مطالعه مولکولی ژن‌های SCP, NP ,MEP در ترایکوفایتون روبروم و ترایکوفیتون منتاگروفایتس جداسازی شده از ضایعات درماتوفیتی

حسن محمدی فرد[۱]، کیومرث امینی[۲*]، منصور بیات[۱]، سید جمال هاشمی[۳]، فاطمه نوربخش[٤]

چکیده

تریکوفیتون روبروم و تریکوفیتون منتاگروفایتس از عوامل مهم عفونت های پوستی انسان و حیوان به شمار می روند که با بیان ژن های بیماریزا باعث ایجاد عفونت می گردند. هدف از انجام این تحقیق بررسی حضور و نقش ژن های بیماریزا در پاتوژنز این قارچها بوده است. در این مطالعه ٤٨ نمونه تایید شده از کلکسیون قارچ شناسی انستیتوپاستور تهیه شد. قارچها در محیط های اختصاصی کشت داده شدند و تست های افتراقی برای هر دو درماتوفیت انجام شد. . استخراج DNA با استفاده از کیت اختصاصی صورت گرفت. پی سی آر چندگانه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن های مورد نظربرای بررسی حضور ژن های مورد نظر انجام شد. نتایج بدست آمده از Multiplex PCR نشان داد که در سویه های مورد بررسی mep4 و mep1,2,4 بیشترین حضور را به ترتیب در تریکوفیتون روبروم و تریکوفیتون منتاگروفایتس نشان دادند. نتایج حاصل از بررسی Multiplex PCR برای ژنهای ScpA , B وژن Np حاکی از این بود که NP تقریبا در ۸۰٪ سویه های هر دو درماتوفیت وجود داشت. حضور مثبت ژن ScpA در ٦ سویه تراکوفیتون روبروم و ١٤ سویه تراکوفیتون منتاگروفایتس دیده شد. داده های این مطالعه موید اثر سینرژیک ژن های بیماری زا بر روی یک دیگر در روند بیماری داشت. همچنین مطالعه حاضر اثبات نمود که روش Multiplex PCR روشی دقیق و با صحت بالا است که میتواند با کاهش قابل توجه زمان تشخیص بیماری درماتوفیتوزیس موجب افزایش شانس درمان در بیماران مبتلا به این بیماری شود.

واژگان کلیدی: ترایکوفایتون منتاگروفایتس، ترایکوفایتون روبروم، ژن مقاومت، درماتوفیت.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲

مقدمه

تهاجم قارچها به اندامها و بافتهای انسان برای اولین بار در دهه های اولیه قرن هجدهم میلادی گزارش شده است و سپس از سال ۱۹۰۰ میلادی به بعد، گزارشات مختلفی از بیماریهای قارچی و شیوع روزافزون این بیماریها و عوامل بیماریزای آنها ارائه شده است (۱). بیماریهای قارچی به واسطه دسته مهمی از قارچهای کپکی و مخمری خاک ایجاد می شود. برخی از این قارچها جزء فلور نرمال قسمتهای مختلف بدن انسان، مانند دهان، واژن، پوست و... می باشند (۲). این عوامل در طبیعت به صورت ساپروفیت یا کپکی رشد می کنندودر این شرایط در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد، قادر به تولید کونیدی و میسیلیوم می باشند. با استنشاق کونیدی قارچی و ورود قارچ به بدن، ارگانیسم، خود را با بافت زنده سازش می دهد و می تواند در درجه حرارت بدن، یعنی دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، با تغییر در مورفولوژی و ترکیبات دیواره سلولی، متابولیسم، سیستم آنزیمی و روش تولید مثلی، شرایط را برای حمله به بافت فراهم کند و درنتیجه در محیط داخل بدن پایدار بماند(۳). درماتوفیت ها، مهمترین و فراوانترین عوامل قارچی جلدی بوده که پوست و ضمائم آن (ناخن و مو) را مورد تهاجم قرار میدهند. این گروه از قارچها مسئول بسیاری از عفونت های قارچی سطحی در انسان و حیوان می باشند. در ایجاد عفونت توسط این گروه از قارچها سه مرحله چسبیدن به بافت میزبان، حمله و گسترش پاسخ ایمنی میزبان وجود دارد که در مرحله حمله به میزبان از آنزیم های خاصی استفاده می کنند(٤).

