مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۲۵/هفته اول اردیبهشت ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۶

شناسایی اختصاصی کاندیدا گلابراتا با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا

علی عینلو[۱]، دکتر پروین دهقان[۲]، دکتر مجتبی صلوتی[۳]، دکتر سینا میرزااحمدی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کاندیدا گلابراتا یکی از شایع‌ترین گونه‌های جنس کاندیدا است که به دلیل توانایی کسب مقاومت دارویی، شناسایی سریع آن جهت درمان عفونت‌ها ضروری به نظر می‌رسد. روش‌های شناسایی متداول گونه‌های کاندیدا اغلب وقت‌گیر و پر دردسر هستند. امروزه، استفاده از نانوذرات، به دلیل خصوصیات منحصر به فردشان، گسترش زیادی یافته است. هدف از تحقیق حاضر، تشخیص سریع آزمایشگاهی کاندیدا گلابراتا با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا بود.

روش‌ها: کاندیدا گلابراتا در محیط مایع Yeasts Extract Peptone Dextrose (YEPD) کشت داده شد و DNA آن استخراج گردید. سپس توالی ژن اختصاصی آن (CAGL0M05005g) از بانک اطلاعات ژنتیک کاندیدا به دست آمد. جهت انجام Polymerase chain reaction (PCR)، پرایمرها و پروب مربوط توسط نرم‌افزار Oligo 7 طراحی گردید. محصول PCR و پروب تحت دناتوراسیون و دمای اتصال بهینه قرار گرفت. سپس نانوذرات طلا به آن افزوده شد و تغییر رنگ محلول به صورت چشمی و با استفاده از اسپکتروفتومتر Ultraviolet-visible (UV-vis) و Transmission electron microscopy (TEM) بررسی گردید. جهت بررسی حساسیت روش جدید، از محصول PCR با رقت‌های مختلف استفاده شد و نتایج با روش ژل الکتروفورز مقایسه گردید.

یافته‌ها: دماهای بهینه‌ی اتصال پرایمر به DNA الگو و هیبریداسیون پروب تعیین گردید. پس از افزودن نانوذرات طلا، رنگ محلول از قرمز به بنفش تغییر یافت و نتایج حاصل با استفاده از اسپکتروسکوپی و TEM تأیید شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که روش جدید یک روش سریع نسبت به روش‌های متداول و حساس نسبت به روش ژل الکتروفورز جهت شناسایی کاندیدا گلابراتا می‌باشد.

واژگان کلیدی: کاندیدا گلابراتا، نانوذرات طلا، رنگ سنجی

ارجاع: عینلو علی، دهقان پروین، صلوتی مجتبی، میرزااحمدی سینا. **شناسایی اختصاصی کاندیدا گلابراتا با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۲۵): ۲۴۱-۲۳۱

مقدمه

در طی دهه‌های اخیر افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، کورتیکواستروئیدها، داروهای سرکوب کننده‌ی سیستم ایمنی، شیمی درمانی، رادیوتراپی، افزایش بیماری‌های نقص سیستم ایمنی، دیابت و ...، راه را برای گسترش طیف وسیعی از عفونت‌های

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران
۴- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر پروین دهقان
Email: dehghan@med.mui.ac.ir

فرصت طلب مخاطی، جلدی، گوارشی، ریوی و سیستمیک قارچی هموار کرده است (۱). عفونت کاندیدایی، در صورت تهاجم شدید، حتی ممکن است به مرگ بیمار منتهی شود (۳-۲). هر چند کاندیدا آلبیکنس عامل اصلی بسیاری از عفونت‌های کاندیدایی به شمار می‌رود. گزارش‌های اخیر از کشورهای مختلف، تغییر در الگوی اپیدمیولوژی این بیماری به سمت گونه‌های غیرآلبیکنس (Non-albicans) را نشان می‌دهد (۶-۴). طی دهه‌های اخیر، افزایش کاندیدمی ناشی از کاندیدا گلابراتا (C. glabrata)، کاندیدا پاراپسیلوزیس (C. parapsilosis) و کاندیدا کروزه‌ای (C. krusei)، به خصوص در بیماران مبتلا به سرطان، افزایش نگران کننده‌ای داشته است (۷). در سال ۲۰۰۹، کاندیدا گلابراتا پس از کاندیدا آلبیکنس به عنوان دومین عامل کاندیدیازیس سطحی و مهاجم بزرگسالان در ایالات متحده گزارش شده است (۸). همچنین، کاندیدا گلابراتا به عنوان عامل عفونت‌های بیمارستانی اهمیت داشته و طبق تحقیق به عمل آمده توسط Fraser و همکاران، در بین گونه‌های کاندیدایی عامل ایجاد عفونت در بیماران مستعد، رتبه‌ی چهارم را به دست آورده است (۹). از ویژگی‌های آزمایشگاهی این قارچ، وجود بلاستوکونیدی‌های بیضی شکل و عدم توان تولید میسلیوم کاذب (Pseudohyphae)، لوله‌ی زایا (Germ tube) و کلامیدیوکونیدی (Clamydoconidia) است. همچنین، در محیط کشت CHROMagar، ایجاد کلنی‌های صورتی رنگ می‌نماید. به طور کلی، در مقایسه با کاندیدا آلبیکنس، در مورد سایر گونه‌های کاندیدا مطالعات اندکی صورت گرفته است. لذا، شناسایی این ارگانیسم و تلاش در جهت پیش‌گیری از عفونت و نیز درمان صحیح و به موقع بیماری ضروری به نظر می‌رسد (۱۰).

