مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هفتم، شماره بیست و پنجم - زمستان ۱۳۹۵

Research Article
مقاله تحقیقی

مقایسه و ارزیابی روش های آزمایشگاهی اسمیر-کشت-مولکولی عفونت های قارچی در نمونه های بالینی بیماران

نسرین شیخی[1*]، سعید ذاکر بستان آباد[2]، سینا میرزا احمدی[1]

۱- گروه ژنتیک دانشگاه آزاد واحد زنجان، زنجان، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران

چکیده

سابقه و هدف: افزایش نگران کننده عفونت های قارچی به ویژه در بیمارانی که به نحوی سیستم ایمنی آن ها در دفاع از عوامل عفونی تضعیف شده و نیز پیشرفت های گسترده در روش های تشخیصی، موجب بررسی های گسترده تر در تشخیص عفونت های قارچی با روش های نوین تر در گروه های مختلف بیماران گردیده است. هدف اصلی این مطالعه مقایسه و ارزیابی روش های آزمایشگاهی اسمیر-کشت-مولکولی عفونت های قارچی در نمونه های بالینی بیماران می باشد.

مواد و روش ها: از مرداد ۱۳۹۳ تا دی ماه۱۳۹۳، ۴۲۰ نمونه مشکوک به عفونت های قارچی، از سه مرکز بیمارستان رازی، بیمارستان بقیه اله و آزمایشگاه مسعود جمع آوری شد. آزمایش لام مستقیم برای نمونه ها آماده شد و بر اساس نتایج آن ، نوع ضایعه و تشخیص پزشک متخصص، نمونه ها گروه بندی شده وآزمایش های کشت و مولکولی(PCR) همزمان صورت گرفت.

یافته ها: از ۴۲۰ نمونه بررسی شده با روش میکروسکوپی، ۱۵ نمونه(۳/۵٪) آسپرژیلوس، ۶۴ نمونه(۱۵/۲٪) درماتوفیت و برای موکور نمونه ای تشخیص داده نشد. از۱۵ نمونه آسپرژیلوس، ۱۲ نمونه(۸۰٪) در نتیجه کشت مثبت و ۳ نمونه (۲۰٪) منفی بود و با روش Nested PCR، ۱۵ نمونه مثبت شدند. از۶۴ نمونه درماتوفیت ها ، نتیجه کشت ۴۰ مورد (۶۲/۵٪) مثبت و۱۶ نمونه(۲۵٪) منفی بودند. تعداد ۶ مورد (۹/۳٪) آلودگی ساپروفیت و ۲ نمونه (۳/۱۲٪) در محل تلقیح، آسپرژیلوس رشد کرده بودند. با روش Nested PCR، ۶۲ مورد (۹۶/۸٪) مثبت شد.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده در این مطالعه، نشان می دهد که PCR با توجه به حساسیت بالا، قابلیت خوبی در تشخیص بیماری قارچی در مراحل اولیه عفونت دارد. از آنجایی که تشخیص سریع و اختصاصی عفونت های قارچی، به ویژه با توجه به جنس ها و گونه های عامل بیماری، امکان اعمال پروتکل های درمانی ضد قارچی را به طور جهت دار و با کفایت فراهم خواهد کرد، طراحی و به کارگیری تکنیک های سریع، دقیق و حساس در این رابطه بسیار ضروری و اجتناب ناپذیر خواهد بود.

کلمات کلیدی: آسپرژیلوس، درماتوفیت، موکور، اسمیر، PCR، کشت

مقدمه

تشخیص بیماری های عفونی به ویژه قارچ ها به دلیل شیوع بالا، مسری بودن و ایجاد معضلات بزرگ بهداشتی در جوامع انسانی از اهمیت خاصی برخوردار می باشند اما با پیشرفت های علمی و استفاده مستمر از روش های جدید علوم پزشکی پیشگیری و کنترل راه های انتقال، ایمن سازی و دارو، درمان وضعیت فوق را به نحو مساعدی تغییر داده است(۱،۲). افزایش شیوع عفونت های قارچی فرصت طلب در بین بیماران پیوندی و افراد با ایمنی سرکوب شده، تهدید کننده می باشد. درماتوفیت ها با شیوع ۲۰-۱۰ درصد کل جمعیت دنیا زمینه را جهت بررسی و مطالعه فراهم نموده است(۱). امروزه با وجود آزمایش های هیستولوژیک، بیوشیمیایی، تغذیه ای و سرولوژیک قابل دسترس، شناسایی قارچ های بیماری زا اغلب با تشخیص ویژگی های ساختمانی آن ها در کشت و با مطالعه های میکروسکوپی انجام می گیرد(۷). قارچ های فرصت طلب و پاتوژن شایع و متداول در ایران، در آزمایشگاه ها به طور معمول با رنگ آمیزی گرم، لاکتوفنل کاتن بلو یا با استفاده از پتاس ۱۰ درصد به عنوان شفاف کننده تشخیص داده می شود و برای تعیین گونه،

