DOI: 10.22122/jims.v37i520.11374 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هفتم/شماره‌ی ۵۲۰/هفته‌ی چهارم اردیبهشت ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۲۶ تاریخ چاپ: ۱۳۹۸/۲/۲۲

شناسایی عوامل درماتوفیتوزیس در مشهد با استفاده از روش مولکولی (PCR Sequencing) Polymerase Chain Reaction Sequencing

راحله نجاتی حسینی[۱]، حسین زرین‌فر[۲]، محمود پریان[۱]، سعید پرهام[۱]، عبدالمجید فتی[۳]، علی رضائی مته‌کلائی[۴]، محمدجواد نجف‌زاده[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: درماتوفیت‌ها، گروهی از قارچ‌ها هستند که بافت‌های کراتینه‌ی پوست، مو و ناخن را در انسان و حیوان مورد حمله قرار می‌دهند و عفونت‌هایی تحت عنوان درماتوفیتوزیس (کچلی) ایجاد می‌کنند. از آن جایی که شناسایی قارچ‌های پاتوژن در سطح گونه جهت ردیابی منبع عوامل ایجاد کننده، کنترل و پیش‌گیری و اپیدمیولوژی عفونت حایز اهمیت است، استفاده از روش‌های تشخیصی اختصاصی و حساس برای شناسایی عوامل درماتوفیتوزیس ضروری به نظر می‌رسد.

روش‌ها: نمونه‌های بالینی (پوسته، ناخن و مو) مبتلایان به درماتوفیتوزیس در شهر مشهد بر روی محیط کشت مایکوزیل آگار کشت داده شد و سپس، ژنوم کلنی‌های درماتوفیت‌های به دست آمده، توسط کیت مخصوص استخراج گردید. ژن Internal transcribed spacer (ITS) توسط پرایمرهای ITS1 و ITS4، تکثیر و سپس، تعیین توالی آن‌ها انجام شد. در نهایت، نتایج توالی‌ها با نرم‌افزار SeqMan، آنالیز گردید و جواب آن‌ها با موارد موجود در پایگاه داده‌ای قارچی هلند مقایسه شد.

یافته‌ها: ۸۰ ایزوله‌ی درماتوفیتی در این مطالعه تعیین توالی شدند که شامل ۹ گونه‌ی درماتوفیتی و عبارت از ۲۳ مورد (۲۸/۸ درصد) Trichophyton interdigitale، ۱۸ مورد (۲۲/۵ درصد) Trichophyton tonsurans، ۱۰ مورد (۱۲/۵ درصد) Epidermophyton floccosum ، ۱۰ مورد (۱۲/۵ درصد) Trichophyton mentagrophytes، ۸ مورد (۱۰/۰ درصد) Microsporum canis، ۴ مورد (۵/۰ درصد) Trichophyton rubrum ، ۴ مورد (۵/۰ درصد) Trichophyton benhamiae ، ۲ مورد (۲/۵ درصد) Nannizzia fulva و ۱ مورد (۱/۲ درصد) Nannizzia persicolor بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به گزارش گونه‌های نادر درماتوفیت در این مطالعه، استفاده از روش‌های مولکولی نظیر تعیین توالی ژن ITS می‌تواند تنوع گونه‌ای درماتوفیت‌ها در یک منطقه را با دقت بیشتری نسبت به روش‌های ریخت‌شناسی (Morphology) تعیین کند.

واژگان کلیدی: درماتوفیتوزیس، تعیین توالی DNA، ایران

ارجاع: نجاتی حسینی راحله، زرین‌فر حسین، پریان محمود، پرهام سعید، فتی عبدالمجید، رضائی مته‌کلائی علی، نجف‌زاده محمدجواد. **شناسایی عوامل درماتوفیتوزیس با استفاده از روش مولکولی Polymerase Chain Reaction Sequencing (PCR Sequencing) در مشهد- ایران.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۲۰): ۲۶۲-۲۵۶

مقدمه

درماتوفیت‌ها، دسته‌ای از قارچ‌های رشته‌ای کراتین‌دوست (Keratinophilic) هستند که طیفی از عفونت‌های جلدی در بافت‌های کراتینه ی انسان و حیوان شامل پوست، مو، ناخن، پر و شاخ را تحت عنوان درماتوفیتوزیس یا کچلی ایجاد می نمایند. بر طبق آخرین تاکسونومی، این قارچ ها شامل بیش از ۵۰ گونه می باشند که در جنس‌های Trichophyton، Epidermophyton، Microsporum، Nannizzia، Arthroderma، Paraphyton و

۱- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۳- استاد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۴- دانشیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
۵- دانشیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: محمدجواد نجف‌زاده
Email: najafzadehmj@mums.ac.ir

Lophophyton قرار می‌گیرند (۲-۱).

