شناسایی گونه‌های آسپرژیلوسی با کاربرد تک آنزیم محدودساز MwoI در روش RFLP مبتنی بر آمپلیفیکاسیون ناحیه ژنی rDNA

کامبیز دیبا[1]، سیدحسین میرهندی[2]، پریوش کردبچه[2]، زهره خورشیدوند[3]

۱- دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳- کارشناس ارشد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.

یافته / دوره پانزدهم / شماره ۴ / پاییز ۹۲ / مسلسل ۵۷

چکیده

دریافت مقاله: ۹۲/۴/۱۰ ، پذیرش مقاله: ۹۲/۶/۱۹

مقدمه: گونه‌های آسپرژیلوس بعضاً با بیماریهای انسان مرتبط هستند. یافتن یک روش دقیق و سریع برای شناسایی این قارچها اهمیت ویژه‌ای دارد و می‌تواند در غربالگری بیماری و اهداف اپیدمیولوژیک مؤثر باشد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های ما شامل گونه‌های مختلف آسپرژیلوسی از نمونه‌های بالینی و محیطی چهار بیمارستان آموزشی بودند. آسپرژیلوس‌ها ابتدا با روش مورفولوژیک شناسایی شدند. توده‌های میسلیومی آسپرژیلوسی از کشت‌های سابورود براث استخراج شده برای استخراج DNA به روش فنل کلروفرم- گلاسبید مورد استفاده قرار گرفتند. آمپلیفیکاسیون ژن rDNA با استفاده از پرایمرهای یونیورسال ناحیه ITS انجام شد و محصولات واکنش زنجیره‌ای قابل هضم با آنزیم محدودساز MwoI با استفاده از روش PCR-RFLP مورد تفکیک قرار گرفتند.

یافته‌ها: ما موفق به شناسایی هشت گونه مهم آسپرژیلوس شامل: آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس ترئوس، آسپرژیلوس کلاواتوس، آسپرژیلوس اکراسئوس، آسپرژیلوس آمستلوئیدامی و آسپرژیلوس نیدولانس با کاربرد روش مولکولی آزمون شدیم. شناسایی و افتراق مهمترین گونه‌های آسپرژیلوس بدست آمده از کشت کوتاه مدت ۳۶ ساعته و استفاده از پروفایل معرفی شده شامل استخراج DNA ، PCR و هضم آنزیمی برای تقریباً تمام نمونه‌های آزمون شده زمانی در حدود یک روز کاری نیاز داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: روش PCR-RFLP مبتنی بر ژن DNA ریبوزومی، برای تعیین گونه‌های آسپرژیلوسی مورد استفاده قرار گرفت. کاربرد آنزیم محدودساز MwoI ما را قادر نمود که بیشترین افتراق را در بین گونه‌های آسپرژیلوسی ایجاد نماییم و گونه‌های مهم آسپرژیلوسی را در مدت زمان کوتاهی شناسایی کنیم.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوس، آمپلیفیکاسیون، آنزیم محدودساز.

آدرس مکاتبه: ارومیه، .کیلومتر ۱۱ جاده سرو، دانشکده علوم پزشکی ارومیه، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

پست الکترونیک: kambiz37diba@gmail.com

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

مقدمه

برخی از گونه‌های جنس آسپرژیلوس با بیماری‌های انسانی از جمله بیماری برونکوپولمونری آلرژیک، کراتیت قارچی، عفونت قارچی گوش، سینوزیت‌های بینی و همچنین عفونت‌های مهاجم ریه مرتبط هستند (۱). اگرچه آسپرژیلوس فومیگاتوس به عنوان مهمترین عامل آسپرژیلوزیس مهاجم مطرح است، اما حداقل ۳۰ گونه دیگر نیز با بیماری‌های انسان در ارتباطند که می‌توان از مهمترین این عوامل، گونه‌های آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس، آسپرژیلوس نیدولانس، آسپرژیلوس یوستوس و آسپرژیلوس ورسی‌کالر را ذکر کرد (۲).

