

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

Hadadi F, Sabokbar A*, Dezfulian M

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

*Corresponding Author: Tel: +989125179417 Fax: +982632229533 E-mail: sabokbar@kiau.ac.ir

Received: 1 May 2013 Accepted: 27 Jan 2014

ABSTRACT

Background & objectives: *Trichophyton rubrum* is one of the most common pathogenic cause of dermatophytosis. One of the drugs which have been prescribed widely for fungal infections is terbinafine which belongs to allylamines 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 Terbinafine 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 using each 3 primers 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 0.1 mg concentration of drug, also had limited growth at the low concentration of drug. Ten resistant isolates which grew in 0.1mg/ml of drug, in lower concentration of drug were resisted. RAPD analysis for molecular typing of *Trichophyton rubrum* seems to be completely suitable.

Keywords: *Trichophyton rubrum*, Terbinafine, RAPD-PCR, Genetic Diversity

بررسی رابطه الگوی ژنتیکی و حساسیت به داروی ترینافین در ایزوله های کلینیکی ترایکوفایتون روبروم

فاطمه حدادی، آذر سبکبار*، مهروز دزفولیان

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

*نویسنده مسئول: تلفن: ۰۹۱۲۵۱۷۹۴۱۷ فاکس: ۰۲۶۳۲۲۲۹۵۳۳ پست الکترونیک: sabokbar@kiaou.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: ترایکوفایتون روبروم یکی از شایعترین عوامل مولد بیماری درماتوفیتوزیس است. یکی از داروهایی که به طور وسیعی جهت درمان تجویز می شود، ترینافین از گروه آلیل آمین ها می باشد. اخیراً روشهای تایپینگ مولکولی برای پاسخ دادن به سؤالات اپیدمیولوژیکی و مشکلات عود مجدد بیماری گسترش زیادی یافته اند. 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 ترینافین در ایزوله های کلینیکی ترایکوفایتون روبروم بود.

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

یافته ها: هر پرایمر الگوی تکثیر یافته متفاوتی را ایجاد کرد و با هر ۳ پرایمر تفاوتی در الگوی ژنتیکی نمونه های حساس و مقاوم دیده شد ولی هیچ بانندی که ۱۰۰٪ اختصاصیت را نشان دهد یافت نشد.

نتیجه گیری: ۱۲ ایزوله حساس که در غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر دارو رشد نکردند، در غلظت های پایین تر دارو نیز رشد آن ها به میزان چشمگیری در مقایسه با پلیت شاهد محدود شد. ۱۰ ایزوله مقاوم که در غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر دارو رشد کردند، در غلظت های پایین تر دارو نیز از خود مقاومت نشان دادند.

آنالیز RAPD جهت تایپینگ مولکولی ایزوله های ترایکوفایتون روبروم کاملاً مناسب نشان داد.

کلمات کلیدی: ترایکوفایتون روبروم؛ ترینافین؛ RAPD-PCR؛ نوع ژنتیکی

دریافت: ۹۲/۸/۲۰ پذیرش: ۹۲/۱۱/۷

مقدمه

عفونتهای درماتوفیتی یکی از شایعترین بیماریهای واگیردار قارچی در انسان محسوب می شوند [۱]. درماتوفیتها قارچهایی کراتین دوست هستند که باعث ایجاد گروه وسیعی از بیماریهای پوست و ضمام آن مانند ناخن و مو می شوند. این عوامل قارچی در ۳ جنس میکروسپوروم، ترایکوفایتون و اپیدرموفایتون قرار دارند [۲] که ترایکوفایتون روبروم عامل ۶۹/۵٪ عفونتهای درماتوفیتی و اصلی ترین 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].

درمان اینکومایکوزیس ناشی از درماتوفیت ها با ترینافین (Terbinafine) در ۸۵٪ موارد موفقیت آمیز بوده است [۵]. از دلایل عمده عدم موفقیت (۱۵٪ موارد) می توان به عواملی مانند عدم نفوذ دارو به بافت های عمقی، مقاومت به داروهای ضد قارچی، انواع گونه ها، واریته ها و سویه های قارچی، و پاسخ های میزبان اشاره کرد که تمام آنها می توانند سبب عود مجدد بیماری شوند که عود بیماری به ویژه در عفونت های ناشی از ترایکوفایتون روبروم به طور مکرر مشاهده شده است [۶]. شناسایی ترایکوفایتون روبروم در سطح سوپه کمک قابل ملاحظه ای در درمان و پیشگیری درماتوفیتوزیس خواهد کرد [۱].

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 r RNA 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 واریته‌های مختلف ترایکوفایتون‌ها می‌شود و تشخیص درمان‌وفیت‌های انسانی بهتر، دقیق‌تر و سریع‌تر صورت می‌گیرد. ما در این مطالعه از تکنیک RAPD با ۳ پرایمر مختلف با توالی تصادفی، جهت تایپینگ مولکولی ایزوله‌های حساس و مقاوم ترایکوفایتون روبروم استفاده کردیم که با هر ۳ پرایمر الگوی تکثیر یافته متفاوتی بین نمونه‌های حساس و مقاوم مشاهده شد.

هدف از این پژوهش بررسی رابطه الگوی ژنتیکی و حساسیت به داروی تربینافین 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 توصیفی بوده است و شامل مراحل زیر می‌باشد. الف) میکروارگانیزم: جدایه‌های ترایکوفایتون روبروم از ۲۲ بیمار مبتلا به درماتوفیتوزیس به طور اتفاقی جمع‌آوری شد. قارچ‌های جدا شده ابتدا در محیط کشت سابورد کستروز آگار حاوی کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید کشت داده شد و مشخصات میکروسکوپی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. سپس با استفاده از روش اسلاید کالچر (slide culture) مشخصات میکروسکوپی نیز تأیید شد.

ب) تعیین حساسیت جدایه‌ها نسبت به داروی تربینافین: در این مرحله روش آگارماکرودیلوشن (agar macrodilution) که در سال ۱۹۸۹ توسط Proctor و Mackenzie 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

روشهای مرفولوژیک قادر به شناسایی در حد گونه یا واریته به علت تشابهات زیاد نبوده درحالیکه روشهای مولکولی جدید قادر به تمیز دادن حتی در حد سویه نیز می‌باشد. تکنیک‌های زیست مولکولی مثل RFLP، PCR، 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]. گراسر^۱ و همکارانش در سال ۲۰۰۰ روی ۹۶ سویه ترایکوفایتون روبروم از ۴ قاره جهان، به وسیله PCR amplified fragment length fingerprinting polymorphism و monomorphic DNA markers تحقیق کردند. این سویه‌ها مورفولوژی کلنی متنوعی را نشان می‌دادند در حالیکه هیچ یک از این متدها هیچ پلی مورفیمی را آشکار نکرد [۹].

