Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 18:42 +0330 on Tuesday February 19th 2019

تشخیص مولکولی گونه‌های کاندیدا با استفاده از ژن کدکننده ۶۵ کیلودالتونی مانوپروتئین به روش PCR

فرحناز بینشیان[۱](M.Sc)،محمدحسین یادگاری[۱*](Ph.D)، زهره شریفی[۲](Ph.D)، محمدرضا اکبری عیدگاهی[۳](Ph.D)، رضا نصر[۳](M.Sc)

۱- *دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی*

۲- *موسسه عالی آموزشی وپژوهشی طب انتقال خون، مرکز تحقیقات انتقال خون*

۳- *دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی سمنان، مرکزتحقیقات بیوتکنولوژی*

چکیده

سابقه و هدف: عفونت‌های قارچی مهاجم به عنوان یک مشکل اساسی در سلامت عمومی گزارش می‌شود به ویژه کاندیدیازیس سیستمیک که موجب افزایش مرگ و میر در افراد ایمنوکومپرامایز از قبیل بیماران ایدزی و نوتروپنیک تحت شیمی‌درمانییا پیوند مغز استخوان می‌شود. تشخیص اولیه کاندیدیازیس سیستمیک اغلب مشکل است در نتیجه درمان موثر اغلب با تاخیر شروع می‌شود. بنابراین استفاده از روش‌هایی جهت کاهش زمان تشخیص عفونت‌های قارچی با کاهش مرگ و میر بیماری منتشره مرتبط می‌باشد.ژن مانوپروتئین ۶۵ کیلودالتونی کاندیدا آلبیکنس کاندید مناسبی برای تشخیص می‌باشد. هدف از این مطالعه شناسایی گونه‌های متفاوت کاندیدا (آلبیکنس، گلابراتا، پاراپسیلوزیس) با استفاده از تکنیکPCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بر روی ۱۰۷ مورد نمونه‌های کلینیکی آزمایش‌های کشت در محیط کورن‌میل آگار حاوی توئین ۸۰، تولید لوله زایا در محیط سرم،کشت در محیط کروم آگار هم‌چنین تست‌های جذب قندی با استفاده از کیت API 20 C AUX (Biomerieux,France) برای شناسایی انواع مختلف کاندیدا انجام شد.آزمایشPCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه برای ژن مانوپروتئین ۶۵ کیلودالتونی بر روی تمام نمونه‌ها انجام شد.

یافته‌ها:با استفاده از روش‌های کشت وتست‌های بیوشیمیایی۱۰۰مورد نمونه کاندیدا آلبیکنس،۶ مورد کاندیدا گلابراتا و۱ مورد کاندیدا پاراپسیلوزیس جدا شده از نمونه‌های کلینیکی شناسایی شدند.آزمایشPCRبا پرایمرهای اختصاصی گونه بر روی نمونه‌های کلینیکی انجام شد که در همه مواردیک باند با طول قطعه مورد انتظار برای کاندیدا آلبیکنس، گلابراتا و پاراپسیلوزیس (۱۲۴bp، ۳۶۱bp، ۴۷۵bp) به ترتیب به دست آمد و با همه موارد گونه‌های تشخیص داده شده با روش کشت مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری:نتایج این مطالعه نشان داد که روش PCR با به‌کارگیری پرایمرهای اختصاصی گونه کاندیدا جهت شناسایی گونه‌های کاندیدا روشی قابل تکرار،سریع واختصاصی است.

واژه‌های کلیدی: مانوپروتئین ۶۵، کاندیدا، تشخیص مولکولی

مقدمه

شیوع بیماری کاندیدیازیس مهاجم در طی چند دهه اخیررو به افزایش است به علت افزایش بیماران ایدزی، پیوندهای ارگان ودیگر بیماران ایمنوکومپرامایز بروز بیماریکاندیدیازیس افزایشیافته است [۱].

کاندیدمیا به عنوان چهارمین عفونت بیمارستانی با مرگ و

* نویسنده مسئول، تلفن:۸۲۸۸۳۵۷۲-۰۲۱ نمابر:۸۲۸۸۳۰۳۰-۰۲۱ Email: yadegarm@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۸/۱۱

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 18:42 +0330 on Tuesday February 19th 2019

میر ۵۰٪ گزارش شده است [۲] .شروع درمان ضد قارچی اولیه برای بهبودی بیماران ضروری است. تشخیص اولیه اغلب مشکل است علایم کلینیکی غیر اختصاصی و کشت‌ها اغلب منفی و یا با تاخیر مثبت می‌شوند که برای شروع درمان ضد قارچی خیلی دیر است. در ۵۶٪ موارد کشت‌های منفی خون از نظر کاندیدیازیس منتشره،ارگانیسم بعد از اتوپسی جدا گردیده که نشانگر عدم تشخیص به موقع و تاخیر در درمان می‌باشد [۳].

