مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
پاییز ۱۳۹۳؛۶(۳): ۵۳۳-۵۴۰

Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
Autumn2014;6(3): 533-540

مقاله پژوهشی

کاربرد روش های مولکولی و سنتی برای شناسایی درماتوفیتوزیس انسانی در مناطق حاشیه دریاچه ارومیه

کامبیز دیبا[۱]، آرزو غیبی[۲]، زهرا دیلمی[۳]، زهرا یکتا[۴]، خسرو حضرتی تپه[۵]*

[۱]دانشیار قارچ شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
[۲]کارشناس ارشد میکروبیولوژی ، دانشگاه ازاد اسلامی زنجان، زنجان، ایران
[۳]استادیار میکروب شناسی، دانشگاه ازاد اسلامی زنجان، زنجان، ایران
[۴]دانشیار پزشکی اجتماعی، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
[۵]استاد انگل شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
[*]**نویسنده مسئول:** دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
پست الکترونیک: kambiz37diba@gmail.com

وصول: ۹۱/۱۰/۲۷ اصلاح: ۹۲/۲/۱ پذیرش: ۹۲/۶/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: *درماتوفیتوزیس ، عفونت پوست، مو یا ناخن است که به وسیله قارچ های کراتین دوست متنوعی موسوم به درماتوفیت ها ایجاد می شود. تینه آ جزء عفونتهای شایع در سراسر جهان می باشد. عفونت درماتوفیتی یک مشکل بهداشت عمومی محسوب می شود و از بیماری های شایع ایران نیز محسوب می گردد. هدف از انجام این تحقیق بررسی شیوع عفونت قارچی درماتوفیتی در منطقه آذربایجان غربی با کاربرد روش های مولکولی و سنتی بود.*

مواد و روش کار *: این تحقیق بر روی ۲۴۶ نمونه بالینی مشکوک به درماتوفیتوزیس جمع آوری شده از مراکز درمانی بیماریهای پوستی ارومیه انجام شد. بر روی نمونه ها آزمایش مستقیم و کشت به عمل آمد و نهایتا شناسایی گونه های درماتوفیتی جداسازی شده با استفاده از روش های متداول صورت گرفت.*

یافته ها *: از میان کل نمونه های بدست آمده، ۲۸ مورد مثبت درماتوفیتی شامل: ترایکوفیتون منتاگروفایتیس ۱۲ (۴۲/۸ ٪)، میکروسپوروم کانیس ۹ (۳۲/۱ ٪)، میکروسپوروم جیپسئوم ۴ (۱۴/۲ ٪)، ترایکوفیتون روبروم ۲ (۷/۱ ٪)، :ترایکوفیتون شوئن لاینی ۱ (۳/۵ ٪) شناسایی و تشخیص داده شدند.*

نتیجه گیری *: نتایج ما نشان داد که شیوع و درصد درماتوفیت ها در ارومیه و ایران از تغییر نسبی فزاینده ای برخوردار است.*

واژه های کلیدی*: شناسایی، درماتوفیتوزیس، ارومیه*

مقدمه

درماتوفیتوزیس، عارضه قارچی بافت های کراتینیزه شده مو، ناخن و لایه های شاخی پوست می باشدکه در نتیجه جایگزین شدن درماتوفیت ها دراین نسوج حاصل می گردد و در زمره شایع ترین عفونت ها درجهان است. از آنجا که عفونت های درماتوفیتی سطحی بوده و محدود به لایه شاخی هستند، مصونیت چندانی به میزبان نمی بخشند [۱،۲]. درماتوفیت ها، به عنوان عوامل این عفونت ها، گروهی از قارچ های رشته ای (کپکی) هستند که در بافت های کراتین دار (شاخی) پوست، مو و ناخن انسان و بسیاری از جانوران مستقر می شوند و با ترشح آنزیم های پروتئولیتیک مثل (کراتیناز)، از کراتین به عنوان منبع تغذیه استفاده می کنند [۱،۳]. درماتوفیت ها در پوست، موی سر و صورت، ناخن، پوست بدون موی بدن، کشاله ران، پا و دست ایجاد عفونت می کنند. این ارگانیزم ها گاهی از سطح اپیدرم فراتر می روند و نواحی عمیق تر

