

## دراسة حساسية تقانة Nested PCR في كشف الرشاشية الدخناء في عينات قشع مخموجة تجريبياً

آلاء رمضان<sup>(1)</sup> و محمد طاهر إسماعيل<sup>(2)</sup> و شادي سكرية<sup>(3)</sup>\*

<sup>(\*)</sup> قسم علم الحياة الحيوانية - كلية العلوم - جامعة دمشق - سورية

<sup>(\*\*)</sup> كلية الصيدلة - الجامعة العربية الدولية الخاصة AIU - سورية

تاريخ الإيداع 2012/03/29

قبل للنشر في 2012/05/28

### الملخص

تحتل الإصابات الفطرية المسببة بأنواع فطر الرشاشية *Aspergillus* عموماً، المرتبة الثانية عالمياً بين الإصابات الفطرية الغازية، وبشكل خاص، تعد الرشاشية الدخناء *Aspergillus fumigatus* المسبب الرئيسي لداء الرشاشيات الغازي (IA). وعلى الرغم من أن هذا الداء نادراً ما يصيب الأفراد سليمي المناعة، إلا أنه يؤدي إلى الوفاة لدى الأشخاص المضعفين مناعياً، لذلك فمن الضروري تشخيصه بشكل مبكر، لمعالجته بشكل ناجح. إن الأدوات التشخيصية التقليدية المتبعة حالياً للكشف عن الإصابات هي الاستنابات على وسط سابورو، إذ تتصف هذه الطريقة بأنها ذات حساسية منخفضة وموثوقية ضعيفة. وقد سمح لنا انتشار تقانة التفاعل السلسلي للبوليميراز Nested-PCR كتقانة جزيئية ذات حساسية عالية، بإجراء دراسة مقارنة بين حساسية كلتا الطريقتين التقليدية المتبعة و Nested-PCR، وأظهرت نتائج الدراسة على عينات قشع مخموجة تجريبياً بتركيز مختلفة راوحت بين  $10^6$  -  $10^8$  بوغة/مل، حساسية تقانة Nested-PCR ونوعيتها في الكشف عن أدنى التراكيز، مقارنة بطريقة التشخيص التقليدية المتمثلة بالاستنابات الفطري على وسط سابورو التي كانت سلبية للتراكيز جميعها.

الكلمات المفتاحية: داء الرشاشيات الغازي، الرشاشية الدخناء *A.fumigatus*،  
Nested PCR، DNA جينومي.

(1) طالب، (2) الأستاذ المشرف، (3) الأستاذ المشرف المشارك.

## Testing the sensitivity of Nested PCR method to detect *Aspergillus fumigates* in experimentally infected Sputum samples

A. Ramadan <sup>\*(1)</sup>; M. T. Esmail <sup>\*\* (2)</sup> and S. Soukkaria <sup>\*(3)</sup>

<sup>(\*)</sup> Department of Zoology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

<sup>(\*\*)</sup> Faculty of Pharmacy, Arabic International University (AIU), Syria

Received 29/03/2012

Accepted 28/05/2012

### ABSTRACT

Fungal infections caused by *Aspergillus* species generally are occupying a second place among invasive fungal infections in the world, especially *A. fumigatus*, which is considered the main cause of invasive Aspergillosis (IA). Although IA rarely infects immunocompetent individuals, however, it can lead to death in immunocompromised patients. Therefore, it is necessary to diagnose the infection early in order to treat the disease efficiently.

However, the conventional diagnostic tools, currently used to detect infections, has low sensitivity and reliability.

Polymerase chain reaction (PCR) technology distribution as a molecular and high sensitive technology has allowed us to make comparative study between sensitivity of traditional currently used diagnostic method and Nested-PCR, the result of the study of sputum samples that experimentally infected with different concentrations of *A.fumigatus* spores ramping from 10 to 10<sup>6</sup> spore/ml, have high sensitivity and specificity of Nested-PCR in detecting the lower concentrations, comparing with traditional diagnostic method (culture on Sabouraud media) that were negative in all concentrations.

**Keywords:** Invasive Aspergillosis, *A. fumigates*, Nested PCR, Genomic DNA.

---

<sup>(1)</sup>Student, <sup>(2)</sup> Supervisor, <sup>(3)</sup> Associated supervisor.

## المقدمة

تشكل الإصابات الفطرية الجهازية systemic fungal infection مشكلة صحية كبيرة في معظم بلدان العالم، النامية منها والمتطورة على السواء. وقد سُجل في العقدين الماضيين ارتفاع ملحوظ في نسبة حدوث هذه الإنتانات الفطرية الجهازية، إذ أصبحت تعدُّ سبباً شائعاً للوفاة بين فئة معينة من المرضى تعرف بمضعفي المناعة (immunocompromised patients) وتضم كلاً من مرضى اغتراس الأعضاء ونقي العظم ومرضى السرطان، حيث يخضع هؤلاء إلى معالجات كيميائية ومثبطات مناعية تجعل جهازهم المناعي ضعيفاً (Chakrabarti, 2005; Denning et al., 2003; Groll et al., 1996; Lin et al., 2001) يُعد جنسا *Candida sp.* و *Aspergillus sp.* المسببان الأكثر شيوعاً للإصابات الفطرية، فهما المسؤولان عن نحو 90% من هذه الإصابات التي قد يؤدي بعضها إلى الموت (Bodey et al., 1992; Ruhnke et al., 2002). وتشير الدراسات الحديثة إلى أن الرشاشية الدخناء *A.fumigatus* تحتل المرتبة الثانية بين الفطور المسببة للإصابات البشرية بعد فطر *Candida albicans* (Denning, 1998). تُعدُّ الرشاشية الدخناء نوعاً عالمياً الانتشار (Bansod et al., 2008)، حيث تعيش في التربة وتؤدي دوراً مهماً في الظروف الطبيعية كمسؤولة عن التدرج الهوائي للمواد العضوية، فضلاً عن دورها الأساسي في دورتي الكربون والنتروجين في الطبيعة (Latgé & Steinbach, 2009). كما تُعدُّ أبواغها الغبيرية conidia من أكثر الأبواغ الرشاشية المحمولة في الجو انتشاراً، وذلك نظراً إلى إنتاجها لكميات كبيرة من الأبواغ من جهة ولصغر حجم الأبواغ من جهة أخرى، مما يسهل انتشارها في كل مكان ودخولها في أثناء التنفس إلى الأنساح الرئوية (Latgé, 1999; Nolard, 1994). تؤكد الدراسات والتقارير البيئية استنشاق البشر جميعاً يومياً عدة مئات من أبواغ هذا الفطر (Chazalet, 1998; Hospenthal, 1998).

