دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۳، صفحه ۳۹۰ – ۳۷۷ (مرداد و شهریور ۱۳۹۳)

ISMJ 2014; 17(3): 377-390

بهینه نمودن تشخیص مولکولی کریپتوکوکوس نئوفورمنس با استفاده از کنترل داخلی

محمدحسن شاه‌حسینی [۱*]، شکوفه بگلری [۲و۳]، منصور بیات [۴]، الهام مسلمی [۳و۵]، محمد قهری [۳و۶]

[۱] گروه میکروبیولوژی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی تهران

[۲] گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران

[۳] مؤسسه ایرانیان ژن فناور (IGF)، تهران

[۴] گروه علوم دامپزشکی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

[۵] گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی تهران

[۶] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین تهران

(دریافت مقاله: ۹۱/۱۰/۱۵- پذیرش مقاله: ۹۱/۱۲/۱۶)

چکیده

زمینه: نبود کنترل داخلی در پژوهش‌های انجام گرفته در زمینه PCRهای تشخیصی محدودیتی مهم محسوب می‌گردد. به‌کارگیری تکنیک‌های آزمایشگاهی حساس و اختصاصی همچون PCR در تشخیص کریپتوکوکوزیس، ضروری است. روش‌های متنوعی برای تشخیص این قارچ بیماری‌زا وجود دارد. به‌طورکلی روش‌های مبتنی بر کشت، تکنیک‌های وقت‌گیر با حساسیت پایین هستند و نیازمند امکانات و تجربه کافی برای تفسیر نتایج می‌باشند و همچنین روش‌های رنگ‌آمیزی نیزحساسیت لازم را ندارند. در نتیجه روش‌های مولکولی از جمله PCR، تکنیک‌های مناسب‌تری برای شناسایی هستند. هدف این مطالعه طراحی و ساخت کنترل داخلی تکثیری پلاسمیدی (IAC) جهت شناسایی ممانعت کننده‌ها در آزمایش PCR کریپتوکوکوس نئوفورمنس (C.neo) و کاربردهای آتی در لابراتوارهای روتین تشخیصی بوده است.

مواد و روش‌ها: در این بررسی برای ساخت کنترل داخلی، ابتدا پرایمرهای ویژه آزمایش PCR، بر مبنای هدف ژنی 16S rRNA جهت تشخیص مولکولی، بهینه و سپس حساسیت و ویژگی مشخص شد. پرایمرهای مرکب (Composite Primer) برای IAC-C.neo نیز طراحی، تکثیر و سپس کلون گردید. IAC-C.neo تکثیر شده در پلاسمید pTZ57R الحاق و در باکتری اشریشیا کلی JM107 ترانسفورم و کلون گردید. تعداد حداقل IC در هر واکنش PCR با رقیق‌سازی و همچنین طیف پاسخ PCR همراه با IC مورد بررسی قرار گرفت

یافته‌ها: اندازه محصول تشخیصی C.neo با پرایمرهای اختصاصی آن برابر با bp ۴۱۵ و محصول IAC-C.neo برابر با ۶۶۱ جفت باز بود، که از نظر اندازه، اختلاف مطلوب (۲۴۶ جفت باز) را با هم دارند. تعداد حداقل IC در هر واکنش ۱۰۰۰ عدد تعیین شد. حداقل و حداکثر حساسیت آزمایش PCR همراه با IC برای DNA کریپتوکوکوس نئوفورمنس بین ۳ میلیون تا ۱۰۰ عدد کریپتوکوکوس مشخص گردید. در آزمایش ویژگی با عوامل مختلف هیچ محصول ناخواسته‌ای مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: علیرغم سرعت و دقت بالای تکنیک PCR، یافته‌های منفی و مثبت کاذب که به‌دلایل مختلف رخ می‌دهند از مشکلات مهم این تکنیک جذاب می‌باشد که می‌توانند کارایی آن را کاهش دهند. استفاده از یک کنترل داخلی در تشخیص مولکولی کریپتوکوکوس نئوفورمنس، این خطاها را شناسایی می‌نماید.

واژگان کلیدی: کنترل داخلی تکثیری، کریپتوکوکوس نئوفورمنس، PCR

* تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، دپارتمان میکروبیولوژی،

Email :shahhosseiny@yahoo.com

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

مقدمه

پس از دهه نود یک افزایش انفجاری در شمار مقالات چاپ شده در زمینه تکنیک‌های تکثیر اسید نوکلئیک خصوصاً روش PCR در شناسایی عوامل بیماری‌زا مانند کریپتوکوکوس نئوفورمنس رخ داده است. با این وجود، متغیرهایی مانند نوع آزمایشگاه، دستگاه‌های مورد استفاده، نوع و بازده DNA پلیمراز مورد استفاده، پرسنل و سطح آموزش و مهارت‌ها، حضور ممانعت‌کننده‌ها، هدف‌های ژنی متفاوت در عامل مورد شناسایی، سطح اپتیماسیون با توجه به مهارت‌ها در آزمایشگاه‌ها، روش‌های PCR خانگی (in house PCR) و پارامترهای دیگر، سبب شده در برخی موارد جواب‌های صحیح و قابل تکرار گزارش نشده است و فقط برخی از پروتکل‌های چاپ شده در مقالات به‌طور عملی در آزمایشگاه یا آزمایشگاه‌های دیگر تکرار شده است (۷-۱).

کریپتوکوکوس نئوفورمنس مخمری است که در افراد سالم با استنشاق گرد و غبار آلوده به کونیدی‌های زنده قارچ، ایجاد بیماری می‌نماید، اما بیشتر بیماران را افراد سرکوب شده ایمنی تشکیل می‌دهد. عفونت از راه استنشاق کسب می‌شود. بیشتر موارد بیماری بدون علامت بوده و شایع‌ترین تظاهر بالینی عفونت، منتژیت است، احتمال بروز عفونت منتشر نیز وجود دارد.

با افزایش رو به رشد بیماری‌های نقص ایمنی، این قارچ از اهمیت ویژه‌ای برخوردار گشته است. به نوعی که بیماری کریپتوکوکوزیس چهارمین عامل مرگ ومیر در بیماران مبتلا به ایدز گزارش شده است و البته همزمان با حمله جهانی کریپتوکوکوزیس آمار رخداد این بیماری نیز چند برابر افزایش یافته است (۸).

این مخمر بر اساس ویژگی‌های قارچ‌شناسی، بیوشیمیایی، اکولوژی و اپیدمیولوژی به ۲ واریته (variety) نئوفورمنس و گاتی طبقه‌بندی می‌شود. همچنین براساس آنتی‌ژن‌های کپسولی به ۵ سروتیپ A، B، C، D، AD تقسیم می‌شود. واریته نئوفورمنس سروتیپ‌های A، D، AD و واریته گاتی سروتیپ‌های B، C را تشکیل می‌دهند. اخیراً سروتیپ‌های A و D بر اساس اختلافات ژنتیکی، به‌عنوان دو واریته جدا از هم مطرح شده‌اند، به گونه‌ای که کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته نئوفورمنس به‌عنوان سروتیپ D و کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گروبی به‌عنوان سروتیپ A در نظر گرفته می‌شود (۸).