زنده، یعنی درم را گرفتار می کنند و مشخصه هایی نظیر درماتوفیتوزیس عمیق، کریون، گرانولوما را به بار می آورد [۴]. شناسایی درماتوفیت ها تا سطح گونه، از نقطه نظر تشخیص آزمایشگاهی و برای درمان هر چه بهتر و موثرتر بیماری، از لحاظ اپیدمیولوژی و اکولوژی به منظور درک راه های انتشار و سرایت بیماری، آن گاه قطع زنجیره های انتقال و پیش گیری از بیماری و نیز شناسایی عوامل درماتوفیتی بومی هر منطقه و بالاخره از نقطه نظر زیست شناسی و تاکسونومی حایز اهمیت است [۵]. کاربرد روش های مختلف تشخیص آزمایشگاهی همواره مورد مطالعه بوده تا با شناسایی دقیق درماتوفیت ها در سطح گونه، اولا در مطالعه اپیدمیولوژیک مناطق مختلف در جهان، برآورد صحیحی از نسبت و درصد موارد عفونت های درماتوفیتوزیس و عوامل ایجاد کننده ارائه نماید و دوم این که در موارد مقاومت به درمان عفونت های درماتوفیتی با به کار بردن شیوه مناسب درمانی به مقتضی گونه عامل بیماری پر ثمر باشد [۶]. روش های ملکولی برای شناسایی از حساسیت نسبتاً خوبی برخوردارند. از همه مهم‌تر این که سرعت عمل آن بسیار ایده ال می باشد و همچنین این تست ها وابسته به تشکیل بخش های اسپورزا نیستند. لذا مسئله پلئومورفیسم مشکلی ایجاد نمی کند. در میان روش های ملکولی، روش PCR-RFLP جزء روش هایی که برای شناسایی بسیاری از ارگانیسم ها از جمله درماتوفیت ها به کار برده می شود. در این روش محصول تکثیر یافته ژن مورد نظر با کاربرد آنزیم محدودساز، برش داده شده و قطعات به دست آمده در الکتروفورز تشکیل باندهایی می دهد که نهایتاً الگوهای شناسایی مطلوبی را ایجاد می نماید. با توجه به این که روش مذکور اخیرا در شناسایی میکروارگانیزم های مختلف از جمله قارچ ها کاربرد وسیعی یافته است، در این مطالعه برای تعیین هویت گونه های درماتوفیتی جداسازی شده از نمونه های بالینی روش مولکولی RFLP مورد استفاده قرار گرفته با روش سنتی مورفولوژی مقایسه گردید.

روش کار

در طول مدت یکسال مطالعه از تیر ماه ۱۳۸۹ تا خرداد ماه ۱۳۹۰ از چهار شهر استان آذربایجانغربی شامل ارومیه (شرق)، مهاباد (غرب)، بوکان (جنوب) و ماکو در شمال دریاچه ارومیه، ۲۴۶ نمونه بالینی از بیماران مشکوک به درماتوفیتوزیس مراجعه کننده به مراکز تخصصی پوست و مراکز بهداشتی درمانی جمع آوری شدند. نمونه ها از مراکز بهداشتی شهرستانها توسط پزشکان جمع آوری شده ارسال می گردید. در ارومیه با توجه به جمعیت بالای شهری و روستایی نمونه ها هم از مراکز بهداشتی درمانی و نیز از مطب برخی پزشکان متخصص سطح شهر و هم چنین کلینیک تخصصی وابسته به دانشگاه به آزمایشگاه قارچ شناسی پزشکی دانشکده پزشکی جمع آوری می گردید. نمونه برداری در مراکز و آزمایشگاه با استفاده از روش های تراشه برداری پوست، ناخن و تاول ها با اسکالپل و جداکردن ریشه موها با پنس انجام می شد. تشخیص آزمایشگاهی به وسیله آزمایش مستقیم توسط هیدروکسید پتاسیم ۲۰ ٪ و کشت بر روی محیط سابورود دکستروز آگار همراه با کلرامفی نیکل و سیکلوهگزامید انجام گرفت.

شناسایی مورفولوژیک: بطور خلاصه در صورت رشد درماتوفیت، از روی کشت روی لام (اسلاید کالچر) برای شناسایی ساختمان اسپورزایی قارچ استفاده شد. در صورت لزوم، محیط های اختصاصی شامل ترایکوفیتون آگار جهت تشخیص نوع درماتوفیت و محیط های حاوی اوره و کورن میل آگار به همراه ۲ ٪ دکستروز و تست سوراخ کردن مو به کار گرفته شد. تشخیص گونه های مختلف، بر اساس مشخصات کلنی ها وساختمان اسپورزایی قارچ شامل میکرو و ماکروکونیدی ها و اشکال اختصاصی صورت گرفت [۱] .

شناسایی مولکولی: ۱) استخراج DNA: به روش گلاس بید فنل کلروفرم[1] انجام گرفت، به این صورت که یک قطعه از توده هایفی فریز شده به وزن ۳۰۰ میکروگرم به همراه ۳۰۰ میکرولیتر گلاس بید (پرل های از سیلیس به قطر ۳/۰ تا ۴/۰ میلی لیتر، ۲۰۰ یکصد میلی مولار کلرید سدیم۲ ، تریتون ۱۰۰-x ۲٪ و SDS ۱٪) و نهایتا میکرولیتر بافرلیز(ده میلی مولار تریس۳ ، یک میلی مولار EDTA [PH=8]، به میزان ۲۵۰ میکرولیتر فنل

1-Glass beads- phenol chloroform
2-Nacl
3-Tris

کلروفروم در زیر هود کلاس II به یک لوله ۱/۵ میلی لیتری اپندورف استریل انتقال داده شده، سپس با کمک میکرودیسممبراتور با سرعت ۹۰۰ نوسان در دقیقه و به مدت ۶۰ ثانیه مخلوط به حرکت در می آید. سپس با کمک میکروفیوژ در سرعت 5000 g، DNA جدا شده به صورت مایع رویی به تیوب جدید منتقل و با حجم مساوی از کلروفرم مخلوط گردید تا یک بار دیگر مایع رویی عاری از اثر فنل جدا گردد. در مرحله ترسیب و تخلیص، حجم مساوی از ۲-پروپانول و یک دهم حجم استات سدیم ۳ مولار (pH=۵/۲) در شرایط سرما اضافه گردیده به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط فریز (۲۰- درجه سانتی گراد) و سپس سانتریفیوژ با دور بالای 12000g انجام گرفت تا DNA به شکل رسوب (pellet) از بقیه محلول جداشود و پس ازشستشو با الکل ۷۰ درصد رسوب نهایی در ۲۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه مجددا محلول گردید [۷]. برای بررسی و تایید جداسازی DNA از الکتروفورز افقی با ژل آگاروز ۱/۳٪ استفاده شد.