نویسنده مسئول :

گروه ژنتیک دانشگاه آزاد واحد زنجان، زنجان، ایران

پست الکترونیکی: nasrin_sheikhi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۷

تاریخ پذیرش:۱۳۹۵/۰۳/۱۱

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

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.1.5]

محیط های کشت scc برای درماتوفیت ها و محیط s برای سایر قارچ ها به کار می رود(۱۱). روش های معمول شناسایی قارچ ها از جمله اسمیر مستقیم، کشت و نمونه های پاتولوژیک آن چنان که باید یا سریع نیستند و یا از حساسیت لازم برخوردار نمی باشند(۲۳). روش های ایمونولوژیک مانند روش های ردیابی آنتی بادی و آنتی ژن نیز اگرچه سریع هستند، اما فاقد ویژگی و دقت لازم هستند و در بعضی مواقع در بیماران دارای نقص در سیستم ایمنی که در تولید آنتی بادی مشکل دارند قابل انجام نمی باشند(۱۸). روش های مولکولی از جمله PCR(polymerase chain reaction) امروزه به شکل بسیار وسیعی در تشخیص عفونت ها به کار می روند. این روش ها هم حساسیت لازم و هم ویژگی کافی و نیز سرعت مناسب را دارا هستند. Nested PCR یک روش PCR دو مرحله ای است که برای افزایش حساسیت و اختصاصی بودن PCR به کار می رود (۸). این روش حساسیت و ویژگی PCR را به نحو چشم گیری بالا می برد و احتمال تکثیر قطعه مورد نظر را در مقابل قطعات غیر اختصاصی افزایش می دهد(۸). با توجه به شرایط ویژه بیماران بستری شده در بخش مراقبت های ویژه ، تشخیص اولیه و اختصاصی بیماری جهت شروع درمان های ضد قارچی بسیار ضروری بوده و نیازمند تکنیک های تشخیصی با ارزش و مناسب می باشد ولی با وجود پیشرفت های حاصل شده در روش های تشخیصی، عفونت قارچی هنوز خوب و به موقع تشخیص داده نشده و تشخیص قطعی آن قبل از مرگ بیمار و قبل از تکثیر فراوان عامل قارچی با مشکل صورت می گیرد(۲۵). بقای بیماران علیر غم استفاده از داروهای ضد قارچی پایین می باشد که در بیشتر به علت عدم اثبات تشخیص بیماری در مراحل اولیه آلودگی و به دنبال آن شروع دیر هنگام درمان های ضدقارچی برای بهبود وضعیت بیماران می باشد(۲۴، ۱۴). در این تحقیق روش PCR برای شناسائی عفونت های قاری به کار رفت تا اهمیت روش مولکولی برای به کارگیری در تشخیص های سریع در ردیابی انواع قارچ ها مورد ارزیابی قرار گیرد. در ادامه این مطالعه به منظور مقایسه و ارزیابی روش های آزمایشگاهی مختلف اسمیر و کشت و مولکولی در تشخیص قارچ های آسپرژیلوس و درماتوفیت و موکور صورت گرفت.

مواد و روش ها

نمونه: نمونه ها از سه مرکز بیمارستان رازی، بیمارستان بقیه اله و آزمایشگاه مسعود جمع آوری شد.

اسمیر مستقیم: نمونه ها با کاهش اندازه و نرم کردن در یک قطره KOH، مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند(۲۷).

کشت: بر اساس شناسایی صورت گرفته با لام مستقیم و محل ضایعه و درخواست پزشک، نمونه ها در محیط های کشت SC و SCC کشت داده شد(۲۷).

جداسازی DNA و مراحل PCR

استخراج DNA از نمونه های بالینی با استفاده از کیت Probe NA(کیاژن) صورت گرفت و DNA استخراج شده از نمونه های بالینی بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ مشاهده شد و خلوص و کیفیت DNA بررسی شد. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر جنس صورت گرفت. برای انجام PCR از Master Mix شرکت ویراژن با نام تجاری ۲x Master Taq DNA Polymerase Mix Red استفاده شد. محصول PCR هر جنس روی ژل آگارز ۲٪ بررسی شدند. نمونه های گروه آسپرژیلوس، با پرایمرهای SP۵ (۵'-GAT AAC GAA CGA GAC CTC GG-۳') و SP۸ (۵'-TGC CAA CTC CCC TGA GCC AG-۳') دور اول PCR گذاشته شد و سپس محصول PCR آن، به عنوان الگو برای مرحله دوم PCR با پرایمرهای ASP۷ (۵'-CCT-GAG CCA GTC CGA AGG CC-۳') و ASP۱ (۵'-CGG CCC TTA AAT AGC CCG GTC-۳') استفاده شد(۲۶).