روش‌های مختلفی برای شناسایی گونه‌های کاندیدا وجود دارد. روش‌های متداول و قدیمی بیشتر مبتنی بر خصوصیات مورفولوژی از قبیل ویژگی‌های کلنی بر روی محیط کشت Sabouraud Dextrose Agar، ایجاد لوله‌ی زایا و کلامیدوکونیدی و نیز خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژی، نظیر الگوهای جذب و تخمیر قندها، می‌باشد (۱۳-۱۱). برای انجام این روش‌ها جهت شناسایی ایزوله‌ها، چندین روز زمان لازم است. در سالیان اخیر روش‌های شناسایی ژنوتیپی، به خصوص استفاده از تکنیک PCR (Polymerase chain reaction) گسترش قابل توجهی یافته و توانایی شناسایی سریع‌تر و صحیح‌تر را نسبت به روش‌های قدیمی فراهم کرده است (۱۴). تجزیه و تحلیل نتایج PCR با استفاده از الکتروفورز محصولات روی ژل آگارز یا اکریل‌آمید صورت می‌گیرد که علاوه بر نیاز به تجهیزات و مواد مربوط، به نسبت زمان‌بر است. مدل‌های پیشرفته‌ای از PCR، مانند Real-time PCR، با استفاده از فن‌آوری انتقال انرژی فلورسانس تشدید یافته، باعث تسریع در روند تشخیص مولکولی شده است؛ با این وجود، برای انجام Real-time PCR، نیاز به فراهم نمودن پروب های اختصاصی است که موجب پرهزینه شدن روش می‌گردد (۱۵).

روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا (GNPs یا Gold nanoparticles)، یک روش جدید به نسبت سریع و حساس می‌باشد که تشخیص DNA تکثیر شده (در صورت وجود) با استفاده از پروب تک

رشته‌ای و نانوذرات طلا با ایجاد تغییر رنگ مخلوط واکنش صورت می‌گیرد.

نانوذرات (Nanoparticles) دارای خصوصیات بی‌نظیری از قبیل اندازه‌ی بسیار کوچک، نسبت سطح بزرگ به حجم و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاصی می‌باشند که مواد در مقیاس بزرگ‌تر فاقد این ویژگی‌ها هستند. در واقع، اندازه‌ی ذره به حدی می‌رسد که بر اثرات کوانتومی غلبه کرده، علاوه بر تأثیر بر ویژگی‌های ذره، بر روی واکنش آن با سایر ذرات نیز تأثیر گذار است (۱۸-۱۶). فلز طلا نیز هنگامی که به ابعاد نانو در می‌آید، خواص فیزیکی و شیمیایی متفاوتی از خود نشان می‌دهد و تغییرات محسوسی در رنگ آن بسته به سایز ذرات دیده می‌شود (۲۰-۱۹). اصول روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا، بر این اساس است که اگر DNA مورد نظر تکثیر یافته باشد، پروب مربوط با محصول PCR مکمل شده، نانوذرات طلا به صورت آزاد و رها در محلول باقی مانده، اضافه نمودن محلول نمک موجب تجمع نانوذرات طلا و تغییر رنگ می‌شود (۲۱). در صورت عدم حضور محصول PCR اختصاصی پروب‌ها در محلول به صورت آزاد و رها باقی مانده، با جذب نانوذرات طلا مانع از تجمع آن‌ها شده، هیچ گونه تغییر رنگی رخ نمی‌دهد. هدف از تحقیق حاضر، راه‌اندازی یک روش جدید مبتنی بر نانوتکنولوژی جهت شناسایی اختصاصی کاندیدا گلابراتا با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا است.

روش‌ها

آنزیم تک پلیمراز، دزوکسی نوکلئوتید تری‌فسفات، PCR بافر، DNA سایز مارکر، کلرید منیزیم، اتیدیوم بروماید، بافر TBE (Tris/Borate/ Ethylenediaminetetraacetic acid) از شرکت سیناکلون و نانوذرات طلا از شرکت US NANO خریداری گردید. سفارش ساخت پرایمرها و پروب طراحی شده به شرکت ژن فن‌آوران ایران داده شد. همچنین، سویه‌ی استاندارد کاندیدا گلابراتا (PTCC5297) از بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران به صورت آمپول لیوفیلیزه تهیه گردید.

