

بررسی مولکولی گونه های بیماریزای اسپرزیلوس جدا شده زخم پای افراد دیابتی با

استفاده از روش Nested PCR

سارا کمال زاده^{*۱} - آذر سبک بار^۲

۱- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، البرز، ایران.
۲- دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، البرز، ایران.
***نویسنده مسئول:** کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، البرز، ایران.
پست الکترونیکی: sara.kamalzadeh@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: روش PCR حساسیت و ویژگی بالایی را جهت تعیین DNA قارچی و شناسایی سریع اغلب گونه های شایع کلینیکی اسپرزیلوس را ارائه میدهد. هدف از این مطالعه مقایسه کشت با روش nestedPCR برای تعیین اسپرزیلوزیس از زخم پای بیماران دیابتی مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی تهران بود.

روش: ۶۵ نمونه زخم های مشکوک به اسپرزیلوزیس موجود در زخم پای دیابتی تحت شرایط کشت و PCR قرار گرفتند. ایزوله های اسپرزیلوس در حد جنس بر روی محیط SGA شناسایی شدند. سپس استخراج DNA انجام و واکنشهای PCR و Nested PCR انجام شد. از بیماران نمونه سرم تهیه و واکنش الیزا جهت یافتن آنتی بادی های ضد جنس و گونه انجام شد. نتایج با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس تجزیه و تحلیل شدند و $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها: از مجموع ۶۵ نمونه ؛ ۳۹ نمونه بعنوان اسپرزیلوزیس حاصله از روش کشت تشخیص داده شدند. در روش PCR و Nested PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ۴۱ مورد بعنوان اسپرزیلوس تشخیص داده شدند که از نظر در تشخیص گونه با هم یکسان ولی در تشخیص جنس با هم متفاوت بودند. نتایج الیزا نشان داد که تعداد ۳۹ نمونه مثبت بودند.

نتیجه گیری: اگرچه PCR حساسیت کمتری نسبت به سنجش Nested PCR دارد ولی اکثرا شایعترین گونه های بیماریزا یعنی اسپرزیلوس فومیگاتوس را تعیین میکند. نتایج ما نشان میدهند که تفاوت معنی داری مابین نتایج کشت و نتایج nPCR در شناسایی جنس اسپرزیلوس وجود دارند.

کلیدواژه ها: Nested PCR - اسپرزیلوس - زخم پای دیابتی - کشت

فصلنامه علمی دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، دوره ی اول، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲

مقدمه

امروزه با رشد تکنولوژی و پیشرفت علوم پزشکی همگام با آن و نیز بهبود شرایط اجتماعی و بالارفتن سطح بهداشت عمومی در جوامع پیشرفته به نحو چشمگیر و در کشورهای در حال توسعه در حد مطلوب، موجب کنترل بیماریهای عفونی و خصوصاً قارچی گردیده ولی متأسفانه در این روند همواره عواملی چون آیدز، سرطاناتها و دیابت ایجاد اختلال نموده اند(۱).

پیشرفتهای حاصله در شناسایی عوامل میکروبی بیماریزای انسان همچنین کنترل و درمان بیماریهای حاصله از آنها در دو دهه اخیر برجسته و تحسین بر انگیز بوده است. با وجود این بیماریهای قارچی فرصت طلب با گسترش بیماری های سرکوب کننده سیستم ایمنی به عنوان معضل درمانی مطرح هستند(۲). در حالیکه موفقیت های کمی در کنترل این قبیل بیماریها حاصل شده است اما ممکن است مورد توجه واقع نشوند و میتوانند عملاً بزرگترین مشکلات بهداشتی را در زمینه مسائل افراد دیابتی بوجود آورند(۱).

عفونت های قارچی فرصت طلب معمولاً در افراد مستعد باعث ایجاد بیماری های حاد و کشنده می گردد(۳). همانطور که ذکر شد از جمله بیماریهای زمینه ای در ابتلا به عفونتهای قارچی فرصت طلب دیابت است. امروزه علیرغم کنترل و کاهش بسیاری از عوارض این بیماری، عفونتهای قارچی فرصت طلب از گرفتاریها و مزاحمتهای مهم بیماران دیابتی می باشد. بطور مثال موکور مایکوزیس که یکی از بیماریهای قارچی با پیشرفت خیلی سریع و کشنده می باشد بیش از ۹۰٪ موارد در بیماران دیابتی دیده می شود(۳).

گزارشهای زیادی حاکی از این است که دیابت ملیتوس بعنوان یکی از بیماریهای مهم زمینه ای برای ابتلا به بیماریهای قارچی بخصوص عفونتهای زخم پای دیابتی می باشند(۵،۴) زیرا این بیماران از یک طرف شانس بیشتری برای ابتلا به بیماریهای قارچی داشته و از طرف دیگر در صورت ابتلا، بیماری بصورت مزمن یا منتشره درمی آید و به درمان ضدقارچی هم جواب مناسب نمی دهد(۶،۷).

