

کاربرد PCR در تشخیص اختصاصی فوزاریوم سولانی بیماران HIV مثبت

آتوسا فردوسی*^۱، دکتر محمدحسن شاه حسینی^۲، دکتر منصور بیات^۳، دکتر سیدجمال هاشمی^۴، دکتر محمد قهری^۵

۱- دانشجوی دکتری رشته قارچ شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه پاتوبیولوژی، تهران. ۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس و مؤسسه ایرانیان زن فن آور (IGF)، اشرافی اصفهانی، تهران. ۳- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران. ۴- استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه تهران. ۵- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم و مهندسی، دانشگاه امام حسین (ع).

چکیده

زمینه و هدف: فوزاریوم سولانی به عنوان شایع ترین گونه فوزاریوم عامل فانگمی و فوزاریوزیس منتشره شناخته می شود که در میزان دچار نقص سیستم ایمنی با میزان مرگ و میری در حدود ۱۰۰ درصد همراه است. به علت مقاومت گونه های فوزاریوم در برابر داروهای ضدقارچی، شناسایی سریع و دقیق آنها برای کنترل تبعات عفونت امری ضروری است. این مطالعه به منظور تعیین کاربرد روش تشخیصی PCR برای شناسایی دقیق و سریع فوزاریوم سولانی در سرم بیماران HIV مثبت انجام شد. **روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی تست PCR بر اساس ژن هدف سیتوکروم *b* میتوکندریایی با محصول *bp* ۳۳۰ اپتیمایز گردید. پس از بررسی حساسیت و ویژگی، آزمون با سوش استاندارد PTCC 5284 و ده سوش معتبر متعلق به دانشگاه تهران، روش PCR روی ۴۵ نمونه سرم بیماران HIV مثبت انجام شد. **یافته ها:** در تست PCR اپتیمایز شده محصول *bp* ۳۳۰ تکثیر گردید. حساسیت تست در حد یک نسخه از DNA فوزاریوم سولانی و اختصاصی بودن تست ۱۰۰٪ است. از ۴۵ نمونه سرم مورد بررسی ۹ مورد (۲۰٪ درصد) مثبت گردید. **نتیجه گیری:** تست PCR برای تشخیص بالینی مستقیم، سریع و اختصاصی فوزاریوم سولانی در سرم بیماران HIV مثبت قابلیت کاربردی دارد.

کلید واژه ها: فوزاریوم سولانی، ژن سیتوکروم *b* میتوکندریایی، HIV، PCR

* نویسنده مسؤول: آتوسا فردوسی، پست الکترونیکی atousaferdousiir@yahoo.com

نشانی: تهران، اشرافی اصفهانی، ۳۰ متر بالاتر از پل نیایش، سمت چپ، کوچه پنجم، پلاک ۸، طبقه چهارم، واحد ۷، مؤسسه ایرانیان زن فن آور
کد پستی ۱۴۷۷۶۹۴۵۸۸، تلفن ۰۲۱-۴۴۸۴۹۴۶، شماره ۴۴۸۶۱۸۸۹
وصول مقاله ۹۲/۷/۲۸، اصلاح نهایی ۹۲/۱۱/۸، پذیرش مقاله ۹۲/۱۱/۲۳

مقدمه

در حال حاضر فوزاریوزیس در جایگاه دومین عامل شایع عفونت های قارچی مهاجم و منتشره قرار دارد (۱-۴). فوزاریوم سولانی با بیشترین میزان ویرولانس، شایع ترین گونه این جنس محسوب می شود که عامل بیش از ۵۰ درصد عفونت های منتشره در انسان بوده و با میزان مرگ و میری در حدود ۱۰۰ درصد همراه است (۱ و ۳ و ۵ و ۶). برخلاف سایر گروه های دارای نقص سیستم ایمنی، بنا به دلیل نامشخصی، عفونت فوزاریوزیس در جمعیت بیماران HIV مثبت همواره و حتی تا سال های اخیر به عنوان یک عفونت نادر و کمیاب در نظر بوده است (۷ و ۲) و به دلیل محدودیت روش های تشخیصی، شیوع دقیق و تعداد موارد بروز این عفونت ها کاملاً مشخص نیست.