در سال ۲۰۰۸ میرهندی و همکارانش طی تحقیقی با روش واکنش زنجیره‌ای پلی مرز ناخیه SrDNA-ITS2ITS1-5.8 را تقویت کردند و سپس به کمک آنزیم Mva مورد هضم اندونوکلازای قرار دادند. آنها با این روش موفق به شناسایی و افتراق ترایکوفایتون روبروم و ترایکوفایتون منتاگروفایتیس شدند [۱۰]. عباس تبار و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۳ تحقیقی در مورد درماتوفیت‌های بیماریزا در کشور ایران داشتند. آنها روی ژن مولد β -tubulin متمرکز شدند و از روش RFLP استفاده کردند. در نتیجه گونه‌های تراکوفایتون را همچنان یکی از برجسته‌ترین عوامل عفونی در کشور قلمداد کردند. به نظر آنها ژن β T2 مارکر ژنتیکی مفیدی جهت مطالعات اپیدمیولوژیکی درماتوفیت‌ها است [۱۱].

این امکان وجود دارد که بیماران مبتلا به درماتوفیتوزیس به طور فردی به وسیله سویه‌های گوناگون مبتلا شده باشند. به ویژه بیمارانی با عفونت ناخن ناشی از ترایکوفایتون روبروم، که یک استعداد ژنتیکی دارند که آنها را نسبت به این ارگانیزم آسیب پذیر می‌کند [۱۳، ۱۴]. یزدانپرست و همکارانش در سال ۲۰۰۳ تعداد ۲ سویه مختلف یا بیشتر از

¹ Graser

با توجه به درصد کاهش رشد در غلظت های متفاوت دارو، درجه حساسیت و مقاومت ایزوله ها به داروی تربینافین تعیین گردید [۱۶-۱۸].

ج) استخراج DNA: همه ایزوله ها روی محیط کشت سابورد کستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (۰/۰۵ W/V) و سیکلوهگزامید (۰/۰۵ W/V) (محیط کشت SCC) کشت داده شدند و در دمای ۲۵°C برای ۱۰ روز انکوبه شدند. در یک هاون چینی نیتروژن مایع به ۲۱۰ گرم از میسلیم قارچی اضافه شد و سلول ها به خوبی با دسته هاون آسیاب و پودر شدند. DNA ژنومی به وسیله روشی که Del Sal و همکارانش توصیف کردند، با اندکی تغییرات استخراج شد [۱۹]. به طور خلاصه ۵۰۰ میکرولیتر lysis buffer (شامل ۱۰ mM اسیدکلریدریک-تریس (Tris-HCl) با pH:8، EDTA به میزان ۱ mM، 1% SDS و 100 µg از proteinase K ml⁻¹) در یک تیوب اپندورف به این پودر میسلیمی اضافه گردید. مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد، ۲۰۰ میکرولیتر از 15M NaCl اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر استیل تری متیل آمونیوم بروماید (۱۰% w/v) اضافه و انکوباسیون برای ۲۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد ادامه یافت. RNase A با غلظت نهایی ۵۰ µg ml⁻¹ به محلول زده شد و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس با یک حجم مساوی از فنل/کلروفرم/ایزوامیل الکل (۱:۲:۱) استخراج شد و در ۱۲۰۰۰ g برای ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. این مرحله ۳ بار تکرار شد. DNA با دو حجم از ۲-پروپانول سرد در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد 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) از اسید کلریدریک-تریس با pH:8، 2mM EDTA حل شد. غلظت DNA استخراج شده به وسیله اندازه گیری جذب نوری در 260nm تخمین زده شد. [1]

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'

اثری ست [۱۶-۱۸]. به کمک حلال استون ۵۰٪، رقت ۱ میلی گرم در میلی لیتر از داروی تربینافین به عنوان محلول مادر تهیه شد. در ابتدا از محدوده وسیعی از غلظت دارو جهت تعیین حساسیت استفاده شد. در غلظتهای ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر و ۰/۰۵ میکروگرم در میلی لیتر از دارو، برخی نمونه ها محدودیت چشمگیری در رشد داشتند و در غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر فاقد رشد بودند. به دلیل اینکه قطر هاله رشد کلنی های حساس در غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر دارو به صفر رسید پس این غلظت بیشترین غلظت برای دارو جهت تعیین حساسیت در نظر گرفته شد. از طرفی در غلظت ۰/۰۰۵ میکروگرم در میلی لیتر اولین آثار تاثیر دارو دیده شد و در غلظت ۰/۰۰۱ میکروگرم در میلی لیتر از دارو، همین نمونه های حساس هم از نظر قطر هاله رشد فرقی با نمونه شاهد نداشتند. بنابراین روی غلظت های ۰/۰۵ و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۵ تمرکز شد.

مقدار مشخصی از محلول مادر به ۲۰ سی سی محیط کشت SCC استریل موجود در لوله آزمایش، در شرایط استریل و در دمای مناسب اضافه گردید تا رقت های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۰۰۵ میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد. سریعاً این محیط ها به داخل پلیتیا منتقل شدند. برای تهیه رقت های دارویی ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱ میکروگرم در میلی لیتر، محلول مادر با کمک استون ۵۰٪، هزار برابر رقیق شد تا غلظت آن به ۱ میکروگرم در میلی لیتر رسید و با استفاده از آن این رقت ها تهیه گردید. همچنین جهت ارزیابی اثر ضد قارچی استن از پلیت کنترل حاوی حلال استن نیز استفاده شد. بعد از آماده شدن محیط های تعیین حساسیت، با استفاده از پانچر ۶ میلی متری از ایزوله هایی که تقریباً ۷ روز از کشت آنها می گذشت تکه هایی برداشته شد و به این محیطها منتقل شد. این محیط های تعیین حساسیت به همراه یک پلیت شاهد فاقد دارو و یک پلیت کنترل حاوی حلال استن برای هر ایزوله، به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از ۱۰ روز درصد کاهش رشد جدایه های قارچی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