در میان عوامل قارچی، شایع ترین آنها آسپرژیلوزیس و کاندیدیازیس در زخم پا میباشد که معمولاً این افراد به درمان آنتی بیوتیکی پاسخ نمیدهند و بیماری سیر مزمن میگردد(۸،۹). آسپرژیلوزیس فومیگاتوس (*A.fumigatus*) و آسپرژیلوس فلاووس (*A.flavus*) دو عامل اصلی ایجادکننده آسپرژیلوزیس دیابتی می باشند. گونه های دیگری ممکن است مداخله داشته

باشند که شامل *A.nigrescens* *A.amstelodami* *A.niger*, *A.nidulans*, *A.glaucus*, *A.terreus* می شوند(۱۰،۱۲).

هنگامی که این قارچ به طور مکرر از نمونه های مشکوک جدا شود آسپرژیلوزیس تشخیص داده میشود. به دلیل اینکه اسپوره های این قارچ تقریباً در همه جا حضور دارند تنها با مقایسه نتایج یکسری از آزمایشات و با روش یکسان و همزمان میتوان نوع گونه را مشخص نمود. لذا برای تایید عامل آسپرژیلوزی در عفونت زخم، باید از زخم طی چند مرحله نمونه برداری به عمل آید و عامل جدا شده در تمام مراحل باید یک نوع آسپرژیلوس باشد تا بتوان آنرا به عنوان عامل عفونت مطرح کرد(۳). تعیین نوع گونه به آزمایشات دقیق و تخصصی نیازمند است که شامل کشت یا بررسی ژنوم می باشد. در این بین بررسی ژنوم روشی مطمئن تر و دقیق تر میباشد. هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی مولکولی گونه های آسپرژیلوس جدا شده از زخم پای دیابتی توسط روش Nested PCR و مقایسه حساسیت آن با PCR و کشت بود.

روش مطالعه

در این مطالعه مقطعی؛ طی یک دوره ی ۹ ماه ، سه فصل (پاییز- زمستان ۹۱ - بهار - اوایل تابستان ۹۲) از ۶۵ بیمار با زخم پای دیابتی مراجعه کننده به بخش عفونی بیمارستان امام خمینی تهران که زخم هایشان به درمان آنتی بیوتیکی پاسخ نداده بودند و در ضمن هیچ گونه درمان ضد قارچی دریافت نکرده بودند و یا جراحی نشده بودند نمونه گیری جهت انجام آزمایشات قارچ شناسی انجام شد.

نمونه گیری به روش تراشیدن سطح پوست (اسکراپینگ) پا و بین انگشتان پا بیماران دیابتی با زخم دیابتی انجام گرفت. تراشیدن آرام سطح ضایعات و بافت گرفتار با لبه اسکالپل تیغ بیستوری شماره ۱۱ از محل زخم و تراشیدن سطح پوست از بافت سالم و غیر گرفتار انجام شد. نمونه ها در پلیت جمع آوری شد. سپس بررسی پرونده ی بیمار با توجه به نام و نام خانوادگی- سن- جنس- بیماریهای همراه- داروهای مصرف شده - تشخیص پزشک- تاریخ نمونه گیری و از نظر درجه درگیری (۱. زخم سطحی عفونی، ۲. زخم عمیق عفونی، ۳. آبسه عمیق حاد، ۴. فاسد شدن انگشت تکی مرطوب، ۵. فاسد شدن کامل پا) بررسی گردید و سریع به آزمایشگاه قارچ شناسی منتقل شد. همزمان جهت آزمایشات پاتوبیولوژی؛ بیوپسی و برداشت

شد. از DNA بدست آمده برای واکنش PCR به منظور شناسایی جنس اسپرزیلوس استفاده گردید.

واکنش PCR: شرایط واکنش PCR برای تمامی نمونه ها به صورت یکسان انجام شد. هر یک از واکنش ها حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱۵ میلی مولار MgCl₂، ۰/۵ U آنزیم Taq polymerase، ۱ میکرولیتر dNTP و ۲۰ پیکو مول از هر یک از پرایمر ها (Asp1 و Asp2) بود. این پرایمر ها بر اساس قطعه ۳۶۰ جفت باز حفظ شده در ناحیه 16s rRNA در جنس اسپرزیلوس ها می باشد. از این توالی به منظور شناسایی جنس و تایید آن استفاده شده است.

الکتروفورز: محصولات PCR توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/۵ میکروگرم به ازای هر میلی لیتر بررسی شدند. میزان ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR همراه با ۲ میکرولیتر Loading Buffer 6X درون چاهک های ژل آگارز بار گذاری شدند و برای مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ ولت درون تانک حاوی TAE Buffer 0.5X راه اندازی شدند. پس از این مدت ژل در زیر دستگاه UV مورد بررسی قرار گرفت.

