

Detection and Identification of *Aspergillus fumigatus* in BAL Samples of Patients with Suspected Tuberculosis by Nested-PCR

Farzaneh Amini ¹, Hossein Mirhendi ², Reza Kachuei ³, Fatemeh Noorbakhsh ¹

1. Department of Biology, Islamic Azad University, Varamin-pishva Branch, Tehran, Iran.
2. Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Article Information

Article history:

Received:2014/06/17
Accepted:2014/08/16
Available online:2014/08/17

Article Subject:

Medical Mycology

IJMM 1393; 8(2): P 14-21

Corresponding author at:

Dr. Reza Kachuei

Molecular Biology Research
Center, Baqiyatallah University
of Medical Sciences, Tehran,
Iran

Email:

kachueiz@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: *Aspergillus fumigatus* is the cause of more than 90% of invasive pulmonary aspergillosis. The aim of this study is identification and detection of *A.fumigatus* in bronchoalveolar lavage (BAL) samples patients suspected to have tuberculosis by using of Nested-PCR.

Materials and Methods: In this assay, a set of 100 BAL samples which were collected in 9 month, between the years 2012-2013, from patients with suspected tuberculosis in Tehran hospital, were examined by direct, culture and molecular tests. Manual phenol-chloroform method was used in order to extract DNA. Specific primers of *Aspergillus* genus and beta-actin primers were used for duplex-PCR. A pairs of internal primers were utilized in order to identification of *A.fumigatus* (Nested-PCR method). Finally, some of the PCR-products were sequenced for confirming results.

Results: Overall, 12 samples (12%) were aspergillus-positive by molecular test while 11% and 10% samples were positive by direct and culture test, respectively. The sensitivities and specificities of PCR method compare with direct examination was 100% and 98.8%, respectively. The study also showed that sensitivities and specificities of PCR method compare with culture was 100% and 97.7%, respectively. After sequencing PCR product sample, isolated species were recognized as *A. fumigatus*.

Conclusions: This study showed that PCR method in compare with the direct method and the culture has a higher sensitivity in the detection of *Aspergillus* species, also Present study displayed that can be consider *Aspergillus* species and *A. fumigatus* in suspicious to tuberculosis BAL samples.

Key Words: *Aspergillus fumigatus*, Bronchoalveolar lavage (BAL), PCR

Copyright © 2014 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Amini F, Mirhendi H, Kachuei R, Noorbakhsh F. Detection and Identification of *Aspergillus fumigatus* in BAL Samples of Patients with Suspected Tuberculosis by Nested-PCR. Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (2) :14-21

جداسازی و شناسایی آسپرژیلوس فومیگاتوس در نمونه های لاواژ برونکوالوئولار (BAL) مشکوک به سل به روش Nested-PCR

فرزانه امینی^۱، سید حسین میرهندی^۲، رضا کچوئی^۳، فاطمه نوربخش^۱

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پیشوا ورامین، تهران، ایران.

۲. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: آسپرژیلوس فومیگاتوس عامل بیش از ۹۰٪ آسپرژیلوزیس مهاجم حاد ریوی است. هدف از مطالعه حاضر شناسایی و ردیابی آسپرژیلوس فومیگاتوس در نمونه های لاواژ برونکوالوئولار (BAL) مشکوک به سل به روش Nested-PCR است.

مواد و روش کار: در این بررسی، در طی ۹ ماه در طول سال های ۹۱-۹۲ تعداد ۱۰۰ نمونه BAL از بیماران بستری و مراجعه کننده به بیمارستان آموزشی در شمال تهران جمع آوری گردید، آزمایش مستقیم، کشت و PCR بر روی نمونه های مورد مطالعه صورت گرفت، به منظور استخراج DNA از روش دستی فنل-کلروفرم استفاده گردید. جهت انجام Duplex PCR از پرایمرهای اختصاصی جنس آسپرژیلوس و پرایمرهای بتاآکتین استفاده شد. به منظور شناسایی گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس از یک جفت پرایمر داخلی (روش Nested-PCR) و جهت تایید، تعدادی از محصولات PCR تعیین توالی گردید.

یافته ها: به روش PCR آسپرژیلوس در ۱۲ نمونه (۱۲٪) تشخیص داده شد، موارد مثبت در روش مستقیم و کشت به ترتیب ۱۱٪ و ۱۰٪ بود. حساسیت و اختصاصیت روش مولکولی PCR در مقایسه با آزمایش مستقیم به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۸/۸٪ بود. همچنین حساسیت و اختصاصیت این روش در مقایسه با کشت به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۷/۷٪ محاسبه گردید. نتایج تعیین توالی تعدادی از محصولات PCR وجود آسپرژیلوس فومیگاتوس را تایید نمود.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که روش PCR، در مقایسه با روش مستقیم و کشت، حساسیت بالاتری در شناسایی و ردیابی آسپرژیلوس دارا می باشد، همچنین در نمونه های BAL مشکوک به سل می توان آسپرژیلوس ها و به ویژه آسپرژیلوس فومیگاتوس را مدنظر قرار داد.