هر چند در این حالت وضعیت سروتیپ AD نامعلوم است. مرحله جنسی قارچ بنام فیلوبازیدیلا نئوفورمنس شناخته می‌شود. دو واریته نئوفورمنس از نظر پراکندگی جغرافیایی و زیستگاه طبیعی اختلافاتی با یکدیگر دارند. کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گاتی (سروتیپ‌های B و C) از بقایای پوسیده درختان اکالیپتوس جداسازی شده است. انتشار عفونت انسانی واریته گاتی با پراکندگی درختان اکالیپتوس مطابقت دارد. کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته نئوفورمنس (سروتیپ‌های A و D) غالباً از خاک آلوده به فضولات کبوتر و سایر پرندگان، جداسازی می‌شود.

ارگانیسم از فضولات خشک پرندگان که در ساختمان‌ها انباشته شده قابل جداسازی است، ولی در فضولات تازه پرندگان یافت نمی‌شود. سروتیپ‌های یاد شده از لحاظ پراکندگی جغرافیایی اختلافاتی با یکدیگر دارند، به‌طوری‌که سروتیپ A انتشار جهانی دارد در حالی‌که سروتیپ D در مناطق جغرافیایی خاصی از جمله شمال اروپا شایع‌تر است (۱۳-۹).

درمان صحیح و سریع کریپتوکوکوزیس، به ویژه منتژیت کریپتوکوکوسی، برای بیمار حیاتی است. تشخیص صحیح و به‌موقع عامل بیماری، مهم‌ترین فاکتور برای

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

تجویز داروی مناسب و به‌موقع به بیمار می‌باشد. از آنجا که منتژیت کریپتوکوکوسی (نوروکریپتوکوکوزیس) بسیار کشنده بوده و معمولاً در افراد دچار نقص ایمنی بروز می‌کند، برای تشخیص و درمان این بیماری فرصت بسیار کمی در دست می‌باشد که حتی اندکی کوتاهی یا خطا در تشخیص آن یا در تجویز دارو، باعث مرگ بیمار خواهد شد. روش‌های رایجی که به‌صورت کاربردی برای تشخیص این عامل استفاده می‌شوند شامل رنگ‌آمیزی Indian ink، کشت و روش‌های سرولوژیک و مولکولی (PCR base) می‌باشند. توضیح اینکه، به‌دلیل خطای بالا و غیرحساس بودن روش رنگ‌آمیزی، نمی‌توان به‌عنوان روشی مطمئن به آن تکیه کرد. همچنین روش‌های مبتنی بر کشت هم وقت‌گیر بوده و هم هنگامی که سلول‌های مخمری در نمونه بالینی به‌دلایل مختلف از جمله کوتاهی در انتقال نمونه به آزمایشگاه مرده باشند، منفی می‌شوند (۸).

روش‌های سرولوژیک از دو روش پیشین حساس‌تر است. اما یافته‌های مثبت کاذب و منفی کاذبی که در نتایج حاصل از آن‌ها به‌دست می‌آید، امر تشخیص را دچار مشکل می‌کند. علاوه‌بر این، در هر سه روش یاد شده نیاز به مهارت بالا برای تفسیر نتایج می‌باشد که این مسئله خود احتمال تشخیص اشتباه را افزایش می‌دهد (۸).

از این‌رو هیچ‌کدام از این روش‌های سنتی، حساسیت، اویژگی و سرعت قابل قبولی را ندارند و نمی‌توان از آن‌ها به‌عنوان روشی مطمئن، سریع و دقیق در تشخیص چنین بیماری کشنده‌ای که نیاز به درمان صحیح و فوری دارد استفاده کرد. روش مولکولی مورد استفاده در سال‌های اخیر جهت تشخیص، PCR است که روشی سریع، حساس ودارای مزایای بسیاری است اما دارای محدودیت‌هایی نیز مانند استاندارد نبودن بسیاری از آزمایش‌های اپتیمایز (optimize) شده PCR در آزمایشگاه های مختلف مورد اکاربرد، می‌باشد (۱۶-۱۴).

پژوهش‌های بسیاری در زمینه تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمنس صورت گرفته است که در برخی از آن‌ها به مقایسه چند روش تشخیصی پرداخته شده است. به‌عنوان مثال توسط راپلی (Rappelli) و همکاران سه روش کشت، سرولوژی و PCR با هم مقایسه گردید. طبق نتایج حاصل از مطالعه راپلی و همکاران، در تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمنس حساسیت روش‌های کشت ۶۷ درصد، سرولوژی ۸۹ درصد و PCR ۹۸ درصد به‌دست آمد (۱۷).

هدف‌های ژنی متفاوتی جهت شناسایی کریپتوکوکوس استفاده شده است، اما عمده‌ترین این تارگت‌های ژنی عبارتند از: بخش‌های مشترک ژن 16S rRNA (۱۸)، ژن کپسول (۱۹) و یا هدف‌های دیگر مانند ژن آنزیم فسفولیپاز (۲۰). میزان حساسیت و دقت PCR در شناسایی برخی قطعات خاص ژنوم کریپتوکوکوس نئوفورمنس تا حد زیادی به‌روش استخراج DNA، ژن هدف، پرایمرهای طراحی شده و روش شناسایی محصول بستگی دارد که در تحقیقات مختلف متفاوت است. با این وجود، بخش‌های به‌شدت ثابت موجود در توالی ژن rRNA کریپتوکوکوس نئوفورمنس آن را از نظر طراحی پرایمر مخصوص گونه، جذاب نموده است (۲۶-۲۱).

از مهم‌ترین محدودیت های بیشتر بررسی های انجام شده در زمینه تشخیص PCR این مخمر فرصت طلب تا کنون، نداشتن کنترل داخلی است. برخلاف کنترل مثبت، کنترل داخلی عموماً یک سکانس DNA غیر هدف حاضر در نمونه است که به‌طور همزمان با سکانس هدف آمپلیفیه (تکثیر) می‌گردد. در یک PCR بدون کنترل داخلی، یک پاسخ منفی یعنی اینکه سکانس هدف

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

حضور ندارد. اما، آن می‌تواند در عین حال به معنای این باشد که واکنش به‌دلایلی مانند اختلال در دستگاه ترموسایکلر، مخلوط PCR غلط، فعالیت آنزیم DNA پلیمراز و یا حداقل حضور مواد بازدارنده در ماتریکس نمونه، ممانعت شده است. به‌طور بر عکس، در یک PCR با IAC، یک سیگنال کنترل همیشه تولید می‌گردد که تکثیر کنترل داخلی می‌باشد. این کنترل داخلی حتی در نبود سکانس هدف مورد ازمایش تکثیر می‌گردد و اگر تکثیر نشود یعنی اشکالی در تکثیر (به دلایل متفاوت) وجود دارد (۱، ۵ و ۷).