واکنش nested PCR: مرحله اول: پس از تایید جنس اسپرزیلوس در مرحله قبل به منظور شناسایی گونه اسپرزیلوس از واکنش nPCR استفاده می شود. در مرحله اول این واکنش تمامی ترکیبات همانند واکنش PCR مرحله قبل می باشد به غیر از پرایمر Reverse که به جای Asp2 از Asp3 استفاده شده است. طول قطعه تکثیر شده در این مرحله ۷۴۰ جفت باز بوده که درون این قطعه نواحی متغیری در گونه های مختلف وجود دارند. پس از تایید تکثیر این قطعه با الکتروفورز از محصول این مرحله به عنوان DNA نمونه در مرحله بعدی استفاده شد. مرحله دوم: در این مرحله به ازای هر نمونه از مرحله قبلی سه مخلوط مشابه مرحله اول آماده شد ولی به هر یک از میکروتیوب ها پرایمر های متفاوتی به شرح زیر اضافه شد:

1. به منظور شناسایی گونه های Afl1, Afl2، اسپرزیلوس فلاووس
 2. به منظور شناسایی گونه های Afu1, Afu2، اسپرزیلوس فومیگاتوس
 3. به منظور شناسایی گونه های Anil, Ani2، اسپرزیلوس نایجر
- شرایط واکنش مانند مرحله اول بوده و پس از تکثیر قطعه درونی ۱۲۰ جفت بازی مورد بررسی با آزمون الکتروفورز قرار

بافت از بیمار انجام گردید که برای رنگ آمیزی با PAS به آزمایشگاه منتقل شد.

تشخیص بیماری بر اساس علائم بالینی، نمونه برداری بافتی، تهیه و تایید سریع آزمایش لامهای نسوج رنگ آمیزی شده در شرایط آسپتیک (بعثت اینکه ارگانیسم ساپروفیت بود)، مشاهده هایفهای قارچ، تشخیص نهایی جدا کردن از کشت همراه با آنتی بیوتیک ضد باکتریایی و مقایسه قارچهای همزمان از کشت هوا، قابل تایید بود.

مطالعات ماکروسکوپی: تراشه های جمع آوری شده که شامل بافت سالم و گرفتار بودند به آزمایشگاه منتقل شد و بر روی محیط سابوردکستروز آگار کشت داده شدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت یک هفته انکوبه گردیدند و پس از این مدت در صورتی که کلونی مشاهده شد، از روش وت مانت استفاده شد. در انجام وت مانت و بررسی در زیر میکروسکوپ، سلول مخمری از قارچ ساپروفیتی افتراق داده شدند. در صورت مشاهده ی قارچ ساپروفیت توسط پتاس ۱۰٪، از لاکتوفل برای تشخیص استفاده شد.

آزمایشات بافت شناسی: پس از پاساز بافت، بلوک بافت شناسی از نمونه ها تهیه و سپس توسط دستگاه میکروتوم به اندازه ۴-۵ میکرونی برش داده و لام پاتولوژی تهیه گردید. پس از فیکس شدن، رنگ آمیزی توسط PAS انجام شد. در این روش قارچها به رنگ صورتی و زمینه بر حسب استفاده از لایت گرین یا از H&E، سبز یا قرمز می باشد.

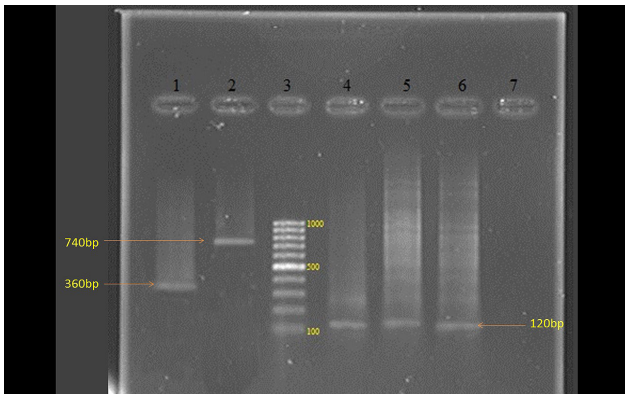
آزمایشات مولکولی: برای استخراج DNA قارچ، میسلیم ها از محیط های کشت به آرامی جدا شدند سپس ۵۰۰ میکرو لیتر از بافر استخراج (شامل ۱۰۰ میلی مولار Tris-HCl و ۴۰ میلی مولار EDTA) و ۶۰ میکرو لیتر سدیم دودسیل سولفات ۲۰٪ و ۳۰۰ میکرولیتر بنزیل کلراید به هر نمونه افزوده شد. این مخلوط پس از ورتکس شدن به مدت ۴۰ دقیقه و در دمای ۵۰ درجه انکوبه شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه به شدت تکان داده شد تا اینکه دو فاز مجزا ایجاد شود.