نادراً ما يؤدي استنشاق الأبواغ الغبيرية إلى تأثيرات ضارة عند الأفراد سليمي المناعة، على الرغم من أنه في السنوات الأخيرة سُجل فطر الرشاشية الدخناء *A. fumigatus* كعامل ممرض ضعيف مسؤول عن الأشكال التحسسية المرضية. (Latgé 1999) وقد أثبتت الدراسات المتعددة على مدى العقدين الماضيين أن فطر *A. fumigatus* أصبح أكثر الفطور الممرضة انتشاراً في الجو، وأشدّها خطورة وفتكاً لدى المرضى المثبطين مناعياً والمصابين بالتهابات رئوية حادة (Ellis et al., 2000). هذا وقد ازدادت نسبة حالات الإصابة بداء الرشاشيات في الاثنتي عشرة سنة الماضية بحيث أصبحت أربعة أضعاف ما كانت عليه سابقاً، ففي عام 1992 كان داء الرشاشيات الغازي (IA) مسؤولاً عن 30% تقريباً من الإصابات الفطرية لدى المرضى الذين

يقضون بسبب مرض السرطان. وتُشير الدراسات إلى أنه يصيب مرضى اللوكيميا خاصة، بنسبة أكبر، وتراوح نسبة الوفاة بينهم 80-90 % بسبب هذا الداء (Verweij, 1997). أمّا في الوقت الراهن، فيشكل IA السبب الرئيسي للوفاة في مراكز معالجة اللوكيميا وزرع نقي العظم ومراكز اغتراس الأعضاء. إذ يعدُّ *A. fumigatus* العاملُ الإمبراضي المسؤول عن 90 % من الإصابات البشرية (Latgé et al., 1997). وتُشخصُ عادة الإصابات الفطرية الجهازية بشكل متأخر، وغالباً ما يتم تأكيدها بشكل قاطع عند تشريح الجثة لتحديد سبب الوفاة (Groll et al., 1996).

عادة تُشخصُ الإصابة بهذا الداء باستنابت عينات من سائل غسل الأسناخ الرئوية على أوساط خاصة، وفي كثير من الأحيان لا تعطي هذه الطريقة نتائج دقيقة، كما وقد تعطي أحياناً نتائج مغلوطة فيها بسبب تلوث الزرع بأبواغ الفطر الموجودة في الهواء. من النادر الكشف عن الإصابة عن طريق استنابت الدم، بسبب قلة محتواه من CFU (الوحدات المكونة للمستعمرات Colony Forming Unit). ويلجأ في بعض الأحيان إلى إجراء مقاطع نسيجية لخزعات مأخوذة من الأسناخ الرئوية للكشف عن نمو الفطر فيها، ولكن في الحالات الخطرة من الضعف المناعي (المرضى الذين يعانون من حمى شديدة وقلة عدلات وقلة صفيحات) يصعب الحصول على الخزعات النسيجية، إذ إنّ مثل هذا الإجراء يمكن أن يؤدي إلى خطر الإصابة بالنزيف بسبب قلة الصفيحات الدموية أو باختلاطات أخرى نتيجة أخذ الخزعات (Ellis et al., 2000; Girmenia, 2001; Robinson, 1995). أمّا بالنسبة إلى الاختبارات المصلية المناعية للكشف عن أضداد الرشاشية الدخاء، فهي تقريباً عديمة الفائدة بسبب ضعف الاستجابة المناعية لدى المرضى مضعفي المناعة، ومن ثمّ قلة الأضداد في المصل (Maertens et al., 2001).

وفي ضوء الحساسية والنوعية المنخفضتين لهذه الطرائق التقليدية، لجأ الباحثون إلى الكشف عن الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA الفطري لتشخيص الإصابة؛ وذلك باستخدام تقانة التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR. إذ يمكن الكشف عن واسمات نوعية خاصة بهذا الفطر، وهي عبارة عن تسلسلات هدفية موجودة ضمن DNA الجينومي للفطر، كالتسلسل المرمز لأحد الحموض النووية الريبية الريبوزومية rRNA أو تسلسلات موجودة ضمن DNA المتقدرات (الميتوكوندري) (Buchheidt et al., 2002; Costa et al., 2002; Hebart et al., 2000; Latgé & Steinbach, 2009; Skladny et al., 1999). بيّنت بعض البحوث أن استخدام طريقة PCR للكشف عن الجنس *Aspergillus* بشكل عام أكثر حساسية وسرعة من الطرائق التقليدية. وقد أثبتت بحوث أخرى فاعلية طريقة Nested-PCR (وهي طريقة يجري فيها تفاعلان متتاليان من PCR) في الكشف النوعي عن *A.fumigatus* في عينات مختلفة مأخوذة من

مرضى. وتتصف هذه الطريقة بشكل عام بكونها أكثر دقة من استخدام طريقة PCR التقليدي (Hummel et al., 2004; Pringle et al., 2005).

