REVIEW ARTICLE

Diagnostic Tools in Fungal Infections since Classical to Molecular Era

Mojtaba Nabili[1],
Maryam Moazeni[2],
Mojtaba Taghizadeh Armaki[3],
Mohammad Reza Asgari[3],
Ahmad Nosrati[4],
Tahereh Shokohi[5]

[1] PhD Student, Department of Medical Mycology and Parasitology, Student Research Committee, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari AND Golestan Social Security Organization, Gorgan, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Medical Mycology and Parasitology, Invasive Fungi Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] PhD Student, Department of Medical Mycology and Parasitology, Student Research Committee, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Golestan Social Security Organization, Gorgan, Iran
[5] Professor, Department of Medical Mycology and Parasitology, Invasive Fungi Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 6, 2013; Accepted July 10, 2013)

Abstract

Human fungal diseases are largely a 20th and 21st century's phenomenon. Due to use of corticosteroids and antibacterial drug, medical developmenta are associated with increased risk for number of fungal disease. These nosocomial developments in invasive mycosis were paralleled over the last two decades by the human immunodeficiency virus (HIV) pandemic, which has resulted in an even larger number of patients at risk for fungal diseases. In the past, the differentiation of fungal pathogens was based on the characteristics of morphology and physiology. Today, by the use of molecular biology and conserved nucleotide sequences of subunits and the spacer regions of ribosomal DNA identification of the species level is possible. Rapid, accurate and sensitive methods are important tools in treatment of fungal infections. Unfortunately the classical diagnostic method based on morphology and staining is stable, the transitional of medical mycology into the molecular era has probably been more important for fungal epidemiology than for any other area inside the field of clinical mycology. The most challenging tasks ahead consist of how to apply our knowledge of pathobiology and new identification systems obtained in the recent molecular era to the prevention of and therapeutic intervention for fungal diseases and management of patient.

***Keywords*:** Fungal infection, diagnosis, molecular

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(104): 109-129 (Persian).

مروری

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۰۴ شهریور سال ۱۳۹۲ (۱۲۹-۱۰۹)

روش‌های تشخیصی بیماری‌های قارچی: از دوره کلاسیک تا عصر مولکولی

مجتبی نبیلی[۱]
مریم موذنی[۲]
مجتبی تقی‌زاده ارمکی[۳]
محمد رضا عسگری[۳]
احمد نصرتی[۴]
طاهره شکوهی[۵]

چکیده

بیماری‌های قارچی انسانی به عنوان پدیده بزرگ قرن بیستم و بیست و یکم شناخته شده‌اند. گسترش علم پزشکی به دلیل استفاده از کورتیکواستروییدها و داروهای آنتی‌باکتریال در طب بالینی باعث افزایش تعداد بیماری‌های قارچی شد. عفونت‌های قارچی تهاجمی ناشی از عفونت‌های بیمارستانی در دو دهه گذشته به موازات پاندمی ایدز افزایش یافته‌اند. این مسأله باعث گردیده است که بیماران زیادی در معرض ابتلا به عفونت‌های قارچی قرار گیرند. در گذشته، افتراق پاتوژن‌های قارچی بر خصوصیات مورفولوژی و فیزیولوژی استوار بودند. امروزه با استعانت از ابزارهای بر پایه بیولوژی مولکولی و توالی‌های نوکلئوتیدی محافظت‌شده و یا زیر واحدها و نواحی DNA ریبوزومی، شناسایی در حد گونه امکان پذیر شده است. یکی از ابزارهای مهم در درمان عفونت‌های قارچی توانایی تشخیص سریع، دقیق و روش‌های با حساسیت بالا است. متأسفانه روش‌های تشخیصی کلاسیک بر مورفولوژی، رنگ‌آمیزی و یا خصوصیات رشد تحت شرایط مختلف، استوار است. بنابراین، گذر از قارچ‌شناسی پزشکی کلاسیک به عصر مولکولی برای اپیدمیولوژی قارچ‌ها بسیار مهم‌تر از بقیه زمینه‌های بالینی قارچ‌شناسی بوده است. خطیرترین وظیفه پیش رو این است که چگونه از دانش پاتوبیولوژی و سیستم‌های طبقه‌بندی جدید مبتنی بر روش‌های مولکولی، برای پیشگیری و درمان بیماری‌های قارچی و مدیریت بیماران استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌های قارچی، تشخیص، مولکولی

مقدمه

بیماری‌های قارچی انسانی به عنوان پدیده بزرگ قرن بیستم و بیست و یکم شناخته شدند. اغلب بیماری‌های قارچی سیستمیک در اوایل سال‌های ۱۹۰۰ توصیف گردید. این زمانی بود که برای اولین بار مشخص شد بسیاری از قارچ‌های اندمیک نواحی خاص دارای توانایی بیماری‌زایی می‌باشند. گسترش علم پزشکی در اواسط دهه ۱۹۰۰ به دلیل استفاده از کورتیکواستروییدها و داروهای آنتی‌باکتریال در طب بالینی، باعث افزایش فراوانی بیماری‌های قارچی شد. تجویز عوامل آنتی‌باکتریال و استفاده از وسایل پزشکی در بیمارانی که وضعیت وخیمی از نظر سیستم ایمنی داشتند باعث شد که این بیماران نسبت به بیماری‌های قارچی حساسیت ویژه‌ای پیدا کنند.

مولف مسئول: طاهره شکوهی- ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ‌های تهاجمی. E-mail: shokohi.tahereh@gmail.com

۱. دانشجوی دکتری قارچ‌شناسی پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری و مدیریت درمان سازمان تأمین اجتماعی استان گلستان، گرگان، ایران

۲. استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ‌های تهاجمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشجوی دکتری قارچ‌شناسی پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. دکتری عمومی، مدیریت درمان سازمان تأمین اجتماعی استان گلستان، گرگان، ایران

۵. استاد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ‌های تهاجمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۳/۲۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۴/۱۹

در حقیقت با پیشرفت علم پزشکی در درمان سرطان‌ها با استفاده از شیمی‌درمانی، آنتی‌بادی‌ها و تجویز داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی در پیوند اعضا، همه و همه باعث افزایش تعداد افراد در معرض خطر عفونت‌های قارچی با عوامل مخمری و رشته‌ای شد. علاوه بر این توسعه علم پزشکی در اعمال جراحی و افزایش استفاده از اعضای مصنوعی در بدن میزبان باعث افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های قارچی می‌گردد.

عفونت‌های قارچی تهاجمی ناشی از عفونت‌های بیمارستانی در دو دهه گذشته به موازات پاندمی ایدز افزایش یافته است. این مسأله باعث گردیده است بیماران زیادی در معرض ابتلا به عفونت‌های قارچی قرار گیرند. افزایش عفونت‌های قارچ تهاجمی باعث افزایش مرگ و میر و افزایش هزینه‌ها در جمعیت‌های انسانی شده است. خوشبختانه به تازگی عوامل ضد قارچی مؤثری روانه بازار گردیده‌اند که از آن‌ها می‌توان در درمان بیماری‌های قارچی استفاده کرد. این عوامل باعث اطمینان خاطر پزشکان در درمان عفونت‌های قارچی تهاجمی شده‌اند. اما مسأله مهم پیش رو در این گونه بیماری‌ها، افزایش مقاومت دارویی است. روش‌های حل این معضل نیز در حال تکامل می‌باشد. هم‌زمان با عفونت‌های تهاجمی قارچی در دو دهه گذشته، انقلابی عظیم در بیولوژی مولکولی و علم ژنتیک پزشکی ایجاد شد. خط مشی این پیشرفت در بیولوژی قارچ‌ها بر اساس مطالعات انجام‌شده بر روی قارچ ساکارومایسس سرویسیه بوده است. بخش‌های مهمی از اطلاعات ما در ارتباط با بیولوژی مولکولی، ژنتیک و بیوشیمی یوکاریوت‌ها نتایج حاصل از مطالعاتی است که توسط این مدل قارچی به دست آمده است. در دهه گذشته تغییرات عمده‌ای در نحوه تحقیقات صورت گرفت به نحوی که امروزه محققین مطالعات مولکولی را به صورت مستقیم بر روی قارچ‌های پاتوژن اختصاصی انجام می‌دهند (۱).

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مروری بود و با استفاده از کلیدواژه‌های عفونت‌های قارچی (Fungal infection)، تشخیص (Diagnosis) و روش‌های مولکولی (Molecular tools) با جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی نظیر PubMed، Scopus، Elsevier، SID و Iranmedex انجام گرفت.

یافته‌ها

روش‌های کلاسیک در تشخیص بیماری‌های قارچی

یکی از ابزارهای مهم در درمان عفونت‌های قارچی، توانایی تشخیص سریع، دقیق و روش‌های با حساسیت بالا است. متأسفانه روش‌های تشخیصی کلاسیک بر مورفولوژی، رنگ‌آمیزی و یا خصوصیات رشد تحت شرایط مختلف استوار است. افزایش بروز بیماری‌های قارچی و گسترده شدن طیف این عفونت‌ها باعث گردیده است که این روش‌ها جوابگوی آزمایشگاه‌های کلینیکی مدرن نباشد. روش‌های شناسایی قارچی رایج به ۲ دسته بزرگ روش‌های وابسته به کشت و غیر وابسته به کشت طبقه‌بندی می‌گردد.

۱- روش‌های وابسته به کشت

شناسایی بر پایه کشت قارچ به روش‌های متفاوتی انجام می‌گردد. به هر حال شناسایی تمامی این روش‌ها ماهیت یکسانی دارد که متکی به شناسایی کل ارگانیسم‌ها می‌باشد. در این روش‌ها تشخیص گونه‌ها بر اساس تفاوت در مورفولوژی و خصوصیات کشت می‌باشد. تشخیص مورفولوژیکی گونه‌های قارچی بر اساس تنوع در شکل، اندازه، رنگ و ساختارهای اختصاصی شامل ساختارهای کونیدی‌زا، کونیدیوفورها، وزیکول‌ها، فیالایدها و کونیدی‌ها می‌باشد. در مشاهده میکروسکوپی نمونه‌های بالینی رنگ‌آمیزی‌های متعددی همانند مرکب چین، گرم، کالکوفلوروایت می‌توانند در تسهیل مشاهده هایف‌های قارچی نقش داشته باشند (۳، ۲). استفاده از محیط‌های کروموژنیک در آزمایشگاه روش بسیار مناسبی برای مخمرها است ولی در مورد قارچ‌های رشته‌ای مفید نیست. کشت خون برای تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم و موکورومایکوزیس توصیه نمی‌گردد اما برای فوزاریوزیس به نسبت مفید است (۵، ۴). به تازگی آسپرژیلوس فومیگاتوس و دیگر گونه‌ها قادر به رشد و

جداسازی از کشت خون هستند (۶). یکی از مزایای استفاده از ویال‌های کشت خون (BACTEC Plus Aerobic/F) کمک به جداسازی آسپرژیلوس و دیگر قارچ‌های رشته‌ای در بیماران تحت درمان داروهای ضد قارچی می‌باشد. به هر حال شناسایی بر پایه کشت به عنوان اساس تشخیص قارچ‌ها مطرح است. متأسفانه یکی از معایب بزرگ روش‌های بر پایه کشت، حساسیت پایین، سرعت‌های رشد اختصاصی و متغیر بسته گونه و نیاز به مهارت قارچ‌شناسی است. به منظور جبران این مشکل، روش‌های شناسایی غیر وابسته به کشت در سال‌های اخیر مد نظر قرار گرفته است.

۲- روش‌های غیر وابسته به کشت

روش‌های غیر وابسته به کشت به چندین دسته مختلف شامل هیستوپاتولوژی، تصویربرداری، روش‌های سرولوژیکی و شناسایی آنتی‌ژن و تعیین متابولیت تقسیم می‌گردند. یکی از مزایای بزرگ این روش این است که برای اثبات عفونت نیاز به شناسایی کل ارگانیسم نیست. در نتیجه این تست‌ها کمتر تهاجمی هستند، سریع‌تر هستند، حساسیت بالاتری دارند و برای پایش دوره عفونت به منظور بررسی اثر بخشی درمان بسیار مفید هستند.