سپس ۶۰ میکرولیتر سدیم استات ۳ مولار اضافه گردید و میکرو تیوب ها بر روی یخ به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شدند. پس از سانتریفوژ با شتاب 3,500 x g در دمای ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه مایع رویی جدا شد و DNA توسط ایزوپروپانول به نسبت یک به یک رسوب داده شد. رسوب حاوی DNA مجددا در ۳۰۰ میکرولیتر از بافر TE حل شد. و ۱/۵ میکرو لیتر RNase (۱۰ میلی گرم در هر میلی لیتر) به این محلول اضافه

یافته ها

نتایج کشت و اسمیر مستقیم: از ۶۵ بیمار که دارای بافت گرفتار بوده اند در بررسی با KOH ۳۵ نفر مثبت مشاهده شده اند و ۳۰ نفر منفی گزارش شده اند. کشت نمونه ها نیز نتایج مشابهی داشت.

نتایج آزمون PCR: بر اساس نتایج این آزمون از ۶۵ بیمار تعدا ۴۱ نمونه مثبت تشخیص داده شد و ۲۴ نمونه منفی گزارش شدند. فراوانی گونه ها از قرار اسپرژیلوس فومیگاتوس با ۳۵ مورد (۸۵/۳۶٪) بیشترین گونه ایزوله شده و به دنبال آن اسپرژیلوس فلاووس با ۳ مورد (۷/۳۲٪) اسپرژیلوس نایجر با ۲ مورد (۴/۸۸٪) و دیگر گونه های اسپرژیلوس با ۱ مورد (۲/۴۴٪) در رتبه های بعدی بودند (نمودار ۱ و ۲).



تصویر ۱: الکتروفورز محصولات PCR و Nested PCR بر روی ژل آگارز.

چاهک ۱: نمونه مثبت PCR برای جنس اسپرژیلوس. چاهک ۲: نمونه مثبت Nested-PCR برای جنس اسپرژیلوس. چاهک ۳: خط کش ۱۰۰ جفت بازی DNA. چاهک ۴: نمونه مثبت Nested-PCR برای اسپرژیلوس فومیگاتوس. چاهک ۵: نمونه مثبت Nested-PCR برای اسپرژیلوس فلاووس. چاهک ۶: نمونه مثبت Nested-PCR برای اسپرژیلوس نایجر. چاهک ۷: نمونه کنترل منفی

نتیجه آزمون الیزا: طبق آزمون الیزا که بر روی ۶۵ نمونه های سرم بیماران صورت گرفت تعداد ۳۹ مورد بعنوان نمونه مثبت اسپرژیلوزیس تلقی شدند. ۳۲ مورد اسپرژیلوس فومیگاتوس (۸۲/۰۵٪)، ۴ مورد (۱۰/۲۵٪) اسپرژیلوس فلاووس، ۲ مورد (۵/۱۲٪) اسپرژیلوس نایجر و ۱ مورد نیز (۲/۵۶٪) سایر گونه ها شناسایی شدند (نمودار ۱ و ۲).

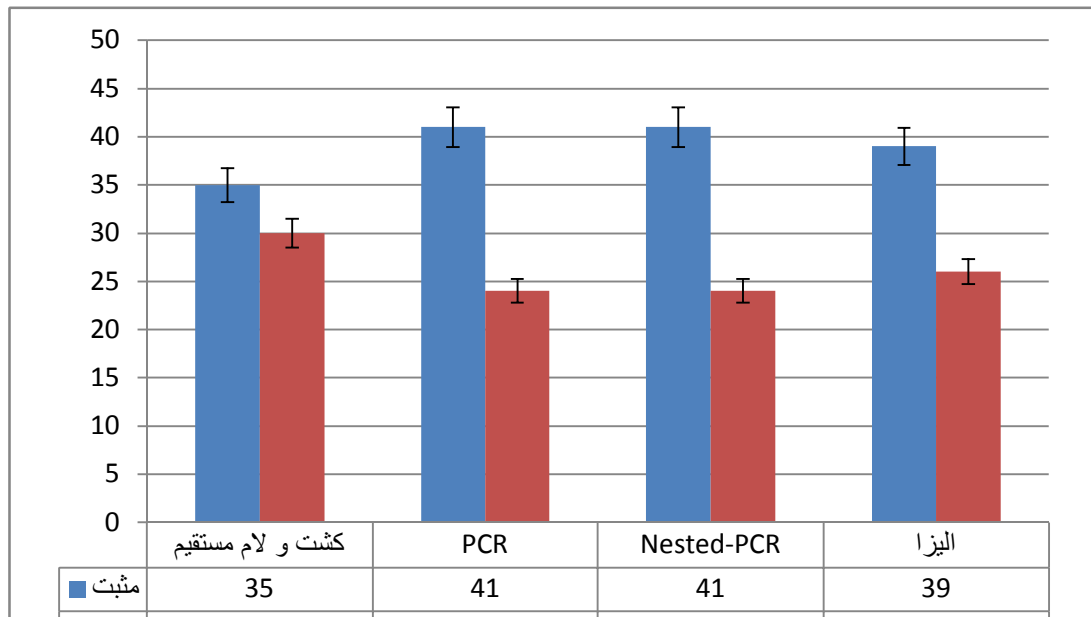
گرفتند. در صورتی که میکروتیوب ۱ مثبت باشد گونه اسپرژیلوس فلاووس می باشد. در صورتی که میکروتیوب ۲ مثبت باشد گونه اسپرژیلوس فومیگاتوس می باشد، در صورتی که میکروتیوب ۳ مثبت باشد گونه اسپرژیلوس نایجر می باشد، و نهایتا در صورت منفی بودن تمامی واکنش ها گونه های دیگر اسپرژیلوس هستند.