کاندیدا آلبیکنس شایع‌ترین جنس بیماری‌زا است و بعد از آن گونه‌های گلابراتا وکروزی رو به افزایش هستند و پاراپسیلوزیس و تروپیکالیس در موارد کم‌تر می‌باشند چون چندین گونه کاندیدایی غیر آلبیکنس مقاوم به داروهای ضد قارچی شناخته شده‌اند بنابراین شناسایی کاندیدا در سطح گونه برای تعیین درمان ضد قارچی مناسب بسیار اهمیت دارد [۴]. مصرف گسترده و مکرر آزول‌ها به‌ویژه فلوکونازول منجر به توسعه سریع مقاومت آزول در کاندیدا آلبیکنس می‌گردد [۵].توسعه و گسترش مقاومت دارویی آزول در میان استرین‌های کاندیدا آلبیکنسیک مشکل مهم پزشکی است و درمان عفونت‌های قارچی مقاوم به دارو خیلی مشکل‌تر و گران‌تر از آن دسته از عفونت‌های کاندیدایی حساس می‌باشد [۶].

مانوپروتئینیک ماکرومولکول هتروژن ترکیبیافته از مانوز،گروه فسفات،پیوندهایNلینک وO لینک با پروتئین‌های با وزن‌های مولکولی مختلف می‌باشد اهمیت مانوپروتئین‌ها در اتصال کاندیدا به بافت و برانگیختگی پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال میزبان مشخص شده است[۹,۸,۷].

مانوپروتئین ۶۵ کیلودالتونی دارای پیوندهایOگلیکوزیدی و حساس به قلیا می‌باشد و امروزه یکی ازمهم‌ترین پروتئین‌های قابل اهمیت در اتصال کاندیدا به ماتریکس خارج سلولی بوده وجهت ایجاد بیوفیلم موثرمی‌باشد[۱۰].

مانوپروتئین ۶۵ کیلودالتونی هم به‌صورت ساختمانی و ترشحی به‌ویژه در فرم هایفی کاندیدا وجود داردفرم هایفی باعث افزایش قدرت تهاجم قارچ در مقایسه با فرم مخمری می‌شود این پروتئین دارای چندین سایت گلیکوزیلاسیون می‌باشد این پروتئینیک آنتی‌ژن اصلی برای پاسخ CMI به‌شمار می‌رود مانوپروتئین ۶۵ کیلودالتونییک ادهیژن بتاگلوکوناز بوده که عضوی از خانواده گلیکوزیل (GH17) هیدرولاز می‌باشد ودر مرفوژنز و چسبندگی و بیماری‌زایی میزبان نقش اصلی را بازی می‌کند [۳-۱،۷،۱۰،۱۱].به این دلایل تمایل زیادی جهت توسعه روش‌هایی با تکنولوژی‌هایجدید برای شناسایی و تشخیص سریع گونه‌های مختلف درکاندیدیازیس مهاجم وجود دارد.

تغییراتی در طیف گونه‌های مختلف کاندیدا مشاهده شده است به طوری که گونه‌های کاندیدایی غیر آلبیکنس در ایزوله‌های کلینیکی افزایشیافته است.افزایش بروز عفونت کاندیدایی خون به علت کاندیدا پاراپسیلوزیس وکاندیدا گلابراتا [۱۲] کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا کروزی[۱۳] گزارش شده است.

محققین آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی کلینیکی جهت شناسایی و تشخیص صحیح و سریع کاندیدای بیماری‌زا در تلاش هستند. اگر چه تست‌های آزمایشگاهی متنوع برای تشخیص متابولیت‌ها، آنتی‌بادی‌ها، آنتی‌ژن‌های اختصاصی کاندیدا توسعه‌یافته است اما همه آن‌ها فاقد حساسیت و ویژگی لازم بوده هم‌چنین زمان آزمایش طولانی است [۱۵،۱۴].

افزایش بروز عفونت‌های قارچی در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی و اهمیت مقاومت داروهای ضد قارچی در این دسته از بیماران منجر به توجه و تشخیص سریع عفونت‌های قارچی مهاجم با استفاده از تکنیک‌های بیولوژی مولکولی شده است.اکثر روش‌های مولکولی قادر به تشخیص بیماراندر مراحل اولیه عفونت قارچی هستند هم‌چنین شناساییقارچ‌های بیماری‌زا به وسیله تکنیک‌های مبتنی بر DNA روش‌های سریع‌تری از روش شناسایی مبتنی بر کشت می‌باشد.بنابراین در این مطالعه،روش PCR به منظورشناسایی کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا و کاندیدا پاراپسیلوزیس درایزوله‌های کلینیکی با استفاده از پرایمرهای ژنی توسعه داده شد.

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 18:42 +0330 on Tuesday February 19th 2019

مواد و روش‌ها

۱۰۷ مورد نمونه‌های کلینیکی(۶۶ ایزوله ازبیماران ایدزی مبتلا به کاندیدیازیز دهانی و ۵۰ ایزوله از بیماران مبتلا به واژینیت کاندیدیایی و ۱ ایزوله ازگروه قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران) تهیه گردید.

سوش‌های استاندارد کاندیدا آلبیکنس ATCC۱۰۲۳۱، کاندیدا گلابراتا ۶۶۰۳۲ ATCC، پاراپسیلوزیس ۹۰۰۱۸ ATCCدر این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.تمام نمونه‌های کلینیکی بر روی محیط سابارودکستروز آگار به همراه کلرامفنیکل کشت داده شدند.گونه‌های کاندیدا با انجام آزمایش‌های کشت در محیط کورن‌میل آگار حاوی توئین ۸۰و تولید لوله زایا در محیط سرم و کشت در محیط کروم آگار و تست‌های جذب قندی با استفاده از کیت API 20 C AUX (Biomerieux, France)شناسایی شدند.