کشت میکروارگانیسم: ابتدا مخمر مذکور در محیط کشت قارچی Sabouraud dextrose agar کشت داده شد. پس از ۴۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های به دست آمده از لحاظ ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. جهت حصول اطمینان از ویژگی‌های مورفولوژی بر روی محیط CHROMagar کاندیدا، Corn Meal Agar توئین ۸۰ و نیز سرم به منظور بررسی رنگ کلنی، ایجاد میسلیوم کاذب و لوله زایا کشت داده شد.

استخراج DNA: تولید انبوه میکروارگانیسم با تلقیح آن در محیط کشت مایع Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD) به مدت ۳۰-۲۴ ساعت در انکوباتور Shakerدار با دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه انجام و DNA مخمر به صورت دستی و با استفاده از روش اعمال حرارت و برودت استخراج شد (۲۲). جهت اطمینان از نتیجه‌ی استخراج DNA، محصول به دست آمده بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز و بررسی گردید.

طراحی پرایمر و پروب: توالی ژن اختصاصی کاندیدا گلابراتا (CAGL0M05005g) از بانک اطلاعات ژنتیک کاندیدا (candidagenome.org) به دست آمد و جهت انجام PCR، پرایمرهای پیش‌ران (Forward primer) و برگشتی (Reverse primer) برای تکثیر اختصاصی توالی ژن فوق توسط نرم‌افزار Oligo 7 طراحی و توالی آن به صورت زیر به دست آمد:

Forward primer:
5′ GAGTGGTATGACGAGCAATGGT3′
Reverse primer:
5′TTGTATTGAAGATTCCCTCCCATATATC3′

پروب الیگونوکلئوتیدی مکمل محصول PCR در موقعیت داخلی نیز توسط نرم‌افزار Oligo 5 طراحی و توالی مذکور به صورت زیر به دست آمد:

Probe: 5′TACGGCTGGCGATTG3′

اختصاصی بودن توالی نوکلئوتیدی پرایمرها برای شناسایی ژن اختصاصی کاندیدا گلابراتا در سایت National Center of Biotechnology (NCBI) با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Blast بررسی و تأیید شد.

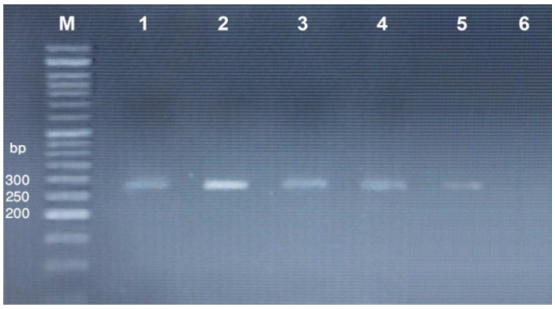
PCR: برای انجام PCR، از مواد زیر با غلظت‌های ذکر شده برای هر واکنش ۳۰ میکرولیتری استفاده شد: PCR Buffer (۱X)، MgCl2 (۱/۵ mM)، dNTP (۰/۱ mM)، پرایمر پیش‌ران و برگشتی هر کدام ۲۰ Pmol، DNA template (۱۰ ng) و آنزیم Taq DNA polymerase (۱ U). جهت بهینه سازی دمای اتصال پرایمر برای انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر گرادیانت (Eppendorf Gradient Mastercycler) و با اعمال شیب دمایی استفاده گردید. پس از اتمام PCR، جهت اطمینان از انجام تکثیر مطلوب محصولات به دست آمده با دماهای مختلف در ژل آگارز ۲ درصد با روش الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت و واضح‌ترین باند الکتروفورزی که نشان‌گر بهترین دمای اتصال برای انجام PCR ژن (CAGL0M05005g) بود، تعیین گردید.

رنگ‌سنجی: بهینه سازی دمای هیبریداسیون پروب به محصول PCR نیز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر گرادیان و با اعمال شیب دمایی انجام گردید. برای این کار، ابتدا ۴ میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتری انتخاب و داخل هر کدام، مقدار ۵ میکرولیتر بافر فسفات ریخته شد. سپس، مقدار ۲۰۰ نانوگرم محصول PCR و ۱۰۰ نانوگرم پروب الیگونوکلئوتیدی به مخلوط اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه تحت دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت تا دو رشته‌ی DNA از هم جدا شوند؛ سپس، به مدت ۱۰ دقیقه جهت اتصال پروب به محصول PCR تحت گرادیان دمایی قرار گرفت. پس از خارج نمودن از دستگاه ترموسایکلر، به هر کدام مقدار ۷۰ میکرولیتر نانوذرات طلای کروی با سایز ۱۵ نانومتر که به وسیله‌ی آب دیونیزه رقیق شده بود، اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. سپس، به تدریج محلول کلرید سدیم ۰/۵ مولار اضافه شد و نحوه‌ی تغییر رنگ مخلوط واکنش به صورت چشمی مورد بررسی قرار گرفت و دمای بهینه‌ی هیبریداسیون پروب به محصول PCR، از روی بیشترین و واضح‌ترین تغییر رنگ تعیین شد. برای اطمینان از صحت عملکرد این روش، از کنترل منفی نیز استفاده گردید. جهت این کار، در ۴ لوله‌ی مربوط، به عنوان کنترل منفی، از آب دیونیزه به جای محصول PCR اختصاصی استفاده شد و آزمون رنگ‌سنجی بر روی آن‌ها نیز صورت گرفت و تغییر

