به عنوان ژن هدف برگزیده شد

واکنش PCR:

هر واکنش شامل ۵ میکرولیتر الگو (DNA استخراجی از نمونه)، ۲/5 میکرولیتر از10x PCR Buffer، یک میکرولیتر از هر کدام ازدو پرایمر جلویی و عقبی 10mM ، ۰/۷۵ میکرولیتر از MgCl2(50mM) ، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP10mM ، ۰/٤ میکرولیتر Taq DNA polymerase 5u/µl، در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر می‌باشد. پروتکل دمایی به صورت دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد دو دقیقه ، دناتوراسیون سیکل‌ها یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، دمای چسبیدن یک دقیقه ۵۰ درجه سانتی‌گراد، دو دقیقه مرحله پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، پلیمریزاسیون نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و تعداد سیکل‌ها ۳۵ سیکل می‌باشد.

مشاهده محصول PCR :

محصول واکنش در ژل آگارز ۱/۵ ٪ حاوی سایبر گرین (سینا کلون:Cat.No. R7730C) در بافر TBE 0/5 x الکتروفورز گردید.

کلونینگ محصول PCR به عنوان کنترل مثبت:

بعد از خالص‌سازی محصول PCR با استفاده از کیت T/A cloning ترموساینتیفیک (cat:K1214) در وکتور pTZ57/R کلون گردید.

تعیین حساسیت واختصاصی بودن تست PCR:

به منظور بررسی حساسیت تست، رقت‌های مختلف DNA قارچ، از یک ملیون کپی DNA (غلظت$^{-1}$ ۱۰) تا یک کپی DNA (غلظت $^{-6}$ ۱۰) تهیه گردید. جهت بررسی ویژگی تست، DNAهای هرپسسیمپلکس ویروس، استرپتوکوکوس پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس و سایر قارچ‌های گونه فوزاریوم به جز سولانی ، شامل گونه‌های اکسیسپروم[1]، پوا[2]، ورتیسلوئیدس[3]، گرامینیاروم[4] و پرولیفراتوم[5] استفاده شد.

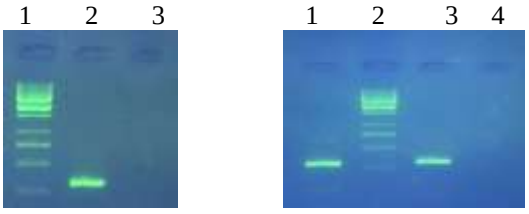
انجام تست بر روی DNA استخراج شده از نمونه تراشه‌های قرنیه مشکوک به هرپس سیمپلکس ویروس:

تست بهینه شده پس از بررسی ویژگی و حساسیت بر روی DNA استخراج شده ازهر ۱۰۰ نمونه حاصله از تراشه‌های قرنیه مشکوک به هرپس سیمپلکس ویروس انجام‌گرفت.

یافته ها:

محصول PCR بهینه‌سازی شده با DNA استخراج شده از سوش استاندارد ، بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد لود شد. اندازه قطعه به‌دست آمده با استفاده ازپرایمرهای ویژه۳۳۰ bp می‌باشد (شکل ۱A). محصول PCR در پلاسمید pTZ57/R کلون شد. پس از جداسازی تک کلنی‌های سفید ، DNA از آنها استخراج گردید و به وسیله روش PCR تأیید شد (شکل 1B). حساسیت تست PCR تا یک کپی از DNA فوزاریوم سولانی تعیین گردید. به‌طوری‌که تا آخرین تیتر از رقت تهیه شده (که رقت $^{-6}$ ۱۰ معادل یک کپی از DNA فوزاریوم سولانی بود)، هم‌چنان باند ۳۳۰bp محصول رویت شد (شکل ۲). تست PCR دارای ویژگی صد در صد می‌باشد به نحوی که فقط با DNA فوزاریوم سولانی واکنش داد (شکل ۳). تست بهینه شده با حساسیت و ویژگی ذکر شده، بر روی نمونه‌های DNA استخراج شده، از هر ۱۰۰ نمونه حاصله از تراشه‌های قرنیه مشکوک به هرپس سیمپلکس ویروس انجام گرفت.

