

## Study of Relationship between Genetic Pattern and Susceptibility to Fluconazole in Clinical Isolated of *Trichophyton rubrum*

Hadadi F\*, Sabokbar A, Dezfulian M, Bakhtiari A

Department of Microbiology, College of Basic Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

\* **Corresponding Author.** Tel: +989127674945 Fax: +982632229533 E-mail: fatem\_hdd@yahoo.com

Received: Sep 16, 2014 Accepted: Mar 8, 2015

### ABSTRACT

**Background & objectives:** *Trichophyton rubrum* is one of the most common pathogenic causes of dermatophytosis. One of the drugs prescribed for fungal infections is fluconazole which belongs to Azoles group of antifungal agents. Recently molecular typing methods have been developed for answering the epidemiological questions and disease recurrence problems. Current study has been conducted on 22 isolates of *Trichophyton rubrum* obtained from patients randomly. Our aim was the investigation of correlation between genetic pattern and sensitivity to Fluconazole in clinical isolates of *Trichophyton rubrum*.

**Methods:** Firstly the genus and species of isolated fungi from patients have been confirmed by macroscopic and microscopic methods. Then, the resistance and sensitivity of isolates against drug have been determined using culture medium containing defined amount of drug. In next step fungal DNA has been extracted by RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA) with random sequences of 3 primers.

**Results:** Each primer produced different amplified pattern, and differences have been observed in genetic pattern of resistant and sensitive samples using each 3 primers, but there was no bond with 100% specificity.

**Conclusion:** The 12 sensitive isolates which didn't grow in 50µg/ml concentration of drug, also had limited growth at the lower concentration of drug. Ten resistant isolates which grew in 50µg/ml of drug, also showed resistant to lower concentration of drug. There are differences in genetic pattern of resistant and sensitive samples. RAPD analysis for molecular typing of *Trichophyton rubrum* seems to be completely suitable.

**Keywords:** *Trichophyton rubrum*, Fluconazole, RAPD-PCR, Genetic Diversity.

## بررسی رابطه الگوی ژنتیکی و حساسیت به داروی فلوکونازول در ایزوله‌های کلینیکی *ترایکوفایتون روبروم*

فاطمه حدادی\*، آذر سبکبار، مهروز دزفولیان، امیر بختیاری

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۷۶۷۴۹۴۵، فاکس: ۰۲۶۳۲۲۹۵۳۳، پست الکترونیک: fatem\_hdd@yahoo.com

### چکیده:

**زمینه و هدف:** *ترایکوفایتون روبروم* معمول‌ترین پاتوژن مولد بیماری درماتوفیتوزیس است. فلوکونازول دارویی از خانواده آزول‌ها است که جهت درمان تجویز می‌شود. اخیراً روش‌های تاپینگ مولکولی برای پاسخ دادن به سؤالات اپیدمیولوژیکی و مشکلات عود مجدد بیماری گسترش زیادی یافته‌اند. این مطالعه روی ۲۲ ایزوله *ترایکوفایتون روبروم* که به طور اتفاقی از بیماران مبتلا جدا شده بود، انجام گرفت. هدف مطالعه بررسی رابطه الگوی ژنتیکی و حساسیت به داروی فلوکونازول در ایزوله‌های کلینیکی *ترایکوفایتون روبروم* بود.

**روش کار:** ابتدا جنس و گونه قارچ‌های جدا شده از بیماران با روش‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی تأیید گردید. سپس با استفاده از محیط کشت‌های حاوی مقدار معین دارو مقاومت و حساسیت ایزوله‌ها نسبت به دارو تعیین شد. در مرحله بعد DNA قارچ‌ها استخراج گردید و RAPD-PCR (تکنیک تصادفی قطعات پلی مرفیک) با استفاده از ۳ پرایمر با توالی تصادفی انجام گرفت.

**یافته‌ها:** هر پرایمر الگوی تکثیر یافته متفاوتی را ایجاد کرد و با هر ۳ پرایمر تفاوت‌هایی در الگوی ژنتیکی نمونه‌های حساس و مقاوم دیده شد ولی هیچ بانندی که ۱۰۰٪ اختصاصیت را نشان دهد، یافت نشد.

**نتیجه گیری:** ۱۲ ایزوله حساس که در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر دارو رشد نکردند، در غلظت‌های پایین‌تر دارو نیز رشد آن‌ها به میزان چشمگیری در مقایسه با پلیت شاهد محدود شد. ۱۰ ایزوله مقاوم که در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر دارو رشد کردند، در غلظت‌های پایین‌تر دارو نیز از خود مقاومت نشان دادند. تفاوت‌هایی در الگوی ژنتیکی نمونه‌های حساس و مقاوم وجود دارد. آنالیز RAPD جهت تاپینگ مولکولی ایزوله‌های *ترایکوفایتون روبروم* کاملاً مناسب نشان داد.

**واژه‌های کلیدی:** *ترایکوفایتون روبروم*، فلوکونازول، RAPD-PCR، تنوع ژنتیکی

دریافت: ۹۳/۶/۲۵

پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۷

### مقدمه

عفونت‌های درماتوفیتی یکی از معمول‌ترین بیماری‌های واگیردار قارچی در انسان محسوب می‌شوند [۱]. درماتوفیت‌ها قارچ‌هایی کراتین‌دوست هستند که باعث ایجاد گروه وسیعی از بیماری‌های پوست و ضمام آن مانند ناخن و مو می‌شوند. این عوامل قارچی در ۳ جنس میکروسپوروم، *ترایکوفایتون* و *اپیدرموفایتون* قرار دارند [۲]. که *ترایکوفایتون روبروم* عامل ۶۹/۵ درصد عفونت‌های

درماتوفیتی و اصلی‌ترین عامل شناخته شده است [۳] و این به علت حضور این قارچ در سراسر دنیا و همچنین توانایی آن در فرار از سیستم ایمنی میزبان است [۴]. داروی فلوکونازول از جمله مشتقات خانواده بزرگ آزول‌ها و متعلق به گروه تری آزول‌ها است. این دارو با جلوگیری از دمتیلاسیون در اتم کربن ۱۴ لانواسترویل که یک پیش‌ساز ارگوسترویل است، از سنتز این ترکیب اساسی غشای سلول‌های قارچی ممانعت می‌کند. در مقایسه با دیگر آزول‌ها

درماتوفیتوزیس به طور فردی به وسیله سویه‌های گوناگون مبتلا شده باشند. به ویژه بیماری با عفونت ناخن ناشی از *ترایکوفایتون روبروم*، که یک استعداد ژنتیکی دارند که آن‌ها را نسبت به این ارگانیسم آسیب پذیر می‌کند [۱۳، ۱۲]. یزدانپرست و همکاران تعداد ۲ سویه مختلف یا بیشتر از *ترایکوفایتون روبروم* از یک ناحیه عفونی گزارش کردند. آن‌ها از هر پلیت کشت، ۵ کلنی برای تایپینگ انتخاب کردند و سویه‌ها به وسیله یک روش مبتنی بر PCR برای تعیین تعداد عوامل تکراری در NTS از تکرارهای ژن rRNA آنالیز شدند. نتایج پیشنهاد کرد که در عفونت‌های ناخن سویه‌های مختلفی درگیر هستند [۲]. آزمایش‌های آتی نوکلئوتید بر اساس باندهای اختصاصی مشاهده شده، بینش‌هایی را نسبت به ساختار ژنتیکی و عملکردهای ممکن در مورد این نواحی ژنی اشغال شده فراهم می‌کند و روشن است که موجب درک بیشتر روابط ژنتیکی بین انواع مختلف *ترایکوفایتون*‌ها می‌شود و تشخیص درماتوفیت‌های انسانی بهتر، دقیق‌تر و سریع‌تر صورت می‌گیرد. در این مطالعه از تکنیک RAPD با ۳ پرایمر مختلف با توالی تصادفی، جهت تایپینگ مولکولی ایزوله‌های حساس و مقاوم *ترایکوفایتون روبروم* استفاده گردید.

هدف از این پژوهش بررسی رابطه الگوی ژنتیکی و حساسیت به داروی فلوکونازول در ایزوله‌های کلینیکی *ترایکوفایتون روبروم* بود، که از روش RAPD استفاده شد، به این امید که بتوان تفاوت‌هایی در الگوی ژنتیکی نمونه‌های حساس و مقاوم یافت.

### روش کار

نوع مطالعه گروه حاضر، توصیفی بوده است و شامل مراحل زیر می‌باشد.

اثر اختصاصی‌تری بر روی آنزیم سیتوکروم P450 قارچی نسبت به نوع انسانی دارد و عوارض و تداخلات آن نیز کمتر است [۶، ۵، ۳]. تکنیک‌های زیست مولکولی مثل PCR، RFLP، آنالیز Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) و Southern Blotting منجر به پیشرفت برجسته در تمیز دادن گونه و سویه‌ها شده است [۱]. در مورد *ترایکوفایتون*، تکنیک RAPD در تفکیک *ترایکوفایتون روبروم*، *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* و *ترایکوفایتون تونسورانس* موفق بود [۷]، و تنوع داخل گونه‌ای به وسیله این روش در گروه *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* آشکار شد [۸]. گریزر<sup>۱</sup> و همکاران روی ۹۶ سویه *ترایکوفایتون روبروم* از ۴ قاره جهان، به وسیله PCR Amplified Fragment Length Fingerprinting Random Polymorphism و Monomorphic DNA Markers تحقیق کردند. این سویه‌ها مورفولوژی کلنی متنوعی را نشان می‌دادند در حالی که هیچ یک از این متدها هیچ پلی‌مورفیسمی را آشکار نکرد [۹]. در سال ۲۰۰۸ میرهندی و همکاران طی تحقیقی با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ناحیه SrDNA-ITS2ITS1-5.8 را تقویت کردند و سپس به کمک آنزیم MvaI مورد هضم اندونوکلازای قرار دادند. آن‌ها با این روش موفق به شناسایی و افتراق *ترایکوفایتون روبروم* و *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* شدند [۱۰]. عباس تبار و همکاران نیز تحقیقی در مورد درماتوفیت‌های بیماریزا در ایران داشتند. آن‌ها روی ژن مولد  $\beta$ -Tubulin متمرکز شدند و از روش RFLP استفاده کردند. در نتیجه گونه‌های *ترایکوفایتون* را همچنان یکی از برجسته‌ترین عوامل عفونی در کشور قلمداد کردند. به نظر آن‌ها ژن  $\beta$ T2 مارکر ژنتیکی مفیدی جهت مطالعات اپیدمیولوژیکی درماتوفیت‌ها است [۱۱]. این امکان وجود دارد که بیماران مبتلا به

<sup>1</sup> Graser

**الف) جمع‌آوری میکروارگانیسم‌ها**

جدایه‌های *تریکوفایتون* روبروم از ۲۲ بیمار مبتلا به درماتوفیتوزیس مراجعه‌کننده به آزمایشگاه قارچ‌شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران و آزمایشگاه‌های تخصصی قارچ‌شناسی در تهران به طور اتفاقی جمع‌آوری شد. قارچ‌های جداشده ابتدا در محیط کشت سابورودکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید کشت داده شد و مشخصات ماکروسکوپی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت، سپس با استفاده از روش اسلاید کالچر<sup>۱</sup> مشخصات میکروسکوپی نیز تأیید شد.