رنگ نمونه‌ها بررسی شد. جهت تأیید نتایج میزان جذب نوری، واکنش‌های مثبت و منفی با استفاده از اسپکتروسکوپی جذب Ultraviolet–visible (UV-vis) بررسی شد. همچنین، برای مانیتورینگ تجمع نانوذرات طلا با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmition Electron Microscope یا TEM) مدل Philips EM 208، نمونه‌های واکنش مثبت (حاوی محصول PCR اختصاصی کاندیدا گلابراتا) و نمونه‌های کنترل منفی (حاوی آب دیونیزه) مورد عکس‌برداری قرار گرفت. برای سنجش حساسیت روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا نسبت به روش ژل الکتروفورز، از محصولات PCR رقیق شده با نسبت‌های ۱:۲، ۱:۴، ۱:۱۰ و ۱:۲۰ استفاده شد و با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز و رنگ‌سنجی، نتایج مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

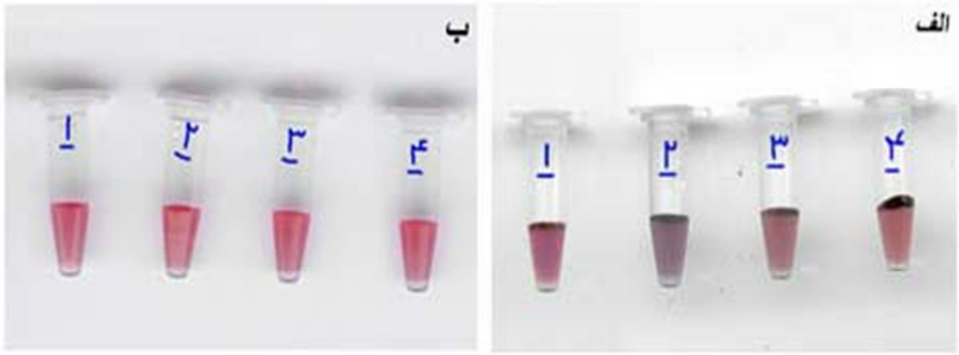
در بررسی نتایج کشت سویه‌ی استاندارد کاندیدا گلابراتا بر روی محیط Corn Meal Agar حاوی توئین ۸۰، تنها بلاستوکونیدی‌های بیضی شکل ریز و بدون سودوهایف و کلامیدیوکونیدی مشاهده شد. همچنین در محیط سرم، جرم تیوب مشاهده نشد و در محیط کشت CHROMagar، کلنی‌های صورتی رنگ مشاهده گردید که نتایج تأییدی بر ویژگی‌های کاندیدا گلابراتا بود (۲۳). پس از انجام PCR ژن اختصاصی کاندیدا گلابراتا (CAGL0M05005g) در دماهای مختلف، محصولات به دست آمده بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید و با استفاده از دستگاه Transiluminator (UV TEC, UK) تحت تابش اشعه‌ی ماورای بنفش، باند مربوط مشاهده شد (شکل ۱). واضح‌ترین باند الکتروفورزی که نشان‌گر بهترین دمای اتصال برای انجام PCR ژن مذکور بود، در دمای ۵۱/۳ درجه‌ی سانتی‌گراد تعیین گردید و با استفاده از سیستم Gel documentation عکس‌برداری شد (باند شماره‌ی ۲).



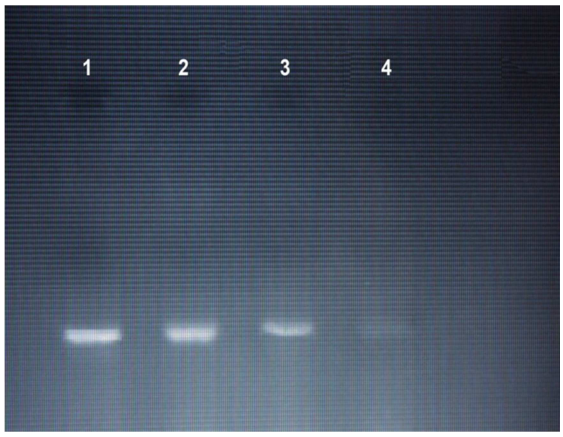
شکل ۱. باند محصولات Polymerase chain reaction ژن (CAGL0M05005g) بر روی ژل آگارز
M: سایز مارکر شرکت سیناژن 50bp DNA Ladder
۶-۱ به ترتیب دماهای اتصال ۵۰/۳، ۵۱/۳، ۵۲/۲، ۵۳/۳، ۵۴/۴ و ۵۵/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد

با انجام آزمون رنگ‌سنجی در لوله‌هایی که دارای محصول PCR اختصاصی بودند، تغییر رنگ قرمز به بنفش مشاهده شد ولی در لوله‌های کنترل منفی، که فاقد محصول PCR اختصاصی بودند، هیچ گونه تغییر رنگی مشاهده نشد. در لوله‌های واکنش مثبت نیز بیش‌ترین تغییر رنگ مربوط به بهینه‌ی دمای اتصال پروب به محصول PCR بود که ۴۷/۹ درجه‌ی سانتی‌گراد تعیین گردید (شکل ۲).