هدف بررسی کنونی، طراحی و ساخت کنترل داخلی تکثیری آزمایش PCR تشخیصی کریپتوکوکوس نئوفورمنس به‌روش رقابتی و با PCR-Cloning و همین‌طور تعیین کمینه و بیشینه حساسیت آزمایش بوده است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش بین سال‌های ۱۳۹۰ الی ۱۳۹۱ انجام شده است.

تهیه سوش استاندارد کریپتوکوکوس نئوفورمس

سوش استاندارد از مرکز مجموعه قارچ و باکتری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌صورت لیوفلیزه (ATCC number :۱۳۶۹۰) و دو سویه از آزمایشگاه رسالت تهران دریافت گردید. پس از انتقال آن به آزمایشگاه از کیت کرایوتیوب شرکت کوشا فراور گیتی (KFG) جهت تهیه سوش مادر و سوش کاری و ایجاد بانک استفاده گردید. از سوش لیوفلیزه سه ویال انجماد مادر تهیه و در سه مکان مختلف در ۲۰- درجه نگهداری شد. جهت جلوگیری از ذوب شدن و انجماد مکرر سوش مادر از بیدهای کوچکی در ویال‌های انجماد استفاده شده بود که به‌منظور تهیه سوش کاری هر بار تنها یکی از بیدها از ویال خارج و احیا می‌شد، بدین‌منظور از محیط کشت yeast malt agar (ساخت Merck) داخل لوله پس از افزودن کلرامفنیکل (سیگما) به‌میزان ۴۰۰ (میلی‌گرم در لیتر) به‌طور اسلنت تهیه و پس از غلتاندن بید و تلقیح کریپتوکوکوس نئوفورمنس روی سطح شیبدار، روی آن با محیط کشت سابورو دکستروز براث پوشانده (Merck) شد، لوله‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت الی یک هفته در دمای ۳۷-۳۴ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد و ایجاد کلونی روی سطح شیبدار و کدورت در بخش مایع نشانه رشد مناسب بود.

کشت سوش استاندارد و رنگ‌آمیزی

جهت اطمینان از کشت سوش کاری، یک مرحله کشت ایزولاسیون خطی نیز انجام گردید. برای این‌منظور از محیط کشت Niger seed agar داخل پلیت، کشت ایزوله تهیه شد. پس از ۷۲ ساعت کلونی‌ها همه به رنگ قهوه‌ای روشن بودند که نشان دهنده خالص بودن و عدم آلودگی کشت کریپتوکوکوس نئوفورمنس بود. برای تهیه این محیط مرکب، ابتدا ۵۰ میلی‌لیتر از مکمل که به‌صورت دانه‌ای می‌باشد را وزن کرده و توسط مخلوط‌کن برقی به‌صورت پودر درآمد. سپس ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به آن اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه جوشانده شد. سپس تا دمای اتاق سرد شدو از کاغذ صافی عبور داده شد. آنگاه حجم با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و به آن ۱۸ گرم از محیط پایه که حاوی آگار است اضافه گردید و سپس اُتوکلاو شد. پس از اتمام اُتوکلاو، حدوداً تا دمای ۴۸ خنک گردید. ۴۰۰ میلی‌گرم در یک لیتر از محیط آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به‌منظور ممانعت از رشد باکتری‌ها، به محیط اضافه گردید و به آرامی هم زده شد. در آخرین مرحله، محیط را در پلیت پخش نمودیم. نمونه‌ها تا حدود یک هفته در ۳۷ درجه انکوبه گردید. معمولاً کلنی‌های کریپتوکوکوس نئوفورمنس در عرض سه روز

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

نمایان می‌شوند. رنگ‌آمیزی منفی با استفاده از رقت مناسبی از رنگ نگروزین یا مرکب سیاه Indian ink و همین‌طور به‌صورت وت مانت با لام ولامل انجام شد.

استخراج DNA از کریپتوکوکوس نئوفورمنس

برای استخراج DNA از کشت، از کیت استخراج DNA تولید شرکت سیناکلون بنام DNG-Kit (سیناکلون) استفاده شد. مراحل کاری به‌طور خلاصه عبارت بود از: قرار دادن محلول DNG Plus در ۳۷ درجه و آرام تکان دادن آن، تا به‌صورت یک محلول هم دما و یکنواخت درآید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون را با ۴۰۰ میکرولیتر محلول DNG Plus مخلوط نموده و به‌مدت ۲۰–۱۵ ثانیه ورتکس گردید.

نمونه در این مرحله باید به‌طور کامل به‌صورت سوسپانسیون درآید و هر گونه تجمع و یا توده‌ای، تخریب شده و از بین رود. سپس ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول (مرک) را اضافه کرده، ۱۰ مرتبه وارونه نموده و متعاقب آن، لوله‌ها را در فریزر به‌مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و پس در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۰دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی به آرامی خالی شد و تیوب به‌طور واژگون بر روی دستمال کاغذی قرار داده شد. ۱ میلی‌لیتر اتانول سرد ۷۵ درصد را به رسوب اضافه گردید و به‌مدت ۵–۳ ثانیه ورتکس و سپس در دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. اتانول کاملاً خالی شد و رسوب را در ۶۵ درجه خشک کرده، رسوب که محتوی DNA است در ۵۰ µl میکرولیتر آب همراه با تکان دادن آرام و قرار دادن در ۶۵ درجه خوب حل گردید. از استرپتوکوکوس پنومونیه، کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کروزئی، کاندیدا کفیر و همچنین سلول‌های انسانی نیز به‌همین ترتیب DNA استخراج و در بررسی‌های ویژگی آزمایش PCR، مورد استفاده قرار گرفتند.

پرایمرها و شرایط PCR

بهینه نمودن آزمایش PCR برای تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمنس، با بهینه نمودن غلظت اجزایی که در واکنش PCR به‌کار می‌روند و همچنین طراحی و انتخاب برنامه حرارتی مناسب در دستگاه ترموسایکلر (Major Cycler) انجام گردید.

پرایمرهای مورد استفاده در این بررسی، پرایمرهای مخصوص ژن ۱۶ S rRNA کریپتوکوکوس نئوفورمنس است که از مطالعات انجام گرفته توسط لویتز (Lewitz) در سال ۱۹۹۱ و کون–چانگ (Kwon-Chung) در سال ۱۹۹۲ به‌دست آمده‌اند، که توالی آن‌ها در جدول ۱ آمده است (۲۷ و ۲۸).

