Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:22 IRST on Sunday October 10th 2021

افتراق عوامل درماتوفیتوزیس در انسان (*ترایکوفایتون روبروم* و *ترایکوفایتون اینتردیجیتال*) به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز دوگانه

زهرا فصیحی‌زاده[۱]، بهرام احمدی[۲]، غلامرضا شکوهی[۳]، نیلوفر جلالی‌زند[۱]، مرجان معتمدی[٤*]، حسین میرهندی[٥]

۱- گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲- گروه آموزشی علوم آزمایشگاهی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران.
۳- گروه آموزشی انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران.
٤- گروه آموزشی انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
٥- گروه آموزشی انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

[*] نویسنده مسئول: شیراز، خیابان زند، میدان امام‌حسین، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی.
تلفن: ۳۲۳۰۵۲۹۱ - ۰۷۱
E-mail: marjanmotamedi64@yahoo.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۳۰ ویرایش: ۱۳۹۸/۰۳/۰۷ پذیرش: ۱۳۹۸/۰٤/۲٤ آنلاین: ۱۳۹۸/۰٤/۳۱

زمینه و هدف: دوگونه‌ی *ترایکوفایتون روبروم* و *ترایکوفایتون اینتردیجیتال* عامل بیش از ۸۰٪ انواع درماتوفیتوزیس می‌باشند. تاکنون روش‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک مختلفی جهت افتراق این دوگونه‌ی بسیار مشابه استفاده شده است، اما این روش‌ها کمابیش زمان‌بر بوده و از ویژگی پایینی برخوردارند. هدف این مطالعه، معرفی یک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز دوگانه ساده و سریع برای افتراق این دو گونه از یکدیگر می‌باشد.

روش بررسی: این پژوهش، یک مطالعه تحلیلی و تجربی است که بین سال‌های ۱۳۹٤ تا ۱۳۹۵ در آزمایشگاه قارچ‌شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. بدین منظور توالی نوکلئوتیدی ٤ ناحیه ژنی Internal transcribed spacer (ITS)، بتا توبولین، الانگیشن فاکتور یک آلفا و کالمودولین در دو گونه قارچ مدنظر، مورد آنالیز بیوانفورماتیک قرار گرفت و تفاوت‌ها و تشابه‌های نوکلئوتیدها بین دو گونه در هر کدام از ژن‌های یادشده، برای انتخاب پرایمر بررسی گردید. ویژگی پرایمرهای انتخابی جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز دوگانه (Duplex PCR) در مقابل ایزوله‌های تعیین توالی شده‌ی گونه‌های درماتوفیتی آزمایش گردید.

یافته‌ها: با توجه به مجموع داده‌ها، پرایمرهای اختصاصی از ژن الانگیشن فاکتور یک آلفا انتخاب گردید. این پرایمرها محصولی با ۱۷۳ و ۳۸٤ جفت باز به‌ترتیب در گونه‌های *ترایکوفایتون روبروم* و *اینتردیجیتال* تولید نمود و در مواجهه با گونه‌های درماتوفیتی مختلف از اختصاصیت بالایی برخوردار بودند.

نتیجه‌گیری: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز دوگانه راه‌اندازی شده یک روش افتراقی اختصاصی و سریع نسبت به روش‌های متداول جهت شناسایی دو گونه *ترایکوفایتون روبروم* و *ترایکوفایتون اینتردیجیتال* از یکدیگر می‌باشد.

کلمات کلیدی: درماتوفیتوزیس، الانگیشن فاکتور یک، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز.

مقدمه

درماتوفیت‌ها گروهی از قارچ‌های رشته‌ای هستند که توانایی رشد بر روی بافت‌های کراتین‌دار بدن را دارا می‌باشند و براساس مرحله غیرجنسی در سه جنس ترایکوفایتون، اپیدرموفایتون و میکروسپوروم طبقه‌بندی می‌گردند که هر یک می‌توانند از مخازنی مانند انسان، حیوان و یا خاک جدا شوند.[۱] درماتوفیت‌ها دارای حدود ٤۱ گونه می‌باشند که از این میان دو گونه انسان دوست *ترایکوفایتون روبروم* و *ترایکوفایتون اینتردیجیتال* عامل بیش از ۸۰٪ درماتوفیتوزیس در ایران و جهان می‌باشند. این دو گونه علل عمده کچلی پا، کشاله‌ی ران، دست و کچلی ناخن در سرتاسر دنیا می‌باشند.[۲و۳] تشخیص آزمایشگاهی *ترایکوفایتون روبروم* و *ترایکوفایتون اینتردیجیتال* از یکدیگر براساس ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی آن‌ها در محیط کشت، تست سوراخ