اندازه قطر کلنی در محیط

حاوی دارو - اندازه قطر کلنی

شاهد

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

UV Illuminator جهت مشاهده باندها و Polaroid camera جهت عکس برداری زیر نور UV استفاده شد. با استفاده از نرم افزار UVIDoc Mw اندازه باندها تعیین شد. سپس در نرم افزار SPSS، 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 ایزوله‌ها، دیسک دیفیوژن disk diffusion بوده است [۲۲]. در مرحله تعیین حساسیت این نتیجه حاصل شد که ایزوله‌های شماره ۱ تا ۱۲ حساس به تربینافین در غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر و ایزوله‌های شماره ۱۳ تا ۲۲ مقاوم به تربینافین در غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر هستند. 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 شماره ۲ و ۳ آورده شده است. با پرایمر A در نمونه‌های حساس، همه

Master mix (غلظت نهایی): 3mM, 1x PCR Buffer, ۰/۵mM Mgcl2، ۲۰pmol. dNTPs، ۲۰ng Taq DNA polymerase، primer به مقدار ۲۵μl، حجم کلی نهایی ۲۵μl بود. میکروتیوب 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 سانتی گراد، در ادامه مرحله واسرشت با ۳۸ سیکل ۵۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، سپس مرحله اتصال به تعداد ۳۸ سیکل ۱ دقیقه‌ای که دمای آن در کار با پرایمر A و B، ۳۶ درجه سانتی گراد و در کار با پرایمر C، ۳۰ درجه سانتی گراد بود. مرحله بعدی مرحله ساخت شامل ۳۸ سیکل ۱ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد، و در پایان مرحله ساخت پایانی با زمان ۱۰ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی گراد واکنش PCR را کامل کرد. بعد از خارج کردن میکروتیوب‌ها از دستگاه، جدا کردن فرآورده‌های تکرار و تکثیر DNA توسط الکتروفورز بر روی آگاروز ژل ۲٪ انجام شد. رنگ آمیزی با ایتیدیوم بروماید (EB) صورت گرفت و از Trans

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

باند (bp)	۴۴۰	۳۹۱	۳۴۱	۲۹۱	۲۴۱	۱۹۱	۱۴۱	۹۱	۴۱	۱	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰	۲۵۰	۳۰۰	۳۵۰	۴۰۰	۴۵۰	
در نمونه‌های حساس	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪
در نمونه‌های مقاوم	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪

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

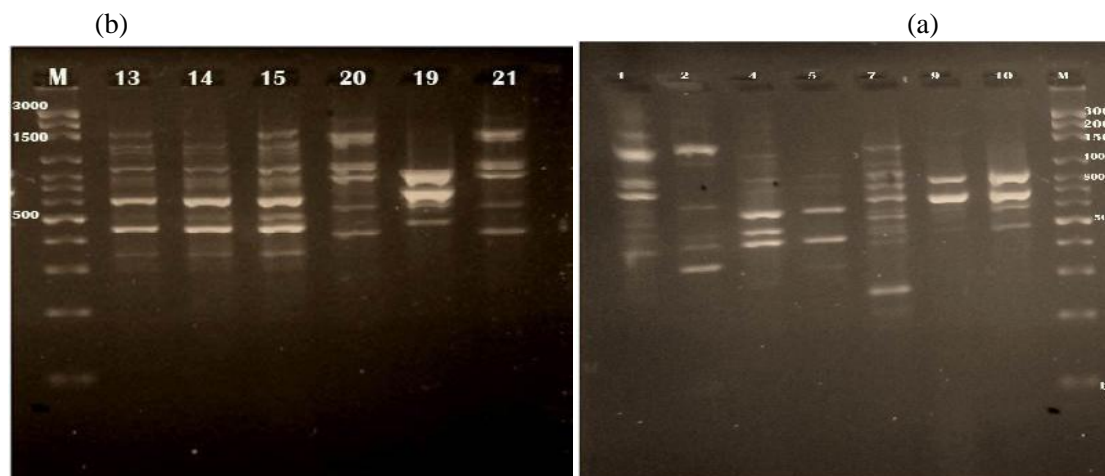
باند (bp)	۶۶۰	۵۱۰	۳۸۰	۲۶۰	۱۷۰	۱۸۰	۶۰	۵۰	۱۵۰	۴۹۰	۴۳۰	۳۲۵	۳۳۰
در نمونه‌های حساس	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪
در نمونه‌های مقاوم	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪

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

باند (bp)	۱۶۰	۱۵۱	۱۴۱	۱۰۱	۹۱	۳۷	۳۷	۱۷	۱۰۰	۹۸	۸۰	۶۰	۷۸	۴۶	۷۸	۴۶
در نمونه‌های حساس	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪
در نمونه‌های مقاوم	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪	٪

جدایه ها به جز جدایه شماره ۱۲ جواب دادند. جدایه شماره ۹ با ۲ باند حداقل تعداد باندهای ایجاد شده را دارد و جدایه های شماره ۱۱ و ۷ به ترتیب با ۱۳ و ۱۲ باند ایجاد حادتر باندها را ایجاد کردند. هم چنین الگوی تکثیر یافته هیچ یک از جدایه های حساس با یکدیگر یکسان نیست. باندهای ۸۴۰ و ۸۱۰ و ۶۴۰ و ۵۷۰ و ۴۷۰ و ۴۶۰ و ۳۲۰ (bp) با فراوانی نسبی ۲۵٪ بیشترین بیان را در نمونه های حساس داشته اند. 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 ۲۲۰ و ۱۳۰ و ۱۱۰ (bp) با فراوانی نسبی ۸/۳۳٪، هر کدام فقط در یکی از جدایه های حساس بیان شدند. در بین باندها، باندهایی وجود دارند که دارای فراوانی نسبی مشابهی می باشند ولی در جدایه های مشابه مشاهده نشده اند (تصویر ۱-ا). با پرایمر A در نمونه های مقاوم، همه جدایه ها 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 حادتر باندها را ایجاد نمود. الگوی مولکولی جدایه های ۲۰ و ۲۱ کاملاً یکسان است. الگوی مولکولی جدایه های 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 جدایه های مقاوم بیان شدند. در بین باندها، باندهایی وجود دارند که دارای فراوانی نسبی مشابهی می باشند ولی در جدایه های مشابه مشاهده نشده اند (تصویر ۱-ب). ضمناً با پرایمر A در نسبت فراوانی تمامی