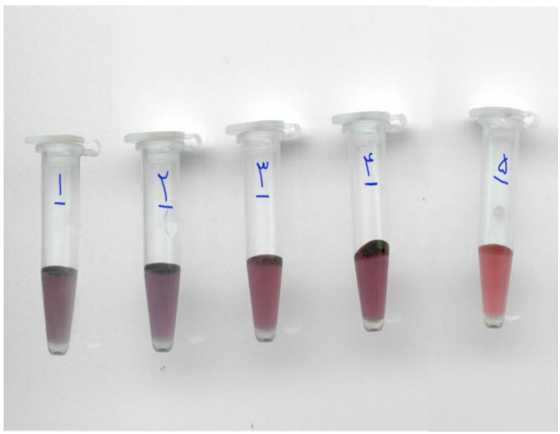
در بررسی حساسیت آزمون رنگ‌سنجی نسبت به ژل الکتروفورز، پس از الکتروفورز محصولات PCR رقیق شده بر روی ژل آگارز، در ردیف مربوط به رقت‌های ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۱۰ باند مربوط مشاهده شد؛ در حالی که با رقت ۱:۲۰، باند واضحی روی ژل آگارز مشاهده نگردید (شکل ۳).



شکل ۲. عکس لوله‌های آزمون رنگ سنجی؛ الف: لوله‌های واکنش مثبت، ب: لوله‌های کنترل منفی ردیف‌های ۴-۱ به ترتیب مربوط به دماهای اتصال ۴۶/۸، ۴۷/۹، ۴۸/۹ و ۴۹/۴ درجه‌ی سانتی‌گراد



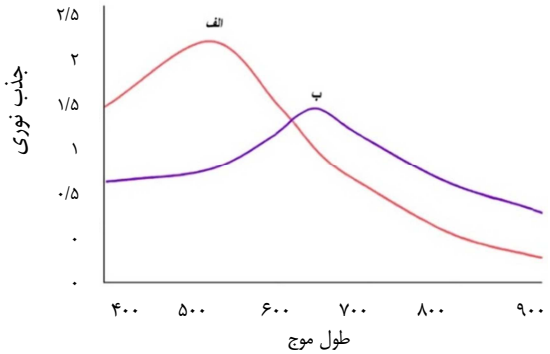
شکل ۳. باند محصولات Polymerase chain reaction ژن (CAGL0M05005g) رقیق شده بر روی ژل آگارز ردیف‌های ۴-۱ به ترتیب رقت‌های ۱:۲، ۱:۴، ۱:۱۰ و ۱:۲۰



شکل ۴. عکس لوله‌های روش رنگ سنجی لوله‌های ۴-۱ به ترتیب مربوط به رقت‌های ۱:۲، ۱:۴، ۱:۱۰، ۱:۲۰ محصول Polymerase chain reaction و لوله‌ی شماره‌ی ۵: کنترل منفی

از همان رقت‌ها برای انجام عمل رنگ‌سنجی نیز استفاده شد و تغییر رنگ صورتی به بنفش در تمامی رقت‌های ۱:۲، ۱:۴، ۱:۱۰ و ۱:۲۰ قابل مشاهده بود (شکل ۴).

با انجام اسپکتروسکوپی نمونه‌های مورد آزمایش، واکنش‌های مثبت (نمونه‌هایی که تغییر رنگ صورتی به بنفش داشتند) بیشترین جذب نوری را در طول موج ۶۵۰ نانومتر نشان دادند؛ در حالی که، برای واکنش‌های کنترل منفی، بیشترین جذب نوری در طول موج ۵۲۰ نانومتر به دست آمد (شکل ۵).