درماتوفیتوزیس را بر حسب محل آناتومیک درگیری و ایجاد ضایعه طبقه‌بندی می‌کنند؛ به این ترتیب، درماتوفیتوزیس شامل چندین فرم بالینی نظیر کچلی سر، کچلی بدن، کشاله‌ی ران، پا، دست، ناخن و ریش می‌باشند (۳). شایع‌ترین روش مورد استفاده در آزمایشگاه‌ها جهت شناسایی عوامل درماتوفیتی، آزمایش مستقیم و کشت نمونه‌های بالینی می‌باشد (۴). آزمایش مستقیم پوسته‌ها، مو و ناخن اغلب جهت تشخیص عفونت قارچی کافی است، اما جنس و گونه‌ی قارچ را مشخص نمی‌کند. از این رو، قادر به تمایز قطعی درماتوفیت‌ها از یکدیگر و سایر کپک‌ها نمی‌باشد. گام بعدی در شناسایی جنس و گونه‌ی درماتوفیت، کشت نمونه در محیط قارچی مناسب و انجام آزمایش‌های ریخت‌شناسی (Morphology) و فیزیولوژی پس از کشت می‌باشد (۵). با این همه، به دلیل وجود گونه‌ها و تنوع‌های مختلف درماتوفیت‌ها و همچنین، گاهی رشد آهسته و عدم ثبات خصوصیات فنوتیپیک، شناسایی این قارچ‌ها با اتکا به این معیارهای ناپایدار، پیچیده و دشوار است (۷-۶).

روش‌های مرسوم، با وجود ارزشمندی، وقت‌گیر می‌باشند و به طور اصولی، مستلزم حضور کادر قارچ‌شناسی متبحر هستند. ضمن این که این روش‌ها بسیار متنوع و گاهی غیر دقیق می‌باشند، درصد قابل توجهی از ایزوله‌های درماتوفیتی ناشناخته باقی خواهند ماند. به تازگی، محققان روی روش‌های مبتنی بر اختلافات و تشابهات نواحی خاصی از DNA جهت شناسایی قارچ‌ها متمرکز شده‌اند. در این روش‌ها، تفاوت‌های پایدار و اختصاصی موجود در توالی ژن‌های قارچی مورد سنجش قرار می‌گیرد و به این ترتیب، ارگانیسم مورد نظر در سطوح جنس، گونه و حتی زیرگونه شناسایی می‌شود (۸).

روش‌های زیست‌شناسی مولکولی مختلفی جهت شناسایی درماتوفیت‌ها در سطح گونه معرفی شده‌اند که یکی از این روش‌ها، تعیین توالی (Sequencing) می‌باشد (۹). در بیشتر مطالعات مبتنی بر Polymerase chain reaction (PCR)، ژن DNA ریبوزومی (Ribosomal DNA یا rDNA) به عنوان ژن هدف جهت شناسایی گونه‌های درماتوفیتی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۰). این ژن‌ها، در تمام قارچ‌ها و به تعداد کپی بالا وجود دارند که حساسیت ردیابی آن‌ها را افزایش داده است. کمپلکس rDNA در قارچ‌ها شامل سه بخش کد کننده‌ی 18S، 5.8S و 28S و نواحی غیر کد کننده به نام نواحی فاصله‌انداز Internal transcribed spacer1 (ITS) و ITS2 می‌باشد که در بین نواحی کد کننده قرار دارند (۱۱). شباهت‌ها و تفاوت‌های موجود در توالی نواحی کد کننده و فاصله‌انداز، اساس ژنتیک برای تقسیم‌بندی قارچ‌ها به گروه‌های تاکسونومیک می‌باشند و این تفاوت در توالی نواحی ITS جهت شناسایی گونه‌های درماتوفیتی نیز استفاده شده است؛ به گونه‌ای که در حال حاضر، تعیین توالی نواحی ITS1-ITS2، استاندارد طلایی شناسایی درماتوفیت‌ها در سطح گونه است (۱۴-۱۲).

در گذشته، جنبه‌های قارچ‌شناسی عفونت درماتوفیتوزیس در مشهد با اتکا به روش های متداول و غیر دقیق نظیر کشت، مورد بررسی قرار گرفته است؛ اما با توجه به تغییراتی که در دو دهه ی اخیر در تاکسونومی درماتوفیت‌ها ایجاد شده است، هیچ یک از شناسایی‌های انجام شده بر این تغییرات منطبق نبوده‌اند. از این رو، با توجه به گرایش اخیر به شناسایی گونه‌های درماتوفیتی در اغلب نقاط دنیا، مطالعه‌ی حاضر برای نخستین بار با هدف تعیین هویت گونه‌های درماتوفیت‌هایی که از بیماران مبتلا به کچلی و در محیط های کشت قارچی جدا شده بودند، با استفاده از روش مولکولی تعیین توالی نواحی rDNA-ITS انجام شد.

روش‌ها

این مطالعه، پس از تأیید توسط کمیته‌ی اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد (با کد IR.MUMS.fm.REC.1394.251) بر روی بیماران مبتلا به انواع کچلی مراجعه کننده به آزمایشگاه قارچ‌شناسی بیمارستان قائم (عج) و امام رضا (ع) مشهد انجام شد. تمامی نمونه‌ها با استفاده از آزمایش مستقیم (Potassium hydroxide یا KOH ۲۰-۱۰ درصد) مورد بررسی قرار گرفتند و در محیط Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol and cycloheximide (SCC) کشت داده شدند و در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴ هفته انکوبه شدند.