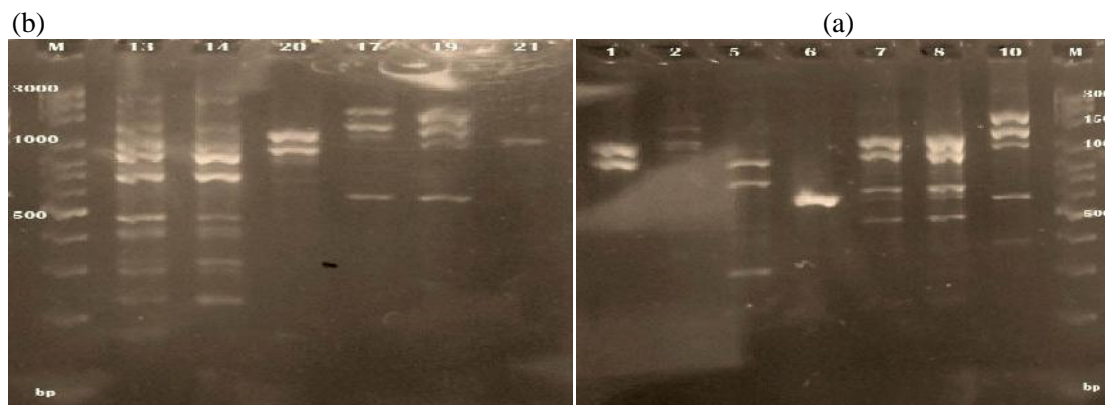
باند ها در نمونه های حساس و مقاوم اختلاف قابل ملاحظه ای دیده شد، به جز در باند ۶۳۰ و ۳۵۰ (bp) که میزان این اختلاف ۱/۶۷٪ بود. بیشترین اختلاف نسبت فراوانی باندها در نمونه های حساس و مقاوم ۶۰٪ و در باند ۷۶۰ bp بود. برخی باندها مانند ۳۸۱۰ و ۲۱۵۰ و ۱۶۳۰ و ۱۴۶۰ و ۱۲۸۰ و ۱۱۰۰ و ۱۰۰۰ و ۸۹۰ و ۷۹۰ و ۶۹۰ و ۵۹۰ و ۵۰۰ و ۴۵۰ و ۴۰۰ و ۳۲۰ و ۲۵۰ و ۱۳۰ و ۱۱۰ (bp)، باندهایی بودند که فقط در نمونه های 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 نمونه های مقاوم مشاهده شدند. بنابراین، این باندها می توانند اختصاصی حساس و مقاوم شوند و آنها را از هم تفکیک کنند (تصویر شماره ۱). با پرایمر B در نمونه های حساس، همه جدایه ها به جز جدایه های شماره ۱۳ 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 حادتر باندها را ایجاد کرده است. هم چنین الگوی تکثیر یافته جدایه های 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 نمونه های حساس داشته اند. 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 جدایه های حساس بیان شدند. در بین باندها، باندهایی وجود دارند که دارای فراوانی نسبی مشابهی می باشند ولی در جدایه های مشابه مشاهده نشده اند (تصویر ۲-ا). با پرایمر B در نمونه های مقاوم، همه جدایه ها به جز جدایه های شماره ۱۵ و ۱۶ جواب



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

نمونه های حساس داشته است. باندهایی مانند ۲۳۷۰ و ۲۳۳۰ 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 جدایه های حساس بیان شدند. در بین باندها، باندهایی وجود دارند که دارای فراوانی نسبی مشابهی می باشند ولی در جدایه های مشابه مشاهده نشده اند (تصویر ۳-ا). با پرایمر C در نمونه های مقاوم، همه جدایه ها باند ایجاد کردند. جدایه های شماره ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶ تعداد ۵ باند و جدایه های شماره ۱۷ و ۲۰ و ۲۱ تعداد ۶ باند و جدایه ۲۲ تعداد ۷ باند و جدایه های ۱۸ و ۱۹ تعداد ۸ باند ایجاد کردند. الگوی تکثیر یافته جدایه های شماره ۱۸ و ۱۹ با یکدیگر یکسان است. هم چنین الگوی تکثیر یافته جدایه های 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 نمونه های مقاوم داشته است. باندهایی مانند 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 جدایه های مقاوم بیان شدند. در بین باندها، باندهایی وجود دارند که دارای فراوانی نسبی مشابهی می باشند ولی در جدایه های مشابه مشاهده نشده اند (تصویر ۳-ب). با پرایمر C در نسبت فراوانی تمامی باندها در نمونه های حساس و مقاوم اختلاف قابل ملاحظه ای دیده شد، به جز در باند ۱۳۷۰ bp و ۹۶۰ bp که میزان این اختلاف ۱/۶۷٪ بود. بیشترین اختلاف نسبت فراوانی باندها در نمونه های حساس و مقاوم ۵۰٪ و در باند ۸۱۰ bp دیده شد. باندهایی مثل ۲۳۷۰ و ۲۳۳۰ و ۱۷۰۰ و ۱۵۶۰ و ۱۴۵۰ و ۱۳۶۰ و ۱۲۴۰ و ۹۵۰ و ۸۴۰ و ۷۰۰

دادند. جدایه شماره ۲۱ با ۱ باند حداقل تعداد باندهای ایجاد شده را دارد و جدایه های شماره ۱۳ و ۱۴ با ۱۱ باند ایجادی حداکثر باندها را ایجاد کرده اند. هم چنین الگوی تکثیر یافته جدایه های شماره ۱۳ و ۱۴ با یکدیگر یکسان است. باند ۹۹۰ bp با فراوانی نسبی ۳۰٪ بیشترین بیان را در نمونه های 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 جدایه های مقاوم بیان شدند. در بین باندها، باندهایی وجود دارند که دارای فراوانی نسبی مشابهی می باشند ولی در جدایه های مشابه مشاهده نشده اند (تصویر ۲-ب). ضمناً با پرایمر B در نسبت فراوانی تمامی باندها در نمونه های حساس و مقاوم اختلاف قابل ملاحظه ای دیده شد، به جز در باند ۱۷۹۰ bp و ۷۲۰ bp که میزان این اختلاف ۱/۶۷٪ بود. بیشترین اختلاف نسبت فراوانی باندها در نمونه های حساس و مقاوم 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 نمونه های 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 نمونه های مقاوم دیده شدند. بنابراین این باندها می توانند اختصاصی حساس و مقاوم شوند و آنها را از هم تفکیک کنند (تصویر شماره ۲). با پرایمر C در نمونه های حساس، همه جدایه ها باند ایجاد کردند. جدایه های شماره ۲ و ۱۲ با ۱ باند حداقل تعداد باندهای ایجاد شده را دارند و جدایه شماره ۱۰ با ۸ باند ایجادی حداکثر باندها را ایجاد کرده است. هم چنین الگوی تکثیر یافته جدایه های شماره ۴ و ۵ با یکدیگر یکسان است. باند ۸۴۰ bp با فراوانی نسبی ۴۱/۶۶٪ بیشترین بیان را در



تصویر ۲. محصولات RAPD-PCR روی ژل الکتروفورز (با پرایمر B): تصویر سمت راست (a) مربوط به نمونه های حساس با شماره های ۱-۱۰-۷-۶-۵-۲ و تصویر سمت چپ (b) مربوط به نمونه های مقاوم با شماره های ۲۱-۱۹-۱۷-۲۰-۱۴-۱۳ می باشد.