**ب) تعیین حساسیت جدایه‌ها نسبت به داروی فلوکونازول**

در این مرحله روش آگار ماکرودیولوشن<sup>۲</sup> که در سال ۱۹۸۹ توسط پروکتور<sup>۳</sup> و مکنزی<sup>۴</sup> معرفی شد و چندین محقق دیگر نیز در مطالعات خود آن را به کار برده‌اند، استفاده گردید [۱۷-۱۴]. از آنجایی که حلال DMSO تا حدودی روی رشد درماتوفیت‌ها به خصوص در پلیت و آگار تأثیر منفی دارد، حال آنکه استون با توجه به اینکه فرار نیز هست فاقد چنین اثری است [۱۸-۱۶]، به کمک حلال استون ۵۰٪ رقت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از داروی فلوکونازول به عنوان محلول مادر تهیه شد. در ابتدا از دامنه وسیعی از غلظت دارو جهت تعیین حساسیت استفاده شد. در غلظت‌های ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از دارو، برخی نمونه‌ها محدودیت چشمگیری در رشد داشتند و در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فاقد رشد بودند. به دلیل اینکه قطر هاله رشد کلنی‌های حساس در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارو به صفر رسید پس این غلظت بیشترین غلظت برای دارو جهت تعیین

حساسیت در نظر گرفته شد. از طرفی در غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر اولین آثار تأثیر دارو دیده شد و در غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از دارو، همین نمونه‌های حساس هم از نظر قطر هاله رشد فرقی با نمونه شاهد نداشتند. بنابراین روی غلظت‌های ۱ و ۶/۲۵ و ۱۲/۵ و ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تمرکز شد. جهت تهیه رقت‌های ۱، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، به ترتیب ۲، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول مادر به ۲۰ سی سی محیط کشت SCC استریل موجود در لوله آزمایش، در شرایط استریل و در دمای مناسب اضافه گردید. سریعاً این محیط‌ها به داخل پلیت‌ها منتقل شدند. همچنین جهت ارزیابی اثر ضد قارچی استن از پلیت کنترل حاوی حلال استن نیز استفاده شد. میزان استنی که به این پلیت‌ها اضافه شده بود، برابر با استن پلیت‌های حاوی دارو بود، به عنوان مثال برای پلیت کنترل رقت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر دارو ۲ میکرولیتر استن به محیط کشت اضافه گردید. بعد از آماده شدن محیط‌های تعیین حساسیت، با استفاده از پانچر ۶ میلی‌متری از سوش‌هایی که تقریباً ۷ روز از کشت آن‌ها می‌گذشت تکه‌هایی برداشته شد و به این محیط‌ها منتقل شد. این محیط‌های تعیین حساسیت به همراه یک پلیت شاهد فاقد دارو و یک پلیت کنترل حاوی حلال استن برای هر سوش، به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از ۱۰ روز درصد کاهش رشد جدایه‌های قارچی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد کاهش رشد} = \frac{\text{دارو-اندازه قطر کلنی شاهد} - \text{اندازه قطر کلنی در محیط حاوی}}{\text{اندازه قطر کلنی شاهد}} \times 100$$

با توجه به درصد کاهش رشد در غلظت‌های متفاوت دارو، درجه حساسیت و مقاومت سوش‌ها به داروی فلوکونازول تعیین گردید [۱۸-۱۶].

<sup>1</sup> Slide Culture<sup>2</sup> Agar Macro-dilution<sup>3</sup> Proctor<sup>4</sup> Mackenzie

## ج) استخراج DNA

همه سوبه‌ها روی محیط کشت سابورودکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (۰.۵W/V) و سیکلوهگزامید (۰.۵W/V) (محیط کشت SCC) کشت داده شدند و در دمای ۲۵°C برای ۱۰ روز انکوبه شدند. در یک هاون چینی نیتروژن مایع به ۱ تا ۲ گرم از میسلیم قارچی اضافه شد، به مقداری که کاملاً روی آن را بگیرد و آن را خشک کند. سلول‌ها به خوبی با دسته هاون آسیاب و پودر شدند. DNA ژنومی به وسیله روشی که دل‌سال<sup>۱</sup> و همکاران توصیف کردند، با اندکی تغییرات استخراج شد [۱۹]. به‌طور خلاصه ۵۰۰ میکرولیتر lysis buffer (شامل 10mM اسیدکلریدریک-تریس (Tris/HCl) با pH: 8، EDTA به میزان 1mM، 1% SDS و 100µg از proteinase K ml<sup>-1</sup>) در یک تیوب اپندورف به این پودر میسلیمی اضافه گردید. مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، ۲۰۰ میکرولیتر از 5M NaCl اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر استیل تری متیل آمونیوم بروماید ۱۰٪ (w/v) اضافه و انکوباسیون برای ۲۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. RNase A با غلظت نهایی ۵۰ µg ml<sup>-1</sup> به محلول زده شد و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس با یک حجم مساوی از فنل/کلروفرم/ایزوآمیل الکل {۱:۲۴:۲۵ (v/v)} استخراج شد و در ۱۲۰۰۰ g برای ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. این مرحله ۳ بار تکرار شد. DNA با دو حجم از ۲- پروپانول سرد در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ دقیقه متراکم شد، برای دو بار در ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ شستشو شد، خشک شد، و در ۱۰۰ میکرولیتر از بافر TE (40 mM Tris/HCl pH:8, 2mM EDTA) حل شد. غلظت DNA استخراج شده به وسیله

اندازه‌گیری جذب نوری در nm ۲۶۰ تخمین زده شد [۱].

## د) RAPD-PCR

جهت انجام واکنش از ۳ پرایمر زیر استفاده گردید [۲۱،۲۰] (جدول ۱).

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمرها

نام پرایمر	توالی پرایمر
پرایمر A	5'-GGTTCTGGCA-3'
پرایمر B	5'-AAGAGCCCGT-3'
پرایمر C	5'-AACGCGCAAC-3'

Master mix (غلظت نهایی): 1xPCR Buffer، 3mM از Mgcl2، 0.5 mM مخلوط Taq DNA primer، 20pmol از dNTPs، polymerase به مقدار 2µ، 10ng از DNA استخراج شده، حجم کلی نهایی ۲۵µ بود.

میکروتیوپ حاوی مواد فوق داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد و سیکل زیر آغاز گردید. در ابتدا مرحله واسرشت اولیه به مدت ۴ دقیقه و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، در ادامه مرحله واسرشت با ۳۸ سیکل ۵۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس مرحله اتصال به تعداد ۳۸ سیکل ۱ دقیقه‌ای که دمای آن در کار با پرایمر A و B، ۳۶ درجه سانتی‌گراد و در کار با پرایمر C، ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. مرحله بعدی مرحله ساخت شامل ۳۸ سیکل ۱ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، و در پایان مرحله ساخت پایانی با زمان ۱۰ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد واکنش PCR را کامل کرد. بعد از خارج کردن میکروتیوپ‌ها از دستگاه، جدا کردن فرآورده‌های تکرار و تکثیر DNA توسط الکتروفورز بر روی آگاروز ژل ۲٪ انجام شد. رنگ‌آمیزی با ایتیدیوم بروماید (EB) صورت گرفت و از UV Transilluminator جهت مشاهده باندها و Polaroid Camera جهت عکس‌برداری زیر نور UV استفاده شد. با استفاده از نرم افزار UVIDocMw اندازه باندها تعیین شد. سپس در نرم افزار SPSS،

<sup>۱</sup> Del-Sal

پایین‌تر دارو نیز درصد کاهش رشد بالایی داشتند. سوش‌های شماره ۱۳ تا ۲۲ مقاوم به فلوکونازول با درصد کاهش رشد ۰٪ یا نزدیک به آن، در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هستند. درصد کاهش رشد این ایزوله‌های مقاوم در غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر دارو کمتر از ۵۰٪ بود و در غلظت‌های پایین‌تر دارو نیز رشد چشمگیری داشتند. با هر ۳ پرایمر الگوی تکثیر یافته متفاوتی بین نمونه‌های حساس و مقاوم مشاهده شد. خلاصه‌ای از مقایسه باندهای موجود در محصولات RAPD-PCR ایزوله‌های مقاوم و حساس با پرایمرهای A, B, C در جداول ۲ و ۳ و ۴ آورده شده است.

هر ایزوله به همراه باندهای آن معرفی گردید و این نرم افزار با استفاده از این اطلاعات برای ایزوله‌ها درخت فیلوژنی ترسیم کرد.

