# بررسی مولکولی گونه های بیماریزای آسپرژیلوس جدا شده زخم پای افراد دیابتی با استفاده از روش Nested PCR

**سارا کمال زاده[1*]- آذر سبک بار[2]**

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 آسپرژیلوس را ارائه میدهد. هدف از این مطالعه مقایسه کشت با روش nestedPCR برای تعیین آسپرژیلوزیس از زخم پای بیماران دیابتی مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی تهران بود.

**روش:** ۶۵ نمونه زخم های مشکوک به آسپرزیلوزیس موجود در زخم پای دیابتی تحت شرایط کشت و PCR قرار گرفتند. ایزوله های آسپرژیلوس 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 آسپرژیلوزیس حاصله از روش کشت تشخیص داده شدند. در روشPCR وNested PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ۴۱ مورد بعنوان آسپرژیلوس 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 آسپرژیلوس فومیگاتوس را تعیین میکند. نتایج ما نشان میدهند که تفاوت معنی داری مابین نتایج کشت و نتایجnPCR در شناسایی جنس آسپرژیلوس وجود دارند.

**کلیدواژه ها:** Nested PCR - آسپرژیلوس- زخم پای دیابتی- کشت



[ Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-07-22 ]

**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 دراین روند همواره عواملی چون ایدز، سرطانها 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 عملا بزرگترین مشکلات بهداشتی را در زمینه مسائل افراد دیابتی بوجود آورند(۱).

عفونت های قارچی فرصت طلب معمولا 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(۷،۶).

در میان عوامل قارچی، شایع ترین آنها آسپرژیلوزیس و کاندیدیازیس در زخم پا میباشد که معمولا این افراد به درمان آنتی بیوتیکی پاسخ نمیدهند و بیماری سیر مزمن میگیرد(۹،۸).

آسپرژیلوزیس فومیگاتوس( A.fumigatus) وآسپرژیلوس فلاووس (A.flavus) دوعامل اصلی ایجادکننده آسپرژیلوزیس دیابتی می باشند. گونه های دیگری ممکن است مداخله داشته باشند که شامل A.amstelodami A.nigrescens ,A.terreus ,A.glaucus ,A.nidulans ,A.niger,می شوند(۱۲،۱۰).

هنگامی که این قارچ به طور مکرر از نمونه های مشکوک جدا شود آسپرژیلوزیس تشخیص داده میشود. به دلیل اینکه اسپورهای این قارچ تقریبا 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 آسپرژیلوسی در عفونت زخم، باید از زخم طی چند مرحله نمونه برداری به عمل آید و عامل جداشده 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- زمستان۹۱ – بهار – اوایل تابستان۹۲) 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



[ Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-07-22 ]

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 (بعلت اینکه ارگانسیم 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 سابرودکستروز 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 لاکتوفنل برای تشخیص استفاده شد.

**آزمایشات بافت شناسی:** پس از پاساژ بافت، بلوک بافت شناسی از نمونه ها تهیه و سپس توسط دستگاه میکروتوم به اندازه ۵-۴ 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، میسلیوم 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 شد. از DNA بدست آمده برای واکنش PCR به منظور شناسایی جنس آسپرژیلوس 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 آسپرژیلوس 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 آسپرژیلوس در مرحله قبل به منظور شناسایی گونه آسپرژیلوس 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 الکترو فورز 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. Afl1,Afl2 , به منظور شناسایی گونه های آسپرژیلوس فلاووس
2. Afu1,Afu2 به منظور شناسایی گونه های آسپرژیلوس فومیگاتوس
3. Ani1.Ani2 به منظور شناسایی گونه های آسپرژیلوس نایجر

شرایط واکنش مانند مرحله اول بوده و پس از تکثیر قطعه درونی ۱۲۰ جفت بازی مورد بررسی با آزمون الکتروفورز قرار



[ Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-07-22 ]

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

**ELISA:** برای انجام تست الایزا ابتدا از بیماران نمونه خون جدا گردید و سرم خون جدا شد. به منظور تشخیص گونه با استفاده از روش الایزا ابتدا سویه های استاندارد آسپرژیلوس 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 الایزا استفاده شد. سوپ سلولی را به میزان ۵۰ میکرولیتر درون چاهک های کیت الایزا ریخته و هم حجم آن Coating Buffer اضافه نمودیم. این کار به منظور فیکس کردن آنتی ژن در درون چاهک های الایزا می باشد.