گزارشهای متعددی نشان داده است که درماتوفیتوزیس (عفونت قارچی درماتوفیت)، رایج ترین بیماری عفونی در میان ۱۰ عامل اصلی پاتوژنز انسانی جداشده در اروپا است که از عوامل شایع ایجاد آن ترایکوفایتون روبروم و ترایکوفایتون منتاگروفیتس و میکروسپوروم کنیس هستند و شدت آن بسته به ایمنی میزبان و مقاومت سوش بیماری زا

۱ -گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.(dr_kumarss_amini@yahoo.com)
۳- دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
٤- گروه میکروب شناسی ، دانشکده علوم زیستی ، واحد ورامین-پیشوا ، دانشگاه آزاد اسلامی ، ورامین ، پیشوا ، ایران.

دربرابر عوامل ضد قارچی است. زندگی اجتماعی، تماس با حیوانات، استفاده از آنتی بیوتیک ها کورتیکوستروئیدها، داروهای ضد سرطان، بعضی فاکتورهای دیگر از عوامل مهم افزایش عفونت های قارچی بخصوص درماتوفیت ها هستند. ترایکوفیتون روبروم درماتوفیتی انسان دوست است که از عوامل شایع کچلی کشاله ران، بدن، ناخن و دست می باشد و ترایکوفیتون منتاگروفایتس در انسان ضایعاتی به صورت ضایعات التهابی در سر، صورت، ناخن و ریش ایجاد مینماید و واریته های حیوانی در موجوداتی چون موش و جوجه تیغی بیماری ایجاد می نمایند (٤، ٥).

از مهمترین عوامل حدت این میکروارگانیسم ها پروتئازها هستند که پروتئین های بین مولکولی بوده و باعث تخریب کراتین میشوند. چندین پروتئاز از جمله فانگولایزین به عنوان فاکتورهای بالقوه دارای بیشترین تاثیر در درماتوفیتوزیس در نظر گرفته شده است. داده ها نشان داده است که ژن های تولید کننده فانگولایزین ها که با عنوان MEP یا Metalloprotease شماره یک تا ٥ شناخته میشوند در محیط کراتین دار به شدت القا می شوند(٦). از پروتئازهای دیگر دخیل در بیماریزایی ترایکوفایتون‌ها neutral protease هستند که توسط دسته ژنی NP تولید میشوند، تخریب پروتئین را کاتالیزه میکنند و مقادیر بهینه عملکرد آنها در pH ٦ تا ٧/٥ است. از سوی دیگر کربوکسی پپیندازها نیز از عوامل حدت به شمار میروند. آنها آنزیمهای پروتئولایتیکی هستند که تنها می توانند در پایانه انتهایی حلقه پپتید پلی پپتیدها شکاف ایجاد کنند و بر اساس مکانیسم تجزیه شان به دو گروه کربوکسی پپتیداز و سرین کربوکسی پپنیداز تقسیم می شوند که گروه دوم در لیزوزوم بسیاری از قارچها دیده می شود. ScpA باعث ازبین رفتن سریع پایانه انتهایی حلقه آروماتیک و برعکس گلایسین و آمینواسیدها را به آرامی حذف می نماید. ScpB حذف سریع آرژنین و لایزین را انجام می دهد اما می تواند در پاره ای از موارد اسیدآمینه های خنثی را نیز حذف نماید(٦،٧).

همانطور که ذکر گردید درماتوفیت‌های تریکوفیتون روبروم و تریکوفیتون منتاگروفایتس از عوامل مهم عفونت های انسان به خصوص در افراد دچار نقص سیستم ایمنی و سالمندان به شمار می روند و با توجه به افزایش مقاومت آنها در برابر داروهای ضد قارچی، شناسایی ژنوم آنها و مکانیسم‌های مقاومت در این قارچها از اهمیت فراوانی برخوردار است. با توجه به نکات ذکر شده این مطالعه به مطالعه مولکولی ژن‌های SCP, NP ,MEP در ترایکوفایتون روبروم و ترایکوفیتون منتاگروفایتس جداسازی شده از ضایعات درماتوفیتی پرداخته است.

