

Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism, A Rapid and Simple Method for Identification of Pathogenic Fungi

Robab Ebrahimi Barogh¹,
Iman Haghani²,
Javad Javidnia³,
Mahdi Abastabar^{4,5}

¹ PhD Student, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Invasive Fungi Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ PhD in Medical Mycology, Invasive Fungi Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Medical Mycology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Invasive Fungi Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received June 12, 2023; Accepted August 29, 2023)

Abstract

In recent years, the incidence of infections caused by pathogenic fungi has increased globally, especially in immunocompromised patients, transplant patients, or patients undergoing chemotherapy in intensive care units. Due to the morbidity and rapid spread of infection to other organs, accurate, rapid diagnosis and treatment of fungal infections is essential. Molecular methods such as polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) have significant superiority in sensitivity and specificity compared to conventional methods. The aim of this study is to point out the limitations of common diagnostic methods and factors affecting the sensitivity and specificity of PCR-RFLP molecular diagnostic test.

This article is a review study for which subject-related academic papers (before 2023) were collected and studied by searching the keywords of pathogenic fungi, and RFLP molecular diagnostic methods; in Persian databases as well as Latin electronic databases including Scopus, Web of Science, and PubMed .

Reviewing numerous articles showed that PCR-RFLP is a rapid, practical, and reliable method, which can be used in laboratories to determine the genotype of specific variants of fungal species isolated from clinical samples. However, there are several limitations for PCR-RFLP method demanding for more attention. The main limitations are the need for specific restriction enzymes and the difficulty of accurately determining single nucleotide polymorphisms (SNPs) in a specific diagnostic locus.

Keywords: RFLP, molecular diagnostic technique, fungi

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (225): 244-260 (Persian).

Corresponding Author: Mahdi Abastabar - Invasive Fungi Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: mabastabar@gmail.com)

واکنش زنجیره ای پلیمرز - چند شکلی طول قطعه محدود [PCR-RFLP]؛ متد سریع و ساده در تشخیص قارچ های بیماری زا

رباب ابراهیمی باروق^۱

ایمان حقانی^۲

جواد جاویدنیا^۳

مهدی عباس تبار^{۴و۵}

چکیده

در سال های اخیر، بروز عفونت های ناشی از قارچ های بیماری زا در سطح جهانی افزایش یافته است، به ویژه در بیماران مبتلا به نقص ایمنی، بیماران پیوندی و یا بیمارانی که تحت شیمی درمانی در بخش های مراقبت های ویژه قرار می گیرند. با توجه به موریدیتی و گسترش سریع عفونت به سایر اندام ها، تشخیص دقیق، سریع و درمان عفونت های قارچی امری ضروری است. روش های مولکولی از جمله polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism دارای برتری قابل توجهی در حساسیت و ویژگی نسبت به روش های مرسوم است. هدف از این مطالعه اشاره به محدودیت های روش های تشخیصی متداول و عوامل مؤثر بر حساسیت و ویژگی تست تشخیصی مولکولی PCR-RFLP است.

در این مطالعه مروری، مطالب علمی مرتبط با موضوع، شامل جستجوی کلید واژه های قارچ های بیماری زا، روش های تشخیصی مولکولی RFLP، در بانک های اطلاعاتی فارسی و هم چنین جستجو در سایر بانک های الکترونیکی لاتین مشتمل بر Web of science، Scopus، PubMed و تا سال ۲۰۲۳ جمع آوری و مورد مطالعه قرار گرفت. با بررسی مقالات متعدد دیده شد که روش PCR-RFLP سریع، عملی و قابل اعتماد است و می تواند در آزمایشگاه ها در تعیین گونه های قارچی جدا شده از نمونه های بالینی استفاده شود. از جمله معایب PCR-RFLP، تعیین دقیق پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNPs) در یک مکان تشخیصی خاص است.

واژه های کلیدی: قارچ های بیماری زا، روش های تشخیصی مولکولی، PCR-RFLP

مقدمه

قارچی زیرجلدی نظیر اسپورتریکوزیس، بافت های زیر جلدی را درگیر می کنند (۳) و عفونت های قارچی تهاجمی می توانند اندام های داخلی را بخصوص در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی، تحت تأثیر قرار دهند (۱). هر ساله حدود ۱/۵ میلیون مرگ ناشی از عفونت های قارچی تهاجمی در سطح جهان رخ می دهد (۴). به منظور کاهش

عفونت های قارچی یک مسئله جهانی است که میلیون ها نفر را در سراسر جهان تحت تأثیر قرار می دهد. آن ها به عفونت های سطحی، جلدی/مخاطی، زیرجلدی و تهاجمی طبقه بندی می شوند (۱). عفونت های قارچی سطحی و جلدی معمولاً توسط گونه های *کاندیدا*، *مالاسزیا*، *ترایکوسپورون* و درماتوفیت ها ایجاد می شوند (۲). بیماری های

مؤلف مسئول: مهدی عباس تبار - ساری: ۱۷ کیلومتری جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی E-mail: mabastabar@gmail.com

۱. دانشجوی دکتری قارچ شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ساری، ایران

۲. استادیار، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، پژوهشکده بیماری های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دکتری تخصصی قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، پژوهشکده بیماری های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. دانشیار، گروه قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، پژوهشکده بیماری های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۴/۴ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۶/۷

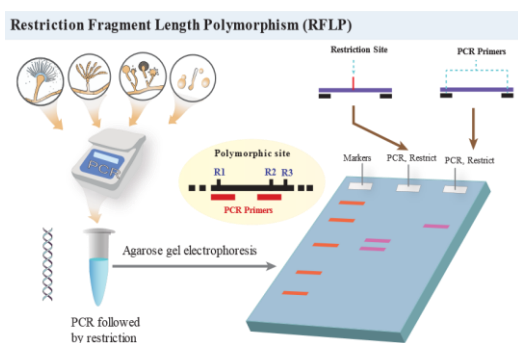
بروز جهانی مرگ و میر ناشی از عفونت های تهاجمی، باید به سمت توسعه ابزارهای تشخیصی حرکت کنیم. علاوه بر این پیدایش مقاومت به داروهای متداول در درمان این عفونت ها، حائز اهمیت می باشد. بنابراین شناسایی سریع ایزوله های مقاوم به این داروها و جهش های ژنی مرتبط آن ها برای مدیریت درمان بیمار و تحقیقات اپیدمیولوژیک بسیار مهم می باشد. با استفاده از روش های مولکولی که قادر به شناسایی مستقیم مقاومت دارویی است می توان درمان ایده آلی را برای بیماران مختلف فراهم کرد (۵). در پزشکی، شناسایی گونه میکروارگانیزم های جدا شده برای پیشگیری، تشخیص و درمان بیماری های عفونی مهم است. از مهم ترین روش های تشخیصی در بیماری های قارچی آزمایش مستقیم، کشت عوامل قارچی، تست سرولوژیکی، هیستوپاتولوژی و روش مولکولی است (۴،۵). هر کدام از این روش ها دارای معایبی هستند از جمله خطاهای نمونه گیری، مثبت و منفی کاذب، آلودگی محیط زیست و هزینه بالای تشخیص و درمان که با صرف زمان بسیار طولانی به بیمار تحمیل می شود (۶). بنابراین این روش ها جوابگوی همه گیری عفونت های قارچی در بیماران مختلف به ویژه در بیماران با دستگاه ایمنی سرکوب شده نمی باشد (۷،۸). با توجه به این که چنین تکنیک های تشخیصی مرسوم برای رسیدن به تشخیص بسیار زمان بر هستند و دقت نتایج به تخصص پرسنل بستگی دارد. بنابراین، نیاز به تکنیک های تشخیصی مولکولی برای افزایش حساسیت، ویژگی و سرعت تشخیص احساس می شود. تشخیص سریع، مشکل ناشی از تشخیص دیر هنگام و طولانی شدن دوره درمان را برای بیمار کاهش می دهد (۹). نقش تست های تشخیصی مولکولی در ارزیابی علت عفونت قارچی به سرعت در حال تکامل است و هر ساله آزمایش های جدیدی در دسترس قرار می گیرند. سایر تکنیک های مولکولی مانند توالی یابی ژنوم جزئی یا کامل، Microarrays، تکنیک های مدرن PCR، مثل Real-time PCR، Multiplex PCR نیز مورد استفاده قرار می گیرند، اما برای آزمایشگاه های بالینی کوچک، به دلیل هزینه بالای تجهیزات و معرف ها