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:22 IRST on Sunday October 10th 2021

کـردن مو و تعدادی دیگر از تست‌های فیزیولوژیکی صورت می‌گیرد کـه اغلب این تست‌ها وقت‌گیر بوده و به‌دلیل وجود شباهت زیاد ویژگی‌های فنوتیپی میان این دو گونه، به مهـارت‌هـای دقت خاص کادر تخصصی آزمایشگاهی نیاز است.[۴] امروزه روش‌های مولکولی افزون‌براین که از حساسیت و ویژگی بالاتری برخوردارند و قادرند گونه‌ی قارچ‌ها را تا حد گونه تعیین نمایند، از سرعت بالاتری نیز برخوردار بوده و وابسته به تشکیل بخش‌های اسپورزا نیز نیستند و مشکلاتی مانند مسئله پلئومورفیسم نیز در این روش‌ها مشکل‌ساز نمی‌شود.[۵]

این پژوهش با هدف مطالعه دقیق توالی‌های نوکلئوتیدی نواحی ژنی مختلف در دو گونه *ترایکوفایتون روبروم* و *ترایکوفایتون اینتردیجیتال* به‌منظور تفکیک همزمان دو گونه یادشده از یکدیگر انجام گرفت.

روش بررسی

این مطالعه از نوع تحلیلی و تجربی می‌باشد که در سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹٤ در آزمایشگاه قارچ‌شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم‌پزشکی تهران انجام پذیرفت.

نمونه‌های مورد آزمون در این مطالعه شامل دو گروه بود: الف) ۲٤ استرین‌های استاندارد گونه‌های شایع درماتوفیتی که از موسسات Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) و NITE Biological Resource Center (NBRC) تهیه شدند. ب) ۱۰۷ ایزوله‌ی درماتوفیتی جدا شده از بیمارانی که جهت تشخیص عفونت درماتوفیتوزیس به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه تهران و دکتر شیدفر در تهران مراجعه کردند. تمامی درماتوفیت‌ها پس از کشت روی محیط سابورودکستروز آگار (Merck, Germany) محتوی کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید جداسازی گردیدند.

جداسازی DNA به روش گریندر و تخلیص آن به روش فنل کلروفرم انجام گرفت.[۶] تمام گونه‌های استاندارد و بالینی با تکنیک Internal transcribed spacer, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (ITS PCR-RFLP) و با استفاده از آنزیم محدوداثر MvaI که پیش‌تر توصیف شده است،[۷] مورد شناسایی قرار گرفتند. پس از تاثیر آنزیم گونه *ترایکوفایتون روبروم* باندهای ۳٦۸، ۱٦٤، ۹۵ و ٦۵ نوکلئوتیدی و *ترایکوفایتون اینتردیجیتال* باندهای ٤۰٦، ۱۲٤، ۸۹، ۵۰ و ۱٤ نوکلئوتیدی را ایجاد می‌کنند.