کلمات کلیدی: آسپرژیلوس فومیگاتوس، لاواژ برونکوالوئولار، واکنش زنجیره پلیمرازی

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۱۰

پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۱۹

انتشار آنلاین: ۱۳۹۳/۰۶/۲۶

موضوع:

قارچ شناسی پزشکی

IJMM 1392; 8(2): P 14-21

نویسنده مسئول:

دکتر رضا کچوئی

مرکز تحقیقات بیولوژی

مولکولی دانشگاه علوم پزشکی

بقیه ا... (عج)، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱۸۲۴۸۲۵۵۸

پست الکترونیک:

kachueiz@yahoo.com

مقدمه

مختلف زنده بماند، افراد از طریق استنشاق، به طور پیوسته در تماس با این اسپورها هستند. تخمین زده می شود که یک فرد روزانه حدود چند صد کونیدی را استنشاق می کند (۲،۳). در افراد با سیستم ایمنی سالم معمولاً این اسپورها آسیبی ایجاد نمی کنند؛ زیرا توسط مکانیسم های دفاعی ریوی حذف می شوند.

چهار گونه مهم جنس آسپرژیلوس، مسئول بیشتر بیماری های ناشی از آنها هستند که شامل آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس ترئوس می باشند (۱).

آسپرژیلوس فومیگاتوس، یک قارچ ساپروفیت است که تعداد زیادی اسپور کوچک تولید می کند که می تواند در شرایط محیطی

اما در افراد دچار نقص سیستم ایمنی، استنشاق کونیدی‌ها می‌تواند آسپرژیلوزیس ریوی را ایجاد کند (۴).

آسپرژیلوزیس مهاجم حاد ریه، عفونت شدید و کشنده‌ای است که در بیماران دچار نقص ایمنی، نوتروپنی، گرانولوماتوز مزمن، بدخیمی‌های خونی، دریافت کنندگان مغز استخوان، سلول‌های بنیادی و سایر بافت‌ها و استفاده طولانی مدت از استروئیدها و آنتی‌بیوتیک‌ها و شیمی درمانی مشاهده می‌شود (۵-۹). این بیماری حتی در افراد بدون ریسک فاکتورهای مشخص و همچنین بیماران با وضعیت وخیم که به مدت طولانی در بیمارستان بستری می‌شوند، رخ می‌دهد که با مرگ و میر بسیار بالا در این بیماران همراه می‌باشد (۱۰).

آسپرژیلوس فومیگاتوس عامل ۹۰٪ از آسپرژیلوزیس‌های مهاجم حاد ریه است. میزان مرگ و میر آن ۵۰-۹۰٪ می‌باشد. مرگ و میر بالایی که در عفونت‌های ناشی از این قارچ دیده می‌شود، بدلیل پاسخ ایمنی ضعیف شده، ویرولانسی میکروارگانیزم و شاید بخاطر تاخیر در اثبات تشخیص بیماری باشد، که این امر از موفقیت درمان جلوگیری می‌کند (۱۱). مایکوباکتریوم‌ها، پاتوژن‌های درون سلولی هستند که می‌توانند عفونت‌های جدی در انسان‌ها و حیوانات ایجاد کنند، در حال حاضر بیش از ۱۰۰ گونه مایکوباکتریوم شناخته شده است که بسیاری از آن‌ها در انسان بیماریزا می‌باشند. مهمترین گونه آن مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است که عامل بیماری سل شناخته می‌شود (۱۲).

روش‌های مولکولی روش‌های با حساسیت بالا در امر شناسایی میکروارگانیزم‌ها هستند که در شناسایی آسپرژیلوزیس نیز به کار می‌روند. در سال‌های اخیر مطالعات متعددی در خصوص تشخیص مولکولی آسپرژیلوزیس صورت گرفته است (۱۳-۱۶)، در ایران نیز مطالعاتی در مورد تشخیص مولکولی آسپرژیلوس‌ها و آسپرژیلوزیس ریوی به روش‌های مولکولی PCR-RFLP، PCR و RT-PCR و PCR-Sequencing صورت گرفته است (۱۷-۱۹).

در مواردی علائم بالینی بیماران مبتلا عفونت حاد ریوی به گونه‌ای است که پزشک را ملزم به درخواست همزمان آزمایش قارچ شناسی (به ویژه از نظر آسپرژیلوس) و آزمایش از نظر وجود مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در نمونه شستشوی برونش می‌نماید.

از آنجایی که در روش Nested-PCR، ابتدا از یک جفت پرایمر خارجی استفاده می‌شود و سپس از محصول این واکنش به همراه پرایمرهای داخلی، برای آمپلیفیکاسیون مرحله دوم استفاده میگردد، بنابراین امکان مثبت شدن نتیجه بیشتر خواهد بود که این امر بخاطر دومرحله‌ای بودن واکنش و در نتیجه حساسیت بیشتر می‌باشد که این امر عامل تفاوت این روش با PCR معمولی است. هدف از مطالعه حاضر شناسایی و ردیابی آسپرژیلوس فومیگاتوس در نمونه‌های لاواژ برونکوالوئولار (BAL) مشکوک به سل به روش Nested-PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های مورد بررسی