در عین حال بین گونه‌های بیماریزای آسپرژیلوس، تفاوت هایی از نظر پاسخ به درمان‌های ضد قارچی وجود دارد، در برخی مؤسسات آسپرژیلوس ترئوس به لحاظ این‌که به داروهای ضد قارچی حساسیت کمتری نشان می‌دهد اهمیت ویژه‌ای یافته است. چنان‌که در مقایسه با آسپرژیلوس فومیگاتوس به داروی آمفوتریسین B حساسیت کمتری نشان می‌دهد. همچنین آسپرژیلوس نیدولانس در مقایسه با آسپرژیلوس فومیگاتوس از حساسیت کمتری برخوردار است و به همین ترتیب آسپرژیلوس یوستوس با وجود این‌که یک عامل نادر عفونت مهاجم تلقی می گردد در عین حال مقاومت بیشتری در مقایسه با آسپرژیلوس فومیگاتوس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ضد قارچی از جمله وریکونازول نشان می‌دهد (۳).

با این اوصاف، یافتن یک روش صحیح، دقیق و به موقع برای تشخیص و شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس در نمونه‌های بالینی اهمیت ویژه‌ای می‌یابد، و می‌تواند در پایش و غربالگری بیماری و اهداف اپیدمیولوژیک مؤثر باشد. روش‌های سنتی و رایج در شناسایی آسپرژیلوس‌ها بررسی مورفولوژیک ماکروسکوپی و میکروسکوپی می‌باشند. این روش‌ها ارزان قیمت بوده و تنها نیازمند امکانات کشت، مشاهده و بررسی میکروسکوپی است (۴). اما در عین حال روش‌های کلاسیک از نقایصی نظیر زمانبری طولانی از سه روز تا چند هفته، ضرورت نیروهای متخصص با تجربه و دقت پایین رنج می‌برند. از طرفی کشت‌ها همیشه به اسپورزایی منتهی نمی‌گردند و اشتباهات متعددی که در شناسایی با این روش‌ها رخ می‌دهند.

اخیراً روش‌های مولکولی با دقت و سهولت انجام و حساسیت بالا برای تشخیص و شناسایی عوامل قارچی پاتوژن از جمله گونه‌های آسپرژیلوس مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۵). یکی از این روش‌ها (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ترکیب با روش پلی مورفیسم طول قطعه محدود شده (PCR-RFLP) می‌باشد (۶). مطالعه حاضر به کاربرد روش PCR-RFLP با کاربرد آنزیم محدود ساز MwoI به صورت تکی با توانایی افتراق بین هشت گونه آسپرژیلوس می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

مطالعات مورفولوژیک

سویه‌های شناسنامه‌دار جهانی از ۳۰ گونه آسپرژیلوس عامل بیماری‌های انسان از کلکسیون کشت‌های میکروبی ژاپن[1] به دست آمدند، و سویه‌های اصلی ما که از نمونه‌های بالینی ارجاعی به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران و نیز از کشت‌های مثبت بیماران بستری در چهار بیمارستان آموزشی در تهران، اصفهان و کرمانشاه و از نمونه‌های محیطی این بیمارستان‌ها به‌دست آمدند. تمامی نمونه‌های به‌دست آمده محیطی (بیمارستانی) و بالینی، در محیط کشت پایه سابورود دکستروز آگار ۴٪ تلقیح گردیده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند تا این‌که اسپورولاسیون کامل ظاهر گردید. از هر کشت به‌دست آمده متعلق به هر سویه آسپرژیلوسی یک سوسپانسیون تلقیحی شامل بخش اسپورزای کشت در محیط تلقیحی حاوی ۲٪ آگار باکتریولوژیک و ۰/۵٪

1. Japanese Collection for Microorganisms

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

توئین ۸۰ تهیه شده، یک حجم کوچک از آن به محیط‌های کشت افتراقی چهارگانه انتقال یافت.

تمامی ایزوله‌های آسپرژیلوسی با استفاده از خصوصیات مورفولوژیک میکروسکوپی و ماکروسکوپی و با کمک کلیدهای شناسایی رفرانس از جمله میزان رشد، ویژگی‌های ماکروسکوپی کلنی (شکل، رنگ، بافت، توپوگرافی و غیره) و نیز ویژگی‌های میکروسکوپی کلنی (رئوس کونیدیایی[1]، طول و قطر کونیدیوفور، شکل و اندازه وزیکول‌ها، شکل و اندازه فیالیدها، یک ردیفی یا دو ردیفی بودن فیالیدها و شکل و اندازه کونیدی‌ها) و سایر ویژگی‌های میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند (۷).