۲) واکنش زنجیره ای (PCR): بر اساس مطالعات قبلی انجام شده از پرایمرهای رفت و برگشت دو قطعه ITS_1 و ITS_2[1] که دارای تنوع[2] کافی برای افتراق گونه های درماتوفیت ها است استفاده گردید. توالی پرایمر ها به قرار زیر بودند: Forward-5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3', Reverse-5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3'. برای انجام موفقPCR، پس از انجام آزمایشات متعدد سرانجام مواد زیر با غلظت های ذکر شده برای انجام یک واکنش ۲۵ میکرولیتری استفاده شد (بافر واکنش۱۰X ۲/۵µL، پرایمر رفت۱۰پیکومولی ۰/۶ µL، پرایمر برگشت۱۰ پیکومولی ۰/۶ µL، کلرید منیزیم[3]۵۰۳ میلی مولار ۱/۸ میکرولیتر، dNTP ۲ میلی مولاریµL ۲/۵، آنزیم Taq پلی مرازی ۰/۲ µL، DNA الگو ۱ میکرولیتر، آب مقطر دیونیزه شده تا حجم ۲۵ میکرولیتر). برای اجرای تست RFLP ۱۳ میکرولیتر از محصول PCR در ۱/۵ میکرولیتر بافر ویژه آنزیم تحت اثر ۰/۵ میکرولیتر آنزیم محدود الاثر Mva I، استفاده گردید (کیت شناسایی درماتوفیت ها، آزمایشگاه دکتر میرهندی). به منظور تفکیک قطعات DNA، آگاهی از اندازه مخصوص PCR و نیز قابل رنگ آمیزی و قابل رویت کردن آن ها هر کدام از محصولات استخراج DNA، PCR وRFLP ژل آگارز ۱/۵٪ مورد استفاده قرار گرفت. نمونه کنترل مثبت مورد استفاده در این پژوهش مربوط به گونه شناسنامه دار ترایکوفایتون منتاگروفایتیس (UMSU-D220) می باشد. باندهای DNA با استفاده از دستگاه ژل داک رویت گردید [۷].

یافته ها

در طول مدت این بررسی از مجموع ۲۴۶ نمونه مشکوک به درماتوفیتوزیس، ۲۸ نمونه از نظر عفونت درماتوفیتی مثبت بودند که شامل: ترایکوفیتون منتاگروفایتیس ۱۲ (۴۲/۸٪)، میکروسپوروم کانیس ۹ (۳۲/۱٪)، میکروسپوروم جیپسئوم ۴ (۱۴/۲٪)، ترایکوفیتون روبروم۲ (۷/۱٪)، ترایکوفیتون شوئن لاینی ۱ (۳/۵٪) شناسایی و تشخیص داده شدند. درماتوفیتوزیس پوست سر و مو شایع ترین فرم کلینیکی ۱۱ (۳۹/۲٪) بود که میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیپسئوم، ترایکوفیتون شوئن لاینی عامل این نوع درماتوفیتوزیس بودند. پس از آن درماتوفیتوزیس ناخن دومین فرم کلینیکی شایع ۹ (۳۲/۱٪) بود که ترایکوفیتون منتاگروفایتیس و ترایکوفیتون روبروم در این نوع درماتوفیتوزیس نقش داشتند. کمترین میزان شیوع مربوط به درماتوفیتوزیس کف دست ۳/۵٪ بود. به تفکیک مناطق جغرافیایی از ۲۸ مورد مثبت، ۱۹ (۶۷/۸٪) مورد مربوط به مناطق روستایی و ۹ (۳۲/۲٪) مورد مربوط به مناطق شهری بودند. در این بررسی فاکتورهای زمینه ای برای ابتلا به درماتوفیتوزیس شامل: عدم رعایت بهداشت شخصی، تماس با حیوانات، سابقه داشتن عفونت درماتوفیتی در خانواده بیمار، ضربه وگاه نقص سیستم ایمنی می گردید.