اختلاف نسبت فراوانی باند ۸۱۰ bp آن در نمونه های حساس و مقاوم ۵۰٪ بود و پرایمر B نیز با اختلاف نسبت فراوانی ۳۰٪ در باند ۹۹۰ bp جهت تفکیک نمونه های حساس و مقاوم می تواند مناسب باشد.

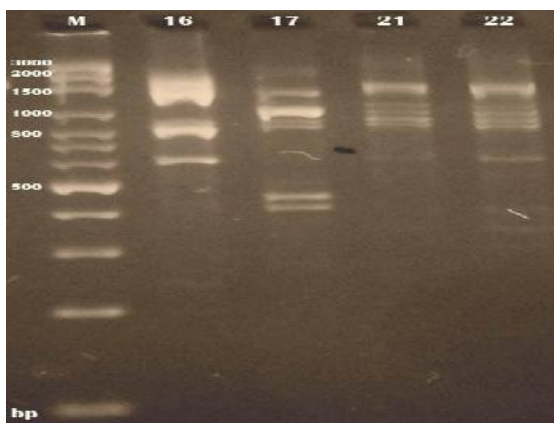
در دندروگرامی که توسط نرم افزار SPSS و با استفاده از الگوهای مولکولی ایزوله ها با پرایمر A ترسیم شد، ایزوله ها در سطح ۱۵٪، در ۳ گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل ایزوله های شماره ۲۰ و ۲۱، گروه دوم شامل ایزوله های ۱۳، ۱۴، ۱۵ و گروه سوم شامل ایزوله های ۹-۱۱-۱۲-۱۳-۱۴-۱۵-۱۶-۱۷-۱۸-۱۹-۲۰-۲۱-۲۲ بود. (تصویر شماره ۴-ا)

در دندروگرام الگوهای RAPD به دست آمده از ایزوله

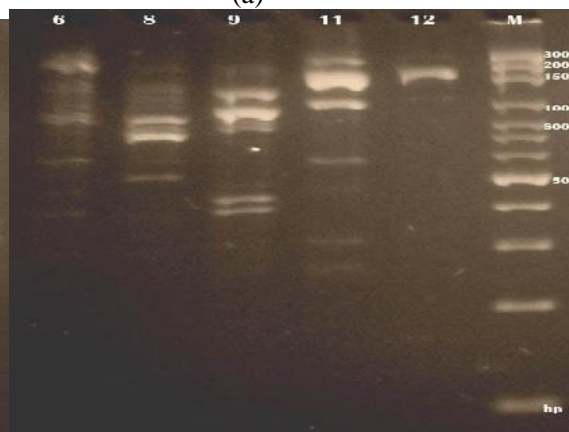
و ۵۸۰ و ۵۱۰ و ۴۴۰ و ۴۰۰ و ۳۰۰ و ۲۵۰ (bp)، باندهایی بودند که فقط در نمونه های حساس دیده شدند و باندهای ۱۶۲۰ و ۱۴۰۰ و ۱۳۰۰ و ۱۲۶۰ و ۱۱۲۰ و ۱۰۶۰ و ۱۰۰۰ و ۹۰۰ و ۸۳۰ و ۷۲۰ و ۶۰۰ و ۴۸۰ و ۳۸۰ (bp)، فقط در نمونه های مقاوم مشاهده شدند. بنابراین این باندها می توانند اختصاصی حساس و مقاوم شوند و آنها را از هم تفکیک کنند (تصویر شماره ۳).

در کل با هر ۳ پرایمر تفاوتی در الگوی ژنتیکی نمونه های حساس و مقاوم دیده شد. پرایمر A که اختلاف نسبت فراوانی باند ۷۶۰ bp آن در نمونه های حساس و مقاوم ۶۰٪ بود، جهت تفکیک مناسب به نظر می رسد و به ترتیب پرایمر C که با همه جدایه های موجود باند تشکیل داد و

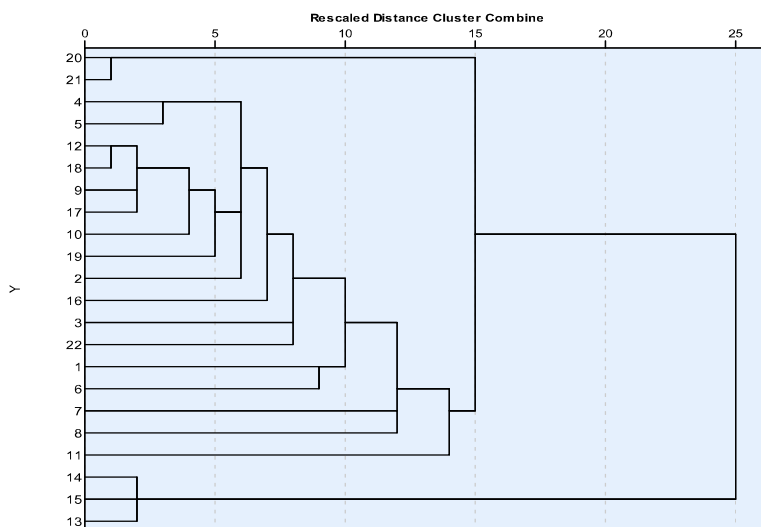
(b)



(a)



تصویر ۳. محصولات RAPD-PCR روی ژل الکتروفورز (با پرایمر C): تصویر سمت راست (a) مربوط به نمونه های حساس با شماره های ۱۶-۱۷-۱۸-۱۹-۲۰-۲۱ و تصویر سمت چپ (b) مربوط به نمونه های مقاوم با شماره های ۶-۷-۸-۹-۱۰-۱۱-۱۲ می باشد.