استخراجDNA .استخراج DNA از نمونه‌های بالینی به روش فنل‌کلروفرم پرل شیشه‌ای صورت گرفت. هم‌چنین از کیت استخراج DNA ژنومی Prime prep Genomic DNA Isolation kit (from Blood)جهت استخراج DNA از رقت‌های ژنومی تهیه شده، استفاده گردید.برای تهیه رقت‌های ژنومی، ۵ ویال حاوی ۱ سی‌سیاز سرم افراد دهنده سالم با غلظت‌های به ترتیب ۵۰-$۱۰^{۲}$-$۱۰^{۳}$- $۱۰^{۴}$- $۱۰^{۵}$ از کاندیدا آلبیکنس، کاندیداگلابراتا و کاندیدا پاراپسیلوزیس به طور جداگانه آماده شدند.

PCR.ابتدا جهت راه‌اندازی واکنشPCR با استفاده از هر جفت پرایمر ویژه گونه (آلبیکنس al-F ATGTTATTCAAGTCTTTCGTTACT, al-R TGACATTAAATCCAGATAATTGAGC گلابراتا Gla-F GATGTTGTCACTAAGACTGTTCA، Gla-R AGTAGGAAGACAACTTGGCAAGG وپاراپسیلوزیس Par-R CTTCCGAAGCTAGCCAAGT [۳]، Par-F GAGGATGAAGTGGAGTCG)

واکنش انجام شد. برای انجام واکنشPCRبه حجم ۲۵ میکرولیتری حاوی۱۲/۵ میکرولیتر از Master mix (سیناژن)و۱ میکرولیتر از پرایمر فوروارد حاوی ۱۰ میکرومول و۱ میکرولیتر از پرایمر ریورس حاوی ۱۰ میکرومول از هر جفت پرایمر اختصاصی گونه و ۱۰-۱ نانوگرم از هر کدام از DNAسه گونه‌ی کاندیدا و با آب مقطر دیونیزه استریل به حجم ۲۵ میکرولیتررسانده شد.میکروتیوب‌ها جهت تکثیر DNAدر داخل دستگاه Eppendorf Mastercycler Gradient قرار داده شدند. سیکل دمایی شامل: دناتوراسیون آغازین۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه یک سیکل،۳۰سیکل با دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، آنلینگ ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، توسعه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه در پایان توسعه نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه بود. محصول PCR روی ژل آگاروز ۲٪ همراه با اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند سپس باندهای روی ژل،تحت اشعه UV با دستگاهUVdoc عکس‌برداری شد.

برای اختصاصی بودن پرایمر ویژه گونه‌ها،واکنش PCR با استفاده از سه جفت پرایمر گونه‌های متفاوت بر روی DNA استخراج شده از هرگونه انجام شد.هم‌چنین DNA استخراج شده از سه گونه متفاوت با یک جفت پرایمر انجام شد.برای تعیین ویژگی واکنش PCR،واکنش فوق بر روی آسپرژیلوس، ساکارومایسس سرویزیه، کریپتوکوکوس،کاندیدا تروپیکالیس وکاندیدا کروزی نیز انجام شد.

در نهایت محصولات PCR نمونه‌های تکثیر شده با پرایمرهای اختصاصی طبق پروتکل کیت Silica Bead DNA Gel Extraction Kit(K0513) تخلیص شد و جهت تعیین توالی به همراه پرایمرهای مربوطه به شرکت Bioneer ارسال گردیدند.

نتایج

از ۵۰ بیمار مبتلا به واژینیت کاندیدایی ۳۴ مورد(۶۸٪) کاندیدا آلبیکنس و ۶ مورد (۱۲٪)کاندیدا گلابراتا و از ۶۶ ایزوله از کاندیدیازیس دهانی بیماران ایدزی ۶۶ مورد کاندیدا آلبیکنس و۱ ایزوله ازگروه قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران کاندیدا پاراپسیلوزیس با روش‌های کشت وکیتAPI 20 C AUX تعیین هویت شدند.بر روی ۶۶ مورد کاندیدا آلبیکنس جدا شده از کاندیدیازیس