ELISA: برای انجام تست الیزا ابتدا از بیماران نمونه خون جدا گردید و سرم خون جدا شد. به منظور تشخیص گونه با استفاده از روش الیزا ابتدا سویه های استاندارد اسپرژیلوس در محیط مایع به منظور کشت انبوه پاساژ داده شد. کشت انبوه حاصله را پس از رسوب دادن و شستشو با اب مقطر استریل در ۲ مرحله دیواره ۲۸ لول ها را به روش سایش مکانیکی شکسته و محتویات سلولی را جدا کردیم (مشابه روش استخراج DNA به روش اول) از سوپ سلولی حاصل به عنوان آنتی ژن در واکنش الیزا استفاده شد. سوپ سلولی را به میزان ۵۰ میکرولیتر درون چاهک های کیت الیزا ریخته و هم حجم آن Coating Buffer اضافه نمودیم. این کار به منظور فیکس کردن آنتی ژن در درون چاهک های الیزا می باشد.

پس از سه مرحله شستشو با Wash buffer حاوی Twin نمونه های سرم به دست آمده را بر درون چاهک ها با رقت های ۱:۱، ۱:۱۰، ۱:۱۰۰ و ۱:۱۰۰۰ اضافه نمودیم. در صورت حضور آنتی ژن علیه سویه های اسپرژیلوس بین آنتی ژن و آنتی بادی موجود در سرم اتصال برقرار می شود. پس از این مرحله نیز سه بار کیت شستشو داده شد. سپس آنتی سرم انسانی کانژوگه شده به چاهک ها اضافه گردید. در صورتی که کمپلکس آنتی ژن-آنتی بادی مرحله قبل تشکیل شده باشد آنتی سرم انسانی به این کمپلکس از طریق آنتی بادی متصل شده و در صورت افزودن سوبسترا تغییر رنگ ایجاد می شود. نتایج توسط دستگاه الیزا ریدر مورد بررسی قرار گرفت.

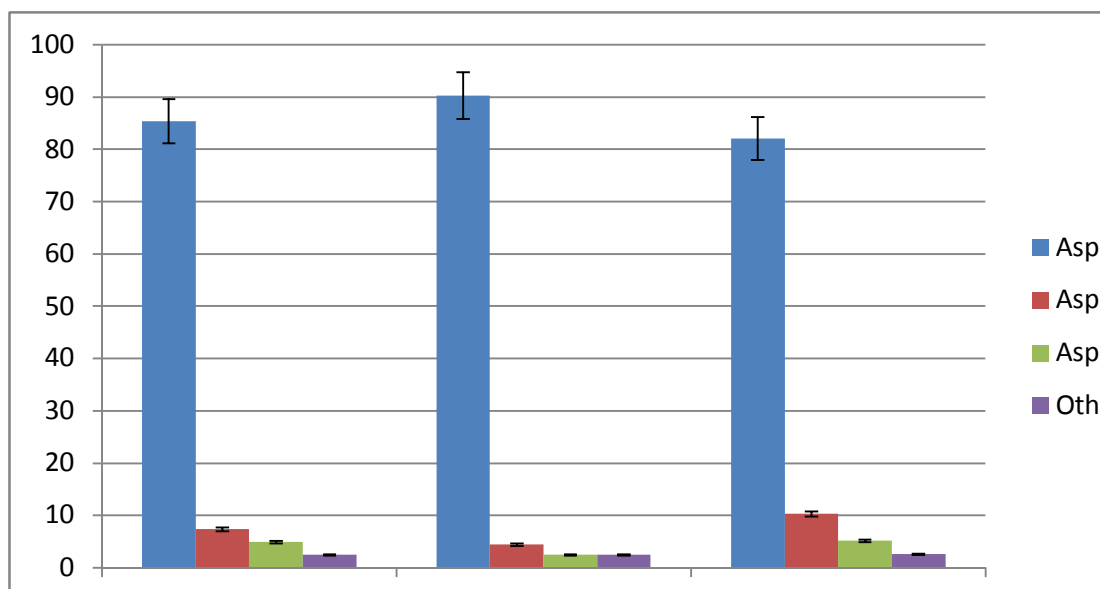
آنالیز آماری: کلیه تست ها به صورت سه بار تکرار انجام شد و سپس $mean \pm SD$ محاسبه گردید. داده ها به وسیله آزمون ANOVA و نرم افزار آماری SPSS در مقایسه با معیارهای استاندارد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقدار p value < 0.05 میباشد.