برای انجام واکنش PCR با استفاده از لوله‌های ۲۰۰ میکرولیتری و با حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر به‌ترتیب زیر عمل گردید: ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده با استفاده از پرایمرهای جلویی و عقبی مخصوص ژن ۱۶S rRNA با غلظت نهایی ۰/۴ میلی‌مول (یک میکرولیتر از غلظت ده میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر از ۱۰X PCR Buffer سینا کلون، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (MgCl۲) سیناکلون (از غلظت ۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰میلی‌مولار) فرمتاس و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (بیوفلوکس)، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تکثیر یافت. چرخه‌های حرارتی شامل یک سیکل ۶ دقیقه‌ای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ سیکل متوالی (شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه) و یک سیکل پلیمریزاسیون نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه بود. پس از به پایان رسیدن سیکل‌های حرارتی، برای مشاهده DNA تکثیر شده از تکنیک الکتروفورز استفاده شد. محصول PCR (۴۱۵ جفت‌باز) در کنار سایز مارکر و کنترل مثبت و منفی،

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد و با استفاده از سایبرگرین و نور UV بر روی دستگاه ژل داکومنتیشن، بررسی گردید.

حساسیت و ویژگی

جهت بررسی حساسیت جفت پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه، رقت‌هایی از سوسپانسیون کریپتوکوکوس نئوفورمنس با واحد کلنی‌ساز مشخص (CFU)، تهیه شد و استخراج DNA از این رقت‌ها به‌روش DNG-Plus (سیناکلون) انجام و سپس آزمون PCR بر روی رقت‌های تهیه شده انجام گرفت. آزمون ویژگی هم با استفاده از سوش‌های کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا کروزئی، کاندیدا کفیر، استرپتوکوکوس پنومونیه و همچنین سلول‌های انسانی، مورد آزمایش و ارزیابی قرار گرفتند.

ساخت کنترل داخلی (IC)

جهت ساخت کنترل داخلی رقابتی به‌روش PCR-Cloning، پرایمرهای جلویی و عقبی PCR کریپتوکوکوس را در بخش '۵ پرایمرهای ژن کپسولپلاست لیشمانیا (۲۹ و ۳۰) با اندازه محصول ۶۲۰ جفت باز، به‌صورت دم (Tail) طراحی و سنتز گردید (جدول ۱).

جدول ۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص DNA کریپتوکوکوس نئوفورمنس و تکثیر کنترل داخلی.

نام پرایمر	ترادف پرایمر (´3 ´5)
ITS1	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'
CN4	5' ATCACCTTCCCACTAACACATT3'
Forward-IC	5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - TCg CAg AAC gCC CCT ACC 3'
Reverse-IC	5' ATC ACC TTC CCA CTA ACA CAT T - AGG GGT TGG TGT AAA ATA GGC 3'

برای انجام واکنش PCR جهت تکثیر قطعه کنترل داخلی، ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده لیشمانیا با استفاده از پرایمرهای جلویی و عقبی IC با غلظت نهایی ۰/۴ میکرومول، ۲/۵ میکرولیتر از ۱۰X PCR Buffer (سیناکلون)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (MgCl۲) (از غلظت ۵۰ میلی‌مولار و ساخت سینا کلون)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مولار و ساخت فرمنتاس) و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (بیوفلاکس)، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تکثیر یافت. چرخه‌های حرارتی شامل، ۳۵ سیکل متوالی (شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه) و یک سیکل پلیمریزاسیون نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۵ دقیقه بود. پس از به پایان رسیدن سیکل‌های حرارتی، برای مشاهده DNA تکثیر شده از تکنیک الکتروفورز استفاده شد. قطعه حاصل با پلاسمید pTZ57R کمپانی فرمنتاس به‌مدت ۱ ساعت در ۲۲ درجه سانتی‌گراد لایگیت و سپس در باکتری اشریشیاکلی JM107 ترانسفورم و کانستراکت حاصل با Blue/White Screening در محیط حاوی آمپی‌سیلین (سیگما)، X-GAL و IPTG (فرمنتاس) انتخاب گردید. کلون‌های مناسب از طریق استخراج پلاسمید با کیت استخراج پلاسمید و آزمایش PCR، تائید گردیدند.

کلونینگ محصول PCR و کنترل داخلی

پس از خالص سازی محصول PCR و IC، با استفاده از کیت T/A cloning کمپانی Thermo scientific هر دو آمپلیکون در وکتور pTZ57/R کلون گردید.

پلاسمیدهای حاوی آمپلیکون حاصل با GeneJET Plasmid Miniprep Kit (K۰۵۰۲) کمپانی Thermo Scentific استخراج گردید. سپس با روش PCR، پلاسمیدهای حاوی محصول PCR و IC با استفاده از پرایمرهای تشخیصی تائید گردید.

تعیین غلظت ایده‌آل IC

هدف از تعریف غلظت DNA ایده‌آل IC برای PCR،

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

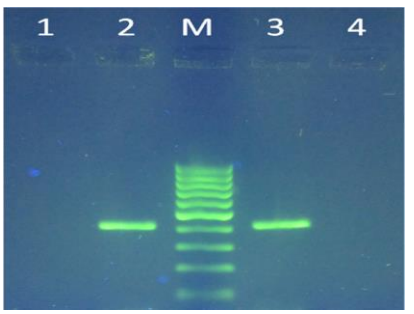
تأئید غلظت اپتیمال IC است که با تارگت، کمترین رقابت در تکثیر را انجام دهد جهت به‌دست آوردن غلظت اپتیمم، غلظت‌های متفاوت پلاسمید حاوی IC و DNAی کریپتوکوکوس نئوفورمنس استاندارد مورد آزمایش واقع گردید. غلظت DNA کریپتوکوکوس نئوفورمنس مورد استفاده در آزمایش و همچنین IC به‌وسیله اسپکتروفتومتر در A260 تعیین شد. رقت‌های حاوی ۱۰۰ پیکوگرم- ۱۰ پیکوگرم- ۱ پیکوگرم- ۱۰۰ فوکوگرم- ۱۰، ۵ و ۱ فوکوگرم به لوله‌های حاوی DNAی کریپتوکوکوس استاندارد، اضافه و آزمایش گردید. برای PCR، ۵ میکرولیتر از DNAی کریپتوکوکوس با ۱ میکرولیتر از IC مخلوط و در میکس PCR استفاده گردید.

توالی‌یابی

تعیین توالی DNA در دو جهت با استفاده از روش ختم زنجیره (Dideoxy Chain Termination) و به‌وسیله محصول کمپانی ماکروژن کره انجام گردید.

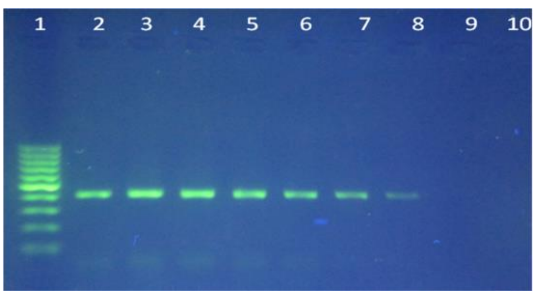
یافته‌ها

آزمایشPCR بر روی DNA استخراج شده از سوش کریپتوکوکوس نئوفورمنس (کشت داده شده بر روی محیط کشت)، اپتیمایز گردید (شکل ۱). ترادف محصول تکثیر شده از طریق روش ختم زنجیره تأئید گردید.