در این بررسی تعداد ۱۰۰ نمونه لاواژ برونکوالوئولار (BAL) از بیماران مشکوک به سل (با علائم بی‌حالی، کاهش وزن، سرفه، عرق شبانه و در برخی موارد خلط خونی) مراجعه کننده و یا بستری در بیمارستان آموزشی در شمال تهران در طی ۹ ماه در سال‌های ۹۱-۹۲، جمع‌آوری گردید، لازم به ذکر است نمونه‌ها از نظر سل مثبت بودن یا منفی بودن توسط متخصص مربوطه به روش‌های آزمایش مستقیم (رنگ آمیزی زیل نلسون، کشت (در محیط کشت لونشتاین جانسون) و مولکولار (Real Time-PCR)) انجام می‌گرفت، اما هدف ما در مطالعه حاضر جستجوی آسپرژیلوس به روش‌های مورفولوژی و مولکولی در این دسته نمونه‌ها بود و داده‌های مربوط به سل را شامل نمی‌شود، همچنین در این مطالعه از سویه استاندارد آسپرژیلوس فومیگاتوس (ATCC 26430) به عنوان کنترل مثبت در آزمون استفاده گردید.

آزمایش مستقیم

ابتدا نمونه‌های بدست آمده توسط سانتریفوژ در دور ۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد، بخشی از رسوب در آزمایش مستقیم با پتاس ۱۰٪ مورد استفاده قرار گرفت، وجود هیف‌های شفاف با تیغه میانی که با انشعابات دیکوتوموسی (با زاویه ۴۵°) قرار گرفته‌اند، بیانگر آسپرژیلوس می‌باشد.

آزمایش کشت

بخشی دیگر از نمونه کشت گردید به این صورت که نمونه در دو پلیت حاوی محیط کشت سابورو دکستروز آگار کلرامفنیکل دار (SC) کشت و سپس در دو شرایط دمایی ۲۵ و ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری گردید، لازم به ذکر است با توجه به

اینکه قارچ مورد بررسی از عوامل قارچی فرصت طلب است و به راحتی در محیط یافت می شود، به همین دلیل در هر پلیت در دو نقطه نمونه را تلقیح نموده و نتایج رشد قارچ در محل تلقیح ملاک مثبت بودن کشت تلقی می گردید.

آزمایش مولکولی

بخش دیگری از رسوب نمونه جهت انجام آزمایش مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این کار استخراج DNA به روش دستی از نمونه ها صورت گرفت.

استخراج DNA

ابتدا استخراج DNA سویه استاندارد و بالینی (به صورت تجربی آلوده شده) و سپس نمونه های شستشوی برونش، انجام شد. ابتدا معادل ۲۵۰ میکرولیتر پرل شیشه ای، ۲۵۰ میکرولیتر بافر لیز و ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه به میکروتیوب ۲ میکرولیتر، افزوده شد؛ سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس جوشانده شد. به میزان ۲۵ میکرولیتر پروتئیناز k اضافه نموده، ورتکس (با دستگاه هیدولف ساخت آلمان) انجام شد، میکروتیوب ها به مدت ۲ ساعت در بن ماری (ممرت ساخت کشور آلمان) در دمای ۵۶ درجه سلسیوس انکوبه گردید. پس از اتمام انکوباسیون، نمونه ها به مدت ۵ دقیقه به شدت ورتکس شدند. در مرحله بعد، خالص سازی با روش فنل-کلروفرم انجام شد. به این ترتیب که ۵۰۰ میکرولیتر فنل-کلروفرم به تیوب ها افزوده شد. سپس سانتریفوژ با ۵۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. بعد از سانتریفوژ، مایع رویی برداشته شده و به تیوب جدید انتقال یافت. هم حجم مایع رویی برداشته شده، کلروفرم اضافه شد و سانتریفوژ با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه

انجام شد. بعد از سانتریفوژ، مایع رویی با سمپلر برداشته شده و به تیوب جدید انتقال یافت. در این مرحله هم حجم مایع رویی، ۲- پروپانول و ۰/۱ حجم مایع رویی استات سدیم ۳ مولار افزوده شده و بعد از اسپین نمودن (با دستگاه تامی ساخت ژاپن) به مدت ۲۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس فریز شد. بعد از اتمام زمان فریز، سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. مایع رویی دور ریخته شد و سپس، الکل ۷۰٪ اضافه شد. سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. سپس مایع رویی به دقت خارج شده و اجازه داده شد تا تیوب ها به طور کامل خشک شوند. پس از خشک شدن کامل تیوب ها، ۲۵ میکرولیتر آب مقطر استریل به هر تیوب افزوده شد و پس از ورتکس در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

واکنش PCR: این روش به منظور شناسایی و ردیابی جنس آسپرژیلوس در نمونه برونش و وجود ژن بتا اکتین انسانی به عنوان هاوسکیپینگ (این نوع ژن ها به عنوان ژن های ساختاری و حفاظت شده در حفظ و پایداری سلول نقش دارند، وجود این ژن معرف این مطلب است که مطالعه بر روی نمونه بالینی انسانی انجام گرفته است) در نمونه های بالینی مورد بررسی به صورت جدا گانه صورت گرفت، واکنش PCR درحجم نهائی ۲۵ μ L انجام گرفت، برای این کار مطابق بررسی Sugita و همکاران (۲۰) از پرایمرهای ASAP1 و ASAP2 برای ردیابی آسپرژیلوس استفاده شد. همچنین از پرایمرهای BetF و BetR برای تکثیر توالی ۲۰۴ جفت بازی ژن بتا اکتین انسانی به عنوان هاوسکیپینگ ژن انسانی استفاده گردید (۲۱) (جدول ۱).