ژنوم کلنی‌های درماتوفیت‌های به دست آمده، توسط کیت استخراج DNA (دنا زیست Cat. No. S-1034-1) استخراج شدند. برای تخریب هر چه بهتر دیواره‌ی سلولی، از دستگاه گریندر مدل Power Masher استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. سپس، PCR و تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت ITS1 و ITS4 انجام شد. توالی پرایمرها به شرح زیر بودند:

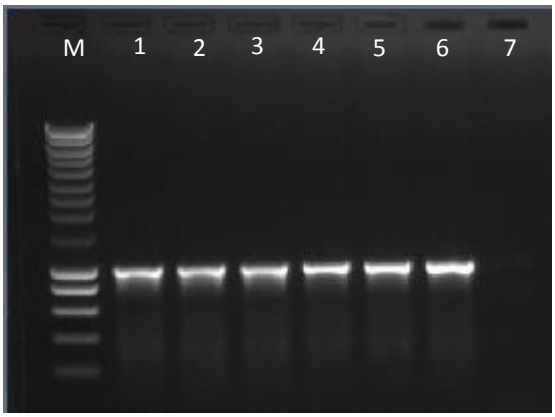
ITS1 :5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

پس از پایان PCR، نتایج بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد و با دستگاه ABI prism BigDye TM terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) تعیین توالی گردید. نتایج با استفاده از نرم‌افزارهای Chromas و SeqMan (DNASTAR, Wisconsin, USA) واکاوی و جهت تعیین گونه‌ی قارچی، با نمونه‌های درماتوفیتی موجود در پایگاه داده‌ای قارچی هلند (www.westerdijkinstitute.nl) و بانک ژن جهانی مقایسه شد.

یافته‌ها

ژن ITS همه‌ی نمونه‌ها به خوبی تعیین توالی گردید. طول قطعه‌ی ITS بر روی ژل حدود ۶۵۰-۵۵۰ جفت‌باز بود (شکل ۱). در این مطالعه، ۸۰ ایزوله‌ی درماتوفیتی به دست آمده از بیماران مبتلا به درماتوفیتوزیس مورد ارزیابی قرار گرفت که ۵۵ مورد مرد (۶۸/۸ درصد) و ۲۲ مورد زن (۲۷/۵ درصد) و ۳ مورد (۳/۷ درصد) بدون اطلاعات و در محدوده‌ی سنی ۶۰-۵ سال بودند. بیشترین میزان عفونت در گروه سنی مورد مطالعه در افراد زیر ۲۰ سال مشاهده شد. به غیر از کچلی ریش، سایر انواع کچلی‌ها در این بیماران مشاهده شد. کچلی بدن ۴۶ مورد (۵۷/۵ درصد) شایع‌ترین شکل عفونت و بعد از آن کچلی کشاله‌ی ران ۱۰ مورد (۱۲/۵ درصد)، کچلی ناخن ۷ مورد (۸/۸ درصد)، کچلی سر ۶ مورد (۷/۵ درصد)، کچلی دست ۶ مورد (۷/۵ درصد) و کچلی پا ۲ مورد (۲/۵ درصد) بود و در ۳ مورد (۳/۷ درصد) نیز بدون اطلاعات گزارش شد.



شکل ۱. تکثیر ژن ITS ایزوله‌های درماتوفیت بر روی ژل آگارز.
M = نشانگر ۱۰۰ جفت‌باز، شماره‌های ۶-۱ نمونه‌های مثبت و شماره‌ی ۷ شاهد منفی

از بین عوامل درماتوفیتوزیس مطابق جدول ۱، ۹ گونه‌ی قارچی از بیماران مورد مطالعه جدا گردید که عبارت از ۲۳ مورد (۲۸/۸ درصد) Trichophyton interdigitale، ۱۸ مورد (۲۲/۵ درصد) Trichophyton tonsurans، ۱۰ مورد (۱۲/۵ درصد) Epidermophyton floccosum، ۱۰ مورد (۱۲/۵ درصد) Trichophyton mentagrophytes، ۸ مورد (۱۰/۰ درصد) Microsporum canis، ۴ مورد (۵/۰ درصد) Trichophyton rubrum، ۴ مورد (۵/۰ درصد) Trichophyton benhamiae، ۲ مورد (۲/۵ درصد) Nannizzia fulva و ۱ مورد (۱/۲ درصد) Nannizzia persicolor بودند. Trichophyton interdigitale در بین گونه‌های شناسایی شده، بیشترین فراوانی را داشت.