در همین زمینه مطابق آنچه در جدول ۱ مشاهده می گردد بیشترین درصد فراوانی درماتوفیت جداسازی شده از ناحیه سر و صورت متعلق به میکروسپوروم کنیس می باشد، در صورتی که تریکوفیتون روبروم وتریکوفیتون منتاگروفایتیس در این جداسازی جایی نداشتند از طرفی تریکوفیتون منتاگروفایتیس درماتوفیت غالب در این مطالعه است که از ضایعات ناخن جدا شده است، در مقابل

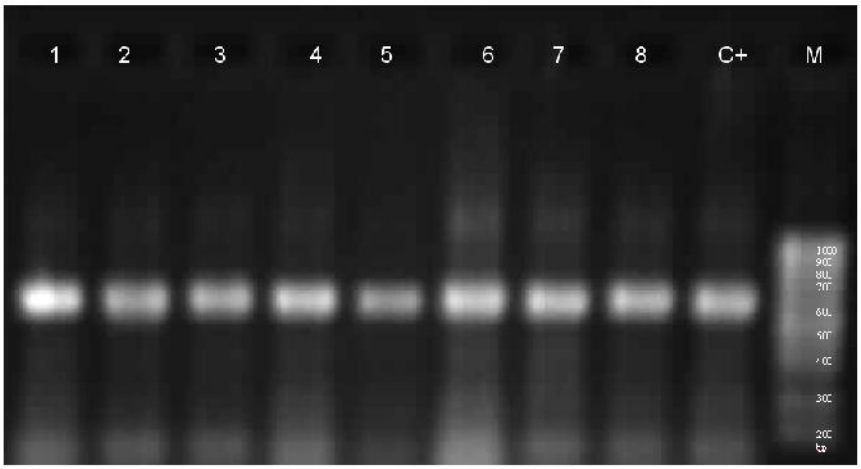
1-Internal Transcribed Spacer
2-Variation
3-Mgcl2

جدول۱: توزیع فراوانی مطلق و نسبی درماتوفیت های جدا شده از مواضع مختلف به تفکیک درماتوفیت

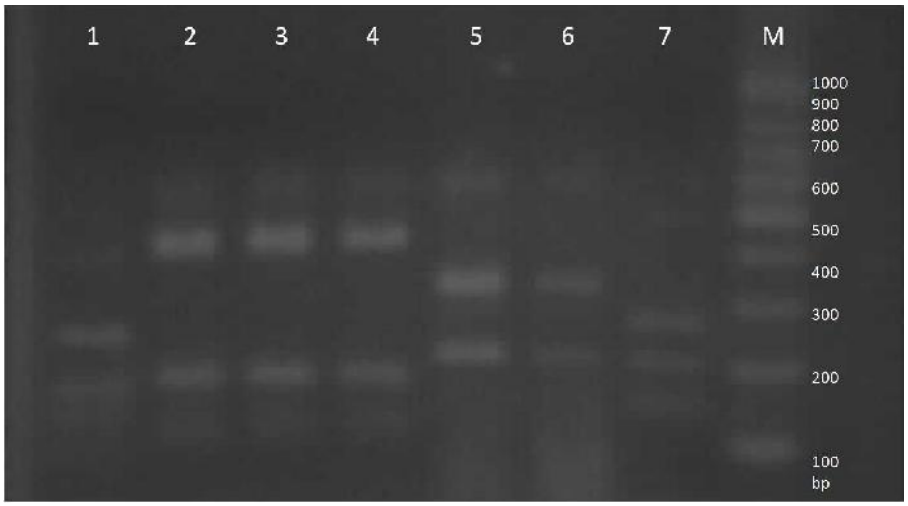
متغیر	تریکوفیتون منتاگروفایتیس	میکروسپوروم کنیس	میکروسپوروم جپسئوم	تریکوفیتون روبروم	تریکوفیتون شوئن لاینی	جمع کل
محل	(٪)N	(٪)N	(٪)N	(٪)N	(٪)N	(٪)N
پوست سر مو	(٪۰)۰	(٪۶۶/۶)۶	(٪۱۰۰)۴	(٪۰)۰	(٪۱۰۰)۱	(٪۳۹/۲۸)۱۱
ناخن	(٪۶۶/۶)۸	(٪۰)۰	(٪۰)۰	(٪۵۰)۱	(٪۰)۰	(٪۳۲/۱۴)۹
بدن	(٪۲۵)۳	(٪۳۳/۴)۳	(٪۰)۰	(٪۵۰)۱	(٪۰)۰	(٪۲۵)۷
کف دست	(٪۸/۴)۱	(٪۰)۰	(٪۰)۰	(٪۰)۰	(٪۰)۰	(٪۳/۵۸)۱
جمع	(٪۱۰۰)۱۲	(٪۱۰۰)۹	(٪۱۰۰)۴	(٪۱۰۰)۲	(٪۱۰۰)۱	(٪۱۰۰)۲۸