۲-۱- هیستوپاتولوژی

آزمایش‌های هیستوپاتولوژی و رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی از جمله روش‌های قابل اعتماد در تشخیص بیماری‌های قارچی می‌باشند. مشاهده هیف‌های شفاف با دیواره عرضی و انشعابات دو شاخه متعدد، تشخیص عارضه قارچی را مسجل می‌کند. با این وجود سایر قارچ‌های شفاف از جمله گونه‌های فوزاریوم و سدوسپوریوم آپیوسپرموم نمای میکروسکوپی مشابهی را ایجاد می‌کنند. به همین دلیل جداسازی عامل اتیولوژیک در کشت جهت تشخیص قطعی ضروری است (۹-۷). تشخیص دقیق‌تر میکروسکوپی بر پایه رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی استوار است. آزمایش نمونه برونکوآلوئولار لاواژ (Bronchoalveolar lavage یا BAL) و بیوپسی‌های بافتی می‌تواند در تشخیص قارچ‌ها مفید واقع شود، به علت این که با این نمونه‌ها می‌توان به شناسایی قارچ پرداخت و برای تعیین حساسیت دارویی ضد قارچی در شرایط آزمایشگاهی (In-vitro) در جهت انتخاب داروی مناسب و تعیین میران دوز داروی مورد نظر اقدام کرد. هیستوپاتولوژی اگر چه روش بسیار مفیدی در تشخیص قارچ‌ها است اما یک روش تهاجمی است و در بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی به علت ترومبوسیتوپنی شدید به ندرت توسط پزشکان درخواست می‌گردد (۱۰).

۲-۲- تصویربرداری

استراتژی‌های مختلفی برای پیگیری تشخیصی بیماری‌های قارچی در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی وجود دارد. برای اغلب این بیماران مشکوک به بیماری‌های قارچی ریوی، کلیوی و یا مغزی در ۲۴ ساعت اول درخواست تصوی برداری اشعه X و یا CT اسکن انجام می‌شود. به نظر می‌رسد CT اسکن وسیله تشخیصی بهتری در مقابل اشعه X در تشخیص کلونیزاسیون‌های داخل حفره و یا نشان دادن وجود توده در داخل کاویته، هنگامی که توپ قارچی (Fungus ball) قابل دیدن توسط اشعه X نباشد، است (۱۱). تصویربرداری اشعه X در شناسایی زخم‌های ندولار بسیار مفید است (۱۲) اما CT اسکن اهمیت ویژه‌ای در تشخیص بیماری‌های قارچی که تهاجم به عروق دارند و باعث ایجاد یک هاله ضعیف شیشه‌ای اطراف یک ندول مرکزی (Halo sign) و ساختار هلالی شکل (Air crescent) که ناشی از تهاجم ارگانیسم به رگ می‌باشد، دارد (۱۳). به منظور تشخیص تهاجم به مغز و اوربیت CT اسکن سینوس و MRI مغز بسیار کمک‌کننده هستند. CT اسکن ابزار بسیار ارزشمندی در تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم در بیماران مشکوک به آسپرژیلوزیس است، چرا که در این بیماران علامت Halo sign مشاهده می‌شود؛ هر چند که این علامت در موکورمایکوزیس، کاندیدیازیس ریوی، بیماری‌های ریوی گرانولوماتوز و توبرکلوما هم دیده شده است (۱۴). تنها در CT اسکن بیماران مبتلا به فئوهایفومایکوز مغزی، یافته مشخصی دیده می‌شود که به آن ضایعات حلقوی منفرد مشخص (Ring-enhancing lesion) با هسته ضعیف کم رنگ که به وسیله ضایعات کم تراکم احاطه شده است، گفته می‌شود (۱۵).

این اسکن‌ها در تشخیص زودرس بیماری‌های قارچی اهمیت بسیار ویژه‌ای دارند، اما این علامت‌ها اختصاصی نیستند و در دیگر بیماری‌های ریوی نیز دیده می‌شوند. همچنین دارای اختصاصیت پایین می‌باشند (۱۶). بنابراین نمی‌توان به تنهایی و با استفاده از رادیوگرافی به تشخیص بیماری رسید (۱۷).

۳-۲- سرولوژی و شناسایی آنتی‌ژن

بعضی از آزمایش‌های سرولوژی به طور گسترده‌ای به علت استفاده آسان آن‌ها در حال انجام است. مزیت این روش این است که سریع است و برای تشخیص قارچ‌های کند رشد بسیار مفید می‌باشد. تحقیقات مداوم در این زمینه آزمایش‌های امیدبخشی را معرفی کرد.

۱-۳-۲- گالاکتومانان

گالاکتومانان (GM) یک هترو پلی‌ساکارید مقاوم به حرارت در دیواره سلولی موجود در بعضی از گونه‌های قارچی است. این آنتی‌ژن پلی‌ساکاریدی در طی تهاجم به بافت از هایف قارچ آزاد می‌شود. از آن جا که این آنتی‌ژن یک کربوهیدرات محلول درآب است می‌توان آن را علاوه بر سرم در سایر نمونه‌های به دست‌آمده از بیمار مثل ادرار، مایع مغزی نخاعی، مایع پلور، لاواژ برونکوآلوئولار و نمونه‌های بافتی تعیین کرد (۱۹، ۱۸). این آزمایش در بیماران مبتلا به بدخیمی خونی بسیار معتبر، استاندارد و با تکرارپذیری بالایی است (۲۱، ۲۰). GM می‌تواند ۴ ± ۱۰ روز قبل از روش‌های بر پایه کشت، مثبت گردد. بسته به نوع نمونه (سرم، BAL) و Cut-off values حساسیت ۶۰ تا ۱۰۰ درصد و اختصاصیت ۸۱ تا ۹۹ درصد در بیماران نوتروپنیک گزارش شده است (۲۳، ۲۲). یکی از جدیدترین تحولاتی که در خصوص ردیابی آسپرژیلوس انجام شده است استفاده از تکنیک ساندویچی ELISA (Platelia aspergillus) است که یکی از حساس‌ترین تست‌ها در تشخیص گالاکتومانان (GM) قارچی می‌باشد (۲۴). در مطالعه نبیلی و همکاران بر روی بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی و گیرندگان پیوند مغز استخوان حساسیت و اختصاصیت تست گالاکتومانان به ترتیب ۶۱ درصد و ۹۰ درصد گزارش شد (۲۵). در مطالعه صورت‌گرفته با استفاده از کیت Platelia aspergillus enzyme immunoassay (Bio-rad) در نمونه ۱۵ بیمار مبتلا به HIV (Human immunodeficiency virus) همراه با پنی‌سیلیوزیس، ۲۲ بیمار HIV همراه با کریپتوکوکوزیس و ۱۱ بیمار شاهد، اندکس GM افزایش معنی‌داری را در تمام بیماران HIV همراه با پنی‌سیلیوزیس نشان داد و توانست تسهیلاتی را در جهت تشخیص زودرس بیماری در نواحی اندمیک فراهم آورد (۲۶). همچنین در مطالعه‌ای در بیماران بلاستومایکوز و هیستوپلاسموز مشاهده شد که نشان می‌دهد Platelia فقط اختصاصی برای گونه‌های آسپرژیلوس نیست (۲۷). همچنین موفقیت‌هایی در تعیین مانان کاندیدا با روش‌های الایزا به دست آمده است (۲۸). روش تعیین آنتی‌ژن GM گاهی اوقات نتایج مثبت کاذبی را به دلایل مختلف نظیر واکنش متقاطع گونه‌های آسپرژیلوس با دیگر قارچ‌ها و باکتری‌ها، درمان با آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مانند پیپراسیلین- تازوباکتام (Piperacillin–Tazobactam) در بزرگسالان و سیکلوهگزامید، آلودگی آزمایشگاهی، نوع رژیم غذایی در نوزادان، واکنش متقاطع با اپی‌توپ‌های گونه‌های بیفیدوباکتریوم، استافیلوکوک، سودوموناس، درمان با سیکلوفسفامید و مشکلات تکنیکی مثل سلولز سوآپ‌های پنبه‌ای داشته است (۳۰، ۲۹).

۲-۳-۲- بتا- دی گلوکان (β-D-glucans)

بتا- دی گلوکان (BG) یکی از ترکیبات اصلی در دیواره سلولی اکثر قارچ‌های مهم پزشکی غیر از موکور و کریپتوکوکوس است (۳۱). آنتی‌ژن BG در سرم بیماران پیوندی و خونی قابل اندازه‌گیری است و سطح بیشتر از ۸۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر به عنوان مثبت قلمداد می‌گردد (Fungitell Assay, associates of cape cod, Inc). این تست در طیف وسیعی از گونه‌های قارچی مثبت می‌گردد و همین مسأله به عنوان یکی از محدودیت‌های بزرگ این روش به علت وجود مثبت کاذب می‌باشد (۳۲). ارزش این تست در موارد بیماری‌های منتشره قارچی افزایش می‌یابد و حساسیت تست برای تشخیص بیماری‌های قارچی به دنبال نتیجه تست GM مثبت

برای بیمارانی که داروهای ضد قارچی استفاده کرده‌اند بالاتر می‌رود. تست BG بویژه برای غربالگری اولیه بیماران قارچی تهاجمی در بیماران پیوندی بسیار مفید است (۳۴، ۳۳).

۴-۲- متابولیت‌ها

متابولیت‌های قارچی اولین بار ۲۰ سال پیش به عنوان مارکرهای عفونت قارچی شناسایی شدند. این متابوایت‌ها به علت این که در افراد غیر مبتلا وجود ندارد، مورد توجه قرار گرفته‌اند. متابولیت‌های مرتبط با کاندیدا (دی آرابینیتول)، کریپتوکوکوس نئوفورمنس (مانیتول) و آسپرژیلوس (مانیتول) است. یکی از جذابیت‌های استفاده از این متابولیت‌ها به عنوان مارکر قارچی این است که میزان این متابولیت‌ها متناسب با بار قارچی است (۳۵). اما به هر حال مسایل و مشکلات آنالیزی این متابولیت‌ها مانع پیشرفت و اعتبار این مارکرها شده است.

ارگانیسم‌ها می‌توانند بر اساس روش‌های بیوشیمیایی یا مورفولوژیکی بعد از رشد در محیط‌های مناسب و یا بر اساس هیستولوژیکی از نمونه بافتی شناسایی شوند. شناسایی بیوشیمیایی از طریق الگوی جذب کربوهیدرات‌ها (نوارهای تست Analytical profile index یا API) یا محیط‌های رنگی مختلف (کروم آگار و...) به صورت معمول در آزمایشگاه‌های بالینی انجام می‌گردد. انواع دیگر روش‌های بیوشیمیایی شامل سیستم Vitek، نوار ID32C یا میکروپلیت Biolog YT است که با استفاده از جذب قندها صورت می‌گیرد. شناسایی بیوشیمیایی و دیگر روش‌ها (مثل آنالیز اسید چرب سلول) به طور معمول برای مخمرها قابل استفاده است. در حالی که در اکثر قارچ‌های رشته‌ای شناسایی بر اساس کشت باید به وسیله آزمایشات مورفولوژیکی و یا روش‌های غیر از کشت انجام می‌پذیرد (۳۶).

در بین این روش‌ها ساده‌ترین و سریع‌ترین تست‌ها، تست آگلوتیناسیون لاتکس است که امروزه به طور تجاری استفاده می‌شود. این کیت‌ها برای شناسایی کریپتوکوکوس نئوفورمنس، هیستوپلاسما کپسولاتوم، کوکسیدیوییدس ایمیتیس، اسپوروتریکس شنکیی، آسپرژیلوس و کاندیدا طراحی شده است. اما مشکلات بالقوه‌ای که در این روش‌های سرولوژیک وجود دارد لزوم تحقیقات گسترده‌تری را در این زمینه می‌طلبد. پاره‌ای از این مشکلات عبارت هستند از واکنش متقاطع (۳۷)، کاهش حساسیت تست در بیماران ناتوان (۳۸)، وجود آنتی‌ژن‌های گذرا (۳۹) و افزایش فراوانی مثبت کاذب (۴۰) است. اگر چه تکنیک‌های سرولوژی، تصویربرداری و تشخیص‌های متابولیت نویدهای بزرگی را در بعضی از زمینه‌ها نشان می‌دهند اما همه‌ی آن‌ها دارای یک نقطه ضعف مشترک می‌باشند، و آن این که فقط در مورد طیف محدودی از بیماری‌های قارچی مهم به کار می‌روند. در عوض روش‌های مولکولی قابلیت این را دارند که به سادگی برای دامنه وسیعی از ارگانیسم‌ها و برای طیف وسیعی از نمونه‌ها از بیماران با شرایط متفاوت طراحی و انجام شوند.

روش‌های مولکولی در تشخیص بیماری‌های قارچی

اغلب روش‌های وابسته به ژنوم قارچ‌ها با استفاده از تکنیک‌های وابسته به PCR (Polymerase chain reaction) انجام می‌گیرد.