مواد و روش‌کار

نمونه برداری و شناسایی درماتوفیت ها

به منظور انجام این مطالعه در کل ٤٨ سویه تایید شده ازکلکسیون قارچ شناسی انستیتو پاستور تهیه شد و اطلاعات جمعیت‌شناسی اشخاصی که این نمونه ها قبلا از آنها تهیه شده بود جهت بررسی اپیدمیولوژی جمع آوری شده و بررسی های مولکولی در مراحل بعدی با روش Multiplex PCR مورد استفاده قرار گرفت. نمونه ها شامل نمونه های پوست نقاط مختلف بدن زن و مرد و بیشتر مربوط به سنین ٣٠ تا ٧٢ سال بود. نمونه‌ها بر روی محیط سابورو دکستروز آگار (SDA) محتوی کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید طبق دستورالعمل آن ساخته شده بود کشت داده شد، و به مدت ٤ هفته در انکوباتور٢٨ درجه سانتیگراد نگهداری شد. کلنی های *ترایکوفایتون منتاگروفایتس* سطحی صاف یا پیچ خورده با رنگ های سفید، زرد، صورتی یا کرم داشتند و تولید پیگمان قرمز نشانگر رشد کلنی ترایکوفایتون *روبروم* برروی محیط کشت اختصاصی SCC (Sabouraud dextrose agar with 0.05% cycloheximide) یا Dermatophyte test medium (DTM) بود. تست اوره آز،

تست سوراخ شدن مو و تست تخمیر قند سوربیتول طبق روشهای استاندارد بر روی هر دو قارچ انجام شد.

تهیه توده میسیلیومی از درماتوفیت ها

از کلنی ایزوله های جداسازی و شناسایی شده *ترایکوفایتون روبروم* و *ترایکوفایتون منتاگروفایتس* بر روی محیط کشت های SCC و SDA جهت تشکیل توده میسیلیومی کافی در دو محیط SCC و SDA به طریق نقطه ای کشت شدند. محیط سابرو دکستروزآگار تهیه کرده و در کنار شعله و زیر هود در دو گروه ٤ پلیت یکبار مصرف به میزان ۱۵ میلی لیتر ریخته سپس یک قطعه از میسیلیوم و اسپور را با آنس استریل یکبار از پلیت SCC به عنوان گروه اول و یکبار از پلیت SDA به عنوان گروه دوم، برداشته و درون این پلیت ها افزوده و بعد پلیت ها کمی تکان داده شد تا اسپورها کاملا درون محیط کشت پخش گردند، سپس این پلیت ها را نیز درون انکوباتور با دمای ٢٦ قرار داده شد تا زمانی که توده میسلیومی به صورت معلق و بطور یکنواخت در سطح پلیت ها و قبل از تشکیل میسیلیوم های هوایی شکل گیرند.

بررسی مولکولی

به منظور بررسی مولکولی ژنومی درماتوفیت ها DNA آنها با استفاده از کیت اختصاصی استخراج (سیناژن، ایران) گردید. پرایمر های جدول شماره ۱ طراحی شده و توسط شرکت Bioneer کره جنوبی ساخته شدند.

در مرحله بعد روش Multiplex PCR با پرایمر های ذکر شده انجام شد. این واکنش ها برای هر یک از ژنها در حجم کلی ۲۰میکرولیتر شامل ۳µl از هر یک از پرایمرهای فوروارد و ریورس،٤ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۰ µl از Master mix2x انجام میشد. یک سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل کلی: در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، در ٤٢ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت۹۰ ثانیه، یک

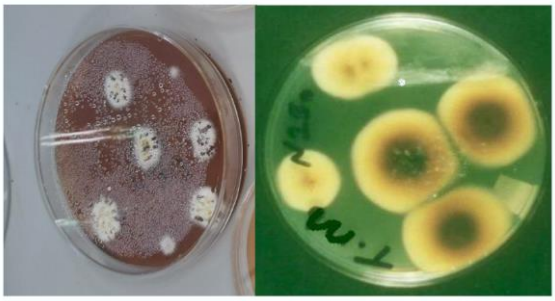
جدول ۱: پرایمر های استفاده شده در این مطالعه

