

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 و پژوهشی طب انتقال خون، مرکز تحقیقات انتقال خون

۳- دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی سمنان، مرکز تحقیقات 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 شیمی‌درمانی 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 تکنیک PCR 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 (Biomérieux, France)* برای شناسایی انواع مختلف کاندیدا انجام شد. آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه برای ژن مانوپروتئین ۶۵ کیلودالتونی بر روی تمام نمونه‌ها انجام شد.

یافته‌ها: با استفاده از روش‌های کشت و تست‌های بیوشیمیایی ۱۰۰ مورد نمونه کاندیدا آلبیکنس، ۶ مورد کاندیدا گلابراتا و ۱ مورد کاندیدا پاراپسیلوزیس جدا شده از نمونه‌های کلینیکی شناسایی شدند. آزمایش PCR با پرایمرهای اختصاصی گونه بر روی نمونه‌های کلینیکی انجام شد که در همه موارد یک باند با طول قطعه مورد انتظار برای کاندیدا آلبیکنس، گلابراتا و پاراپسیلوزیس (۴۷۵bp، ۳۶۱bp، ۱۲۴bp) 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 و اختصاصی است.

واژه‌های کلیدی: مانوپروتئین ۶۵، کاندیدا، تشخیص مولکولی

مقدمه

پیوندهای ارگان و دیگر بیماران ایمنوکومپرامایز بروز

بیماری کاندیدیازیس افزایش یافته است [۱].

کاندیدمیا به عنوان چهارمین عفونت بیمارستانی با مرگ و

شیوع بیماری کاندیدیازیس مهاجم در طی چند دهه

اخیر به افزایش است به علت افزایش بیماران ایدزی،

می‌شود این پروتئین دارای چندین سایت گلیکوزیلاسیون می‌باشد این پروتئینیک آنتی‌ژن اصلی برای پاسخ CMI به‌شمار می‌رود مانوپروتئین ۶۵ کیلودالتونیک ادھیژن بتاگلوکوناز بوده که عضوی از خانواده گلیکوزیل (GH17) هیدرولاز می‌باشد و در مرفوژنز و چسبندگی و بیماری‌زایی میزبان نقش اصلی را بازی می‌کند [۳-۷، ۱۰، ۱۱]. به این دلایل تمایل زیادی جهت توسعه روش‌هایی با تکنولوژی‌های جدید برای شناسایی و تشخیص سریع گونه‌های مختلف درکاندیدایزیس مهاجم وجود دارد.

تغییراتی در طیف گونه‌های مختلف کانیدیا مشاهده شده است به طوری که گونه‌های کانیدایی غیر آلیکنس در ایزوله‌های کلینیکی افزایش یافته است. افزایش بروز عفونت کانیدایی خون به علت کانیدیا پاراپسیلوزیس و کانیدیا گلابراتا [۱۲] کانیدیا تروپیکالیس و کانیدیا کروزوی [۱۳] گزارش شده است.

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

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 بیماراندرا مراحل اولیه عفونت قارچی هستند هم‌چنین شناسایی قارچ‌های بیماری‌زا به وسیله تکنیک‌های مبتنی بر DNA روش‌های سریع‌تری از روش شناسایی مبتنی بر کشت می‌باشد. بنابراین در این مطالعه، روش PCR به منظور شناسایی کانیدیا آلیکنس و کانیدیا گلابراتا و کانیدیا پاراپسیلوزیس در ایزوله‌های کلینیکی با استفاده از پرایمرهای ژنی توسعه داده شد.

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 کانیدیا یزیس منتشره، ارگانیسیم بعد از اتوپسی جدا گردیده که نشانگر عدم تشخیص به موقع و تاخیر در درمان می‌باشد [۳].