شکل 1A شکل 1B



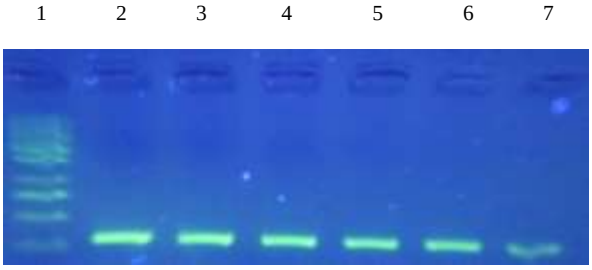
شکل ۱: الکترفورز محصول PCR

شکل۱A : محصول واکنش PCR :

1- oxysporum
2-poa
3 - verticillioides
4 - graminearum
5- proliferatum

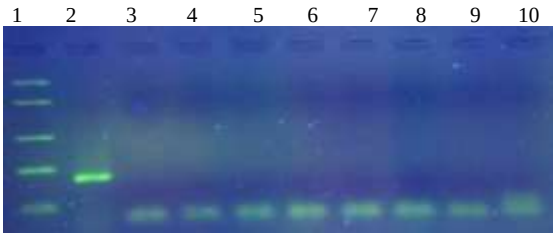
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.8.2]

لاین ۱ :سایز مارکر ترموساینتیفیک 1Kb DNA Ladder ، لاین ۲: قطعه تکثیر شده bp ۳۳۰ ،
لاین ۳ : کنترل منفی
شکل 1B : محصول کلون شده :
لاین ۱: قطعه تکثیر یافته از پلاسمید،
لاین ۲ : سایز مارکر ترموساینتیفیک 1Kb DNA Ladder ،
لاین۳: قطعه تکثیر شده bp ۳۳۰ ، لاین۴: کنترل منفی



شکل ۲ : نتایج بررسی حساسیت تست

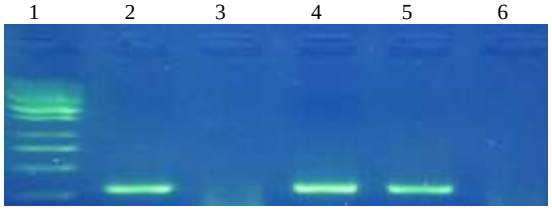
لاین ۱ : سایز مارکر فرمنتاس 1 Kb DNA Ladder
لاین۲ : رقت 10^{-1} معادل ۱۰۰۰۰۰ نسخه از DNA فوزاریوم سولانی
لاین۳ : رقت 10^{-2} معادل ۱۰۰۰۰ نسخه از DNA فوزاریوم سولانی
لاین۴: رقت 10^{-3} معادل ۱۰۰۰ نسخه از DNA فوزاریوم سولانی
لاین۵ : رقت 10^{-4} معادل ۱۰۰ نسخه از DNA فوزاریوم سولانی
لاین۶ : رقت 10^{-5} معادل ۱۰ نسخه از DNA فوزاریوم سولانی
لاین۷ : رقت 10^{-6} معادل ۱ نسخه از DNA فوزاریوم سولانی



شکل ۳ : نتایج بررسی ویژگی تست

لاین۱ : سایز مارکرترموساینتیفیک Middel Range DNA Ladder 1113
لاین ۲: DNA فوزاریوم سولانی
لاین ۳: DNA هرپس سیمپلکس ویروس
لاین ۴:DNA استافیلوکوکوس اورئوس
لاین ۵ : DNA استرپتوکوکوس پنومونیه
لاین ۶ : DNA فوزاریوم اکسی سپوروم
لاین ۷:DNA فوزاریوم پوا
لاین ۸ :DNA فوزاریوم پرولیفراتوم
لاین ۹:DNA فوزاریوم ورتیسلوئیدس
لاین ۱۰:DNA فوزاریوم گرامیناروم

در میان ۶۵ نمونه که با روشPCR از نظر ویروسHSV منفی بوده‌اند، ۲ مورد از نظر حضور فوزاریوم سولانی در نمونه مثبت بودند و باند bp ۳۳۰ محصول PCR در این نمونه‌ها رویت گردید (شکل ۴). ولی در۳۵ نمونه‌ای که با روش PCR از نظر HSV مثبت بودند، باند مربوط به محصول پی سی آر فوزاریوم سولانی رویت نگردید.