برنامه PCR برای هر دو مرحله مطابق جدول زیر می باشد(جدول۱):

جدول۱. برنامه PCR آسپرژیلوس

Initial denaturation	94°C for 5min
Thermo-Cycle file	cycle 30
Denaturation	94°C for 1 min
Annealing	56°C for 1 min
Extension	72°C for 90 second
Final extension	72°C for 10 min
8ºC	Store

نمونه های گروه درماتوفیت ها با پرایمر S-CHS۱ (۵'-CAT CGA-GTA CAT GTG CTC GC-۳') و R-CHS۱ (۵'-CTC GAG GTC-AAA AGC ACG CC-۳') مرحله اول PCR صورت گرفت. برای مرحله Nested PCR از محصول اولیه استفاده و تکثیر با پرایمرهای JF۲ (۵'- GCA AAG AAG CCT GGA AGA AG-۳') و JR۲ (۵'-GGA GAC CAT CTG TGA GAG TTG-۳') انجام شد(۱۰).

برنامه PCR مطابق جدول زیر می باشد(جدول۲):

جدول۲: برنامه PCR درماتوفیت

Initial denaturation	94°C for 3min
Thermo-Cycle file	cycles 35
Denaturation	94°C for 1 min
Annealing	56°C for 1 min and 15 second
Extension	72°C for 90 second
Final extension	72°C for 10 min
8ºC	store

یافته ها:

از ۷۹ بیمار مثبت تشخیص داده شده با مشاهده مستقیم، تعداد

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

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.1.5]

مردان ۵۰ ، تعداد زنان ۲۹ مورد و در محدوده سنی ۱۱ تا ۸۷ سال بودند. بیش ترین فراوانی ابتلا به عفونت های قارچی به تفکیک سن و جنس مربوط به گروه سنی ۱۰-۱۹ سال در جنس مذکر بود که تفاوت چشم گیری با جنس مونث در این رده سنی داشت. در این رده سنی بیش تر افراد مذکر کشتی گیر بودند.

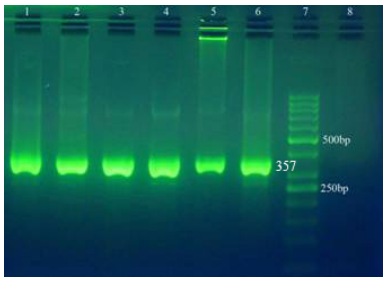
با مشاهده لام مستقیم ۷۹(۱۸/۸٪) مورد، ۱۵(۳/۵٪) نمونه آسپرژیلوس و ۶۴(۱۵/۲٪) نمونه درماتوفیت شناسایی شد (جدول۴ و۵).

فراوانی بیماری در دست، هم در افراد مذکر و هم در افراد مونث نسبت به سایر نقاط بدن بیش تر بود. هم چنین این یافته در جنس مذکر نسبت به جنس مونث بیش تر بود. بیماری در گوش و زیر بغل با کم ترین فراوانی بودند(جدول ۳).

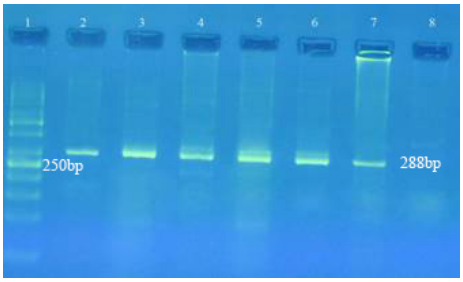
از۱۵ نمونه آسپرژیلوس، ۱۲ نمونه(۸۰٪) در نتیجه کشت مثبت و ۳ نمونه (۲۰٪) منفی بود و در روش Nested PCR، ۱۵ نمونه مثبت شدند. از۶۴ نمونه درماتوفیت ها ، نتیجه کشت۴۰ مورد (۶۲/۵٪) مثبت و۱۶ نمونه(۲۵٪) منفی بودند. تعداد ۶ مورد (۹/۳٪) آلودگی ساپروفیت و ۲ نمونه (۳/۱۲٪) در محل تلقیح، آسپرژیلوس رشد کرده بودند(جدول۴و۵).

همزمان با بررسی از طریق کشت، PCR نمونه ها انجام شد. از ۱۵ نمونه گروه آسپرژیلوس همه (۱۰۰٪) مثبت بودند(تصویر۱).نمونه های گروه درماتوفیت ها از ۶۴ نمونه ۶۲ مورد (۹۶/۸٪) مثبت بودند (تصویر۲).

۲ مورد منفی(۳/۱۲٪) با پرایمر درماتوفیت را در خصوص ۲ مورد آسپرژیلوس با روش Nested PCR بررسی شد و جواب PCR مثبت بود(جدول۴و۵).



تصویر ۱: نتیجه Nested PCR آسپرژیلوس نمونه های بالینی (شماره ۱: کنترل مثبت، شماره های۲ تا ۶: نمونه های مثبت آسپرژیلوس، شماره ۷: مارکر ۵۰ bp، شماره ۸: کنترل منفی).