نمودار ۱: توزیع فراوانی نمونه های جدا شده از زخم پای بیماران دیابتی برحسب مثبت و منفی در روش های مختلف مورد مطالعه. ارزش اخباری مثبت و منفی در روش کشت و لام مستقیم نسبت به سایر روشهای تشخیصی کمتر است.



نتیجه آزمون nPCR بر اساس آزمون nPCR انجام شده از مجموع ۶۵ مورد ۴۱ نمونه با پرایمر های اختصاصی مثبت گردید که ۳۷ مورد آسپرژیلوس فومیگاتوس (۹۰/۲۴٪)، ۲ مورد (۴/۸۸٪) آسپرژیلوس فلاووس، ۱ مورد (۲/۴۴٪) آسپرژیلوس نایجر و ۱ مورد نیز (۲/۴۴٪) سایر گونه ها شناسایی شدند (نمودار ۱ و ۲)

نمودار ۲: توزیع فراوانی نسبی گونه های آسپرژیلوس جدا شده از نمونه زخم پای دیابتی بر اساس روش تشخیص. در هر سه روش افتراقی آسپرژیلوس فومیگاتوس بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده است.



بحث

سیستم ایمنی افزایش غلظت گلوکز در غشا مخاط، بافت ها و مایعات مختلف بدن، افزایش تکثیر فلور نرمال مخمری بدن، بیماران دیابتی را برای ابتلا به بیماری های قارچی و ... مستعد می سازد. گزارش های زیادی در رابطه با افزایش شیوع و شدت عفونت های قارچی در دهان، دستگاه تناسلی، ناخن ها، دستگاه ادراری، نواحی بدن و بافت ها در بیماران دیابتی به خصوص

بیماران مبتلا به دیابت از آن جهت که دیابت شرایط و زمینه مساعد را برای ابتلا به بیماری های عفونی دیگر به خصوص بیماری های قارچی فرصت طلب فراهم می کند از اهمیت به سزایی برخوردار است. به دلیل مختلف از جمله ضعف فزاینده

گراندول و همکاران در مطالعات تجربی خود متوجه شدند عدم تولید پروتئاز در کاندیدا آلبیکنس موتاسیون یافته باعث کاهش اتصال این مخمر به سطح پوست می شود. تحقیقات چینچولیکاروپال در مورد وجود پاتوژن های قارچی در بافت های زخم پای دیابتی نشان داد که در بین آنها انواع کاندیدا بیشتر بوده است (۱۸).

ایمیلیا ملینری و همکاران در سال ۲۰۰۵ میلادی طی پژوهشی متوجه شدند که کاندیدا پاراپسیلوزیس پر تکرارترین نمونه قارچی جدا شده از سندرم پای دیابتی بوده است که در مطالعه ی آنها ۵۹٪ مرد و ۴۰/۹٪ زن در میانگین سنی ۵۲ تا ۸۰ سال بودند که آسیب های عصبی در همه بیماران وجود داشت. همه موارد جدا شده از زخم مخمر یا مخمر همراه با باکتری گزارش شد که ۴۵/۵٪ کاندیدا پاراپسیلوزیس و ۲۲/۷٪ کاندیدا تروپیکالیس و ۹/۱٪ کاندیدا آلبیکنس و گلابراتا بودند. کاندیدا کروزه ای و کاندیدا کفیر به میزان کم به طور مساوی جدا شدند (۱۱). هلد و همکارانش هم همراهی کاندیدا با زخم های طولانی در پای دیابتی را در مطالعه خود تأیید می کنند که درمان ضد قارچی را بهبود می بخشد (۱۹).

وجود انواع کاندیدا در بیماران دیابتی با زخم گزارش شده در فضاهای پا توسط میسونی گزارش شد (۲۰). سام پتر و همکارانش در سال ۲۰۰۶ الی ۲۰۰۷ میلادی در هند ۷۴ نوع بیمار دیابت را با عفونت های پای دیابتی انتخاب کردند، که ۴۹ نفر مرد و ۲۵ نفر زن بین سنین ۴۸ تا ۶۹ سال بودند، انواع قارچ های جدا شده از زخم پای آنها ۹۳٪ کاندیدا بود که پژوهشگران کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا گلابراتا را در تحقیق مشاهده نمودند، و می توان در این تحقیق وجود درماتوفیت ها را هم تأیید کرد.