نمونه‌هایی از کلنی‌های آسپرژیلوسی اعم از سویه‌های مربوط به کلکسیون و ایزوله‌های جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی و محیط، محیط کشت عصاره سیب زمینی (۲۰٪)، دکستروز (۲٪) و آگار (۱/۵٪)[2] کشت داده شد و پس از ۷ روز انکوباسیون در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌ها از لحاظ ویژگی‌های ماکروسکوپی کلنی و نیز ویژگی‌های میکروسکوپی کلنی مورد بررسی قرار گرفتند (۸).

مطالعات مولکولی

الف) کشت و استخراج DNA

کشت‌های براث با تلقیح یک نیدل از کشت ۷ روزه در SGA ۴٪ به پنجاه میلی لیتر از محیط SG ۴٪ broth در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری تهیه گردید. سپس در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بر روی یک سطح متحرک به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت، جمع‌آوری هایفی قارچ پس از این مدت با استفاده از فیلترهای میلی‌پور(۰/۴۵µm) و شستشو با بافر Tris-EDTA و نیز آب مقطر دو بار تقطیر استریل انجام شد (۹).

توده‌های میسلیومی به‌نام Matt به لوله‌های استریل منتقل گردیده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در استخراج DNA به روش Glass beads – Phenol Chloroform توده هایفی به‌دست آمده پس از گذراندن مرحله‌ای در دستگاه vacuum drier کاملاً شکننده می‌گردد. سپس قطعه کوچکی از آن در یک لوله میکروفیوژ حاوی ۴۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج و ۴۰۰ میلی‌گرم از گلاسبید با قطر ۰/۵ میلی‌متر مخلوط نموده نهایتاً ۴۰۰ میلی‌گرم از محلول فنل کلروفرم اضافه گردید، مخلوط به مدت ۲-۳ دقیقه در دیسممبراتور به شدت ۹۰۰-۱۰۰۰ زده تا یک سوسپانسیون هموژن فراهم گردید. سپس لوله‌ها در میکروفیوژ قرار گرفته با سرعت ۵۰۰۰g به مدت پنج دقیقه رسوب‌گیری شد (۱۰).

مایع رویی به لوله جدید منتقل شده به میزان هم حجم از فنل کلروفرم افزوده دوباره سانترفوژ با شرایط قبلی انجام گرفت. بار دیگر مایع رویی به لوله جدید منتقل شده به میزان دو برابر حجم از ۲- پروپانل و ۰/۱ حجم از استات سدیم به لوله افزوده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریزر به مدت بیست دقیقه سرمادهی شد. سپس ده دقیقه رسوب‌گیری در میکروفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ g انجام شد.

در این مرحله رسوب تشکیل شده است که درانتهای لوله قابل مشاهده بود. برای حذف نمک و الکل با درصد بالا، یک‌بار شستشو با اتانل ۷۰٪ انجام گردید و رسوب انتهایی با افزودن بیست میکرولیتر از آب مقطر دو بار تقطیر دوباره حل شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد (۱۱).

1. Conidial heads
2. Potato Dextrose Agar (PDA)

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

ب) تکثیر DNA هدف با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

۱-انتخاب پرایمرها: توالی پرایمرهای مورد استفاده به قرار زیر می‌باشد:

Forward: 5´-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3´
Reverse: 5´-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3´

۲- شرایط PCR: برای انجام موفق PCR، پس از انجام آزمایشات متعدد سرانجام مواد زیر با غلظت‌های ذکر شده برای انجام یک واکنش ۱۰۰ میکرولیتری استفاده شد: بافرPCR، ۵ میکرولیتر، پرایمر رفت (ITS1) ۵۰ پیکومول، پرایمر برگشت (ITS4) پنجاه پیکومول، چهار نوع نوکلئوتید (dNTPs) ۲۰۰ میکرو مولار، آنزیم Taq ۲/۵ واحد، DNA الگو ۵ میکرولیتر و آب مقطر دیونیزه با حجم لازم تا رسیدن به حجم کلی یک میکرولیتر. سپس میکروتیوب‌ها در دستگاه ترمال‌سایکر با برنامه دمایی استاندارد PCR (۹۵ درجه برای دناتوراسیون[1]، ۵۵ درجه برای انیلینگ[2]، ۷۲ درجه برای اکستنشن[3]) قرار گرفتند. برای مشاهده نتایج تکثیر DNA، از آگاروز ژل الکتروفورز استفاده گردید (۱۲).