تصویر ۲: نتیجه Nested PCR درماتوفیت نمونه های بالینی (شماره ۱: مارکر ۵۰ bp، شماره ۳: کنترل مثبت، شماره های ۲،۴، ۵، ۶ و۷: نمونه های مثبت درماتوفیت، شماره ۸: کنترل منفی).

در بررسی انواع عوامل قارچی براساس موضع درگیر، عامل ایجاد عفونت در هر موضع درگیر به طور معنی داری با موضع دیگر متفاوت بوده است (CI=۰/۹۵; P=۰/۰۰۰). این بررسی نشان می دهد که هرعامل عفونی به موضع های خاص گرایش متفاوتی دارد.

جدول۳. فراوانی نواحی مبتلا به عفونت قارچی به تفکیک جنس در افراد مورد مطالعه

محل ضایعه جنس	کشاله ران	کف پا	دست	پشت کمر	سر	صورت	زیر بغل	ساق پا	گوش	سینوس	ناخن
تعداد مذکر	۴	۷	۱۲	۴	۱۲	۲		۲	۱	۲	۴
تعداد مونث	۷	۳	۷		۱	۱	۱			۱	۸
جمع کل	۱۱	۱۰	۱۹	۴	۱۳	۳	۱	۲	۱	۳	۱۳

جدول ۴: مقایسه نتایج حاصل از اسمیر و کشت و PCR نمونه های درماتوفیت

محل ضایعه	Result of PCR	Species assign-ment by culture	Result of smear	No. of strains iso-lated
دست	+	No growth	+	1-1, 1-4, 1-9, 4-5, 5-9
دست	+	Trichophyton mentagrophytes	+	1-2, 2-8, 2-9, 3-9, 5-11
سر	+	Microsporum canis	+	1-3, 2-11, 3-4
صورت	+	Trichophyton mentagrophytes	+	1-5, 5-10
کف پا	+	No growth	+	1-6, 2-5, 2-7, 3-10, 4-1
سر	+	Unknown	+	1-7
کف پا	+	saprophyte	+	1-8
پشت کمر	+	No growth	+	1-10, 1-11
کشاله ران	+	No growth	+	1-12, 84225
دست	+	Microsporum canis	+	1-13, 115435
کشاله ران	+	Trichophyton verrucosum	+	1-14
کشاله ران	+	Trichophyton rubrum	+	1-15, 2-13, 5-1
دست	+	Trichophyton verrucosum	+	2-1, 4-2
دست	+	Trichophyton tonsurans	+	2-2
سر	+	No growth	+	2-3, 3-8
صورت	+	Trichophyton tonsurans	+	2-4
کشاله ران	+	Trichophyton mentagrophytes	+	2-6
سر	+	saprophyte	+	2-10

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

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.1.5]

دست	+	saprophyte	+	12-2, 8-4, 5-4, 6-5
کف پا	+	Epidermophyton floccosum	+	14-2
سر	+	Trichophyton mentagrophytes	+	1-3, 2-3, 7-3, 12-3, 4-4
دست	–	.Aspergillus sp	+	3-3
پشت کمر	+	Trichophyton mentagrophytes	+	5-3, 7-5
کشاله ران	+	Epidermophyton floccosum	+	6-3, 11-3
ساق پا	+	Trichophyton verrucosum	+	3-4
زیر بغل	+	Epidermophyton floccosum	+	6-4
ساق پا	+	Epidermophyton floccosum	+	7-4
کشاله ران	+	Trichophyton ?verrucosum	+	2-5
کشاله ران	+	Epidermophyton floccosum and Candida	+	3-5
کف پا	+	Trichophyton rubrum	+	5-5, 8-5
کف پا	–	.Aspergillus sp	+	84001
گوش	+	Trichophyton mentagrophytes	+	86865

جدول۵: مقایسه نتایج حاصل از اسمیر و کشت و PCR نمونه های آسپرژیلوس

محل ضایعه	Re-sult of PCR	Species assignment by culture	Result of smear	No. of strains isolated
ناخن پا	+	No growth	+	85726
ناخن پا	+	.Aspergillus sp	+	118, 1, 89
ناخن پا	+	Aspergillus flavous	+	2-17, 18, 2, 3108, 1160, 140593
نا خن دست	+	Aspergillus niger	+	0020
سینوس	+	Aspergillus niger	+	2-18
ناخن پا	+	Aspergillus fumi-gatus	+	88
سینوس	+	No growth	+	3608, 3

بحث

تشخیص عفونت های قارچی در ایران همانند کشور های دیگر مشکل جدی تلقی می گردد و ده ها محقق در آزمایشگاه های مجهز همواره در صدد یافتن راه کاری برای ردیابی عفونت های قارچی به خصوص عفونت های قارچی مهاجم هستند(۲۷).