قابلیت اجرایی ندارند (۱۰) با این حال روش پلی مورفیسم طول قطعه برش یافته با واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR-RFLP) به نسبت آسان و کم هزینه است و الگوی به دست آمده قابل تکرار و قابل اعتماد است (۱۱). تکنیک PCR-RFLP اولین بار در سال ۱۹۸۰ معرفی شد (۱۲) و کاربرد وسیعی در ژنتیک پزشکی انسان از جمله تشخیص سرطان زایی با توصیف پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNPs)، عفونت انگلی، گاستریت، عفونت دستگاه ادراری، پلی مورفیسم ژنتیکی، ناباروری و ژنوتیپ گروه خونی دارد (۱۳). اساس این تکنیک، برش دادن DNA ژنومی با استفاده از آنزیم های محدود الاثر و الکتروفورز قطعات تولید شده بر اساس اندازه مولکولی بر روی ژل الکتروفورز می باشد (۱۴). آنزیم های محدود الاثر، آنزیم هایی هستند که توالی های نوکلئوتیدی خاص را تشخیص و برش می دهند (۱۵). این آنزیم ها در دهه ۱۹۵۰ به عنوان یک سیستم Restriction و Modification کشف شدند. هر آنزیم با استفاده از یک سیستم نام گذاری بر اساس جنس، گونه و سویه باکتری، از روی باکتری که از آن جدا شده است، نامگذاری می شود. به عنوان مثال نام آنزیم محدود الاثر *EcoRI*، *Escherichia coli* (مخفف جنس باکتری، *CO*) مخفف گونه خاص باکتری، *R* (RY13) مخفف گونه باکتری، *I* نشان دهنده ترتیب شناسایی باکتری می باشد. آنزیم های محدود الاثر بر اساس ترکیب آنزیم، کوفاکتورهای مورد نیاز، توالی مورد شناسایی و مشخصات هضم DNA به چهار نوع I، II، III، IV تقسیم می شوند (۱۶). نرم افزارهای کامپیوتری مختلفی برای کمک به انتخاب اندونوکلئازهای محدود الاثر از جمله Gene Runner، Webcutter، NEBcutter، MapDraw، Genetyx، REBsites، Infobiogen، DNA Club، BioEdit و SNP Cutter توسعه یافته اند. برای شناسایی آنزیم های محدود الاثر توسط این سایت ها توالی مورد نظر خود را وارد می نماییم (۱۷). جایگاه برش (Cutting site) در نرم افزار در محلی مشخص می شود که هر آنزیم به طور اختصاصی شناسایی می کند و برش می دهد (۱۸). از مزایای

نمونه برای اطمینان از نتیجه مثبت نیست و راه را برای سایر تکنیک‌های مولکولی برای تشخیص قارچ‌ها از جمله PCR-RFLP باز می‌کند. روش انجام RFLP در تصویر شماره ۱ به صورت شماتیک آورده شده است. جدول شماره ۲ خلاصه‌ای از مطالعات انجام شده با روش PCR-RFLP برای شناسایی قارچ‌های مختلف می‌باشد.

جدول شماره ۱: مزایا و معایب روش PCR-RFLP

مزایا	معایب
سرعت بالا، اجرای ساده، کم هزینه بودن، تکرار پذیری بالا	نیاز به آنالیز دقیق سکاتس به منظور انتخاب دقیق آنزیم‌های محدودالانتر اختصاصی
نیاز به مقدار DNA اولیه بسیار کم و در حد نانوگرم، بهینه سازی سریع	عدم توانایی در شناسایی جهش‌های ناشناخته
اختصاصیت فوق العاده بالا و عدم شناسایی توالی غیر اختصاصی	گران بودن برخی از آنزیم‌ها
روش کاربردی در تعیین گونه و ژنوتیپ واریت‌ها	
قابل تشخیص بودن ژنوتیپ هتروزیگوت	
شناسایی عفونت‌هایی که به طور هم زمان توسط چند گونه ایجاد شده اند	



تصویر شماره ۱: پروتکل انجام PCR-RFLP شامل مراحل ذیل است: مرحله ۱: استخراج DNA از قارچ. مرحله ۲: انجام PCR برای افزایش مقدار DNA. مرحله ۳: استفاده از آنزیم محدودالانتر به منظور تجزیه DNA به قطعات کوچک‌تر. مرحله ۴: الکتروفورز با ژل آگاروز. مرحله ۵: تعیین پلی مورفسم؛ در ستون میانی، به علت تاثیر آنزیم محدودالانتر، محصولات PCR تنها دو باند ایجاد می‌کنند. در ستون سمت راست، تنها یک باند وجود دارد؛ چون DNA الگو فاقد جایگاه برش می‌باشد.

تست PCR-RFLP، حساس بودن، دقیق بودن، سریع بودن، تکرار پذیری بالا، عدم نیاز به ابزار پیشرفته و ایجاد تنوع چند شکلی و آنالیز آسان نتایج می‌باشد. با این حال، یکی از معایب این روش تشخیصی، نیاز به DNA با کیفیت و کمیت بالا است (۱۹). در جدول شماره ۱ مزایا و معایب تست PCR-RFLP بیان شده است. این مقاله مروری بر اهمیت تشخیص سریع و دقیق عفونت‌های قارچی، محدودیت‌های روش‌های تشخیصی متداول و عوامل مؤثر بر حساسیت و ویژگی تست تشخیصی مولکولی PCR-RFLP تمرکز دارد. این مقاله یک مطالعه مروری است که برای انجام آن، مطالب علمی مرتبط با موضوع با جستجوی کلید واژه‌های قارچ‌های بیماری‌زا، روش‌های تشخیصی مولکولی RFLP در بانک‌های اطلاعاتی فارسی مشتمل بر منابع SID، Magiran و IranMedex همچنین جستجو در سایر بانک‌های الکترونیکی لاتین مشتمل بر Web of science، PubMed و Scopus تا ۲۰۲۳ جمع‌آوری و مورد مطالعه قرار گرفت.

روش PCR-RFLP برای شناسایی قارچ‌ها

تشخیص مولکولی قارچ‌ها نیازمند استخراج DNA قارچی و به دنبال آن تکثیر با استفاده از PCR است. استخراج DNA از نمونه‌های بالینی را می‌توان با روش سنتی فیل-کلروفرم یا با استفاده از کیت‌های استخراج DNA تجاری کارآمدتر و راحت‌تر انجام داد (۲۰، ۹). با این که PCR معمولی ساده‌تر و هزینه کم‌تری دارد، اما قادر به تخمین کمیت بار قارچی و تعیین مقدار مناسب

جدول شماره ۱: شناسایی قارچ‌های بیماری‌زا با ژن‌ها و آنزیم‌های محدودالانتر در تکنیک RFLP

قارچ و انواع قارچ	نام آنزیم محدودالانتر	ژن‌های هدف	مرجع
مخمر کاندیدا	<i>MspI, AluI</i>	ITS rDNA regions, <i>HWP1</i> gene, <i>glycosyl phosphatidyl inositol (gpi)</i> gene	(۹۸، ۹۹، ۸۸)
قارچ‌های رشته ای درماتوفیت‌ها	<i>BsrDI, DdeI, MvaI, HaeIII, DdeI, HinfI, MvaI, HinfI, Cfr13I, BstNI</i>	ITS rDNA regions, 18S rDNA regions, Metalloproteinase-1 (MEP1), Topoisomerase II (TOP2), Chitin synthase gene, Ribosomal RNA (rRNA) gene	(۸۶-۹۲، ۲۵)
آسپرژیلوس موکور	<i>AluI, HincII, AluI</i>	Beta tubulin gene, <i>cop51A</i> gene, <i>FTR1</i> gene	(۹۵، ۴۷، ۴۳)
فوزاریوم	<i>BsrDI, AflII, Eco0109I, HaeII</i>	rDNA	(۵۳)
قارچ‌های دوشکلی	<i>MspI, HhaI, TaqI, FagI, HaeIII, SmaI, HpaI, AluI, HhaI, HincPII, HpyCH4V</i>	rDNA, Beta-tubulin, Elongation factor 1a, α , β -tubulin genes	(۶۲، ۶۶، ۶۷، ۹۶، ۹۷)
اسپروتریکس	<i>AseI, HhaI, BsuRI</i>	Intergenic region between <i>ATP9</i> , <i>COX2</i> genes of the mtDNA, <i>Cal</i> , <i>kDNA</i>	(۹۴، ۹۳)
هیستوپلاسما کپیتولایوم، نالارومایس مارنفتی	<i>MboII, HaeIII, HhaI</i>	ITS rDNA regions	(۸۳)
پاراکوکسیدیویدس براسیلینسینس	<i>BclI, MspI, Mspou</i>	<i>TUB1</i> gene	(۸۴)
کوکسییدیویدس ایبیتیس	<i>Avall (SniI), HaeIII, HincII, HindIII, HinfI, PstI, PvuI, SalI, SniI</i>	DNA	(۸۵)