جدول۲ : توزیع درصد فراوانی موارد تشخیص داده شده درماتوفیتی با روش مولکولی

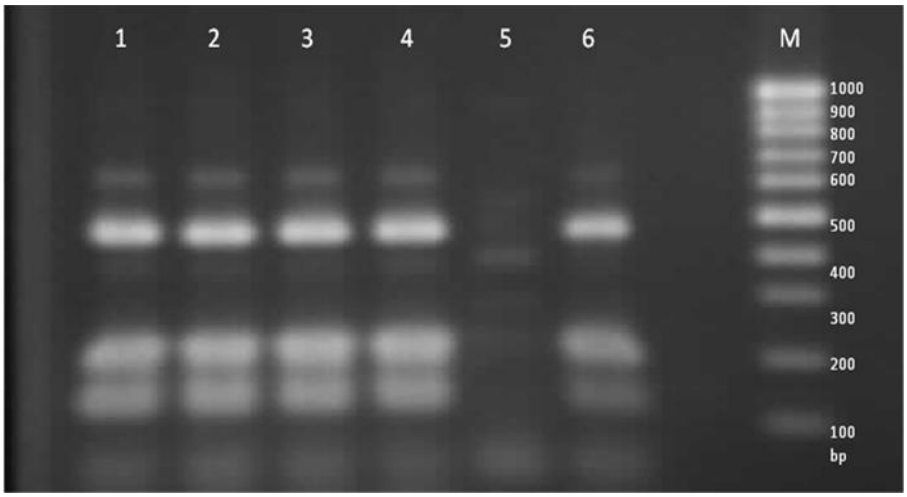
متغیر	تائید شده (مثبت) N (٪)	تائید نشده (منفی) N (٪)	جمع کل N (٪)
میکروسپوروم کنیس	۶ (٪۳۵/۲۹)	۲ (٪۴۰)	۸ (٪۳۴/۷۸)
ترایکوفیتون منتاگروفایتیس	۴ (٪۲۳/۵۲)	۳ (٪۶۰)	۷ (٪۳۰/۴۳)
میکروسپوروم جیپسئوم	۴ (٪۲۳/۵۲)	۰ (٪۰)	۴ (٪۱۷/۳۹)
ترایکوفیتون روبروم	۱ (٪۵/۸)	۰ (٪۰)	۱ (٪۴/۳۴)
اپیدرموفیتون فلوکوزوم	۲ (٪۱۱/۸۷)	۰ (٪۰)	۲ (٪۱۳/۰۶)
جمع کل	۱۷ (٪۱۰۰)	۵ (۱۰۰)	۲۲ (٪۱۰۰)



شکل۱: تصویر آگاروز الکترفورزیس مربوط به محصولات PCR نواحی ژنومی ریبوزومال DNA تکثیر شده.چنان که ملاحظه می گردد تمامی باند ها در سایز یکسان (۶۰۰-۷۰۰bp) قرار گرفته اند.+C به عنوان کنترل مثبت می باشد.



شکل ۲: تصویر الکتروفورز افقی محصولات هضم با آنزیم Mva I در گونه های جداسازی شده بالینی. ستونهای 1, 7 اپیدرموفیتون فلوکوزوم، ستونهای 2,3,4 میکروسپوروم کانیس و ستونهای ۵،۶ متعلق به ترایکوفایتون روبروم و ستون M مارکر ۱۰۰bp هستند.



شکل ۳: تصویر الکتروفورز افقی محصولات هضم آنزیمی Mva I ستونهای 1,2,3,4, 6 مربوط به گونه ترایکوفایتون منتاگروفایتیس، ستون M: مارکر 100 bp می باشند.

میکروسپوروم کانیس و میکروسپوروم جیپسئوم از نمونه ناخن به دست نیامد و تنها درماتوفیت جداسازی شده از نمونه کف دست تریکوفیتون منتاگروفایتیس می باشد. تمامی یافته های مربوط به شناسایی درماتوفیت ها از نمونه بالینی با تست ملکولی PCR-RFLP نیز بررسی شدند. در پروسه ملکولی به هدف تشخیص وجود الگوهای تفکیکی ضرورت داشت. نتایج پروسه PCR بر روی DNA استخراج شده از درماتوفیت ها بیانگر این بود که افتراق وتمایز قابل ملاحظه ای بین درماتوفیت های جداسازی شده از لحاظ طول قطعات تکثیر یافته وجود ندارد (شکل ۱). بر این اساس ما قادر شدیم که گونه های درماتوفیتی میکروسپوروم کنیس، تریکوفیتون منتاگروفایتیس، میکروسپوروم جیپسئوم، تریکوفیتون روبروم و اپیدرموفیتون فلوکوزوم را افتراق داده و شناسایی نماییم. نتایج یافته های ملکولی در جدول شماره ۲ مشاهده می شود که بر این اساس به طور کلی از میان ایزوله های درماتوفیتی شناسایی شده (۲۸ مورد)، ۲۳ مورد با روش PCR-RFLP مورد شناسایی قرار گرفتند که البته

تغییرات کوچکی در درصد فراوانی موارد شناسایی شده درماتوفیت های مورد آزمایش مشاهده گردید. اختلاف ۵ مورد مشاهده شده بین دو روش مربوط به تعداد موارد ترایکوفیتون منتاگروفایتیس و شناسایی ترایکوفیتون شوئن لاینی می باشد.