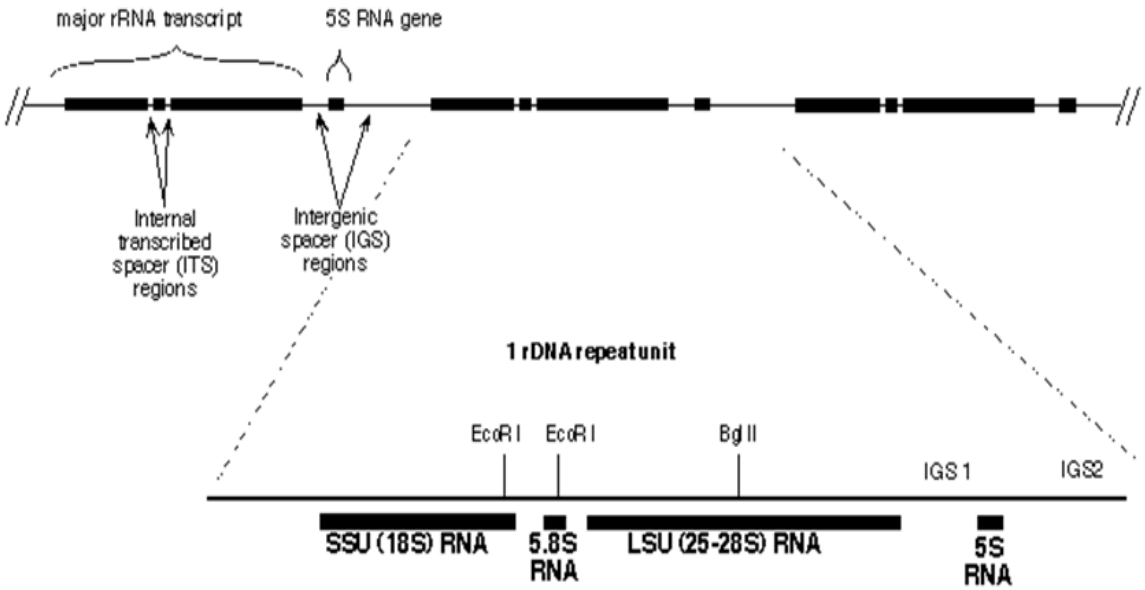
PCR

این تکنیک، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده برای توالی‌های خاص، محصولی با سایز مشخص تولید می‌کند. با این روش افتراق گونه‌ها از طریق وجود یا عدم وجود محصول، تفاوت در اندازه و تعداد محصول، هضم محصولات PCR به منظور تولید محصولات متعدد انجام می‌پذیرد. مزیت این روش سادگی، حساسیت و توانایی این واکنش در شناسایی و تکثیر توالی نوکلئوتیدهای مورد نظر در نمونه‌های مختلط است. این روش دارای محدودیت‌هایی است که می‌توان به عدم توانایی اندازه‌گیری بار قارچی به صورت دقیق و همچنین خطر تکثیر DNAهای غیر مرتبط که نمونه را آلوده کرده‌اند، اشاره کرد.

در واکنش PCR لازم نیست کل توالی قطعه‌ای که قرار است تکثیر شود مشخص باشد، فقط کافی است توالی قسمت کوچکی از آن که محل اتصال پرایمر است شناخته شده باشد. یکی از این توالی‌ها که در بسیاری از آنالیزها انتخاب می‌گردد نواحی بین ژن‌های کدکننده کمپلکس DNA ریبوزومی (rDNA) است. کمپلکس rDNA حاوی توالی‌های 18S،

28S و 5.8S است که به وسیله ۲ ناحیه ITS (Internal transcribed spacer) به نام ITS1 و ITS2 از هم جدا می‌گردند. این سه ژن در کنار یکدیگر در یک طرف به وسیله ژن‌های کدکننده 5S rDNA که بین دو ناحیه IGS1 و IGS2 هستند، کد می‌گردند و به طور غیر وابسته از ژن‌های 5.8S، 18S و 28S رونویسی می‌گردند. سازمان‌دهی ناحیه ژنی rDNA به عنوان یک شاخص مفید برای شناسایی قارچ‌ها است. ژن‌های ریبوزوم به طور معمولی بسیار محافظت شده‌اند. در نتیجه توالی این ژن‌های اختصاصی تنوع کافی را به منظور افتراق قارچ‌ها در سطح گونه فراهم نمی‌کند. نواحی D1 و D2 که در درون واحد 26S قرار دارد، تنوع کافی را در غالب موارد به منظور شناسایی در حد گونه فراهم می‌کند. در حد فاصل ژن‌های 18S و 28S ناحیه ژنی ITS1-5.8S-ITS2 قرار دارد. نواحی ITS1 و ITS2 متغیر و ژن 5.8S محافظت شده است. تعیین توالی این نواحی به سهولت قابل انجام است و اطلاعات بسیار مفیدی را فراهم می‌آورد (تصویر شماره ۱).

تعیین توالی (Sequencing DNA) ریبوزومی به عنوان یک روش شناسایی قارچ‌ها، بیانگر یک جهش بزرگ از روش‌های کلاسیک قارچی به روش‌های مولکولی قارچی در شناسایی و تاکسونومی قارچ‌ها است. ژنوم قارچ‌ها حاوی نواحی خاصی است که به لحاظ تنوع سکانس نوکلئوتیدی در گونه‌های مختلف یک جنس، ارزش زیادی در شناسایی گونه‌ها، اپیدمیولوژی مولکولی و همچنین تاکسونومی قارچ‌ها دارند. از جمله این نواحی می‌توان به ناحیه ITS، ژن β-tubulin، ژن کدکننده Elongation factor 1 و ناحیه IGS1 (Intergenic spacer 1) اشاره کرد. در جدول شماره ۱ برخی نواحی ژنی ایده آل برای شناسایی دقیق قارچ های مختلف آمده است. استفاده از ناحیه ITS برای شناسایی اولیه قارچ‌های ناشناخته با توجه به متغیر بودن این ناحیه و تنوع کافی آن در قارچ‌های مختلف و سهولت انجام آن، بسیار مناسب است (۴۱). اما ناحیه ITS دارای معایب مهمی است و نباید آن را برای بعضی از قارچ‌ها استفاده کرد. این معایب شامل عدم تنوع کافی در تشخیص گونه‌های متنوع در کمپلکس‌های گروه (Section) آسپرژیلوس و گونه‌های فوزاریوم، عدم توانایی تشخیص گونه‌هایی که خیلی به یکدیگر نزدیک هستند به علت کافی نبودن تفاوت‌های نوکلئوتیدی در این ناحیه (به عنوان مثال عدم تشخیص بین آسپرژیلوس لنتولوس و آسپرژیلوس فومیگاتوس) و در نهایت عدم تکرارپذیری توالی ناحیه ITS در پایگاه‌های اطلاعاتی مرجع مثل Gen bank/EMBL/DDBJ به خصوص برای بازیدیومیست‌ها می‌باشد (۴۲).



تصویر شماره ۱: نواحی ژنی کمپلکس DNA ریبوزومی (rDNA) (۴۱)

جدول شماره ۱: نواحی ژنی ایده‌آل برای شناسایی دقیق قارچ‌های مختلف

شماره منبع	ناحیه ژنی ایده‌آل	جنس قارچ
۴۳-۴۴	β-tubulin	آسپرژیلوس
۴۵	β-tubulin	پنی‌سیلیوم
۴۶	β-tubulin	فئواکرومونیوم
۴۷	ناحیه ITS rDNA و D1-D2	کاندیدا
۴۸-۴۹	Elongation Factor 1	فوزاریوم
۵۰	ناحیه IGS1، D1-D2 و ITS rDNA	مالاسزیا
۵۱	ناحیه ITS rDNA	قارچ‌های سیاه
۵۲-۵۴	ناحیه ITS rDNA	درماتوفیت‌ها
۵۵	ناحیه ITS rDNA، D1-D2	موکورال‌ها

Real-time PCR:

تمایل به ایجاد روشی که بتواند بار قارچی را در نمونه به دقت اندازه‌گیری کند، منجر به ابداع روش Real-time PCR گردید. در گذشته، روش Nested PCR، به عنوان مهم‌ترین روش اختصاصی برای شناسایی گونه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس مورد استفاده قرار می‌گرفت ولی، به دلیل نیاز به رو باز بودن لوله‌های واکنش، رفته رفته ارزش و اهمیت خود را از دست داد، زیرا با باز کردن درب لوله‌های واکنش، امکان آلودگی نمونه‌ی مورد مطالعه وجود داشت. از این رو، امروزه استفاده از روش‌های Real-Time PCR جایگزین Nested PCR شده است (۵۷، ۵۶). تکنیک‌های شناسایی بعد از تکثیر، در عین حالی که اطلاعات اختصاصی مربوط به جنس یا گونه را به ما می‌دهند، موجب افزایش اختصاصیت و حساسیت نیز می‌شوند. روش‌های تشخیصی Real-Time PCR خودکار، سریع و قابل تکرار می‌باشند. مشکلات و نواقص عدیده موجود در End point PCR و نیاز به روشی از PCR با قابلیت تعیین کمی دقیق، زمینه گشایش عرصه‌ای نوین در تکنیک Real-time PCR گردید. همان طور که از معنی واژه بر می‌آید مفهوم Real-time PCR مشاهده لحظه به لحظه یک فرایند می‌باشد. دراین سیستم تشخیصی یک ماده فلورسانت در طی واکنش، متناسب با میزان محصولات هر سیکل آزاد می‌شود و میزان فلورسنت آن توسط یک نمایانگر (Detector) شناسایی و ثبت می‌گردد. فرمول‌بندی Real-Time PCR ابتدا توسط Higuchi و همکاران به انجام رسید. ارزیابی‌های DNA قارچ به صورت کمی با Real-Time PCR نیاز به دقت بسیار بالایی در بهینه و استانداردسازی دارد چرا که برای شناسایی ۱۰-۱ کپی ژنوم [یک کپی ژنوم یا یک CFU (Colony-forming units) قارچ برابر با است ۱۰ فمتوگرم از DNA] در نمونه، حساسیت بالایی نیاز است. بعضی محققین (۵۸) حساسیت این روش را در خون کامل بین ۱۰۰-۱۰ فمتوگرم در میلی‌لیتر از DNA آسپرژیلوس گزارش کرده‌اند. در مطالعه نبیلی و همکاران با استفاده از تکنیک FRET (Flurescence resononse energy transfer) حداقل مقداری DNA قابل شناسایی ۱۰ کونیدی یا CFU (معادل ۱۰۰ فمتوگرم) در هر واکنش PCR بودد که نشان‌دهنده حساسیت بالای این روش می‌باشد (۵۹، ۲۵). آن چه که حساس بودن روش PCR در شناسایی عوامل قارچی موجود در نمونه‌های بالینی را مورد تردید قرار داده است، ویژگی بازدارندگی داروهای ضد قارچی در روند انجام PCR است. با وجود این مشکل، امروزه برای بسیاری از متخصصین مشکلات غیر قابل انکار و مسلم تشخیص سنتی متکی بر کشت قارچ‌ها اثبات شده است. به دلیل صحت و سرعت بالای نتیجه آزمایش بسیاری از آزمون‌های PCR، استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای شناسایی عوامل عفونت‌زای میکروبی در نمونه‌های بالینی به طور چشم‌گیری افزایش یافته است. مشکل عمده Real Time PCR هزینه بالای آن است که ناشی از ماهیت فلورسنتی واکنش و افزایش قیمت پرایمرها و همچنین نیاز به مهارت‌های بالا برای تفسیر اطلاعات می‌باشد. با این وجود، به علت قدرت تشخیصی بالای این تکنولوژی، در طراحی روش‌های جدید تشخیصی در قارچ‌شناسی از این تکنیک استفاده شده است.