تکنیک PCR-RFLP برای شناسایی درماتوفیت ها

درماتوفیتوزیس توسط قارچ های کراتینولیتیک بیماری زا به نام درماتوفیت ها، در حیوانات و انسان ایجاد می شود. با پیشرفت تکنیک های تشخیصی، درماتوفیت ها به هفت جنس *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Paraphyton*, *Lophophyton*, *Nannizzia*, *Microsporum* و *Arthroderma* طبقه بندی شدند (۲۱). در طول دو دهه گذشته، عوارض درماتوفیتوز در انسان به دلیل مشکلات اجتماعی - اقتصادی، سفرهای بین المللی گسترده، مهاجرت از کشورهای گرمسیری و تماس با حیوانات به ویژه حیوانات خانگی، افزایش سن و استفاده از داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی افزایش یافته است (۲۲). تکنیک های تشخیصی مرسوم بسیار زمان بر هستند و دقت نتایج به تخصص پرسنل بستگی دارد. بنابراین، نیاز به تکنیک های مولکولی برای افزایش حساسیت، ویژگی نتایج مورد نیاز برای شناسایی درماتوفیت ها در سطح جنس، گونه و بررسی پلی مورفیسم بسیار حایز اهمیت است (۹). مطالعه ای با اشاره بر زمان بر و غیر قابل اعتماد بودن روش های سنتی شناسایی درماتوفیت ها در سطح گونه، با تکیه بر ویژگی های ماکروسکوپی و میکروسکوپی کلنی ها (۲۳)، استفاده از تکنیک های مبتنی بر DNA به ویژه سیستم های PCR-RFLP را که می توانند گونه های مختلف درماتوفیت ها را برای اهداف درمانی و اپیدمیولوژیک به طور دقیق شناسایی کنند را مورد بحث قرار می دهد (۲۴). محققان دریافته اند که مناطق غیر کد کننده مجموعه rDNA در این قارچ ها به اندازه کافی متفاوت است که امکان تمایز گونه ها با استفاده از سیستم های PCR-RFLP فراهم می شود (۲۵). در این مطالعه ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA از سویه های مرجع مختلف گونه های درماتوفیت با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 و آنزیم محدودالایر *MvaI* تکثیر داده شد. الگوهای RFLP به دست آمده برای بسیاری از گونه ها از جمله *T. violaceum*, *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *E. floccosum*, *M. nanum*, *M. audouinii*, *M. persicolor*

خاص بودند، اما برای برخی از گونه های نزدیک به هم مانند *M. canis* / *M. ferrugineum*، مشابه بودند. عملاً مشخص شد که ITS-PCR و متقابلاً *MvaI*-RFLP یک روش مفید و قابل اعتماد برای شناسایی و تمایز چندین گونه بیماری زا است و می تواند برای غربال گری سریع حتی گونه های نزدیک به درماتوفیت ها در محیط های بالینی و اپیدمیولوژیک استفاده شود (۲۶).

مقاله ای دیگر کارایی ژن بتا-توبولین (BT2) را به عنوان یک مارکر ژنتیکی برای تمایز دقیق درماتوفیت های بیماری زا ارزیابی می کند. این روش شامل: بازیابی توالی های ژن بتا-توبولین گونه های درماتوفیت از GenBank، تجزیه و تحلیل توالی ها با استفاده از نرم افزار بیوانفورماتیک برای انتخاب آنزیم های محدودالایر مناسب، تکثیر ژن BT2 از ۴۰ مجموعه کشت مرجع و ۱۰۰ ایزوله بالینی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی T1 و Bt2b، آنالیز تجربی RFLP محصولات PCR با استفاده از آنزیم های محدودالایر انتخاب شده از جمله *FatI*, *MwoI*, *Alw21I* و *HpyCH4V* برای تایید شناسایی گونه های درماتوفیت، مقایسه نتایج RFLP تجربی با نتایج حاصل از آنالیز کامپیوتری برای اعتبارسنجی روش می باشد. بنابراین به ترتیب آنزیم های *Alw21I*, *MwoI*, *HpyCH4V* به عنوان بهترین کاندید برای تمایز بین جفت گونه های *T. interdigitale* / *T. tonsurans* و *T. schoenleinii* / *E. floccosum* و *T. rubrum* / *T. violaceum* انتخاب شدند. نویسندگان این مقاله به این نتیجه رسیدند که ژن بتا-توبولین می تواند به عنوان یک نشانگر ژنتیکی قابل اعتماد برای شناسایی گونه های درماتوفیت استفاده شود. روش PCR-RFLP سریع تر و دقیق تر از روش های مرسوم یعنی شناسایی مبتنی بر ویژگی های فیزیکی و بیوشیمیایی است و برای شناسایی معمول گونه های درماتوفیت در آزمایشگاه های بالینی مناسب است (۲۷).

تکنیک PCR-RFLP برای شناسایی گونه های اسپروتریکس اسپروتریکوزیس یک بیماری قارچی جلدی یا

زیرجلدی است که پستانداران را تحت تاثیر قرار می‌دهد که توسط گونه‌های اسپوروتریکس (*Sporothrix*) ایجاد می‌شود و معمولاً پوست و غشاهای مخاطی را درگیر می‌کند (۲۸). در حال حاضر، اسپوروتریکس شامل ۵۳ گونه است که به کلادهای بالینی و محیطی تقسیم می‌شوند که کلاد بالینی شامل *S. luriei* و *S. globosa*، *S. brasiliensis*، *S. schenckii* هستند و *S. chilensis*، *S. pallida*، *S. mexicana* و *S. humicola* به کلاد محیطی تعلق دارند (۲۹، ۳۰).

کاوازاکی و همکاران استفاده از جفت پرایمر 975-9194R و 975-8038F را برای هدف قرار دادن یک منطقه بین ژنی بین ژن‌های ATP9 و COX2 mtDNA و به دنبال آن برش آنزیمی آمپلیکون‌ها با آنزیم محدودالایتر *AseI* را برای گونه‌های اسپوروتریکس پیشنهاد نمودند (۳۱). بنابراین، تفسیر مجدد داده‌ها (۳۳) تحت تحولات طبقه‌بندی اخیر گروه‌های کلاسیک A و B از *S. schenckii* را به ترتیب با *S. globosa* و *S. schenckii* شناسایی کرده‌اند (۳۱، ۳۲). رودریگز و همکاران یک PCR-RFLP را توصیف کردند که ژن *CAL* را هدف قرار می‌دهد و با آنزیم محدودالایتر *HhaI* برش داده می‌شود تا گونه‌های *S. brasiliensis*، *S. schenckii*، *S. globosa* و *S. luriei* را شناسایی کند. مونته‌نگرو و همکاران (۳۳) از PCR-RFLP برای شناسایی ایزوله‌های *S. brasiliensis* به عنوان عامل ایجادکننده اسپوروتریکوزیس در ایالت استفاده کرد (۳۴). تکنیک‌های مولکولی در تشخیص اسپوروتریکوزیس کارآمد هستند ولی اکثر پروتکل‌ها می‌توانند تشخیص را در به دلیل صرف زمان طولانی برای کشت قارچ به تاخیر بیندازد (۳۵، ۳۶). فقدان پروتوکل‌های مبتنی بر استخراج مستقیم DNA از نمونه‌های بالینی برای تشخیص اسپوروتریکس یک شکاف قابل توجه در تشخیص مولکولی است زیرا آن‌ها گران هستند و به زیرساخت‌های آزمایشگاهی نیاز دارند و آن‌ها را برای جوامع کم منابع نامناسب می‌سازد، با توجه به این که

اسپوروتریکوزیس اغلب بر فقیرترین جمعیت‌ها تأثیر می‌گذارد (۳۵، ۳۷).