کانیدیا آلیکنس شایع‌ترین جنس بیماری‌زا است و بعد از آن گونه‌های گلابراتا و کروزوی رو به افزایش هستند و پاراپسیلوزیس و تروپیکالیس در موارد کم‌تر می‌باشند چون چندین گونه کانیدایی غیر آلیکنس مقاوم به داروهای ضد قارچی شناخته شده‌اند بنابراین شناسایی کانیدیا 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 کانیدیا آلیکنس می‌گردد [۵]. توسعه و گسترش مقاومت دارویی آزول در میان استرین‌های کانیدیا آلیکنسیک مشکل مهم پزشکی است و درمان عفونت‌های قارچی مقاوم به دارو خیلی مشکل‌تر و گران‌تر از آن دسته از عفونت‌های کانیدایی حساس می‌باشد [۶].

مانوپروتئینیک ماکرومولکول هتروژن ترکیب یافته از مانوز، گروه فسفات، پیوندهای N لینک و O لینک با پروتئین‌های با وزن‌های مولکولی مختلف می‌باشد اهمیت مانوپروتئین‌ها در اتصال کانیدیا به بافت و برانگیختگی پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال میزبان مشخص شده است [۷، ۸، ۹].

مانوپروتئین ۶۵ کیلودالتونی دارای پیوندهای O گلیکوزیدی و حساس به قلیا می‌باشد و امروزه یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های قابل اهمیت در اتصال کانیدیا به ماتریکس خارج سلولی بوده جهت ایجاد بیوفیلیم موثر می‌باشد [۱۰].

مانوپروتئین ۶۵ کیلودالتونی هم به‌صورت ساختمانی و ترشحی به‌ویژه در فرم هایفی کانیدیا وجود دارد فرم هایفی باعث افزایش قدرت تهاجم قارچ در مقایسه با فرم مخمری

مواد و روش‌ها

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

سوش‌های استاندارد کاندیدا آلیکنس ATCC ۱۰۲۳۱، کاندیدا گلابراتا ATCC ۶۶۰۳۲، پاراپسیلوزیس ۹۰۰۱۸ ATCC در 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 ۸۰ و 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.

استخراج DNA، استخراج DNA از نمونه‌های بالینی به روش فنل کلروفرم برل 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 ۵۰-۱۰۲-۱۰۳-۱۰۴-۱۰۵ از کاندیدا آلیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا پاراپسیلوزیس به طور جداگانه آماده شدند.

PCR ابتدا جهت راه‌اندازی واکنش PCR با استفاده از هر جفت پرایمر ویژه گونه (آلیکنس al-F ATGTTATTCAAGTCTTTCGTACT, al-R TGACATTAATCCAGATAATTGAGC گلابراتا Gla-R, Gla-F GATGTTGCTACTAAGACTGTTCAAGTAGGAAGACAACCTTGCCAAGG و پاراپسیلوزیس Par-R [۳] Par-R CTTCCGAAGCTAGCCAAGT F GAGGATGAAGTGGAGTCG)

واکنش انجام شد. برای انجام واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتری حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر از Master mix (سیناژن) و ۱ میکرولیتر از پرایمر فوروارد حاوی ۱۰ میکرومول و ۱ میکرولیتر از پرایمر ریورس حاوی ۱۰ میکرومول از هر

جفت پرایمر اختصاصی گونه و ۱۰-۱ نانوگرم از هر کدام از DNA سه گونه‌ی کاندیدا و با آب مقطر دیونیزه استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. میکروتیوب‌ها جهت تکثیر DNA در داخل دستگاه Eppendorf Mastercycler Gradient قرار داده شدند. سیکل دمایی شامل: دناتوراسیون آغازین ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه یک سیکل، ۳۰ سیکل 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 دستگاه UVdoc 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 و کاندیدا کروزنی 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 کاندیدیایی ۳۴ مورد (۶۸٪) کاندیدا آلیکنس و ۶ مورد (۱۲٪) کاندیدا گلابراتا و از ۶۶ ایزوله از کاندیدیا یازدهانی بیماران ایدزی ۶۶ مورد کاندیدا آلیکنس و ۱ ایزوله از گروه قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران کاندیدا پاراپسیلوزیس با روش‌های کشت و کیت API 20 C AUX تعیین هویت شدند. بر روی ۶۶ مورد کاندیدا آلیکنس جدا شده از کاندیدیا یازیس