نام ژن هدف	توالی پرایمر	**اندازه محصول (bp)**
MEP1	For: GCCACTGAGCTGGTTAAG Rev: CTTTGGATCGAACTTAGC	۱۹۵۰
MEP2	For: AGAGTTCCTGACTCGGAC Rev: ACTCGTGGATGACAATACC	١٤٦٤
MEP3	For: GCCATGTCCTTCTCCAAG Rev: GCCATGTCCTTCTCCAAG	۲۰۰۰
MEP4	For: ATCGTGATTCCTTTAGCACC Rev: TCGCCCATGGTATAGTCAG	۲۵۷
MEP5	For: CCAGCTACATGAGTTCAGATG Rev: ACAGGATGTGTAGACCAATGG	١٦٤٨
Np11-1	For: GTTCTCGAGCCTCTATCCCGCTGCTGCTC Rev: CTTGGATCCTTTAGCAGCCAAGGTAGAT	۹۲۰
ScpA	For: GTTGTCGACTTCAAGGCTTCCCTCCACCCGTT Rev: CTTGTCGACGCGGCCGCCTACAAGAAGAAAGCAAG	۱۹۷۳
ScpB	For: CTTCTCGAGCTCAGTTCCCACCAAAACCGG Rev: CTTGGATCCTTACATTGCCAGCTCTATAAC	۲۰٤۵

سیکل در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای این واکنش ها استفاده شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 19 و با استفاده از روش t-test صورت گرفت.

نتایج

نتایج رشد قارچ *ترایکوفایتون روبروم* به حالت پنبه ای و پیگمان قرمز در پشت کلنی، همچنین رشد کلنی قارچ *ترایکوفایتون متاگروفایتس* در نگاره ۱ مشاهده می شود.

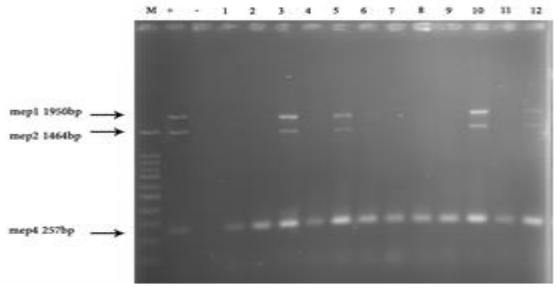


نگاره ۱: کلنی قارچ رشد کرده *ترایکوفایتون متاگروفایتس* (راست) و *ترایکوفایتون روبروم* (چپ)

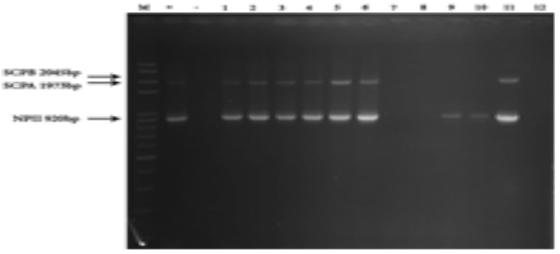
در محیط کشت کریستین اوره آگار (محیط اوره) درماتوفیت های *ترایکوفایتون متاگروفایتس* قادر به هضم اوره بودند و محیط کشت تغییر رنگ نشان داد، اما این تست درمورد *ترایکوفایتون روبروم* منفی بود و رنگ محیط کشت تغییر نکرده و همچنان به رنگ زرد باقی می ماند. علاوه بر این بعد از گذشت دو هفته مقدار مویی که در ظرف استریل در دمای ۲۵ درجه به منظور بررسی تست سوراخ شدن مو گذاشته شده بود توسط رنگ لاکتوفنل بلو رنگ آمیزی شد و سپس در زیر میکروسکوپ عدم سوراخ شدن مو توسط قارچ *ترایکوفیتون روبروم* و برعکس سوراخ شدن مو توسط *ترایکوفایتون متاگروفایتس* دیده شد.

نتایج Multiplex جهت شناسایی ژن های حدت در *ترایکوفایتون روبروم*

داده های بررسی وجود ژن های MEP در نمونه های *ترایکوفایتون روبروم* نشان داد که ژن mep3 در هیچ یک از سویه ها دیده نشد، همچنین ژن mep4 با بیشترین درصد حضور در نمونه ها دارای بیشترین فراوانی این دسته ژنی بود (جدول ۲). نگاره ۲ نشان دهنده نمونه ای از الکتروفورز محصولات Multiplex PCR تمامی ژن های حدت در *ترایکوفایتون روبروم* است. همچنین بیان ژن mep1,2 (P≤0.014)و ژن mep4(P≤0.001) در *ترایکوفایتون روبروم* معنی دار بوده در حالی که این بیان برای ژن mep5 معنی دار نبوده است(P≤0.221). ScpA و NP نیز سطح معنی داری از بیان را نشان دادند (P≤0.014 و P≤0.001 به ترتیب برای ScpA و NP).