بحث

با توجه به این که روش های مبتنی بر مورفولوژی، شیوه های سخت، زمانبر و نیازمند به تخصص و تجربه زیاد بوده همچنین از حساسیت بالایی برخوردار نیستند، لذا این روش ها با وجود اصالت، قدمت و در برگیرندگی، اخیرا کمتر مورد توجه قرار گرفته اند. هر چند موارد معدود در مقالاتی اشاره شده اند [۸]. روش های ملکولی بر پایه آمپلیفیکاسیون یک قطعه ژنی مثل ITS جهت شناسایی، تعیین هویت گونه ها و تفکیک بین گونه ها و زیر گونه ها بسیار مناسب هستند. گذشته از این مقوله این روش ها زمان بر نیستند و نیاز به کادر تخصصی ندارند و به جز مورد تعیین توالی ژنی بقیه موارد نسبتا ارزان و مقرون به صرفه می باشند و با توجه به اینکه اخیرا بسیار توجهات را به خود جلب کرده است محققین موضوعات جدید، تلاش می کنند از این روش ها در نتایج خود بهره ببرند [۹]. روش مورد استفاده در این مطالعه کاربرد آنزیم محدودساز برای ایجاد الگوی تفکیکی، تاکنون در بسیاری از موارد تفکیک و شناسایی گونه های میکروبی و قارچی و حتی خود درماتوفیت ها مورد استفاده قرار گرفته است. از این جمله می توان به مطالعات لیو[1] در سال ۱۹۹۹، بلنز[2] در سال ۲۰۰۰، کولین[3] در سال ۱۹۹۹، جکسون[4] در سال۱۹۹۹ اشاره نمود [۱۲-۹]. البته در این میان افرادی نظیر کنب[5]در سال ۲۰۰۳ از ناحیه ژنی متفاوت مثل ژن توپروایزومراز II برای تکثیر DNA درماتوفیت ها استفادنمود [۱۳]. کامیا [6] در سال ۲۰۰۴ از ژاپن ناحیه ژنی NTS از ژن ریبوزومال DNA و همچنین ژن توپوایزومراز II را برای تفکیک و شناسایی گونه های درماتوفیتی از جمله تریکوفیتون روبروم، ترایکوفیتون منتاگروفایتیس، تریکوفیتون تونسورانس، میکروسپوروم کنیس، میکروسپوروم جیپسئوم و اپیدرموفیتون فلوکوزوم مورد استفاده قرار دادند [۱۴]. در مطالعه حاضر ناحیه ژنی ریبوزومال DNA که یک ژن فیلوژنیک محسوب می گردد که در بسیاری از موارد تعریف گونه ها، جابجایی گونه ها و طبقه بندی کاربرد دارد، مورد استفاده قرار گرفت. گذشته از موارد معدودی که مرتبط با ژن های دیگر جهت شناسایی درماتوفیت ها تعریف شده اند ناحیه ژنی ITS شامل قطعاتITS1 , ITS2 زیر مجموعه ژن DNA ریبوزومی در غالب مطالعات مورد استفاده قرار گرفته اند و نتایج خوبی گرفته اند [۱۴-۱۶]. در مطالعه حاضر که ۵ گونه درماتوفیتی از منابع بالینی جداسازی شده اند ضرورت یک روش جامع با قدرت تفکیکی بالا را می طلبید. در بین روش های مختلف بر پایه PCR تعیین ترادف ژنی برترین روش با قدرت تفکیک بالا و حساسیت و ویژگی خوب می باشد اما این روش چنان که می دانیم هزینه بر و نیازمند به ابزار و امکانات پیشرفته می باشد که اساسا در آزمایشگاه های طبی با روش های متداول امکان بهره برداری پیدا نکرده است [۱۰]. در مقابل روش های دیگر که در بالا نام برده شد مقرون به صرفه تر بوده و نیاز به امکانات کمتری دارد اما این روش ها عمدتا از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار نیستند در این میان روش PCR-RFLP با برخورداری از تنوع آنزیمی مورد استفاده، توانسته است حساسیت و ویژگی بالاتری را کسب کند و به همین دلیل کاربرد وسیعی در تفکیک و شناسایی گونه های متنوعی داشته است. در این مطالعه با عنایت به مزایای شمرده شده در بالا روش PCR- RFLP انتخاب شده برای شناسایی و تفکیک ایزوله های درماتوفیتی در سطح گونه به کار گرفته شد. انتخاب آنزیم محدود ساز MvaI با توجه به تجارب دیگران صورت گرفت [۷]، گذشته از این که با توجه به ناحیه ژنی انتخابی آنزیم محدود ساز MvaI قادر بود که گونه های بیشتری را از طریق هضم درون ناحیه تفکیک و مورد شناسایی قرار دهد [۷،۱۷]. در مطالعه میرزاحسینی و همکاران آنزیم های Hae III ,Hinf I همراه با MvaI مورد استفاده قرار گرفتند که نتیجه آن ایجاد الگوهای