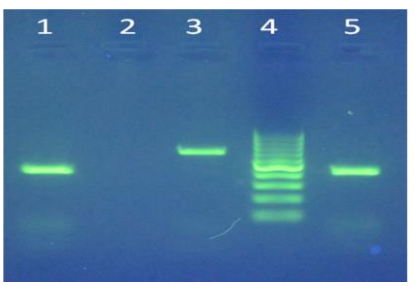
شکل ۱) آزمایش اپتیمایز شدهPCR بر روی سوش استانداردکریپتوکوکوس نئوفورمنس. لاین M: سایز مارکر (100 bp DNA Ladder Thermo scientific)، لاین ۱ و ۴: آزمایش PCR منفی، لاین ۲ و ۳: آزمایش PCR مثبت با محصول ۴۱۵ bp

در آزمون ویژگی، هیچ محصول نا خواسته‌ای با DNA گونه‌های مختلف سوش‌های کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا کروزئی، کاندیدا کفیر، استرپتوکوکوس پنومونیه و همین‌طور DNA انسان دیده نشد. با تهیه رقت‌های سری ازکشت این مخمر، و انجام استخراج DNA و آزمایش PCR، حد تشخیص (حساسیت) در حد ۱۰ کپی در نمونه‌ی مورد آزمایش به‌دست آمد (شکل ۲).



شکل ۲) آزمایش حساسیت PCR با استفاده از نمونه‌های حاوی تعداد DNAی مشخص کریپتوکوکوس نئوفورمنس (CFU مشخص). لاین ۱: سایز مارکر (100bp DNA Ladder Thermo scientific)، لاین ۲: نمونه کنترل مثبت، لاین‌های ۹-۳: حاوی نمونه‌های مشخص و به‌ترتیب شامل۳: (۱۰۰۰۰۰۰CFU)، ۴: (۱۰۰۰۰۰CFU)، ۵: (۱۰۰۰۰CFU)، ۶: (۱۰۰۰CFU)، ۷: (۱۰۰CFU) ، ۸:(۱۰CFU)،۹:(۱CFU)، ۱۰: نمونه کنترل منفی.

قطعه کنترل داخلی بعد از آمپلیفیکاسیون، کلون و توسط روش PCR تأئید گردید. در شکل ۳ محصول تکثیر شده کنترل داخلی با اندازه ۶۶۱ bp در کنار سایز مارکر ۱۰۰bp DNA Ladder و همچنین آمپلیکون ۴۱۵ جفت بازی، مشاهده می‌گردد.



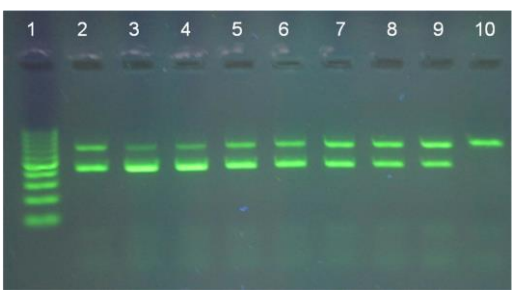
شکل ۳) کنترل داخلی کلون و تکثیر شده توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز. لاین ۱ و ۵: آزمایش تشخیصی با محصول ۴۱۵ bp بر روی سوش استانداردکریپتوکوکوس نئوفورمنس. لاین ۲: کنترل منفی. لاین ۳: کنترل داخلی تکثیر شده لاین ۴: سایز مارکر (100 bp DNA Ladder Thermo scientific)

در شکل ۴ نتایج PCR کنترل داخلی و آزمایش آن با

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

مقادیر متفاوت DNAی کریپتوکوکوس نئوفورمنس از ۱۰۰ عدد تا ۳ میلیون عدد قارچ مشاهده می‌شود.

غلظت ایده‌ال IC جهت آزمایش PCR، مقدار 5fg در هر واکنش به‌دست آمد. این غلظت برای آزمایش با نمونه‌های مرضی استفاده گردید.



شکل ۴) الکتروفورز نتایج PCR با تعداد مشخص DNA کریپتوکوکوس نئوفورمنس
۱. سایز مارکر (Thermo Scientific) ۱۰۰bp DNA Ladder. ۲: کنترل مثبت (حاوی کنترل داخلی و DNA کریپتوکوکوس). ۳:DNA تعداد ۳ میلیون از عامل. ۴: تعداد ۲ میلیون. ۵: تعداد یک میلیون. ۶: تعداد صد هزار. ۷: تعداد ده هزار. ۸: تعداد هزار. ۹: تعداد صد عدد. ۱۰: کنترل منفی (حاوی صرفا کنترل داخلی)

بحث

بیماری کریپتوکوکوزیس در چند سال اخیر به مسئله ای مهم تبدیل شده است و اکنون به‌عنوان عفونت قارچی سال‌های آینده فرض می‌شود. کریپتوکوکوس نئوفورمنس مخمری کپسول‌دار و فرصت‌طلب بوده و دارای ۳ واریته، ۵ سروتیپ و ۸ تیپ مولکولی است.

از آنجا که منتژیت کریپتوکوکوسی بیماری بسیار کشنده است و نیاز به درمان فوری و صحیح دارد، جداسازی کریپتوکوکوس نئوفورمنس از مایع مغزی نخاعی حائز اهمیت است.بنابراین تشخیص به‌موقع این مخمر در افراد مبتلا به نوروکریپتوکوکوزیس نقش مهمی در کاهش میزان مرگ ومیر ناشی از این بیماری دارد. جهت تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمنس تاکنون روش‌های مختلفی ارائه شده است که هر کدام مزایا و معایبی داشته‌اند (۸ و ۹).

روش‌های سنتی مبتنی بر کشت گرچه در مواردی هنوز به‌عنوان استاندارد طلایی مطرح است ولی عموماً ویژگی‌های یک روش مطلوب در شناسایی سریع میکروارگانیسم‌ها و از جمله کریپتوکوکوس نئوفورمنس را ندارند. این مسئله که در روش‌های کشت و رنگ‌آمیزی نتایج منفی کاذب رخ می‌دهد هم به‌دلیل حساسیت کم این آزمایش‌ها، و گاهی نیز ممکن است به‌دلیل دیر رسیدن نمونه به آزمایشگاه باشد که در این حالت ممکن است سلول‌های کریپتوکوکوس نئوفورمنس از بین رفته باشند. در روش‌های کشت و رنگ‌آمیزی نیاز به سلول‌های زنده است، و اگر سلول‌ها به‌دلایل مختلفی از جمله کوتاهی در انتقال نمونه به آزمایشگاه مرده باشند، منفی کاذب رخ می‌دهد. اما در واکنش PCR، چون تنها به ژنوم عامل مورد نظر نیاز است، حتی در صورت وجود سلول‌های مرده، نتیجه آزمایش مثبت خواهد شد (۱۶-۱۸).