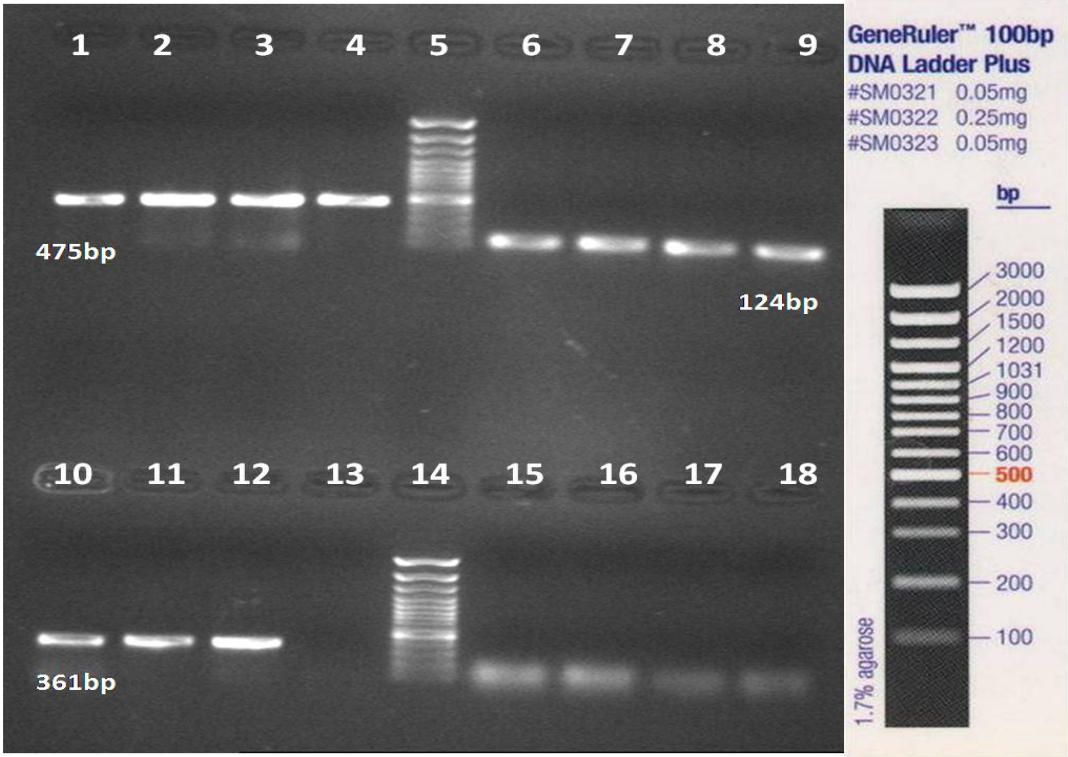
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 18:42 +0330 on Tuesday February 19th 2019

دهانی بیماران ایدزی و۳۴ مورد کاندیدا آلبیکنس جدا شده از واژینیت کاندیداییآزمایشPCR با پرایمرهـای اختصاصـی ژن مـانوپروتئین ۶۵ کیلودالتـونی انجـام شـد ودر ۱۰۰٪ مـوارد نتایجPCR اختصاصی بوده وقطعه۴۷۵ bp که نشانه تکثیـر ژن مانوپروتئین ۶۵ کیلودالتونی کاندیدا آلبیکنس می‌باشد به‌دسـت آمد (شکل ۱ و ۲).

۶ مورد کاندیدا گلابراتا و ۱ مورد کاندیدا پاراپسـیلوزیس نیز که با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن مـانوپروتئین ۶۵ کیلودالتونیPCR شده بودند با نتایج کشت مطابقت داشتند ودر ۱۰۰٪ موارد محصول PCR اختصاصی بود و قطعه ۳۶۱ bp و ۱۲۴ bp جهـت کاندیـدا گلابراتـا وکاندیداپاراپسـیلوزیس مشاهده گردید (شکل ۱).نتایج فوق نشـان داد کـه پرایمرهـای مورد استفاده برای تشخیص گونه‌های کاندیدا کاملاً اختصاصی می‌باشند.

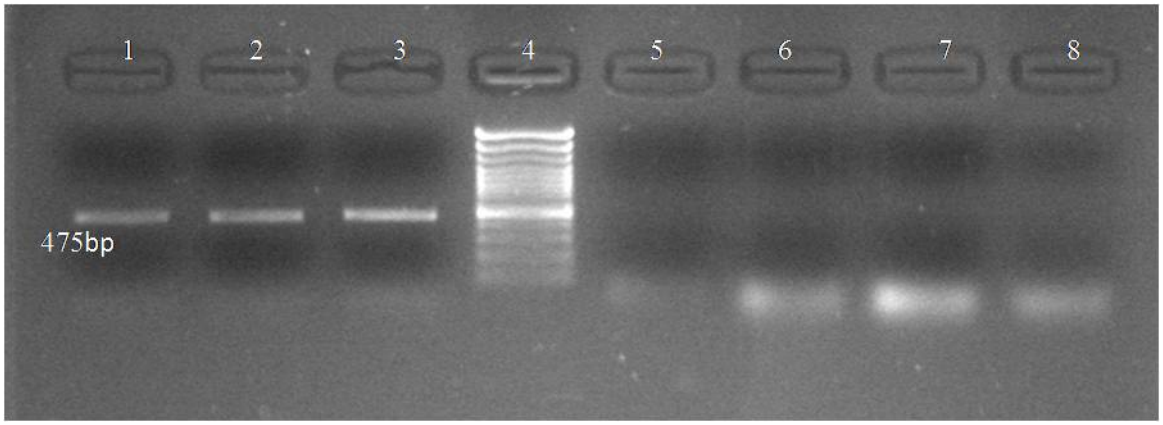
برای تعیـین حساسـیتPCR تعـداد ۵۰، $۱۰^۲$، $۱۰^۳$، $۱۰^۴$، $۱۰^۵$ ازسلول مخمری کاندیدا آلبیکنس به نمونه‌های سرم افراد سـالم تلقـیح گردیـد سـپس بـه دو روش فنـل کلروفـرم وکیـت Prime prep Genomic DNA Isolation kit، DNA سلول مخمری استخراج گردید و بر روی آن‌ها واکـنش PCR انجام شد که حداقل مقدار قابل شناسایی واکنشPCRدر حـد ۵۰ سلول مخمری با روش فنل‌کلروفرم بود(شکل ۳).