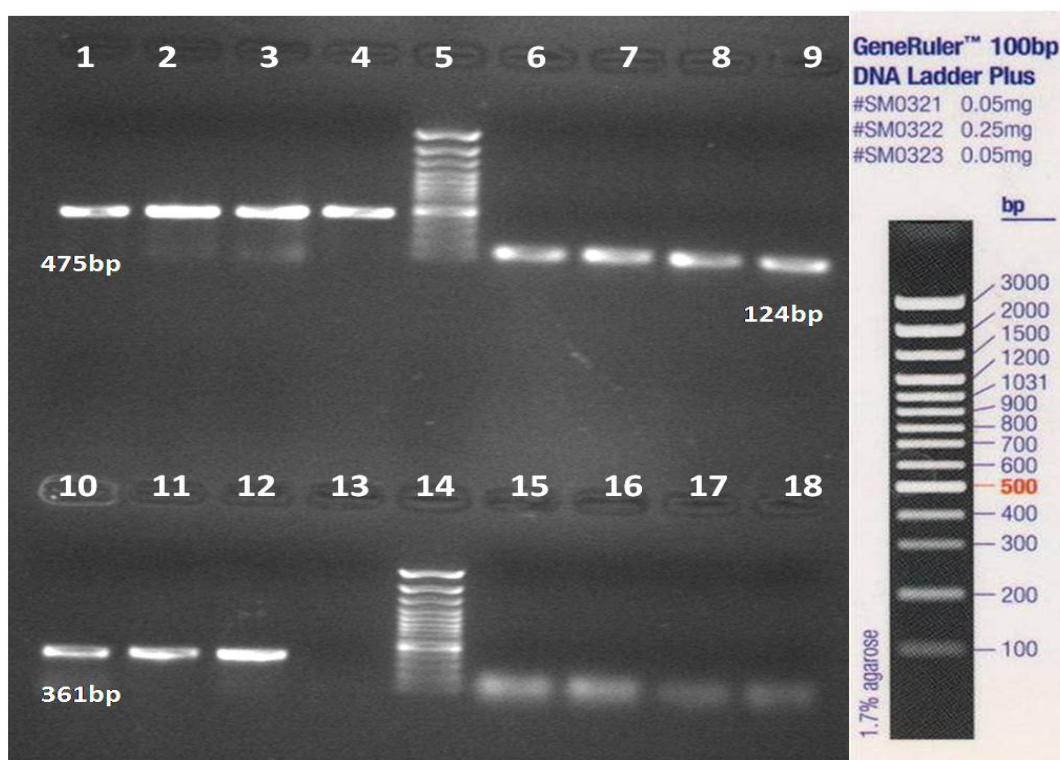
مورد استفاده برای تشخیص گونه‌های کاندیدا کاملاً اختصاصی می‌باشند.

برای تعیین حساسیت PCR تعداد 5.0×10^2 ، 1.0^2 ، 1.0^4 ، 1.0^5 از سلول مخمری کاندیدا آلیکنس به نمونه‌های سرم افراد سالم تلقیح گردید سپس به دو روش فنل کلروفرم و کیت Prime prep Genomic DNA Isolation kit سلول مخمری استخراج گردید و بر روی آن‌ها واکنش PCR انجام شد که حداقل مقدار قابل شناسایی واکنش PCR در حد 5.0×10^5 سلول مخمری با روش فنل کلروفرم بود (شکل ۳).