تکنیک PCR-RFLP برای شناسایی پاتوژن‌های فرصت طلب (عامل عفونت‌های قارچی مهاجم) تکنیک PCR-RFLP برای شناسایی گونه‌های اسپریلیوس اسپریلیوس عامل ایجاد طیف وسیعی از تظاهرات بالینی از جمله کلونیزاسیون، اسپریلیوزیس برونکوپولمونری آلرژیک درگیری پوستی، اتومایکوزیس و اسپریلیوزیس مهاجم می‌باشد (۳۸، ۳۹). در میان گونه‌های مختلف اسپریلیوس، *A. fumigatus* به عنوان عامل اصلی اسپریلیوزیس در انسان و سایر حیوانات است و به دنبال آن *A. flavus*، *A. niger*، *A. terreus* و *A. nidulans* قرار دارند (۴۰). شناسایی ایزوله‌های بالینی اسپریلیوس در سطح گونه بسیار مهم است، زیرا گونه‌های مختلف ممکن است در تظاهرات بالینی، پاسخ به داروهای ضد قارچ و عوامل بیماری‌زا متفاوت باشند (۴۱).

در طول دهه‌های گذشته، تکنیک‌های مولکولی متعددی بر شناسایی گونه‌های اسپریلیوس براساس توالی‌یابی ژنوم جزئی یا کامل اهداف ژنی متمرکز شده‌اند (۴۲). در مطالعه‌ای از یک تست کم هزینه مبتنی بر PCR-RFLP برای تمایز ایزوله‌های اسپریلیوس در سطح گونه استفاده شد و با استفاده از پرایمرهای قارچی Bt2a و Bt2b ژن بتا-توبولین سویه‌های مختلف اسپریلیوس تکثیر شدند. محصولات PCR با یک آنزیم محدودالایتر *AlwI* برش داده شدند. تست PCR-RFLP الگوهای منحصر به فردی را برای شش گونه مهم بالینی اسپریلیوس، از جمله *A. flavus*، *A. fumigatus*، *A. nidulans*، *A. terreus*، *A. clausenii* و *A. nidulans* ایجاد کرد (۴۳). *A. flavus* دومین عامل اصلی اسپریلیوزیس مهاجم در سراسر جهان است و معمولاً در انسان باعث بیماری‌های گسترده‌ای می‌شود (۴۴). برخلاف سویه‌های *A. flavus* که با تولید آفلاتوکسین‌ها

مرتبط هستند. *آ. اوریزه* به رغم وجود تمام ژن های مورد نیاز برای بیوسنتز آفلاتوکسین ها، به عنوان یک ارگانیزم بی خطر برای تولید آنزیم در غذا و صنعت استفاده می شود (۴۶،۴۵). در یک مطالعه، از تست RFLP براساس ژن *cyp51A* برای تمایز بین *آ. فلاووس* و *آ. اوریزه* استفاده شد. توالی های ژن *cyp51A* سویه های مرجع *آ. فلاووس* و *آ. اوریزه* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی CYP51AF و CYP51AR تکثیر شدند. محصولات PCR تحت برش با آنزیم محدودالایتر *HincII* قرار گرفتند. این روش الگوهای خاصی را برای سویه های استاندارد و ایزوله های بالینی و محیطی *آ. فلاووس* و *آ. اوریزه* نشان داد. برخلاف اکثر روش های طراحی شده برای تمایز این گونه ها که زمان بر و بسیار گران قیمت هستند، تست تک آنزیمی PCR-RFLP روی ژن *cyp51A* در مطالعه حاضر روشی ساده، قابل اعتماد و کم هزینه برای تمایز دقیق و سریع *آ. فلاووس* و *آ. اوریزه* جدا شده از نمونه های بالینی و محیطی است (۴۷).

تکنیک PCR-RFLP برای شناسایی موکورال ها

گونه های موکورال ها عوامل رایجی هستند که بر سینوس های بینی تأثیر می گذارند و ممکن است تظاهرات بالینی مشابهی داشته باشند (۴۸). تشخیص موکورمایکوزیس تهاجمی به دلیل علائم بالینی و رادیوگرافی غیراختصاصی و کشت خون منفی چالش برانگیز است (۵۰،۴۹). روش های متداول مانند آزمایش مستقیم و کشت برای تشخیص حائز اهمیت هستند اما ممکن است حساس نباشند و مدت زمان زیادی طول بکشد تا نتیجه مثبت حاصل شود (۵۱). در هیستوپاتولوژی میزان جداسازی کم عامل موکورمایکوزیس از نمونه بافت به ویژگی ظریف هایف های بدون تیغه موکورال ها نسبت داده می شود که به راحتی می تواند در طول تهیه نمونه از بافت آسیب بیند که به نوبه خود ممکن است منجر به کاهش رشد قارچ شود (۵۲،۵۰). تکنیک مولکولی از جمله PCR-RFLP ممکن است این کمبود را با سرعت معقولی برطرف

کند. در یک مطالعه ای با تست مولکولی PCR-RFLP با استفاده از پرایمرهای اختصاصی موکورال ها ZM1 و ZM3 از ناحیه 18S rDNA قطعات ۱۷۶-۱۷۹ جفت باز را تکثیر کردند این تکنیک با استفاده از چهار آنزیم محدودالایتر قادر به شناسایی دقیق موکورال ها از ۵۰ مورد نمونه های بافت تازه در بیماران مبتلا به موکورمایکوزیس راینو-اوریتو-سربرال تا سطح جنس بود (۵۳).

تکنیک PCR-RFLP برای شناسایی گونه های فوزاریوم گونه فوزاریوم یکی از مهم ترین گروه های قارچی در زمینه های علوم پزشکی، کشاورزی و دامپزشکی است (۵۴) و عامل طیف وسیعی از عفونت ها از جمله عفونت های سطحی (مانند کراتیت، ضایعات جلدی و اونیکومیکوزیس)، عفونت های مزمن بافت زیر جلدی (مانند مایستوما) و عفونت های منتشره (مانند پنومونی، اندوکاردیت، پریتونیت، عفونت کاتتر و عفونت خونی) می شود (۵۵،۵۶). این عفونت ها اغلب مقاوم به درمان هستند (۵۷) و می توانند منجر به طولانی شدن زمان عفونت، افزایش مرگ و میر و هم چنین افزایش هزینه های مراکز بهداشتی و درمانی شود. گونه های فوزاریوم پاتوژن به هفت مجموعه گونه گروه بندی می شوند: *Fusarium solani* (FSSC)، *Fusarium oxysporum* (FOSC)، *Fusarium fujikuroi* (FIESC)، *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC)، *Fusarium dimerum* (FCSC)، *Fusarium chlamidosporum* (FDSC) و *Fusarium sportricoides* (FSAMSC). بیش تر پاتوژن های فرصت طلب فوزاریوم متعلق به *Fusarium solani* (FSSC)، *Fusarium oxysporum* (FOSC) و *Fusarium fujikuroi* (FFSC) هستند (۶۰-۵۸). روش های مولکولی مانند Multiplex-PCR و PCR-RFLP برای تشخیص گونه های فوزاریوم حساس تر و سریع تر هستند (۶۱،۶۲).

در مطالعه ای با استفاده از PCR-RFLP، DNA ۱۷۲ ایزوله از ۲۳ گونه فوزاریوم استخراج و با

ژن‌های مسیر بیوسنتزی مایکوتوکسین‌ها به‌عنوان اهدافی برای شناسایی فوزاریوم در سطح گونه استفاده گردید (۶۷،۶۸).