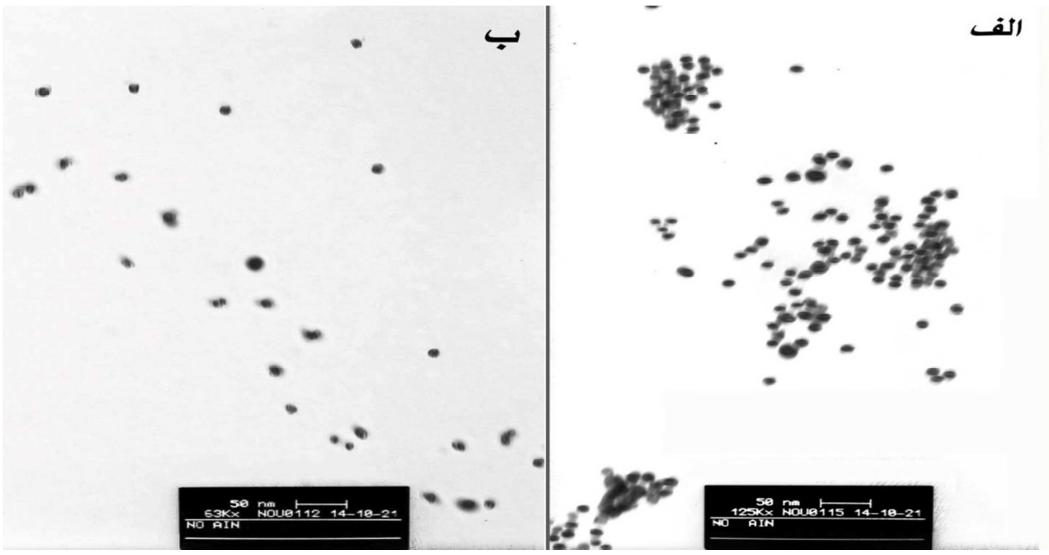
شکل ۵. نمودار الف: λMax واکنش کنترل منفی (عدم حضور محصول تکثیر یافته)
نمودار ب: λMax واکنش مثبت (حضور محصول تکثیر یافته)

با استفاده از عکس‌برداری توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری، تجمع نانوذرات طلا در نمونه‌های واکنش مثبت، آن‌هایی که تغییر رنگ صورتی به بنفش داشتند، و عدم تجمع نانوذرات طلا در نمونه‌های کنترل منفی (عدم تغییر رنگ) مشخص گردید (شکل ۶).

بحث

شناسایی گونه‌های کاندیدا با استفاده از روش‌های تشخیص آزمایشگاهی متداول، همانند به کارگیری محیط‌های کشت معمولی مانند Sabouraud dextrose agar و عصاره‌ی مالت آگار امکان‌پذیر نمی‌باشد. ایراد به کار گیری محیط کشت افتراقی کروموژنیک CHROMagar کاندیدا، محدودیت در شناسایی گونه‌ها است؛ ضمن این که، به زمان بیشتری برای دست‌یابی به جواب نیازمند است. آزمون‌های بیوشیمیایی، وقت‌گیر و یا در بعضی موارد پرهزینه هستند. آزمایش‌های سرولوژی، حساسیت یا جنبه‌ی اختصاصی محدودی دارند. آنتی‌بادی سرمی و ایمنی با واسطه‌ی سلولی نیز در اکثر افراد قابل مشاهده هستند که ناشی از تماس دائمی با مخمر کاندیدا می‌باشند. سنجش آنتی‌بادی در افراد با ایمنی سرکوب شده نیز به علت عدم توانایی پاسخ به عفونت، دشوار است.

آزمون بررسی تولید لوله‌ی زایا یکی از ابتدایی‌ترین روش‌های تشخیص کاندیدا آلبیکنس از گونه‌های غیرآلبیکنس است که البته با پیدایش گونه‌های جدید دارای خصوصیت تولید لوله‌ی زایا، برای شناسایی دقیق گونه، انجام آزمایشات تکمیلی ضروری است. استفاده از محیط کشت Corn Meal Agar، جهت بررسی توانایی تولید بلاستوکونیدی، کلامیدوکونیدی و میسلیوم کاذب علاوه بر وقت گیر بودن، به طور کامل اختصاصی نبوده، شناسایی دقیق گونه‌ها مستلزم انجام آزمایشات دیگری است؛ چرا که، برخی از روش‌های تشخیصی متداول با پیدایش گونه‌های جدید در حقیقت اختصاصیت خود را از دست داده است.



شکل ۶. عکس میکروسکوپ الکترونی عبوری؛ الف) مربوط به نمونه‌ی واکنش مثبت که تجمع نانوذرات طلا مشاهده می‌شود. ب) مربوط به نمونه‌ی واکنش منفی که نانوذرات طلا به‌صورت منفرد و پخش هستند.

به طور کلی، انجام تمامی روش‌های مذکور جهت شناسایی ایزوله‌ها، چندین روز زمان لازم داشته، به نفع بیمار و آزمایشگاه نمی‌باشد. استفاده از کیت‌های تجارتی API، سیستم خودکار Vitek و Sequencing نیز جهت شناسایی گونه‌ها، به دلیل هزینه‌ی زیاد غیر قابل کاربرد روزمره در آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی است (۲۴).

شناسایی گونه‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR، بر اساس خصوصیات ژنوتیپی استوار می‌باشد که در سالیان اخیر گسترش قابل توجهی یافته و شناسایی سریع‌تر و صحیح‌تر را نسبت به روش‌های قدیمی فراهم کرده است (۱۵-۱۴). اما، تجزیه و تحلیل نتایج PCR، با استفاده از الکتروفورز محصول به دست آمده بر روی ژل صورت می‌گیرد که نیاز به تجهیزات و مواد مربوط دارد.