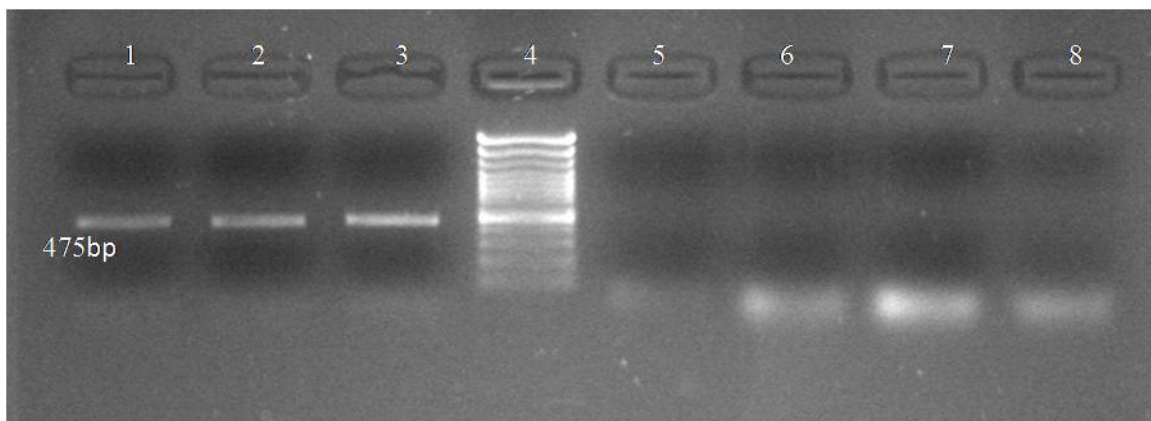
استفاده از کیت Prime prep Genomic DNA Isolation kit (from Blood) در حد 1.0^5 سلول مخمری را می‌تواند شناسایی کند (شکل ۴).

دهانی بیماران ایدزی و ۳۴ مورد کاندیدا آلیکنس جدا شده از واژینیت کاندیدا آلیکنس با PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن مانوپروتئین ۶۵ کیلودالتونی انجام شد و در ۱۰۰٪ موارد نتایج PCR اختصاصی بوده و قطعه ۴۷۵ bp که نشانه تکثیر ژن مانوپروتئین ۶۵ کیلودالتونی کاندیدا آلیکنس می‌باشد به دست آمد (شکل ۱ و ۲).

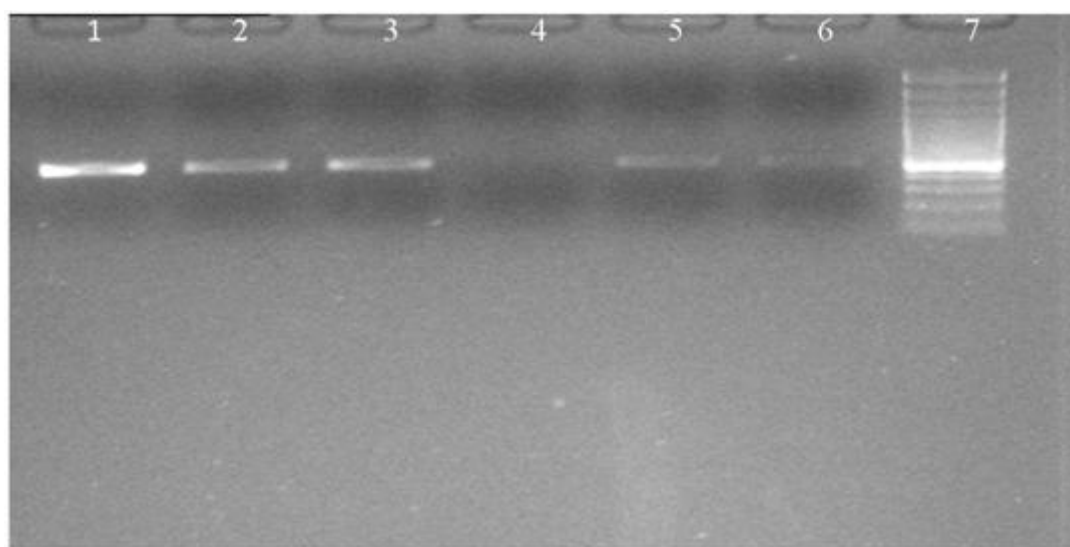
۶ مورد کاندیدا گلابراتا و ۱ مورد کاندیدا پاراپسیلوزیس نیز که با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن مانوپروتئین ۶۵ کیلودالتونی PCR شده بودند با نتایج کشت مطابقت داشتند و در ۱۰۰٪ موارد محصول PCR اختصاصی بود و قطعه ۳۶۱ bp و ۱۲۴ bp جهت کاندیدا گلابراتا و کاندیدا پاراپسیلوزیس مشاهده گردید (شکل ۱). نتایج فوق نشان داد که پرایمرهای