1-liu
2-Blanz
3-Colin
4 -Jakson

شناسایی برای تفکیک ۶ گونه درماتوفیتی شامل تریکوفیتون منتاگروفایتیس، تریکو فیتون روبروم، تریکو فیتون وروکوزوم، تریکوفیتون تونسورانس، میکروسپوروم کنیس، اپیدرموفیتون فلوکوزوم بود [۱۷]. در مطالعه حاضر از میان ۲۴۶ نمونه ۲۳ مورد مثبت درماتوفیتی شناسایی نمود و همان طور که در جدول (۲) مشاهده می شود گونه های میکروسپورم کنیس، تریکوفیتون منتاگروفایتیس، میکروسیوروم جیپسئوم، تریکوفیتون روبروم، اپیدرموفیتون فلوکوزوم مورد شناسایی قرار گرفته است. در مطالعات دیگران بسته به مناطق جغرافیایی، گونه های متفاوتی از درماتوفیت ها گزارش گردیده است از جمله در مقاله ای که به وسیله کولین [۱۱] انجام شد ضمن اینکه در شناسایی گونه ها از نواحی ژنی ITS و همچنین آنزیم MvaI برای هضم DNA مورد استفاده قرار گرفته است به گونه هایی چون تریکوفیتون منتاگروفایتیس، تریکوفیتون سودانس، تریکوفیتون کوئینکنوم، تریکوفیتون شوئن لاینی اشاره گردیده است. چنانکه ملاحظه می شود تریکوفیتون روبروم و تریکوفیتون شوئن لاینی دو گونه درماتوفیتی هستند که در مطالعه ما نیز با روش کلاسیک شناسایی شده اند. در یک مطالعه مشابه که در دانشگاه تیاگارایا هندوستان توسط بایالاکشمی در سال ۲۰۰۸ انجام گرفت روش PCR-RFLP در ناحیه ژنی rDNA برای شناسایی سویه های مختلف گونه تریکوفیتون روبروم به کار گرفته شده است در این مطالعه روش ملکولی با روش میکروسکوپی مقایسه شده که تنها در ۱۹ درصد موارد هر دو روش به نتیجه یکسان رسیدند [۱۸]. در مقایسه، روش های مورفولوژی و ملکولی در مطالعه ما به ترتیب به ۷/۱۴ درصد و ۴/۳۴ درصد فراوانی این قارچ را اشاره کرده اند که در واقع می توان گفت در ۵۰ درصد موارد دو روش توافق دارند. در حالی که در مطالعه ما روش های مورفولوژی و ملکولی به ترتیب به ۷/۱۴ درصد و ۴/۳۴ درصد فراوانی این قارچ اشاره کرده اند که در واقع می توان گفت در ۵۰ درصد موارد و روش توافق دارند . لذا در مطالعه ما نتایج روش ملکولی به روش کلاسیک نزدیک تر می باشد . بطور کلی با مقایسه دو روش به کار برده شده تفاوت هایی در بین تعداد یافته ها مشاهده گردید. در مطالعه ای دیگر که توسط یزدان پرست و همکاران در ایران انجام شد، نمونه های بیماران با ضایعات ناخن مورد بررسی قرار گرفت که با استفاده از تنها متد PCR بر روی ژن rDNA شناسایی استرین های مختلف گونه تریکوفیتون روبروم انجام گرفت [۱۹]. با توجه به محدود بودن هدف مطالعه که تریکوفیتون روبروم بوده است ظاهرا استفاده از جفت پرایمر در واکنش PCR در شناسایی گونه بالا کفایت داشته است. در غیر این صورت و چنانکه در مطالعه ما قبلا مورد بحث قرار گرفت شناسایی تعداد بیشتری از درماتوفیت ها نیازمند به استفاده از آنزیم های محدود ساز در روش RFLP می باشد که با هضم یا ایجاد برش در قطعات تکثیر یافته (آمپلی فیکاسیون) PCR یک الگوی شناسایی قادر به تفکیک گونه های درماتوفیتی را فراهم می سازد. با توجه به اینکه گونه های درماتوفیتی شناسایی شده در مطالعه ما در اکثر مطالعات ایران [۳،۷] مشترک هستند این موضوع می تواند تبعیت اکولوژیک درماتوفیت های منطقه آذربایجان غربی به خصوص ارومیه از شیوع کلی درماتوفیت های مناطق دیگر ایران راتائید نماید.

نتیجه گیری

تست های ملکولی به طور کلی از مزایایی چون سرعت عمل، عدم نیاز به تخصص و تجربه افراد و دقت عمل برتر از روش های مورفولوژیک هستند و در این مورد خاص یعنی روش RFLP با وجود حساسیت پایین تر روش اما به دلیل سادگی، سرعت و عدم نیاز به فرد متخصص می تواند به عنوان جایگزین مناسبی برای شناسایی مهم ترین یا شایع ترین عوامل درماتوفیتی در ایران می باشد. نتایج تحقیقات مولکولی ما نشان داد که شیوع و درصد درماتوفیت ها در ارومیه و ایران از یک تغییر فزاینده برخوردار است.

تشکر و قدردانی

نتایج این مطالعه از طرح پژوهشی" بررسی اپیدمیولوژی مولکولی درماتوفیتوزیس انسانی در استان آذربایجان غربی" مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ارومیه با شماره ۸۵۰ در تاریخ ۸۹/۱۱/۲۰ استخراج گردیده است، لذا از آن معاونت برای حمایت های مالی و اداری سپاسگزاری می گردد. از پروفسور حسین میرهندی برای رهنود های ارزنده ایشان، از آقای داود

جباری برای کمک بی دریغ فنی، از پزشکان مراکز بهداشتی شهرستانهای مهاباد، خوی، ماکو و کلینیک ویژه قدس دانشگاه علوم پزشکی ارومیه برای حمایت های بی شائبه در زمینه پشتیبانی نمونه های بالینی قدردانی می گردد.