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی	اندازه محصول (bp)
ASAP1	5'- CAGCGAGTACATCACCTTGG-3'	۵۲۱
ASAP2	5'- CCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATT-3'	
BetF	5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTG -3'	۲۰۴
BetR	5'-CTGGGCATGGAGTCCTGTGG-3'	
ASPU	5'-ACTACCGATTGAATGGCTCG-3'	۳۰۷
Af3r	5'-CATACTTTCAGAACAGCGTTCA-3'	

Ampliqon III (کشور دانمارک)، ۳ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرو لیتر از هر پرایمر R و F (با غلظت ۲۰ pmol) و آب مقطر دو

هر نمونه شامل ۱۲/۵ μ L Master mix (محتوی بافر، dNTP، Taq DNA polymerase و کلرید منیزیم) (ساخت کمپانی

حاوی قطعه ژن به طول ۵۲۱ جفت بازی پس از تخلیص از روی ژل، جهت تعیین توالی به شرکت زیست فناوری پیشگام ارسال نموده و نتایج تعیین توالی از طریق نوکلئوتید بلست در بانک اطلاعات ژنی و با وارد کردن در نرم افزار Mega5 با داده های وارد شده قبلی مقایسه و آنالیز گردید.

بررسی حساسیت و اختصاصیت روش ها: حساسیت و اختصاصیت روش مولکولی PCR در مقایسه با آزمایش مستقیم، همچنین حساسیت و اختصاصیت این روش در مقایسه با کشت مطابق Altman و همکاران با استفاده از آمار توصیفی محاسبه گردید (۲۲). لازم به ذکر است گلد استاندارد بخش اول آزمایش مستقیم و بخش دوم آزمایش کشت بود.

یافته‌ها

در نتایج آزمایش مستقیم از مجموع ۱۰۰ نمونه بالینی BAL، تعداد ۱۱ نمونه (۱۱٪) در آزمایش مستقیم از نظر آسپرزیلوس مثبت شد. شکل ۱ منظره میکروسکوپی آسپرزیلوس را در نمونه تهیه شده با پتاس ۱۰٪ نشان می دهد.

در نتایج کشت از ۱۰۰ نمونه کشت انجام شده برای آسپرزیلوس، ۱۰ نمونه (۱۰٪) مثبت بود که از این تعداد، ۳ مورد (۳٪) از نظر مورفولوژی (خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی)، آسپرزیلوس فومیگاتوس تشخیص داده شد.

در نتایج مولکولی شکل ۲ نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR نمونه های شستشوی برونش را با پرایمر اختصاصی جنس آسپرزیلوس و پرایمر بتا اکتین نشان می دهد. در شکل ۳ وجود باند ۳۰۷ جفت بازی نشان از وجود آسپرزیلوس فومیگاتوس می باشد، نتایج مولکولی بررسی بر روی ۱۰۰ نمونه شستشوی برونش معرف این است که ۱۲ مورد از نمونه ها (۱۲٪) از نظر گونه های آسپرزیلوس مثبت می باشد، در حقیقت ۸۸ نمونه (۸۸٪) از نظر گونه های آسپرزیلوس منفی شد، همچنین به روش Nested-PCR مشخص گردید که تعداد ۶ مورد (۶٪) آسپرزیلوس فومیگاتوس جدا شده است. جدول ۲ مشخصات بیماران مثبت از نظر آسپرزیلوس را نشان می دهد، همانطور که ملاحظه می کنید موارد مثبت آسپرزیلوس در فاصله سنی ۲۲ تا ۷۶ سال قرار داشتند، همچنین فراوانی گونه های آسپرزیلوس بیشتر در مردان مشاهده گردید. حساسیت و اختصاصیت روش مولکولی PCR در مقایسه با آزمایش مستقیم به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۸/۸٪ بود.

بر تقطیر استریل تا حجم نهایی واکنش به ۲۵μL برسد. فرایند PCR شامل واسرشت ابتدایی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۶ دقیقه، ۳۵ دور از واسرشت (۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه)، اتصال (۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه) و گسترش (۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه) و در ادامه، گسترش نهایی (۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه) انجام شد.

برای بررسی محصولات PCR از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱٪ و رنگ آمیزی DNA با رنگ اتیدیوم بروماید استفاده شد. ژل ها با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفت. محصولات PCR در صورت نیاز در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید.

روش Duplex PCR: پرایمرهای نام برده به صورت همزمان طی واکنش Duplex-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. این روش همانند PCR انجام گرفت با این تفاوت که همزمان از دو جفت پرایمر در واکنش ۲۵μL استفاده گردید.