یکی از عفونت های قارچی مورد مطالعه در این تحقیق آسپرژیلوزیس بود. قابل ذکر است که آسپرژیلوس ها از جنبه های مختلف صنعتی، پزشکی و بیوشیمیایی حایز اهمیت هستند. در قسمتی از تحقیق به مطالعه و جداسازی درماتوفیت ها پرداخته شد چرا که تغییرهای جمعیتی که طی دهه های اخیر ایجاد شده موجب گسترش عفونت های درماتوفیتی شده است. امروزه عفونت های جلدی ناشی از درماتوفیت ها در همه گروه های سنی و در سرتا سر دنیا رخ می دهند و هر ساله میلیون ها نفر از کسانی که به کچلی مبتلا می شوند میلیون ها دلار جهت مراقبت های بهداشتی به طور خصوص جهت درمان در مواردی که تشخیص به سرعت انجام نمی شود، هزینه می نمایند(۲۲). در حال حاضر نیز نسبت قابل توجهی از کشت های قارچی که در آزمایشگاه های بالینی قارچ شناسی تشخیص داده می شوند را درماتوفیت ها تشکیل می دهند(۲۱).

روش های تشخیصی متعددی برای ردیابی قارچ ها در حال انجام است که هر کدام دارای ویژگی های خاصی می باشند.

در مشاهده میکروسکوپی سرعت مهم ترین مزیت آن می باشد و می تواند اطلاعاتی را به ما بدهد که با روش های دیگر قابل دسترس نمی باشند. برای مثال در بعضی از نمونه ها مانند ناخن، تعداد قابل توجهی از نمونه ها در مشاهده میکروسکوپی، مثبت هستند به کشت جواب نمی دهند. در این موارد تشخیص قطعی عفونت قارچی به مشاهده میکروسکوپی وابسته است(۱۹). قابل ذکر است که آزمایش مستقیم میکروسکوپی حساسیت کمتری از کشت دارد و یک آزمایش مستقیم منفی عفونت قارچی را رد نمی کند.

روش متداول شناسایی قارچ ها در آزمایشگاه های تشخیص طبی، هنوز شامل کشت در محیط های جداسازی اولیه است و چون نمونه بیش تری مورد آزمایش قرار می گیرد در نتیجه، روش حساس تری می باشد. این روش ها به رغم ارزش قابل توجه شان بسیار متنوع و در بعضی مواقع غیر دقیق، به طور عموم وقت گیر، پر هزینه و به طور اصول مستلزم کادر قارچ شناسی متبحر هستند و در نهایت درصد قابل توجهی از جدایه ها در این روش ها با هویت مبهم و مشکوک باقی می مانند(۱۶).

روش های مولکولی مبتنی بر تفاوت در توالی قطعات DNA می باشد(۱۶). روش های مبتنی بر PCR نظیر PCR تک مرحله ای، RAPD-PCR، Nested PCR، تعیین توالی نواحی ITS از DNA ریبوزومی و تعیین توالی ژن های کد کننده پروتئین برخی از روش ها هستند (۱۵،۵). به تازگی با بررسی تشابه و اختلاف قطعات خاصی از مولکول DNA مثل ITS (۱۲) ، DNA Topoisomerease II (۱۳) و Chitin synthase (۱۷) و غیره روش های جدیدی برای شناسایی گونه های قارچ ها معرفی شده است (۱۶). هم چنین روش های مولکولی در مواردی که بیمار، داروی ضد قارچی استفاده کرده باشد، مفید می باشد چون مصرف دارو باعث عدم رشد در محیط های کشت و عدم امکان تشخیص درست می گردد(۱۰). از دیگر مزایای روش های مولکولی این است که تحقیقات ژنومی به طور لازم مستلزم استفاده از ارگانیسم زنده نمی باشند و انگشت نگاری PCR

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

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.1.5]

می تواند جهت بررسی سوش های مرده مورد استفاده قرار گیرد (۹). سرانجام این که با استفاده از روش های مولکولی می توان به ارزیابی اثر های درمانی عوامل ضد قارچی پرداخت (۶).

در این تحقیق ۴۲۰ بیمار مستعد کسب عفونت های قارچی آسپرژیلوزیس، درمافیتوزیس و موکوروزیس مورد بررسی قرار گرفتند که با توجه به نتایج لام مستقیم در سه گروه آسپرژیلوس، درماتوفیت و موکور دسته بندی شده و از نظر کشت و مولکولی (Nested PCR) ارزیابی شدند.

در آزمایش مستقیم، با دیدن میسلیوم های دو شاخه بی نظم با دیواره عرضی نمونه ها در گروه آسپرژیلوس ها قرار گرفتند که ۱۵ مورد(۳/۵٪) گزارش شد و نمونه هایی که میسلیوم آرتوکونیدی دارند و میسلیوم کم رنگ تر و منظم ترنسبت به آسپرژیلوس بودند در گروه درماتوفیت ها قرار گرفتند که ۶۴ مورد(۱۵/۲٪) شناسایی شد.