تصویر ۴-ا. دندروگرام الگوهای RAPD به دست آمده از ایزوله های *تریکوفایتون روبروم* با پرایمر A

گروه چهارم شامل ایزوله های ۱۵و۱۴و۲۰و۵و۱۰ بود. (تصویر شماره ۴-ع)

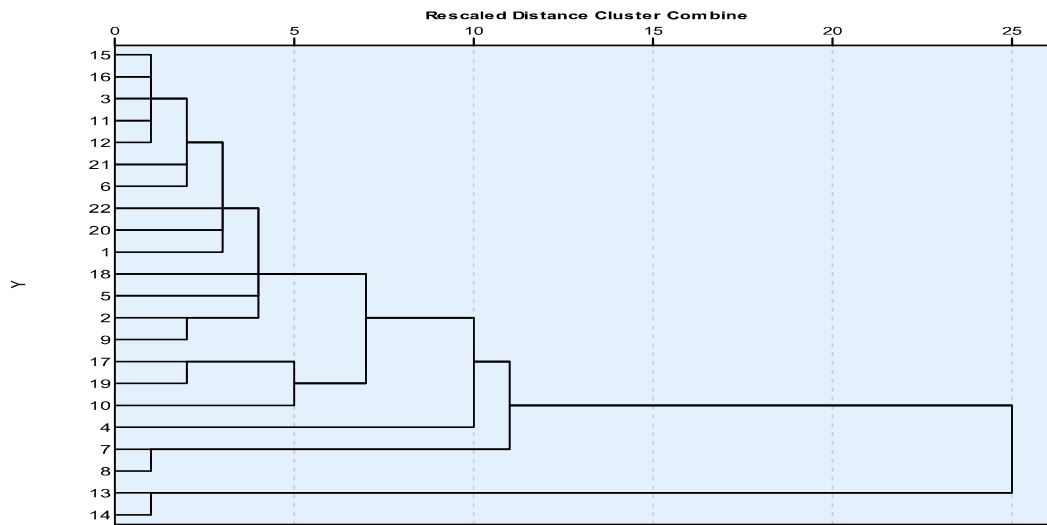
بحث

قارچهای درماتوفیت دارای آنزیم های پروتئولیتیک به نام کراتوکلیناز هستند که این آنزیم سبب هضم کراتین شده و قارچ از این ماده و سایر عناصر جهت تغذیه استفاده می کند. از آن جا که کراتین در مو و ناخن و قسمت شاخی پوست وجود دارد این قارچ ها به این بخش ها حمله کرده و در طبقه شاخی پوست کلنی تشکیل می دهند [۲۳].

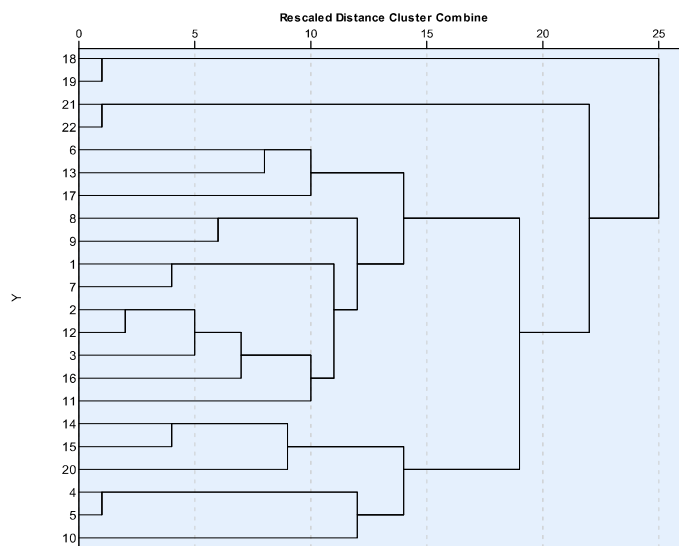
تربینافین که متعلق به خانواده آلیل آمین ها می باشد به

های *ترایکوفایتون روبروم* با پرایمر B، در سطح ۱۰٪ ایزوله ها ۴ گروه را تشکیل دادند. ایزوله های ۱۳ و ۱۴ در گروه اول، ایزوله های ۸و۷ در گروه دوم، ایزوله شماره ۴ در گروه سوم و سایر ایزوله ها (۱۰-۱۹-۱۷-۹-۲-۵-۱۸-۱-۲۰-۲۲-۶-۲۱-۱۲-۱۱-۳-۱۶-۱۵) در گروه چهارم قرار گرفتند. (تصویر شماره ۴-ب)

در دندروگرام الگوهای RAPD به دست آمده از ایزوله های *ترایکوفایتون روبروم* با پرایمر C، ایزوله ها در سطح ۱۵٪، ۴ گروه تشکیل دادند. گروه اول شامل ایزوله های ۱۹و۱۸، گروه دوم شامل ایزوله های ۲۱و۲۲، گروه سوم شامل ایزوله های ۶و۱۳و۱۷و۸و۹و۱و۷و۲و۱۲و۳و۱۶و۱۱ و



تصویر (۴-ب). دندروگرام الگوهای RAPD به دست آمده از ایزوله های *ترایکوفایتون روبروم* با پرایمر B.



تصویر (۴-ج). دندروگرام الگوهای RAPD به دست آمده از ایزوله های *ترایکوفایتون روبروم* با پرایمر C.

طور وسیعی جهت درمان عفونت های درماتوفیتی تجویز می شود. آلایل آمین ها از طریق مهار مراحل اولیه بیوسنتز ارگوسترول، رشد دیواره سلولی قارچ را مهار می کنند که این باعث عدم حفاظت و حمایت از سلول و در نتیجه مرگ سلول می شود. این از هم گسیختگی دیواره قارچ باعث اختلال در عملکرد دیواره قارچی هم می شود. [۲۴]

عواملی مانند عدم نفوذ دارو به بافت های عمقی، عدم تشخیص صحیح عوامل قارچی در آزمایشگاه، عوامل سیستماتیک و پاسخ های میزبان در عدم موفقیت درمان با داروهای ضدقارچی دخیل هستند اما یکی از مهمترین دلایل شکست در درمان بیماری های قارچی پاسخ های متفاوت یا درجه مقاومتی است که قارچ ها به دارو نشان می دهند [۲]. این پایان نامه با هدف یافتن رابطه ای بین الگوی ژنتیکی و حساسیت به داروی تریینافین در ایزوله های کلینیکی *ترایکوفایتون روبروم*، بر روی جدایه های جمع آوری شده از بیماران مبتلا به درماتوفیتوزیس مراجعه کننده به آزمایشگاه قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران و آزمایشگاه های تخصصی قارچ شناسی در تهران در آزمایشگاه تحقیقاتی ارشد میکروبیولوژی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج صورت گرفت.