استفاده از کیت Prime prep Genomic DNA Isolation kit(from Blood) در حد $۱۰^۵$ سـلول مخمـری را مـی‌توانـد شناسایی کند (شکل ۴).

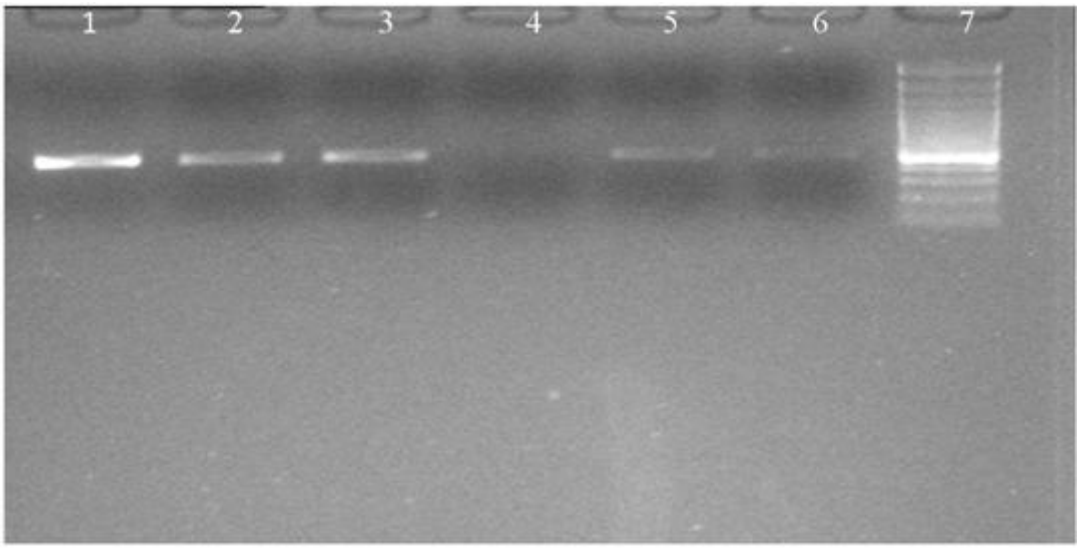


شکل۱. ژل الکترفورز محصولPCR گونه های مختلف کاندیدا با استفاده از پرایمر های ویژه گونه. ستون های ۴-۱ محصولPCR کاندیدا آلبیکنس که ۴۷۵bpمی باشد، ستون های ۹-۶محصولPCR کاندیدا پاراپسیلوزیس 124 bp ، ستون های ۱۲-۱۰ محصولPCR کاندیدا گلابراتا 361 bp، ستون ۱۳- کنترل منفی ، ستون۱۴-مارکر ۱۰۰ bp (شرکت فرمنتاز)، ستون ۱۸-۱۵ به ترتیب محصولPCR برروی آسپرژیلوس ، ساکارومایسس سرویزیه، کاندیدا تروپیکالیس وکاندیدا کروزی.

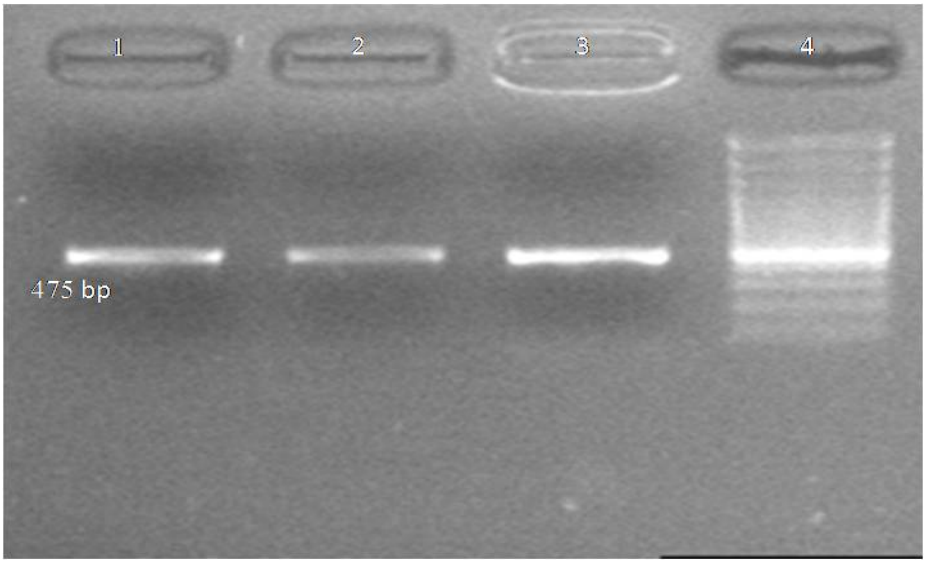
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 18:42 +0330 on Tuesday February 19th 2019



شکل ۲.ژل الکترفورز محصولPCR .ستون های ۳-۱محصولPCR کاندیدا آلبیکنس بیمارکه ۴۷۵bp می باشد، ستون۴- مارکر bp ۱۰۰(شرکت فرمنتاز) ، ستون ۵-کریپتوکوکوس ، ستون ۶- ساکارومایسس سرویزیه ، ستون۷- کاندیدا تروپیکالیس ، ستون ۸- کاندیدا کروزی.