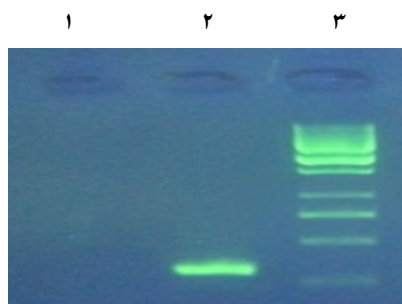
تشخیص به موقع فوزاریوزیس بسیار حیاتی است؛ زیرا به علت مقاومت کلی این گونه ها در برابر داروهای آنتی فانگال در مواردی نیاز به درمان های ترکیبی و توأم است (۸ و ۲). کاربرد روش های تشخیصی سنتی و مرسوم از لحاظ سرعت و دقت عمل، دارای محدودیت بسیار است؛ اما روش های مولکولی نظیر روش گلدان استاندارد PCR به نسبت روش های مرسوم، از مزایای بیشتری برخوردار است و تاکنون بسیاری از گونه های قارچی را با این روش شناسایی کرده اند (۹-۱۱). این مطالعه به منظور تعیین کاربرد روش تشخیصی PCR برای شناسایی دقیق و سریع فوزاریوم سولانی در سرم بیماران HIV مثبت انجام شد.

(۷ و ۳).

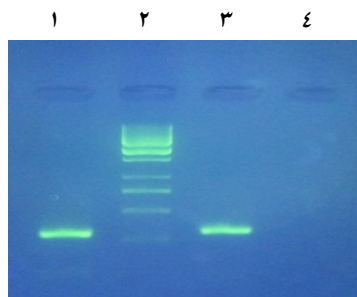
غیرفعال شدند. سپس با کمک کیت (DNG-plus™)، DNA از سرم بیماران استخراج گردید و تست PCR انجام شد.

یافته‌ها

محصول PCR بهینه‌سازی شده با DNA استخراج شده از سوش استاندارد بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد لود شد. اندازه قطعه حاصله با استفاده از پرایمرهای ویژه ۳۳۰ bp بود (شکل یک - الف ۳). محصول PCR در پلاسمید pTZ57/R کلون شد. پس از جداسازی تک کلنی‌های سفید، DNA از آنها استخراج گردید و به وسیله روش PCR تایید شد (شکل یک - ب ۳). همچنین نتایج تست PCR با ده سوش متعلق به کلکسیون دانشگاه تهران نیز مورد تایید قرار گرفت.



الف) الکتروفورز محصول واکنش PCR بهینه شده (۱) کنترل منفی، (۲) قطعه تکثیر شده ۳۳۰ bp (۳) اندازه مارکر ترموسایتیفیک 1Kb DNA Ladder



ب) الکتروفورز محصول کلون شده (۱) کنترل منفی، (۲) قطعه تکثیر شده ۳۳۰ bp (۳) اندازه مارکر ترموسایتیفیک 1Kb DNA Ladder، (۴) قطعه تکثیر یافته از پلاسمید شکل ۱: الکتروفورز محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

با هدف بهینه‌سازی، تعداد سیکل‌ها از ۳۰ به ۳۵ سیکل افزایش یافت. این امر مدت زمان کوتاهی در حدود ۲۰ دقیقه به زمان انجام تست اضافه نمود که این افزایش زمانی از لحاظ بالینی بازدارنده نبود. دمای دناتوراسیون اولیه و دناتوراسیون سیکل‌ها از ۹۵ به ۹۴ درجه سانتی‌گراد کم شد و میزان مصرف dNTP کاهش یافت. میزان مصرف آنزیم کاهش یافت که ضمن به حداقل رساندن مواد مصرفی، با پروتکل بهینه‌سازی شده ویژگی تست ۱۰۰ درصد تعیین گردید. به نحوی که فقط با DNA فوزاریوم سولانی واکنش داد و میزان حساسیت آن به حد یک نسخه از ژنوم ارگانسیم افزایش

روش بررسی

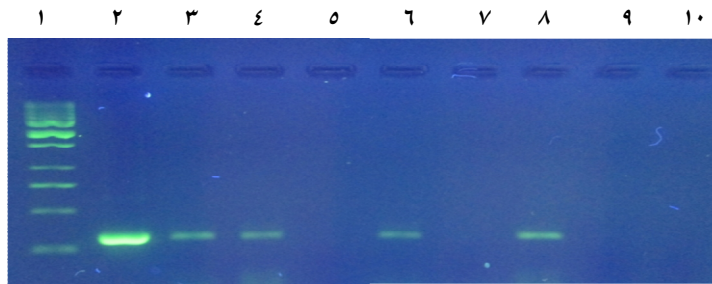
این مطالعه توصیفی روی ۴۵ نمونه سرم بیماران HIV مثبت تهیه شده از انستیتو پاستور ایران (۳۵ نمونه) و مرکز تحقیقات ایدز بیمارستان امام خمینی (ره) تهران (۱۰ نمونه) در سال‌های ۹۲-۱۳۹۰ انجام شد.