در سال های اخیر روش های مولکولی به نحو چشمگیری در تشخیص عفونت های قارچی و گونه های آنها مورد استفاده قرار گرفته است [۲۶،۲۵]. میرزاحسینی و همکارانش در سال ۲۰۰۹ عملکرد PCR-RFLP را در سرعت بخشیدن به تشخیص درماتوفیت های پاتوژن مهم کلینیکی مورد بررسی قرار دادند. آنها نتیجه گرفتند محصولات PCR اختصاصی و الگوهای RFLP حاصل از اثر آنزیم های محدودکننده *HaeIII*، *HinfI*، *MvaI* تشخیص سریع ایزوله های درماتوفیتی که ۵-۱۰ روز از کشت آنها می گذرد را در سطح جنس و گونه امکان پذیر می نماید. ژن هدف آنها در این تحقیق روی ناحیه ITS از *tDNA* قرار دارد [۲۷]. در سال ۲۰۱۲ رضائی ماتکلانی با کمک تکنیک RFLP دو تحقیق که بر روی نواحی ITS *tDNA* پایه گذاری شده بود انجام داد. او توانست بین گونه های مختلف درماتوفیتها در ایران تفاوت هایی مشاهده کند و بیان کرد که روشهای مبتنی بر عملکرد و ساختار DNA بیشترین کمک را در تشخیص و نشان دادن قرابت ژنتیکی درماتوفیت ها به ما خواهد کرد [۲۸]. در تحقیق دیگرش با همین تکنیک که ژن های هدف آن (BT2) مسئول در ساخت β -tubulin و (TEF1) مسئول در ساخت فاکتور α -1 بودند، توانست *ترایکوفایتون*

تونسورانس را از *ترایکوفایتون اکوئینیوم* جدا کند [۲۹]. عباس تبار و همکارانش در سال ۲۰۱۴ با به کارگیری اندونوکلئازهای HpyCH4V، Alw21I، MwoI روی ژن مولد β -tubulin اثر می گذاشتند توانستند *ترایکوفایتون روبروم* را از *ترایکوفایتون اینتردیجیتال*، *ترایکوفایتون تونسورانس* و *ترایکوفایتون ویولاستوم* تفکیک کنند [۳۰].

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) که مبتنی بر استفاده از آنزیم DNA پلیمرز می باشد در سال ۱۹۸۵ ابداع و در ۱۹۸۸ به روز رسانی شد. این روش یکی از حساس ترین و اختصاصی ترین تکنیک ها جهت تشخیص قارچ های مهم در پزشکی است [۳۱-۳۳]. برای مثال جکسون و همکارانش در سال ۲۰۰۰ تنوع داخل گونه ای در سویه های *ترایکوفایتون روبروم* را به وسیله گسترش عوامل جزئی تکراری متوالی به نام (TRS-1) از ناحیه فاصله انداز رونویسی نشده ی rDNA به نام (NTS)، توصیف کردند که ۲۱ تپ *TRS-1* PCR در ۱۰۱ ایزوله کلینیکی شناسایی شد [۳۴]. همچنین کامیا و همکارانش در سال ۲۰۰۴، ۱۷ تپ از *TRS-1* PCR در ۲۵۲ ایزوله کلینیکی مشاهده کردند [۳۵]. 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 عفونت های ناخن سویه های مختلفی درگیر هستند [۲].

یکی از انواع روشهای PCR، RAPD-PCR می باشد که تکثیر تصادفی قطعات ژنوم را به همراه دارد. پرایمرها به محل هایی متصل می شوند که بالاترین همولوژی تحت شرایط PCR داده شده به آن ها را دارند. اخیراً این روش برای مطالعات تشخیصی مولکولی برخی میکروارگانیسم ها به کار گرفته شده زیرا این روش می تواند الگوهای متفاوتی ایجاد کند که برای طبقه بندی میکروارگانیسم ها استفاده شوند [۳۶]. نکته ای که باید در مطالعه با استفاده از این روش مورد توجه قرار داد تغییرات غیرحقیقی است که در نتایج رخ می دهد و در اثر اختلافات کوچکی در شرایط واکنش نظیر غلظت DNA الگو، غلظت پرایمر، دماهای مراحل مختلف PCR، غلظت یون منیزیم ایجاد می شود [۱].

مطالعاتی که تا به حال بر روی قارچ *ترایکوفایتون روبروم* و به روش RAPD-PCR صورت گرفته همگی در خصوص

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 مطالعه ای که توسط سانتوس^۶ و همکارانش صورت گرفت و از دو پرایمر فوق استفاده شد، توانایی و شایستگی هر دوی آنها ثابت شد. ۱۹ پروفایل مولکولی برای ایزوله های *ترایکوفایتون روبروم* با این پرایمرها شکل دهی شد [۴۲]. گروه دیگری از محققین در سال ۲۰۱۱ از این دو پرایمر جهت تشخیص ایزوله های کلینیکی *ترایکوفایتون روبروم* به روش RAPD استفاده کردند که پرایمر ۱ نشان داد که تقریباً همه ایزوله ها (۸۷/۳٪) از لحاظ ژنتیکی با یکدیگر مرتبط اند [۴۳].

در این مطالعه ابتدا حساسیت یا مقاومت ایزوله ها در برابر داروی ترینافین تعیین شد. ایزوله هایی که در غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر از دارو رشد نکردند و در غلظت ۰/۰۵ میکروگرم در میلی لیتر از دارو نیز مقدار درصد کاهش رشد آنها در مقایسه با پلیت شاهد پس از انجام محاسبات بیشتر از ۶۰٪ بود ایزوله های حساسی بودند که در غلظت های ۰/۰۱ و ۰/۰۰۵ میکروگرم در میلی لیتر از دارو نیز رشد آن ها محدود شد. اما ایزوله های مقاوم در غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر از دارو رشد کردند و در غلظت های پایین تر دارو نیز از خود مقاومت قابل ملاحظه ای 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 و با هر ۳ پرایمر تفاوت هایی در الگوی ژنتیکی نمونه های حساس و مقاوم دیده شد. در مقایسه نمونه های حساس و مقاوم هیچ بانندی که ۱۰۰٪ اختصاصیت را نشان دهد، دیده نشد. با پرایمر A الگوی مولکولی جدایه های ۲۰ و ۲۱ کاملاً یکسان بود و الگوی مولکولی جدایه های ۱۳ و ۱۴ و ۱۵ مشابه یکدیگر بود ولی یکسان نبود. با پرایمر B الگوی تکثیر یافته جدایه های شماره ۷ و ۸ با یکدیگر یکسان بود و هم چنین الگوی تکثیر یافته جدایه های شماره ۱۳ و ۱۴ یکسان بود. با پرایمر C الگوی تکثیر یافته جدایه های شماره ۴ و ۵ با یکدیگر و الگوی تکثیر یافته جدایه های شماره ۱۸ و ۱۹ با یکدیگر یکسان بود. هم چنین الگوی تکثیر یافته جدایه های شماره ۲۱ و ۲۲ شبیه