جدول ۱. فراوانی گونه‌های درماتوفیتی با روش تعیین توالی، در بین مبتلایان به درماتوفیتوزیس مراجعه کننده به آزمایشگاه قارچ‌شناسی بیمارستان قائم (عج) و امام رضا (ع)

مورد	تعداد (درصد)
Trichophyton interdigitale	۲۳ (۲۸/۸)
Trichophyton tonsurans	۱۸ (۲۲/۵)
Epidermophyton floccosum	۱۰ (۱۲/۵)
Trichophyton mentagrophytes	۱۰ (۱۲/۵)
Microsporum canis	۸ (۱۰/۰)
Trichophyton rubrum	۴ (۵/۰)
Trichophyton benhamiae	۴ (۵/۰)
Nannizzia fulva	۲ (۲/۵)
Nannizzia persicolor	۱ (۱/۲)
کل	۸۰ (۱۰۰)

رابطه‌ی بین نوع کچلی و گونه‌ی درماتوفیتی در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲. رابطه‌ی نوع کچلی و گونه‌ی درماتوفیتی

محل / گونه	بدن	کشاله‌ی ران	ناخن	سر	دست	پا	بدون داده	جمع
Trichophyton tonsurans	۱۶	۰	۰	۱	۰	۰	۱	۱۸
Trichophyton rubrum	۰	۴	۰	۰	۰	۰	۰	۴
Trichophyton interdigitale	۹	۲	۶	۲	۱	۲	۱	۲۳
Trichophyton benhamiae	۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۴
Trichophyton mentagrophytes	۷	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۹
Microsporum canis	۳	۰	۰	۲	۲	۰	۱	۸
Nannizzia persicolor	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
Nannizzia fulva	۰	۰	۰	۰	۲	۰	۰	۲
Epidermophyton floccosum	۶	۳	۰	۰	۱	۰	۰	۱۰
کل	۴۶	۱۰	۷	۶	۶	۲	۳	۸۰

بحث

درماتوفیت‌ها، شایع‌ترین پاتوژن‌ها در عفونت‌های پوستی قارچی می‌باشند (۱۵) که انتشار آن‌ها در کشورها و نواحی جغرافیایی متغیر است و به عواملی نظیر شیوه‌ی زندگی، عادات بهداشتی، مهاجرت مردم و شرایط

اقلیمی بستگی دارد (۱۶). این بیماری، به دلیل مسری بودن، یک مشکل بهداشت عمومی محسوب می‌شود و سالانه، میلیون‌ها دلار جهت شناسایی و درمان افراد مبتلا به کچلی هزینه می‌شود (۱۷). از آن جایی که درمان عوامل غیر درماتوفیتی نسبت به عوامل درماتوفیتی متفاوت است، شناسایی عوامل ریشه‌شناسی این ضایعات پوستی قبل از شروع درمان، ضروری به نظر می‌رسد. همچنین، گونه‌های مختلف درماتوفیت‌ها نیز دارای الگوی درمانی متفاوت می‌باشند (۹).

از طرفی، افتراق درماتوفیت‌های انسان‌دوست از انواع حیوان‌دوست و خاک‌دوست جهت قطع زنجیره‌ی انتقال، کنترل و پیش‌گیری عفونت مهم می‌باشد (۶). در حال حاضر، جواب‌دهی در آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی بر اساس آزمایش مستقیم و کشت نمونه‌های بالینی است. این روش‌ها، با وجود ارزشمندی نیازمند کادر قارچ‌شناسی متبحر می‌باشند، ضمن این که این روش‌ها، بسیار متنوع و گاهی غیر دقیق هستند و درصد قابل توجهی از ایزوله‌های درماتوفیتی با هویت ناشناخته باقی می‌مانند. همچنین، به دلیل وجود گونه و تنوع‌های مختلف در داخل درماتوفیت‌ها و همچنین، گاهی رشد آهسته و عدم ثبات خصوصیات فنوتیپیک، شناسایی این قارچ‌ها با اتکا به معیارهای ناپایدار، پیچیده و دشوار است (۷-۶، ۱۸).

شناسایی درماتوفیت‌ها تا سطح گونه، از نقطه نظر تشخیص آزمایشگاهی و برای درمان هر چه بهتر و مؤثرتر بیماری، از لحاظ اپیدمیولوژی و اکولوژی به منظور درک راه‌های انتشار و پیش‌گیری از بیماری و نیز شناسایی عوامل درماتوفیتی بومی هر منطقه و در نهایت، از نقطه نظر زیست‌شناسی و تاکسونومی حایز اهمیت است.

به تازگی، محققان بر روش‌های مبتنی بر اختلافات و تشابهات مولکول‌های خاصی از DNA برای شناسایی قارچ‌ها متمرکز شده‌اند. بدین ترتیب، ارگانیسم مورد نظر در سطح جنس، گونه و حتی زیرگونه شناسایی می‌شود که بیشتر مطالعات مبتنی بر روش PCR، ژن DNA ریبوزومی و ژن‌های کد کننده‌ی بعضی از پروتئین‌ها به عنوان ژن هدف مورد بررسی قرار می‌گیرند (۱۱). این ژن‌ها، در تمام قارچ‌ها و به تعداد کپی بالا وجود دارند که حساسیت ردیابی آن‌ها را افزایش داده است. در حال حاضر، تعیین توالی نواحی ITS1 و ITS2، استاندارد طلایی شناسایی درماتوفیت‌ها در سطح گونه می‌باشد (۱۴).