هدفت هذه الدراسة إلى مقارنة حساسية طريقة الاستنابت التقليدية، المستخدمة حالياً في مخابر التحاليل الطبية والتشخيص المخبري في دمشق، بحساسية تقانة Nested-PCR التي باتت شائعة الاستخدام عالمياً في تشخيص الإصابة بهذا الداء.

### مواد البحث وطرقه

#### 1- الحصول على الرشاشية الدخناء وتحضير المعلق الفطري:

تم الحصول على سلالة مرجعية من الرشاشية الدخناء من أحد المخابر المرجعية في كلية الطب بجامعة دمشق، أُخذت بواسطة إبرة زرع معقمة وبشروط عقيمة ضمن غرفة سلامة حيوية Biosafety Cabinet كمية من الأبواغ وعلقت ضمن 1 مل من دارة ملحية فوسفاتية (PBS)، ثم عدت الأبواغ ضمن المعلق بواسطة عدادة نيوباور وحُسب تركيزها في الملي لتر من المحلول، بذلك تم الحصول على معلق ذي تركيز  $2 \times 10^6$  بوغة/مل.

#### 2- تحضير العينات المخموجة بأبواغ الرشاشية الدخناء واستنابتها:

أُخذت عينة قشع من شخص سليم وغير مدخن، وقُسمت إلى 7 أنابيب ابيندورف، ثم أُخمجت بستة تراكيز مختلفة من المعلق الفطري:  $10^6$ ،  $10^5$ ،  $10^4$ ،  $10^3$ ،  $10^2$ ،  $10$  بوغة/مل وأُقي على عينة واحدة شاهدة. بعد ذلك قُسمت كل عينة من العينات السبع السابقة إلى قسمين قسم استخدم بالاستنابت بحسب الطريقة التقليدية المتبعة في مخابر تشخيص الإصابات الرشاشية في دمشق، حيث استنبتت العينات على وسط انتقائي سابورو-كلورامفينيكول ضمن شروط عقيمة، وحُضنت مدة أسبوع عند الدرجة  $27^\circ\text{C}$ . واستخلص DNA الجينومي الفطري من القسم الآخر للعينات.

#### 3- استخلاص DNA الجينومي الفطري:

استُخلص DNA الجينومي من عينات القشع المخموجة بأبواغ الفطر باستخدام عتيدة (Kit) استخلاص جاهزة تعتمد على أعمدة كروموتوغرافيا مكروية تحوي على غشاء من السيليكا رابط لـ DNA (شركة AJ ألمانيا). اتبعت الخطوات العامة للاستخلاص المنصوح بها من قبل الشركة المصنعة مع إجراء بعض التعديلات، عولجت العينات بمحلول NAC (2% N-acetyl cysteine-NaOH)، وحُضنت مدة 20 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة. بعد ذلك نبذت الأنابيب باستخدام مثقلة أنابيب ابيندورف (Hermel 233M-2) بسرعة دوران 10000 دورة/الدقيقة مدة 15 دقيقة، أزيل السائل الطافي وغسلت الرسابة بدائرة TE (Promega). ومن ثم أُضيف 200U من أنزيم

(sigma) Iyticase، الهاضم إلى جدار الأبواغ الفطرية وحُضنت مدة 30 دقيقة عند الدرجة 37°م، أُضيفت دائرة الحل وحُضنت العينات عند الدرجة 95°م مدة 20 دقيقة، ومن ثم وُضعت العينات في الثلج مدة دقيقتين، وعولج ناتج الحل بأنزيم البروتيناز K، مدة 30 دقيقة عند الدرجة 50°م للتخلص من البروتينات.

أضيف 200µl من محلول الربط مع غشاء السيليكا، ومُرر المزيج على أعمدة الكروموتوغرافيا، نبذت هذه الأعمدة مدة دقيقتين بسرعة 12000 دورة/الدقيقة، وغسلت بدائرة تحوي الإيثانول للتخلص من الشوائب، وأخيراً شُطف DNA المرتبط على الغشاء بدائرة دافئة من TE وجمع في أنابيب ايبندورف نظيفة، وحُفظ DNA المستخلص في الدرجة - 20°م.

#### 4- التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR:

أُجزت تفاعلات PCR باستخدام جهاز مدور حراري Thermal cycler (Eppendorf) وعتيدة (Promega) Go Taq DNA Polymerase. اصطنعت المرئسات Primers النوعية لـ DNA الفطر، (AFU7AS, AFU5S, AFU5AS, AFU7S) من قبل شركة Alpha DNA الكندية، ويوضح الجدول (1) تسلسل المرئسات المستخدمة في الدراسة (Bansod et al. 2008).

الجدول (1) تسلسل المرئسات المستخدمة في الدراسة

المرئسة	التسلسل	الموقع
AFU5S	AGG GCC AGC GAG TAC ATC ACC TTG	1436-1459
AFU5AS	GG G (AG)GT CGT TGC CAA C(CT)C (CT)CC TGA	1648-1771
AFU7S	CGG CCC TTA AAT AGC CCG	1296-1313
AFU7AS	GA CCG GGT TTG ACC AAC TTT	1681-1700

تعتمد تقانة Nested-PCR على إجراء تفاعلين متتاليين من PCR، يستخدم الأول DNA المستخلص من العينات وشفع من المرئسات النوعية، في حين يستخدم الثاني ناتج التفاعل الأول وشفعاً آخر من المرئسات يتعرف تسلسلات نوعية ضمن شدة DNA الناتجة عن التفاعل الأول.