با روش جوشاندن و متعاقب آن کاربرد روش DNG-plus از سوش استاندارد فوزاریوم سولانی متعلق به کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران PTCC NO.5284 (واجد شماره کلکسیون UMAH 7419 DNA) استخراج گردید. روش PCR با ژن هدف mitochondrial cytochrome b و دو پرایمر اختصاصی گونه فوزاریوم سولانی به نام‌های f-fuso1 با مترادف 5'-TGG TAC TAT AGC TGG AGG A-3' با مترادف 5'-CTC TGT TAA TAA TGC AAC TC-3' با مترادف 5'-TGG TAC TAT AGC TGG AGG A-3' با محصول ۳۳۰ bp (۱۲) بر روی این سوش و ده سوش تاییدی دیگر که از کلکسیون دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شده بود؛ انجام گردید. این واکنش با شرایط ۵ میکرولیتر DNA استخراجی از نمونه، ۲/۵ میکرولیتر از 10x PCR Buffer، یک میکرولیتر از هر کدام از دو پرایمر جلوبی و عقبی ۱۰mM، ۰/۷۵ میکرولیتر از ۵۰mM MgCl₂، ۰/۵ میکرولیتر از 10mM dNTP، ۰/۴ میکرولیتر از 5u/μl Taq DNA polymerase، با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بهینه گردید.

پروتکل دمایی به صورت دناتوراسیون اولیه ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، دناتوراسیون سیکل‌ها یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، دمای چسبیدن یک دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، دو دقیقه مرحله پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، پلیمریزاسیون نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد با تعداد ۳۵ سیکل بود.

به منظور حفظ و افزایش وضوح باندهای رویت شده، سرعت، حساسیت و دقت تست، تغییراتی با قصد بهینه‌سازی در زمان، دما و میزان مواد مصرفی به ویژه آنزیم و dNTPs انجام شد. محصول واکنش در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی سایر گرین (سینا کلون MR7730C Cat.No.:) در بافر x 0/5 TBE الکتروفورز گردید و بعد از خالص‌سازی محصول PCR با استفاده از کیت T/A cloning ترموسایتیفیک (cat:K1214) در وکتور pTZ57/R کلون گردید.

به منظور بررسی حساسیت تست، رقت‌های مختلف DNA قارچ، از یک میلیون کپی DNA (غلظت 10⁻¹) تا یک کپی DNA (غلظت 10⁻⁶) تهیه گردید و برای بررسی ویژگی تست از DNA های HSV، و سایر قارچ‌های گونه فوزاریوم به جز سولانی استفاده شد. برای رعایت موارد ایمنی، در ابتدا نمونه‌ها توسط حرارت



شکل ۲: کاربرد تست PCR بهینه سازی شده بر روی سرم بیماران (۱) اندازه مارکر فرمنتاس 1 Kb DNA Ladder-PLUs (۲) کنترل مثبت، (۳) و (۴) نمونه‌های مثبت (۵) نمونه منفی، (۶) نمونه مثبت، (۷) نمونه منفی، (۸) نمونه مثبت، (۹) نمونه منفی، (۱۰) کنترل منفی

در همین رابطه نتایج مطالعات گوناگون نشان داده که با انجام اقدامات درمانی مناسب نظیر استفاده از درمان‌های ترکیبی، طول عمر بیمار افزایش می‌یابد (۱۶-۱۳).