در مطالعه‌ی حاضر، تعداد ۸۰ ایزوله‌ی درماتوفیتی به دست آمده از بیماران مبتلا به درماتوفیتوزیس مراجعه کننده به آزمایشگاه قارچ‌شناسی بیمارستان قائم (عج) و امام رضا (ع) مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه، ۱۰ گونه‌ی درماتوفیتی جدا شدند که این تنوع گونه‌ای، با ضریب اطمینان بسیار بالا در این حجم نمونه قابل توجه می‌باشد و با مطالعه‌ی رضائی مته‌کلائی و همکاران در تهران (۱۹) که مانند همین مطالعه با روش مولکولی و تعیین توالی ۱۰ گونه جدا کرده‌اند، مشابهت دارد. در صورتی که در مطالعه‌ی خسروی و همکاران در نواحی مختلف ایران، فقط گونه‌های Microsporum canis، Epidermophyton floccosum و Trichophyton mentagrophytes را جدا کردند (۲۰). با وجود این که این مطالعه هم در ایران انجام شده است، اما به نظر می‌رسد نوع روش شناسایی این درماتوفیت‌ها در تعداد گونه‌های شناسایی شده نقش مهمی را ایفا کند.

در مطالعه‌ی Korstanje و Staats در هلند، ۷۹ درصد گونه‌های جدا شده Epidermophyton floccosum، Microsporum canis و Trichophyton violaceum بوده است (۲۱). در تمام این مطالعات، از روش‌های مستقیم و کشت جهت شناسایی گونه‌ها استفاده شده است که در آن‌ها، نمی‌توان نوع گونه را با اطمینان و دقت بالا به دست آورد و نوع روش تشخیصی و به احتمال کمتر، موقعیت جغرافیایی می‌تواند علت محدود بودن گونه‌های جدا شده در مطالعات مختلف باشد. البته در مطالعه‌ی فلاحتی و همکاران در تهران (۲۲) و نیز ناصری و همکاران در مشهد (۲۳) با روش مستقیم و کشت، ۸ گونه‌ی درماتوفیتی جدا شد که البته حجم نمونه در این مطالعات، دو برابر مطالعه‌ی حاضر بوده است. از این رو، حجم نمونه‌ی مورد مطالعه نیز از عوامل مهم تأثیرگذار در این تنوع گونه‌ای مطرح خواهد بود.

در مطالعه‌ی حاضر، تعداد ۴ مورد Arthroderma benhamiae گزارش گردید که این گونه توسط رضایی مته‌کلائی و همکاران در تحقیقی در اهواز به میزان (۰/۵ درصد) (۱۹) و در مطالعه‌ای در تهران ۵ مورد گزارش شده است (۲۴). در سایر مطالعات در ایران از این گونه یاد نشده است که این امر می‌تواند به دلیل عدم امکان شناسایی این گونه با روش‌های مرسوم فنوتیپی، تغییر در طبقه‌بندی درماتوفیت‌ها و عدم استفاده از روش‌های مولکولی در مطالعات گذشته باشد.

امروزه، تعیین گونه در بانک ژن جهانی بر اساس تعیین توالی ژن‌های درماتوفیت‌ها انجام می‌شود، اما در مطالعاتی که بر اساس کشت می‌باشند، گونه‌ها بر اساس ریخت‌شناسی تعیین گونه می‌شوند که با این روش افتراق گونه‌های مشتق از کمپلکس‌های گونه‌ای نظیر Trichophyton mentagrophytes سابق شامل Trichophyton mentagrophytes، Trichophyton interdigitale، Trichophyton benhamiae و Trichophyton erinacei غیر ممکن می‌باشد. مگر این که از روش‌های نوین مولکولی و حتی ژن‌های خاص در تعیین گونه استفاده شود. به هر حال، Nannizzia persicolor، Arthroderma benhamiae و Nannizzia fulva جزء گونه‌های نادر شناسایی شده در این مطالعه توسط روش PCR sequencing در شهر مشهد بودند که کمتر مطالعه‌ای در ایران این گونه‌ها را گزارش کرده‌اند. البته، ناصری و

همکاران (۲۳) گونه‌ی Nannizzia persicolor را در شهر مشهد به روش ریخت‌شناسی گزارش کرده بودند. گونه‌ی Nannizzia fulva نیز در این مطالعه برای دومین بار در ایران گزارش گردید (۲۵).