#### تفاعل PCR الأول:

حُضّر حجم نهائي قدره 50 µl لكل تفاعل PCR، يحوي على: دائرة خاصة بالأنزيم بتركيز 1X و 1.5 mM من MgCl<sub>2</sub> و 0.2mM من كل نيكليوتيد من النكليوتيدات الأربعة ثلاثية الفوسفات منزوعة الأوكسجين dNTPs (Roth) و 1µM من كل مرئسة (AFU7S, AFU7AS) و 1.25U من Taq بوليميراز و 29µl من ناتج استخلاص DNA. بُرْمَجَ جهاز PCR كما يأتي: التسخين إلى درجة 95°م مدة دقيقتين ثم إنجاز 35 دورة تتألف كل منها من ثلاث مراحل: التسخين في المرحلة الأولى إلى الدرجة 95°م

مدة 40 ثانية، وفي المرحلة الثانية إلى الدرجة 60°م مدة دقيقة واحدة، وفي المرحلة الثالثة إلى درجة 72°م مدة دقيقة واحدة. وتحليل نواتج تفاعل PCR رُحلت العينات على هلامه الأغاروز.

#### تفاعل Nested-PCR (التفاعل الثاني):

حُضِرَ حجم نهائي قدره 50µl لكل تفاعل PCR، يحوي على المواد المكونة للتفاعل السابق كلها مع الاختلافيين الآتيين: استخدمت المرستات AFU5S و AFU5AS وأخذ 1µl من ناتج تضخيم تفاعل PCR الأول بدلاً من ناتج استخلاص DNA. بُرمج جهاز PCR كما يأتي: التسخين إلى درجة 94°م مدة دقيقتين ثم إنجاز 35 دورة تتألف كل منها من ثلاث مراحل: التسخين في المرحلة الأولى إلى الدرجة 94°م مدة 40 ثانية، وفي المرحلة الثانية إلى الدرجة 62°م مدة دقيقة واحدة، وفي المرحلة الثالثة إلى درجة 72°م مدة دقيقة واحدة. استخدم في كلا التفاعلين DNA مستخلص من سلالة مرجعية للرشاشية الدخناء، كما استعمل شاهد سلبي يتألف من جميع مكونات تفاعل PCR باستثناء DNA. وتحليل نواتج تفاعل PCR رُحلت العينات على هلامه الأغاروز.

#### 5- الرحلان الكهربائي:

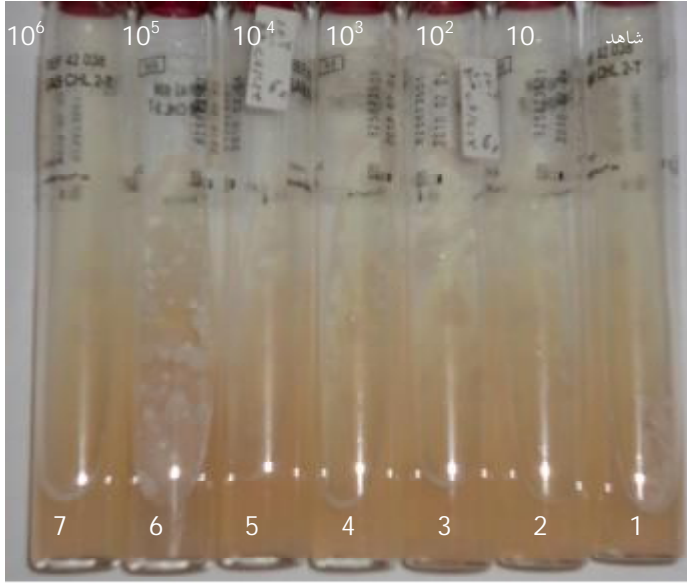
حُضرت هلامه من الأغاروز بتركيز 2% ضمن دائرة من TBE 1X وأضيف إليها محلول بروم الإيثيديوم تركيز 5µg/ml، ثم صُبّت برفق في قالب الرحلان الكهربائي المخصص، وُضعت الأمشاط المناسبة وتركت حتى تتكوثر، ومن ثم سُحبت الأمشاط ووضعت الهلامه داخل حوض الترحيل وغمرت بدائرة TBE 1 X.

مُرّج 10 ميكروليتر من كل ناتج PCR مع 2 ميكروليتر من دائرة التحميل Loading Buffer 6X. ثم وُضع المزيج ضمن آبار الهلامه، كما وُضع 12 ميكروليتر من واسمات أطوال معيارية (BioLabs) في إحدى الآبار، ورُحلت العينات باستخدام جهاز الرحلان بفولطية 135 مدة 25 دقيقة، فحص الهلام بواسطة جهاز التصوير بالأشعة فوق البنفسجية UV- Transilluminator ثم صُوّر باستخدام جهاز توثيق الهلام Cleaver.

### النتائج

#### 1- استنبات عينات القشع الحاوية على تراكيز مختلفة:

حُضرت عينات من القشع أُخمدت تجريبياً بستة تراكيز من أبواغ الرشاشية الدخناء، كما ذكر في الطرائق، ثم استنبت قسم منها على وسط سابورو كلورامفينيكول عند درجة حرارة 27°م. بعد مرور أسبوع فحصت الأنابيب وتبين عدم نمو فطر الرشاشية الدخناء في أي أنبوب (الشكل 1)، أي إن نتيجة استنبات القشع المخموج بالأبواغ الفطرية كانت سلبية للتراكيز جميعها.