نتیجه گیری

با توجه به مطالعه حاضر و مطالعات مشابه، لزوم بررسی های قارچ شناسی در مبتلایان به سندرم پای دیابتی جهت تشخیص و درمان بموقع ضروری مینماید تا بتوان از عوارض به نحو مطلوب کاست.

تشکر و قدردانی

از کلیه عزیزانی که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند؛ در بیمارستان امام خمینی تهران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج تشکر و قدردانی به عمل می آید.

آنهایی که به طور ناقص درمان می شوند، وجود دارد. کلینیزاسیون مخمری در بافت ها خصوصا بافت های آسیب دیده در دیابتی ها، به دلیل وجود قند شایع می باشد. از جمله نواحی با احتمال بالای تروما و نوروپاتی پای افراد دیابتی است که در معرض ابتلا به عفونت قارچی قرار دارد.

قارچ اسپرژیلوس فومیگاتوس یکی از ساپروفیت های فرصت طلب خاکزی می باشد و به راحتی میتواند از طریق کفش و پوشاک آلوده پای صدمه دیده فرد دیابتی را آلوده سازد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کشت نمونه ها به منظور شناسایی جنس آلوده کننده نمیتواند زیاد قابل اطمینان باشد ولی تست های مولکولی PCR و nested PCR در تشخیص جنس با قدرت و دقت یکسان عمل نمودند. از طرفی تست تعیین گونه در دو روش PCR و nested PCR با اختلافاتی در نتایج همراه بود که از نظر آماری معنی دار نبود (سطح معنی داری $P < 0.05$). همچنین نتایج الیزا نشان داد که افراد مبتلا تا حدی میتوانند در خون خود آنتی بادی علیه جنس و حتی گونه آلوده کننده تولید کنند ولی احتمالا به دلیل شباهت ساختاری آنتی ژنی و یا از آنجا که ممکن است این عوامل به صورت فلور نرمال تولید آنتی بادی را تحریک کنند، نتایج آن قابل اطمینان نخواهد بود. مطالعات متشابهی در این رابطه صورت گرفته است که نتایج آنها با یافته های ما همراهی نداشته است.

نتایج مطالعه حاضر با مطالعه نیر و همکاران مغایر است. در مطالعه آنان کاندیدا آلبیکنس ۴۹٪، کاندیدا تروپیکالیس ۲۳٪، کاندیدا پاراپسیلوزیس ۱۸٪، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا کروزه ای هر کدام ۵٪ بودند انواع اسپرژیلوس جدا شده ۰.۷۲٪ بود (۱۶). در بررسی شهین دخت بصیری جهرمی و علی اصغر خاکسر در سال ۲۰۰۵ در بررسی عفونت های قارچی در سندرم پای دیابتی متوجه حضور ۶۹/۴٪ کاندیدا آلبیکنس و ۱۳/۹٪ گونه های اسپرژیلوس و ۴/۲٪ کاندیدا نئوفرمنس^۱، ۲/۸٪ فوزاریوم شدند (۱۷).

همچنین بر طبق مطالعه ی دوگلاس و همکارانش مشاهده کردیم که کاندیدا آلبیکنس جدا شده در سال ۲۰۰۰ میلادی در مبتلایان دیابت که دارای زخم پا هستند قدرت اتصال بالاتری دارد و سایر کاندیداهای جدا شده نسبت به کاندیدا آلبیکنس از قدرت اتصال کمتری برخوردارند مانند کاندیدا تروپیکالیس، کروزه ای و پاراپسیلوزیس.

References:

1. Sarkar P, Balantyne S, Management of Diabetic leg Ulcer. *Postgrad Med J*, 2000 Novembar, 76 (901) ,674 - 82.
2. Mandell G, Bennet J, Dolin R . Cellulitis and soft tissue infection. *Principles and Practice of infectious diseases*. Sixth edition, Pennsylvania , Churchill living stone , 2005 , volume 2 , (86) , 1046 – 47.
3. Shadzi shahla. *Medicine mycology, Laboratory diagnostic and treatment*. Isfahan, Jahad daneshgahi, 1386
4. Aly F2, Blackwell Cc, Mackenzie Da , Weir Dm . Ehon Ra , Cumming Ca, Et Al M Chronic Atrophic Orod Candidiasis Amany Patients With Diabetes Mellitus – Role Of Secretor Status *Epidemiol Infect* 1m91, 14 (Suppl 1) : 48-53
5. Schuberts, Heesemann J. [Infection In Diabetes Mellitus] *Immun Infelet*. 1995. 23:200
6. Danowslo- Toset Al 1966 Shin Spots And Diabete , Mellitus *Am . 7. Of Med .Science*.107 Uay 1966 P.704-105.
7. St Georgier V. *Infection Diseases In Immunocpromised Host . Crc* 1997 ; 739-1148.
8. Vazquez Ja.Sobel Jb. *Fungal Infection In Diabetics . Infect Dis .Clin. Nerth Am* 25 9(97:97-116;Mar 1995.
9. Ross- Flanigan , Nancy,2002 *Antifungal Drays Systemic. Qale Encyaopedia Of Medicine*.
10. Kahn Cr, Weir Gc, Eds, *Joslin's Diabetes Memites*,13 Th Ed. Media: Williams & Willkins, 1994.
11. EmilijaMlinari-Missoni.Smilija Kalenic,M.V,D.S.2005.Candida infection foot ulcer.Department of clinical Mycology,Creation National 34:29-35
12. Gerding Dn. *Foot Infection In Diabetic Patients The Role Of Anaerobes . Clin Infect Dis*. 1995;20 Csuppl2):S283-S8.
13. Hart Pd, Rusell E Jr, Remington Js,*The Compromised Host And Deep Fungal Infection. J Infect Dis* 1969;120c2:169-97
14. Heald Ahm O'halloran Dj, Richards Km Et Al , *Fungal In Fection Of The Diabetic Foot : Two Distinct Syndromes . Diabet Med . 2001;18c7:567-72*
15. Saba Fata.mohammad Hadi Saeed Mohaghegh.Rabeeh Fazlizadeh,Mohammad javad Najafzadeh.M.A,M.G,2006-2008.Macotic infection in diabetic foot ulcers in Emam Reza hospital Mashhad.*Jundishapur journal of Microbiology*.4(1):11-16
16. Seema Nair,Abliash Sasidharan,Sujatha Sistia.2006-2007.Incidence of Mycotic Infection in diabetic foot tissue.*Journal of culture collections*.pp:85-89
17. Shahindokht Bassiri Jahromi,Aliasghar Khaksar.2005.Deep-seated Fungal Infection in Immunocompromised patients in Iran.*IRANIN journal of Allergey*.4:27-32.
18. Chinckolikar Dam Pal Rb.*Stady Of Fengal And Bacterial In Fectian Of Diabetic Foot . Indian J Pathol Microbial* 2002, 45:15-22
19. Heald Ahm O'halloran Dj, Richards Km Et Al , *Fungal In Fection Of The Diabetic Foot : Two Distinct Syndromes . Diabet Med . 2001;18c7:567-72*.
20. Mlinariae- Missoni Em Kaleniae S. Vuleeliae M. De Syo Dm Belicza M. *Candida Infection Diabetic Foot Ulcers. Diabetologia Evoatica*. 2005:34-1.

Molecular Survey of Pathogen Species of Aspergillus Isolated from Diabetic Foot Lesion Using Nested PCR Method

Kamalzadeh S^{1*}, Sabokbar A²

1- MSc, Department of Microbiology, College of Basic Sciences, karaj Branch, Islamic Azad University, Alborz, Iran

2- PhD, Department of Microbiology, College of Basic Sciences, karaj Branch, Islamic Azad University, Alborz, Iran

*Corresponding author: Department of Microbiology, College of Basic Sciences, Karaj Branch Islamic Azad University, Alborz, Iran.

Email: sara.kamalzadeh@gmail.com

Abstract:

Background and Aim: PCR has high sensitivity and specificity for the determination of fungal DNA. It is also useful for rapid identification of the most common species of *Aspergillus*. The purpose of this study was to compare culture method with nested PCR method to determine *Aspergillus* lesion in diabetic foot patient in Imam Khomeini Hospital, Tehran.

Material and Methods: Sixty-five cases of suspicious diabetic foot lesion *Aspergillus* were examined under culture and molecular method. *Aspergillus* isolates were identified to genus level on the SGA. DNA extraction performed and PCR and Nested PCR reactions were done. Serum samples were collected and ELISA for anti bodies against all species were performed. Results were analyzed using ANOVA and *P* was considered significant at $P < 0.05$.

Results: Of the total of 65 samples, 39 were diagnosed as *Aspergillus* is obtained from cultures. In PCR and Nested PCR using specific primers, 41 samples were diagnosed as *Aspergillus*. PCR and Nested PCR for species recognition were equal but differences in gender were recognized. ELISA results showed that 39 samples were positive.

Conclusion: Although PCR is less sensitive than nested PCR, but we can recognize the most common pathogenic species, *Aspergillus fumigatus*. Our results showed significant differences between the results of culture and nested-PCR in the identification of the *Aspergillus* genus.

Keywords : Nested PCR - *Aspergillus*- foot lesion- culture