گونه های آسپرژیلوس شناسایی شده با کشت شامل: آسپرژیلوس فلاووس ۶ مورد(۵۰٪)، آسپرژیلوس نایجر ۲ مورد(۱۶/۶٪) و آسپرژیلوس فومیگاتوس ا مورد(۸/۳٪) بود. ۳ مورد (۲۵٪) شناسایی نشدند.

در مطالعه حاضر ، آسپرژیلوس فلاووس شایع ترین جدایه ی مورد شناسایی بود که این موضوع با مطالعه ی میرهند ی و همکاران (۱۶)، زینی و همکاران (۲۷) و شکوهی و همکاران (۳) تطابق داشت. شایع ترین موضع درگیری آسپرژیلوس ها ناخن بود.

بعد از بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی کشت های درماتوفیتی، گونه های قابل شناسایی شامل: ترایکوفایتون منتاگروفایتیس ۱۶ مورد(۴۰٪)، ترایکوفایتون روبروم ۵ مورد(۱۲/۵٪)، ترایکوفایتون وروکوزوم ۵ مورد (۱۲/۵٪) که ۱ مورد آن مشکوک به وروکوزوم گزارش گردید. ترایکوفایتون تونسورنس ۲ مورد(۵٪)، اپیدرموفایتون فلوکوزوم ۶ مورد(۱۵٪) مشاهده شد که ۱ مورد از آن ها میکس با کاندیدا بود. ترایکوفایتون اکوئینوم و ترایکوفایتون ویولاسئوم موردی مشاهده نشد.

در مطالعه ای که توسط عمران و همکارانش صورت گرفت به بررسی تعیین توزیع و چگونگی انتشار بیماری های قارچی سطحی و جلدی پرداختند، درماتوفیتوزیس را شایع ترین بیماری معرفی کردند. معمولی ترین شکل بالینی درماتوفیتوزیس کچلی کشاله ران و در میان درماتوفیت های جدا شده از کشت از موارد درماتوفیتوزیس ترایکوفایتون منتاگروفایتیس، شایع ترین عامل بوده است(۴) که در مطالعه ما نیز درماتوفیتوزیس شایع ترین بیماری، شایع ترین موضع درگیری درماتوفیت ها در هر دو جنس، دست و ترایکوفایتون منتاگروفایتیس از کشت بیش ترین مورد بود.

در بین۱۵ نمونه دارای آزمایش مستقیم مثبت در گروه آسپرژیلوس ها، ۱۲ مورد(۸۰٪) با هر دو روش کشت و Nested PCR هم خوانی داشتند و ۳ مورد(۲۰٪) تنها با روش Nested PCR مثبت شدند.

در بین۶۴ نمونه دارای آزمایش مستقیم مثبت در گروه درماتوفیت ها، ۴۰ مورد (۶۲/۵٪) با هر دو روش کشت و Nested PCR هم خوانی داشتند و ۲۲ مورد (۳۴/۳٪) تنها با روش Nested PCR تایید شدند. ۲ مورد (۳/۱٪) با هر دو روش کشت و Nested PCR هم خوانی داشتند ولی نتیجه آزمایش مستقیم را تایید نمی کردند و آسپرژیلوس بودند.

در نتیجه، تعداد نمونه هایی که آزمایش مولکولی Nested PCR بر روی آن ها صورت پذیرفت ۷۹ نمونه بوده است که در بین این نمونه ها ۱۷ مورد(۲۱/۵٪) آسپژیلوس مثبت و ۶۲ مورد(۷۸/۴٪) درماتوفیت مثبت ثبت گردیده است. در مطالعه انجام شده توسط Garga و همکاران برای تشخیص سریع درماتوفیت ها در ۱۵۵ نمونه بالینی، Nested PCR را روش حساس تری نسبت اسمیر و کشت معرفی کرد(۱۵) که مطالعه حاضر نیز این موضوع را تایید می کند.

در کچلی کشاله ران در بیش تر موارد علت وقوع آن درماتوفیتی هایی چون ترایکوفایتون روبروم و ترایکوفایتون منتاگروفیتس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم می باشد(۲۰). در این تحقیق هم شایع ترین درماتوفیت مولد کچلی کشاله ران اپیدرموفیتون فلوکوزوم و تریکوفیتون روبروم بود، راه انتقال از حوله، لباس، لیف و ملحفه و تماس مستقیم می باشد، هم چنین تشک های آلوده کشتی در سالن های ورزشی راهی برای انتقال کچلی می باشد. اوترو(Otero) و همکاران مواردی از کچلی ران را به خاطر تماس های جنسی گزارش داده اند، آن ها اشاره به زنان فاحشه ای داشتند که در تماس های جنسی خود کچلی کشاله ران خود را به مردانی که با آن ها تماس جنسی داشتند انتقال داده بودند و معتقدند که کچلی کشاله ران می بایستی مورد توجه کسانی قرار گیرد که در قسمت بیماری های منتقله به وسیله تماس جنسی (STD) مطالعه می کنند(۲۰).