References

1. Zeini F, Mehbod SA, Emami M, Comprehensive Medical Mycology, Jahad-daneshgahi, Tehran, Third Edition: 2009, 111-190.
2. Sotudehnia AH., Jawetz Medical Microbilogy, Arjomand, Tehran, Third Edition: 2003, 560-569[Persian].
3. Mahboobi A, Baghestani S, Hamedi Y, Epidemiology of Dermatophytosis in Bandar-Abbas during 2003-2005, HMJ 2005; 9(4): 227-234[Persian].
4. Moshir M, Skin Diseases, IUMS Jahad-daneshgahi, First edition: 1992, 34[Persian].
5. Omran N, Hashemi SJ, Hashemi Farshad, Epidemiologic study of the cutaneus and superficial mycoses in 5500 cases in Tehran, IUMS J 2010; 68(1): 45-53[Persian].
6. Shadzi S, Medical Mycology (Diagnostic methods and Treatment), IUMS Jahad-Daneshgahi, eighth edition 2004.
7. Mirhendi SH, Nooripur S, Shidfar MR, Identification and differentiation of Trichophyton rubrum and Trichophyton mentagrophytis using PCR-RFLP method, JAD 2008; 13(2): 40-48.
8. Almeida SR, Immunology of dermatophytosis, Mycopathologia 2008; 166(5-6): 77-83.
9. Liu D, Coloe S, Baird R, Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi, JMM 2000; 49:493-497.
10. Blanz P, Buzina W, Ginter G, Gräser Y, Molecular biological methods and their consequences in taxonomy and diagnosis of dermatophytes, Mycoses 2000; 43 (1):11-6.
11. Colin J, Jackson E, Richard C, Species Identification and Strain Differentiation of Dermatophyte Fungi by Analysis of Ribosomal-DNA Intergenic Spacer Regions, J Clin Microbiol 1999; 37(4):931-936.
12. Jackson C, Barton R, Evans G, Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions, J Clin Microbiol 1999; 37 (4): 1-6.
13. Kanbe T, Suzuki Y, Kamiya A, Mochizuki T, Kawasaki M, Fujihiro M, Kikuchi A, Species-identification of dermatophytes Trichophyton, Microsporum and Epidermophyton by PCR and PCR-RFLP targeting of the DNA topoisomerase II genes, J Dermatol Sci 2003; 33(1): 41-54.
14. Kamiya A, Kikuchi A, Tomita Y, Kanbe T, PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis, J Dermatol Sci 2004; 34(1):35-48.
15. Chermette R, Ferreiro L, Guillot J, Dermatophytoses in animals, Mycopathologia 2008; 166(56): 385-40.
16. Schwinn A, Ebert J, Bröcker EB, Frequency of Trichophyton rubrum in tinea capitis, Mycoses 1995; 38(12): 1-7.
17. Mirzahoseini H, Omidinia E, Shams-Ghahfarokhi M, et al, Application of PCR-RFLP to rapid Identification of the Main pathogenic Dermatophytes from clinical specimens, J Publ Health 2009; 38(1): 18-24[Persian]
18. Bagyalakshmi R, Senthilvelan B, Application of polymerase chain reaction (PCR) and PCR based restriction fragment length polymorphism for detection and identification of dermatophytes from dermatological specimens, J Clin Microbiol 2008; 53(1):15-20.
19. Yazdanparast SA, Differentiation of Trichophyton rubrum strains isolated from onicomycosis by using PCR, IUMSJ 2004; 43(11): 34-39[Persian].

Original Article

Use of the molecular and conventional methods for the identification of human Dermatophytosis in Urmia Lake's peripheral area

*Diba K *[1], Gheibi A[2], Deilami Z[3], Yekta Z[4], Hazrati Kh[5]*

[1]Associate Professor of Medical Mycology, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
[2]Ms in Microbiology, Azad University of Zanjan, Zanjan, Iran
[3]Assistant Professor of Microbiology , Azad University of Zanjan, Zanjan, Iran
[4]Associate Professor of Social Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
[5]Professor of Parasitology, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

***Corresponding Author:** School of Medicine, Urmia University of Medical Science ,Urmia, Iran
Email: kambiz37diba@gmail.com

Abstract

Background & objectives: *Dermatophytosis is the infection of skin, hair and nail that is caused by various keratinophilic dermatophytes. It is a common infection wide spreading in the world and a public problem common endemic disease in Iran. As a short study we assessed the frequency of dermatophytic cutaneus infections in west Azarbayejan, Iran.*

Methods & Material: *A total of 246 specimens were collected from clinically suspected. All patients were referred to medical mycology lab for the laboratorial identifications.*

Results: *Among 246 clinical samples examined, 28 positive patterns of dermatophytes were identified and five dermatophyte species including Trichophyton mentagrophytes (42.8%) Trichophyton rubrum (7.1%), Microsporum canis (32.1%), Microsporum gypseum (14.2%) and Trichophyton schoenleini (3.5%) were identified.*

Conclusion: *Our results showed that the frequency and prevalence of dermatophytic infections have an increasing mode in Urmia, Iran.*

Key words*: Identification, Dermatophyte, Urmia*

Submitted:16 Jan 2013
Revised:21 Apr 2013
Accepted:7 Sep 2013