### یافته‌ها

معیار برای تعیین حساسیت و مقاومت سوبه‌ها، دیسک دیفیوژن بوده است [۲۲]. در مرحله تعیین حساسیت این نتایج حاصل شد: ایزوله‌های شماره ۱ تا ۱۲ حساس به فلوکونازول با درصد کاهش رشد ۱۰۰٪ یا خیلی نزدیک به آن، در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هستند که در غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از دارو نیز مقدار درصد کاهش رشد آن‌ها در مقایسه با پلیت شاهد پس از انجام محاسبات بیشتر از ۶۰٪ بوده و در غلظت‌های

جدول ۲. خلاصه‌ای از مقایسه باندها در محصولات RAPD-PCR حاصل از نمونه‌های مقاوم و حساس در کار با پرایمر A

باند (bp)	۳۶۱	۳۶۱	۳۶۱	۱۱۱	۲۶	۷۷	۹۲	۸۴	۷۰	۶۶	۵۰	۵۰	۵۰	۳۳	۳۳	۳۳
نمونه‌های حساس	۰٪	۰٪	۰٪	۰٪	۰٪	۰٪	۲۵٪	۰٪	۰٪	۲۵٪	۰٪	۲۵٪	۰٪	۲۵٪	۰٪	۲۵٪
نمونه‌های مقاوم	۲۰٪	۲۰٪	۳۰٪	۳۰٪	۲۰٪	۵۰٪	۰٪	۶۰٪	۲۰٪	۰٪	۳۰٪	۰٪	۲۰٪	۰٪	۴۰٪	۰٪

جدول ۳. خلاصه‌ای از مقایسه باندها در محصولات RAPD-PCR حاصل از نمونه‌های مقاوم و حساس در کار با پرایمر B

باند (bp)	۲۶۱	۱۵۰	۱۳۱	۶۶	۸۷	۷۱	۶۰	۵۵	۱۵۰	۶۶	۳۳	۵۲۵	۳۳
نمونه‌های حساس	۰٪	۲۵٪	۰٪	۰٪	۰٪	۰٪	۲۵٪	۰٪	۲۵٪	۰٪	۰٪	۰٪	۰٪
نمونه‌های مقاوم	۲۰٪	۰٪	۲۰٪	۳۰٪	۲۰٪	۲۰٪	۰٪	۲۰٪	۰٪	۲۰٪	۲۰٪	۲۰٪	۲۰٪

جدول ۴. خلاصه‌ای از مقایسه باندها در محصولات RAPD-PCR حاصل از نمونه‌های مقاوم و حساس در کار با پرایمر C

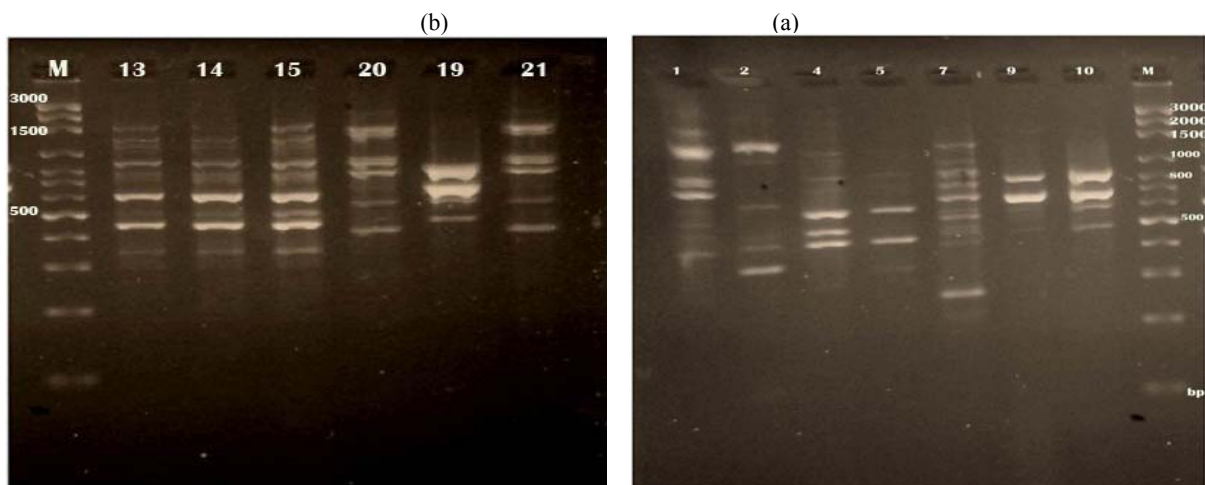
باند (bp)	۳۶۱	۱۵۰	۱۴۱	۶۰۱	۸۶	۳۷	۸۷	۱۷	۷۰	۶۸	۷۲	۶۰	۷۳	۶۶
نمونه‌های حساس	۰٪	۳۳/۷٪	۰٪	۰٪	۰٪	۶۶/۱۳٪	۰٪	۰٪	۳۳/۳۳٪	۰٪	۰٪	۰٪	۰٪	۰٪
نمونه‌های مقاوم	۲۰٪	۴۰٪	۲۰٪	۲۰٪	۲۰٪	۰٪	۲۰٪	۵۰٪	۱۰٪	۲۰٪	۴۰٪	۲۰٪	۲۰٪	۲۰٪

۲ باند حداقل تعداد باندهای ایجاد شده را دارد و جدایه‌های شماره ۱۱ و ۷ به ترتیب با ۱۳ و ۱۲ باند

با پرایمر A در نمونه‌های حساس، همه جدایه‌ها به جز جدایه شماره ۱۲ جواب دادند. جدایه شماره ۹ با

ایجاد حد اکثر باندها را ایجاد کردند. هم چنین الگوی تکثیر یافته هیچیک از جدایه‌های حساس با یکدیگر یکسان نیست. باندهای ۸۴۰ و ۸۱۰ و ۶۴۰ و ۵۷۰ و ۴۷۰ و ۴۶۰ (bp) با فراوانی نسبی ۲۵٪ بیشترین بیان را در نمونه‌های حساس داشته‌اند. باندهایی مانند ۳۸۱۰ و ۲۱۵۰ و ۱۵۸۰ و ۱۴۶۰ و ۱۳۰۰ و ۱۱۹۰ و ۱۱۰۰ و ۸۳۰ و ۶۸۰ و ۵۴۰ و ۵۰۰ و ۴۵۰ و ۴۰۰ و ۳۵۰ و ۲۷۰ و ۲۵۰ و ۲۲۰ و ۱۳۰ و ۱۱۰ (bp) با فراوانی نسبی ۸/۳۳٪ هر کدام فقط در یکی از جدایه‌های حساس بیان شدند. در بین باندها، باندهایی وجود دارند که دارای فراوانی نسبی مشابهی می‌باشند ولی در جدایه‌های مشابه مشاهده نشده‌اند (شکل ۱-ا). با پرایمر A در نمونه‌های مقاوم، همه جدایه‌ها به جز جدایه شماره ۱۸ جواب دادند. جدایه شماره ۱۷ با ۲ باند حداقل تعداد باندهای ایجاد شده را دارد و جدایه شماره ۱۵ با ۱۱ باند ایجاد حد اکثر باندها را ایجاد نمود. الگوی مولکولی جدایه‌های ۲۰ و ۲۱ کاملاً یکسان است. الگوی مولکولی جدایه‌های ۱۳ و ۱۴ و ۱۵ مشابه یکدیگر بوده ولی یکسان نمی باشد. باند ۷۶۰ bp با فراوانی نسبی ۶۰٪ بیشترین بیان را داشته است. باندهایی مانند ۱۵۰۰ و ۱۳۶۰ و ۱۰۴۰ و ۹۳۰ و ۹۰۰ و ۸۵۰ و ۸۰۰ و ۷۴۰ و ۶۳۰ و ۶۰۰ و ۴۶۰ و ۳۵۰ (bp) با

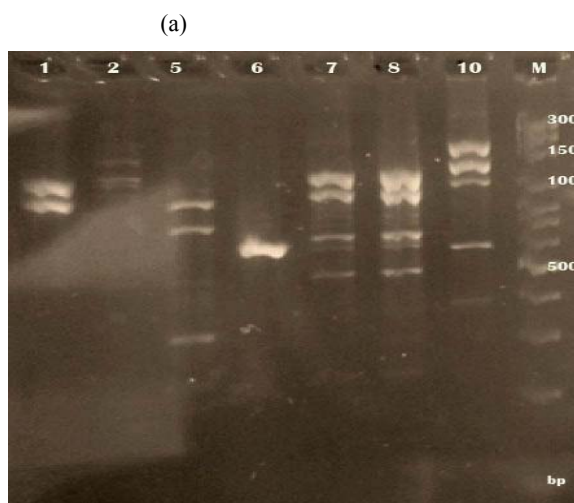
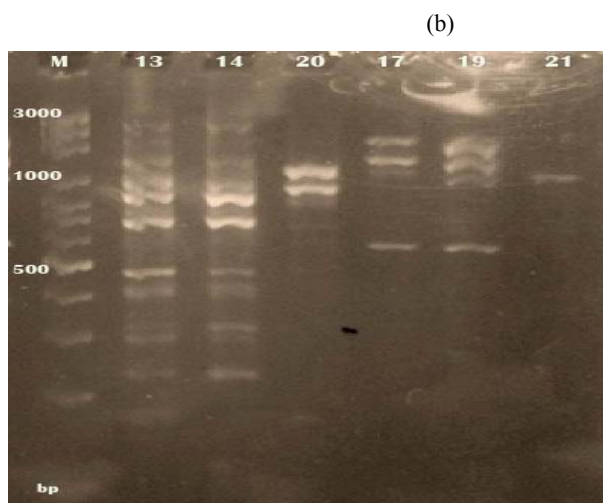
فراوانی نسبی ۱۰٪، هر کدام فقط در یکی از جدایه‌های مقاوم بیان شدند. در بین باندها، باندهایی وجود دارند که دارای فراوانی نسبی مشابهی می‌باشند ولی در جدایه‌های مشابه مشاهده نشده‌اند (شکل ۱-ب). ضمناً با پرایمر A در نسبت فراوانی تمامی باندها در نمونه‌های حساس و مقاوم اختلاف قابل ملاحظه‌ای دیده شد. بیشترین اختلاف نسبت فراوانی باندها در نمونه‌های حساس و مقاوم ۶۰٪ و در باند ۷۶۰ bp بود. برخی باندها مانند ۳۸۱۰ و ۲۱۵۰ و ۱۶۳۰ و ۱۴۶۰ و ۱۲۸۰ و ۱۱۰۰ و ۱۰۰۰ و ۸۹۰ و ۷۹۰ و ۶۹۰ و ۵۹۰ و ۵۰۰ و ۴۵۰ و ۴۰۰ و ۳۲۰ و ۲۵۰ و ۱۳۰ و ۱۱۰ (bp)، باندهایی بودند که فقط در نمونه‌های حساس دیده شدند و باندهایی مانند ۱۵۰۰ و ۱۳۹۰ و ۱۳۴۰ و ۱۲۴۰ و ۱۱۱۰ و ۹۳۰ و ۹۰۰ و ۸۵۰ و ۸۰۰ و ۷۶۰ و ۷۰۰ و ۶۰۰ و ۵۶۰ و ۴۴۰ (bp)، باندهایی بودند که فقط در نمونه‌های مقاوم مشاهده شدند. این باندها نشان از وجود ارتباط بین مقاومت سوش‌ها به دارو و الگوی ژنتیکی آن‌ها و در نتیجه وجود ارتباط بین مقاومت سوش‌ها به دارو و الگوی RAPD حاصل از آن‌ها دارد. بنابراین، این باندها می‌توانند اختصاصی حساس و مقاوم شوند و آن‌ها را از هم تفکیک کنند (شکل ۱).