گاره ۲ : نتایج آزمون Multiplex PCR. نمونه های ۱تا ۱۲ *ترایکوفیتون روبروم*، از چپ به راست: Ladder 100bp – کنترل مثبت- کنترل منفی. ژن های مورد نظر بر روی باندهای mep1 (1950 bp) و mep2 (1464 bp) و mep4 (257 bp) دیده شدند.



نگاره ۳: نتایج آزمونMultiplex PCR نمونه های *ترایکوفیتون متاگروفایتس* برای ژن های *ScpA,B, NP11*، از چپ به راست: *Ladder 100bp* –، +کنترل مثبت، – کنترل منفی. تشکیل باند برای ژن های *ScpA(1973bp)*، *ScpB(2045)*، *ScpA .NP11(920)* در سویه های ۱-۶ و ۱۱ دیده شد. *NP* در سویه های ۱-۶ و ۹و۱۰و۱۱ حضور مثبت را نشان داد. در هیچ یک از سویه ها *ScpB* دیده نشد.

جدول ۲: الکتروفورز محصولات Multiplex PCR به منظور بررسی حضور ژن های حدت در *ترایکوفایتون روبروم*

ژن	نمونه های دارای ژن	نمونه های فاقد ژن	درصد حضور ژن در نمونه ها	درصد عدم حضور ژن در نمونه ها	تعدادکل
Mep1	۹	۱۵	٪۳۷/۵	٪۶۲/۵	۲۴(٪۱۰۰)
Mep2	۹	۱۵	٪۳۷/۵	٪۶۲/۵	۲۴(٪۱۰۰)
Mep3	۰	۲۴	٪۰	٪۱۰۰	۲۴(٪۱۰۰)
Mep4	۲۳	۱	٪۹۵/۸	٪۴/۲	۲۴(٪۱۰۰)
Mep5	۱۱	۱۳	٪۴۵/۸۳	٪۵۴/۱۷	۲۴(٪۱۰۰)
ScpA	۶	۱۸	٪۲۵	٪۷۵	۲۴(٪۱۰۰)
ScpB	۰	۲۴	٪۰	٪۱۰۰	۲۴(٪۱۰۰)
NP	2	2	٪۹۱/۶۶	٪۸/۳۳	۲۴(٪۱۰۰)

جدول ۳: نتایج الکتروفورز محصولات Multiplex PCR به منظور بررسی حضور ژن های حدت در *ترایکوفیتون منتاگروفایتس*

ژن	نمونه های دارای ژن	نمونه های فاقد ژن	درصد حضور ژن در نمونه ها	درصد عدم حضور ژن در نمونه ها	تعدادکل
Mep1	۱۶	۸	٪۶۶/۷	٪۳۳/۳	۲۴(٪۱۰۰)
Mep2	۱۶	۸	٪۶۶/۷	٪۳۳/۳	۲۴(٪۱۰۰)
Mep3	۱۵	۹	٪۶۲/۵	٪۳۷/۵	۲۴(٪۱۰۰)
Mep4	۱۷	۷	٪۷۰/۸۳	٪۲۹/۱۷	۲۴(٪۱۰۰)
Mep5	۱۵	۹	٪۶۲/۵	٪۳۷/۵	۲۴(٪۱۰۰)
ScpA	۱۴	۱۰	٪۵۸/۳	٪۴۱/۷	۲۴(٪۱۰۰)
ScpB	۰	۲۴	٪۰	٪۱۰۰	۲۴(٪۱۰۰)
NP	۱۸	۶	٪۷۵	٪۲۵	۲۴(٪۱۰۰)

هیچ یک از نمونه ها وجود نداشت و ژن NP در بیش از ۷۵ درصد نمونه ها مشاهده گردید. جدول ۳ نشانگر الکتروفورز محصولات Multiplex PCR به منظور بررسی حضور ژن های حدت در *ترایکوفیتون منتاگروفایتس* است. نگاره ۳