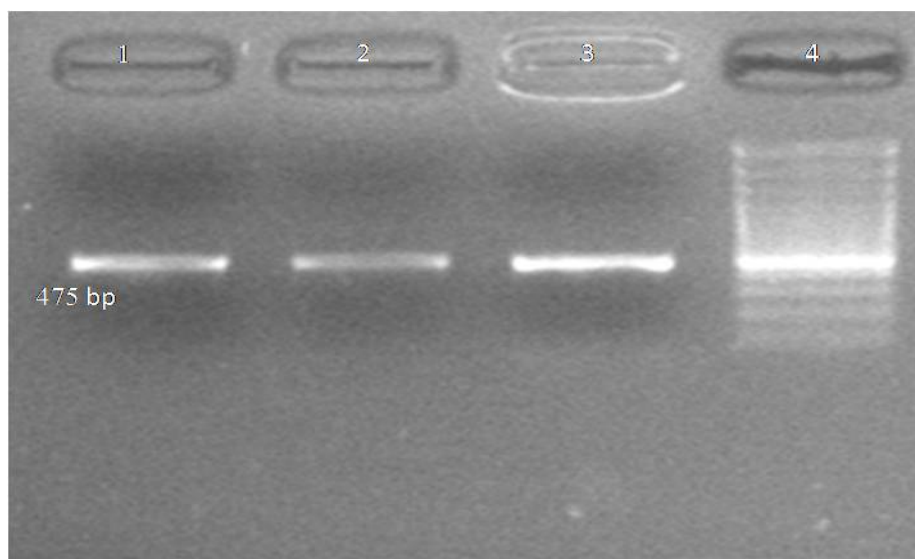
شکل ۱. ژل الکتروفورز محصول PCR گونه‌های مختلف کاندیدا با استفاده از پرایمرهای ویژه گونه. ستون‌های ۱-۴ محصول PCR کاندیدا آلیکنس که ۴۷۵bp می‌باشد، ستون‌های ۶-۹ محصول PCR کاندیدا پاراپسیلوزیس ۱۲۴ bp، ستون‌های ۱۰-۱۲ محصول PCR کاندیدا گلابراتا ۳۶۱ bp، ستون ۱۳- کنترل منفی، ستون ۱۴- مارکر ۱۰۰ bp (شرکت فرمتناز)، ستون ۱۵-۱۸ به ترتیب محصول PCR بروی آسپریلوس، ساکارومایسس سرویزیه، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا کروزی.



شکل ۲. ژل الکتروفورز محصول PCR. ستون‌های ۱-۳ محصول PCR کاندیدا آلیکنس بیمارکه ۴۷۵bp می باشد، ستون ۴- مارکر ۱۰۰ bp (شرکت فرمتاز)، ستون ۵- کریپتوکوکوس، ستون ۶- ساکارومایسس سرویزیه، ستون ۷- کاندیدا تروپیکالیس، ستون ۸- کاندیدا کروزئی.



شکل ۳. حساسیت PCR در نمونه های بیولوژیک سرم ستون ۱ حاوی ۱۰^۵، ستون ۲ حاوی ۱۰^۴، ستون ۳ حاوی ۱۰^۳، ستون ۴ حاوی ۱۰^۲، ستون ۵ حاوی ۱۰^۱، ستون ۶ حاوی ۵۰ سلول مخمری کاندیدا آلیکنس، ستون ۷ مارکر ۱۰۰ bp (شرکت فرمتاز).



شکل ۴. حساسیت PCR در نمونه های بیولوژیک سرم ستون (۱-۲) حاوی ۱۰^۵ سلول مخمری به دو روش کیت، ستون ۳ فنل کلروفرم، ستون ۴ مارکر ۱۰۰ bp (شرکت فرمتاز).

در حالی که آزمایش PCR بر روی DNA جنس‌های قارچی دیگر آسپرژیلوس و کریپتوکوکوس و ساکارومایسس سرویزیه که با پرایمرهای اختصاصی گونه کاندیدا آلیکنس و کاندیدا گلابراتا و کاندیدا پاراپسیلوزیس آزمایش شدند، هیچ‌گونه تکثیر DNA صورت نگرفت.