طراحی جفت پرایمرهای اختصاصی: چهل توالی نوکلئوتیدی مربوط به دو گونه *ترایکوفایتون روبروم* و *ترایکوفایتون اینتردیجیتال* در ٤ ناحیه ژنی ITS، بتا توبولین، الانگیشن فاکتور یک آلفا و کالمودولین از پایگاه ژنی NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) گردآوری شد. در ادامه با استفاده از DNASIS computer program, version 2.5 (Hitachi Software Engineering Co., Yokohama, Japan) توالی‌های نوکلئوتیدی برای هر ژن به صورت مجزا مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت از بین ده‌ها حالت ممکن دو جفت پرایمر اختصاصی انتخاب گردید. به‌منظور بررسی اختصاصیت پرایمرها در واکنش Single PCR ۱۲/۵ میکرولیتر از پره‌میکس ۲X (Ampliqon Denmark) و ۰/۵ µl (۰/٤ µmol) از هریک از پرایمرهای رفت و برگشت در حجم نهایی ۲۵ µl تهیه شد. آنگاه به هر تیوب ٤ µl، DNA استخراج شده از هر ایزوله اضافه شد. مراحل PCR در دستگاه Thermal cycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) شامل ۵ دقیقه در ۹۵، ۳۰ سیکل شامل ٤۵ ثانیه $^{\circ}$C ۹٤، ۱ دقیقه $^{\circ}$C ۵۸، ۱ دقیقه $^{\circ}$C ۷۲ و در نهایت هفت دقیقه در $^{\circ}$C ۷۲ برنامه‌ریزی و انجام شد. هر تیوب در واکنش Duplex PCR حاوی دو جفت پرایمر اختصاصی بوده که با ایجاد باندهایی در اندازه‌های متفاوت توانستند دو گونه *ترایکوفایتون روبروم* و *ترایکوفایتون اینتردیجیتال* را شناسایی و از یکدیگر تفکیک نماید. شرایط زیر برای انجام یک واکنش ۲۵ µl در یک تیوب PCR استفاده شد: ۱۲/۵ µl از پره‌میکس ۲X، ۰/٤ µl (۰/٤ µmol) از هریک از ٤ پرایمر (دو جفت) طراحی شده، ۱/٦ µl از DNA استخراج شده و مقدار لازم آب مقطر دیونیزه‌ی استریل تا رسیدن به حجم نهایی ۲۵ µl. در ادامه برنامه حرارتی در دستگاه Thermal cycler به صورت یک سیکل $^{\circ}$C ۹۵ پنج دقیقه، ۳۵ سیکل $^{\circ}$C ۹٤، ۳۰ ثانیه، $^{\circ}$C ٦۱، ۳۵ ثانیه و $^{\circ}$C ٦۸، ۳۵ ثانیه و یک سیکل $^{\circ}$C ٦۸، ٦ دقیقه تنظیم گردید.

الکتروفورز محصول PCR: ۵ µl از DNA تکثیر شده در هر یک از واکنش‌های Single PCR و Duplex PCR در ژل آگارز ۱/۲٪ بارگذاری گردید.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:22 IRST on Sunday October 10th 2021

یافته‌ها

پس از بررسی توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به چهار ناحیه ژنی ITS، بتا توبولین، الانگیشن فاکتور یک آلفا و کالمودولین، مشخص شد که طول توالی‌های نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن مربوط به ژن الانگیشن فاکتور یک آلفا در دو گونه‌ی *ترایکوفایتون روبروم* و *ترایکوفایتون اینتردیجیتال* بین ۷۰۰ تا ۷۷۰ جفت باز است. میزان تشابه این دو گونه در ناحیه ژنی ۹٤/٦٪ می‌باشد و در ۷۸ جفت باز با یکدیگر اختلاف دارند. داده‌های بیشتر در زمینه‌ی سکانس‌های نوکلئوتیدی مورد ارزیابی در جدول ۱ آورده شده است. در نهایت یک جفت پرایمر اختصاصی برای *ترایکوفایتون روبروم* و یک جفت برای *ترایکوفایتون اینتردیجیتال* از ناحیه ژنی الانگیشن فاکتور یک آلفا انتخاب و پس از بررسی‌های کامپیوتری سنتز گردید. توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه به‌صورت زیر می‌باشد.

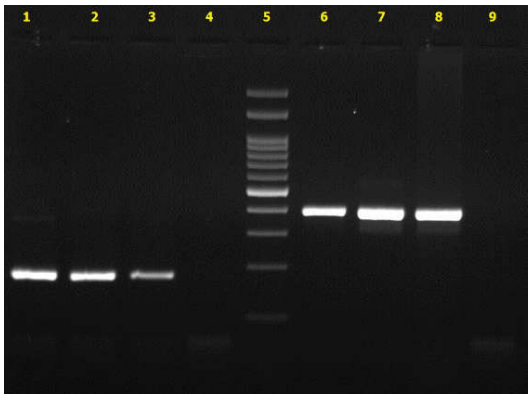
T. interdigitale forward primer:
CTGCACATTTTTTCTCTCCCTT