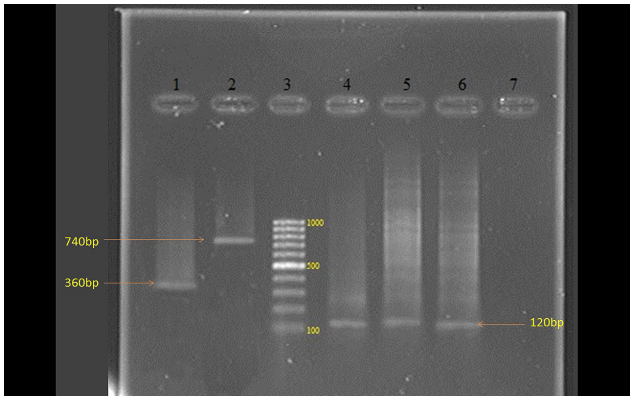
پس از سه مرحله شستشو با Wash buffer حاوی Twin نمونه های سرم به دست امده را بر درون چاهک ها با رقت های ۱:۱، ۱:۱۰، ۱:۱۰۰ و ۱:۱۰۰۰ اضافه نمودیم. در صورت حضور آنتی ژن علیه سویه های آسپرژیلوس بین آنتی ژن و آنتی بادی موجود در سرم اتصال برقرار می شود. پس از این مرحله نیز سه بار کیت شستشو داده شد. سپس آنتی سرم 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 الایزا ریدر مورد بررسی قرار گرفت.

**آنالیز آماری:** کلیه تست ها به صورت سه بار تکرار انجام شد و سپس mean±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.

## 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 آسپرژیلوس فومیگاتوس با ۳۵ مورد(۸۵/۳۶٪) بیشترین گونه ایزوله شده و به دنبال آن آسپرژیلوس فلاووس با ۳ مورد(۷/۳۲٪) آسپرژیلوس نایجر با ۲مورد(۴/۸۸٪) و دیگر گونه های آسپرژیلوس با ۱ مورد(۲/۴۴٪) در رتبه های بعدی بودند(نمودار۱و۲).




**تصویر۱: الکتروفورز محصولات PCR و Nested PCR بر روی ژل آگارز.**

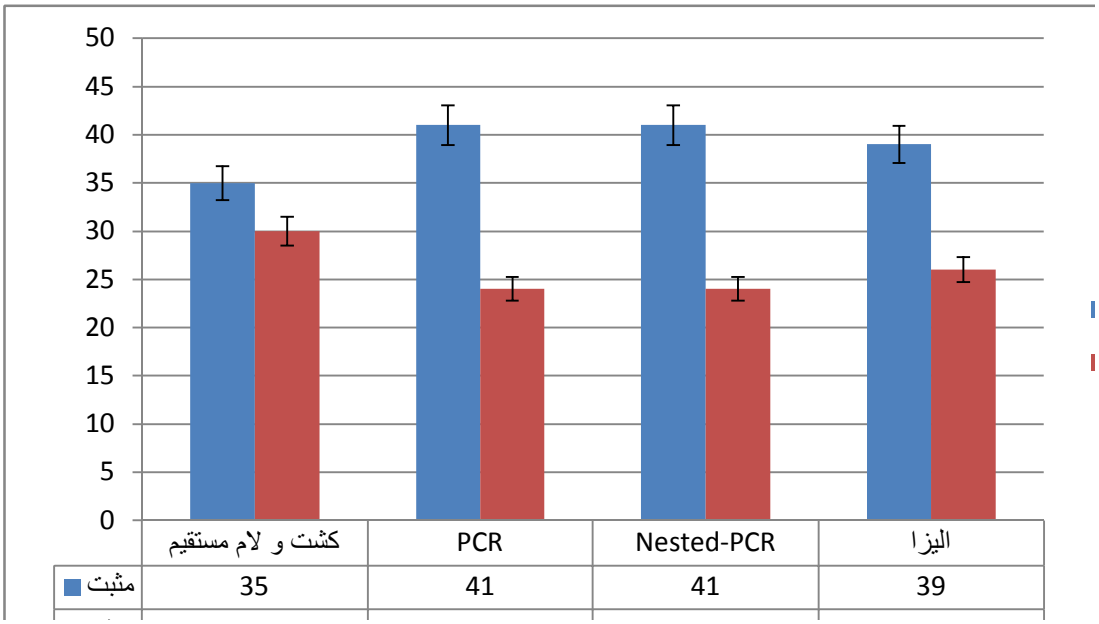
چاهک۱: نمونه مثبت PCR برای جنس آسپرژیلوس. چاهک ۲: نمونه مثبت Nested-PCR برای جنس آسپرژیلوس. چاهک۳: خط کش ۱۰۰ جفت بازی DNA. چاهک ۴: نمونه مثبت Nested-PCR برای آسپرژیلوس فومیگاتوس. چاهک ۵: نمونه مثبت Nested-PCR برای آسپرژیلوس فلاووس. چاهک ۶: نمونه مثبت Nested-PCR برای آسپرژیلوس نایجر. چاهک۷: نمونه کنترل منفی