طبق تحقیق انجام گرفته توسط املین گلین وان اونس، نشان داد که از میان کل نمونه هایی که به وسیله میکروسکوپ و یا کشت و یا هر دو مثبت بودند، تنها ۱۵٪ آن ها فقط به وسیله کشت تشخیص داده می شدند. به طور معمول این مسئله ناشی از کمیابی قارچ ها در بافت و کمی نسبی مواد مورد آزمایش در مشاهده مستقیم میکروسکوپی نسبت به کشت می باشد. از طرف دیگر در ۳۱٪ موارد اگر کشت به تنهایی انجام می گرفت به تشخیص نمی رسیدند. اکثریت چنین نمونه هایی(۲۴٪) ناخن بود، مشخص شده است که در حدود ۵۰٪ از ناخن های آلوده جدا شده، در محیط کشت رشد نمی کنند، این مسئله در مورد مخمرها و قارچ های رشته ای دیگر مانند درماتوفیت ها دیده می شود. ۷٪ باقی مانده از ۳۱٪ که کشت به تنهایی قابلیت

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

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.1.5]

تشخیص نداشت مربوط به نمونه های پوستی بود و عامل این مسئله به احتمال زیاد به استفاده از داروی ضد قارچی بدون اطلاع دادن به آزمایشگاه بود. با این وجود، این موضوع که نمونه های گرفته شده از دست، صورت، و کف پا بیش تر از نمونه های جاهای دیگر تمایل به منفی بودن در کشت دارند یک واقعیت می باشد (۱۹).

نتیجه گیری

از دلایلی که موجب این عدم ارتباط و تطابق بین نتایج تست های مختلف می گردند: اول، به علت درمان های تجربی قبل از انجام تست های تشخیصی عفونت های قارچی است که این امرموجب منفی شدن کشت ها به علت دژنره شدن عوامل قارچی و حتی منفی شدن آزمایش مستقیم در تشخیص عوامل قارچی خواهد شد. دوم، اطلاع کافی نداشتن از روند پیشرفت بیماری و نمونه گیری در مواقعی که عوامل قارچی هنوز به بافت هجوم پیدا نکرده اند و یا توسط سلول های ایمنی پاک شده اند. سوم، به علت آلودگی های محیطی و نیز کلنیزاسیون در بیماران که موجب ایجاد نتایج مثبت کاذب خواهند شد. چهارم، خطاهای نمونه گیری و خطاهای دستی و تکنیکی که در روند انجام تست ها برحسب تداول اجتناب ناپذیر هستند نیز موجب نتایج مثبت کاذب و یا منفی کاذب خواهند شد. پنجم، پایین بودن حساسیت روش های سنتی (۴۰ تا ۵۰ درصد) موجب شده که نمی توان صد در صد انتظار داشت که همیشه نتایج این روش ها انطباق کامل با دیگر روش ها را داشته باشد چرا که ممکن است حساسیت روش های غیر سنتی بیش تر بوده و در نتیجه در این موارد نتایج مثبت بیش تری را نسبت به روش های سنتی شاهد باشیم. ششم، تعریف و تعیین نشدن بهترین استراتژی برای ترکیب و استفاده همزمان و این که استفاده از کدام روش ها مؤثرتر خواهد بود.

بنابراین می توان نتیجه گرفت که Nested PCR با هدف قرار دادن ژن های مورد مطالعه ممکن است استاندارد طلایی برای تشخیص در بیماران مبتلا در نظر گرفته و می تواند پزشک را در شروع سریع و درمان ضد قارچی مناسب کمک کند. این روش نه تنها سریع بلکه ساده و ارزان در مقایسه با دیگر روش های مولکولی برای تشخیص عفونت قارچی می باشد.

سپاسگزاری

از کلیه همکاران بخش قارچ شناسی آزمایشگاه مسعود، به ویژه آقایان رضا امیری و علی قربان پور در خصوص همکاری در مراحل انجام تحقیق فوق، کمال تشکر را دارم.

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

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.1.5]

منابع

۱- ثمینی، م. فارماکولوژی(شیمی درمانی)، تبریز: چاپ دوازدهم، ۱۳۶۲: ۶۰۷-۶۰۶.

۲- شادزی، ش. قارچ شناسی پزشکی، تهران: چاپ چهارم، ۱۳۶۸: ۵۳۳-۳۵۲، ۳۶۰، ۴-۳۸۲.

۳- شکوهی غ، میر هندی ح و دیگران، شناسایی مورفولوژیک و ژنوتیپیک برخی جدایه های آسپرژیلوس محیطی در ایران بر اساس توالی ژن بتا توبولین (β-tubulin).مجله دانشکده پزشکی اصفهان. ۱۳۹۰; ۲۹(۱۶۶).