T. interdigitale revers primer:
ATGGAGGGGAAAGGTAAAGAG

T. rubrum forward primer:
AGCCACCAGATACCTCTAG

T. rubrum revers primer:
GAAAATTGTGCAACAGAACGGA

ناحیه مورد بررسی در این ژن در *ترایکوفایتون اینتردیجیتال* محصولی به اندازه‌ی ۳۸٤ جفت باز و در *ترایکوفایتون روبروم* ۱۷۳ جفت باز ایجاد کرد که از لحاظ اندازه با هم اختلاف چشمگیری داشته و در مرحله الکتروفورز باندهای حاصل به‌طورکامل قابل تفکیک از یکدیگر می‌باشند. پرایمرهای طراحی شده به‌صورت In slico (بررسی توسط نرم‌افزار) و در آزمون Single PCR تنها به دو گونه مورد نظر متصل می‌شدند نه دیگر گونه‌های درماتوفیتی و سایر قارچ‌ها مانند ساپروفیت‌های غیردرماتوفیتی و مخمرها. از مجموع ۱۰۷ DNA استخراج شده از ایزوله‌های بالینی درماتوفیتی در واکنش



شکل ۱: تمایز ایزوله‌های *ترایکوفایتون روبروم* و *ترایکوفایتون اینتردیجیتال* با روش Duplex PCR. ردیف‌های ۱، ۲ و ۳ را *ترایکوفایتون روبروم*، ردیف‌های ٦، ۷ و ۸ *ترایکوفایتون اینتردیجیتال*، ردیف‌های ٤، ۵ و ۹ کنترل منفی و ردیف ۵ مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی.

جدول ۱: داده‌های مربوط به آنالیزهای بیوانفورماتیک بر روی نواحی ژنی مورد نظر در این مطالعه.

ناحیه ژنی	گونه درماتوفیتی	میانگین طول توالی‌ها در بانک ژنی/ جفت باز	تعداد نوکلئوتیدهای متفاوت بین گونه‌ای/ جفت باز	تشابه دوگونه/درصد
ITS	*ترایکوفایتون روبروم*	۷۲۰	۷۲	۹۳/۵
	ترایکوفایتون اینتردیجیتال	٦۳۱		
بتا توبولین	*ترایکوفایتون روبروم*	۷۹٤	۲۸	۹۷/٤
	ترایکوفایتون اینتردیجیتال	٤۳۲		
کالمودولین	*ترایکوفایتون روبروم*	٦۲۷	۳۵	۹٦/۳
	ترایکوفایتون اینتردیجیتال	٦۳٤		
الانگیشن فاکتور یک آلفا	*ترایکوفایتون روبروم*	۷۳۷	۷۸	۹٤/٦
	ترایکوفایتون اینتردیجیتال	۷٦۸		

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:22 IRST on Sunday October 10th 2021

Duplex PCR، ۲٤ ایزوله با پرایمر اختصاصی *ترایکوفایتون اینتردیجیتال* و ۷۱ ایزوله در مقابل *ترایکوفایتون روبروم* مثبت گردید. سایر ایزوله‌ها که شش مورد را شامل می‌شدند در این واکنش منفی بودند. شکل ۱ الکتروفورز ایزوله‌های بالینی در واکنش Duplex PCR را نشان می‌دهد. نتایج تعیین گونه‌ها در Duplex PCR طراحی شده با نتایج حاصل از PCR-RFLP به طور کامل همخوانی داشت.

بحث

نواحی ژنی که تاکنون توالی آن‌ها در شناسایی گونه‌ها و زیرگونه‌های درماتوفیتی مشابه به یکدیگر به‌کار رفته است، محدود می‌باشد و می‌توان گفت از میان آن‌ها نواحی ITS در کمپلکس rDNA بیشترین قدرت تفکیک را دارا می‌باشد. از ناحیه ITS در درماتوفیت‌ها جهت تمایز گونه‌های کمپلکس *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* و گونه‌ی نزدیک به آن‌ها یعنی *ترایکوفایتون روبروم*، دو گونه *ترایکوفایتون اکوئینوم* و *تونسورانس*، گونه‌های کمپلکس روبروم و گونه‌های شایع جنس ترایکوفایتون استفاده شده است.[۸–۱۱] در مطالعه حاضر از این ناحیه نیز با توجه به وجود ۷۲ جفت باز اختلاف پرایمرهایی طراحی شد که در بررسی‌های بیوانفورماتیکی، ویژگی آن‌ها صددرصد بود، اما در محیط آزمایشگاه دو گونه مورد مطالعه قابل تفکیک از یکدیگر نمی‌باشند. همچنین ناحیه ژنی بتا توبولین در افتراق دوگونه‌ی *ترایکوفایتون اکوئینوم* و *تونسورانس* و کمپلکس *آرترودرما اوته* به‌کار رفته و ناحیه ژنی کالمودولین نیز برای بررسی فیلوژنی دامنه‌ی وسیعی از گونه‌های درماتوفیتی بررسی شده است.[۱۲–۱٤] با این وجود، این دو ناحیه به‌واسطه‌ی تشابه زیاد نوکلئوتیدی برای افتراق دو گونه *ترایکوفایتون روبروم* و *ترایکوفایتون اینتردیجیتال* چندان مفید به نظر نمی‌رسد. ناحیه الانگیشن فاکتور یک آلفا پیش‌تر جهت بررسی تفاوت‌های بین گونه‌ای و درون گونه‌ای ۱٦۷ ایزوله درماتوفیتی از ۳۰ گونه مختلف به‌کار رفته و نتایج حاصله نشان داده است که این ناحیه قدرت تفکیک کم و بیش مشابهی با ITS دارد، اما ویژگی و قدرت تفکیک الانگیشن فاکتور یک آلفا در برخی موارد بیشتر از ITS می‌باشد، به‌طوری که در شناسایی گونه‌های موجود در برخی از کمپلکس‌ها مانند *آرترودرما وان بروزگمی*، *ترایکوفایتون روبروم*، *آرترودرما بنهامی* و *آرترودرما اوته* مفیدتر است.[۱۵]