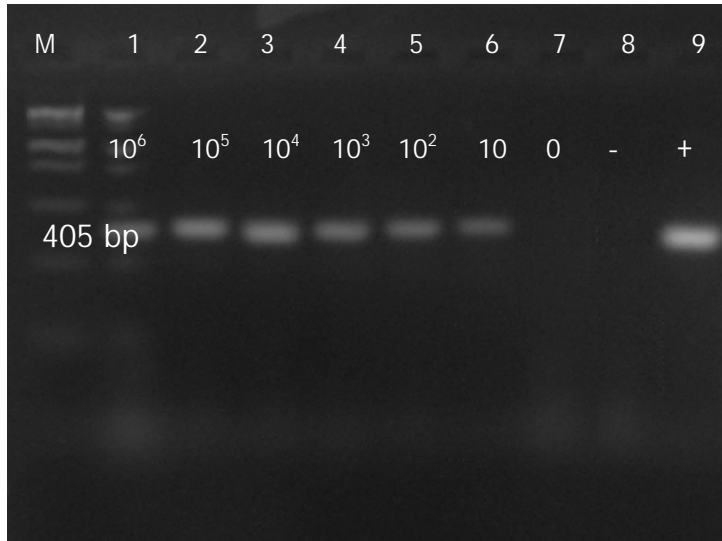
الشكل (1) نتائج الاستنبات الفطري لعينات قشع تحتوي على تراكيز متزايدة من أبواغ الرشاشية الدخاء على وسط سابورو كلورامفينيكول. الأنبوب رقم 1 لا يحوي أي أبواغ فطرية (شاهد) والأنبوب رقم 2 يحوي 10 أبواغ/مل وتتزايد تراكيز الأبواغ في الأنابيب للوصول إلى الأنبوب رقم 7 الذي يحوي  $10^6$  بوغة/مل. تراكيز الأبواغ الفطرية مسجلة أعلى كل أنبوب. يتبين أن نتيجة الزرع سلبية للتراكيز المستعملة جميعها.

2- التحري عن DNA الجينومي للرشاشية الدخاء بتقانة Nested-PCR:

استُخلص DNA من القسم الثاني من العينات كما ورد في الطرائق باستعمال عتيدة تعتمد على أعمدة كروماتوغرافيا تحوي غشاء من السيلكا ذا إلفة عالية لـ DNA. وللتحري عن DNA الجينومي للرشاشية الدخاء تم اللجوء لتقانة Nested-PCR، التي تعتمد -كما ذكر سابقاً- على إجراء تفاعلين متتاليين من PCR.

استعمل في تفاعل PCR الأول حجم ثابت من DNA المستخلص وزوج من المرئسات يتشافع مع تسلسلات محافظة للجين المرزمة لـ rRNA-18S، ويضخم شدة طولها 405bp مميزة لجنس الرشاشية. رُحلت نواتج التفاعل الأول على هلامة الأغاروز بتركيز 2%، ويوضح الشكل (2) صورة هلامة الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل PCR الأول، حيث تظهر في المسارات جميعها عصابة مفردة بطول 405 bp، ناتجة عن تضخيم شدة من DNA الجينومي مميزة لجنس الرشاشية في العينات جميعها. تشير هذه النتيجة إلى قدرة تقانة PCR على الكشف عن DNA الفطري في تراكيز الأبواغ الفطرية كلها التي استخدمت في إخماج العينات.

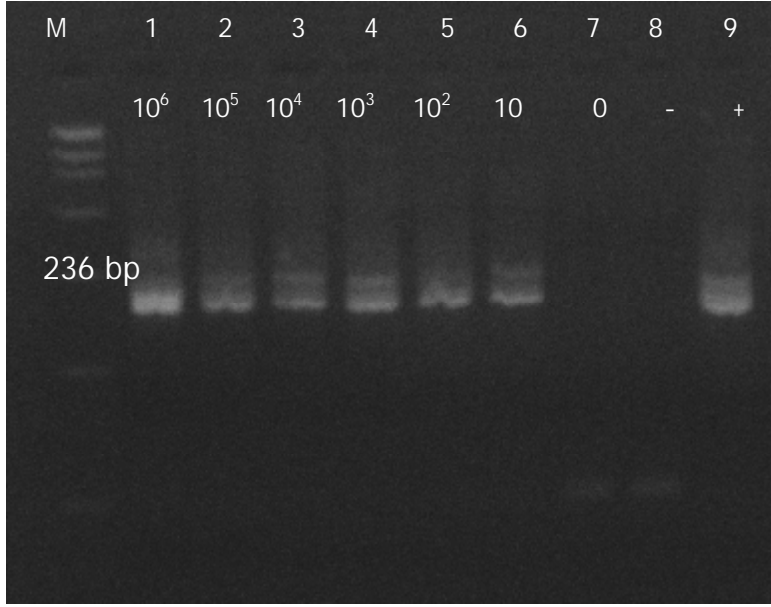




الشكل (2) الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل PCR الأول.

M واسمات أطوال معيارية DNA ladder، الأرقام من 1 إلى 7 هي نواتج تفاعل PCR باستخدام DNA المستخلص من عينات القشع السبع. تشير أرقام الصف الثاني إلى تركيز الأبواغ ضمن العينة (بوغة/مل). تظهر شذفة بطول 405 bp مميزة لجنس الرشاشية في العينات كلها باستثناء العينة ذات التركيز 0. البئر 8، شاهد سلبي، نواتج تفاعل PCR دون DNA حيث لا تظهر أي عصابة على مسار البئر. البئر 9، شاهد إيجابي، نواتج تفاعل PCR لـDNA مرجعي للرشاشية الدخناء ومن الملاحظ وجود شذفة بطول 405 bp.