ج) هضم اندونوکلئازی محصولات PCR با استفاده از آنزیم محدودساز

برای اجرای تستRFLP، ۱۳ میکرولیتر از محصولPCR، ۱/۵ میکرولیتر از بافر ویژه آنزیم و ۰/۵میکرولیتر از آنزیم محدودالاثر برای حجم نهایی واکنش ۱۵ میکرولیتر در تیوب ۲۰۰ میکرولیتری ریخته شد و مدت ۳ ساعت در حرارت ۶۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد (بسته به نوع آنزیم) قرارداده شد.

د) الکتروفورز DNA

به منظور تفکیک قطعات DNA، آگاهی از اندازه محصول PCR و نیز قابل رنگ آمیزی وقابل رؤیت کردن آنها، هر کدام از محصولات استخراج DNA، PCR و RFLP روی ژل آگارز الکتروفورز گردید و به روش اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و پس از آن با استفاده از دستگاه ترانس ایلومیناتور دیجیتال[4] رویت و عکس‌برداری می‌گردید (۱۳).

یافته‌ها

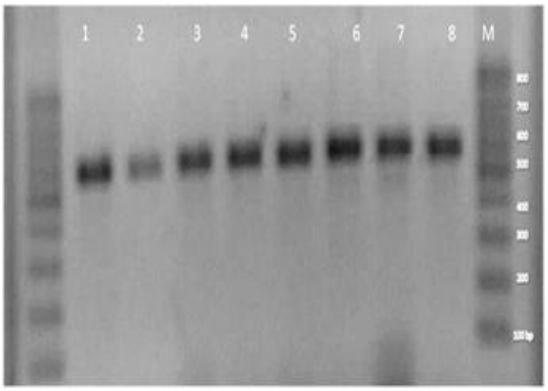
نتایج بررسی ماکروسکوپی کلنی (شکل، رنگ، بافت، توپوگرافی و غیره) و نیز ویژگی‌های میکروسکوپی کلنی (رئوس کونیدیایی)، طول و قطر کونیدیوفور، شکل و اندازه وزیکول‌ها، شکل و اندازه فیالیدها یک ردیفی یا دو ردیفی بودن فیالیدها و شکل و اندازه کونیدی‌ها) و سایر ویژگی‌های میکروسکوپی در جدول ۱ مشاهده می‌گردد.

آمپلیفیکاسیون قطعات ITS ژن کدکننده DNA ریبوزومی سویه‌های استاندارد آسپژیلوس‌ها محصولات PCR با سایز ۶۰۰bp-۵۶۰ را تقریباً در یک دامنه ثابت نشان می‌داد (شکل ۱).

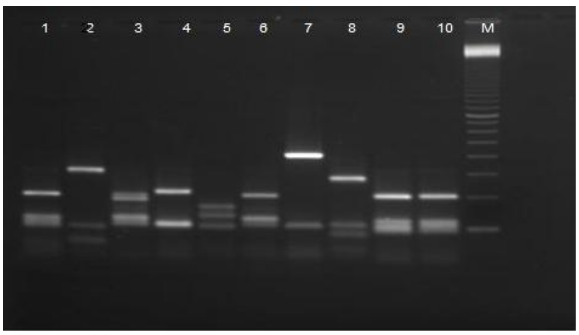
آنزیم محدودساز MwoI بر روی قطعات ژنی ITS برخی گونه‌های آسپرژیلوس مکان‌های برش مختلفی ایجاد می‌نماید که حاصل هضم DNA توسط آن تشکیل باندهای DNA با سایزهای متفاوت برای هر گونه می‌باشد که بر خلاف الگوی باندی آمپلیفیکاسیون، قادر است یک الگوی افتراق بین گونه‌ای در آسپرژیلوس‌های مهم بیماریزا ایجاد نماید. چنان‌که در جدول ۲ مشاهده می‌گردد، استفاده از آنزیم محدودساز MwoI در روش مولکولی PCR-RFLP الگویی ایجاد نمود که قادر بود هشت گونه با اهمیت پزشکی را از یکدیگر افتراق دهد (شکل ۲). هرچند این نتیجه با پیش بینی نظری متفاوت بود، اما با کاربرد این روش ما قادر بودیم شناسایی اکثر گونه‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی و محیطی (بیمارستانی) را انجام دهیم و گونه‌های یافت شده با فراوانی بالا در میان هشت گونه افتراق داده شده قرار می‌گرفت.