سیستم‌های ایزوترمال

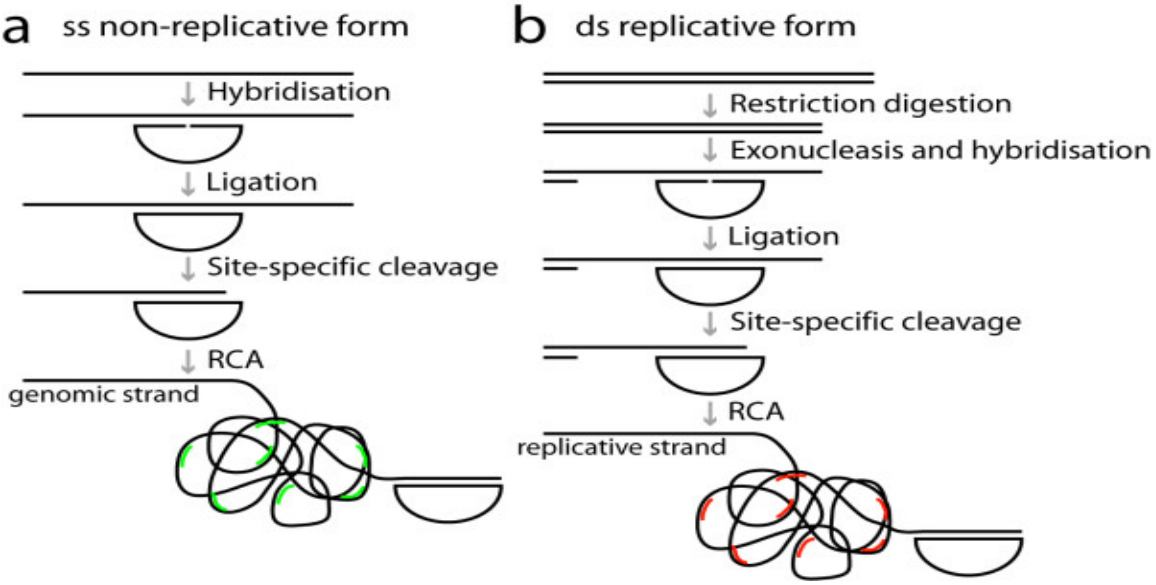
در سالیان اخیر پیشرفت‌هایی در زمینه ماهیت مولکولی DNA در محیط‌های زنده صورت گرفته و نشان دهنده این

واقعیت است که می‌توان DNA را در دمای واحدی بدون نیاز به دستگاه‌های ترموسایکلر تکثیر کرد و بدین ترتیب روش‌های متعدد تکثیری هم‌دما (Isothermal) برای تکثیر الگوهای اسید نوکلئوتیدی در ۱۰ سال گذشته گسترش یافته‌اند. آنزیم DNA پلیمراز با کمک آنزیم‌های متعددی عمل تکثیر DNA را انجام می‌دهد بنابراین شناخت این آنزیم‌ها امکان توسعه این روش‌های هم‌دما را به وسیله شبیه‌سازی این مکانیسم‌ها فراهم می‌آورد. این سیستم‌ها احتیاجی به دستگاه ترمال سایکلر به منظور تغییر سریع دما ندارند، اما نیازمند یک Platform ساده مثل حمام آب یا بلوک‌های حرارتی هستند. این سیستم‌ها شامل RCA-LAMP (Rolling circle amplification- Loop-mediated isothermal amplification) می‌شود.

RCA

امروزه شناسایی و تعیین پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (Single-nucleotide polymorphism یا SNP) به عنوان رویکردی نوین در جهت شناسایی پاتوژن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (۶۰). جهت تشخیص SNPs میان ژنوتایپ‌های مختلف، تکنیک‌های بر پایه پروب‌های PLPs (Padlock probes) مورد نیاز هستند. این پروب‌ها الیگونوکلئوتیدهایی طویل با اندازه‌ای حدود ۱۰۰ جفت باز و حاوی یک ناحیه مکمل رشته هدف در قسمت ´3 و ´5 هستند. واکنش RCA در چهار مرحله انجام می‌شود. در مرحله اول هیبریدسازی رخ می‌دهد که دو قسمت از توالی مکمل به DNA هدف متصل می‌گردد. مرحله دوم اتصال است که آنزیم DNA لیگاز با برداشت فسفات از انتهای ´5 آن را به انتهای ´3 متصل می‌کند که با توالی مکمل هدف به شکل حلقه ایجاد می‌شود. در مرحله سوم تکثیر با استفاده از آنزیم Bst DNA پلیمراز با اتصال پرایمر RCA1 به جایگاه خود بر روی پروب اولین رشته مکمل از پروب به دست می‌آید. سپس پرایمر RCA2 به جایگاه خود بر روی محصول متصل می‌گردد و عمل تکثیر آنزیم ادامه می‌یابد. این واکنش‌ها به طور متوالی و پشت سر هم ادامه پیدا می‌کنند تا یک ساختار گل کلم مانند ایجاد شود. مرحله چهارم مرحله ظاهرسازی است که از طریق کروماتوگرافی ژل الکتروفورز به بررسی باندهای ایجادشده بر روی ژل پرداخته می‌شود. در این مرحله حضور باندهای نردبانی متوالی در هر واکنش RCA برای گونه‌های قارچی تأیید می‌گردد (۶۱) (تصویر شماره ۲).

در واقع، اساس RCA تقویت یک قطعه کوچک از DNA تک رشته‌ای حلقوی است (۶۲). در این واکنش یک پرایمر فوروارد که سکانس آن مکمل ناحیه linker پروب



تصویر شماره ۲: مراحل تکنیک RCA (۶۰)

است و همچنین DNA پلیمراز با فعالیت جابجاشدگی (Displacement activity) شرکت دارند. مقدار پروب توسط این پلیمراز در سیستم ایزوترمال ۱۰۰ برابر می‌شود. به واسطه فعالیت جابجاشدگی پلیمراز در انتهای رشته سنتزشده به ابتدای آن در نهایت ما یک تک رشته بلند از DNA را خواهیم داشت که حاوی نواحی تکرارشده سکانس پروب می‌باشد. دومین پرایمر برای تقویت همین رشته طویل ساخته‌شده طراحی می‌شود. این سیستم به نام H-RCA (Hyper branching RCA) معروف است. این سیستم برای مطالعات ژنومی گروه‌های متنوعی از میکروارگانیسم‌ها از جمله قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها تعریف شده است (۶۳).

LAMP

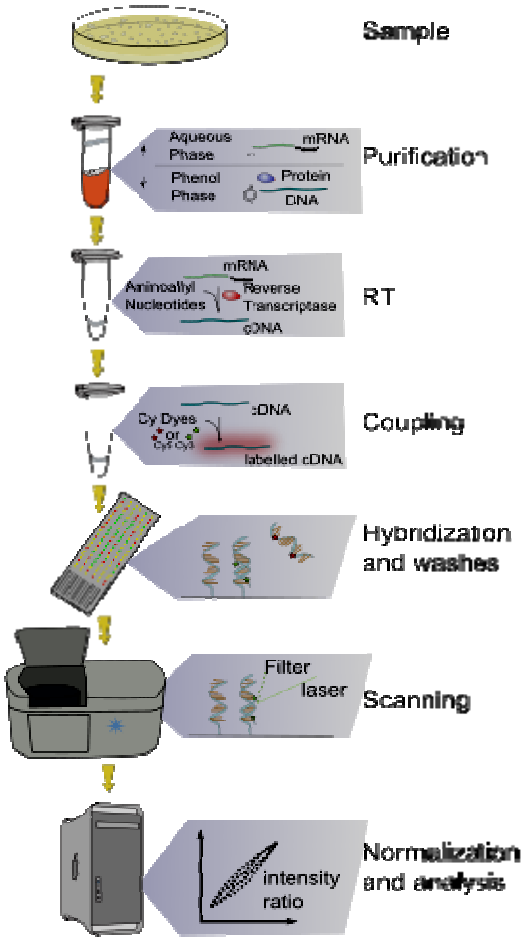
این روش توسط Tomita و همکاران معرفی گردید. در این روش DNA به طور اختصاصی و با کارایی و سرعت بالا در شرایط تک دمایی (Isothermal) تکثیر می‌یابد. LAMP در حال حاضر با موفقیت برای تشخیص سریع ویروس‌های DNA و RNA مانند ویروس وست نایل (West Nile)، سندرم حاد تنفسی (سارس) و تب دانگ استفاده می‌شود (۶۵، ۶۴). به تازگی، انگل‌شناسان از تکنیک LAMP برای تشخیص چندین بیماری‌های انگلی انسانی از جمله انگل کریپتوسپوریدیوم، انتامبا هیستولیتیکا، پلاسمودیوم، تریپونوزوما، تنیا، شیستوزوما، فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا، و توکسوپلاسما گوندی و همین طور انگل‌های حیوانی مانند تیلریا و بابزیا بهره جسته‌اند (۶۷، ۶۶). از این تکنیک برای شناسایی قارچ‌های پنوموسیستیس جیروسی، گونه‌های مختلف کاندیدا، پنی‌سیلیوم مارنفئی، پاراکوکسیدیوییدس برازیلینسیس و توکسین های آسپرژیلوس فلاووس استفاده می‌شود (۷۰-۶۸).

در این روش از ۴ پرایمر (دو پرایمر داخلی و دو پرایمر خارجی) استفاده می‌گردد، که در مجموع ۶ ناحیه ژنی از DNA هدف را مورد شناسایی قرار می‌دهد. ناحیه هدف طی فرایندی دنباله‌دار و با تشکیل نواحی سنجاق سری در دمای ۶۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد و با استفاده از یک آنزیم DNA پلی‌مراز مقاوم به حرارت تکثیر می‌یابد. روش LAMP ساده و انجام آن آسان است و تنها نیاز به پرایمر، DNA پلی‌مراز و مخلوط واکنش دارد و نیازی به ترمو سایکلر ندارد. واکنش در حمام آب گرم یا بلوک‌های حرارتی قابل انجام است (۶۵). به وسیله ترکیب با نسخه‌برداری معکوس، LAMP قادر است توالی‌های RNA را با کارایی بالا تکثیر نماید. امکان آشکارسازی نتیجه نهایی واکنش بر اساس کدر شدن محیط عمل واکنش است که با چشم یا دستگاه قابل مشاهده است. نیاز به واسرشت نمودن DNA اولیه و حتی نیاز به استخراج DNA اولیه از برخی نمونه‌های بیولوژیک (مانند محیط کشت مایع) نمی‌باشد. پر واضح است که LAMP نیز همانند سایر روش‌ها دارای محدودیت هایی در طراحی پیچیده پرایمر است که البته آشنایان با بیوانفورماتیک قادر به انجام آن هستند. چنین شرایط ساده‌ای، انجام LAMP را به راحتی برای آزمایشگاه‌های کوچک، به ویژه در مناطق بومی و روستایی در دسترس می‌کند. بنابراین، به نظر می‌رسد این روش یک ابزار امیدوارکننده است (۷۲، ۷۱).

DNA Array Hybridization

این روش با عنوان RDBH (Reverse dot blot hybridization) و DNA Microarray technology نیز شناخته می‌شود. این روش بر اساس هیبریداسیون قطعات تکثیرشده توسط PCR به نواحی پروب‌های الیگونوکلئوتیدی ایموبیلیزه و نشان‌دار شده تعریف شده است (۷۴، ۷۳). در اصل این متد برای شناسایی موتاسیون‌های موجود در ژنوم انسان طراحی و به کار گرفته شده بود. امروزه به عنوان یک تکنیک عملکردی برای تشخیص و تعیین هویت میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها و قارچ‌ها از نمونه‌های کلینیکی و محیطی، بدون نیاز به کشت و همچنین بررسی پروفایل بیانی ژن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷۷-۷۵). پروب‌های الیگونوکلئوتیدی نشان‌دار باید بر اساس سکانس ژنومی گونه یا استرین‌های مورد نظر، توسط نرم‌افزارهای اختصاصی، طراحی شوند. بنابراین دانستن سکانس ژنومی میکروارگانیسم مورد مطالعه ضروری است. برای این کار در خصوص قارچ‌ها و میکروارگانیسم‌های شبه قارچ از نواحی

ژنومی متنوعی نظیر ناحیه ITS، ژن‌های میتوکندریایی COX (Cytochrome c oxydase subunit) و برخی نواحی کدکننده پروتئین‌هایی نظیر بتا-توبولین و EF-1α استفاده می‌شود (۷۸، ۷۹). امروزه این تکنیک راهکار مناسب و نوینی در جهت تعیین پروفایل مولکولی، تعیین اهداف دارویی جدید و طراحی بیومارکرها محسوب می‌شود (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۳: مراحل تکنیک DNA array hybridization (۶۳)

Fluorescent Insitu hybridisation :FISH

از آن جا که قارچ‌ها دارای انتشار جهانی هستند، درک تنوع زیستی، فراوانی و همچنین نقش زیست محیطی آن‌ها در زیستگاه‌های مختلف مانند خاک، برگ‌های پوسیده، چوب و همچنین محیط‌های داخلی (بدن انسان) بسیار حائز اهمیت است. به دلیل محدودیت در تهیه بیوپسی از بافت، شناسایی قارچ در مقاطع بافتی می‌تواند مشکل باشد. این تکنیک در شناسایی سریع و دقیق قارچ‌های مهاجم کمک می‌کند. آسپرژیلوس و گونه زیگومیست‌ها، اغلب در بافت تنها در اشکال هیفی خود دیده می‌شوند. گونه‌های کاندیدا به طور معمول کمتر به عنوان عناصر هیفی دیده می‌شوند. امروزه با استفاده از این تکنیک، به واسطه طراحی پروب اختصاصی، قادر به شناسایی این گونه‌های پاتوژن شده‌اند. پروب‌های DNA با درجه بالایی از ویژگی، در برابر 5S و 18S توالی RNA ریبوزومی از سه گروه از قارچ‌ها، به طور جداگانه طراحی شده است (۸۰). شناسایی مخمرها و شبه مخمر در مقاطع بافتی می‌تواند بسیار دشوار باشد. علاوه بر این، چندین گونه از لحاظ ویژگی‌های بافت‌شناسی با یکدیگر تداخل دارند. هر یک از این ارگانیسم‌های بلاستومایسس درماتیتیدیس، کوکسیدیوییدس ایمیتیس، کریپتوکوکوس نئوفورمنس، هیستوپلاسما کپسولاتوم و اسپوروتریکس شنکئی می‌توانند در داخل بافت، ساختارهای شبه مخمری یا مخمری آشکار و اغلب در یک محدوده، اندازه مشابه ایجاد نمایند. امروزه با استفاده از تکنیک FISH قادر به شناسایی گونه های پاتوژنی خواهیم بود که در تصاویر میکروسکوپی بسیار نزدیک هم هستند (۸۱). FISH یک روش قدرتمند برای تشخیص سریع ارگانیسم قارچی در نمونه‌های محیطی است. این تکنیک می‌تواند محل دقیق توالی خاص DNA یا RNA در سیتوپلاسم و اندامک‌ها یا هسته را مشخص نماید. به عنوان یک نتیجه، این تکنیک می‌تواند زمانی که RNA وجود دارد، قارچ‌های فعال از نظر متابولیکی و غیر قابل کشت را به طور مستقیم از محیط شناسایی نماید.