در مطالعه‌ای دیگر به آنالیز توالی نوکلئوتیدی این ناحیه ژنی در دو گونه *ترایکوفایتون اکوئینوم* و *تونسورانس* پرداخته شده و معلوم شده است که دو گونه‌ی یادشده در ژن الانگیشن فاکتور ۱۳ نوکلئوتید با یکدیگر اختلاف دارند و این در حالی است که اختلاف آن‌ها در ناحیه ITS در حد یک نوکلئوتید است.[۱۲]

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز دوگانه معرفی شده در این مطالعه یک روش تشخیصی و افتراقی اختصاصی می‌باشد که به‌طور چشمگیری دقیق‌تر و سریع‌تر از روش روتین کشت جهت شناسایی دو گونه *ترایکوفایتون روبروم* و *ترایکوفایتون اینتردیجیتال* از یکدیگر عمل نموده است.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه با عنوان "معرفی و ارزیابی یک روش Multiplex PCR ساده جهت افتراق *ترایکوفایتون روبروم* و *ترایکوفایتون اینتردیجیتال* به عنوان شایعترین عوامل درماتوفیتوزیس انسان" در مقطع کارشناسی ارشد رشته قارچ شناسی پزشکی در سال ۱۳۹۵ و کد ٤۱۱۸۵۲۰ می‌باشد که با حمایت دانشگاه تهران اجرا شده است.

References

1. Agrawal E, Marothi Y, Varma K, Agrawal M, Murthy R. Distribution and characterization of dermatophytes in a tertiary care hospital in Madhyapradesh. *J Evol Med Dent Sci* 2015;4(2):201-7.
2. Perea S, Ramos MJ, Garau M, Gonzalez A, Noriega AR, del Palacio A. Prevalence and risk factors of tinea unguium and tinea pedis in the general population in Spain. *J Clin Microbiol* 2000;38(9):3226-30.
3. Lee WJ, Kim SL, Jang YH, Lee S-J, Kim DW, Bang YJ, et al. Increasing prevalence of Trichophyton rubrum identified through an analysis of 115,846 cases over the last 37 years. *J Korean Med Sci* 2015;30(5):639-43.
4. Stevens DA. Diagnosis of fungal infections: current status. *J Antimicrob Chemother* 2002;49(suppl_1):11-9.
5. Mehlig L, Garve C, Ritschel A, Zeiler A, Brabetz W, Weber C, et al. Clinical evaluation of a novel commercial multiplex-based PCR diagnostic test for differential diagnosis of dermatomycoses. *Mycoses* 2014;57(1):27-34.
6. Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T, Hasegawa A, Tajiri Y, Hanazawa R, et al. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Clin Microbiol* 1999;37(4):920-4.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:22 IRST on Sunday October 10th 2021