1. Denaturation
2. Annealing
3. Extension
4. Gel doc system

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]



شکل ۱. الکتروفورز افقی محصولات PCR مربوط به گونه‌های مختلف آسپرژیلوس (ستون ۸-۱) شامل موارد ذکر شده در جدول ۱. بدون در نظر گرفتن شیب ژل تقریبا تمامی باندها (ستونهای۸-۱) با سایز تقریباً یکسان (۶۰۰-۵۰۰ bp) مشاهده می‌گردند.



شکل ۲. تصویر الکتروفورز افقی از الگوی هضم آنزیم MwoI در گونه‌های آسپرژیلوس مورد بررسی. ستونهای ۸-۱ به ترتیب نمایانگر الگوی باندی گونه‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس،آسپرژیلوس نیدولانس، آسپرژیلوس کلاواتوس، آسپرژیلوس اکراسئوس و آسپرژیلوس آمستلوئیدامی می‌باشند.

جدول ۱. فراوانی و درصد کلنی‌های شناسایی شده گونه‌های آسپرژیلوس در نمونه‌های بالینی و محیطی

گونه	تعداد کلونی‌های جدا شده					
	نمونه‌های بالینی		نمونه‌های محیطی		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
A.flavus	۳۸	۷۴/۵	۷۰	۴۸/۲	۱۰۸	۵۵
A.niger	۳	۵/۸	۶۰	۴۱/۳	۶۳	۳۱/۷
A.fumigatus	۶	۱۱/۷	۱۲	۷/۲	۱۸	۸/۷
A.nidulans	۱	۱/۹۶	۱	۶/۸	۲	۱
A.terreus	۱	۱/۹۶	۱	۶/۸	۲	۱
A. clavatus	۱	۱/۹۶	۰	۰	۱	۰/۵
A.ochraceus	۱	۱/۹۶	۰	۰	۱	۰/۵
A.amstelloidami	۰	۰	۱	۶/۸	۱	۰/۵
جمع	۵۱	۱۰۰	۱۴۵	۱۰۰	۲۰۵	۱۰۰

جدول ۲. الگوی هضم آنزیمی قطعات ITS در هشت گونه مختلف آسپرژیلوس بوسیله آنزیم محدودساز MwoI

گونه	حجم اصلی نمونه (bp)	سایز باند بعد از هضم آنزیمی(bp)
A. fumigatus	۵۹۵	۲۰۷،۱۲۵،۱۰۸،۲۹،۲۱،۹
A. flavus	۵۹۵	۳۲۵،۹۸،۶۵،۴۰،۲۰
A. niger	۶۰۰	۱۹۲،۱۷۵،۱۲۰،۱۰۸،۳۰،۲۱،۹
A. terreus	۶۰۷	۲۲۰،۱۰۹،۱۰۶،۹۶،۲۹،۹
A. nidulans	۵۶۲	۱۶۲،۱۳۵،۱۰۴،۳۱،۲۹،۹
A. clavatus	۵۷۶	۲۱۰،۱۲۵،۱۰۶
A. ochraceus	۶۰۰	۴۲۰،۹۰،۳۹،۹
A. amstelloidami	۵۹۲	۲۸۶،۱۰۶،۱۰۰،۲۹،۹

بجز موارد معدود که مربوط به خطای فردی بود، نتایج حاصل از آزمایش ایزوله‌های آسپرژیلوسی با روش‌های مورفولوژی و مولکولی (RFLP) تفاوت معنی‌داری نشان نداد. اما در نتایج RFLP با کاربرد آنزیم محدودساز MwoI آن چه مهم است،

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

افتراق بین گونه‌ای هشت گونه از آسپرژیلوس‌های مورد مطالعه است. شناسایی و افتراق مهمترین گونه‌های آسپرژیلوس به دست آمده از کشت کوتاه مدت ۳۶ ساعته و استفاده از پروفایل معرفی شده شامل استخراج DNA، PCR و هضم آنزیمی برای تقریباً تمام نمونه‌های آزمون شده زمانی در حدود یک روز کاری اختصاص داد.