مراحل اصلی تکنیک FISH شامل تهیه مواد بیولوژیکی یا نمونه زیست محیطی و نشان‌دار نمودن (آغشته نمودن به ترکیب فلورسنت/ نشانگر) و ساختن پروب (یک توالی اسید نوکلئیک کوتاه) می‌باشد. در این تکنیک پروب با اسید نوکلئیک از جنس RNA و DNA هیبرید می‌شود تا یک

مولکول دو رشته‌ای شکل گیرد. در پایان محل هیبریدشده شناسایی می‌شود و فلورسنت ساطع می‌شود. اغلب سکانس مورد هدف در تکنیک FISH کپی‌های زیاد توالی RNA ریبوزیمی و ژن‌های میتوکندریایی در هر سلول است. پروب یا الیگونوکلئوتیدی با یک Fluorochrome، به عنوان مثال یک رنگ Carboindocyanine، نشان‌دار می‌شود. اولین پروب FISH با هدف قرار دادن قارچ اوریوبازیدیوم پولولنس روی جوانه در سال ۱۹۹۶ طراحی شد. از محدودیت‌های تکنیک FISH، خاصیت اتوفلورسانس برخی از قارچ‌ها و سوبستراها، نفوذپذیری نامناسب دیواره سلولی، اتصالات غیر اختصاصی پروب و محتویات پایین کپی‌های ریبوزومی در برخی از سلول ها است. خاصیت اتوفلورسانس قارچ منجر به پاسخ‌های مثبت کاذب می‌شود (۸۲).

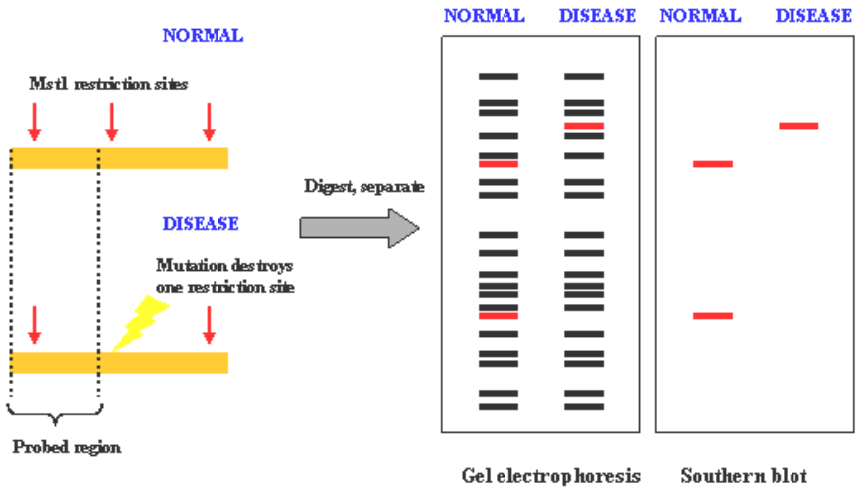
روش‌های اپیدمیولوژی مولکولی

گذار از قارچ‌شناسی پزشکی کلاسیک به عصر مولکولی برای اپیدمیولوژی قارچ‌ها بسیار مهم‌تر ار سایر زمینه‌های بالینی قارچ‌شناسی بوده است. در دوره مولکولی کمابیش در تشخیص‌های قارچ‌شناسی بهبود بخشیده شد. در این زمان ایجاد زمینه‌ای از اپیدمیولوژی مولکولی ضروری به نظر می‌رسید. در مطالعات گذشته تعیین ارتباط دو گونه با هم بر اساس استفاده از تکنیک‌های متعددی برای تشخیص قارچ‌شناسی با هدف ایجاد حساسیت بالا و به دست آوردن قدرت افتراق در سطح داخل گونه‌ای بود. این روش‌ها به طور عمده بر اساس روش‌های فنوتیپی است. بعضی از این روش‌های عمده شامل تعیین گونه بر اساس مورفولوژی، سرولوژی، آنتی‌بیوگرام، رسیتوگرام، بیوتایپینگ، کشندگی توکسین و آنالیز ایزوزیم‌ها بود. تکنیک‌هایی که در ادامه گفته خواهد شد به علت استفاده همه‌گیر آن‌ها در اپیدمیولوژی قارچی بسیار حائز اهمیت است.

RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

تأثیر بیولوژی مولکولی بر اپیدمیولوژی قارچ‌ها اولین بار با ابداع تکنیک RFLP که به صورت موفقیت‌آمیزی در افتراق گونه‌های کاندیدا به کار رفت، مشخص گردید (۴۰). این روش، در بین تکنیک‌های مولکولی، ساده‌ترین روش در شناسایی گونه‌ها است. ژنوم موجودات به طور طبیعی دارای تفاوت‌هایی در ردیف بازهای خطی می‌باشند. این تغییرات طبیعی که سبب گوناگونی در افراد یک جمعیت می‌شود پلی‌مورفیسم نام دارد. اگر این پلی‌مورفیسم در ردیف بازهای DNA در جایگاه شناسایی آنزیم محدودکننده ایجاد شده باشند به راحتی قابل ردیابی است. RFLP وجود الگوهای غیر یکسان است که بر اثر هضم آنزیمی یک ناحیه خاص از DNA به وسیله آنزیم‌های محدودکننده مشخص می‌شود. این الگوهای غیر یکسان به علت تفاوت DNA بسته به حضور یا عدم حضور جایگاه آنزیم‌های محدودکننده به وجود می‌آید (تصویر شماره ۴).

در این روش ابتدا به وسیله یک آنزیم برش‌دهنده (Restriction enzyme) قطعات DNA از روی توالی بازهای آلی بریده می‌شوند. آنزیم‌های برش‌دهنده آنزیم‌هایی هستند که فقط اتصالات خاص از رمزهای ATCG را تشخیص می‌دهند. هر آنزیمی که اتصال مخصوص خودش را پیدا کند به آن متصل می‌شود و رشته DNA را در این محل قطع می‌کند. به عنوان مثال اگر آنزیم بتواند اتصال CCGC را تشخیص دهد بنابراین همیشه اتصال بین C و G را قطع می‌کند. حال قطعات حاصل از این برش‌ها بر روی ژل آگارز لکه‌گذاری می‌شوند و سپس جریان الکتریسیته به آن متصل می‌گردد. این جریان باعث می‌شود هر کدام از این قطعات بر حسب طول خود با سرعت‌های مختلف بر روی ژل حرکت کنند. قطعات کوچک سریع‌تر از قطعات طویل بر روی ژل حرکت می‌کنند و پس از مدتی این قطعات به صورت باندهایی در اندازه‌های مختلف انتشار می‌یابند. هم اکنون در مطالعات اپیدمیولوژیک به علت این که تکنیک‌های دیگر حساسیت بالاتری دارند و گسترش پیدا کرده‌اند، از روش RFLP استفاده نمی‌گردد. به هر حال RFLP اساسی را برای روش‌های تایپینگ قارچ‌ها فراهم می‌کند که از آن جمله



تصویر شماره ۴: مراحل تکنیک RFLP (۴۰)

می‌توان به انگشت‌نگاری DNA با استفاده از پروب‌های هیبریداسیون اختصاصی اشاره کرد.

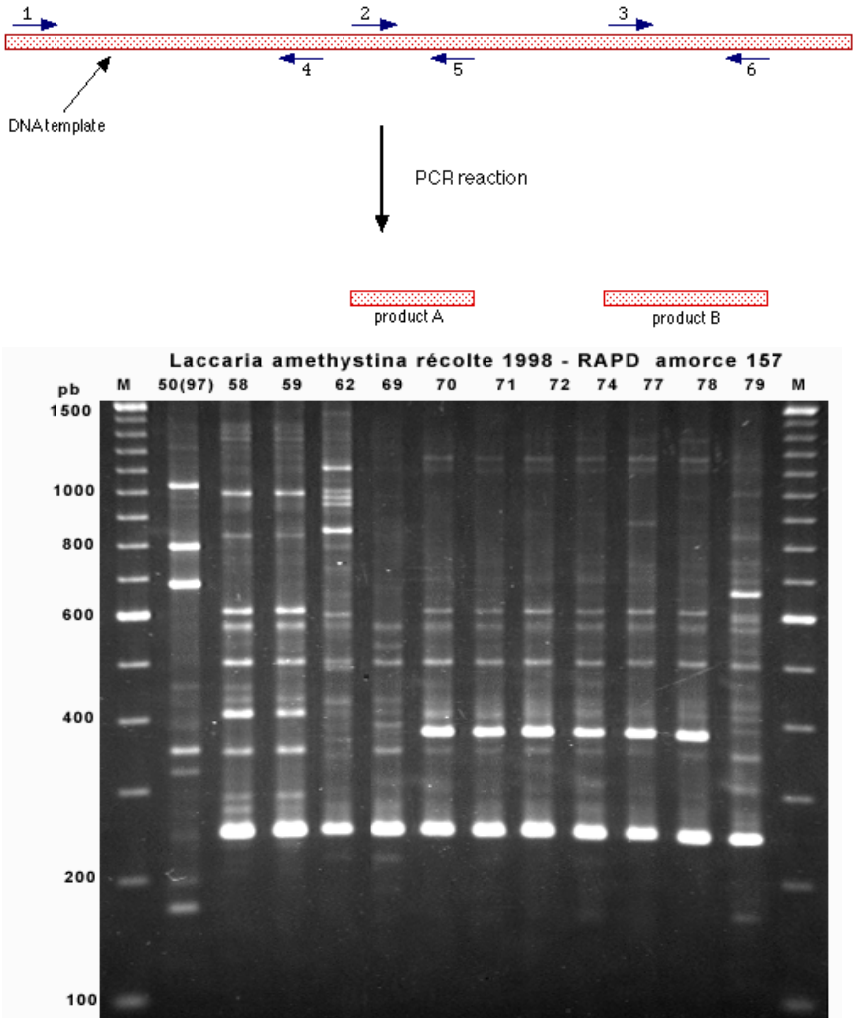
Random amplification of polymorphic DNA (RAPD)

در بین روش‌هایی که گفته شد شاید هیچ روش ساده‌تری از RAPD، به عنوان یک ابزار اپیدمیولوژیک، برای تعیین ارتباط ۲ ایزوله نباشد. این تکنیک بر اساس تکثیر DNA ژنومی به روش PCR انجام می‌گیرد، اما نیازی به شناسایی محل اتصال پرایمر هدف ندارد. اولین کاربردهای آنالیز RAPD به منظور تمایز ایزوله‌های هیستوپلاسما کپسولاتوم، آسپرژیلوس فومیگاتوس و کاندیدا آلبیکنس در سال ۱۹۹۲ در مورد پاتوژن‌های قارچی انسانی به کار گرفته شد. این تکنیک متکی به محل‌های متفاوت اتصال پرایمر (به طور معمول یک تا ۳ پرایمر در یک واکنش می‌تواند وجود داشته باشد) است که به حد کافی به یکدیگر نزدیک هستند تا امکان ایجاد تکثیر را فراهم کنند (تصویر شماره ۵).

طراحی پرایمر به طور معمول اختیاری است و می‌توان به سادگی از پرایمرهای تجارتی (پرایمر M13) استفاده نمود. در این روش پرایمرها کوتاه‌تر از پرایمرهای مورد استفاده در PCR استاندارد هستند. این مسأله احتمال یافتن مکان‌های اتصال پرایمر را افزایش می‌دهد. از این رو پرایمرها به درجه حرارت به نسبت پایینی برای اتصال نیاز دارند. محصولات تکثیر بعد از جداسازی روی ژل آگارز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید قابل مشاهده می‌باشند. آنالیز RAPD در اپیدمیولوژی قارچ‌ها به علت قابلیت تکرارپذیری پایین و تنوع زیاد نتایج در آزمایشگاه‌های مختلف مورد انتقاد می‌باشد (۸۳).