تکنیک PCR-RFLP برای شناسایی گونه‌های کاندیدا میکروبیولوژیست‌های بالینی در کشورهای کم‌درآمد به دلیل فقدان فناوری‌های مناسب در شناسایی گونه‌های مخمر با چالش‌هایی روبرو هستند. روش‌های مرسوم مبتنی بر ویژگی‌های فنوتیپی یا بیوشیمیایی ممکن است به‌طور دقیق عامل اتیولوژیک عفونت را شناسایی نکنند (۶۹،۷۰). گونه‌های جدید کاندیدا می‌تواند از نظر بالینی مهم باشند، زیرا می‌توانند هم در حدت و هم در طیف مقاومت ضد قارچی متفاوت باشند (۷۱). فقدان داده‌های میکروبیولوژیکی خاص می‌تواند پزشکان را مجبور به درمان تجربی قارچ‌های تهدیدکننده حیات با داروهای ضد قارچی وسیع‌الطیف کند، که بر مشکلات موجود در مقاومت ضد قارچی تأثیر می‌گذارد. در یک مطالعه ۱۰۸ ایزوله از کمپلکس‌های کاندیدا آلیکنس (*C. albicans*)، کاندیدا گلابراتا (*C. glabrata*)، کاندیدا پاراپسیلوزیس (*C. parapsilosis*) و کاندیدا همولونی (*C. haemulonii*) با روش‌های مولکولی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۷۲،۷۳). با این حال، گونه‌های cryptic موجود در این مجموعه، مانند کاندیدا دابلینینسیس (*C. dubliniensis*) و کاندیدا آفریکانا (*C. africana*)، معمولاً به اشتباه شناسایی می‌شوند یا ناشناخته باقی می‌مانند. بنابراین، این سوگیری می‌تواند تعداد ک. آلیکنس گزارش شده را کمی بیش از حد برآورد کند (۷۴-۷۶). در این مطالعه ۶۶ ایزوله از کمپلکس ک. آلیکنس با تکثیر ژن *hwp1* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نشان داد که بیش از ۹۲ درصد از افراد به عنوان ک. آلیکنس و ۷/۶ درصد به‌عنوان ک. دابلینینسیس یا ک. آفریکانا شناسایی می‌شوند. این اولین گزارش ک. دابلینینسیس و ک. آفریکانا در هندوراس بود. شناسایی گونه‌ها با تکثیر خاص ژن

استفاده از پرایمرهای ITS و چهار اندونوکلاز *HhaI*، *TaqI*، *MspI* و *FaqI* به ۳۳ گروه تقسیم شدند. سه آنزیم اول توانستند گونه‌های فوزاریوم را به ۲۳ گروه طبقه‌بندی کنند که ۱۹ گروه شامل یک عضو، یک گروه شامل دو عضو و سه گروه شامل سه عضو از گونه فوزاریوم بودند. این مطالعه هم‌چنین امکان شناسایی گونه‌های *F. solani* complex، *F. semitectum*، *F. coeruleum*، *F. nisikadoi*، *F. pseudograminearum* و *F. acuminatum* توسط یک آنزیم منحصر به فرد و توانایی تمایز *F. compactum* از *F. equiseti* را نشان داد. مطالعات نشان داده‌اند که ITS1 و ITS2 اهداف مفیدی برای شناسایی گونه‌های خاص فوزاریوم هستند (۶۳،۶۴). زیرا وضوح طبقه‌بندی مناسبی را برای اکثر قارچ‌ها ایجاد می‌کند (۶۵). با این حال داده‌های بیوانفورماتیک ممکن است در برخی موارد با آزمایش‌های عملی انجام شده در آزمایشگاه مطابقت نداشته باشد، همان‌طور که در برخی گونه‌ها مانند *F. verticellioides* دیده می‌شود (۵۴).

مطالعه‌ای دیگر از آنالیز PCR-RFLP منطقه بتا-توبولین برای تمایز ۱۰۷ گونه مختلف فوزاریوم استفاده کرد. ابتدا ژن بتا-توبولین تمام ایزوله‌ها با پرایمر (T1 و T22) تکثیر شد، سپس با استفاده از سه آنزیم محدودالایر *HincII* و *BsaWI*، *BanII* گونه‌های فوزاریوم جدا شده در ۲۴ گروه دسته‌بندی شدند. در این مطالعه با تکنیک RFLP، *F. culmorum*، *F. graminearum*، *F. solani* و *F. cerealis* شناسایی شد. برخلاف سایر مطالعات مشابه قبلی، این مطالعه قادر به تمایز بین *F. culmorum*، *F. graminearum* و *F. cerealis* بود. ولی موفق به افتراق *F. acuminatum* یا *F. sportrichioides* از *F. langsethiae* نشدند (۶۶). ژن‌های دیگر مانند نواحی بین ژنی از جمله نواحی فاصله بین ژنی (*IGS*)، فاکتور افزایش طول ترجمه ۱ آلفا (*EF1α*)، کالمودولین (*CaM*)، دومین زیر واحد بزرگ RNA پلیمراز (RPB2) II، ژن 28S rRNA و

glycosyl phosphatidyl inositol (gpi) انجام شد و یک تکنیک ساده PCR-RFLP با آنزیم محدودالایر *AluI* طراحی شد که به کاندیدا/اوریس (*C. auris*) اجازه می دهد تا از بقیه گونه های کمپلکس ک. همولونی متمایز شود. جداسازی گونه های کمپلکس ک. همولونی از نمونه های بالینی نادر است (۷۷). افزایش گونه های غیر ک. آلیکنس و مقاومت بیش تر این گونه ها به داروهای ضد قارچی منجر به افزایش میزان مرگ و میر در مبتلایان به کاندیدیازیس می شود که هشدار برای جامعه ی پزشکی است. در مطالعه دیگر DNA ژنومی ۱۸۲ مخمر از کشت های نقاط مختلف بدن شامل ناخن، واژن، کشاله ران، خون، زخم و غیره با استفاده از فیلترهای FTA استخراج شد و ناحیه ITS1-ITS2 با PCR و آنزیم محدودالایر *MspI* تکثیر شد. نتایج نشان داد که ۴۷/۲ درصد مربوط به ک. آلیکنس و ۵۲/۸ درصد مربوط به گونه های غیر ک. آلیکنس بود (۷۸). این نشان می دهد که روش های مولکولی برای انجام تحقیقات اپیدمیولوژیک مستمر در ایران ضروری است. به دلیل آن که بسیاری از مطالعات مولکولی انجام شده در ایران جنبه متدلوژی داشته و یا بررسی های اپیدمیولوژیک فقط با روش سنتی است (۷۹). انجام مطالعات مستمر در رابطه با بررسی های اپیدمیولوژیک با استفاده از روش های مولکولی ضروری به نظر رسیده و رواج این تست ها در آزمایشگاه های بالینی توصیه می شود.

تکنیک PCR-RFLP برای شناسایی گونه های دایمورفسم عفونت های قارچی دوشکلی ناشی از هیستوپلاسما کپسولاتوم (*Histoplasma capsulatum*)، بلاستوما ییس درماتیتیدیس (*Blastomyces dermatitidis*) و کوکسید یوئیدس ایمیتیس پوساداسی (*Coccidioides immitis/ posadasii*) تا ۳۰ درصد از موارد پنومونی اکتسابی از جامعه را در مناطق اندمیک از جمله آمریکای شمالی، مرکزی و آمریکای جنوبی تشکیل می دهند. تشخیص این عفونت ها به دلیل عدم تمایز آن ها از

تظاهرات تنفسی که اغلب از علل شایع باکتریایی ذات الریه هستند به تاخیر می افتد. قارچ های دوشکلی علاوه بر بومی بودن در مناطق خاصی از آمریکا، به دلیل افزایش مسافرت، حمل و نقل کالاها و هم چنین تغییر اپیدمیولوژی به دلیل افزایش گرمایش جهانی در هر شش قاره گزارش شده اند (۸۰).

تالارومیکوزیس (*Talaromycosis*) یک عفونت فرصت طلب مکرر در بیماران مبتلا به ایدز ساکن در جنوب شرق آسیا یا جنوب است (۸۱). تشخیص سریع و دقیق برای مراقبت از بیمار بسیار مهم است، اما روش های تشخیصی مرسوم زمان بر هستند. این امر منجر به تقاضا برای روش های تشخیصی مولکولی جدید برای شناسایی قارچ شده است (۸۲).

در مطالعه ای با استفاده از PCR-RFLP، یک تست مولکولی سریع، حساس و اختصاصی را برای تشخیص گونه های مختلف با استفاده از پرایمرهای universal و آنزیم های محدودالایر *HhaI* و *HaeIII* طراحی کرد. در این مطالعه سی و هشت جدایه از قارچ های بیماری زای انسانی مهم از نظر پزشکی از جمله ه. کپسولاتوم آزمایش شد. این مطالعه نشان داد که الگوی *MboII* مختص گونه ای خاص است، در حالی که الگوهای *HaeIII* و *HhaI* در جنس هایی مانند *آسپرژیلوس* و *کاندیدا* مشابه هستند. برای صرفه جویی در زمان و هزینه، توانستند از ۲ آنزیم محدودالایر *MboII-HaeIII* یا *MboII-HhaI* برای شناسایی گونه های قارچی استفاده کنند (۸۳).