این مسئله، حساسیت آزمایش PCR را تا حد زیادی افزایش داده است و دلیلی دیگر برای مناسب بودن این روش به‌عنوان یک روش تشخیص بالینی مطمئن است (۱۴ و ۱۷). از آنجا که منتژیت کریپتوکوکوسی بیماری بسیار کشنده است و نیاز به درمان فوری و صحیح دارد، جداسازی کریپتوکوکوس نئوفورمنس از مایع مغزی نخاعی رادا اهمیت است.بنابراین تشخیص به‌موقع این مخمر در افراد مبتلا به نوروکریپتوکوکوزیس نقش مهمی در کاهش میزان مرگ ومیر ناشی از این بیماری دارد. پایین بودن میزان جداسازی کریپتوکوکوس نئوفورمنس در ایران در مقایسه با کشورهای دیگر، بیانگر پایین بودن میزان شیوع عفونت‌های ناشی از این مخمر نمی‌باشد، بلکه این اختلاف مربوط به اختلاف روش‌های شناسایی می‌باشد و تحقیقات نشان داده که هر قدر روش‌های شناسایی دقیق‌تر و حساس‌تر باشند، نسبت بالاتری از کریپتوکوکوس نئوفورمنس شناسایی می‌گردد (۱۶-۱۸).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

ولگراکی (Velegraki) و همکاران در سال ۲۰۰۱ میلادی پیشنهاد نمودند تکنیک PCR طراحی شده برای ژن ura۵ و به‌دنبال آن انجام تکنیکRFLP، استراتژی مناسبی جهت شناسایی سریع ۵ سروتیپ کریپتوکوکوس باشد (۳۱).

بررسی‌هایی که در آن‌ها به مقایسه روش‌های سرولوژیکی با روش‌های مولکولی همچون PCR برای تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمنس پرداخته‌اند، این امر که روش‌های مولکولی همچون PCR دارای حساسیت و ویژگی بیشتری است بهروشنی نشان داده شده است (۳۲).

از آنجایی‌که خطر آلودگی تحت شرایط آزمایشگاهی معمول، اجتناب‌ناپذیر است، تلاش‌ها باید در جهت کاهش خطرهایی که هنگام پروسه‌های تکثیر ممکن است رخ دهد، باشد. اساسی‌ترین قدم در تثبیت پروتکل‌ها جهت تکثیر DNAهای وسیع‌الطیف، حذف آلودگی‌ها است. آلودگی می‌تواند از هر منبعی مانند نمونه‌ها، اعمال آزمایشگاهی و سایر شرایط ایجاد گردد (۳۳).

کنترل‌ها یک الزام بسیار مهم در آزمایش‌های PCR به حساب می‌آید، به‌ویژه کنترل منفی (که حاوی ساده‌ترین عنصر یعنی آب می‌باشد) اگر کنترل منفی، در هر مرحله مثبت گردد، به‌معنی آلودگی است و کل آزمایش باید تکرار شود. اگر این مسئله تکرار شود نشان‌دهنده آلودگی عمومی در آزمایشگاه است. در این صورت تمام واکنش‌گرها باید تعویض شوند و دستگاه‌ها و اتاق‌ها باید کاملاً تمیز شوند انجام این عمل، کاری ملال‌آور است زیرا برای رهایی از اسید نوکلئیک باید از مواد شیمیایی قوی مثل هیدروکلریک اسید یا سفید کننده استفاده شود (۳۳).

چندین احتمال نیز برای پدید آمدن جواب منفی کاذب در روش PCR وجود دارد از جمله خطاهای انسانی، مشکلات فنی، غلظت کم DNA هدف در یک نمونه‌ی انسانی که در این بین خطاهای انسانی اجتناب ناپذیرند.

مشکل اساسی روش‌های PCR شناخته شده حتی آن‌هایی که امروزه استفاده می‌شود، نداشتن یک کنترل داخلی است. برخلاف کنترل مثبت خارجی، کنترل داخلی یک توالی از سکانس هدف از DNA موجود در لوله است که همزمان با توالی هدف تکثیر می‌شود. در یک PCR بدون کنترل داخلی، پاسخی منفی (بدون باند یا سیگنال) می‌تواند به معنای نبود توالی هدف در واکنش باشد، اما همچنین ممکن است به معنی باز داشته شدن واکنش، ناشی از عملکرد نا صحیح ترموسایکلر، میکس نا صحیح PCR، فعالیت ضعیف DNA پلیمراز و یا حضور مواد باز دارنده در نمونه باشد. در یک PCR که دارای کنترل داخلی است، همیشه یک signal control، حتی هنگامی که توالی هدف وجود ندارد تولید می‌شود، این امر می‌تواند عدم موفقیت PCR را نمایان کند (۳۴).

با به‌کارگیری کنترل داخلی در آزمایش‌های PCR نتیجه آزمایش را به این صورت تفسیر می‌شود: نمونه‌هایی که دارای سیگنال هدف هستند، بدون توجه به نتیجه کنترل داخلی، مثبت تفسیر می‌شود. نمونه‌هایی که فاقد سیگنال هدف هستند، منفی تلقی شده، هر چند سیگنال کنترل داخلی آن‌ها قابل ردیابی نباشد. نمونه‌هایی که برای هر دو سیگنال هدف و کنترل داخلی منفی هستند به‌عنوان نمونه‌های مخدوش (مهار شده) تفسیر می‌شوند (۳۵).

دو استراتژی کلی برای ساخت IC وجود دارد:

۱- ساخت کنترل داخلی رقابتی (Competition IAC)

۲- ساخت کنترل داخلی غیر رقابتی (IAC Non-competition) با استفاده از تکنیک پرایمر مرکب، هدف و کنترل داخلی با یک جفت پرایمر، در همان شرایط (شرایط یکسان) و در همان لوله (در یک لوله) تکثیر می‌شوند.

در این استراتژی، همیشه رقابت بین DNA هدف و کنترل داخلی وجود دارد، بنابراین میزان کنترل داخلی

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

جهت حد شناسایی (Detection limit) یک نکته حساس و مهم می‌باشد. باید توجه داشت که میزان تکثیر دو قطعه DNAهای متفاوت به‌وسیله یک جفت پرایمر می‌تواند منتج به ممانعت یا تشدید تکثیر یکی از دو محصول گردد. این امر به ۱) میزان مولار (Molar Ration) ۲) طول محصولات تکثیری ۳) ترادف و ساختار ثانویه قطعات DNA و پارامترهای دیگر وابسته است (۱).