بحث و نتیجه گیری

از لحاظ اپیدمیولوژیک شناساسی عوامل آسپرژیلوسی چه برای شناخت هر چه بیشتر پاتوژنز بیماری و چه برای قطع زنجیره‌های انتقال و کنترل آنها به خصوص در طغیان‌های بیمارستانی، ضروری و مهم است. روش‌های مورفولوژیک برای تعیین گونه آسپرژیلوس‌ها کافی و معتبر نمی‌باشند و لذا استفاده از روش‌های معتبرتری همچون روش‌های مبتنی بر DNA (DNA-based یا PCR-based) ضروری است. مرور مقالات نشان می‌دهد که تقریباً تمامی روش‌های به اصطلاح DNA-based که تا به حال برای شناسایی آسپرژیلوس‌ها به کار رفته است، به استثناء تعیین سکانس (Sequencing) تنها به تعداد معدودی از آسپرژیلوس‌ها محدود بوده‌اند. روش‌های متعددی بر پایه PCR برای شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس به کار گرفته شده که عمدتاً آمپلیفیکاسیون ژن rDNA در نواحی ITS1, ITS2, 5.8s را به عنوان نواحی ژنی که تا حدود زیادی از تغییر بین گونه‌ای و ثبات درون گونه‌ای برخوردارند، به کار می‌برند. از این روش‌ها می‌توان به: PCR-Sequencing ناحیه ITS (۱۴)، PCR-EIA (۱۵)، Nested-PCR با هدف نواحی ITS-rDNA (۱۶)، و همچنین PCR-RFLP (۱۷،۱۸) اشاره نمود که همگی در شناسایی آسپرژیلوس‌ها در سطح جنس و گونه به کار رفته‌اند. در این طرح روش PCR-RFLP مبتنی بر ژن DNA ریبوزومی برای تعیین گونه حدود سی گونه از جنس آسپرژیلوس معرفی، راه اندازی و استفاده گردید. در این روش تنها از یک جفت پرایمر استفاده شد که این جفت همان پرایمرهای همگانی ITS1 و ITS4 است که در نواحی 18S و 28S مربوط به DNA ریبوزومال و به عبارت دیگر در نواحی بسیار حفاظت شده قرار گرفته‌اند. لذا پرایمرهای مزبور برای قارچها (اعم از مخمرها و کپک‌ها) عمومی بوده و ناحیه ژنی مربوطه در هر نوع قارچی با این پرایمر تقویت می‌شود.

همان‌طور که در شکل یک مربوط به الکتروفورز محصولات PCR مشاهده می‌شود، باندهای PCR به دست آمده با این پرایمرها در همه آسپرژیلوس‌ها کم و بیش یکسان (حدود ۶۰۰ جفت باز) بوده و لذا با PCR به تنهایی نمی‌توان گونه آسپرژیلوس را شناسایی کرد و لذا تست مکمل دیگر (RFLP) برای تشخیص گونه‌ها به کار گرفته شد که آنزیم محدودساز MwoI به عنوان آنزیمی که بیشترین افتراق را در بین گونه‌های آسپرژیلوس ایجاد می‌کند، مورد استفاده قرار می‌دهد.

پس از کاربرد آن و همان گونه که انتظار می‌رفت، این آنزیم قادر بود که حداکثر ۱۵ گونه آسپرژیلوس را در چند گروه یا حداقل هشت گونه مهم بیماریزا را در یک گروه شناسایی نماید و الگوی هضم آنزیمی تفکیک بین گونه‌ای مطلوب ایجاد کند (شکل ۲).

چنان که در شکل مشاهده می‌گردد، الگوی هضم آنزیم MwoI برای گونه‌های آسپرژیلوسی مورد مطالعه *A. flavus*، *A. fumigatus*، *A. ochraceus* و *A. nidulans* کاملاً متمایز می‌باشد و در مورد گونه‌های *A. amstelloidami*، *A . tereus*، *A. clavatus* و *A. niger* هر چند اختلاف الگوی برش فاحش نیست، اما قادر به تفکیک نسبی است. به علاوه با به کارگیری تکنیک‌های برتر نظیر کاربرد الکتروفورز عمودی و ژل پلی اکریلامید می‌توان این اختلافات کوچک (bp