شکل۳.حساسیت PCR در نمونه های بیولوژیک سرم ستون ۱ حاوی$۱۰^{۵}$، ستون۲ حاوی $۱۰^{۴}$ ، ستون۳ حاوی $۱۰^{۳}$ ، ستون ۵ حاوی $۱۰^{۲}$ ، ستون۶ حاوی ۵۰ سلول مخمری کاندیدا آلبیکنس ، ستون ۷مارکر bp ۱۰۰(شرکت فرمنتاز).



شکل ۴.حساسیت PCR در نمونه های بیولوژیک سرم ستون (۲-۱) حاوی$۱۰^{۵}$ سلول مخمری به دو روش کیت، ستون۳ فنل کلروفرم، ستون۴ مارکر bp ۱۰۰(شرکت فرمنتاز).

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 18:42 +0330 on Tuesday February 19th 2019

با مقایسه دو روش فنل‌کلروفرم و کیت Prime prep Genomic DNA Isolation kit، روش فنل‌کلروفرم حساس‌تر و درحد ۵۰ سلول مخمری مشاهده گردید.

نتایج حاصل از سکوانسینگ محصولات PCR تخلیص شده با استفاده از نرم‌افزار BLASTدر NCBI مورد بررسی قرار گرفت. نتاج حاصله نشان داد که موارد جدا شده از کاندیدیازیس دهانی از بیماران ایدزی (۱۰۰٪) و موارد جدا شده از واژینیت کاندیدایی (۹۸٪) با کاندیدا آلبیکنس مطابقت داشتند هم‌چنین توالی موارد جدا شده (۹۸٪) با کاندیدا گلابراتا وکاندیدا پاراپسیلوزیس مشابهت داشتند.

بحث و نتیجه‌گیری

افزایش بروز کاندیدیازیس مهاجم مستقیماً با افزایش بیماران ایمنوکومپرامایز مرتبط بوده و شروع سریع درمان ضد قارچی درکاهش مرگ و میر کاندیدیازیس منتشره دارای اهمیت می‌باشد [۳-۱]. بنابراین هدف از تشخیص بر پایه مولکولی به منظور تشخیص سریع‌تر عفونت نسبت به روش‌هایرایج می‌باشد به‌خصوص در مواردی‌که جواب مثبت در عفونت کاندیدایی خون که کشت‌های خون آن‌ها منفی می‌باشند مهم می‌باشد.

حساسیت گونه‌های کاندیدا به داروهای ضد قارچی ممکن است به‌طور وسیع متنوع باشند و شناسایی گونه‌های کاندیدا برای انتخاب درمان مناسب لازم می‌باشد [۴]. بنابراین استفاده از یک روش برای شناسایی سریع مخمرهای پاتوژنیک فرصت طلب با حساسیت و اختصاصی بودن بالا نسبت به روش‌های تشخیص سرولوژیکی،بیوشیمیایی و میکروبیولوژی رایج توصیه شده است [۱۵ - ۱۷].

در این تحقیق از جفت پرایمرهای اختصاصی گونه که مستقیماً ژن مانوپروتئین ۶۵ کیلودالتونی را مورد شناسایی قرار می‌دهد از روش PCRبه منظور شناسایی گونه‌های کاندیدا استفاده شده است. نتایجPCR بر روی همه گونه‌های مورد آزمایش در ۱۰۰٪ موارد با نتایج کشت مطابقت داشت و یک باند با طول مورد انتظار (۱۲۴ bp، ۳۶۱ bp، ۴۷۵ bp) برای کاندیدا آلبیکنس، گلابراتا و پاراپسیلوزیس به دست آمد.

در حالی‌که آزمایشPCR بر روی DNA جنس‌های قارچی دیگر آسپرژیلوس و کریپتوکوکوس و ساکارومایسس سرویزیه که با پرایمرهای اختصاصی گونه کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا و کاندیدا پاراپسیلوزیس آزمایش شدند، هیچ‌گونه تکثیرDNAصورت نگرفت.

تمامی محصولات PCRجهت تایید روش PCRوبررسی توالی ژن مورد نظر تعیین توالی شدند سپس با استفاده از نرم‌افزار BLASTمورد بررسی قرار گرفت.نتایجBLAST نشان داد که ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس،گلابراتا و پاراپسیلوزیس به ترتیب ۱۰۰٪، ۹۸٪، ۹۸٪ باایزوله‌هایXM_709288همولوژی دارند.

نتایج این تحقیق با مطالعات انجام شده در ایتالیا از نظر اختصاصی بودن پرایمرها جهت شناسایی گونه‌های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا و کاندیدا پاراپسیلوزیس مطابقت دارد [۱۸،۳].آرانسیا با روشMultiplex PCRو پرایمرهای اختصاصی با استفاده از ژن Mp65 گونه‌های مهم کاندیدایی را مورد شناسایی قرار داد [۳].