پارا کوکسید یو مایکوز (*Pracoccidioidomycosis*) یک عفونت قارچی سیستمیک است که در آمریکای لاتین یافت می شود و توسط دو گروه عمده از گونه ها ایجاد می شود: پارا کوکسید یوئیدس براسیلینسیس (*Paracoccidioides brasiliensis*) (شامل زیر گروه های S1، PS2 و PS3) و پارا کوکسید یوئیدس لوتزی (*P. lutzii*). شناسایی این گونه ها براساس مورفولوژی به تنهایی امکان پذیر نیست.

گونه قارچی هستند که حتی تکنیک توالی‌یابی ژن نیز قادر به شناسایی آن‌ها نمی‌باشد، می‌تواند بر چندین محدودیت تکنیک‌های تشخیصی متداول از جمله، تأخیر در تولید یا عدم وجود میکروکنیدی یا ماکروکنیدی مشخص، شباهت میکرومورفولوژی یا ماکرومورفولوژی یا هر دو در سطح جنس، زمان بر بودن کشت قارچ، واکنش متقابل آنتی‌ژنی بین گونه‌ها و جنس‌های مهم، کشت‌های خطرناک برای سلامت کارکنان آزمایشگاهی، مشکلات ناشی از در دسترس بودن نمونه‌های بالینی و زنده مانند ضعیف عناصر قارچی در اسمیر یا بافت‌ها غلبه کند. بنابراین با توجه به حساسیت و ویژگی این تست، این روش می‌تواند روش جایگزین مناسبی برای تشخیص برخی از عوامل مهم عفونت‌های قارچی در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و بالینی باشد. تشخیص زودهنگام عفونت باعث تسریع شروع درمان ضد قارچی برای افزایش بقا و کاهش عوارض می‌شود.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از مسئولان پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و داوران مقاله که ما را در انجام و ارتقا کیفی این پژوهش یاری دادند، اعلام نمایند.

بنابراین روبرتو و همکاران یک روش PCR-RFLP با استفاده از ژن توبولین (*TUB1*) و آنزیم‌های محدود الاثر *Bcl I* و *Msp I* و *Msp* برای شناسایی گونه‌های پاراکوکسید یویدس پیشنهاد کردند. ژن α -توبولین (*TUB1*) به این دلیل انتخاب شد که پلی‌مورفیسم‌های کافی برای تمایز بین گونه‌های موجود در مجموعه پ. *براسیلیئیس* را داشت (۸۴). در سال ۱۹۹۲، موارد کوکسید یوئیدومیکوزیس (*Coccidioidomycosis*) در کالیفرنیا افزایش یافت، که منجر به مطالعه ۱۵ ایزوله با استفاده از روش PCR-RFLP توسط راجر زیمرمن و همکارانش شد. در این مطالعه از آنزیم‌های (*SinI*)، *HaeIII*، *Avall*، *SinI* و *HincII*، *HindIII*، *PvuI*، *PstI*، *Sall* و *SinI* برای شناسایی ایزوله‌ها استفاده شد. این مطالعه نشان داد که تنها دو الگوی اصلی RFLP شناسایی شد که نشان‌دهنده تنوع کمی در بین ۱۵ ایزوله است. الگوهای RFLP ایزوله‌هایی که چندین دهه پیش بازیابی شده‌اند، همانند نمونه‌های اخیر بود (۸۵). تست مولکولی RFLP به دلیل پیچیدگی و زمان بر بودن طراحی اولیه، کم بودن تعداد جایگاه برش در طول توالی DNA و گهگاهی هزینه بالای خرید آنزیم در جوامع کم درآمد مشکل‌ساز است، اما این تست مولکولی علاوه بر قابلیت تکرارپذیری بالا، تمایز و شناسایی عفونت‌هایی که ناشی از ۲ یا چند

References

1. Pathakumari B, Liang G, Liu W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother* 2020; 130: 110550.
2. Sharma B, Nonzom S. Superficial mycoses, a matter of concern: Global and Indian scenario-an updated analysis. *Mycoses* 2021; 64(8): 890-908.
3. Guégan S, Lanternier F, Rouzaud C, Dupin N, Lortholary O. Fungal skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis* 2016; 29(2): 124-130.
4. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 2012; 4(165): 165rv13.
5. Khodavaisy S, Mahmoudi S, Agha Kuchak Afshari S, Salehi Z, Kord M. Molecular Techniques in Detection of Triazole-resistance Gene Mutations in Common Pathogenic

- Fungi. J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(148): 187-202 (Persian).
6. Khan S, Farabi B, Navarrete-Dechent C, Rao B, Safai B. Applications of Reflectance Confocal Microscopy in the Diagnosis of Fungal Infections: A Systematic Review. J Fungi 2022; 9(1): 39.
 7. Sadamoto S, Mitsui Y, Nihonyanagi Y, Amemiya K, Shinozaki M, Murayama SY, et al. Comparison approach for identifying missed invasive fungal infections in formalin-fixed, paraffin-embedded autopsy specimens. J Fungi 2022; 8(4): 337.
 8. Moallemzadeh SA, Yadegari MH, Rajabi Bazl M, Kachuei R. The simple molecular method for confirming identification of the main species of fungi *Candida*, *Aspergillus* and Dermatophyte. Studies in Medical Sciences 2014; 25(2): 105-112.
 9. Jensen RH, Arendrup MC. Molecular diagnosis of dermatophyte infections. Curr Opin Infect Dis 2012; 25(2): 126-134.
 10. Lamont RF, van den Munckhof EH, Luef BM, Vinter CA, Jørgensen JS. Recent advances in cultivation-independent molecular-based techniques for the characterization of vaginal eubiosis and dysbiosis. Fac Rev 2020; 9: 21.
 11. Fatahi M, Shokohi T, Sooteh H, Hedayati M, Okhovatian A, Tamadoni A, et al. Molecular identification of *Candida albicans* isolated from the oncology patients at four university hospitals in Mazandaran province (2005-6). J Mazandaran Univ Med Sci 2007; 17(61): 1-11 (Persian).
 12. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet 1980; 32(3): 314-331.
 13. Hashim HO, Al-Shuhaib MBS. Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: A review. Journal of Applied Biotechnology Reports 2019; 6(4): 137-144.
 14. Wolf C, Rentsch J, Hübner P. PCR- RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. J Agric Food Chem 1999; 47(4): 1350-1355.
 15. Kisiala M, Kowalska M, Pastor M, Korza HJ, Czapinska H, Bochtler M. Restriction endonucleases that cleave RNA/DNA heteroduplexes bind dsDNA in A-like conformation. Nucleic Acids Res 2020; 48(12): 6954-6969.
 16. Miljkovic M, Malesevic M, Filipic B, Vukotic G, Kojic M. *LraI* from *Lactococcus raffinolactis* BGTRK10-1, an Isoschizomer of *EcoRI*, exhibits ion concentration-dependent specific star activity. BioMed Res Int 2018; 2018: 5657085.
 17. Yang ZH, Huang JX, Yao YJ. Autoscreening of restriction endonucleases for PCR-restriction fragment length polymorphism identification of fungal species, with *Pleurotus* spp. as an example. Appl Environ Microbiol 2007; 73(24): 7947-58.
 18. Jenkins G, Suzen H, Sueiro R, Parry J. The restriction site mutation assay: a review of the methodology development and the current status of the technique. Mutagenesis 1999; 14(5): 439-348.
 19. Chaudhary R, Kumar G. Restriction fragment length polymorphism. Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior. Mumbai: Vonk, J, Shackelford, TK. 2019.
 20. Kupsch C, Ohst T, Pankewitz F, Nenoff P, Uhrlaß S, Winter I, et al. The agony of choice in dermatophyte diagnostics—performance of different molecular tests and culture in the detection of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. Clin Microbiol