7. 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.
8. Summerbell R, Haugland R, Li A, Gupta A. rRNA gene internal transcribed spacer 1 and 2 sequences of asexual, anthropophilic dermatophytes related toTrichophyton rubrum. *J Clin Microbiol* 1999;37(12):4005-11.
9. Summerbell RC, Moore MK, Starink-Willemse M, Van Iperen A. ITS barcodes for Trichophyton tonsurans and T. equinum. *Sabouraudia* 2007;45(3):193-200.
10. Graser Y, Kuijpers A, Presber W, De Hoog G. Molecular taxonomy of the Trichophyton rubrum complex. *J Clin Microbiol* 2000;38(9):3329-36.
11. Kong F, Tong Z, Chen X, Sorrell T, Wang B, Wu Q, et al. Rapid identification and differentiation of Trichophyton species, based on sequence polymorphisms of the ribosomal internal transcribed spacer regions, by rolling-circle amplification. *J Clin Microbiol* 2008;46(4):1192-9.
12. Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, De Hoog GS, Shidfar MR, Satoh K, Najafzadeh MJ, et al. Discrimination of Trichophyton tonsurans and Trichophyton equinum by PCR-RFLP and by β-tubulin and translation elongation factor 1-α sequencing. *Med Mycol* 2012;50(7):760-4.
13. Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, de Hoog GS, Shidfar MR, Satoh K, Najafzadeh MJ, et al. Multilocus differentiation of the related dermatophytes Microsporum canis, Microsporum ferrugineum and Microsporum audouinii. *J Med Microbiol* 2012;61(1):57-63.
14. Ahmadi B, Mirhendi H, Makimura K, de Hoog GS, Shidfar MR, Nouripour-Sisakht S, et al. Phylogenetic analysis of dermatophyte species using DNA sequence polymorphism in calmodulin gene. *Sabouraudia* 2016;54(5):500-14.
15. Mirhendi H, Makimura K, de Hoog GS, Rezaei-Matehkolaei A, Najafzadeh MJ, Umeda Y, et al. Translation elongation factor 1-α gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. *Med Mycol* 2014;53(3):215-24.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 8:22 IRST on Sunday October 10th 2021

TUMJ Tehran University Medical Journal, July 2019; Vol. 77, No. 4: 222-227 Original Article

Differentiating agents of dermatophytosis (*Trichophyton rubrum and Trichophyton interdigitale*) in human by dual polymerase chain reaction

Zahra Fasihizade M.D.[1]
Bahram Ahmadi Ph.D.[2]
Gholam Reza Shokoohi Ph.D.[3]
Nilufar Jalalizand B.Sc.[1]
Marjan Motamedi Ph.D.[4*]
Hossein Mirhendi Ph.D.[5]

1- Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran.
3- Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran.
4- Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
5- Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

[*]Corresponding author: Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Imam Hossein Sq., Zand St., Shiraz, Iran.
Tel: +98- 71- 32305291
E-mail: marjanmotamedi64@yahoo.com

Abstract

Received: 20 May 2019 Revised: 28 May 2019 Accepted: 15 Jul. 2019 Available online: 22 Jul. 2019

Background: Dermatophytes create the most common fungal disease in humans, called dermatophytosis. The two species of Trichophyton rubrum and Trichophyton interdigital are responsible for over 80% of types of dermatophytosis. So far, several morphological and physiological methods have been used to differentiate these very similar species, but these methods are generally time-consuming and have low specificity. The purpose of this study was to introduce a simple and rapid duplex polymerase chain reaction (PCR) reaction to differentiate these two species from each other.

Methods: This research was an analytical and experimental study that was carried out from 2017 to 2018 in the Medical Mycology Laboratory, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Iran. For this purpose, the nucleotide sequences of the 4 regions of internal transcribed spacer (ITS), beta-tubulin, elongation factor 1 alpha and calmodulin in the two considered species of fungi were conducted bioinformatics analysis. The differences and similarities of nucleotides between two species in each of these genes were studied for selecting the primer. The specificity of selected primers was tested for duplex PCR reaction against sequenced isolates of dermatophyte species.

Results: According to the total data, the specific primers were selected from elongation factor 1 alpha gene. These primers produced a product of 173 and 384 bp, in Trichophyton rubrum and Trichophyton interdigital, respectively. They had high specificity in the face of various dermatophytes. The length of nucleotide sequences found in the genebank of this gene in the two species is between 700 and 770 bp. The similarity of the two species in this region is 94.6% and differs by 78 bp. Of the 107 extracted DNAs from clinical dermatophyte isolates, in duplex PCR 24 isolates were positive with Trichophyton interdigital primer and 71 isolates against Trichophyton rubrum. The remaining isolates, which included 6, were negative in this reaction, which included other dermatophyte species.

Conclusion: This method is a specific and fast differential method compared to conventional methods for identifying Trichophyton rubrum and Trichophyton interdigital from each other.

Keywords: dermatophytosis, elongation factor 1, polymerase chain reaction.