در مطالعه دیگر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن Mp65 کاندیدا آلبیکنس در نمونه‌های بیولوژیکی با روش PCR قادر به شناسایی کاندیدا آلبیکنس در تمام نمونه‌های بیولوژیک شدند [۱۷] هم‌چنین با استفاده از روش Real time PCR به کمک پرایمرهای اختصاصی بر روی ژن Mp65 شناسایی کاندیدا آلبیکنس در نمونه‌های بیولوژیکی صورت گرفت [۱۸].در این مطالعه نیز به کمک پرایمرهای اختصاصی بر روی ژن Mp65 گونه‌های کاندیدایی مورد شناسایی قرار گرفت که با مطالعات ذکر شده کاملاً مطابقت داشت و این نشان می‌دهد ژن Mp65 ژن مناسبی برای شناسایی گونه‌های مختلف کاندیدا می‌باشد.

تعداد ۵۰، $۱۰^{۲}$، $۱۰^{۳}$، $۱۰^{۴}$، $۱۰^{۵}$ ازسلول مخمری کاندیدا آلبیکنس،گلابراتا و پاراپسیلوزیس به نمونه‌های سرم افراد سالم تلقیح گردید سپس به دو روش فنل‌کلروفرم وکیت Prime prep Genomic DNA Isolation kit، DNA سلول مخمری استخراج گردید نتایج PCR نشان داد که روش

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 18:42 +0330 on Tuesday February 19th 2019

فنل‌کلروفرم با حساسیت بالا در حد شناسایی ۵۰ سلول مخمری در نمونه‌های کلینیکی بوده وبنابراین روش استخراج فنل‌کلروفرم حساس‌تر از روش کیت Prime prep Genomic DNA Isolation kit می‌باشد.

اهمیت این روش قابلیت استفاده از آن با حداقل امکانات آزمایشگاهی مولکولی است در صورتی‌که در روش‌های لایت سیکلر و high-resolution melting analysis با توجه به گرانی و یا عدم امکان دست‌یابی به این تکنولوژی در همه آزمایشگاه‌ها این آزمایش‌ها مقدور نیست در نتیجه می‌توان از روش‌هایPCR با قابلیت تکرارپذیری در اکثر آزمایشگاه‌ها استفاده نمود [۱۹،۱۱] این روش آسان، سریع،اختصاصی و طی ۴ ساعت قابل انجام است.

از محدودیت‌های این تحقیق به نبود نمونه‌های بالینی برای انجام آزمایش می‌توان اشاره نمود که با گردآوری نمونه‌های بالینی و انجام آزمایشات بر روی آن می‌توان قابلیت کاربرد آن را برای تشخیص سریع بیماران کاندیدیازیس و درمان به موقع استفاده نمود.

به‌کارگیری روش PCR با جفت پرایمرهای اختصاصی گونه کاندیدا جهت شناسایی گونه‌های کاندیدا از نظر اقتصادی مقرون به صرفه بوده زیرا هیچ پروب ودستگاه گران‌قیمت مورد نیاز نیست هم‌چنین امکان شناسایی کاندیدا مستقیماً از نمونه‌های خونی و سرم گرفته شده از بیماران با کاندیدیازیس مهاجم وجود دارد.با شروع سریع درمان ضد قارچی منجر به کاهش مرگ و میر مرتبط با کاندیدیازیس مهاجم می‌گردد.

تشکر و قدردانی

هزینه انجام این تحقیق که بخشی از رساله دکترا بوده به وسیله معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است.بدین‌وسیله از اساتید محترم گروه قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران آقای دکتر میرهندی و آقای محسن گرامی‌شعار به خاطر همکاری صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

[1] La Valle R, Sandini S, Gomez MJ, Mondello F, Romagnoli G, Nisini R,Cassone A. Generation of a recombinant 65-kilodalton mannoprotein, a major antigen target of cell-mediated immune response to Candida albicans. Infect Immun2000; 68:6777-6784.

[2] Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. Clin Infect Dis 2003;37:1172-1177.

[3] Arancia S, Sandini S, Cassone A,De Bernardis F.Use of 65kDa mannoprotein gene primers in PCR methods for the identification of five medically important Candida species. Mol Cell Probes 2009; 23:218-226.

[4] Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, et al.Guidelines for treatment of candidiasis. Clin Infect Dis 2004;38: 161-189.

[5] Jia XM, Ma ZP, Jia Y, Gao PH, Zhang JD, Wang Y, et al. RTA2, a novel gene involved in azole resistance in Candida albicans. Biochem Biophys Res Commun 2008;373: 631-636.

[6] Ribeiroa MA, Paulac CR.Up-regulation of ERG11 gene among fluconazole-resistant Candida albicans generated in vitro: is there any clinical implication?.Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57: 71-75.

[7] Heilmann CJ, Sorgo AG, Siliakus AR, Dekker HL, Brul S, de Koster CG, et al. Hyphal induction in the human fungal pathogen Candida albicans reveals a characteristic wall protein profile. Microbiology 2011; 157: 2297-2307.

[8] Xu H, Nobile CJ, Dongari-Bagtzoglou A.Glucanase induces filamentation of the fungal pathogen candida albicans. Plos One 2013; 8: e63736.