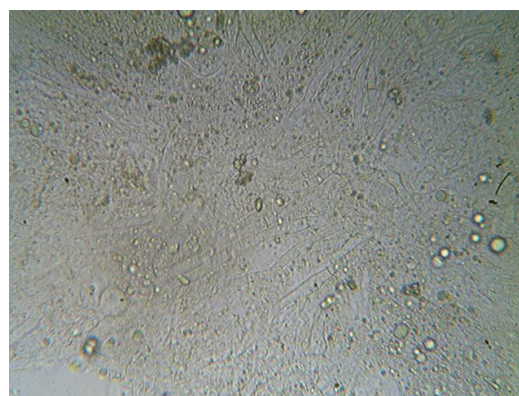
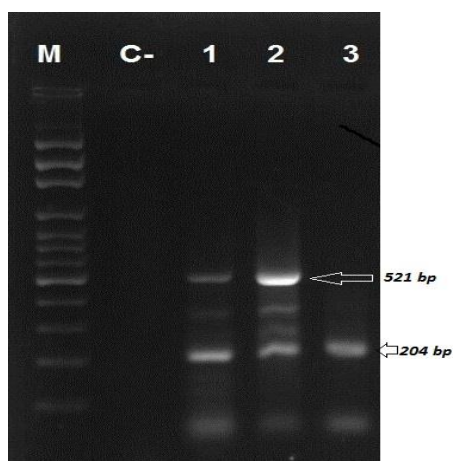
واکنش Nested-PCR: با توجه به اینکه در روش Nested-PCR از محصول PCR اول به عنوان الگو استفاده می شود، در واقع ژن مورد نظر در مرحله دوم PCR به طور انحصاری تر ردیابی می شود بنابراین امکان تکثیر توالی مورد نظر بیشتر می شود و این امر باعث تفاوت و حساس تر بودن این روش در مقایسه با PCR معمولی است، بر این مبنا پس از اتمام واکنش PCR، بر طبق بررسی سوگیتا و همکاران (۲۰) محصولات PCR به میزان یک پنجاهم رقیق شده و با استفاده از پرایمرهای داخلی ASPU و Af3r، PCR دوم (Nested-PCR) انجام گرفت (جدول ۱). این پرایمرها ناحیه داخلی محصول PCR پرایمرهای ASAP1 و ASAP2 را تکثیر می کنند. حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. مقادیر واکنش به این قرار می باشد: پرایمرها ۰/۵ میکرولیتر، Master mix ۱۲/۵ میکرولیتر، DNA ۲ میکرولیتر و آب مقطر استریل ۹/۵ میکرولیتر. هدف از انجام این واکنش، افزایش حساسیت برای ردیابی آسپرزیلوس فومیگاتوس می باشد. برنامه PCR شامل: یک سیکل حرارتی ۹۴ درجه ۴ دقیقه، ۲۵ سیکل ۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۶۰ درجه ۱۵ ثانیه، ۷۲ درجه ۱۵ ثانیه و بسط نهایی ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه انجام شد. در پایان محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ برده شد. تعیین توالی: به منظور تایید شناسایی گونه های آسپرزیلوس فومیگاتوس و شناسایی گونه های دیگر، تعداد ۴ محصول PCR

همچنین حساسیت و اختصاصیت این روش در مقایسه با کشت به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۷/۷٪ محاسبه گردید. تایید نمود، همچنین دو مورد دیگر از نمونه ها معرف اسپرژیلوس فلاووس بود.

نتایج تعیین توالی دو مورد ارسالی همانطور که انتظار می رفت، معرف اسپرژیلوس فومیگاتوس بود که نتایج Nested-PCR را نیز

جدول ۲: مشخصات بیماران مبتلا به اسپرژیلوزیس همراه با بیماری زمینه ونتایج آزمایش مستقیم، کشت، PCR و Nested-PCR در بررسی حاضر

ردیف	بیماری زمینه	سن	جنس	آزمایش مستقیم	کشت	PCR	Nested-PCR
۱	ALL	۲۲	مذکر	+	+	گونه اسپرژیلوس	گونه اسپرژیلوس
۲	AML	۶۲	مذکر	+	+	گونه اسپرژیلوس	گونه اسپرژیلوس
۳	COPD	۵۶	مذکر	+	-	گونه اسپرژیلوس	افومیگاتوس
۴	SLE	۳۰	مذکر	+	افومیگاتوس	گونه اسپرژیلوس	افومیگاتوس
۵	COPD	۷۰	مذکر	-	+	گونه اسپرژیلوس	گونه اسپرژیلوس
۶	COPD	۷۶	مونث	+	-	گونه اسپرژیلوس	افومیگاتوس
۷	لوکمی حاد	۶۳	مونث	+	+	گونه اسپرژیلوس	گونه اسپرژیلوس
۸	AML	۶۲	مذکر	+	+	گونه اسپرژیلوس	گونه اسپرژیلوس
۹	مجروح شیمیایی	۴۹	مذکر	+	افومیگاتوس	گونه اسپرژیلوس	افومیگاتوس
۱۰	سرطان کبد	۴۷	مونث	+	+	گونه اسپرژیلوس	افومیگاتوس
۱۱	COPD	۶۹	مذکر	+	+	گونه اسپرژیلوس	گونه اسپرژیلوس
۱۲	COPD	۶۰	مذکر	+	افومیگاتوس	گونه اسپرژیلوس	افومیگاتوس