بررسی نتایج فراوانی ژن های حدت در سویه های *ترایکوفیتون منتاگروفایتس*

نتایج بررسی درصد حضور ژن های حدت هدف این مطالعه توسط تست Multiplex PCR نشان داد که ژن ***ScpB*** در

درماتوفیتوزیس *ترایکوفیتون روبروم* و *ترایکوفیتون منتاگروفایتس* به کار رفت. .ژنهای فانگولایزین (mep1-5) و سوبتیلیزین از مهم ترین ژن های دخیل در بیماریزایی درماتوفیت ها به شمار می روند و نقش مهمی در روند ایجاد عفونت و گسترش آن دارند. در پژوهش حاضر حضور mep1-5 در سویه های *ترایکوفیتون روبروم* و *ترایکوفیتون منتاگروفایتس* بررسی شدند. بر اساس نتایج مشاهده شد که ژنهای mep 1,2 در ۱۸ سویه *ترایکوفیتون روبروم* دیده شدند. Mep4 در ۲۳ نمونه بالینی (۸ مورد کشاله ران و ۸ نمونه جداسازی شده از ناحیه پا و بقیه مربوط به سایر نقاط بدن) دیده شد. حضور بالای متالوپروتئازها نشان دهنده اهمیت این ژن ها در بیماریزایی این درماتوفیت در نمونه های مورد نظر بود. در ژنوم ٦ سویه *ت.روبروم* ژن ScpA حضور داشت در حالی که حضور این ژن در سویه های جداسازی شده *ت.منتاگروفیتس* بسیار بیشتر(٢٤/١٤) بود. در سویه های جداسازی شده هر دو درماتوفیت حضور بالای ژنNP (٪٧٥ برای *ت.منتاگروفیتس* و ٩١,٦٦٪ برای *ت. روبروم*) مشاهده گردید. نکته قابل توجه در تحقیق حاضر بررسی ژن Scp و NP در سویه های *ترایکوفیتون روبروم* و *ترایکوفیتون منتاگروفایتس* بود که اکثر سویه ها در هر دو درماتوفیت بدون در نظر گرفتن محل ضایعه حامل ژن NP بودند. در حالی که ژن های ScpA بیشتر در سویه های جداسازی شده از کشاله ران حضور مثبت را نشان دادند. حضور ScpB در هیچ یک از سویه ها دیده نشد. این نتایج نشان دهنده اهمیت بررسی بیشتر ژن های بیماریزا در جمعیت آماری بیشتر و متنوع تر را نشان می دهد. کرمی رباطی در سال ۱۳۹۷ مطالعه ای بر روی ۳۲ بیمار مبتلا به عفونت قارچی مراجعه کننده به دانشگاه علوم پزشکی تهران از تیر

نشان دهنده نمونه ای از تصویر الکتروفورز محصولات PCR مذکور است.

نتایج تحلیل آزمون آماری مربع کای نشان داد که در بیان ژنهای mep در سویه های *ترایکوفیتون منتاگروفایتس* اختلاف معنی داری مشاهده نشده است (P≥0.005). از سوی دیگر بیان ژنهای NP در این سویه ها از نظر آماری دارای اختلاف معنی دار بوده است (P≤0.004).

بحث

درماتوفیتوزیس از شایع ترین بیماری های قارچی می باشد که عامل آن درماتوفیت ها می باشند. انتقال بیماری بطور مستقیم و غیر مستقیم با تماس به موها و پوسته های آلوده به عوامل درماتوفیتی صورت می گیرد. بررسی های متعدد نشان داده است که بررسی شیوع ژن های دخیل در بیماریزایی باکتری ها و قارچها میتواند منجر به ردیابی اپیدمیولوژیک این عوامل شده و علاوه بر جلوگیری از شیوع بیشتر، زمینه را در جهت تشخیص هر چه سریعتر آنها فراهم آورد. علاوه بر این شناسایی ژن های دخیل در مقاومت دارویی قارچی در درماتوفیت ها منجر به اتخاذ روشهای درمانی نوین از سوی جامعه بهداشتی برای ریشه‌کنی این عوامل خواهد شد(8) . مطالعات نشان داده است که از میان روش های تشخیصی ژن‌های اختصاصی بیماری زا؛ PCR دارای رایج‌ترین کاربرد است(9) . در مطالعه حاضر از روش Multiplex PCR برای بررسی حضور ژن های بیماریزا استفاده شد. برای بررسی چند ژن به صورت همزمان روش Multiplex PCR با صرفه جویی در مواد لازم و با کاهش زمان بررسی های ژنتیکی و الگوهای مورد نیاز با چند جفت آغازگر به صورت عمومی و اختصاصی و با قابلیت اعتماد و سرعت بالا برای شناسایی مولکولی ژن های مختلف عامل