روش‌های تشخیصی رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات، به دلیل سادگی و چند منظوره بودن، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در سال‌های اخیر، شناسایی و تشخیص پاتوژن‌های مواد غذایی با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا گسترش یافته است (۲۵). Gill و همکاران توانستند 16S rRNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را به روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا شناسایی کنند (۲۶). در مطالعه‌ی Shankaracharya و همکاران در هند نیز با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا، در مدت زمان کوتاهی با حساسیت بالا، گونه‌های سالمونلا تشخیص داده شد (۲۱). تا زمان انجام این پژوهش، هیچ گونه تحقیقی در رابطه با تشخیص اختصاصی گونه‌های قارچی با استفاده از نانوذرات طلا به روش رنگ‌سنجی صورت نگرفته بود.

در تحقیق حاضر، از تکنیک PCR استفاده شد و با انجام آزمون رنگ‌سنجی، در واقع مرحله‌ی الکتروفورز محصول به دست آمده بر روی ژل حذف گردید؛ که علاوه بر سرعت عمل، نیاز به تجهیزات مربوط از قبیل تانک الکتروفورز، Power supply، Transilluminator، ژل Documentation و مواد مورد نیاز همچون آگارز یا اکریل‌آمید، اتیدیوم بروماید یا نیترات نقره، DNA size marker و... نیز مرتفع شد.

همچنین، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که حساسیت روش رنگ‌سنجی بالا بوده، در زمان کوتاهی امکان تشخیص را بدون استفاده از دستگاه و تجهیزات خاص و تنها به صورت چشمی و با استفاده از تغییر رنگ فراهم می‌سازد (۲۷). در صورت کم بودن مقدار محصول PCR با استفاده از الکتروفورز، احتمال مشاهده‌ی یک باند واضح کاهش می‌یابد؛ در صورتی که با همان مقدار می‌توان با استفاده از روش رنگ‌سنجی، نتیجه‌ی قابل قبولی گرفت.

یکی از محدودیت‌های مهم استفاده از نمونه‌های بالینی مستقیم در تشخیص‌های آزمایشگاهی، تعداد میکروارگانیسم کم در نمونه‌ی ارسالی به آزمایشگاه است که در نتیجه، ماده‌ی ژنتیکی در دسترس نیز کم می‌باشد. جهت رفع این اشکال، ابتدا میکروارگانیسم را کشت می‌دهند و سپس، اقدام به شناسایی می‌نمایند که انجام کشت، یک مرحله‌ی زمان‌بر است. امید است در این موارد، بدون انجام کشت بتوان با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا نتایج قابل قبولی گرفت.

به طور کلی، نتایج نشان می‌دهد که در مقایسه با

روش‌های متداول آزمایشگاهی، با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا، شناسایی اختصاصی کاندیدا گلابراتا در مدت زمان کمتر صورت می‌گیرد و نسبت به ژل الکتروفورز، با حساسیت بالا قابل انجام است.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد علی عینلو به شماره‌ی پایان‌نامه‌ی ۳۹۲۶۰۰ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد که در گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی زنجان انجام و هزینه‌های آن توسط دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأمین گردید. بدین وسیله، از همکاری و مساعدت مسؤولین مربوط، تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1. Burket LW, Greenberg M, Glick M. Burket's oral medicine: diagnosis and treatment. Hamilton, Ont: BC Decker; 2003.
2. Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. Med Mycol 2007; 45(4): 321-46.
3. Koc M, Aktas E. Prophylactic treatment of mycotic mucositis in radiotherapy of patients with head and neck cancers. Jpn J Clin Oncol 2003; 33(2): 57-60.
4. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. The yeasts: a taxonomic study. 5th ed. New York, NY: Elsevier; 2011.
5. Mullen CA, Abd El-Baki H, Samir H, Tarrand JJ, Rolston KV. Non-albicans Candida is the most common cause of candidemia in pediatric cancer patients. Support Care Cancer 2003; 11(5): 321-5.
6. Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans Candida spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect 2002; 50(4): 243-60.
7. Safdar A, Perlin DS, Armstrong D. Hematogenous infections due to Candida parapsilosis: changing trends in fungemic patients at a comprehensive cancer center during the last four decades. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 44(1): 11-6.
8. Dongari-Bagtzoglou A, Dwivedi P, Ioannidou E, Shaqman M, Hull D, Burleson J. Oral Candida infection and colonization in solid organ transplant recipients. Oral Microbiol Immunol 2009; 24(3): 249-54.
9. Fraser VJ, Jones M, Dunkel J, Storfer S, Medoff G, Dunagan WC. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. Clin Infect Dis 1992; 15(3): 414-21.
10. Wingard JR, Leather H. A new era of antifungal therapy. Biol Blood Marrow Transplant 2004; 10(2): 73-90.
11. Dalle F, Franco N, Lopez J, Vagner O, Caillot D, Chavanet P, et al. Comparative genotyping of Candida albicans bloodstream and nonbloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. J Clin Microbiol 2000; 38(12): 4554-9.
12. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. J Clin Microbiol 1994; 32(8): 1923-9.
13. Tan GL, Peterson EM. CHROMagar Candida medium for direct susceptibility testing of yeast from blood cultures. J Clin Microbiol 2005; 43(4): 1727-31.
14. Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara JP, Chang TC. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. J Clin Microbiol 2006; 44(3): 693-9.
15. Whelan JA, Russell NB, Whelan MA. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. J Immunol Methods 2003; 278(1-2): 261-9.
16. Hu M, Chen J, Li ZY, Au L, Hartland GV, Li X, et al. Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. Chem Soc Rev 2006; 35(11): 1084-94.
17. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. Pharmacol Rev 2001; 53(2): 283-318.
18. West JL, Halas NJ. Applications of nanotechnology to biotechnology commentary.