انگشت نگاری DNA (DNA fingerprinting)

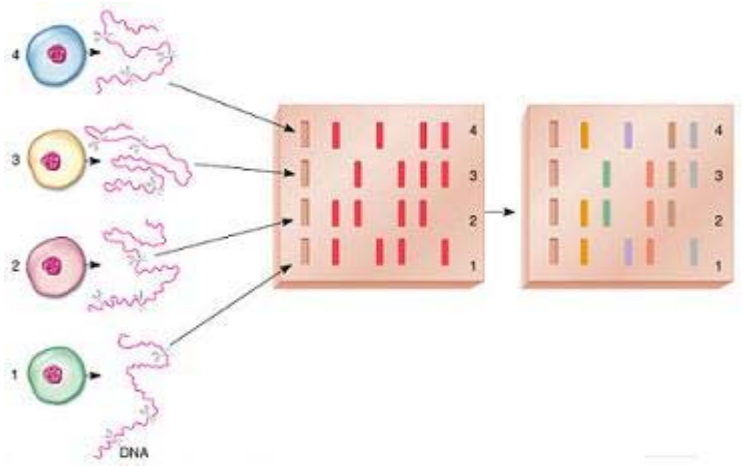
ساختمان شیمیایی همه DNAها شبیه به هم هستند. تنها اختلاف آن‌ها در ترتیب جفت بازها است. بیش از میلیون‌ها جفت باز در DNA هر موجود وجود دارد. هر موجود توالی مختلفی دارد. با استفاده از این توالی، هر موجودی به طور انحصاری به وسیله تعیین توالی جفت بازهای خودش شناخته می‌شود. با توجه به این که بیش از میلیون‌ها جفت باز وجود دارد این کار بسیار وقت‌گیر می‌باشد. در عوض دانشمندان می‌توانند از روش‌های کوتاه‌تر استفاده کنند زیرا الگوهای تکرار DNA را می‌دانند. توالی‌های DNA ژنومی مورد استفاده در این آزمون‌ها، اغلب نواحی حاوی DNA تکراری



تصویر شماره ۵: مراحل تکنیک RAPD (۸۳)

(توالی‌های کوتاه که هزاران بار پشت سر هم، تکرار شده‌اند) هستند که در ژنوم قارچ‌ها معمول هستند. تعداد واحدهای تکراری موجود در چنین DNA هایی، در بین قارچ‌های مختلف، متفاوت است. در صورت انتخاب یک پروب مناسب، الگوی باندهای حاصل از چنین آزمایشی برای هر قارچ، اختصاصی خواهد بود. با به کارگیری پروب‌های متعدد، این آزمون در حدی انتخابی خواهد شد که می‌تواند یک موجود را در کل موجودات شناسایی نماید (۸۴).

تعدادی از پروب‌های مفید برای شناسایی پاتوژن‌های قارچی مهم انسانی شامل 27A، CARE-1 و Ca3 برای کاندیدا آلبیکنس، CNRE-1، Cntel و UT-4p برای کریپتوکوکوس نئوفورمنس و AfUT1، 3011 و 3019 برای آسپرژیلوس فومیگاتوس می‌باشد. علاوه بر پروب این قارچ‌ها، پروب‌های انگشت‌نگاری دیگری نیز برای سایر قارچ‌ها موجود می‌باشد. یکی دیگر از جذابیت‌های عمده در استفاده از پروب‌های انگشت‌نگاری به عنوان یک وسیله تعیین استرین این است که محصول و یا نتایج را می‌توان به صورت کیفی بررسی کرد. بعد از هیبریداسیون، اطلاعاتی که از گراف‌ها به دست می‌آید، بسته به الگوی باندها این اجازه را به محققین می‌دهد تا نگرش کیفی درباره ارتباط دو استرین را فقط به صورت مشاهده ساده تفسیر نمایند. به هر حال سهولت تفسیر نتایج در این روش باعث گردیده است تا این تکنیک به عنوان یکی از رایج‌ترین سیستم‌های تایپینگ مورد استفاده قرار گیرد (تصویر شماره ۶).

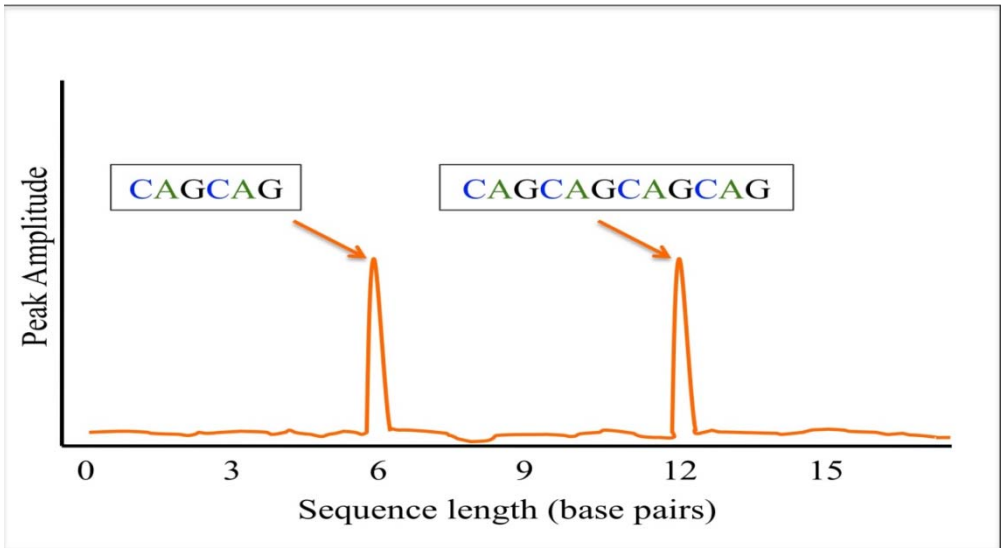


تصویر شماره ۶: مراحل تکنیک DNA fingerprinting (۸۴)

میکروستلایت تایپینگ (Microsatellite typing)

میکروستلایت‌ها توالی‌های ساده تکرارشونده یک نوکلئوتید یا بیشتر (اغلب یک تا ۶) هستند که بر اساس تعداد تکرار تشخیص داده می‌شوند. امروزه واژه میکروساتلایت و مینی‌ساتلایت برای متخصصان علم ژنتیک واژه‌ای بسیار آشنا است. معمول‌ترین تکرارهای موجود در ژنوم پستانداران، تکرارهای n (CA) و n (CT) و (dG-dT) می‌باشند. تعداد بازهای موجود در هر میکروساتلایت ممکن است به ۲، ۳، ۴ و حتی بیشتر برسد که طبق قاعده خاصی در ژنوم تکرار می‌شود (تصویر شماره ۷).

سکانس‌های تک تکرارشونده (SSR یا Single sequence repeat) در سرتاسر ژنوم پراکنده شده‌اند و بسیار پلی‌مورف هستند و یک ابزار تایپینگ عالی را ایجاد می‌کنند. در میکروستلایت تایپینگ نیاز به شناخت توالی ارگانیسم به منظور طراحی جفت پرایمرهایی که به لوکوس متصل می‌شوند، است. این روش دارای قابلیت تکرارپذیری در آزمایشگاه‌های مختلف، قابلیت تعیین کمی، نتایج قابل نقل و انتقال و قابلیت جواب‌دهی بالا است. مارکرهای میکروستلایت به وسیله لوکوس اختصاصی تکثیرشونده با پرایمرهای فلورسنت آنالیز می‌شوند و سپس، محصولات با Capillary sequencer از هم جدا می‌شوند. لوکوس تکثیرشده بر اساس اندازه هر قطعه تکثیرشده از یکدیگر افتراق داده می‌شود (۸۵). هر چه اطلاعات ما درباره سکانس ژن‌های



تصویر شماره ۷: توالی‌های تکرار در میکروستلایت تایپینگ (۸۵)

اختصاصی و ژنوم قارچی‌های مهم پزشکی بیشتر باشد امکان مطالعه سکانس‌ها با جزییات بیشتر از جمله مقایسه چندین لوکوس از چندین استرین، بیشتر ممکن می‌شود. میکروستلایت تایپینگ به صورت روزافزونی برای مطالعه ارتباط فیلوژنتیک پاتوژن‌های قارچی رایج شده است.

(Multilocus enzyme electrophoresis) MLEE

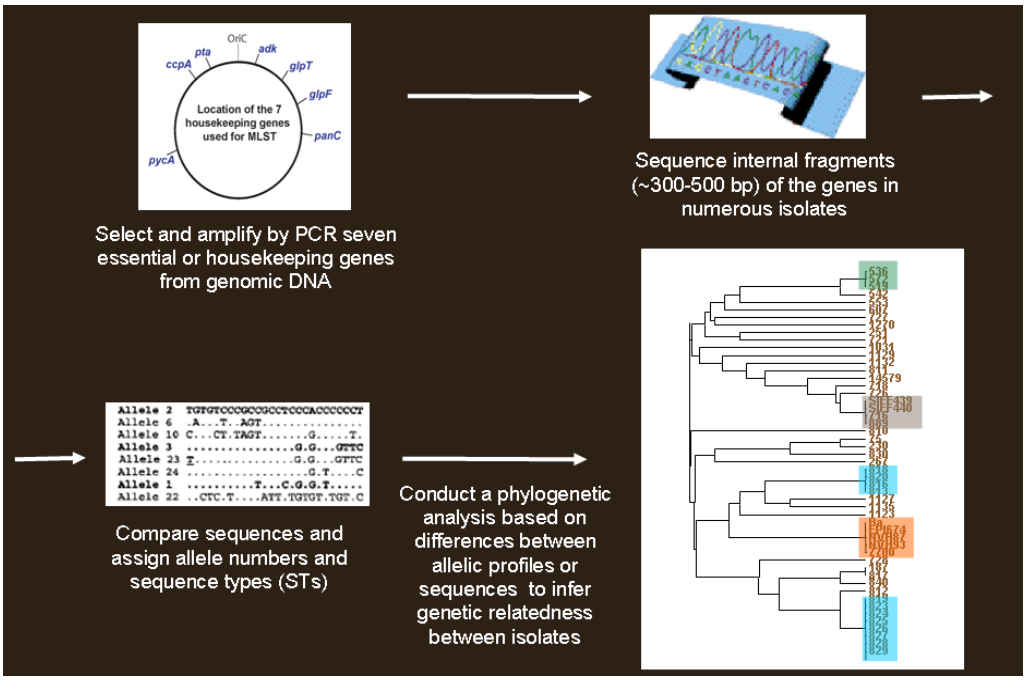
تکنیک MLEE اولین بار در دهه ۱۹۸۰، برای مطالعات سیستماتیک باکتری‌ها به کار برده شد و به عنوان تکنیک استاندارد در مطالعات ژنتیک جمعیت استفاده شد. MLEE میزان حرکت پروتئین‌های کدشده توسط ژن‌های هاسکیپینگ (House keeping) را در میدان الکتریکی بررسی می‌کند.

(Multilocus sequence typing) MLST

روشی است که برای تعیین توالی DNA با PCR پایه‌گذاری شده است و قابلیت بسیار بالایی در افتراق استرین‌ها دارد. این روش با تعیین استرین‌های یک گونه قارچی بر اساس توالی‌های DNA در چندین لوکوس ژنی باعث پیشرفت مطالعات اپیدمیولوژی و تکامل فیلوژنتیکی بسیاری از قارچ‌ها شده است. این روش بر اساس آنالیز توالی DNA پلی‌مورفیسم‌های نوکلئوتید در ژن‌های هاسکیپینگ است و از درجه بالای قدرت تمایزکنندگی درون گونه‌ای برای بسیاری از قارچ‌های پاتوژن برخوردار است. دو تکنیک عمده شامل MLEE و MLST تغییرات در ژن‌های هاسکیپینگ را نشان می‌دهند (۸۶). MLST به طور مستقیم از روی توالی نوکلئوتیدی ژن‌های هاسکیپینگ، الل‌ها را مشخص می‌کند. به تازگی MLST به عنوان یک روش اصلاح‌یافته از تکنیک MLEE پا به عرصه گذاشته است و معتبرترین روش در اپیدمیولوژی مولکولی قلمداد می‌شود. از جمله مزایای تکنیک MLST نسبت به MLEE می‌توان به قدرت تفکیک بیشتر (تغییرات با معنا و بی معنا را شناسایی می‌کند)، دقت بالا، قابلیت انتقال اطلاعات، سهولت انجام تکنیک و قابلیت تکرارپذیری بالا اشاره کرد (تصویر شماره ۸).