با توجه به احتمال مرگ تقریباً حتمی بیمار در اثر عفونت با فوزاریوم سولانی، به نظر می‌رسد تست PCR به کار رفته در این مطالعه، برای تشخیص سریع ارگانسیم قبل از پیشرفت عفونت بسیار مناسب است. از دیگر گروه‌های در معرض خطر بالای این عفونت می‌توان به بیماران دچار بدخیمی‌های خونی و افراد دریافت کننده عضو پیوندی اشاره نمود. پیشنهاد می‌شود این روش در خصوص تشخیص و بررسی احتمال حضور ارگانسیم در این بیماران نیز مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که روش PCR برای ردیابی مستقیم حضور ارگانسیم در سرم بیماران HIV مثبت، در اسرع وقت و قبل از پیشروی عفونت، دارای قابلیت کاربردی و تشخیصی است. همچنین با توجه به تعداد موارد مثبت حضور ارگانسیم در سرم، احتمال بالقوه بروز عفونت در این گروه چندان نادر نیست. زیرا با پیشرفت بیماری اصلی و کاهش چشمگیر تی سل‌ها، عامل زمینه‌ساز برای بروز عفونت منتشره و تهدید حیات بیمار مهیا می‌گردد که با تشخیص زودهنگام می‌توان از بروز آن پیشگیری نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم آتوسا فردوسی برای اخذ درجه دکتری در رشته قارچ‌شناسی از دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران بود. بدین وسیله از خانم دکتر شهلا رودبارمحمدی و آقایان دکتر سعید بیان‌الحق، دکتر محمدجواد نجف‌زاده، دکتر علیرضا خسروی و دکتر علی رضایی به خاطر همکاری در تهیه نمونه‌ها، صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌نمایم.

یافت. به طوری که تا آخرین تیتراژ رقت تهیه شده (رقت 10^{-6} معادل یک کپی از DNA فوزاریوم سولانی) همچنان باند ۳۳۰ bp محصول رویت شد.

با انجام آزمایش بر روی سرم بیماران، در میان ۴۵ نمونه، ۹ مورد (۲۰ درصد) از نظر حضور فوزاریوم سولانی در نمونه مثبت بودند و باند ۳۳۰ bp محصول PCR در این نمونه‌ها رویت گردید (شکل ۲).

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه با استفاده از روش PCR برای ردیابی مستقیم، ۲۰ درصد از نمونه‌های مورد بررسی از نظر فوزاریوم سولانی مثبت بودند. اثبات وجود فوزاریوم در سرم، لزوماً به معنی بروز عفونت و بیماری نیست؛ اما این امر احتمال بالقوه بروز عفونت را افزایش می‌دهد. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۵ از میان ۲۹۴ بیمار مبتلا به ایدز تنها دو مورد فوزاریوزیس منتشره شناسایی گردید (۲) در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۳ یک گزارش مورد از عفونت سیستمیک کشنده ناشی از فوزاریوم سولانی در یک بیمار مبتلا به ویروس ایدز منتشر شد. به طوری که بیمار معرفی شده هیچگونه سابقه‌ای از نوتروپنی نداشت (۵).

نوتروپنی و نقص تی سل دو عامل خطر اصلی برای عفونت‌های منتشره قارچی به حساب می‌آیند. در گزارش مورد مذکور چنین عنوان شده که شاید فقدان نوتروپنی و ضعیف بودن میزان نقص تی سل در ابتدای بیماری، دلیل نادر بودن موارد عفونت فوزاریوزیس منتشره در بیماران HIV مثبت باشد (۲ و ۵). بایستی در نظر داشت که این ارگانسیم به راحتی می‌تواند وارد بدن میزبان شده و به علت نقص و محدودیت روش‌های تشخیصی حضور آن در مراحل اولیه مشهود نیست. در واقع به علت محدودیت روش‌های شناسایی، آزمایشگاه و کارکنان تشخیصی در بسیاری موارد از حضور ارگانسیم در بدن بیمار آگاه نیستند و به همین دلیل میزان شیوع واقعی این نوع عفونت‌ها کاملاً روشن نیست. واضح است که تشخیص به هنگام برای کنترل تبعات عفونت بسیار ضروری است.