شکل ۴ : نتایج تست PCR بر روی نمونه‌هایی که از نظر HSV منفی بودند

لاین ۱ : سایز مارکر ترموساینتیفیک DNA Ladder 1kb
لاین ۲: DNA فوزاریوم سولانی
لاین۳ : نمونه منفی
لاین۴ و ۵:قطعه تکثیر شده bp ۳۳۰
لاین ۶ : کنترل منفی

بحث

تعداد کراتیت‌های قارچی با الگوهای اپیدمیولوژیک متفاوت، ظرف چند دهه اخیر رو به افزایش داشته است. منبع این عفونت اگزوژن بیشتر انتقال از طریق تروما و بعضاً استفاده از لنزهای تماسی گزارش شده است. کراتیت ناشی از تلقیح عامل در چشم به علت تروما ، اکثراً در میان افراد شاغل در بخش-های کشاورزی و دامداری به چشم می‌خورد، و از آنجایی‌که قارچ‌های ساپروفیت و پاتوژن گیاهی نظیر فوزاریوم سولانی در محیط بسیار شایع هستند، برخورد بقایای گیاهی و خاک به چشم منجر به کراتیت قارچی ناشی از این ارگانیسم‌ها می-شود. از دیگر عوامل زمینه ساز می‌توان به جراحی‌های چشمی، اعتیاد، مصرف قطره‌های آنتی‌بیوتیکی و داروهای کورتیکواستروئیدی در چشم، ورود گرد و غبار و نیز عفونت-های مخلوط هرپس سیمپلکس ویروس اشاره کرد. به نظر می رسد وضعیت سیستم ایمنی و بروز بیماری‌های ویروسی نظیر ایدز، در این رابطه یکی دیگر از عوامل اثرگذار باشد (11,13,17,21) . در این خصوص درمطالعه صورت گرفته توسط مسل(Mselle ۱۹۹۹)، فوزاریوم سولانی شایع‌ترین عامل کراتیت قارچی با فراوانی ۷۵٪ گزارش شده است که در این میان۸۱/۲٪ نمونه‌های کراتیت قارچی متعلق به افراد HIV مثبت بوده است (۱۱). در خصوص عفونت‌های هرپس

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.8.2]

سیمپلکس ویروس ، نمای بالینی مشابه با کراتیت‌های قارچی از یک سو و نیز گزارش‌های مبنی بر عفونت توام فوزاریوم سولانی و هرپس سیمپلکس ویروس از سوی دیگر ، لزوم شناسایی اختصاصی و بررسی احتمال حضور دوگانه این عوامل در کراتیت را مطرح می سازد (4,6,8,16). همان‌گونه که ذکر شد ، تشخیص تمایزی کراتیت‌های قارچی و ویروسی با تست-های بهینه شده مولکولی قابل حل می‌باشد.