شکل ۱. محصولات RAPD-PCR روی ژل الکتروفورز (با پرایمر A): تصویر سمت راست (a) مربوط به نمونه‌های حساس با شماره‌های ۱۰-۹-۷-۵-۴ و ۲-۱ و تصویر سمت چپ (b) مربوط به نمونه‌های مقاوم با شماره‌های ۲۱-۱۹-۲۰-۱۵-۱۴-۱۳ می باشد.

فراوانی نسبی ۳۰٪ بیشترین بیان را در نمونه‌های مقاوم داشته است. باندهای ۲۰۰۰ و ۱۷۹۰ و ۱۴۰۰ و ۱۲۵۰ و ۱۱۶۰ و ۱۰۹۰ و ۷۲۰ و ۶۱۰ (bp) با فراوانی نسبی ۱۰٪، هر کدام فقط در یکی از جدایه‌های مقاوم بیان شدند. در بین باندها، باندهایی وجود دارند که دارای فراوانی نسبی مشابهی می‌باشند، ولی در جدایه‌های مشابه مشاهده نشده‌اند (شکل ۲-ب). با استفاده از پرایمر B نیز وجود ارتباط بین مقاومت سوش‌ها و الگوی RAPD حاصل از آن‌ها دیده شد. در نسبت فراوانی تمامی باندها در نمونه‌های حساس و مقاوم اختلاف قابل ملاحظه‌ای وجود داشت. بیشترین میزان این اختلاف ۳۰٪ و در باند ۹۹۰ bp بود. باندهایی مانند ۳۰۹۰ و ۱۵۰۰ و ۱۰۱۰ و ۹۲۰ و ۸۴۰ و ۶۵۰ و ۶۰۰ و ۵۱۰ و ۳۳۰ (bp) فقط در نمونه‌های حساس دیده شدند و باندهای ۲۶۹۰ و ۲۰۰۰ و ۱۴۰۰ و ۱۲۵۰ و ۱۱۶۰ و ۹۹۰ و ۸۸۰ و ۷۱۰ و ۶۱۰ و ۴۹۰ و ۳۲۵ و ۲۳۰ (bp)، باندهایی هستند که فقط در نمونه‌های مقاوم دیده شدند. بنابراین این باندها می‌توانند اختصاصی حساس و مقاوم شوند و آن‌ها را از هم تفکیک کنند (شکل ۲).

با پرایمر B در نمونه‌های حساس، همه جدایه‌ها به جز جدایه‌های شماره ۳ و ۱۱ و ۱۲ جواب دادند. جدایه شماره ۶ با ۱ باند حداقل تعداد باندهای ایجاد شده را دارد و جدایه شماره ۴ با ۸ باند ایجاد حداکثر باندها را ایجاد کرده است. همچنین الگوی تکثیر یافته جدایه‌های شماره ۷ و ۸ با یکدیگر یکسان است. باندهای ۱۵۰۰ و ۱۰۹۰ و ۶۰۰ و ۵۱۰ (bp) با فراوانی نسبی ۲۵٪ بیشترین بیان را در نمونه‌های حساس داشته‌اند. باندهای ۳۰۹۰ و ۲۰۷۰ و ۱۷۹۰ و ۱۳۵۰ و ۱۰۱۰ و ۹۷۰ و ۸۹۰ و ۸۴۰ و ۷۲۰ و ۵۹۰ و ۴۵۰ و ۳۰۰ (bp) با فراوانی نسبی ۸/۳۳٪، هر کدام فقط در یکی از جدایه‌های حساس بیان شدند. در بین باندها، باندهایی وجود دارند که دارای فراوانی نسبی مشابهی می‌باشند ولی در جدایه‌های مشابه مشاهده نشده‌اند (شکل ۲-ا). با پرایمر B در نمونه‌های مقاوم، همه جدایه‌ها به جز جدایه‌های شماره ۱۵ و ۱۶ جواب دادند. جدایه شماره ۲۱ با ۱ باند حداقل تعداد باندهای ایجاد شده را دارد و جدایه‌های شماره ۱۳ و ۱۴ با ۱۱ باند ایجاد حداکثر باندها را ایجاد کرده‌اند. هم‌چنین الگوی تکثیر یافته جدایه‌های شماره ۱۳ و ۱۴ با یکدیگر یکسان است. باند ۹۹۰ bp با



شکل ۲. پرایمر B: تصویر سمت راست (a) مربوط به نمونه‌های حساس با شماره‌های ۱-۲-۵-۶-۷-۸-۱۰ و تصویر سمت چپ (b) مربوط به نمونه‌های مقاوم با شماره‌های ۱۳-۱۴-۲۰-۱۷-۱۹-۲۱ می‌باشد.

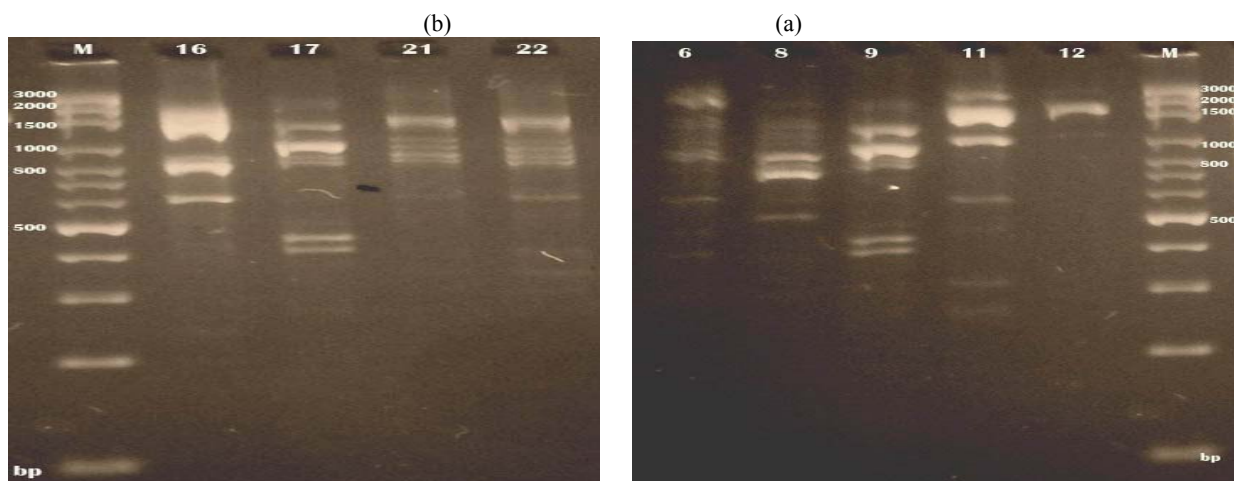
حداقل تعداد باندهای ایجاد شده را دارند و جدایه شماره ۱۰ با ۸ باند ایجاد حداکثر باندها را ایجاد

با پرایمر C در نمونه‌های حساس، همه جدایه‌ها باند ایجاد کردند. جدایه‌های شماره ۲ و ۱۲ با ۱ باند



۱۴۰۰ و ۱۳۲۰ و ۱۲۶۰ و ۱۱۲۰ و ۱۰۰۰ و ۹۶۰ و ۹۰۰ و ۸۰۰ و ۶۱۰ و ۴۸۰ و ۴۳۰ با فراوانی نسبی ۱۰٪، هر کدام فقط در یکی از جدایه‌های مقاوم بیان شدند. در بین باندها، باندهایی وجود دارند که دارای فراوانی نسبی مشابهی می‌باشند ولی در جدایه‌های مشابه مشاهده نشده‌اند (شکل ۳-ب). با پرایمر C در نسبت فراوانی تمامی باندها در نمونه‌های حساس و مقاوم اختلاف قابل ملاحظه‌ای دیده شد. بیشترین اختلاف نسبت فراوانی باندها در نمونه‌های حساس و مقاوم ۵۰٪ و در باند ۸۱۰ bp بود. در این مورد نیز می‌توان آثاری را مبنی بر وجود ارتباط بین مقاومت سوش‌ها و الگوی RAPD حاصل از آن‌ها یافت. باندهایی مثل ۲۳۷۰ و ۲۲۳۰ و ۱۷۰۰ و ۱۵۶۰ و ۱۵۰۰ و ۱۴۵۰ و ۱۳۶۰ و ۱۲۴۰ و ۹۵۰ و ۸۴۰ و ۷۰۰ و ۵۸۰ و ۵۱۰ و ۴۴۰ و ۴۰۰ و ۳۰۰ و ۲۵۰ (bp)، باندهایی بودند که فقط در نمونه‌های حساس دیده شدند و باندهای ۱۶۲۰ و ۱۴۰۰ و ۱۳۰۰ و ۱۲۶۰ و ۱۱۲۰ و ۱۰۶۰ و ۱۰۰۰ و ۹۰۰ و ۸۳۰ و ۷۲۰ و ۶۰۰ و ۴۸۰ و ۳۸۰ (bp)، فقط در نمونه‌های مقاوم مشاهده شدند. بنابراین این باندها می‌توانند اختصاصی حساس و مقاوم شوند و آن‌ها را از هم تفکیک کنند (شکل ۳).