از دلایل دیگری که می‌توان به وجود این تنوع گونه‌ای در مشهد اشاره کرد، مهاجرت و سفرهای زیارتی زیادی است که به این شهر صورت می‌گیرد و برخی گونه‌ها نیز به صورت نوپدید مشاهده شده‌اند. در تحقیق حاضر، شایع‌ترین کچلی، کچلی بدن بود که با یافته های مطالعات فلاحتی و همکاران در تهران (۲۲)، ناصری و همکاران در مشهد (۲۳)، Hanumanthappa و همکاران در هند (۲۶) و نیز Panasiti و همکاران در ایتالیا (۲۷) مطابقت دارد. در حالی که چادگانی‌پور و همکاران در اصفهان (۲۹-۲۸) و Araj و همکاران در لبنان (۳۰) کچلی سر، Abanmi و همکاران در عربستان سعودی (۳۱) کچلی ناخن و Sahin و همکاران در ترکیه (۳۲) کچلی پا را به عنوان شایع‌ترین کچلی گزارش کرده بودند.

در مورد کچلی سر در این تحقیق، ۶ نفر مبتلا به کچلی سر شناسایی شدند که از این تعداد، ۱ مورد اندوتریکس با عامل اتیولوژیک Trichophyton tonsurans و ۵ مورد اکتوتریکس با عوامل اتیولوژیک Trichophyton interdigitale، Microsporum canis، Trichophyton tonsurans و Trichophyton mentagrophytes بودند. شایع‌ترین فرم کچلی سر در این مطالعه، کچلی اکتوتریکس بود که با نتایج مطالعات ناصری و همکاران در مشهد (۲۳) و آیت‌الهی موسوی در کرمان (۳۳) هم‌خوانی دارد.

در این تحقیق ۷ مورد کچلی ناخن مشاهده شد که ۸/۸ درصد موارد کچلی را تشکیل می دهد. در تمام این موارد، ناخن پا درگیر بود. ابتلای بیشتر ناخن های پا را به شرایط محیطی مناسب گرما و رطوبت ناشی از تعریق در کفش‌های محکم بسته شده می‌توان نسبت داد. Trichophyton interdigitale، اولین عامل اتیولوژیک این کچلی بود که با یافته های مطالعات زارعی محمودآبادی در اهواز (۳۴)، چادگانی‌پور و همکاران در اصفهان (۳۵، ۲۸)، محمدی و همکاران در اصفهان (۳۶)، زینی و همکاران در تهران (۳۷) و رضائی متهکلائی و همکاران (۱۹) که اولین و مهم ترین عامل کچلی ناخن را این گونه اعلام کرده اند، مطابقت دارد. در مطالعه ی حاضر، دو مورد کچلی پا دیده شد که ۲/۵ درصد موارد کچلی را تشکیل می‌داد و کمترین شیوع را در این مطالعه داشت. احتمال می‌رود شیوع کم این کچلی در این مطالعه و مطالعات مشابه مانند مطالعه ی امیدی‌نیا و همکاران (۳۸)، به این علت باشد که ضایعات تظاهرات بالینی شدیدی ندارند و به طور معمول، بیماران شکایت خاصی نداشته‌اند و حتی گاهی از آلودگی خود در بین انگشتان پا خبر ندارند و به پزشک مراجعه نمی کنند و به عنوان یک مخزن برای درماتوفیتوزیس محسوب می‌شوند. عامل کچلی پا در این مطالعه، Trichophyton interdigitale بود که با نتایج مطالعه‌ی فلاحتی و همکاران (۲۲) مطابقت دارد. در این مطالعه، ۶ مورد کچلی دست با شیوع ۷/۵ درصد مشاهده شد که این شیوع با مطالعه‌ی زارعی محمود آبادی در اهواز (۳۴) مطابقت داشت.

در نهایت، مطالعه‌ی حاضر نشان داد که با استفاده از روش PCR sequencing می‌توان تنوع گونه‌ای درماتوفیت‌ها در یک منطقه را به خوبی تعیین کرد و از این طریق، جهت ردیابی منبع عوامل ایجاد کننده، کنترل و پیش‌گیری و اپیدمیولوژی آن‌ها اطلاعات دقیقی را کسب کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد قارچ‌شناسی پزشکی به شماره‌ی آ-۰۹۹۹ و طرح پژوهشی با کد ۹۳۱۷۰۷ مصوب کمیته‌ی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و مؤسسه‌ی ملی توسعه‌ی تحقیقات پزشکی ایران (National Institute for Medical Research Development یا NIMAD) با شماره‌ی گرانت ۹۵۸۷۹۷ است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسؤولین مربوط به خاطر تصویب طرح و حمایت مالی از اجرای آن ابراز می‌دارند.

References

1. de Hoog GS, Dukik K, Monod M, Packeu A, Stubbe D, Hendrickx M, et al. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. Mycopathologia 2017; 182(1-2): 5-31.
2. Rezaei-Matehkolaei A, Mirhendi H, Makimura K, de Hoog GS, Satoh K, Najafzadeh MJ, et al. Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes. Med Mycol 2014; 52(7): 674-88.
3. Koksal F, Er E, Samasti M. Causative agents of superficial mycoses in Istanbul, Turkey: retrospective study. Mycopathologia 2009; 168(3): 117-23.
4. Faggi E, Pini G, Campisi E, Bertellini C, Difonzo E, Mancianti F. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. J Clin Microbiol 2001; 39(9): 3382-5.
5. Brillowska-Dabrowska A, Saunte DM, Arendrup MC. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of Trichophyton rubrum. J Clin Microbiol 2007; 45(4): 1200-4.
6. Liu D, Pearce L, Lilley G, Coloe S, Baird R, Pedersen J. PCR identification of dermatophyte fungi Trichophyton rubrum, T. soudanense and T. gourvilii. J Med Microbiol 2002; 51(2): 117-22.
7. Magill SS, Manfredi L, Swiderski A, Cohen B, Merz WG. Isolation of Trichophyton violaceum and Trichophyton soudanense in Baltimore, Maryland. J Clin Microbiol 2007; 45(2): 461-5.