همچنین وقوع آنها در گونه های ژئوفیل و زئوفیل، نشان می دهد که غربالگری ژن ها برای بررسی فرآیند عفونت ضروری است (۱۱) .نتایج تحقیق فوق نشان می دهد این پژوهش با تحقیق حاضر در یک راستا عمل کرده و به بررسی فراوانی ژن های خانواده متالوپروتئاز ها عامل درماتوفیتوزیس پرداخته است. در تحقیق حاضر ژن های mep4 بیشترین حضور را در نمونه ها نسبت به mep1,2,3,5 در *ترایکوفیتون روبروم* داشته که این نمونه ها مربوط به نمونه های جداسازی شده از کشاله ران بوده اما این حضور برای mep1,2,4 برای *ترایکوفیتون متاگروفایتس* یکسان بوده و ۱۸ سویه از کل سویه های این درماتوفیت حضور مثبت این سه ژن را نشان دادند این امر لزوم بررسی ژن های حدت فانگولایزین در جهت مهار و کاهش آسیب های ناشی از عفونت های ناشی از درماتوفیت ها را ضروری می داند.

Reda Tarabees و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه ای که بر روی درماتوفیت ها انجام شد نشان دادند که برای بروز بیماری، حضور ژن فانگولایزین ضروری است (12). داده های جمع آوری شده از این مطالعه نشان داد که بروز MEP ۱-٤ تنها در ۱۰٪ نمونه های غربالگری شده بود، در حالی که MEP5 در ۲۰ درصد نمونه ها حاضر بود. به نظر می رسد که این فرضیه اشتباه باشد، زیرا همه نمونه ها از بیماران مبتلا به درماتوفیتوزیس جداسازی شده‌اند و برخی از سویه ها حامل ژن های متالوپروتئاز نبوده و حتما عوامل و ژن های بیشتری در بروز این بیماری دخیل هستند. متفاوت با نتایج آنها، نتایج پژوهش حاضر با استفاده از سویه های تایید شده *ترایکوفیتون روبروم* و *ترایکوفیتون متاگروفایتس* انجام شده، و نشان می دهد که در کل نمونه های *ترایکوفیتون روبروم* mep4 بیشترین حضور را داشته در حالی که در *ترایکوفیتون متاگروفایتس* *mep* 1,2,4 در اکثر سویه ها دیده شده و حضور بالایی را نشان داده‌اند.

ماه تا شهریور ماه سال۱۳۹٦ انجام داد(10) . درصد فراوانی نسبی خانواده سوبتیلیزین (SUB1-7) با فراوانی ۵۷ درصد گزارش شد. در حالی که ژن SUB5 (۱۰۰ درصد) در تمام ایزوله ها مشاهده شد، ژن SUB6 با کم‌ترین فراوانی (٤ از ۷ مورد) و حضور هفت ژن سوبتیلیزین در گونه های جدا شده از بافت ناخن، گزارش شد. حضور و عدم حضور ژن‌های سوبتیلیزین در DNA ایزوله های ترایکوفایتون روبروم، احتمالاً حاکی از اهمیت هر یک از ژن ها در مراحل مختلف عفونت (اتصال، تهاجم و التهاب) درماتوفیت و نوع بافت ناخن و پوست می‌باشد (۱۰) . در پژوهش حاضر، به بررسی ژن های فانگولایزین mep1-5 پرداخته شده است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در سویه های ترایکوفایتون روبروم ژن های فانگولایزین به خصوص mep 1,2 بیشترین فراوانی را نشان دادند(در ۱۸ سویه از ۲٤ سویه) نتایج فراوانی این دو ژن در *ترایکوفایتون متاگروفایتس* ٦٦,۷٪ گزارش شد که نشانگر تاثیرگذاری این ژن ها در عفونت زایی *ترایکوفایتون روبروم* و *ترایکوفایتون متاگروفایتس* در ایجاد بیماری های پوستی است.