**نتیجه آزمون الیزا:** طبق آزمون الیزا که بر روی ۶۵ نمونه های سرم بیماران صورت گرفت تعداد ۳۹ مورد بعنوان نمونه مثبت آسپرژیلوزیس تلقی شدند.۳۲ مورد آسپرژیلوس فومیگاتوس(۸۲/۰۵٪)، ۴ مورد(۱۰/۲۵٪) آسپرژیلوس فلاووس، ۲مورد(۵/۱۲٪) آسپرژیلوس نایجر و ۱ مورد نیز(۲/۵۶٪) سایر گونه ها شناسایی شدند(نمودار۱و۲).



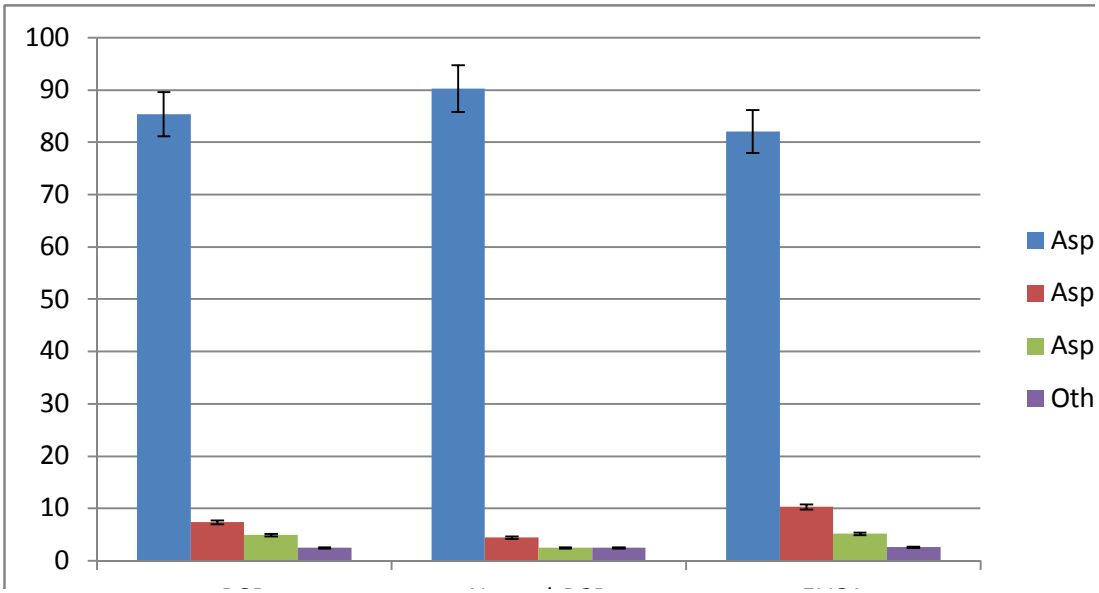
[ Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-07-22 ]

**نمودار۱: 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 ۳۷مورد آسپرژیلوس فومیگاتوس(۹۰/۲۴٪)، ۲ مورد(۴/۸۸٪) آسپرژیلوس فلاووس، ۱مورد(۲/۴۴٪) آسپرژیلوس نایجر و ۱ مورد نیز (۲/۴۴٪) سایر گونه ها شناسایی شدند(نمودار۱و۲)

**نمودار۲: 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

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 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



[ Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-07-22 ]

آنهایی که به طور ناقص درمان می شوند، وجود دارد. کلنیزاسیون 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 آسپرژیلوس 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 $P<۰/۰۵$). 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 کدام۵٪ بودند انواع آسپرژیلوس 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 آسپرژیلوس و ۴/۲٪ کاندیدا نئوفرمنس[1]، 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.

گراندول و همکاران در مطالعات تجربی خود متوجه شدند عدم تولید پروتئاز در کاندیدا آلبینکنس 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 آلبینکنس 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 میآید.

2- C.neaformans



[ Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-07-22 ]

**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 ] Imnun Infelct. 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 Immunocopromised 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 Microbilogy.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.


[ Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-07-22 ]

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

***Kamalzadeh S[1*], Sabokbar A[2]***

*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 offungal 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 Aspergillesion in diabetic foot patient in Imam Khomeini Hospital, Tehran.

**Material and Methods:** Sixty-five cases of suspicious diabetic foot lesion Aspergillusis 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 Aspergillos 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 - Sprzhylvs- foot Dyabty- culture

[ Downloaded from jms.thums.ac.ir on 2024-07-22 ]