رقابت کنترل داخلی می‌تواند موجب کاهش تکثیر و کم شدن بازده محصول PCR و پیرو آن کاهش حد شناسایی گردد. بنابراین، یکی از مهم‌ترین پارامترهایی که بایستی در نظر گرفته شود، غلظت کنترل داخلی در یک آزمایش PCR است چرا که زیادی DNAی کنترل داخلی در یک آزمایش PCR موجب رقابت آن با DNAی هدف و کاهش محصول هدف می‌گردد و این خود می‌تواند موجب نتایج منفی کاذب گردد. در این مطالعه به‌طور هوشمندانه حد شناسایی تعیین گردید. به‌علاوه، اگر غلظت بالای کنترل داخلی انتخاب گردد عوامل ممانعت کننده در آزمایش که موجب نتایج منفی کاذب می‌شوند به ویژه در زمانی که غلظت DNAی هدف کم است مورد شناسایی واقع نمی‌گردند. دومین پارامتر مهم، اندازه کنترل داخلی است. افزایش سایز یک هدف نسبت به دیگری در تئوری، موجب تمایل واکنش به سمت محصول PCR هدف کوچک‌تر می‌گردد. با این وجود، بسیاری از پژوهشگران بدون توجه به سایز کنترل داخلی، عموماً رقابت سکانس هدف در PCR با کنترل داخلی را به‌طور کلی مورد توجه قرار داده‌اند (۱ و ۵).

برایت ول (Brightwell) (۳۶) و عبدالموجود (Abdulmawjood) (۳۷) گزارش کرده‌اند که سایز کنترل داخلی کوچک‌تر از ۵۰۰bp، تأثیری بر روی حساسیت PCR ندارد. با این حال، اینترنال بزرگ‌تر از محصول PCR هدف، کم‌کم موجب رقابت می‌گردد. البته این موضوع در این مطالعه بررسی و کمترین تأثیر بر روی آزمایش مشاهده گردید.

اگر DNA هدف تکثیر شود اما IC تکثیر نگردد، فرض بر این است که میزان DNAی هدف بسیار بسیار بیشتر از DNAی کنترل داخلی است. بنابراین در این شرایط، اگر نتایج مثبت مشاهده شود معتبر است زیرا تکثیر کنترل داخلی غیرضروری است. اگر هم DNAی هدف و هم IC تکثیر نشوند فرض بر این است که عامل ممانعت کننده‌ای موجب عدم تکثیر شده است و آن آزمایش برای نمونه، معتبر (Valid) نیست. به این ترتیب، در این شرایط مهم‌ترین حد کاهش، ناشی از رقابت کنترل داخلی می‌باشد (۵).

در استراتژی غیر رقابتی، پرایمرهای هدف و کنترل داخلی متفاوتند. این استراتژی نیازمند یک آزمایش PCR با دو واکنش متفاوت است که به‌طور همزمان بایستی جلو روند. وقتی هر دو هدف و IC در این روش تکثیر شوند نتایج معتبر است. هر دو واکنش به‌وسیله رقابت با پرایمرهای واکنش دیگر تحت تأثیر قرار نمی‌گیرند. پرایمرهای کنترل داخلی در این استراتژی، عموماً DNAهای سنتتیک (مانند DNA پلاسمیدی)، یا ژن‌های دیگر را هدف قرار می‌دهند، که در هر میکروارگانیسم حضور دارند و عموماً هم دارای کپی نامبر بالایی هستند. در این استراتژی، تکثیر IC بایستی به‌وسیله یک غلظت کنترل شده پرایمرهای مخصوص کنترل داخلی ، محدود شود تا رقابت هدف و IC جهت الیگونوکلئوتیدها و DNA پلیمراز به حداقل برسد. از معایب روش تکثیر غیر رقابتی این نکته است که این متد نوعاً به‌طور دقیق تکثیر تارگت اولیه ناشی از تفاوت در ترادف پرایمرها را منعکس نمی‌نماید (۱).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

بنابراین ترکیب نوکلئوتید و سایز IC به دقت بایستی مورد توجه قرار گیرد. عیب دوم، این موضوع است که کاربرد IC در فرم غیر رقابتی نیازمند توسعه دو PCR و اپتیمایز کردن آن‌ها در یک شرایط PCR است که می‌تواند باعث کاهش کار یک تکثیر و یا هر دو هدف و IC گردد. یک راه برای غلبه بر این مشکل، اپتیمایز کردن سنجش فقط برای تارگت، و اجازه دادن به پیروی کردن واکنش IC از آن است. به‌علاوه محدود کردن تولید آمپلیکون IC به‌وسیله طراحی دقیق غلظت‌پرایمرهای آن در حد مینیمم شرط اساسی و لازم است (۱ و ۵).

از مزایای این روش این است که در یک آزمایشگاه می‌توان از آن برای تهیه‌ی سنجش‌های متفاوت استفاده نمود. زیرا گرایش عمومی در این روش طراحی پرایمرهای IC جهت ۱۶S و ۲۳S ریبوزومال RNA است (۱).

بهترین راه برای نگهداری IC این است که آن‌ها را به‌طور کلون شده در داخل یک پلاسمید و درون میزبان‌های باکتریایی که در درون محیطی کشت حاوی گیسیرید و یا به‌طور لیوفیلیزه نگهداری می‌شوند، حفظ نمود. به این حالت اصولاً میکروبانک اطلاق می‌گردد. می‌توان IC را به‌طور آزاد و با غلظت بالا در یک بافر قلیایی مانند بافر TE که باعث پایداری DNA می‌شود نگهداری نمود. IC اگر در آب و یا غلظت‌های پایین نگهداری شود تجربیات نشان داده است که باعث افت و کاهش سیگنال می‌گردد (۱).

بنابراین اضافه کردن EDTA جهت کیلیت کردن (Chelating) یون‌هایی که موجب واکنش آنزیم‌های تجزیه کننده DNA می‌گردند امری مهم است. اضافه کردن اسیدهای نوکلئیک به‌عنوان یک نگهدارنده موجب پایداری بیشتر IC می‌گردد.

نکته دیگر نگهداری DNA در لوله‌های پلاستیکی است. از قرار معلوم DNA به تیوپ‌های پلی‌پروپیلن متصل و واکنش می‌دهد. این اتصال و واکنش موجب تحریک تغییرات فضایی در DNA شده که بر روی کارآیی تکثیر و دقت و نهایتاً میزان Detection limit اثر می‌گذارد.

استفاده از یک کنترل داخلی در تشخیص مولکولی کریپتوکوکوس نئوفورمنس به‌عنوان کنترل داخلی، می‌تواند خطاها را شناسایی کند.

سپاس و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس که هزینه انجام این پژوهش را فراهم نمودند، تشکر می‌گردد.