وللتأكد من ناتج التفاعل الأول ومن نوعيته أُجري تفاعل PCR ثانٍ على هذا الناتج باستخدام حجم ثابت منه وزوج من المرئسات يتشاقف مع تسلسل نوعي ضمن الشذفة الناتجة عن التفاعل الأول ويضخم شذفة أخرى طولها 236 bp مميزة لنوع الرشاشية الدخناء. رُحل ناتج هذا التفاعل على هلامة الأغاروز بتركيز 2%. ويوضح الشكل (3) صورة هلامة الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل Nested-PCR، يظهر فيها نواتج التضخيم بشكل عصابة مفردة بطول 236 bp في العينات المستخدمة جميعها مما يدل على قدرة هذه التقنية على الكشف وبصورة نوعية عن تراكيز الأبواغ الفطرية جميعها التي استخدمت في إخماج عينات القشع.



الشكل (3) الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل Nested-PCR (التفاعل الثاني).

M واسمات أطوال معيارية DNA ladder، الأرقام من 1 إلى 7 هي نواتج تفاعل PCR باستخدام DNA المضخم في التفاعل الأول لعينات القشع السبع. تشير أرقام الصف الثاني إلى تركيز الأبواغ ضمن العينة (بوع/مل). تظهر شذفة بطول 236 bp مميزة لنوع الرشاشية الدخاء في العينات كلها باستثناء العينة ذات التركيز 0. البئر 8، شاهد سلبي، نواتج تفاعل PCR دون DNA حيث لا تظهر أي عصابة على مسار البئر. البئر 9، شاهد إيجابي، نواتج تفاعل PCR لـDNA مرجعي للرشاشية الدخاء ومن الملاحظ وجود شذفة بطول 236 bp.

### المناقشة

هدفت هذه الدراسة إلى مقارنة الطريقة التقليدية المتبعة حالياً في معظم مخابر التشخيص الطبي للتحري عن الإصابة بداء الرشاشيات الغازي المُسبب بالرشاشية الدخاء (الاستنابات على وسط سابورو)، بالطريقة التي باتت تستخدم عالمياً في تشخيص كثير من الأمراض الإنتانية Nested-PCR بهدف وضع اختبار سريع وعالي الحساسية للكشف عن الرشاشية الدخاء لدى المرضى المهيئين للإصابة بداء الرشاشيات. إذ يُعدُّ الكشف المبكر عن هذا الداء حاسماً لمعالجة المرض في مراحله الأولى حيث يكون الشفاء ممكناً. وقد اعتمدنا في هذا البحث على تقانة Nested-PCR، إذ تجمع هذه التقنية

بين الحساسية والدقة العاليتين. تعود الحساسية العالية إلى تقانة PCR بحد ذاتها التي يمكن أن تكشف كميات قليلة جداً من DNA، بينما تعود دقتها إلى إجراء تفاعلين متتاليين من PCR مما يقلل بشكل كبير احتمال حدوث تفاعلات إيجابية كاذبة (Bansod *et al.*, 2008). في هذا البحث، اختبرت حساسية هذه التقانة في الكشف عن DNA الجينومي للرشاشية الدخناء المسببة لداء الرشاشيات في عينات من القشع أُخِمت تجريبياً بتركيز مختلفة من أبواغ الفطر راوحت بين  $10^6$  - 10 بوغة/مل. إذ قُسمت عينات القشع بعد إخماتها إلى قسمين، استُتبت القسم الأول بالطريقة التقليدية المتبعة في مخابر التشخيص الطبي دون أي تعديل، واستُخلص DNA الجينومي الفطري من القسم الثاني. أُنجز على DNA المستخلص تقانة Nested-PCR بوجود شفعين من المرئسات النوعية للرشاشية الدخناء، يضخم الشفع الأول (AFU7S, AFU7AS) شذفة بطول 405 bp مميزة لجنس الرشاشية، في حين يضخم الشفع الثاني (AFU5S, AFU5AS) شذفة بطول 236bp مميزة لنوع الرشاشية الدخناء (Bansod *et al.*, 2008). كُشف عن هذه الشدفة بواسطة تقانة الرحلان الكهربائي التحليلي لنواتج تفاعل PCR على هلامه الأغاروز وبوجود واسمات أطوال معيارية.

بشكل عام، يعتمد تشخيص داء الرشاشيات على مجموعة من الطرائق المتمثلة بالاستتبات على أوساط خاصة، أو التشريح المرضي لخزاع ترفع من الرئة، وبالطرائق المناعية (Latgé 1999). يُعدُّ استتبات عينات من القشع أو سائل الغسالة القصصية من أكثر طرائق التشخيص التقليدية شيوعاً، إذ تُعدُّ إيجابية نتائج الاستتبات للرشاشية في وسط زرع عقيم الدليل المؤكد على الإصابة بالمرض، ولكن لا بدَّ من الانتظار مدة زمنية طويلة نسبياً (تراوح بين أسبوع - 3 أسابيع) لنمو المستنبتات، مما يجعل هذه الطريقة غير مفيدة في التشخيص المبكر، لحاجتها إلى زمن طويل قد يتفاقم خلاله المرض. كما أن استتبات العينات المأخوذة من المجاري التنفسية بشكل عام تتصف بانخفاض نسبة الحساسية إذ لا تتجاوز 50-70% تقريباً (Perfect *et al.*, 2001). بيّنت الدراسات أن انخفاض نسبة حساسية هذه الطريقة يمكن أن يعود إلى عدد من العوامل منها درجة تقدم الحالة المرضية، إذ تكون حساسية هذه الطرائق عادة منخفضة في بداية الإصابة وتزداد في المراحل المتقدمة منها، ويمكن أن يرجع ذلك للأعداد القليلة من أبواغ الفطر في بداية الإصابة التي لا يمكن لطرائق الاستتبات المعتمدة حالياً كشفها (Steinbach, 2008)، ومن ثمَّ فإن النتائج السلبية في الطريقة التقليدية لا يمكن أن تجزم سلامة المرضى من الإصابة (Perfect *et al.*, 2001). وهذا يتوافق مع نتائجنا، وقد بيّن استتبات القشع المخمخ بالأبواغ الفطرية بتركيز متدرجة من  $10^6$  - 10 بوغة/مل، بالطريقة التقليدية المتبعة حالياً في المخابر التشخيصية، عدم ظهور أي مستعمرات

فطرية على الأوساط بعد أسبوع من الحضن كما في الشكل (1)؛ مما يعني سلبية نتائج هذه المستنبتات، وتعود هذه النتائج السلبية لاختبار الاستنبتات إلى عدة عوامل منها:  
1- الحساسية المنخفضة لاختبار الاستنبتات التي تراوح بين 50 - 70 % وفق الدراسات المرجعية (Steinbach, 2008).