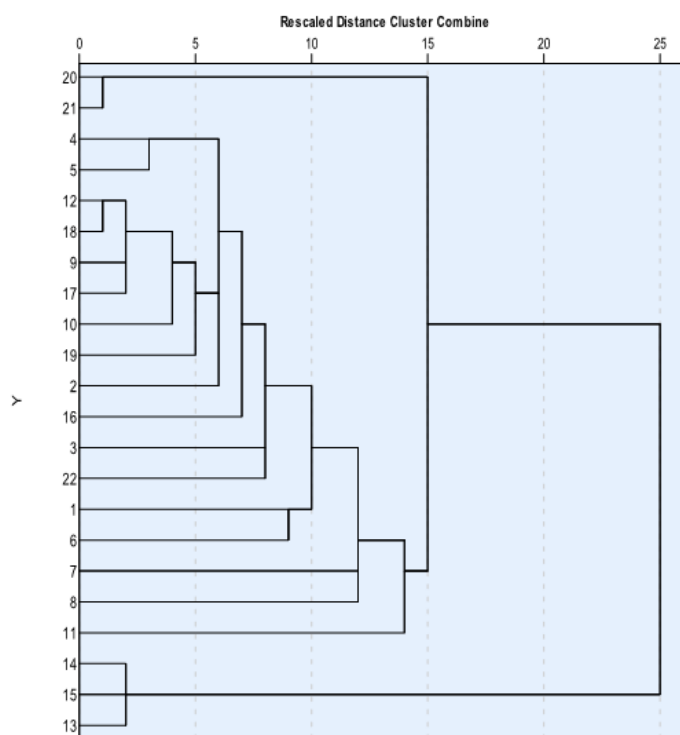
کرده است. هم چنین الگوی تکثیر یافته جدایه‌های شماره ۴ و ۵ با یکدیگر یکسان است. باند ۸۴۰ bp با فراوانی نسبی ۴۱/۶۶٪ بیشترین بیان را در نمونه‌های حساس داشته است. باندهایی مانند ۲۳۷۰ و ۲۲۳۰ و ۱۷۰۰ و ۱۵۶۰ و ۱۵۰۰ و ۱۴۳۰ و ۱۳۷۰ و ۱۲۴۰ و ۱۱۶۰ و ۱۰۱۰ و ۹۵۰ و ۸۵۰ و ۷۷۰ و ۶۹۰ و ۵۸۰ و ۵۱۰ و ۴۴۰ و ۳۰۰ و ۲۵۰ (bp) با فراوانی نسبی ۸/۳۳٪، هر کدام فقط در یکی از جدایه‌های حساس بیان شدند. در بین باندها، باندهایی وجود دارند که دارای فراوانی نسبی مشابهی می‌باشند ولی در جدایه‌های مشابه مشاهده نشده‌اند (شکل ۳-ا). با پرایمر C در نمونه‌های مقاوم، همه جدایه‌ها باند ایجاد کردند. جدایه‌های شماره ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶ تعداد ۵ باند و جدایه‌های شماره ۱۷ و ۲۰ و ۲۱ تعداد ۶ باند و جدایه ۲۲ تعداد ۷ باند و جدایه‌های ۱۸ و ۱۹ تعداد ۸ باند ایجاد کردند. الگوی تکثیر یافته جدایه‌های شماره ۱۸ و ۱۹ با یکدیگر یکسان است. همچنین الگوی تکثیر یافته جدایه‌های شماره ۲۱ و ۲۲ شبیه به یکدیگر است، ولی در جدایه شماره ۲۲ یک باند ۶۱۰ bp وجود دارد که جدایه شماره ۲۱ فاقد آن است. باند ۸۱۰ bp با فراوانی نسبی ۵۰٪ بیشترین بیان را در نمونه‌های مقاوم داشته است. باندهایی مانند



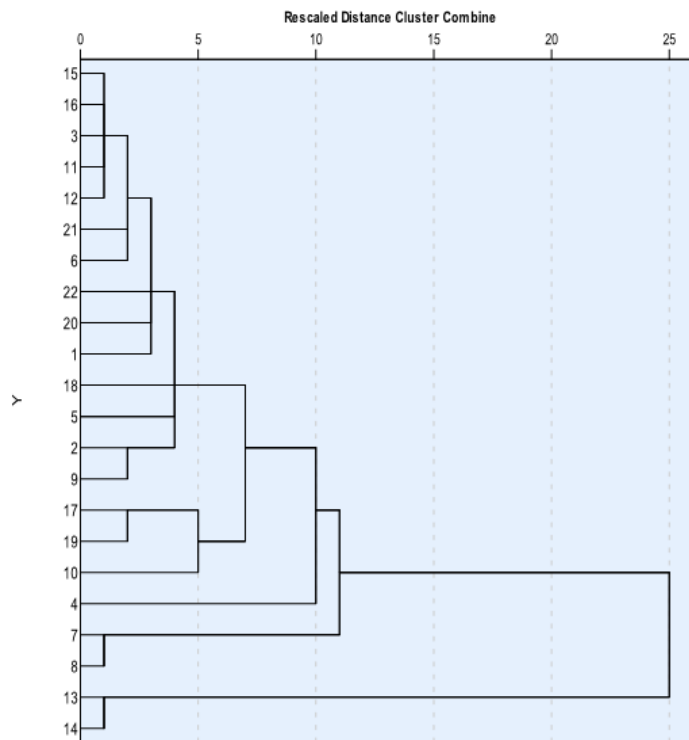
شکل ۳. محصولات RAPD-PCR روی ژل الکتروفورز (با پرایمر C): تصویر سمت راست (a) مربوط به نمونه‌های حساس با شماره‌های ۱۲-۱۱-۹-۸-۶ و تصویر سمت چپ (b) مربوط به نمونه‌های مقاوم با شماره‌های ۲۲-۲۱-۱۷-۱۶ می‌باشد.

جدایه‌های ۳-۱۶-۲-۱۹-۱۰-۱۷-۹-۱۸-۱۲-۵-۴ در کل با هر ۳ پرایمر تفاوت‌هایی در الگوی ژنتیکی نمونه‌های حساس و مقاوم دیده شد که وجود ارتباط بین مقاومت سوش‌ها به دارو و الگوی ژنتیکی آن‌ها و در نتیجه وجود ارتباط بین مقاومت سوش‌ها به دارو و الگوی RAPD حاصل از آن‌ها را ثابت می‌کرد. پرایمر A که اختلاف نسبت فراوانی باند ۷۶۰ bp آن در نمونه‌های حساس و مقاوم ۶۰٪ بود، جهت تفکیک مناسب به نظر می‌رسد و به ترتیب پرایمر C که با همه جدایه‌های موجود باند تشکیل داد و اختلاف نسبت فراوانی باند ۸۱۰ bp آن در نمونه‌های حساس و مقاوم ۵۰٪ بود و پرایمر B نیز با اختلاف نسبت فراوانی ۳۰٪ در باند ۹۹۰ bp جهت تفکیک نمونه‌های حساس و مقاوم می‌تواند مناسب باشد. در دندروگرامی که توسط نرم افزار SPSS و با استفاده از الگوهای مولکولی جدایه‌ها با پرایمر A ترسیم شد، سوش‌ها در سطح ۱۵٪؛ در ۳ گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل جدایه‌های شماره ۲۰ و ۲۱، گروه دوم شامل جدایه‌های ۱۳، ۱۴، ۱۵ و گروه سوم شامل

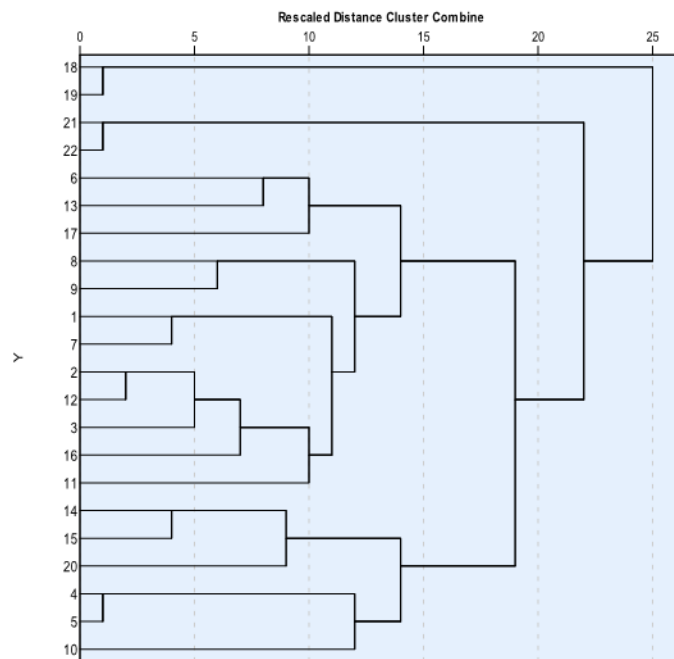
جدایه‌های ۱۱-۸-۷-۶-۱-۲۲ بودند (شکل ۴-ا). در دندروگرام الگوهای RAPD به دست آمده از سوش‌های *ترایکوفایتون روبروم* با پرایمر B، در سطح ۱۰٪ جدایه‌ها ۴ گروه را تشکیل دادند. جدایه‌های ۱۳ و ۱۴ در گروه اول، جدایه‌های ۷ و ۸ در گروه دوم، سوش شماره ۴ در گروه سوم و سایر جدایه‌ها (۱۰-۱۹-۱۷-۹-۲-۵-۱۸-۱-۲۰-۲۲-۶-۲۱-۱۲-۱۱-۳-۱۶-۱۵) در گروه چهارم قرار گرفتند (شکل ۴-ب). در دندروگرام الگوهای RAPD به دست آمده از سوش‌های *ترایکوفایتون روبروم* با پرایمر C، جدایه‌ها در سطح ۱۵٪؛ ۴ گروه تشکیل دادند. گروه اول شامل سوش‌های ۱۸ و ۱۹، گروه دوم شامل سوش‌های ۲۱ و ۲۲، گروه سوم شامل جدایه‌های ۶ و ۱۳ و ۱۷ و ۸ و ۹ و ۱ و ۷ و ۲ و ۱۲ و ۳ و ۱۶ و ۱۱، و گروه چهارم شامل جدایه‌های ۱۴ و ۱۵ و ۲۰ و ۴ و ۵ و ۱۰ بود (شکل ۴-ج).