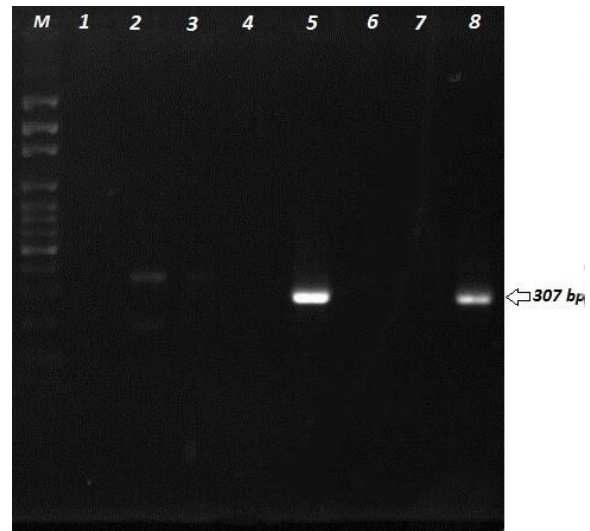
شکل ۱: تصویر میکروسکوپی میسلیم های اسپرژیلوس در نمونه مستقیم BAL با پتاس ۱۰٪

شکل ۲: نتایج ژل الکتروفورز محصولات PCR و Duplex PCR نمونه های بالینی BAL: M. مارکر (100 bp DNA Ladder)، - کنترل منفی، چاهک ۱ و ۲. دو نمونه مثبت با پرایمرهای اختصاصی جنس اسپرژیلوس (باند ۵۲۱ جفت بازی) و ژن بتا اکتین (۲۰۴ جفت بازی)، چاهک ۳. نمونه منفی از نظر اسپرژیلوس و مثبت از جهت وجود ژن بتا اکتین.

از نظر مولکولی آسپرژیلوس مثبت ارزیابی شدند که ۲ مورد از آن‌ها در روش کشت و یک مورد از آن‌ها در روش بررسی مستقیم منفی بود؛ در مواردی که آزمایش مستقیم و کشت آسپرژیلوس منفی است و نتیجه تست مولکولی مثبت است معرف ارزش و اهمیت PCR است که در موارد درمان و یا وجود مقادیر خیلی کم ارگانیسم، قابلیت ردیابی هدف مورد نظر را دارد، زیرا روش مولکولی PCR قابلیت ردیابی میزان اندک میکروارگانیسم را دارد که دلیل بر حساسیت آن می‌باشد. البته باید این نکته را در نظر داشت که بخاطر حساسیت بالای Nested-PCR امکان نتایج مثبت کاذب نیز محتمل می‌باشد و به همین دلیل روش کشت روش قطعی تشخیص می‌باشد و نتیجه مثبت Nested-PCR باید با وجود یا عدم وجود علائم بالینی بیماری در بیمار مورد نظر و بیماری زمینه ای و مصرف دارو های ضد قارچی قبل از انجام تست ها مورد بررسی قرار گیرد. در شرایطی که نتیجه آزمایش مستقیم و کشت منفی باشد، ولی PCR مثبت باشد، نشان دهنده این موضوع است که بیمار قبل از تشخیص قطعی بیماری، تحت درمان قرار گرفته است و به همین دلیل نتایج مورفولوژی منفی شده است ولی از آنجایی که PCR قابلیت ردیابی مقادیر بسیار اندک میکروارگانیسم را دارد بنابراین مثبت شده است، در این تحقیق حساسیت روش PCR در مقایسه با دو روش آزمایش مستقیم و کشت ۱۰۰٪ بود که نشان از اهمیت و حساسیت این روش است.

در یافته‌های Hayette و همکاران که برای ردیابی گونه‌های آسپرژیلوس انجام شد، آن‌ها گزارش کردند که تمام نمونه‌های BAL گرفته شده از بیماران مبتلا به آسپرژیلوزیس ریوی مهاجم، از نظر PCR مثبت شدند که (از نظر مثبت شدن PCR برای نمونه‌هایی با کشت مثبت) با تحقیق حاضر مطابقت دارد (۱۳). در یافته‌های Buchheidt و همکاران نتایج مثبت حاصل از PCR بیشتر از نتایج مورفولوژی بود که مطابق با این بررسی است (۲۵).

در این بررسی پرایمرهای انتخابی مطابق Sugita و همکاران از پرایمرهای ASAP1, ASAP2, Af3r, ASPU استفاده گردید، در این بررسی نتایج مولکولی، نتایج مورفولوژی را مطابق Sugita و همکاران تایید نمود همچنین نتایج تعیین توالی نیز روش Nested-PCR را در تشخیص آسپرژیلوس فومیگاتوس تایید نمود (۲۰).