2- درجة الحرارة المستخدمة بحسب الطريقة التقليدية في حاضنات مخابر التشخيص هي بحدود 27 درجة مئوية، بينما تبين الدراسات المتعلقة بهذا الشأن، أن درجة الحرارة الفضلى لإنتاش الرشاشية تبلغ 37 درجة مئوية إذ يُعدُّ نوع *A.fumigatus* من الأنواع المحبة للحرارة (Araujo & Rodrigues, 2004; Steinbach, 2008)، فضلاً عن أن معظم الدراسات الحديثة على الرشاشية الدخاء تستخدم درجة 37 مئوية لاستنبتاتها (Araujo & Rodrigues, 2004; Bretagne, 2011; Hope et al., 2005; Pasqualotto, 2009; Vallor et al., 2008).

3- عمر الأبواغ وتركيزها في أوساط الاستنبتات، حيث تنخفض نسبة الانتاش بزيادة هذين العاملين، فقد بينت الدراسات أن التركيز الأمثل لأعلى نسبة إنتاش تجريبياً يبلغ  $5 \times 10^5$  بوغة/مل، وتزداد نسبة تثبيط الإنتاش عند التركيز  $10^6$  بوغة/مل (Araujo & Rodrigues, 2004; Steinbach, 2008).

4- حجم العينة، فقد استخدمنا عينة بحجم 200 ميكرو لتر للاستنبتات و 200 ميكرو لتر لتفاعل PCR، فكانت النتائج سلبية في الاستنبتات وإيجابية في PCR، مما يعني أن حساسية تفاعل PCR أعلى منها في الاستنبتات بكثير في كشف الأبواغ في العينات صغيرة الحجم (Araujo & Rodrigues, 2004).

5- مدة الاستنبتات: لوحظ في بعض الدراسات أن لمدة الاستنبتات دوراً في حساسية نتائج الاستنبتات، حيث تقرأ النتائج عادة، إيجابية كانت أم سلبية بعد مرور أسبوع واحد على الحضن، إلا أن بعض الدراسات البحثية أشارت إلى الحاجة لمدة زمنية أطول من ذلك، إذ في بعض الحالات احتاج ظهور المستعمرات الفطرية حضن المستنبتات مدة 4 أسابيع (Perfect et al., 2001).

وبذلك يصبح التشخيص المبكر باستخدام الاستنبتات غير مجد (Steinbach, 2008). وتبقى الطرائق المعتمدة على تقانات البيولوجيا الجزيئية الأنجع في التشخيص الدقيق لكثير من الأمراض البشرية.

يعدُّ الباحث Melchers من أوائل الذين استخدموا تقانة PCR ومؤسسات نوعية تتشافع مع الجين rRNA-18S للتحري عن DNA الرشاشية في عينات من سائل غسالة قصبية مأخوذة من مرضى مضعفين مناعياً، ومن ثمَّ تشخيص المرض لديهم (Melchers et al., 1994). ومنذ ذلك الوقت، والدراسات تهتمُّ بهذه التقانة للكشف عن الرشاشية الدخاء في

عينات مختلفة، تؤخذ من المرضى المهيئين للإصابة بداء الرشاشيات، سواء كانت غسالة قصبية، أم عينة من الدم المحيطي، أم خزعات نسيجية ترفع من الرئة (Bansod *et al.*, 2008; Skladny *et al.*, 1999; Yamakami *et al.*, 1996).

ما يزال نوع العينة الواجب استخدامها للوصول إلى تشخيص سليم ومبكر للمرض موضع جدل. فقد أشارت بعض البحوث إلى إمكانية التحري عن DNA الرشاشية الدخنة في الدم المحيطي للمصاب (Skladny *et al.*, 1999)، في حين بينت دراسات حديثة أن استخدام القشع كان أفضل بكثير (Bansod *et al.*, 2008). وهذا ما يتوافق مع النتائج التي توصلنا إليها في هذه الدراسة حيث كانت نتائج تقانة PCR إيجابية على DNA المستخلص من القشع مهما كانت كمية الأبواغ الفطرية فيه قليلة. وقد برهنا في هذا العمل على الحساسية المرتفعة لتقانة PCR في الكشف عن DNA الفطري إذ استطاعت أن تكشف أقل تراكيز الأبواغ المستخدمة 10 بوغوة/مل، وهذا ما يتوافق مع الدراسات المنشورة حديثاً (Bansod *et al.* 2008).

تعدّ تقانة Nested-PCR أكثر دقة من تقانة PCR لأنها تلغي النتائج الإيجابية الكاذبة؛ وذلك لاعتمادها على تفاعلين متتاليين من PCR يستعمل في التفاعل الثاني نواتج التفاعل الأول. الدقة العالية لهذه التقانة جعلها تستخدم بكثرة في تشخيص كثير من الأمراض ومنها داء الرشاشيات (Steinbach 2008).