- Infect 2016; 22(8): 735. e11- e17.
21. de Hoog GS, Dukik K, Monod M, Packeu A, Stubbe D, Hendrickx M, et al. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. Mycopathologia 2017; 182: 5-31.
 22. Gordon AK, McIver C, Kim M, Murrell DF, Taylor P. Clinical application of a molecular assay for the detection of dermatophytosis and a novel non-invasive sampling technique. Pathology 2016; 48(7): 720-726.
 23. Abastabar M, Jedi A, Guillot J, Ilkit M, Eidi S, Hedayati MT, et al. In vitro activities of 15 antifungal drugs against a large collection of clinical isolates of *Microsporum canis*. Mycoses 2019; 62(11): 1069-1078.
 24. Hainer BL. Dermatophyte infections. Am Fam Physician 2003; 67(1): 101-108.
 25. De Baere T, Summerbell R, Theelen B, Boekhout T, Vaneechoutte M. Evaluation of internal transcribed spacer 2-RFLP analysis for the identification of dermatophytes. J Med Microbiol 2010; 59(1): 48-54.
 26. Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, Shidfar M, Zaini F, Eshraghian M, Jalalizand N, et al. Use of single-enzyme PCR-restriction digestion barcode targeting the internal transcribed spacers (ITS rDNA) to identify dermatophyte species. Iran J Public Health 2012; 41(3): 82-94 (Persian).
 27. Abastabar M, Mirhendi H, Rezaei-Matehkolaei A, Shidfar MR, Kordbacheh P, Makimura K. Restriction analysis of β -tubulin gene for differentiation of the common pathogenic dermatophytes. J Clin Lab Anal 2014; 28(2): 91-96.
 28. Rodrigues AM, Della Terra PP, Gremião ID, Pereira SA, Orofino-Costa R, de Camargo ZP. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. Mycopathologia 2020; 185: 813-842.
 29. Cruz Choappa RM, Vieille Oyarzo PI, Carvajal Silva LC. Isolation of *Sporothrix pallida* complex in clinical and environmental samples from Chile. Rev Argent Microbiol 2014; 46(4): 311-314.
 30. Boechat JS, Oliveira MME, Gremião IDF, Almeida-Paes R, Machado ACdS, Zancopé-Oliveira RM, et al. *Sporothrix brasiliensis* and feline sporotrichosis in the metropolitan region of Rio de Janeiro, Brazil (1998–2018). J Fungi 2022; 8(7): 749.
 31. Kawasaki M, Anzawa K, Mochizuki T, Ishizaki H. New strain typing method with *Sporothrix schenckii* using mitochondrial DNA and polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) technique. J Dermatol 2012; 39(4): 362-365.
 32. Ishizaki H, Kawasaki M, Anzawa K, Mochizuki T, Chakrabarti A, Ungpakorn R, et al. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in India, Thailand, Brazil, Colombia, Guatemala and Mexico. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 2009; 50(1): 19-26.
 33. Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MAG, da Silva EA, Bernardi F, de Camargo ZP. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. BMC Veterinary Research 2014; 10(1): 269.
 34. Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. Diagn Microbiol Infect Dis 2014; 78(4): 383-387.
 35. Rodrigues AM, Gonçalves SS, de Carvalho JA, Borba-Santos LP, Rozental S, Camargo ZPd. Current progress on epidemiology, diagnosis, and treatment of sporotrichosis and their future trends. J Fungi 2022; 8(8): 776.

36. Rodrigues AM, Orofino-Costa R, de Camargo ZP. Pocket guide to mycological diagnosis. 1st ed. 2019; 15.
37. Slater GSC, Birney E. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. BMC Bioinformatics 2005;6:31.
38. Udagawa S. Neosartorya hiratsukae, a new species of food-borne Ascomycetes. Trans Mycol Soc Japan 1991; 32: 23-29.
39. Geiser D, Klich M, Frisvad JC, Peterson S, Varga J, Samson RA. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. Stud Mycol 2007; 59(1): 1-10.
40. Balajee S, Houbraken J, Verweij P, Hong S, Yaghuchi T, Varga J, et al. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. Stud Mycol 2007; 59(1): 39-46.
41. Abastabar M, Hosseini T, Valadan R, Lagzian M, Haghani I, Aslani N, et al. Novel point mutations in cyp51A and cyp51B genes associated with itraconazole and posaconazole resistance in *Aspergillus clavatus* isolates. Microb Drug Resist 2019; 25(5): 652-662.
42. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Stud Mycol 2014; 78(1): 141-173.
43. Nasri T, Hedayati MT, Abastabar M, Pasqualotto AC, Armaki MT, Hoseinnejad A, et al. PCR-RFLP on β -tubulin gene for rapid identification of the most clinically important species of *Aspergillus*. J Microbiol Methods 2015; 117: 144-147.
44. Rudramurthy SM, Paul RA, Chakrabarti A, Mouton JW, Meis JF. Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management. J Fungi 2019; 5(3): 55.
45. Navale V, Vamkudoth KR, Ajmera S, Dhuri V. *Aspergillus* derived mycotoxins in food and the environment: Prevalence, detection, and toxicity. Toxicol Rep 2021; 8: 1008-1030.
46. Schwetz I, Horina J, Buzina W, Roob J, Olschewski H, Krause R. *Aspergillus oryzae* peritonitis in CAPD: case report and review of the literature. Am J kidney Dis 2007; 49(5): 701-704.
47. Abastabar M, Shabanzadeh S, Valadan R, Mayahi S, Haghani I, Khojasteh S, et al. Development of RFLP method for rapid differentiation of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*, two species with high importance in clinical and food microbiology. J Mycol Med 2022; 32(3): 101274.
48. Chakrabarti A, Das A, Mandal J, Shivaprakash M, George VK, Tarai B, et al. The rising trend of invasive zygomycosis in patients with uncontrolled diabetes mellitus. Med Mycol 2006; 44(4): 335-342.
49. Lackner M, Caramalho R, Lass-Flörl C. Laboratory diagnosis of mucormycosis: current status and future perspectives. Future Microbiol 2014; 9(5): 683-695.
50. Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, Chen SC, Dannaoui E, Hochhegger B, et al. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. Lancet Infect Dis 2019; 19(12): e405-e421.
51. Skiada A, Lass-Floerl C, Klimko N, Ibrahim A, Roilides E, Petrakkos G. Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis. Med Mycol 2018; 56(suppl_1): S93-S101.
52. Lass-Flörl C, Mayr A. Diagnosing invasive fungal diseases—limitations of microbiological diagnostic methods. Expert Opin Med Diagn 2009; 3(4): 461-470.

53. Zaman K, Rudramurthy SM, Das A, Panda N, Honnavar P, Kaur H, et al. Molecular diagnosis of rhino-orbito-cerebral mucormycosis from fresh tissue samples. *J Med Microbiol* 2017; 66(8): 1124-1129.
54. Kachuei R, Yadegari MH, Safaie N, Ghiasian A, Noorbakhsh F, Piranfar V, et al. PCR-RFLP patterns for the differentiation of the *Fusarium* species in virtue of ITS rDNA. *Curr Med Mycol* 2015; 1(1): 4-11.
55. Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(4): 695-704.
56. Amadasi S, Pelliccioli GF, Colombini P, Bonomini A, Farina C, Pietrantonio F, et al. Contact lens-related *Fusarium* keratitis: a case report. *Infez Med* 2017; 25(2): 166-168.
57. Abastabar M, Haghani I, Shokohi T, Hedayati MT, Aghili SR, Jedi A, et al. Low in vitro antifungal activity of tavaborole against yeasts and molds from onychomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62(12): e01632-18.
58. Van Diepeningen AD, Al-Hatmi AM, Brankovics B, de Hoog GS. Taxonomy and clinical spectra of *Fusarium* species: where do we stand in 2014? *Current Clinical Microbiology Reports* 2014; 1: 10-18.
59. Salah H, Al-Hatmi AM, Theelen B, Abukamar M, Hashim S, Van Diepeningen AD, et al. Phylogenetic diversity of human pathogenic *Fusarium* and emergence of uncommon virulent species. *J Infect* 2015; 71(6): 658-666.
60. Nucci M, Barreiros G, Akiti T, Anaissie E, Nouér SA. Invasive fusariosis in patients with hematologic diseases. *Journal of Fungi* 2021; 7(10): 815.
61. Van Diepeningen AD, Brankovics B, Iltes J, Van der Lee TA, Waalwijk C. Diagnosis of *Fusarium* infections: approaches to identification by the clinical mycology laboratory. *Curr Fungal Infect Rep* 2015; 9(3): 135-143.
62. Zarrin M, Ganj F, Faramarzi S. Analysis of the rDNA internal transcribed spacer region of the *Fusarium* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Biomedical Reports* 2016; 4(4): 471-474.
63. Mirete S, Patiño B, Jurado M, Vázquez C, González-Jaén MT. Structural variation and dynamics of the nuclear ribosomal intergenic spacer region in key members of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Genome* 2013; 56(4): 205-213.
64. O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, et al. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J Clin Microbiol* 2008; 46(8): 2477-2490.
65. Balajee S, Borman A, Brandt M, 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): 877-884.
66. Nosratabadi M, Kachuei R, Rezaie S, Harchegani AB. Beta-tubulin gene in the differentiation of *Fusarium* species by PCR-RFLP analysis. *Infez Med* 2018; 26(1): 52-60.
67. Mirhendi H, Ghiasian A, Vismer H, ASGARI M, Jalalizand N, Arendrup M, et al. Preliminary identification and typing of pathogenic and toxigenic *Fusarium* species using restriction digestion of ITS1-5.8 S rDNA-ITS2 region. *Iranian Journal of Public Health* 2010; 39(4).
68. Hennequin C, Abachin E, Symoens F, Lavarde V, Reboux G, Nolard N, et al.