شکل ۳. نتایج ژل الکتروفورز محصولات Nested-PCR با پرایمرهای اختصاصی گونه آسپرژیلوس فومیگاتوس در تعدادی از محصولات PCR. M مارکر (100 bp DNA Ladder)، چاهک ۱. کنترل منفی، چاهک ۸: کنترل مثبت آسپرژیلوس فومیگاتوس استاندارد (ATCC 26430)، چاهک ۵، نمونه مثبت (باند ۳۰۷ جفت بازی)، چاهک های ۲، ۳، ۴، ۶ و ۷ گونه های دیگر آسپرژیلوس

بحث

در مواردی علائم بالینی بیمار به گونه ای است که پزشک را ملزم به درخواست همزمان آزمایش قارچ شناسی (به ویژه از نظر آسپرژیلوس) و آزمایش از نظر وجود مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در نمونه BAL می‌نماید، تشخیص زودهنگام آسپرژیلوزیس مهاجم، از جنبه کنترل و درمان این بیماری بسیار اهمیت دارد و روش‌های مولکولی این هدف را محقق می‌سازد (۲۴-۲۲).

در این مطالعه به منظور استخراج DNA آسپرژیلوس در نمونه بالینی BAL از روش دستی فتل کلروفرم استفاده گردید، طی بررسی های انجام شده اکثر مطالعات از کیت های تجاری به این منظور استفاده می کنند و مطالعات محدودی به ویژه در ایران از این روش استفاده شده است (۱۷، ۱۹). همچنین استفاده از Duplex-PCR برای تکثیر همزمان قطعات DNA آسپرژیلوس و ژن بتا اکتین به عنوان هاوسکیپینگ انسانی در نمونه‌های BAL مشکوک به سل مطالعه‌ای است که در بررسی‌های قبلی در ایران انجام نگرفته است و حائز اهمیت است. در بررسی حاضر نتایج حاصل از PCR یافته‌های مورفولوژی را تایید نمود، همچنین نمونه‌هایی که از نظر آسپرژیلوس مثبت بودند، اما در PCR دوم برای آسپرژیلوس فومیگاتوس منفی شدند، به عنوان گونه‌های غیر فومیگاتوس معرفی شدند. در این مطالعه تعداد ۱۲ نمونه (۱۲٪)

نتایج بررسی حاضر نشان داد که در نمونه های BAL مشکوک به سل می توان آسپرژیلوس و به ویژه آسپرژیلوس فومیگاتوس را مد نظر قرار داد، همچنین با توجه به سرعت، دقت و حساسیت بالای روش های مولکولی بهتر است از این روش در آزمایشگاه ها، مراکز درمانی و تحقیقاتی استفاده شود، لازم به ذکر است بهتر بود در مطالعه حاضر در کنار روش مولکولی و مورفولوژی از تست ارزیابی گالاکتو مانان در سرم بیماران مبتلا نیز استفاده شود. اما به دلیل محدود بودن بودجه تحقیقاتی و سختی های گرفتن نمونه این بخش کار انجام نگرفت، توصیه می شود در مطالعات بعدی در کنار کار مولکولی این تست نیز انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

از پرسنل فعال و زحمت کش آزمایشگاه قارچ شناسی مولکولی مرکز تحقیقات سلامت اصفهان وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران که امکان انجام بخش مهمی از کار حاضر را فراهم نمودند، قدردانی می گردد.

تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

Klingspor و همکاران گزارش کردند که نتایج مثبت حاصل از روش مولکولی ۹۷٪ و نتایج مثبت روش کشت ۷۳٪ بود که از نظر برتری روش مولکولی مشابه با بررسی حاضر است (۲۶). Walsh و همکاران با روش Real-time PCR، در نمونه های آلوده شده به روش تجربی، آسپرژیلوس را ردیابی کردند و بیان داشتند که روش مولکولی برای ردیابی آسپرژیلوس فومیگاتوس حساس-تر از کشت است (۱۴) در نتایج Rickerts و همکاران تعداد نمونه های مثبت در روش کشت و مولکولی یکسان بود که تا تقریباً با تحقیق حاضر مطابقت دارد (۸). نتایج مثبت کاذب، به عنوان مرز محدود کننده بررسی های مولکولی در تشخیص آسپرژیلوس مطرح می باشد (۲۸، ۲۷). در بررسی انجام شده توسط Luong و همکاران، مثبت کاذب ۱۲٪ گزارش شد (۲۳)؛ در حالی که در بررسی های دیگر نتایج مثبت کاذب ۸٪ گزارش شد (۱۵، ۲۸، ۲۷). در نتایج Torelli و همکاران دو مورد مثبت کاذب و یک مورد منفی کاذب گزارش شد (۱۶)، در بررسی حاضر نیز دو مورد مثبت کاذب در مقایسه با کشت بدست آمد و

یک مورد مثبت کاذب در مقایسه با آزمایش مستقیم حاصل شد.