بررسی الگوی مولکولی *ترایکوفایتون روبروم* و مقایسه آن با الگوی مولکولی سایر *درماتوفیت* ها بوده است. لیو^۱ و همکارانش، توسط تکنیک RAPD گونه های *ترایکوفایتون روبروم*، *ترایکوفایتون تونسرانس* و *ترایکوفایتون منتاگروفیتس* را از یکدیگر مجزا کردند، آنها گزارش کردند که هیچ اختلافی بین ۸ ایزوله *ترایکوفایتون روبروم* مورد مطالعه خود مشاهده نکردند [۷]. در مطالعه ای دیگر آنها با استفاده از دو پرایمر به سادگی سه قارچ *اییدرموفایتون فلوکوزوم*، *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* و *اریته انسان گرا* و *ترایکوفایتون روبروم* را از یکدیگر تفکیک دادند. بر طبق این مطالعه نتایجی که از تکنیک RAPD حاصل می شود تعارضی با نتایج آنالیز mtDNA RFLP ندارد [۳۸،۳۷]. ماکیزوکی^۲ و همکارانش طی تحقیقی بر روی چندین گونه از *درماتوفیت* های انسانی از قبیل *ترایکوفایتون روبروم*، *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* و *اریته انسان دوست* و *اییدرموفایتون فلوکوزوم* با استفاده از روش RAPD-PCR و توسط ۵ پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی توانستند به طور واضح گونه ها را از هم تفکیک نمایند، آن ها نتیجه گرفتند که گونه های انسان دوست *درماتوفیتی* به طور واضح توسط RAPD-PCR از هم قابل تشخیص اند [۳۹]. فاجی^۳ و همکارانش توانستند روش RAPD-PCR را برای تشخیص گونه های مختلف *درماتوفیت* ها به کار برند. آنها روش RAPD-PCR را با استفاده از پرایمر (GACA) ۴ به عنوان روش مناسب تشخیص *درماتوفیت* ها معرفی کردند [۴۰]. ژانگ^۴ و همکارانش، ۳۰ ایزوله *ترایکوفایتون روبروم* را با روش RAPD مطالعه کردند، آنها ۲۲ ایزوله را تمیز ندادند و ۸ ایزوله را با تفاوت های ناچیز یافتند [۴۱]. بائزا^۵ و همکارانش، در طی تحقیقی توسط ۶ پرایمر مختلف (شامل پرایمرهای C و B 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 گونه ای 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

¹ Liu

² Mochizuki

³ Faggi

⁴ Zhang

⁵ Baeza

⁶ Santose

به یکدیگر بود ولی در جدایه شماره ۲۲ باند ۶۱۰ bp وجود داشت که جدایه شماره ۲۱ فاقد آن بود.

مناسب دارو توسط پزشک، کمک شایان توجهی به بیمارانی که از این عفونتها رنج می برند خواهد شد.

نتیجه گیری

اگر از پرایمرهای متفاوت دیگری و ایزوله های *تریکوفایتون* روبروم بیشتری استفاده شود، نه تنها می توان امیدوار بود که روش RAPD جهت انگشت نگاری ژنتیکی (fingerprinting) ایزوله های مختلف *تریکوفایتون* روبروم به کار گرفته شود، بلکه این امید وجود دارد که بتوان بین الگوی ژنتیکی ایزوله های حساس و مقاوم به ترینافین تفاوت های مهم و مشخصی یافت. بدین ترتیب با تعیین به هنگام میزان مقاومت ایزوله ی مولد عفونت به دارو و تجویز دز

تشکر و قدردانی

از آقای امیر بختیاری کارشناس ارشد آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد کرج که در مراحل انجام پروژه هماهنگی های لازم را مبذول داشتند، سپاسگزار می کنم. همچنین از اعضای محترم آزمایشگاه فارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران که در مرحله جمع آوری نمونه ها به اینجانب عنایت داشته اند تشکر می نمایم.

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. JMM. 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. AAC. 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- Evans EG. Causative pathogens in onychomycosis and the possibility of treatment resistance. J Am Acad Dermatol. 1988 Dec; 39(5): 32-38.
- 6- Roberts DT, Evans EG. Subfungal dermatophytoma complicating dermatophyte onychomycosis. Br J Dermatol. 1998 Apr; 138(1): 189-203.
- 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, Kuijoers 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. Armaghani 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*. ISAC. 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 MA. The effect of dimethylsulfoxide (DMSO) on the growth of dermatophytes. *Jpn J Med Mycol.* 2006 Jul; 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- Pranab M, Leidich S. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to Terbinafine. *AAC.* 2003 Jan; 47(1): 82-86.
- 25- 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.
- 26- 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.
- 27- 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.
- 28- 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.
- 29- 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 α -tubulin and translation elongation factor 1 α sequencing. *Med Mycol.* 2012 Oct; 50(7): 760-4.
- 30- Abastabar M, Mirhendi H, Rezaei-Matehkolaei A, Shidfar MR, Kordbacheh P, Makimura K. Restriction analysis of α -Tubulin gene for differentiation of the common pathogenic dermatophytes. *J Clin Lab Anal.* 2014 Jan; 45(2): 204-20.
- 31- 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.
- 32- Renhsueh PO, Jeneteg LE. Molecular evidence for strain dissemination of *Penicillium marneffeii*. *J Infect Dis.* 2000 Jul; 181(1): 1706-12.

- 33- Rath PM, Marggraf G. Use of phenotypic and genotypic finger printing methods in the strain identification *Aspergillus fumigates*. Mycoses. 1995 Nov; 38(1): 429-34.
- 34- 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.
- 35- 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.
- 36- Ajello L, Hay RJ. *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*: genetic diversity among species and strains. Med Mycol. 1998 Dec; 24(1): 133-57.
- 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, pini G. 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-Gwozdz 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.