روش‌های مرسوم نظیر کشت، علاوه براین‌که زمان‌بر هستند، برای شناسایی عامل در حد گونه به نسبت دشوار بوده و نیاز به تخصص بسیار دارند. در همین رابطه تجربه نشان داده است بین ۳۳ تا ۵۰ درصد موارد عفونتی که فوزاریوم گزارش شده-اند ، دچار خطای تشخیصی بوده اند (14,17). شناسایی عامل در حد گونه برای تجویز دارو امری تعیین کننده است. زیرا پاسخ دارویی گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد. برای مثال گونه‌های فوزاریوم سولانی و فوزاریوم ورتیسلوئیدس معمولاً به آزول‌ها مقاوم بوده و MIC آن‌ها برای آمفوتریسین بی، بیشتر از سایر گونه‌ها می‌باشد. حال آنکه گونه‌های اکسی سپوروم و مونیلیفورم تا حدودی به وریکونازول و پوزاکونازول حساس هستند (۱۷،۷). از آنجایی‌که گونه‌های جنس فوزاریوم یک مقاوت کلی و نسبی به تمامی عوامل ضد قارچی از خود نشان می‌دهند، بسیار مناسب خواهد بود که بتوان حضور آن‌ها را در ابتدا و پیش از تکثیر ارگانیسم در نمونه تشخیص داد. حساسیت تست به‌کار رفته در این مطالعه در حد یک نسخه از DNA فوزاریوم سولانی است که برای تشخیص زودهنگام ارگانیسم بسیار مؤثر می‌باشد. به علاوه حضور ارگانیسم‌های همراه نظیر عفونت‌های مخلوط ویروسی و قارچی با مشاهده مستقیم میکروسکپی و یا سایر روش‌های مرسوم نظیر کشت قابل پیگیری نخواهد بود، اما تکنیک‌های مولکولی قادرند این موانع را برطرف نمایند. تکنیک PCR و مشتقات آن به علت مزایایی که به نسبت سایر روش‌ها دارند، در اغلب مطالعات ارجحیت تشخیصی داشته‌اند. گودی (Godoy) در سال۲۰۰۴ با روش‌های PCR-RFLP و ERIC-PCR ،۴۴ ایزوله فوزاریوم سولانی را به عنوان اصلی‌ترین عامل کراتیت در برزیل شناسایی و گزارش نمود (۷).

با وجود ارزشمندی این تحقیقات، امادر مجموع روش-هایی نظیر RFLP علاوه بر آنکه طولانی و نسبتاً پیچیده می‌باشند، برای تشخیص نیاز به کشت‌های خالص عوامل قارچی دارند، در صورتی که با روش‌های PCR محض می‌توان ارگانیسم را به‌طور مستقیم در نمونه‌ها شناسایی کرد.

اچسلر (Oechsler) نیز در سال ۲۰۰۹ با روش PCR و استفاده از توالی‌های ITS بر روی نمونه‌های کراتیتی، اقدام به شناسایی گونه‌های مختلف فوزاریوم در این موارد نموده‌اند. در این روش ارگانیسم‌های عامل در نمونه‌های کراتیتی با کمک توالی ITS در حد جنس و گونه مورد شناسایی قرار گرفته اند (۱۴). در برخی دیگر از مقالات نیز از توالی‌های ITS وβ-TUB (۱۴،۱۷) برای شناسایی مولکولی فوزاریوم و سایر قارچها استفاده شده است. این توالی‌ها اگر چه در خصوص شناسایی سایر گونه‌های فوزاریوم دارای مزیت‌هایی می‌باشند اما توصیه شده است که در خصوص گونه سولانی بهتر است از کاربرد توالی‌های ITS و β -Tubulin اجتناب کرد زیرا آلل‌های مضاعف متغیر یا پارالوگ در نتایج تست امکان خطا را افزایش می‌دهد (15,17). ژن هدف mt-cty-b و پرایمرهای به‌کار رفته در این مطالعه برای شناسایی گونه فوزاریوم سولانی بسیار اختصاصی می‌باشد.

دان هی (Dan HE) با کاربرد این ژن هدف و پرایمرهای ffuso1 و rfuso2 در میان ۱۶۰ بیمار مبتلا به کراتیت توانسته است فوزاریوم سولانی را به عنوان شایع‌ترین عامل کراتیت قارچی در این نمونه‌ها شناسایی نماید. میزان ویژگی تست آن‌ها نشان داد که روش به کار رفته، برای شناسایی اختصاصی گونه فوزاریوم سولانی بسیار مناسب می‌باشد(۵). با آن‌که در مطالعه حاضر در میان ۳۵ نمونه مثبت از نظر هرپس سیمپلکس ویروس هیچ مورد مثبتی از فوزاریوم سولانی مشاهده نگردید، اما نمی‌توان حضور توام فوزاریوم سولانی را در کراتیت‌های هرپسی به عنوان عفونت همراه کاملاً منتفی دانست. به نظر می‌رسد در این خصوص باید تعداد موارد بیشتری را بررسی نمود. در این مطالعه با بهینه‌سازی شرایط واکنش، میزان حساسیت تست و اختصاصی بودن آن به حداکثر سطح ممکن ارتقا یافته است. در نتیجه این امکان وجود دارد که بتوان حضور ارگانیسم را در اولین مراحل، قبل از تکثیر ارگانیسم و پیشروی عفونت در نمونه تشخیص داد. طبعاً تشخیص سریع و دقیق در درمان و پیشگیری از پیامدهای جبران ناپذیر آن تأثیری به سزا دارد. در این مطالعه با توجه به نتایج تست PCR می‌توان چنین نتیجه گرفت که برخی از کراتیت‌های مشکوک به هرپس سیمپلکس ویروس در واقع ناشی از فوزاریوم سولانی است که بعلت تشابه نمای بالینی در ابتدا جزء موارد ویروسی قلمداد شده‌اند. در این