- Identification of *Fusarium* species involved in human infections by 28S rRNA gene sequencing. J Clin Microbiol 1999; 37(11): 3586-3589.
69. Sadrossadati SZ, Ghahri M, Fooladi AAI, Sayyahfar S, Beyraghi S, Baseri Z. Phenotypic and genotypic characterization of *Candida* species isolated from candidemia in Iran. Curr Med Mycol 2018; 4(2): 14-20.
 70. Ambaraghassi G, Dufresne PJ, Dufresne SF, Vallières É, Muñoz JF, Cuomo CA, et al. Identification of *Candida auris* by use of the updated Vitek 2 yeast identification system, version 8.01: a multilaboratory evaluation study. J Clin Microbiol 2019; 57(11): e00884-19.
 71. Brilhante RSN, Sales JA, da Silva MLQ, de Oliveira JS, Pereira LdA, Pereira-Neto WA, et al. Antifungal susceptibility and virulence of *Candida parapsilosis* species complex: an overview of their pathogenic potential. J Med Microbiol 2018; 67(7): 903-914.
 72. Ortiz B, Pérez-Alemán E, Galo C, Fontecha G. Molecular identification of *Candida* species from urinary infections in Honduras. Revista Iberoamericana de Micología. 2018; 35(2): 73-77.
 73. Bineshian F, Yadegari MH, Sharifi Z, Eidgahi MA, Nasr R. Identification of *Candida* species using MP65 gene and evaluation of the *Candida albicans* MP65 gene expression in BALB/C Mice. Jundishapur Journal of Microbiology 2015; 8(5): e18984.
 74. Hazirolan G, Altun H, Gumral R, Gursay N, Otlu B, Sancak B. Prevalence of *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis: First Turkish *Candida africana* isolates from vulvovaginal candidiasis. J Mycol Med 2017; 27(3): 376-381.
 75. Hu Y, Yu A, Chen X, Wang G, Feng X. Molecular characterization of *Candida africana* in genital specimens in Shanghai, China. BioMed Res Int 2015; 2015: 185387.
 76. Romeo O, Criseo G. Molecular epidemiology of *Candida albicans* and its closely related yeasts *Candida dubliniensis* and *Candida africana*. J Clin Microbiol 2009; 47(1): 212-214.
 77. Fontecha G, Montes K, Ortiz B, Galindo C, Braham S. Identification of cryptic species of four *Candida* complexes in a culture collection. J Fungi 2019; 5(4): 117.
 78. Sasaki E, Rafat Z, Ashrafi K, Salimi Y, Zandi M, Soltani S, et al. Vulvovaginal candidiasis in Iran: A systematic review and meta-analysis on the epidemiology, clinical manifestations, demographic characteristics, risk factors, etiologic agents and laboratory diagnosis. Microb Pathog 2021; 154: 104802.
 79. Pakshir K, Yazdani M, Kimiaghdam R. Etiology of vaginal candidiasis in Shiraz, Southern Iran. Research Journal of Microbiology 2007; 2(9): 696-700.
 80. Azar MM, Malo J, Hage CA. Endemic fungi presenting as community-acquired pneumonia: a review. Semin Respir Crit Care Med 2020; 41(4): 522-537.
 81. Rautemaa-Richardson R, Richardson MD. Systemic fungal infections. Medicine 2017; 45(12): 757-762.
 82. Wickes BL, Wiederhold NP. Molecular diagnostics in medical mycology. Nature Communications 2018; 9(1): 5135.
 83. Szekely J, Chelae S, Ingviya N, Rukchang W, Auepemkiate S, Aiempnanakit K. Universal Multiplex Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (UMPCR-RFLP) for rapid detection and species identification of fungal

- and mycobacterial pathogens. Walailak Journal of Science and Technology 2020; 17(10): 1113-1125.
84. Roberto TN, Rodrigues AM, Hahn RC, de Camargo ZP. Identifying *Paracoccidioides* phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. Med Mycol 2015; 54(3): 240-247.
 85. Zimmermann CR, Snedker CJ, Pappagianis D. Characterization of *Coccidioides immitis* isolates by restriction fragment length polymorphisms. J Clin Microbiol 1994; 32(12): 3040-3042.
 86. Jung HJ, Kim SY, Jung JW, Park HJ, Lee YW, Choe YB, et al. Identification of dermatophytes by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of metalloproteinase-1. Ann Dermatol 2014; 26(3): 338-342.
 87. Villanueva da Fonseca LA, Santos Araújo MA, Wanderlei Silva DM, De Albuquerque Maranhão FC. ITS-RFLP optimization for dermatophyte identification from clinical sources in Alagoas (Brazil) versus phenotypic methods. J Infect Dev Ctries 2022; 16(11): 1773-1777.
 88. Elavarashi E, Kindo AJ, Kalyani J. Optimization of PCR—RFLP directly from the skin and nails in cases of dermatophytosis, targeting the ITS and the 18S ribosomal DNA regions. J Clin Diagn Res 2013; 7(4): 646-651.
 89. Endrawati D, Kusumaningtyas E. Molecular profile of *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum canis* based on PCR-RFLP of internal transcribed spacer. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner 2021; 26(1): 10-21.
 90. Salehi Z, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Internal Transcribed Spacer rDNA and TEF-1 α Gene Sequencing of Pathogenic Dermatophyte Species and Differentiation of Closely Related Species Using PCR-RFLP of The Topoisomerase II. Cell J 2020; 22(1): 85-91.
 91. Batvandi A, Pchelin IM, Kiasat N, Kharazi M, Mohammadi R, Zomorodian K, et al. Time and cost-efficient identification of *Trichophyton indotineae*. Mycoses 2023; 66(1): 75-81.
 92. Ahmad AM. Identification of Dermatophyte Species by PCR Restriction Fragment Length Polymorphism in Ramallah region, Palestine. Al-Quds Journal for Natural Sciences 2022; 1(2).
 93. Mochizuki H, Anzawa K, Mochizuki T. Genotyping of intraspecies polymorphisms of *Sporothrix globosa* using partial sequence of mitochondrial DNA. J Dermatol 2022; 49(2): 263-271.
 94. Çulha G, DoĞramacı AÇ, Hakverdi S, SeÇİntİ İE, AslantaŞ Ö, Çelik E, et al. The investigation of the association of cutaneous leishmaniasis in biopsy specimens of the patients with granulomatous disease and skin cancer using the molecular method. Iran J Parasitol 2020; 15(3): 307-314.
 95. Moudgal S, Rao SO, Pai MO. Mucormycosis: A comparative update between conventional and molecular diagnosis strategies. Curr Med Mycol 2022; 8(1): 44-53.
 96. Hafez M, Abdelmagid A, Adam LR, Daayf F. Specific detection and identification of *Fusarium graminearum* sensu stricto using a PCR-RFLP tool and specific primers targeting the translational elongation factor 1 α gene. Plant Dis 2020; 104(4): 1076-1086.
 97. Kim JS, Kang NJ, Kwak YS, Lee C. Investigation of genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. fragariae using PCR-RFLP. Plant Pathol J 2017; 33(2): 140-147.

98. Moazeni M, Nabili M. Identification of *Candida* Species Isolated from Hospitalized Patients with Candiduria. Medical Laboratory Journal 2022; 16(2): 13-20.
99. Shirvani F, Fattahi M. Molecular identification of *Candida* species isolated from candiduria and its risk factors in neonates and children. Curr Med Mycol 2021; 7(3): 9-12.