8. Mirhendi H, Makimura K, de Hoog GS, Rezaei-Matehkolaei A, Najafzadeh MJ, Umeda Y, et al. Translation elongation factor 1-alpha gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. Med Mycol 2015; 53(3): 215-24.
9. Balajee SA, Sigler L, Brandt ME. DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century. Med Mycol 2007; 45(6): 475-90.
10. Kanbe T, Suzuki Y, Kamiya A, Mochizuki T, Fujihiro M, Kikuchi A. PCR-based identification of common dermatophyte species using primer sets specific for the DNA topoisomerase II genes. J Dermatol Sci 2003; 32(2): 151-61.
11. Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. Med Mycol 2002; 40(1): 87-109.
12. Graser Y, Scott J, Summerbell R. The new species concept in dermatophytes-a polyphasic approach. Mycopathologia 2008; 166(5-6): 239-56.
13. Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, Shidfar M, Zaini F, Eshraghian M, Jalalizand N, et al. Use of Single-enzyme PCR-restriction Digestion Barcode Targeting the Internal Transcribed Spacers (ITS rDNA) to Identify Dermatophyte Species. Iran J Public Health 2012; 41(3): 82-94.
14. Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, de Hoog GS, Shidfar MR, Satoh K, Najafzadeh MJ, et al. Multilocus differentiation of the related dermatophytes Microsporum canis, Microsporum ferrugineum and Microsporum audouinii. J Med Microbiol 2012; 61(Pt 1): 57-63.
15. Ninet B, Jan I, Bontems O, Lechenne B, Jousson O, Panizzon R, et al. Identification of dermatophyte species by 28S ribosomal DNA sequencing with a commercial kit. J Clin Microbiol 2003; 41(2): 826-30.
16. Maraki S, Nioti E, Mantadakis E, Tselentis Y. A 7-year survey of dermatophytoses in Crete, Greece. Mycoses 2007; 50(6): 481-4.
17. Roque HD, Vieira R, Rato S, Luz-Martins M. Specific primers for rapid detection of Microsporum audouinii by PCR in clinical samples. J Clin Microbiol 2006; 44(12): 4336-41.
18. Graser Y, Kuijpers AF, Presber W, de Hoog GS. Molecular taxonomy of the Trichophyton rubrum complex. J Clin Microbiol 2000; 38(9): 3329-36.
19. Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, de 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; 51(2): 203-7.
20. Khosravi AR, Aghamirian MR, Mahmoudi M. Dermatophytoses in Iran. Mycoses 1994; 37(1-2): 43-8.
21. Korstanje MJ, Staats CC. Fungal infections in the Netherlands. Prevailing fungi and pattern of infection. Dermatology 1995; 190(1): 39-42.
22. Falahati M, Akhlaghi L, Lari AR, Alaghehbandan R. Epidemiology of dermatophytoses in an area south of Tehran, Iran. Mycopathologia 2003; 156(4): 279-87.
23. Naseri A, Fata A, Najafzadeh MJ, Shokri H. Surveillance of dermatophytosis in northeast of Iran (Mashhad) and review of published studies. Mycopathologia 2013; 176(3-4): 247-53.
24. Rezaei-Matehkolaei A, Rafiei A, Makimura K, Graser Y, Gharghani M, Sadeghi-Nejad B. Epidemiological Aspects of Dermatophytosis in Khuzestan, southwestern Iran, an Update. Mycopathologia 2016; 181(7-8): 547-53.
25. Nouripour-Sisakht S, Rezaei-Matehkolaei A, Abastabar M, Najafzadeh MJ, Satoh K, Ahmadi B, et al. Microsporum fulvum, an ignored pathogenic dermatophyte: a new clinical isolation from Iran. Mycopathologia 2013; 176(1-2): 157-60.
26. Hanumanthappa H, Sarojini K, Shilpashree P, Muddapur SB. Clinicomycological study of 150 cases of dermatophytosis in a tertiary care hospital in South India. Indian J Dermatol 2012; 57(4): 322-3.
27. Panasiti V, Devirgiliis V, Borroni RG, Mancini M, Curzio M, Rossi M, et al. Epidemiology of dermatophytic infections in Rome, Italy: a retrospective study from 2002 to 2004. Med Mycol 2007; 45(1): 57-60.
28. Chadeganipour M, Mohammadi R. Causative Agents of Onychomycosis: A 7-Year Study. J Clin Lab Anal 2016; 30(6): 1013-20.
29. Chadeganipour M, Mohammadi R, Shadzi S. A 10-Year Study of Dermatophytoses in Isfahan, Iran. J Clin Lab Anal 2016; 30(2): 103-7.
30. Araj GF, Racoubian ES, Daher NK. Etiologic agents of dermatophyte infection in Lebanon. J Med Liban 2004; 52(2): 59-63.
31. Abanmi A, Bakheshwain S, El Khizzi N, Zouman AR, Hantirah S, Al Harthi F, et al. Characteristics of superficial fungal infections in the Riyadh region of Saudi Arabia. Int J Dermatol 2008; 47(3): 229-35.
32. Sahin I, Oksuz S, Kaya D, Sencan I, Cetinkaya R. Dermatophytes in the rural area of Duzce, Turkey. Mycoses 2004; 47(11-12): 470-4.
33. Ayetollahi Mosavi SA, Safizadeh H, Hadizadeh S. Epidemiology of dermatophytosis in patients referred to the medical mycology laboratory of Afzalipoor Faculty of Medicine in Kerman in 2007-2011. Dermatol Cosmet 2012; 3(2): 114-23. [In Persian].
34. Mahmoudabadi AZ. A study of dermatophytosis in South West of Iran (Ahwaz). Mycopathologia 2005; 160(1): 21-4.
35. Chadeganipour M, Nilipour S, Ahmadi G. Study of onychomycosis in Isfahan, Iran. Mycoses 2010; 53(2): 153-7.
36. Mohammadi R, Abastabar M, Mirhendi H, Badali H, Shadzi S, Chadeganipour M, et al. Use of restriction fragment length polymorphism to rapidly identify dermatophyte species related to dermatophytosis. Jundishapur J Microbiol 2015; 8(6): e17296.
37. Zaini F, Mahmoudi M, Mehbod A, Kordbacheh P, Safara M. Fungal nail infections in Tehran, Iran. Iran J Public Health 2009; 38(3): 46-53.
38. Omidynia E, Farshchian M, Sadjjadi M, Zamanian A, Rashidpouraei R. A study of dermatophytoses in Hamadan, the governmentship of West Iran. Mycopathologia 1996; 133(1): 9-13.