Curr Opin Biotechnol 2000; 11(2): 215-7.
19. Jiao PF, Zhou HY, Chen LX, Yan B. Cancer-targeting multifunctionalized gold nanoparticles in imaging and therapy. Curr Med Chem 2011; 18(14): 2086-102.
20. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. Nanomedicine (Lond) 2007; 2(5): 681-93.
21. Shankaracharya PD, Vidyarthi AS. Gold nanoparticles-based colorimetric assay for rapid detection of Salmonella species in food samples. World J Microbiol Biotechnol 2011; 27(9): 2227-30.
22. Harju S, Fedosyuk H, Peterson KR. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. BMC Biotechnol 2004; 4: 8.
23. Komshian SV, Uwaydah AK, Sobel JD, Crane LR. Fungemia caused by Candida species and Torulopsis glabrata in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. Rev Infect Dis 1989; 11(3): 379-90.
24. Ahmad S, Khan Z, Asadzadeh M, Theyyathel A, Chandy R. Performance comparison of phenotypic and molecular methods for detection and differentiation of Candida albicans and Candida dubliniensis. BMC Infect Dis 2012; 12: 230.
25. Bai S, Zhao J, Zhang Y, Huang W, Xu S, Chen H, et al. Rapid and reliable detection of 11 food-borne pathogens using thin-film biosensor chips. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 86(3): 983-90.
26. Gill P, Ghalami M, Ghaemi A, Mosavari N, Abdul-Tehrani H, Sadeghizadeh M. Nanodiagnostic Method for Colorimetric Detection of Mycobacterium tuberculosis 16S rRNA. Nanobiotechnol 2008; 4(1-4): 28-35.
27. Lee H, Kang T, Yoon KA, Lee SY, Joo SW, Lee K. Colorimetric detection of mutations in epidermal growth factor receptor using gold nanoparticle aggregation. Biosens Bioelectron 2010; 25(7): 1669-74.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 18.12.2014
Vol. 33, No. 325, 1st Week, May 2015
Accepted: 25.02.2015

Specific Identification of Candida Glabrata via Colorimetric Assay Based on Gold Nanoparticles

Ali Einloo[1], Parvin Dehghan PhD[2], Mojtaba Saluti PhD[3], Sina Mirzaahmadi PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: Candida glabrata is one of the most common Candida species which is able to get resistant to antifungals. So, the rapid identification of it, seems to be necessary for early treatment of infections. The conventional methods for detection of Candida species are time-consuming and difficult. Today, using of nanoparticles with unique properties has been expanded. The purpose of this study was rapid identification of Candida glabrata using colorimetric assay based on gold nanoparticles.

Methods: Candida glabrata was cultured in yeast extract peptone dextrose broth medium and DNA was extracted. The gene specific sequence (CAGL0M05005g) was determined from the Candida genetic information bank. For polymerase chain reaction (PCR), the primers and probe were designed via Oligo 7 software. The PCR product and probe was affected by denaturation and optimized binding temperatures. The gold nanoparticles were added and changed the color to be visual; by using ultraviolet-visible (UV-vis) spectrophotometer and transmission electron microscopy (TEM), they were confirmed. To evaluate the sensitivity of new method, different concentrations of PCR product were used and the results were analyzed using gel electrophoresis.

Findings: The optimum temperatures of the primer binding to the DNA template and hybridization the probe was determined. After adding gold nanoparticles, the mixture solution color was changed from red to purple. The results were confirmed via spectroscopy and electron microscopy.

Conclusion: The results indicated that in detection of Candida glabrata, the new method is faster than conventional methods and more sensitive than gel electrophoresis.

Keywords: Candida glabrata, Colorimetric assay, Gold nanoparticles

Citation: Einloo A, Dehghan P, Saluti M, Mirzaahmadi S. **Specific Identification of Candida Glabrata via Colorimetric Assay Based on Gold Nanoparticles.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(325): 231-41

1- MSc Student, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Biology Research Center, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Genetics, School of Sciences, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran
Corresponding Author: Parvin Dehghan PhD, Email: dehghan@med.mui.ac.ir