Lemsaddek و همکاران در سال ۲۰۱۲، در مطالعه ای حضور ژن (MEP 1-5)، مرتبط با فانگولایزین و دیگر پروتئازهای زیر مجموعه سوبتیلیزین (ژن های SUB1-7) را با استفاده از روش PCR را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق از ۱۸٤ نمونه بیمار بررسی شده *ترایکوفیتون روبروم* از بیماران جداسازی شد. جدایه های بالینی، ۲۱ ایزوله زیست محیطی و ۲۸ سویه مرجع، ۱٤ گونه *ترایکوفیتون روبروم* جداسازی شد. تنوع بالای پروفایل ژن های بیماری زا در ۲۳۳ درماتوفیت و حضور حداقل یک ژن در ۹۱٪ (۲۳۳/۲۱۲) جدایه ها مشاهده شد، با ٤٤٪ (۲۳۳/۱۰۳) و ۲۷٪ (۲۳۳/٦٤) مثبت بود با این حال، عدم وجود تمام ژن های MEP و SUB در برخی از جدایی های بالینی و

درماتوفیتوزیس از مهمترین بیماری های درگیر کننده بیماران دچار نقص ایمنی و سالمندان است و افزایش مقاومت به عوامل ضد قارچی اهمیت تشخیص هر چه سریعتر آن را الزامی کرده است. در این بررسی با روش Multiplex PCR در کوتاه ترین مدت زمان با ویژگی و حساسیت بالا، حضور ژن های بیماری زای دخیل در فرایند درماتوفیتوزیس مشخص شد که در صورت تشخیص به موقع از به وجود آمدن سویه های مقاوم و انتقال این ژن ها در جمعیت های انسانی جلوگیری به عمل خواهد آمد.

فهرست منابع

1. Stamatiades GA, Ioannou P, Petrikkos G, Tsioutis C. Fungal infections in patients with inflammatory bowel disease: A systematic review. Mycoses. 2018;61(6):366-76.
2. Ramanan P, Wengenack NL, Theel ES. Laboratory diagnostics for fungal infections: a review of current and future diagnostic assays. Clin Chest Med. 2017;38(3):535-54.
3. Pathakumari B, Liang G, Liu W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. Biomed Pharmacother. 2020;130:110550.
4. Furmanek Ł, Czarnota P, Seaward M. Antifungal activity of lichen compounds against dermatophytes: a review. J Appl Microbiol. 2019;127(2):308-25.
5. Pereira FdO. A review of recent research on antifungal agents against dermatophyte biofilms. Med Mycol. 2021.
6. Martins MP, Rossi A, Sanches PR, Bortolossi JC, Martinez-Rossi NM. Comprehensive analysis of the dermatophyte Trichophyton rubrum transcriptional profile reveals dynamic metabolic modulation. Biochem J. 2020;477(5):873-85.
7. Lopes L, Bitencourt TA, Lang EA, Sanches PR, Peres NT, Rossi A, et al. Genes coding for LysM domains in the dermatophyte Trichophyton rubrum: a transcription analysis. Med Mycol. 2020;58(3):372-9.
8. Dabas Y, Xess I, Singh G, Pandey M, Meena S. Molecular identification and antifungal susceptibility patterns of clinical dermatophytes following CLSI and EUCAST guidelines. Journal of Fungi. 2017;3(2):17.
9. Jiang Y, Luo W, Verweij P, Song Y, Zhang B, Shang Z, et al. Regional Differences in Antifungal Susceptibility of the Prevalent Dermatophyte Trichophyton rubrum. Mycopathologia. 2020:1-18.
10. KaramiRobati A, Khalili M, HashemiHazaveh S, Bayat M. Studying the Subtilisin Virulence Genes (1-7) in Trichophyton Rubrum Isolated from Clinical Samples of Skin and Nail in 2017: A Descriptive Study. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences. 2019;17(10):925-36.
11. Lemsaddek L, Chambel L, Tenreiro R. Incidence of fungalysin and subtilisin virulence genes in dermatophytes. Spain: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology A. 2010:658-65.
12. Tarabees R, Sabry M, Abdeen E. Incidence of fungalysins virulence genes (MEP1-5) in dermatophytes isolated form infected cases in Egypt. Int J Microbiol Res. 2013;4:180-7.