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

۳۰-۵) را قابل مشاهده نمود. شناسایی و افتراق گونه‌های آسپرژیلوس در این سیستم شناسایی تک آنزیمی از کشت کوتاه مدت ۳۶-۲۴ و استفاده از پروفایل معرفی شده شامل استخراج DNA، PCR و هضم آنزیمی برای تقریباً ۱۰-۶ نمونه که همگی می‌تواند در طی یک روز کاری انجام گردد، به مراتب سریع‌تر از روش‌های شناسایی سنتی و مورفولوژیک می‌باشد که چندین روز را می‌طلبد. روش مولکولی PCR-RFLP با کاربرد آنزیم محدودساز MwoI از حساسیت و ویژگی بالایی برای تشخیص اکثر گونه‌های آسپرژیلوس برخوردار است. روش مولکولی برقرار شده قادر به شناسایی و سویه‌های آسپرژیلوسی که از نمونه‌های بالینی مختلف به دست آمده از بیمارستانهای آموزشی مورد مطالعه بوده است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه شرکت کنندگان در این طرح تقدیر و تشکر می‌گردد.

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

References

1. Iwen PC, Rupp ME, Langnas AN, Reed EC, Hinrichs SH. Invasive pulmonary aspergillosis due to Aspergillus terreus: 12-year experience and review of the literature. Clin Infect Dis. 1998; 26: 1092-1097.
2. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. The invasive and saprophytic syndromes due to Aspergillus spp. Medical Mycol. 2005; 43: S207-S238.
3. Chandrasekar PH. Antifungal resistance in Aspergillus. Medical Mycol. 2005; 43: S295-S298.
4. Samson RA. The genus Aspergillus with special regards to the Aspergillus fumigatus group. Contrib Microbil. 1999; 2: 5-20.
5. Krappmann S, Braus GH. Nitrogen metabolism of Aspergillus and its role in pathogenicity. Medical Mycol. 2005; 43: S31-S40.
6. Hinrikson HP. Molecular method for the identification of Aspergillus species. J Med Mycol. 2003; 43: S129- S137.
7. Raper KB, Fennell DI. The Genus Aspergillus .Baltimore: Williams & Wilkins, 1965.
8. Diba K, Kordbacheh P, Mirhendi H, Rezaie S, Mahmoudi M. Identification of Aspergillus species using morphological characteristics. PAK J MEDL SCI. 2007; 23(6): 867-872.
9. Martinez-Culebras PV, Ramon D. An ITS-RFLP method to identify black Aspergillus isolates responsible for contamination in grapes and wine. Int J Food Microbiol. 2007; 113: 147-153.
10. De Aguirre L, Hurst SF, Choi JS, Shin JH. Rapid differentiation of Aspergillus species from other medically important opportunistic molds and yeasts by PCR-enzyme immunoassay. J Clin Microbiol. 2004; 42: 3495-3504.
11. Loeffler J, Kloepfer K, Hebart H. Polymerase chain reaction detection of aspergillus DNA in experimental models of invasive aspergillosis. J Infect Dis. 2002; 185: 1203-1206.
12. Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of Aspergillus species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. J Clin Microbiol. 2000; 38: 1510-1515.
13. Diego M, Giovanni R, Guglielmetti S, Daffonchio D. 16S–23S rRNA intergenic spacer region sequence variation in Streptococcus thermophilus and related dairy streptococci and development of a multiplex ITS-SSCP analysis for their identification. J Microbiol. 2003; 149: 807-813.
14. Travis H, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of Aspergillus species using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. J Clin Microbiol. 2000; 38(4): 1510-1551.
15. De Aguirre L, Hurst SF, Choi JS. Rapid differentiation of Aspergillus species from other medically important opportunistic molds and yeasts by PCR-Enzyme Immunoassay. J Clin Microbiol. 2004; 42(8): 3495-3504.
16. Zhao J, Kong F, Li R, Wang D. Identification of Aspergillus fumigatus and isolated species and related species by Nested PCR targeting ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Region. J Clin Microbiol. 2001; 39(6): 2281-2286.
17. Yuko K, Tsutomu A. Single-Strand Conformation polymorphism Analysis of

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

PCR-Amplified Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers to Differentiate Species of Aspergillus Section Flavi. J Appl Environ Microbiol. 1996; 8: 2947-2952.

18. Somashekar D, Rati ER. PCR-restriction fragment length polymorphism of aflR gene gor differentiation and detection of Aspergillus in maize. Int J Food Microbiol. 2003; 93: 101-107.

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]