[9] Sorgo AG, Heilmann CJ, Brul S, de Koster CG, Klis FM. Beyond the wall: Candida albicans secret(e)s to survive. FEMS Microbiol Lett 2013; 338: 10-17.

[10] Sandini S, Stringaro A, Arancia S, Colone M, Mondello F, Murtas S, et al. The MP65 gene is required for cell wall integrity, adherence to epithelial cells and biofilm formation in Candida albicans. BMC Microbiol 2011; 11:106-122.

[11] Sandini S, La Valle R, De Bernardis F, Macrı C,Cassone A. The 65 kDa mannoprotein gene of Candida albicans encodes a putative b-glucanase adhesion required for hyphal morphogenesis and experimental pathogenicity. Cell Microbiol 2007;9:1223-1238.

[12] Malani PN, Bradley SF, Little RS, Kauffman CA. Trends inspecies causing fungaemia in a tertiary care medical centre over 12 years. Mycoses 2001; 44: 446-449.

[13] Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR, Conn LA, Perkins BA, Stephens DS, et al. The epidemiology of candidemia in two United Statescities: results of a population-based active surveillance. Clin Infect Dis 1999; 29: 1164-1170.

[14] Hazen KC. New and emerging yeast pathogens.Clin Microbiol Rev 1995; 8: 462-478.

[15] Xiang H, Xiong L, Liu X, Tu Z. Rapid simultaneous detection and identification of six species Candida using polymerase chain reaction and reverse line hybridization assay.J Microbiol Methods 2007; 69: 282-287.

[16] White PL, Shetty A, Barnes RA.Detection of seven Candida species using the light-cycler system. J Med Microbiol 2003;52:229-238.

[17] Arancia S, Sandini S, Cassone A, De Bernardis F, La Valle R. Construction and use of PCR primers from a 65 kDa mannoprotein gene for identification of C. albicans. Mol Cell Probes 2004;18: 171-175.

[18] Arancia S, Carattoli A, La Valle R, Cassone A, Bernardis F. Use of 65 kDa mannoprotein gene primers in Real Time PCR identification of Candida albicans in biological samples. Mol Cell Probes 2006; 20: 263-268.

[19] Arancia S, Sandini S, De Bernardis F, Fortinib D. Rapid, simple, and low-cost identification of Candida species using high-resolution melting analysis.Diagn MicrobiolInfec Dis 2011; 69: 283-285.

Molecular identification of a 65 kDa mannoprotein encoded gene of Candida species by PCR

Farahnaz Bineshian (M.Sc)[1], Mohammad hossien Yadegari (Ph.D)[*1],Zohre Sharifi (Ph.D)[2],Mohammad reza Akbari Eidgahi (Ph.D)[3],Reza Nasr(M.Sc)[3]

1-Dept. of Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

3- Research Center of Biotechnology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

(Received: 9 Mar 2013; Accepted: 2 Nov 2013)

Introduction: Invasive fungal infections represent a major public health concern. In particular, systemic candidiasis remains an increasing source of morbidity and mortality especially in immunocompromised patients such as neutropenic patients undergoing antiblastic chemotherapy or bone marrow transplants**.** Early diagnosis is often difficult. Consequently, effective treatment is often delayed. PCR has the potential to decrease the time required to diagnose fungal infections and therefore reduce the mortality associated with disseminated disease**.**The MP65 gene of *Candida albicans*is appropriate for detection and identification. The aimofthisstudy was toidentifydifferentspecies of *Candida (C. albicans, C. glabrata, C. parapsilosis*) withPCRtechnique.

Materials and Methods: All 107 yeast isolateswere identified on cornmeal agar supplemented with tween-80, germ tube formation in serum, and assimilation of carbon sources in the API 20 C AUX (Biomerieux, France). Then, all isolates were tesed by PCR using by different species-specific PCR primers selected within the MP65 gene; a recently cloned gene encoding a mannoprotein adhesin.

Results: A hundred of clinical isolates were detemined as *C. albicans* and 6 of the isolates detemined as*C. glabrata* and 1 of the isolates detemined as *C. parapsilosis*. The species-specific PCR primers allowed differentiation of each of three Candida species by the amplicon length produced.The primers amplified all Candida species DNA tested (100% positivity) giving a band of the expected length (475 bp for *C. albicans*, 361bp for*C. glabrata*, 124bp for*C. parapsilosis*). The results were agreed with all culture results for Candida species detection.

Conclusion: The results of this study showed that PCR method for rapididentification ofCandida specieswith specific primers is reproducible, simple and specific.

Keywords: MP65 gene, Candida, Molecular diagnostics

*Corresponding author: Fax: +98-21-82883030;Tel: +98-21-82883572

yadegarm@modares.ac.ir

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 18:42 +0330 on Tuesday February 19th 2019

How to cite this article:

Bineshian F, Yadegari M, Sharifi Z, Akbari Eidgahi M, Nasr R. Molecular identification of a 65 kDa mannoprotein encoded gene of Candida species by PCR. koomesh. 2014; 15 (3) :365-371

URL http://www.koomeshjournal.ir/browse.php?a_code=A-10-1933-1&slc_lang=fa&sid=1