۴- عمران ن و دیگران، بررسی اپیدمیولوژیک عفونت های قارچی سطحی و جلدی در ۵۵۰۰ بیمار مشکوک در تهران. مجله دانشکده پزشکی. دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۸۹; ۶۸: ۴۵-۵۳.

5- Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, Hong SB, Yaghuchi T, Varga J & Samson RA.Aspergillus species identification in the clinical setting. Stud Mycol 2007; 59: 39-46.

6- Binstock JM. Molecular biology techniques for identifying dermatophytes and their possible use in diagnosing onchomycosis in human toenail: a review. J Am Podiatr Med Assoc. 2007; 97(2): 134-44.

7- Campbell Mary C., Stewwart Joyco L. The medical mycology handbook. 3, 161, 165, 168 174-6, 361, 363, 365, 382-385; 1980.

8- Coen DM. The Polymerase Chain Reaction, Current Protocols in Molecular Biology. USA: John Wiley & Sons; 1992: 1100-15.

9- Faggi E, Pini G, Campici E, Bertrllini C, Difonzo E, mancianti F. Application of PCR to Distiguish Common species of Dermatophytes. J Clin Microbiol. 2001; 39(9): 3382-3385.

10- Garag J, Tilak R, et al. Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. BMC Research Notes 2009, 2:60.

11- Haldane DJ. Robart E. A comparison of callcofluor white, potassium hydroxide and culture for the laboratory diagnosis of superficial fungal infection. Diagn microbial infect Dis. 1990; 13(4): 337-9.

12- Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of Aspergillus species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. J Clin Microbiol 2000; 38(4):1510-5.

13- Kanbe T, Yamaki K, Kikuchi A. Identification ofthe pathogenic Aspergillus species by nested PCR using a mixture of specific primers to DNA topoisomerase II gene. Microbiol Immunol 2002; 46(12): 841-8.

14. Koenraad H, Vandewoud E. Aspergillosis in the ICU-The new 21st century problem. Med Mycol 2006; 44: 71-76.

15- Lui D, pearce L, Lilley G, Coloe S, Baird R, Pedersen J. PCR identification of dermatophyte fungi Trichophyton rubrum, T. Soudanense and T. gourvilii. J Med Micribiol. 2002; 51(2): 117-22.

16- Mellado E, Aufauvre-Brown A, Specht CA, Robbins PW, Holden DW. A multigene family related to chitin synthase genes of yeast in the opportunistic pathogen Aspergillus fumigatus. Mol Gen Genet 1995; 246(3): 353-9.

17- Mirhendi H, Diba K, Kordbacheh P, Jalalizand N, Makimura K. Identification of pathogenic Aspergillus species by a PCR-restriction enzyme method. J Med Microbiol 2007; 56(Pt 11): 1568- 70.

18- Murray PR et al, editor: Manual of clinical microbiology. Ed 8, Washington DC, 2003, American Society for Microbiology.

19- Mycology Society. Aspergillosis. Available at: http://www.aspergillus.org.uk/. 2011.

20- Otero L, Palacio V, Vazquez F. Tinea cruris in female prostitutes. Mycopathologia 2002;153: 29-31.

21- Pounder JI, Williams S, Hansen D, Healy M, Reece K, Woods GL. Repetitive Sequence-PCR-BASED DNA Figerprinting Using the DiversLab system for Identification of Commonly Encountered Dermato-

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

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.1.5]

phytes. J Clin Microbiol. 2005; 43(5): 2141-2147.

22- Roque HD, Vieria R, Ra to S, Luz-Matins M. Specific primers for rapid detection of Microsporum audouinii by PCR in clinical samples. J Clin Microbiol. 2006; 44(12): 4336-41.

23- Skladny H, Buchheidt D, Baust C, Krieg Schneider F, Seifarth W, Leib Mösch C, et al. Specific Detection of Aspergillus Species in Blood and Bronchoalveolar Lavage Samples of Immunocompromised Patients by Two-Step PCR. J Clin Microbiol 1999 Dec; 37(12): 3865–71.

24. Verweij PE, Denning DW. The challenge of invasive aspergillosis: increasing numbers in diverse patient groups. Int J Infect Dis 1997; 2: 61-63.

25- Yamakami Y, et al. PCR detection of DNA specific for aspergillus species in serum of patients with invasive aspergillosis. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 1996, p. 2464–2468.

26. Young RC, Bennett JE, Vogel CL, C arbone PP, DeVita VT. Aspergillosis. The spectrum of the disease in 98 patients. Medicine (Baltimore) 1970; 49: 147-173.

27- Zaini F, Mehbod ASA, Emami M. Gharch shenasi Pezeshki jame. 3rd ed. Tehran: Moassese entesharat Daneshgahe Tehran: 1388. p. 133-139. (Persian).

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

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.7.25.1.5]