ما تزال أغلب المراكز الصحية في سورية تعتمد على الطرائق التقليدية، على الرغم من مساوئها، في الكشف عن داء الرشاشيات لدى المرضى المضعفين مناعياً، في حين تظهر النتائج التي تم التوصل إليها في إطار هذه الدراسة الحساسية المرتفعة لتقانة PCR في كشف الرشاشية الدخنة، نقترح البدء باستخدام هذه التقانة في التحري عن الإصابات بداء الرشاشيات لدى المرضى المضعفين مناعياً.

## المراجع References

- Araujo R. & Rodrigues A. G. (2004). Variability Of Germinative Potential among Pathogenic Species of *Aspergillus*. *J. Clin Microbiol* 42, 4335-4337.
- Bansod S., Gupta I. & Rai M. (2008). Specific detection of *Aspergillus fumigatus* in sputum sample of pulmonary tuberculosis patients by two-step PCR. *African Journal of Biotechnology* 7, 16-21.
- Bodey G., Bueltmann B. & Duguid W., *et al.*. (1992). Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. *Eur. J. Clin Microbiol Infect Dis* 11, 99-109.
- Bretagne S. (2011). Primary diagnostic approaches of invasive aspergillosis-molecular testing. *Med Mycol.* 49, S48-S53.
- Buchheidt D., Baust C., Skladny H., Baldus M., Brauning S. & Hehlmann R. (2002). Clinical evaluation of a polymerase chain reaction assay to detect *Aspergillus* species in bronchoalveolar lavage samples of neutropenic patients. *Br. J. Haematol* 116, 803-811.
- Chakrabarti A. (2005). Microbiology of systemic fungal infections. *J. Postgrad Med.* 51 Suppl 1, S16-S20.
- Chazalet V. J. P. D. (1998). Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *J. Clin Microbiol.* 36, 1494-1500.
- Costa C., Costa J. M., Desterke C., Botterel F., Cordonnier C. & Bretagne S. (2002). 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* 40, 2224-2227.
- Denning D. W. (1998). Invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis* 26, 781-805.
- Denning D. W., Kibbler C. C. & Barnes R. A. (2003). British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infect Dis* 3, 230-240.
- Ellis M., Richardson M. & de Pauw B. (2000). Epidemiology. *Hosp Med* 61, 605-609.
- Girmentria C. N. M. M. (2001). Clinical significance of *Aspergillus* fungaemia in patients with haematological malignancies and invasive aspergillosis. *Br. J. Haematol* 114, 93-98.
- Groll A. H., Shah P. M., Mentzel C., Schneider M., Just-Nuebling G. & Huebner K. (1996). Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect* 33, 23-32.
- Hebart H., Loffler J. & Reitze H., *et al.*. (2000). 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* 111, 635-640.
- Hope W.W., Walsh T. J. & Denning D.W. (2005). Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* 5, 609-622.

- Hospenthal D. R. K. K. (1998). Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation. *Med. Mycol.* 36, 165-168.
- Hummel M., Baust C. & Kretschmar M., *et al.* (2004). 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* 53, 803-806.
- Latgé J. P. & Et A. (1997). Infectivity of *Aspergillus fumigatus*. In: *Host-Fungus Interplay* (ed H. E. A. Vanden Bossche) pp. 99-110. National Foundation for Infectious Diseases.
- Latgé J. (1999). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *CLIN. MICROBIOL. REV.* 12, 310-350.
- Latgé J. & Steinbach W. J. (2009). *Aspergillus fumigatus and aspergillosis*. ASM Press, Washington.
- Lin S. J., Schranz J. & Teutsch S. M. (2001). Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* 32, 358-366.
- Maertens J. J., K. V., Lagrou J. & Van Eldere A. M. B. (2001). Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood* 97, 1604-1610.
- Melchers W. J., Verweij P. E. & van den Hurk P., *et al.* (1994). General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol* 32, 1710-1717.
- Nolard N. (1994). Les liens entre les risques d'aspergillose et la contamination de l'environnement. *Pathol. Biol.* 43, 706-710.
- Pasqualotto A. (2009). Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Med Mycol.* 47 Suppl 1, S261-S270.
- Perfect J., Cox G., Lee J. & Et A. (2001). The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: A hospital-based survey of aspergillosis. *Clin Infect Dis* 33, 1824-1833.
- Pringle A., Baker D. M., Platt J. L., Wares J. P., Latge J. P. & Taylor J. W. (2005). Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* 59, 1886-1899.
- Robinson L. A. E. C. (1995). Pulmonary resection for invasive *Aspergillus* infections in immunocompromised patients. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 109, 1182-1196.
- Ruhnke M. & Maschmeyer G. (2002). Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer -- review of the literature. *Eur J Med Res* 7, 227-235.
- Skladny H., Buchheidt D. & Baust C., *et al.* (1999). Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. *J Clin Microbiol* 37, 3865-3871.
- Steinbach W. J. (2008). Clinical Aspects of the genus *Aspergillus*. In: *The Aspergilli Genomics, Medical Aspects, Biotechnology and Research Methods* eds G. H. Goldman & S. A. Osmani) pp. 551. CRC Press, New York.

- Vallor A. C., Kirkpatrick W. R., Najvar L. K., Bocanegra R., Kinney M. C., Fothergill A. W., Herrera M. L., Wickes B. L., Graybill J. R. & Patterson T. F. (2008). Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in pulmonary tissue of guinea pigs by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. *Antimicrob Agents Chemother.* 52, 2593-2598.
- Verweij P. E. A. D. (1997). Diagnostic and therapeutic strategies for invasive aspergillosis. *Respir. Crit. Care Med.* 203-215.
- Yamakami Y., Hashimoto A., Tokimatsu I. & Nasu M. (1996). PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol* 34, 2464-2468.