شکل (۴-ا). دندروگرام الگوهای RAPD به دست آمده از سویه‌های *ترایکوفایتون روبروم* با پرایمر A



شکل (۴-ب). دندروگرام الگوهای RAPD به دست آمده از سویه‌های *ترایکوفایتون روبروم* با پرایمر B



شکل (۴-ج). دندروگرام الگوهای RAPD به دست آمده از سوش‌های *ترایکوفایتون روبروم* با پرایمر C

### بحث

قارچ‌های درماتوفیت دارای آنزیم‌های پروتئولیتیک به نام کراتیناز هستند که این آنزیم سبب هضم کراتین مو و ناخن و قسمت شاخی پوست شده و

ضمن اینکه قارچ از این ماده و سایر عناصر جهت تغذیه استفاده می‌کند، در طبقه شاخی پوست کلنی تشکیل می‌دهد [۲۳]. داروی فلوکونازول از طریق مهار مراحل بیوسنتز ارگوسترول، رشد دیواره

هدف آن (BT2) مسئول در ساخت  $\beta$ -tubulin و (TEF1) مسئول در ساخت فاکتور  $\alpha$ -1 بودند، توانست *ترایکوفایتون تونسورانس* را از *ترایکوفایتون /کوتینیوم جدا کند* [۲۸]. عباس تبار و همکاران با به کارگیری اندونوکلئازهای MwoI, Alw21I, HpyCH4V که بر روی ژن مولد  $\beta$ -tubulin اثر می‌گذاشتند توانستند *ترایکوفایتون روبروم* را از *ترایکوفایتون اینتردیجیتال*، *ترایکوفایتون تونسورانس* و *ترایکوفایتون ویولاسئوم* تفکیک کنند [۲۹]. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) که مبتنی بر استفاده از آنزیم DNA پلیمرز می‌باشد در سال ۱۹۸۵ ابداع و در ۱۹۸۸ به روز رسانی شد. این روش یکی از حساس‌ترین و اختصاصی‌ترین تکنیک‌ها جهت تشخیص قارچ‌های مهم در پزشکی است [۳۰-۳۲]. برای مثال جکسون<sup>۱</sup> و همکاران تنوع داخل گونه‌ای در سویه‌های *ترایکوفایتون روبروم* را به وسیله گسترش عوامل جزئی تکراری متوالی به نام (TRS-1) از ناحیه فاصله انداز رونویسی نشده rDNA به نام (NTS)، توصیف کردند که ۲۱ تیپ PCR TRS-1 در ۱۰۱ جدایه بالینی شناسایی شد [۳۳]. همچنین کامیا<sup>۲</sup> و همکاران، ۱۷ نوع از TRS-1 PCR در ۲۵۲ جدایه بالینی مشاهده کردند [۳۴]. یزدانپرست دو یا تعداد بیشتری سویه مختلف *ترایکوفایتون روبروم* را به وسیله یک روش مبتنی بر PCR برای تعیین تعداد عوامل تکراری در NTS از تکرارهای ژن rRNA آنالیز کرد. او با انجام این آزمایش دریافت که در عفونت‌های ناخن سویه‌های مختلفی درگیر هستند [۲].

یکی از انواع روش‌های PCR، RAPD-PCR می‌باشد که تکثیر تصادفی قطعات ژنوم را به همراه دارد. پرایمرها به محل‌هایی متصل می‌شوند که بالاترین همولوژی تحت شرایط PCR داده شده به آن‌ها را دارند. اخیراً این روش برای مطالعات تشخیصی

سلولی قارچ را مهار می‌کند و باعث اختلال در عملکرد دیواره قارچ، عدم حفاظت و حمایت از سلول و در نتیجه مرگ سلول می‌شود [۳]. یکی از مهمترین دلایل شکست در درمان بیماری‌های قارچی پاسخ‌های متفاوت یا درجه مقاومتی است که قارچ‌ها به دارو نشان می‌دهند [۲]. این مطالعه با هدف یافتن رابطه‌ای بین الگوی ژنتیکی و حساسیت به دارو در نمونه‌های بالینی *ترایکوفایتون روبروم*، بر روی جدایه‌های جمع‌آوری شده از بیماران مبتلا به درماتوفیتوزیس مراجعه‌کننده به آزمایشگاه قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران و آزمایشگاه‌های تخصصی قارچ شناسی در تهران، در آزمایشگاه تحقیقاتی ارشد میکروبیولوژی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج صورت گرفت. در سال‌های اخیر روش‌های مولکولی به نحو چشمگیری در تشخیص عفونت‌های قارچی و گونه‌های آن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است [۲۴، ۲۵]. در مطالعه‌ای میرزاحسینی و همکاران عملکرد PCR-RFLP را در سرعت بخشیدن به تشخیص درماتوفیت‌های پاتوژن مهم کلینیکی مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نتیجه گرفتند محصولات PCR اختصاصی و الگوهای RFLP حاصل از اثر آنزیم‌های محدودکننده MvaI، HinfI و HaeIII تشخیص سریع جدایه‌های درماتوفیتی که ۵-۱۰ روز از کشت آن‌ها می‌گذرد را در سطح جنس و گونه امکان پذیر می‌نماید. ژن هدف آن‌ها در این تحقیق روی ناحیه ITS از rDNA قرار داشت [۲۶]. در مطالعه دیگری رضائی ماتکلایی با کمک تکنیک RFLP دو تحقیق که بر روی نواحی ITS rDNA پایه گذاری شده بود انجام داد. او توانست بین گونه‌های مختلف درماتوفیت‌ها در ایران تفاوت‌هایی مشاهده کند و بیان کرد که روش‌های مبتنی بر عملکرد و ساختار DNA بیشترین کمک را در تشخیص و نشان دادن قرابت ژنتیکی درماتوفیت‌ها خواهد کرد [۲۷]. در تحقیق دیگر این محقق با همین تکنیک که ژن‌های

<sup>1</sup> Jackson

<sup>2</sup> Kamiya

مولکولی برخی میکروارگانیسم‌ها به کار گرفته شده، زیرا این روش می‌تواند الگوهای متفاوتی ایجاد کند که برای طبقه‌بندی میکروارگانیسم‌ها استفاده شوند [۳۶،۳۵]. نکته‌ای که باید در مطالعه با استفاده از این روش مورد توجه قرار داد تغییرات غیر حقیقی است که در نتایج رخ می‌دهد و در اثر اختلافات کوچکی در شرایط واکنش نظیر غلظت DNA الگو، غلظت یون پرایمر، دماهای مراحل مختلف PCR، غلظت یون منیزیم ایجاد می‌شود [۱]. یکی دیگر از محدودیت‌های این پژوهش و به طور کلی این روش، انجام مراحل مختلف تحقیق در شرایط استریل است. چنانچه در یکی از مراحل کشت، تعیین حساسیت، استخراج DNA و یا PCR میکروارگانیسمی همراه ایزوله مورد آزمایش شود، DNA آن در نتایج آزمایش خطا ایجاد خواهد کرد. ضمناً نمونه‌گیری قارچ از بیمار و تشخیص اولیه جنس و گونه درماتوفیت باید با نهایت دقت صورت گیرد، چون درماتوفیت‌ها و به خصوص درماتوفیت‌های جنس *ترایکوفایتون* شباهت‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی به یکدیگر دارند و تشخیص اشتباه باعث خطا در آزمایشات خواهد شد.

مطالعاتی که تا به حال بر روی قارچ *ترایکوفایتون* روبروم و به روش RAPD-PCR صورت گرفته، همگی در خصوص بررسی الگوی مولکولی *ترایکوفایتون* روبروم و مقایسه آن با الگوی مولکولی سایر درماتوفیت‌ها بوده است و تاکنون پژوهشی جهت بررسی رابطه الگوی ژنتیکی و حساسیت این قارچ به داروی فلوکونازول صورت نگرفته است. لیو<sup>۱</sup> و همکاران، با استفاده از دو پرایمر به سادگی سه قارچ *اییدرموفایتون* فلوکوزوم، *ترایکوفایتون* *منتاگروفایتیس* وارپته انسان‌گرا و *ترایکوفایتون* روبروم را از یکدیگر تفکیک دادند. بر طبق این مطالعه نتایجی که از تکنیک RAPD حاصل شد تعارضی با نتایج آنالیز mtDNA RFLP نداشت

[۳۸،۳۷]. ماچیزوکی<sup>۲</sup> و همکاران طی تحقیقی بر روی چندین گونه از درماتوفیت‌های انسانی از قبیل *ترایکوفایتون* روبروم، *ترایکوفایتون* *منتاگروفایتیس* وارپته انسان دوست و *اییدرموفایتون* فلوکوزوم با استفاده از روش RAPD-PCR و توسط ۵ پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی توانستند به طور واضح گونه‌ها را از هم تفکیک نمایند، آن‌ها نتیجه گرفتند که گونه‌های انسان‌دوست درماتوفیتی به طور واضح توسط RAPD-PCR از هم قابل تشخیص هستند [۳۹]. فاگی<sup>۳</sup> و همکاران توانستند روش RAPD-PCR را برای تشخیص گونه‌های مختلف درماتوفیت‌ها به کار برند. آن‌ها روش RAPD-PCR را با استفاده از پرایمر (GACA) ۴ به عنوان روش مناسب تشخیص درماتوفیت‌ها معرفی کردند [۴۰].