References

1. Jain PK, Gupta VK, Misra AK, Gaur R, Bajpai V, Issar S. Current Status of Fusarium Infection in Human and Animal. *Asian J Anim Vet Adv.* 2011; 6:201-7.
2. Nucci M, Anaissie E. Fusarium infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Oct; 20(4):695-704.
3. Lodato F, Tamé MR, Montagnani M, Sambri V, Liguori G, Azzaroli F, et al. Systemic fungemia and hepatic localizations of *Fusarium solani* in a liver transplanted patient: An emerging fungal agent. *Liver Transplantation.* 2006 Nov; 12(11): 1711-14.
4. Guarro J, Nucci M, Akiti T, Gené J, Barreiro MDGC, Gonçalves RT. Fungemia Due to *Fusarium sacchari* in an Immunosuppressed Patient. *J Clin Microbiol.* 2000 Jan; 38(1): 419-21.
5. Esnakula AK, Summers I, Naab TJ. Fatal Disseminated *Fusarium* Infection in a Human Immunodeficiency Virus Positive Patient. *Case Reports in Infectious Diseases.* 2013; Article ID 379320, 5 pages.
6. Galimberti R, Torre AC, Baztán MC, Rodriguez-Chiappetta F. Emerging systemic fungal infections. *Clin Dermatol.* 2012 Nov-Dec;30(6):633-50.
7. Azor M, Gene J, Cano J, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, et al. In Vitro Antifungal Susceptibility and Molecular Characterization of Clinical Isolates of *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) and *Fusarium thapsinum*. *Antimicrob Agents Chemother.* Jun 2008; 52(6): 2228-31.
8. He D, Hao J, Zhang B, Yang Y, Song W, Zhang Y, et al. Pathogenic spectrum of fungal keratitis and specific identification of *Fusarium solani*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Apr; 52(5):2804-8.
9. Atkins SD, Clark IM. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J Appl Genet.* 2004;45(1):3-15.
10. Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, Johnson EM. Molecular identification of pathogenic fungi. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Jan; 61 Suppl 1:i7-12.
11. White PL, Perry MD, Barnes RA. An update on the molecular diagnosis of invasive fungal disease. *FEMS Microbiol Lett.* 2009 Jul; 296(1):1-10.
12. O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Sarver BA, Balajee SA, Schroers HJ, et al. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *J Clin Microbiol.* 2010 Oct;48(10):3708-18.
13. Muhammed M, Coleman JJ, Carneiro HA, Mylonakis E. The challenge of managing fusariosis. *Virulence.* 2011 Mar-Apr; 2(2):91-6.
14. Perfect JR. The impact of the host on fungal infections. *American Journal of Medicine.* 2012 Jan; 125(1):S39-S51.
15. Ho DY, Lee JD, Rosso F, Montoya JG. Treating disseminated fusariosis: amphotericin B, voriconazole or both? *Mycoses.* 2007 May; 50(3):227-31.
16. Vagace JM, Sanz-Rodriguez C, Casado MS, Alonso N, Garcia-Dominguez M, de la Llana FG, et al. Resolution of disseminated fusariosis in a child with acute leukemia treated with combined antifungal therapy: a case report. *BMC Infect Dis.* 2007;7:40.

Original Paper

Application of PCR method in specific identification of *Fusarium solani* in HIV positive patients

Ferdousi A (M.Sc)*¹, Shahhosseiny MH (Ph.D)²
Bayat M (Ph.D)³, Hashemi SJ (Ph.D)⁴, Ghahri M (Ph.D)⁵

¹Ph.D Candidate in Mycology, Department of Pathobiology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran. ²Associate Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shahre Qods Branch, Shahre Qods, Iran and Iranian Gene Fanavar (IGF) Institute, Ashrafi Esfehiani, Tehran, Iran. ³Associate Professor, Department of Pathobiology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran. ⁴Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Public Health and Institute of Public Health Researches, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ⁵Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: *Fusarium solani* is the common etiological agent of fungemia and disseminated fusariosis, which is associated with high incidence of mortality in immune-compromised host. Due to high level of resistance of antifungals in *Fusarium solani*, rapid and specific identification of organism is essential. This study was done to evaluate the PCR method for rapid and specific diagnosis of *Fusarium solani* in serum samples of HIV positive patients.

Methods: In this descriptive study, the PCR test based on mitochondrial cytochrome b gene as the target gene with 330 bp product was optimized. PCR was applied on 45 serum samples of HIV positive patients after evaluation of sensitivity and specificity of the test.

Results: In the optimized PCR test, the 330 bp product was amplified. The sensitivity of the test was a copy of *Fusarium solani* genome, and its specificity was 100%. Among 45 serum samples, 9 cases (20%) were positive for *Fusarium solani*.

Conclusion: The PCR method has functional capabilities for direct, rapid and specific clinical diagnosis of *Fusarium solani* in HIV positive patients.

Keywords: *Fusarium solani*, Mitochondrial cytochrome b gene, HIV, PCR

* **Corresponding Author:** Ferdousi A (M.Sc), E-mail: atousaferdousiir@yahoo.com

Received 20 Oct 2013

Revised 28 Jan 2014

Accepted 12 Feb 2014