DOI: *10.22122/jims.v37i520.11374* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 37, No. 520, 4th Week, May 2019**

Received: 17.02.2018 Accepted: 17.03.2019 Published: 12.05.2019

Identification of Dermatophytosis Agents in Mashhad, Iran, by Using Polymerase Chain Reaction Sequencing (PCR Sequencing) Method

Raheleh Nejati-Hoseini[1], Hossein Zarrinfar[2], Mahmoud Parian[1], Saeid Parham[1], Abdolmajid Fata[3], Ali Rezaei-Matehkolaei[4], Mohammad Javad Najafzadeh[5]

Original Article

Abstract

Background: Dermatophytes are a group of fungi that attack keratinous tissues of the skin, hair, and nail in humans and animals, and cause infections called dermatophytosis (tinea). Since identification of pathogenic fungi at the species level is essential for the detection of the source, control and prevention, and identifying epidemiology of infection, it is necessary to use specific and sensitive diagnostic methods to identify the causes of dermatophytosis.

Methods: The clinical samples (skin, nail, and hair) of patients with dermatophytosis in Mashhad City, Iran, were cultured in Mycosyl Agar culture media, and the DNA of obtained dermatophyte colonies were extracted by specific kit. The internal transcribed spacer (ITS) gene was amplified and sequenced by ITS1, ITS4 primers. Finally, the sequencing results were analyzed using SeqMan software, and were compared with the data of the global genebank.

Findings: In this study, 80 dermatophyte isolates were sequenced, which included 9 dermatophyte species as 23 (28.8%) Trichophyton (T.) interdigital, 18 (22.5%) T. tunsorans, 10 (12.5%) Epidermophyton fluccosum, 10 (12.5%) of T. mentagrophytes, 8 (10%) Microsporum canis, 4 (5%) T. rubrum, 4 (5%) T. benhamiae, 2 (2.5%) Nannizzia (N.) fulvum, 1 (1.2%) N. persicolor.

Conclusion: According to report the rare species of dermatophytes in this study, the use of molecular methods such as sequencing of the ITS gene can determine the diversity of dermatophytes in a region more precisely than morphological methods.

Keywords: Dermatophytosis, DNA sequencing, Iran

Citation: Nejati-Hoseini R, Zarrinfar H, Parian M, Parham S, Fata A, Rezaei-Matehkolaei A, et al. **Identification of Dermatophytosis Agents in Mashhad, Iran, by Using Polymerase Chain Reaction Sequencing (PCR Sequencing) Method.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(520): 256-62.

1- Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
2- Assistant Professor, Allergy Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
3- Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
4- Associate Professor, Department of Medical Mycology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
5- Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
Corresponding Author: Mohammad Javad Najafzadeh, Email: najafzadehmj@mums.ac.ir