ژانگ<sup>۴</sup> و همکاران، ۳۰ سوش *ترایکوفایتون* روبروم را با روش RAPD مطالعه کردند، آن‌ها ۲۲ سوش را تمیز ندادند و ۸ سوش را با تفاوت‌های ناچیز یافتند [۴۱]. بیزا<sup>۵</sup> و همکاران، در طی تحقیقی توسط ۶ پرایمر مختلف (شامل پرایمرهای B و C در این مطالعه) بر روی تایپینگ مولکولی *ترایکوفایتون* روبروم با استفاده از تکنیک RAPD مطالعه کردند که توسط دو پرایمر (از پرایمرهای مقاله حاضر نبودند) پلی مورفیسم داخل گونه‌ای در ۱۰ جدایه مشاهده شد و توسط هر پرایمر، ۵ الگوی مولکولی ایجاد شد [۲۱]. این گروه در سال ۲۰۰۶ تحقیق خود را بر روی ۶۷ جدایه *ترایکوفایتون* روبروم با استفاده از دو پرایمری که در مطالعه پیشین جواب مطلوبی داده بودند، ادامه داد. با بکارگیری یکی از پرایمرها دوازده الگوی مولکولی و با پرایمر دیگر یازده الگوی مولکولی در میان ۶۷ جدایه ایجاد گردید [۱]. در مطالعه‌ای که توسط سانتوز<sup>۶</sup> و همکاران صورت

<sup>2</sup> Mochizuki

<sup>3</sup> Faggi

<sup>4</sup> Zhang

<sup>5</sup> Baeza

<sup>6</sup> Santose

<sup>1</sup> Liu

گرفت و از دو پرایمر فوق استفاده شد، توانایی و شایستگی هر دوی آن‌ها ثابت شد. ۱۹ پروفایل مولکولی برای سویه‌های *ترایکوفایتون روبروم* با این پرایمرها شکل‌دهی شد [۴۲]. گروه دیگری از محققین در سال ۲۰۱۱ از این دو پرایمر جهت تشخیص سوش‌های بالینی *ترایکوفایتون روبروم* به روش RAPD استفاده کردند که نشان داد که تقریباً همه جدایه‌ها (۸۷/۳٪) از لحاظ ژنتیکی با یکدیگر مرتبط اند [۴۳].

در این مطالعه ابتدا حساسیت یا مقاومت جدایه‌ها در برابر داروی فلوکونازول تعیین شد. همان‌گونه که میرعبداله الهی و معمارزاده نیز در مطالعات خود برخی سوش‌های *ترایکوفایتون روبروم* را در برابر داروی فلوکونازول با غلظت‌های مورد آزمایش در این تحقیق حساس و برخی را مقاوم مشاهده کرده بودند [۱۷،۱۶]. در این تحقیق نیز برخی سویه‌ها حساس و برخی مقاوم نشان دادند. این یافته‌ها دلیلی است بر اینکه این دارو روی رشد *ترایکوفایتون روبروم* تأثیرگذار است. سوش‌هایی که در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از دارو رشد نکردند و در غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از دارو نیز مقدار درصد کاهش رشد آن‌ها در مقایسه با پلیت شاهد پس از انجام محاسبات بیشتر از ۶۰٪ بود، ایزوله‌های حساسی بودند که در غلظت‌های ۱۲/۵ و ۶/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از دارو نیز رشد آن‌ها محدود شد؛ اما ایزوله‌های مقاوم در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از دارو رشد کردند و در غلظت‌های پایین‌تر دارو نیز از خود مقاومت قابل ملاحظه‌ای نشان دادند.

در مرحله بعد تایپینگ مولکولی ۲۲ جدایه *ترایکوفایتون روبروم* جدا شده از ۲۲ بیمار مبتلا به درماتوفیتوزیس به روش RAPD-PCR صورت گرفت. از ۳ پرایمر استفاده شد که هر یک الگوی تکثیر یافته متفاوتی را ایجاد کردند. یافته‌های حاصل از این پژوهش همچون نتایج تحقیقات بیزا و همکاران و

همینطور سانتوز و همکاران، پلی مورفیسم داخل گونه‌ای را در جدایه‌های *ترایکوفایتون روبروم* نشان داد [۱،۲۱،۴۲]. این تحقیق همچون تحقیق هرنیسویز<sup>۱</sup> و همکاران که جهت تشخیص جدایه‌های بالینی *ترایکوفایتون روبروم* از روش RAPD استفاده کرده بودند، نشان داد که تقریباً همه جدایه‌ها از لحاظ ژنتیکی با یکدیگر مرتبطند [۴۳]. با هر ۳ پرایمر تفاوت‌هایی در الگوی ژنتیکی نمونه‌های حساس و مقاوم دیده شد. وجود ارتباط بین مقاومت جدایه‌ها به دارو و الگوی ژنتیکی آن‌ها و در نتیجه وجود ارتباط بین مقاومت جدایه‌ها و الگوی RAPD حاصل از آن‌ها، به دلیل وجود باندهایی فقط در نمونه‌های حساس و هم چنین وجود باندهایی فقط در نمونه‌های مقاوم مشاهده شد. در مقایسه نمونه‌های حساس و مقاوم هیچ باندهایی که ۱۰۰٪ اختصاصیت را نشان دهد، دیده نشد. با پرایمر A الگوی مولکولی جدایه‌های ۲۰ و ۲۱ کاملاً یکسان بود و الگوی مولکولی جدایه‌های ۱۳ و ۱۴ و ۱۵ مشابه یکدیگر بود ولی یکسان نبود. برخی باندها هم در نمونه‌های حساس بودند و هم در نمونه‌های مقاوم، که جهت تایپینگ این گونه قارچی مهم هستند. اما باند bp ۷۶۰ در ۶۰٪ نمونه‌های مقاوم و همچنین باند bp ۸۸۰ در ۵۰٪ نمونه‌های مقاوم دیده شد، در حالی که در هیچ یک از نمونه‌های حساس حضور نداشتند. باندهای bp ۶۴۰، ۵۷۰، ۸۱۰، ۴۷۰، ۳۲۰ نیز در ۲۵٪ نمونه‌های حساس حضور داشتند ولی در نمونه‌های مقاوم دیده نشدند. این باندها دارای اهمیت اند و می‌توانند نشان یک اختلاف بین الگوی ژنتیکی نمونه‌های حساس و مقاوم باشند و اینکه مقاومت جدایه‌ها در برابر دارو با الگوی ژنتیکی آن‌ها مرتبط است. با پرایمر B الگوی تکثیر یافته جدایه‌های شماره ۷ و ۸ با یکدیگر یکسان بود و هم چنین الگوی تکثیر یافته جدایه‌های شماره ۱۳ و ۱۴ یکسان بود. به عنوان یک اختلاف مشاهده شده می‌توان به وجود باند bp ۹۹۰ در ۳۰٪ نمونه‌های

<sup>۱</sup> Hryniewicz-Gwóźdź

شدند و برخی فقط در سوش‌های مقاوم بودند. اگرچه هیچ بانندی که ۱۰۰٪ اختصاصیت را نشان دهد دیده نشد ولی همین باندها در کنار یکدیگر می‌توانند نشان دهنده رابطه بین حساسیت سوش به دارو و الگوی ژنتیکی آن باشند. بعضی از باندها هم در نمونه‌های حساس بودند و هم در نمونه‌های مقاوم. این باندها در کنار یکدیگر می‌توانند نشان دهنده ارتباط ژنتیکی بین جدایه‌ها باشند.

### نتیجه گیری

اگر از پرایمرهای متفاوت دیگری و سوبه‌های *ترایکوفایتون روبروم* بیشتری استفاده شود، نه تنها می‌توان امیدوار بود که روش RAPD جهت انگشت‌نگاری ژنتیکی سوش‌های مختلف *ترایکوفایتون روبروم* به کار گرفته شود، بلکه این امید وجود دارد که بتوان بین الگوی ژنتیکی سوبه‌های حساس و مقاوم به داروی فلوکونازول تفاوت‌های مهم و مشخصی یافت. بدین ترتیب با تعیین به هنگام میزان مقاومت سوش مولد عفونت به دارو و تجویز دز مناسب دارو توسط پزشک، کمک شایان توجهی به بیماری‌ها می‌تواند داشته باشد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از اعضای محترم آزمایشگاه قارچ‌شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران که در مرحله جمع‌آوری نمونه‌ها به محقق عنایت داشته‌اند قدردانی می‌گردد.