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.8.2]

مطالعه هیچ موردی از عفونت توأم قارچی و ویروسی رویت نگردید.

نتیجه‌گیری:

در مطالعه حاضر ۱۰۰ نمونه مشکوک به کراتیت هرپسی از لحاظ حضور فوزاریوم سولانی مورد بررسی قرار گرفتند. در میان آن‌ها ۳۵نمونه DNA حاصل از تراشه-های قرنیه باروش PCR از نظر *HSV* مثبت بودند، که با انجام تست پی سی آر اختصاصی و بهینه‌سازی شده فوزاریوم سولانی بر روی این نمونه‌ها هیچ گونه باند مربوط به محصول پی سی آر فوزاریوم سولانی در این ۳۵ مورد رویت نگردید. با توجه به این که حساسیت تست در حد یک نسخه از DNA فوزاریوم سولانی در نمونه‌ها می باشد، حتی حضور یک ارگانیسم فوزاریوم سولانی به صورت همراه در این نمونه‌ها منتفی می‌باشد. بخش دیگر کار مربوط به ۶۵ نمونه DNA استخراج شده از تراشه‌های کراتیتی مشکوک به هرپس سیمپلکس ویروس بود، که این نمونه‌ها از نظر وجود این ویروس با انجام تست PCR منفی، گزارش و تأیید شده بودند. با انجام تست PCR اختصاصی گونه فوزاریوم سولانی بر روی این نمونه‌ها، در دو مورد باند مربوط به فوزاریوم سولانی تکثیر و رویت گردید. بنابراین چنین به نظر می‌آید که نمای بالینی مشابه با کراتیت‌های ویروسی موجب شده است که این موارد در مراحل اولیه تشخیص، جزء کراتیت‌های ویروسی قرار بگیرد. ژن mt cyt b که به عنوان ژن هدف در این مطالعه انتخاب شده است، برای شناسایی اختصاصی در حد گونه بسیار مناسب بوده، و با توجه به این که ویژگی تست صد در صد می‌باشد می‌توان با قطعیت فوزاریوم سولانی را به عنوان عامل اتیولوژیک کراتیت در این نمونه‌ها تعیین نمود. در این خصوص مسئله تشخیص تمایزی کراتیت-های قارچی و ویروسی با تست‌های بهینه شده مولکولی قابل حل می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب سپاس و امتنان خود را از سرکار خانم دکتر شهلا رودبار محمدی، جناب آقای دکتر محمد جواد نجف زاده، جناب اقای دکترعلی رضایی و کادر اورژانس بیمارستان چشم پزشکی فارابی که در تهیه نمونه‌ها نهایت همراهی را داشتند، ابراز می‌دارند.

منابع

۱. فتی سارا و همکاران. کراتیتهای قارچی،عوامل ،زمینه های مستعدکننده و نتایج پاسخ به درمان.مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد.بهار۸۹.شماره ۱. صفحه ۱۶-۲۵

۲. نوروزپور دیلمی کیومرث،شکوهی طاهره، هدایتی محمد تقی، معدل حقیقی تهمینه، خلیلیان علیرضا. شیوع کراتیت قارچی در مراجعه کنندگان با زخم قرنیه به بیمارستان بوعلی سینای ساری در سال ۱۳۸۳.مجله چشم پزشکی بینا.زمستان ۱۳۸۴.دوره ۱۱.شماره ۲. صفحه ۱۹۱- ۱۹۸