References

- Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M. Invasive aspergillosis: disease spectrum, treatment practices, and outcomes. I3 Aspergillus Study Group. Medicine 2000; 79: 250-260.
- Balloy V, Chignard M. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. Microbes Infect. 2009; 11: 919-27.
- LatgeJP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 1999; 12: 310-50.
- Ibrahim-Granet O, Dubourdeau M, Latgé JP, Ave P, Huerre M, Axel A. Brakhage, B Matthias. Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus* is essential for manifestation of invasive aspergillosis. Cell Microbiol. 2008; 10(1): 134-148.
- Yanan Zhao, Steven Park, Peter Warn, Raghdah Shrief, Elizabeth Harrison, and et al. Detection of *Aspergillus fumigatus* in a Rat Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis by Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. J Clin Microbiol. 2010; 48(4): 1378-1383.
- Klingspor L, Loeffler J. Aspergillus PCR formidable challenges and progress. Med Mycol. 2009; 47(1): 241-247.
- Guillermo Garcia-Effron, Amanda Dilger, Laura Alcazar-Fuoli, Steven Park, Emilia Mellado, et al. Rapid Detection of Triazole Antifungal Resistance in *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. Microbiol. 2008; 46(4): 1200-1206.
- Rickerts V, Just-Nubling G, Konrad F, J. Kern . . Lambrecht E. Böhme A. et al. Diagnosis of invasive aspergillosis and mucormycosis in immunocompromised patients by seminested PCR assay of tissue samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006; 25(1): 8-13.
- Hui Xu , Chen W , Li L , Wan Z , Li R , Liu W. Clinical Itraconazole-Resistant Strains of *Aspergillus fumigatus*, Isolated Serially from a Lung Aspergilloma Patient with Pulmonary Tuberculosis, can be Detected with Real-Time PCR Method. Mycopathologia. 2010; 169: 193-199.
- Rello J, Esandi ME, Mariscal D, Gallego M, Domingo C, Valles J. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: report of eight cases and review. Clin Infect Dis. 1998; 26: 1473-1475.
- Del Palacio A, Cuetara MS, Ponton J. Invasive aspergillosis. Rev Iberoam Micol. 2003; 20: 77-8.
- Hosek J., Svastova P, Moravkova M, et al.,. Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological

- material: a review. *Veterinari Medicina*, 2006; 51: (5): 180–192.
13. Hayette M, Vaira D, Susin F, Boland P, Christiaens G, Melin P, De Mol P. Detection of *Aspergillus* Species DNA by PCR in Bronchoalveolar Lavage Fluid. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(6): 2338–2340.
 14. Walsh JT, Wissel M, Grantham J, Petraitiene R, Petraitis V, Kasai M. Molecular Detection and Species-Specific Identification of Medically Important *Aspergillus* Species by Real-Time PCR in Experimental Invasive Pulmonary Aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2011; 4150–4157.
 15. Tuon FF. A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples. *Rev Iberoam Micol*. 2007;24: 89–94.
 16. Torelli R, Sanguinetti M, Moody A. Diagnosis of Invasive Aspergillosis by a Commercial Real-Time PCR Assay for *Aspergillus* DNA in Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples from High-Risk Patients Compared to a Galactomannan Enzyme Immunoassay. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(12): 4273–4278.
 17. Zarrinfar H, Mirhendi H, Makimura K, Satoh K, Khodadadi H, Paknejad O. Use of Mycological, nested PCR, and Real-time PCR Methods on BAL Fluids for Detection of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* in Solid Organ Transplant Recipients. *Mycopathologia* 2013; 176(5): 377–385.
 18. Mirhendi H, Khoramizadeh M, Jalalizand N, Diba K. Identification of most important pathogenic *Aspergillus* species using conformational polymorphism of single stranded PCR. *Urmia Med j*. 2009; 20 (3) :164-171(Persian)
 19. Yazdanparast S, Ghandchi G, Heshmati F, Afshar Moghaddam S, Khodadoust M. Detecting the *Aspergillus* spp. In(BAL) Fluid Samples by Nested PCR, Culture and Direct Smear. *Payavard salamat* . 2011; 5 (3):80-87.
 20. Sugita C, Makimura K, Uchida K, Yamaguchi H, Nagai A. PCR identification system for the genus *Aspergillus* and three major pathogenic species: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Med Mycol* 2004; 42(2): 433-437.
 21. Gilliland G, Perrin S, Bunn HF. Competitive PCR for quantitation of mRNA. In: Innis MA, ed. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990: 60–9.
 22. Altman DG, Bland JM (1994). "Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity". *BMJ* 308 (6943): 1552.
 23. Luong ML, Clancy C J, Vadnerkar A, Kwak EJ, Silveira FP, Wissel MC, Grantham KJ, et al. Comparison of an *Aspergillus* Real-time Polymerase Chain Reaction Assay With Galactomannan Testing of Bronchoalveolar Lavage Fluid for the Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Lung Transplant Recipients. *Clin Infect Dis* 2011; 52(10): 1218–1226.
 24. Perlin D S, and Zhao Y. Molecular diagnostic platforms for detecting *Aspergillus*. *Med Mycol* 2009; 47(Suppl. 1): S223–S232.
 25. Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Baldus M, Brauninger S, Hehlmann R. Detection of *Aspergillus* Species in Blood and Bronchoalveolar Lavage Samples from Immunocompromised Patients by Means of 2-Step Polymerase Chain Reaction: Clinical Results. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 428–435.
 26. Klingspor L and Jalal S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12(8): 745–753.
 27. Khot PD, Fredricks DN. PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009; 7: 1201–1202.
 28. Loeffler J, Hebart H, Bialek R, Hagemeyer L, Schmidt D, Serey FP, et al. Contaminations occurring in fungal PCR assays. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(4): 1200–1202.