تمامی محصولات PCR جهت تایید روش PCR و بررسی توالی ژن مورد نظر تعیین توالی شدند سپس با استفاده از نرم‌افزار BLAST مورد بررسی قرار گرفت. نتایج BLAST نشان داد که ایزوله‌های کاندیدا آلیکنس، گلابراتا و پاراپسیلوزیس به ترتیب ۱۰۰٪، ۹۸٪، ۹۸٪ با ایزوله‌های XM_709288 همولوژی دارند.

نتایج این تحقیق با مطالعات انجام شده در ایتالیا از نظر اختصاصی بودن پرایمرها جهت شناسایی گونه‌های کاندیدا آلیکنس و کاندیدا گلابراتا و کاندیدا پاراپسیلوزیس مطابقت دارد [۱۸،۳]. آرانسیا با روش Multiplex PCR و 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 آلیکنس در نمونه‌های بیولوژیکی با روش PCR قادر به شناسایی کاندیدا آلیکنس در تمام نمونه‌های بیولوژیک شدند [۱۷] هم‌چنین با استفاده از روش Real time PCR به کمک پرایمرهای اختصاصی بر روی ژن Mp65 شناسایی کاندیدا آلیکنس 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 از سلول مخمری کاندیدا آلیکنس، گلابراتا و پاراپسیلوزیس به نمونه‌های سرم افراد سالم تلقیح گردید سپس به دو روش فنل کلروفورم و کیت Prime prep Genomic DNA Isolation kit، DNA سلول مخمری استخراج گردید نتایج PCR نشان داد که روش

با مقایسه دو روش فنل کلروفورم و کیت Prime prep Genomic DNA Isolation kit، روش فنل کلروفورم حساس‌تر و در حد ۵۰ سلول مخمری مشاهده گردید.

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

بحث و نتیجه‌گیری

افزایش بروز کاندیدایزیس مهاجم مستقیماً با افزایش بیماران ایمنوکومپرامایز مرتبط بوده و شروع سریع درمان ضد قارچی در کاهش مرگ و میر کاندیدایزیس منتشره دارای اهمیت می‌باشد [۱-۳]. بنابراین هدف از تشخیص بر پایه مولکولی به منظور تشخیص سریع‌تر عفونت نسبت به روش‌های رایج می‌باشد به خصوص در مواردی که 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 PCR به منظور شناسایی گونه‌های کاندیدا استفاده شده است. نتایج PCR بر روی همه گونه‌های مورد آزمایش در ۱۰۰٪ موارد با نتایج کشت مطابقت داشت و یک باند با طول مورد انتظار (۳۶۱ bp، ۴۷۵ bp، ۱۲۴ bp) برای کاندیدا آلیکنس، گلابراتا و پاراپسیلوزیس به دست آمد.

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 Immun* 2000; 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] Ribeiro 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, Macri 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 in species causing fungemia 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 States cities: 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 Microbiol Infect Dis* 2011; 69: 283-285.

فنل کلروفرم با حساسیت بالا در حد شناسایی ۵۰ سلول مخمری در نمونه‌های کلینیکی بوده و بنابراین روش استخراج فنل کلروفرم حساس تر از روش کیت Prime prep Genomic DNA Isolation kit می‌باشد.

اهمیت این روش قابلیت استفاده از آن با حداقل امکانات آزمایشگاهی مولکولی است در صورتی که 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 روش‌های PCR 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 و دستگاه 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. بدین وسیله از اساتید محترم گروه قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران آقای دکتر میرهندي و آقای محسن گرامی‌شعار به خاطر همکاری صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

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 antineoplastic 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* appropriate for detection and identification. The aim of this study was to identify different species of *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*) with PCR technique.

Materials and Methods: All 107 yeast isolates were identified on cornmeal agar supplemented with tween-80, germ tube formation in serum, and assimilation of carbon sources in the API 20 C AUX (Biomérieux, France). Then, all isolates were tested by PCR using 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 determined as *C. albicans* and 6 of the isolates determined as *C. glabrata* and 1 of the isolates determined 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 rapid identification of *Candida* species with 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

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