مقاوم اشاره کرد، در حالیکه نمونه‌های حساس این باند را نشان ندادند. باندهایی مانند ۳۰۹۰ و ۱۵۰۰ و ۱۰۱۰ و ۹۲۰ و ۸۴۰ و ۶۵۰ و ۶۰۰ و ۵۱۰ و ۳۳۰ (bp) فقط در نمونه‌های حساس دیده شدند و باندهای ۲۶۹۰ و ۲۰۰۰ و ۱۴۰۰ و ۱۲۵۰ و ۱۱۶۰ و ۹۹۰ و ۸۸۰ و ۷۱۰ و ۶۱۰ و ۴۹۰ و ۳۲۵ و ۲۳۰ (bp)، باندهایی هستند که فقط در نمونه‌های مقاوم دیده شدند. برخی باندها نیز، هم در نمونه‌های حساس بودند و هم در نمونه‌های مقاوم. با پرایمر C الگوی تکثیر یافته جدایه‌های شماره ۴ و ۵ با یکدیگر و الگوی تکثیر یافته جدایه‌های شماره ۱۸ و ۱۹ با یکدیگر یکسان بود. هم چنین الگوی تکثیر یافته جدایه‌های شماره ۲۱ و ۲۲ شبیه به یکدیگر بود ولی در جدایه شماره ۲۲ باند ۶۱۰ bp وجود داشت که جدایه شماره ۲۱ فاقد آن بود. ضمن اینکه برخی باندها هم در الگوی RAPD حاصل از نمونه‌های حساس حضور داشتند و هم در الگوی RAPD حاصل از نمونه‌های مقاوم، باند ۸۱۰ bp در ۵۰٪ نمونه‌های مقاوم وجود داشت ولی نمونه‌های حساس فاقد آن بودند. همچنین باند ۸۶۰ bp در ۴۲٪ نمونه‌های حساس مشاهده شد ولی در هیچ یک از نمونه‌های مقاوم نبود. هر دوی این باندها نشان از اختلاف بین الگوی ژنتیکی نمونه‌های حساس و مقاوم دارند. به طور کلی الگوهای RAPD حاصل از هر سه پرایمر تفاوت‌هایی را در الگوی مولکولی تمامی جدایه‌ها نشان داد که گاهی مثلاً در مورد جدایه‌های ۱۳ و ۱۴ این تفاوت بسیار ناچیز بود. برخی باندها فقط در سوش‌های حساس مشاهده

### References

- 1- Baeza L, Matsumoto M, Almedia A, Mendes-Giannini M. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of rDNA nontranscribed spacer. J Med Microbiol. 2006 Sep; 55(1): 429-36.
- 2- Yazdanparast SA, Jackson C, Barton RC, Evans EG. Molecular strain typing of *Trichophyton rubrum* indicates multiple strain involvement in onychomycosis. Br J Dermatol. 2003 Feb; 148(1): 51-54.
- 3- Mukherjee P, Leidich S, Isham N, Leitner I, Ryder N, Ghannoum M. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2003 Jan; 47(1): 82-86.

- 4- Santose D, Araujo R, Kohler L, Machado-Pinto J, Hamdan J, Cisalpino P. Molecular typing and antifungal susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates from patients with onychomycosis pre-and post-treatment. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 May; 29(1): 563-69.
- 5- Barros MES and Hamdan JS. Determination of susceptibility resistance to antifungal drugs of *Trichophyton mentagrophytes* isolates by a macrodilution method. *Can j Microbiol*. 2005 Jan; 51(1): 983-87.
- 6- Rodrigues C, Karla A. In vitro susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method. *Rev Inst Med*. 2009 Mar; 51(1): 9-12.
- 7- Liu D, Coloe S, Pedersen J, Baird R. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to differentiate *Trichophyton mentagrophytes*. *FEMS Microbiol*. 1996 Feb; 136(1): 147-50.
- 8- Kac G, Bougnoux ME, Feuilhade DE, Chauvin M, Sene S, Derouin F. Genetic diversity among *Trichophyton mentagrophytes* isolates using random amplified polymorphic DNA method. *Br J Dermatol*. 1999 Mar; 140(1): 839-44.
- 9- Graser Y, Kuijpers AF, Presber W, Hoog GS. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J Clin Microbiol*. 2000 Sep; 38(1): 3329-36.
- 10- Mirhendi H, Nooripour S, Shidfar MR, Zaini F, Jalalizand N, Tavakoli F. Identification and differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* by polymerase chain reaction and enzymatic digestion. *Armaghan Danesh*. 2008 Feb; 12(1): 45-51. (Full text in Persian)
- 11- Abastabar M, Rezaei-Matehkolaei A, Shidfar MR, Kordbacheh P, Mohammadi R, Shokoohi T, et al. Molecular epidemiological survey of clinically important dermatophytes in Iran based on specific RFLP profiles of betatubulin gene. *Iranian J Publ Health*. 2013 Sep; 42(1): 1049-57.
- 12- Zaias N, Tosti A, Rebell G. Autosomal dominant pattern of distal subungual onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*. *J Am Acad Dermatol*. 1996 Mar; 34(1): 302-4.
- 13- Faergemann J, Correia O, Nowicki R, Ro B. Genetic predisposition-understanding underlying mechanisms of onychomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005 Jun; 31(1): 17-19.
- 14- Fernandez T, Guarro J. A comparative study of the agar macrodilution method and the broth microdilution method (NCCLS) for antifungal susceptibility of *Trichophyton rubrum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000 Sep; 40(1): 17-20.
- 15- Rodrigues C. Comparison of in vitro activity of five antifungal agents against dermatophytes, using the agar dilution and broth microdilution methods. *Egypt D J*. 2005 May; 2(1): 983-7.
- 16- Memarzadeh Sh. Laboratory evaluation of antifungal drugs against *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* and the two intermediate species [dissertation]. Tehran University; 1997-98. (Full text in Persian)
- 17- Mirabdollah-elahi Sh. Study of the effect of some antifungal drugs on prevalent dermatophytes in Tehran [dissertation]. Islamic Azad University-Karaj branch; 2010. (Full text in Persian)
- 18- Randhawa M A. The effect of dimethylsulfoxide (DMSO) on the growth of dermatophytes. *Jpn J Med Mycol*. 2006 Dec; 47(1): 313-18.
- 19- Del-Sal G, Manfioletti G, Schneider C. The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques*. 1989 Apr; 7(1): 514-19.
- 20- Fahami Sh, Kordbacheh P, Moazeni M, Mahmoodi M, Mirhendi H. Species identification and strain typing of *Candida* isolates by PCR-RFLP and RAPD-PCR analysis for determining the probable sources of nosocomial infections. *Iranian Red Crescent Med J*. 2010 Dec; 12(5): 539-47.
- 21- Baeza L, Giannini M. Brief communication strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2004 Nov-Dec; 46(6): 339-41.
- 22- Espinel-Ingroff A, Arthington-Skaggs B, Iqbal N. Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B and caspofungin. *J clin Microbiol*. 2007 Mar; 45(1): 1811-20.
- 23- Graham-Brown R, Burns T. Lecture notes on dermatology. Oxford Black Well SP. 1990 Nov; 10(1): 25.
- 24- Tiwari KL, Jadhav SK, Ashish K. Morphological and molecular study of different *Penicillium* species. *Middle-East J Sci Res*. 2011 Jul; 7(1): 203-10.



- 25- Shantha R, Sarayu K, Sandhya S. Molecular identification of air microorganisms from municipal dumping ground. *World Appl Sci J*. 2009 Jul; 7(1): 689-92.
- 26- Mirzahoseini H, Omidinia E, Shams-Ghahfarokhi M, Sadeghi G, Razzaghi-Abyaneh M. Application of PCR-RFLP to rapid identification of the main pathogenic dermatophytes from clinical specimens. *Iranian J Publ Health*. 2009 Jan; 38(1): 18-24.
- 27- Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, Hoog S, Shidfar MR, Zaini F, Eshraghian M, et al. Molecular epidemiology of dermatophytosis in Tehran, Iran, a clinical and microbial survey. *Med Mycol*. 2013 Feb; 51(2): 203-7.
- 28- Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, Hoog S, Shidfar MR, Satoh K, Najafzadeh MJ, et al. Discrimination of *Trichophyton tonsurans* and *Trichophyton equinum* by PCR-RFLP and by  $\beta$ -tubulin and translation elongation factor 1- $\alpha$  sequencing. *Med Mycol*. 2012 Oct; 50(7): 760-4.
- 29- Abastabar M, Mirhendi H, Rezaei-Matehkolaei A, Shidfar MR, Kordbacheh P, Makimura K. Restriction analysis of  $\beta$ -Tubulin gene for differentiation of the common pathogenic dermatophytes. *Clin Lab Anal*. 2014 Jan; 45(2): 204-20.
- 30- Thanos M, Schonian A, Meyer W, Schweynoch C, Graser Y, Mitchell TG, et al. Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. *J Clin Microbiol*. 1996 Feb; 34(1): 615-21.
- 31- Renhsueh PO, JenetegLE. Molecular evidence for strain dissemination of *Penicillium marneffeii*. *J Infect Dis*. 2000 Jul; 181(1): 1706-12.
- 32- Rath PM, Marggra FG. Use of phenotypic and genotypic finger printing methods in the strain identification *Aspergillus fumigates*. *Mycoses*. 1995 Nov; 38(1): 429-34.
- 33- Jackson CJ, Barton R, Kelly RC, Evans EG. Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar; 38(1): 4527-34.
- 34- Kamiya A, Kikuchi A, Tomita Y, Kanbe T. PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. *J Dermatol Sci*. 2004 Apr; 34(1): 35-38.
- 35- Ajello L, Hay RJ. *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*: genetic diversity among species and strains. *Med Mycol*. 1998 Dec; 24(1): 133-57.
- 36- Saxena S, Verma J, Shikha, Modi DR. RAPD-PCR and 16srDNA phylogenetic analysis of alkaline protease producing bacteria isolated from soil of India: Identification and detection of genetic variability. *J Genetic Engineering and Biotechnology*. 2014 Jun; 12(1): 27-35.
- 37- Perin N, Bond R. Synergistic inhibition of the growth in vitro of *Microsporum canis* by miconazole and chlorhexidine. *Vet Dermatol*. 2003 Nov; 14(1): 99-102.
- 38- Ramanii R, Amalia C, PiniG. Mycology proficiency testing program. *J Dermatol Sci*. 2001 Nov; 29(1): 8-11.
- 39- Mochizuki T, Sugie N, Uehara M. Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes. *Mycoses*. 1997 Jun; 40(1): 405-409.
- 40- Faggi E, Pini G, Campisi E. PCR fingerprinting for identification of common species of dermatophytes. *J Clin Microbiol*. 2002 Dec; 40(12): 4804-5.
- 41- Zhang Z, Li R, Li D, Wang D. Typing of common dermatophytes by random amplification of polymorphic DNA. *Jpn J Med Mycol*. 1997 Feb; 38(1): 239-46.
- 42- Santose D, Araujo R, Hamdan J, Cisalpino P. *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*: genetic diversity among species and strains by random amplified polymorphic DNA method. *Mycopathologia*. 2009 Nov; 169(1): 247-55.
- 43- Hryniewicz-Gwózdź A, Jagielski T, Dobrowolska A, Szepietowski JC, Baran E. Identification and differentiation of *Trichophyton rubrum* clinical isolates using PCR-RFLP and RAPD methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Jun; 30(6): 727-31.