(Amplified fragment length polymorphism) AFLP

یکی از جدیدترین روش‌های آنالیز AFLP است که توسط Keygene BV در هلند ابداع شد (۸۸، ۸۷). این روش

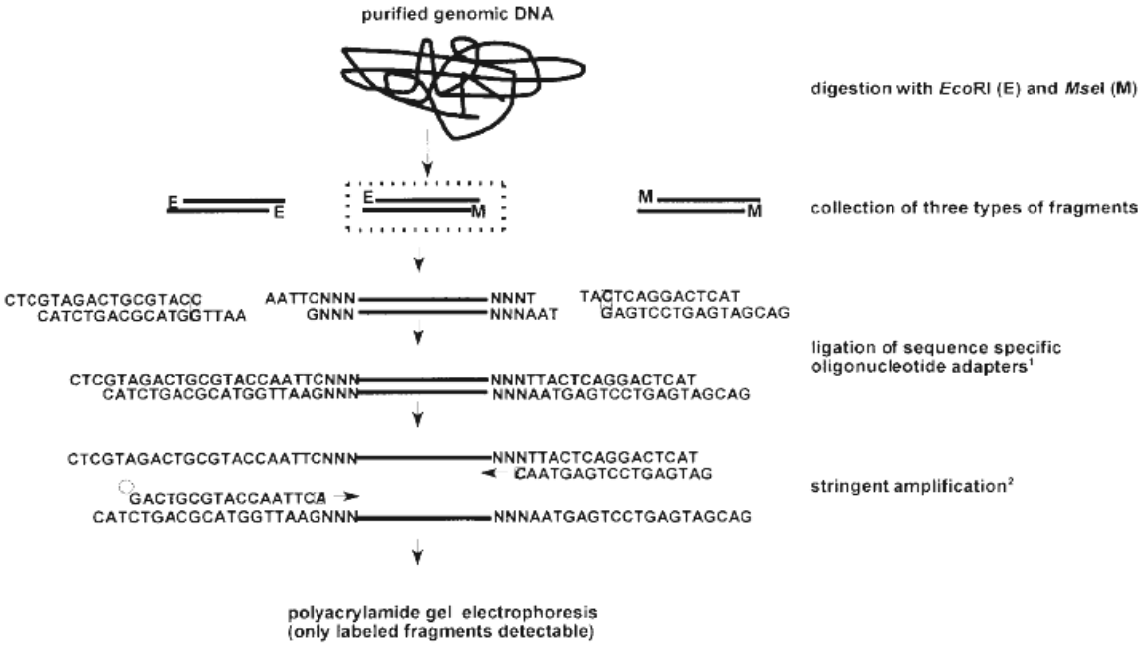


تصویر شماره ۸: مراحل تکنیک MLST (۸۶)

ترکیبی از قدرت افتراق و قابلیت تکرارپذیری بالا می‌باشد (۸۹). این روش در گروه تکنیک‌هایی قرار می‌گیرد که وابسته به تقویت قطعات حاصل از یک یا دو هضم انتخابی توسط آنزیم‌های محدودالاثر (Restriction enzyme) است. اساس این تکنیک اتصال الیگونوکلئوتیدهای دو رشته‌ای به نام Adaptor (Linkers) به قطعات ژنومی هضم‌شده و تکثیر این اهداف توسط پرایمرهای اختصاصی است. به طور مسلم سکانس‌های ژنومی مختلف نقاط برش متفاوتی برای آنزیم‌های محدود الاثر دارند و بنابراین اندازه قطعات حاصل از واکنش PCR برای گونه‌ها و حتی استرین‌های مختلف، متفاوت خواهد بود. این روش به عنوان یک روش بسیار حساس با اختصاصیت بالا جهت مطالعات تاکسونومیک، ژنوتایپینگ و متعاقب آن مولکولی اپیدمیولوژی، تهیه نقشه ژنتیکی و شناسایی مارکرهای تشخیصی برای قارچ‌های پاتوژن، محسوب می‌شود. مزیت این روش نسبت به متد Microarray و نیز Macroarray این است که احتیاج به هیچ گونه اطلاعات قبلی در مورد سکانس ژنومی میکروارگانیسم مورد مطالعه، نیست. جهت انجام این روش مقدار کمی از DNA مورد نیاز است.

DNA ژنومی توسط دو آنزیم محدودالاثر، یکی با سایت‌های برش متعدد و دیگری با سایت‌های برش محدود و نادر، برش می‌خورد و انتهاهای قطعات ایجادشده به اداپتورها متصل می‌شوند. این رشته به عنوان الگو برای انجام PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد. تکثیر قطعات انتخابی طی دو واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی انجام می‌گیرد. پرایمرها دارای ۱ تا ۳ باز تصادفی در انتهای ۳' خود هستند. بنابراین استفاده از یک باز تصادفی باعث تکثیر تنها یک قطعه اختصاصی از ۴ قطعه الگو خواهد شد و به همین ترتیب استفاده از ۳ باز تصادفی در هر پرایمر باعث تکثیر تنها یک قطعه اختصاصی از ۴۰۹۶ قطعه الگو می‌شود (تصویر شماره ۹) (۹۰).

الگوهای متفاوت حاصل از الکتروفورز محصولات PCR، باعث افتراق بین ایزوله‌ها و تعیین ارتباط بین آن‌ها می‌گردد. علاوه بر این شناسایی موتاسیون در نواحی هضم آنزیمی و نیز نواحی اطراف آن‌ها قابل ردیابی خواهد بود. تصویر شماره ۹ مختصری از مراحل انجام این روش را نشان می‌دهد. پژوهشگران موفق به ارزیابی تنوع ژنتیکی قارچ رشته‌ای آسپرژیلوس نایجر با استفاده از این تکنیک شده‌اند (۷۹).



تصویر شماره ۹: مراحل تکنیک در AFLP (۹۱)

همچنین، Montiel و همکاران تنوع ژنتیکی آسپرژیلوس گروه فلاوی را با استفاده از همین تکنیک، بررسی کردند (۹۲).

نتایج رضایت‌بخش برای بیمارانی که به عفونت‌های قارچی مبتلا می‌شوند زمانی اتفاق می‌افتد که تشخیص‌های سریع و دقیق همراه با درمان زودرس و استفاده از داروهای ضد قارچی مناسب انجام شود. امروزه ابزارهای تشخیصی متنوعی در اختیار پزشکان وجود دارد. برخی از این روش‌ها استاندارد هستند و بعضی دیگر نسبت به روش‌های دیگر مزیت‌ها و معایبی دارند. روش‌های سنتی به طور معمول حساسیت و اختصاصیت محدودی دارند و اغلب با استفاده از شیوه‌های تهاجمی که برای بیماران خاص مناسب نیست، همراه می‌باشد. روش‌های تشخیصی جدید بر پایه شناسایی ترکیبات دیواره سلول قارچی (بتا گلوکان و گالاکتومانان)، راه‌های غیر تهاجمی برای تشخیص زودرس عفونت‌های قارچی مهاجم را، ارائه می‌دهند. تشخیص‌های بر پایه PCR از دیگر روش‌های غیر تهاجمی همراه با حساسیت بالا برای تشخیص زودرس عفونت‌های قارچی تهاجمی هستند. اما برای استفاده در درمان‌های بالینی نیاز به استانداردسازی دارند. لازم است پزشکان ابزارهای تشخیصی موجود جدید را بشناسند تا بتوانند با استفاده از روش‌های تشخیصی سنتی و جدید به تفسیر نتایج بپردازند و به تشخیص‌های سریع برسند. تحقیقات در این زمینه باید ادامه پیدا کند تا روش‌های تشخیصی پیچیده تبدیل به روش‌های آسان‌تر، ارزان‌تر و با استفاده از ابزارهای ساده شود.

در نهایت این که اساس تشخیص بسیاری از بیماری‌های قارچی، کشت می‌باشد. به علت این که با این نمونه‌ها می‌توان به شناسایی قارچ پرداخت و حساسیت دارویی ضد قارچی در شرایط آزمایشگاهی (In-vitro) را برای انتخاب داروی مناسب و تعیین میران دوز داروی مورد نظر، تعیین کرد. متأسفانه این روش با وجود سادگی واجد حساسیت رضایت‌بخشی نمی‌باشد و نیاز به زمان طولانی دارند. بنابراین دستیابی به روش‌های تشخیصی سریع‌تر الزامی به نظر می‌رسد. استفاده از روش‌های مولکولی همراه با کشت و سایر روش‌های تشخیصی، به واسطه سرعت زیادتر آن می‌تواند بسیار مفید باشد.

خطیرترین وظیفه پیش رو این است که چگونه از دانش پاتوبیولوژی و سیستم‌های طبقه‌بندی جدید مبتنی بر روش‌های مولکولی، برای پیشگیری و درمان بیماری‌های قارچی و مدیریت بیماران استفاده گردد. کشف داروهای مؤثر و ایجاد واکسن‌هایی که پایه آن‌ها دانش به دست‌آمده از بیولوژی مولکولی است، می‌تواند در پیشگیری و درمان بیماری‌های قارچی نقش داشته باشد.

References

1. Perfect J, Casadewall A. Fungal pathogenesis. In: Heitman J, Edwards JE, Filler SG, Mitchell AP, Editors. Molecular Principles of Fungal Pathogenesis. 1st ed. Herndon, VA: Amer Society for Microbiology; 2006. p. 3-11.
2. Quindos G. [Candidiasis, aspergillosis and other invasive mycoses in recipients of solid organ transplants]. Rev Iberoam Micol 2011; 28(3): 110-9.
3. Pontń J. Diagnśtico microbiolǵico de las micosis. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 25-9.
4. Nucci M, Anaissie E. Fusarium infections in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev 2007; 20(4): 695-704.
5. Klingspor L, Loeffler J. Aspergillus PCR formidable challenges and progress. Med Mycol 2009; 47(Suppl 1): S241-S247.
6. Rosa C, Araujo R, Rodrigues AG, Pinto-de-Sousa MI, Pina-Vaz C. Detection of Aspergillus species in BACTEC blood cultures. J Med Microbiol 2011; 60(Pt 10): 1467-71.
7. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet Infect Dis 2005; 5(10): 609-22.
8. Reichenberger F, Habicht J, Matt P, Frei R, Soler M, Bolliger CT, et al. Diagnostic yield of bronchoscopy in histologically proven invasive pulmonary aspergillosis. Bone Marrow Transplant 1999; 24(11): 1195-9.
9. Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Am J Med 1996; 100(2): 171-8.
10. Hachem RY, Kontoyiannis DP, Chemaly RF, Jiang Y, Reitzel R, Raad I. Utility of galactomannan enzyme immunoassay and (1,3) beta-D-glucan in diagnosis of invasive fungal infections: low sensitivity for Aspergillus fumigatus infection in hematologic malignancy patients. J Clin Microbiol 2009; 47(1): 129-33.
11. Guazzelli LS, Unis G, Xavier MO, Severo CB,