3. Alfonso EC., et al., Insurgence of Fusarium keratitis associated with contact lens wear. Arch Ophthalmol, 2006.124(7):941–947.
4. Akshaya.R, Amrutha.P" A Study on the Epidemiological and Microbiological Aspects of Keratomycosis, Hyderabad, South India.The journal of young investigators. 2010. 20 (1):2-7.
5. Dan He,Jilong Hao, Bo Zhang, Yanqiu Yang, Wengang Song, Yunfeng Zhang, Koji Yokoyama and Li Wang" Pathogenic Spectrum of Fungal Keratitis and Specific Identification of Fusarium solani" iovs.2011. 52 (5): 2804-2808.
6. Dóczi, T. Gyetvai, L. Kredics, E. Nagy, Involvement of Fusarium spp. in fungal keratitis.Clinical Microbiology and Infection. 2004. 10(9): 773–776.
7. Godoy, P., J. Cano, J. Gene, J. Guarro, A.L. Hofling-Lima and A.L. Colombo,. Genotyping of 44 isolates of Fusarium solani, the main agent of fungal keratitis in Brazil. J. Clin. Microbiol. 2004. 42: 4494-4497.
8. Gupta V, Dada T, Vajpayee RB, Sharma N, Dada VK. Polymicrobial keratitis after laser in situ keratomileusis. J Refract Surg. 2001; 17: 147–148.
9. Mancini N. et al. Rapid molecular identification of fungal pathogens in corneal samples from suspected keratomycosis cases. J Med Microbiol. 2006 Nov; 55(Pt 11):1505-9

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.8.2]

10. Mohammad Arif, Shilpi Chawla, N. W. Zaidi1, J. K. Rayar M. Variar4 and U. S. Singh. Development of specific primers for genus Fusarium and F. solani using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1α) geneAfrican Journal of Biotechnology. 2012. 11(2): 444-447.
11. Mselle J. Fungal keratitis as an indicator of HIV infection in Africa. Trop Doct. 1999. 29(3):133-5.
12. Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of Fusarium species. Clin Microbiol Rev. 1994 .7(4):479-504.
13. Nucci, M. and E. Anaissie, .Fusarium infections in immunocompromised patients. Clin. Microbiol. Rev. 2007. 20: 695-704.
14. Oechsler A.Rafael et.al.Utility of molecular sequence analysis of the ITS r RNA region for identification of fusarium spp. From ocular sources. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2009. 50 (5): 2230-2236.
15. O'Donnell Kerry, et.al. Internet-Accessible DNA Sequence Database for Identifying Fusaria from Human and Animal Infections. J. Clin. Microbiol. 2010.48(10):3708-3718.
16. O'Donnell, K., et al. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. J. Clin. Microbial. 2007. 45: 2235-2248.
17. P.K. Jain, V.K. Gupta, A.K. Misra, R. Gaur, V. Bajpai and S. Issar . Current Status of Fusarium Infection in Human and Animal. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. 2011. 6: 201-227.
18. Ritterband DC, Seedor JA, Shah MK, Koplin RS, McCormick SA. Fungal keratitis at the New York Eye and Ear Infirmary. Cornea. 2006. 25(3)264–267.
19. Suhail Ahmad, Zia U. Khan, Ajmal M. Theyyathel. Development of a nested PCR assay for the detection of Fusarium solani DNA and its evaluation in the diagnosis of invasive fusariosis using an experimental mouse model. Mycoses. 2010. 53(1):40-47.
20. Wang He, et.al. Accurate and practical identification of 20 fusarium species by seven –locus sequence analysis and reverses line blot hybridization, and an invitro antifungal susceptibility study. Journal of clinical microbiology.2012.49 (5): 1890-1898.
21. Zhang, N., K. O'Donnell, D.A. Sutton, F.A. Nalim, R.C. Summerbell, A.A. Padhye and D.M. Geiser,. Members of the Fusarium solani species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. J. Clin. Microbiol., 2006. 44: 2186-2190.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.8.2]