Picon PD, Severo LC. Fungus ball in HIV-infected patients. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2009; 51(6): 345-8.
12. Ju MK, Joo DJ, Kim SJ, Chang HK, Kim MS, Kim SI, et al. Invasive pulmonary aspergillosis after solid organ transplantation: diagnosis and treatment based on 28 years of transplantation experience. Transplant Proc 2009; 41(1): 375-8.
13. Kawamura S, Maesaki S, Tomono K, Tashiro T, Kohno S. Clinical evaluation of 61 patients with pulmonary aspergilloma. Intern Med 2000; 39(3): 209-12.
14. Nucci M, Anaissie E. Infections in patients with multiple myeloma. Semin Hematol 2009; 46(3): 277-88.
15. Li DM, de Hoog GS. Cerebral phaeohyphomycosis--a cure at what lengths? Lancet Infect Dis 2009; 9(6): 376-83.
16. Kuhlman JE, Fishman EK, Siegelman SS. Invasive pulmonary aspergillosis in acute leukemia: characteristic findings on CT, the CT halo sign, and the role of CT in early diagnosis. Radiology 1985; 157(3): 611-4.
17. Vandewoude KH, Vogelaers D. Medical imaging and timely diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Clin Infect Dis 2007; 44(3): 380-1.
18. Hebart H, Loffler J, Reitze H, Engel A, Schumacher U, Klingebiel T, et al. Prospective screening by a panfungal polymerase chain reaction assay in patients at risk for fungal infections: implications for the management of febrile neutropenia. Br J Haematol 2000; 111(2): 635-40.
19. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis 2008; 46(12): 1813-21.
20. Thornton CR. Detection of invasive aspergillosis. Adv Appl Microbiol 2010; 70: 187-216.
21. del Palacio A, Alhambra A, Cuetara MS, Ponton J. Early diagnosis of invasive fungal infections caused by Aspergillus and other emerging mycelial fungi. Rev Iberoam Micol 2007; 24(3): 187-97.
22. Rovira M, Jimenez M, De La Bellacasa JP, Mensa J, Rafel M, Ortega M, et al. Detection of Aspergillus galactomannan by enzyme immunoabsorbent assay in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective study. Transplantation 2004; 77(8): 1260-4.
23. Guinea J, Jensen J, Pelaez T, Gijon P, Alonso R, Rivera M, et al. Value of a single galactomannan determination (Platelia) for the diagnosis of invasive aspergillosis in non-hematological patients with clinical isolation of Aspergillus spp. Med Mycol 2008; 46(6): 575-9.
24. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. Lancet Infect Dis 2004; 4(6): 349-57.
25. Nabili M, Shokohi T, Jan Babaei Gh, Ali Moghaddam K, Ghavamzadeh A. Evaluation of Galactomannan Assay in Serum for Detection of Invasive Aspergillosis in Patients with Hematologic Malignancies and Bone Marrow Treansplant Recipients. J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(87): 10-21. (Persian).
26. Vanittanakom N, Cooper CR, Jr., Fisher MC, Sirisanthana T. Penicillium marneffei infection and recent advances in the epidemiology and molecular biology aspects. Clin Microbiol Rev 2006; 19(1): 95-110.
27. Kauffman CA. Diagnosis of histoplasmosis in immunosuppressed patients. Curr Opin Infect Dis 2008; 21(4): 421-5.
28. Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, et al. Biofilm production by Candida species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. J Clin Microbiol 2007; 45(6): 1843-50.
29. Mennink-Kersten MA, Klont RR, Warris A, Op den Camp HJ, Verweij PE. Bifidobacterium lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in aspergillus antigen detection. Lancet 2004; 363(9405): 325-7.
30. Sulahian A, Touratier S, Ribaud P. False positive test for aspergillus antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam. N Engl J Med 2003; 349(24): 2366-7.
31. Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. J Clin Microbiol 2005; 43(12): 5957-62.
32. Barnes PD, Marr KA. Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplant recipients. Br J Haematol 2007; 139(4): 519-31.
33. Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, Weinbergerova B, Buresova L, Toskova M, et al. Difficulties in using 1,3-{beta}-D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies--high frequency of false-positive results and their analysis. J Med Microbiol 2010; 59(Pt 9): 1016-22.
34. Burco JD, Ziccardi MH, Clemons KV, Tell LA. Evaluation of plasma (1-->3) beta-D-glucan concentrations in birds naturally and experimentally infected with aspergillus fumigatus. Avian Dis 2012; 56(1): 183-91.
35. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis

case-fatality rate: systematic review of the literature. Clin Infect Dis 2001; 32(3): 358-66.
36. Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. Med Mycol 2001; 39(1): 9-33.
37. Erjavec Z, Verweij PE. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. Drug Resist Updat 2002; 5(1): 3-10.
38. Martino P, Girmenia C. Making the diagnosis of fungal infection: when to start treatment. Int J Antimicrob Agents 2000; 16(3): 323-9.
39. de Repentigny L. Serodiagnosis of candidiasis, aspergillosis, and cryptococcosis. Clin Infect Dis 1992; 14(Suppl 1): S11-S22.
40. Magee BB, D'Souza TM, Magee PT. Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of Candida species. J Bacteriol 1987; 169(4): 1639-43.
41. White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, Editors. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York, NY: Academic Press; 1990. p. 315-22.
42. Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson KH, Koljalg U. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. PLoS One 2006; 1: e59.
43. Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, Hong SB, Yaghuchi T, Varga J, et al. Aspergillus species identification in the clinical setting. Stud Mycol 2007; 59: 39-46.
44. Seip ER, Woloshuk CP, Payne GA, Curtis SE. Isolation and sequence analysis of a beta-tubulin gene from Aspergillus flavus and its use as a selectable marker. Appl Environ Microbiol 1990; 56(12): 3686-92.
45. Samson RA, Seifert KA, Kuijpers AF, Houbraken JA, Frisvad JC. Phylogenetic analysis of Penicillium subgenus Penicillium using partial tubulin sequences. Studies In Mycology 2004; 49: 175-200.
46. Mostert L, Groenewald JZ, Summerbell RC, Gams W, Crous PW. Taxonomy and pathology of Togninia (Diaporthales) and its Phaeoacremonium anamorphs. STUDIES IN MYCOLOGY 2006; 54: 1-115.
47. Slechta ES, Hohmann SL, Simmon K, Hanson KE. Internal transcribed spacer region sequence analysis using SmartGene IDNS software for the identification of unusual clinical yeast isolates. Med Mycol 2012; 50(5): 458-66.
48. Hsuan HM, Salleh B, Zakaria L. Molecular Identification of Fusarium Species in Gibberella fujikuroi Species Complex from Rice, Sugarcane and Maize from Peninsular Malaysia. Int J Mol Sci 2011; 12(10): 6722-32.
49. Barik BP, Tayung K. Molecular differentiation of Fusarium spp. with varied lifestyles based on TEF 1 alpha gene sequence analysis. Interdiscip Sci 2012; 4(3): 201-8.
50. Sugita T, Takeo K, Hama K, Virtudazo E, Takashima M, Nishikawa A, et al. DNA sequence diversity of intergenic spacer I region in the non-lipid-dependent species Malassezia pachydermatis isolated from animals. Med Mycol 2005; 43(1): 21-6.
51. Badali H, Najafzadeh MJ, van EM, van den Enden E, Tarazooie B, Meis JF, et al. The clinical spectrum of Exophiala jeanselmei, with a case report and in vitro antifungal susceptibility of the species. Med Mycol 2010; 48(2): 318-27.
52. Seifert KA. Progress towards DNA barcoding of fungi. Mol Ecol Resour 2009; 9(Suppl s1): 83-9.
53. Zaki SM, Ibrahim N, Aoyama K, Shetaia YM, Abdel-Ghany K, Mikami Y. Dermatophyte infections in Cairo, Egypt. Mycopathologia 2009; 167(3): 133-7.
54. Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, Shidfar MR, Eshraghian MR, Jalalizand N, Nouripour-Sisakht S, et al. Use of Single-enzyme PCR-restriction Digestion Barcode Targeting the Internal Transcribed Spacers (ITS rDNA) to Identify Dermatophyte Species. Iranian J Publ Health 2012; 41(3): 82-94.
55. Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, et al. Sequence-based identification of Aspergillus, fusarium, and mucorales species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? J Clin Microbiol 2009; 47(4): 877-84.
56. Hummel M, Baust C, Kretschmar M, Nichterlein T, Schleiermacher D, Spiess B, et al. Detection of Aspergillus DNA by a nested PCR assay is superior to blood culture in an experimental murine model of invasive aspergillosis. J Med Microbiol 2004; 53(Pt 8): 803-6.
57. Buchheidt D, Hummel M, Schleiermacher D, Spiess B, Schwerdtfeger R, Cornely OA, et al. Prospective clinical evaluation of a LightCycler-mediated polymerase chain reaction assay, a nested-PCR assay and a galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay for detection of invasive aspergillosis in neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. Br J Haematol 2004; 125(2): 196-202.
58. Costa C, Costa JM, Desterke C, Botterel F, Cordonnier C, Bretagne S. Real-time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis

of invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 2002; 40(6): 2224-7.
59. Nabili M, Shokohi T, Hashemi Soteh MB, Jan Babaie Gh, Aghili SR, Hoseinikhah Z. Quantification and optimization of detection Aspergillus fumigatus DNA in blood sample using Real Time PCR. J Mazand Univ Med Sci 2010; 20(80): 34-44. (Persian).
60. Tsui CK, Woodhall J, Chen W, Levesque CA, Lau A, Schoen CD, et al. Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. IMA Fungus 2011; 2(2): 177-89.
61. Hamzehei H, Badali H, Rahnema M, Ajalli M. The Use of Rolling Circle Amplification for Molecular Identification of Cladophialophora carrionii and Cladophialophora yegresii. J Zanjan Univ Med Sci 2012; 20(80): 64-75. (Persian).
62. Fire A, Xu SQ. Rolling replication of short DNA circles. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92(10): 4641-5.
63. Pickering J, Bamford A, Godbole V, Briggs J, Scozzafava G, Roe P, et al. Integration of DNA ligation and rolling circle amplification for the homogeneous, end-point detection of single nucleotide polymorphisms. Nucleic Acids Res 2002; 30(12): e60.
64. Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. Rev Med Virol 2008; 18(6): 407-21.
65. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nat Protoc 2008; 3(5): 877-82.
66. Poon LL, Wong BW, Ma EH, Chan KH, Chow LM, Abeyewickreme W, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting Plasmodium falciparum DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. Clin Chem 2006; 52(2): 303-6.
67. Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, Di CF, Grab DJ, Suzuki H, et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. J Clin Microbiol 2003; 41(12): 5517-24.
68. Endo S, Komori T, Ricci G, Sano A, Yokoyama K, Ohori A, et al. Detection of gp43 of Paracoccidioides brasiliensis by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. FEMS Microbiol Lett 2004; 234(1): 93-7.
69. Uemura N, Makimura K, Onozaki M, Otsuka Y, Shibuya Y, Yazaki H, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing Pneumocystis pneumonia. J Med Microbiol 2008; 57(Pt 1): 50-7.
70. Inacio J, Flores O, Spencer-Martins I. Efficient identification of clinically relevant Candida yeast species by use of an assay combining panfungal loop-mediated isothermal DNA amplification with hybridization to species-specific oligonucleotide probes. J Clin Microbiol 2008; 46(2): 713-20.
71. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun 2001; 289(1): 150-4.
72. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res 2000; 28(12): E63.
73. Zhang Y, Coyne MY, Will SG, Levenson CH, Kawasaki ES. Single-base mutational analysis of cancer and genetic diseases using membrane bound modified oligonucleotides. Nucleic Acids Res 1991; 19(14): 3929-33.
74. Yang YP, Corley N, Garcia-Heras J. Reverse dot-blot hybridization as an improved tool for the molecular diagnosis of point mutations in congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency. Mol Diagn 2001; 6(3): 193-9.
75. Zhang N, Geiser DM, Smart CD. Macroarray detection of solanaceous plant pathogens in the Fusarium solani species complex. Plant Disease 2007; 91(12): 1612-20.
76. Zhang N, McCarthy ML, Smart CD. A Macroarray System for the Detection of Fungal and Oomycete Pathogens of Solanaceous Crops. Plant Disease 2008; 92(6): 953-60.
77. Chen W, Seifert KA, Levesque CA. A high density COX1 barcode oligonucleotide array for identification and detection of species of Penicillium subgenus Penicillium. Mol Ecol Resour 2009; 9(Suppl s1): 114-29.
78. Harper KA, Smart CD, Davis RM. Development of a DNA-based macroarray for the detection and identification of Amanita species. J Forensic Sci 2011; 56(4): 1003-9
79. Gilbert CA, Zhang N, Hutmacher RB, Davis RM, Smart CD. Plant Pathology and nematology, Development of a DNA-based Macroarray for the Detection and Identification of Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum in Cotton tissue. The Journal of Cotton Science 2008; 12: 165-70.
80. Hayden RT, Qian X, Procop GW, Roberts GD, Lloyd RV. In situ hybridization for the identification of filamentous fungi in tissue section. Diagn Mol Pathol 2002; 11(2): 119-26.
81. Hayden RT, Qian X, Roberts GD, Lloyd RV. In situ hybridization for the identification of yeastlike organisms in tissue section. Diagn Mol Pathol 2001; 10(1): 15-23.
82. Baschien C, Manz W, Neu TR, Szewzyk U. Fluorescence in situ Hybridization of Freshwater

Fungi. International Review of Hydrobiology 2001; 86(4-5): 371-81.
83. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. Clin Microbiol Rev 2000; 13(2): 332-70.
84. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 1990; 18(22): 6531-5.
85. Schlotterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma 2000; 109(6): 365-71.
86. Fisher M. Multilocus sequence typing (MLST) and multilocus microsatellite typing (MLMT) in fungi. In: Gadd G, Watkinson SC, Dyer PS, editors. Fungi in the Environment.Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2007. p. 340-54.
87. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 1995; 23(21): 4407-14.
88. Blears MJ, De Grandis SA, Lee H, Trevors JT. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 1998; 21(3): 99-114.
89. Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting [Online]. 2005; Available from: URL: www.freepatentsonline.com/EP0534858.html/
90. Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, et al. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as an new tool in bacterial taxonomy. Microbiology 1996; 142 (Pt 7): 1881-93.
91. Savelkoul PH, Aarts HJ, de HJ, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, et al. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. J Clin Microbiol 1999; 37(10): 3083-91.
92. Montiel D, Dickinson MJ, Lee HA, Dyer PS, Jeenes DJ, Roberts IN, et al. Genetic differentiation of the Aspergillus section Flavi complex using AFLP fingerprints. Mycol Res 2003; 107(Pt 12): 1427-34.