References:

1. Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, et al. Practical considerations in design of internal amplification controls for Diagnostic PCR assays. J Clin Microbiol 2004; 42: 1863-8.
2. Anonymous. Protocol for the validation of alternative microbiological qualitative methods. 2001. Document NV-DOC.D-2001–04–25 (Accessed at http://nmkl.org/NordVal/NodVal.htm). NordVal, Oslo, Norway.
3. Anonymous. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Protocol for the validation of alternative methods (EN ISO 16140). 2002. European Committee for Standardization, AFNOR, Paris, France.
4. Anonymous. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of foodborne pathogens. General method and specific requirements. 2002. Draft international standard ISO/DIS 22174. DIN, Berlin, Germany.
5. Hoorfar J, Cook N. Critical aspects of standardization of PCR. Methods Mol Biol 2002; 216: 51-64.
6. Malorny B, Tassios PT, Ra°dstro¨m P, et al. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. Int J Food Microbiol 2003; 83:b39-48.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

7.Schoder D, Schmalwieser A, Schauberger G, et al. Physical characteristics of six new thermocyclers. Clin Chem 2003; 49: 960-3.
8.Chen J, Varma A, Diaz MR, Litvintseva AP, et al. Cryptococcus neoformans Strains and Infection in Apparently Immunocompetent Patients, China. Emerg Infect Dis 2008; 14: 755-62.
9.Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within Cryptococcus neoformans? FEMS Yeast Res 2006; 6: 574-87.
10.Idnurm A, Bahn YS, Nielsen K, et al. Deciphering the Model Pathogenic Fungus Cryptococcus Neoformans. Nat Rev Microbiol 2005; 3: 753-64.
11.Bovers M, Hagen F, Boekhout T. Diversity of the Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii species complex. Rev Iberoam Micol 2008; 25: S4-12.
12.Okabayashi K, Kano R, Nakamura Y, et al. Capsule-associated genes of serotypes of Cryptococcus neoformans, especially serotype AD. Med Mycol 2006; 44: 127-32.
13.Nielsen K, Marra RE, Hagen F, et al. Interaction between genetic background and the mating type locus in Cryptococcus neoformans virulence potential. Genetics 2005; 171: 1-9.
14.Prariyachatigul C, Chaiprasert A, Meevootisom V, et al. Assessment of a PCR technique for the detection and identification of Cryptococcus neoformans. J Med Vet Mycol 1996; 34: 251-8.
15.Haynes KA, Sullivan DJ, Coleman DC,et al. Involvement of Multiple Cryptococcus neoformans Strains in a Single Episode of Cryptococcosis and Reinfection with Novel Strains in Recurren Infection Demonstrated by Random Amplification of Polymorphic DNA and DNA Fingerprinting. J Clin Microbiol 1995; 33: 99-102.
16.Raimondi A, Ticozzi R, Sala G, et al. Genotype-based differentiation of the Cryptococcus neoformans serotypes by combined PCR-RFLP analysis of the capsule-associated genes CAP10and CAP 59. Med Mycol 2007; 45: 491-501.
17.Rappelli P, Are R, Casu G, et al. Development of a nested PCR for detection of Cryptococcus neoformans in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1998; 36: 3438-40.
18.Paschoal RC, Hirata MH, Hirata RC, et al. Neurocryptococcosis: diagnosis by PCR method. Rev Inst Med trop Sao Paulo 2004; 46: 203-7.
19.Chang YC, Kwon-Chung KJ. Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, CAP10, of Cryptococcus neoformans. J Bacteriol 1999; 181: 5636-43.
20.Anastasia AP, Kestenbaum L, Vilgalys R, et al. Comparative Analysis of Environmental and Clinical Population of Cryptococcus neoformans. J Clin Microbiol 2005; 43: 556-64.
21.McFadden DC, Casadevall A. Capsule and melanin synthesis in Cryptococcus neoformans. Med Mycol 2001; 39: 19-30.
22.Mitchell TG, Freedman EZ, White TJ, et al. Unique oligonucleotide primers in PCR for identification of Cryptococcus neoformans. J Clin Microbiol 1994; 32: 253-5.
23.Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, et al. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 30: 710-8.
24.Goldman DL, Khine H, Abadi J, et al. Serologic evidence for Cryptococcus neoformans infection in early childhood. Pediatrics 2001; 107: E66.
25.Kralovic SM, Rhodes JC. Utility of routine testing of bronchoalveolar lavage fluid for cryptococcal antigen. J Clin Microbiol 1998; 36: 3088-9.
26.Chen S, Sorrell T, Nimmo G, et al. Epidmiology and host-and variety-dependent characteristics of infection due to Cryptococcus neoformans in Australia and New Zealand. Clin Infect Dis 2000; 31: 499-508.
27.Levitz SM. The ecology of Cryptococcus neoformans and the epidemiology of Cryptococcosis. Rev Infect Dis 1991; 13: 1163-9
28.Kwon-Chung KJ, Edman JC, Wickes BL. Genetic association of mating types and virulence in Cryptococcus neoformans. Infect Immun 1992; 60: 602-5.
29.Mahboudi F, Abolhassan M, Yaran M, et al. Identification and differentiation of Iranian Leishmania species by PCR amplification of kDNA. Scand J Infect Dis 2001; 33: 596-8.
30.Mahboudi F, Abolhassani M, Tehrani SR, et al. Differentiation of old and new world leishmania species at complex and species levels by PCR. Scand J Infect Dis 2002; 34: 756-8.
31.Velegraki A, Kiosses VG, Kansouzidou A, et al. Prospective use of rflp analysis on amplified cryptococcus neoformans ura5 gene sequences for rapid identification of varieties and serotypes in clinical samples. Med Mycol 2001; 39: 409-17.
32.Saha DC, Xess I, Biswas A, et al. Detection of Cryptococcus by conventional, serological and molecular methods. J Med Microbiol 2009; 58: 1098-105.
33.Millar BC, Xu J, Moore JE. Risk assessment of Models and Contamination Management:

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

Implication for Broad-Range Ribosomal DNA as a Diagnostic tool in Medical Bacteriology. J Clin Microbiol 2002; 40: 1575-80.
34.Burkardt HJ. Standardization and Quality control of PCR analyses. Clin Chem Lab Med 2000; 38: 87-91.
35.Sachadyn P, Kur J. The construction and use of a PCR internal control. Mol Cell Probes 1998; 12: 259-62.
36.Abdulmawjood A, Roth S, Bulte M. Two methods for construction of internal amplification
controls for the detection of Escherichia coli O157 by polymerase chain reaction. Mol Cell Probes 2002; 16: 335-9.
37.Brightwell G, Pearce M, Leslie D. Development of internal controls for PCR detection of Bacillus anthracis. Mol Cell Probes 1998; 12: 367-77.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

ISMJ 2014; 17(3): 377-390

Orginal Article

Improvement of the Molecular diagnosis of *Cryptococcus neoformans* using Internal Control (IC)

MH. Shahhosseiny [1*], Sh. Beglari [2, 3], M. Bayat [4], E. moslemi [3, 5], M. Ghahri [3, 6],

[1] Department of Microbiology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, IRAN.
[2] Department of Biology, Tehran Science and Research unit, Islamic Azad University, Tehran, IRAN.
[3] Iranian Gene Fanavar Institute (IGF), Tehran, IRAN.
[4] Department of Medical & Veterinary Specialized Sciences, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, IRAN
[5] Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, IRAN.
[6] Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, IRAN.

(Received 4 Jan, 2013 Accepted 6 Mar, 2013)

Abstract

Background: Lacking of internal control in majority of the PCR realated searchesis one of the most important items yet. Using sensitive and specialized laboratory techniques such as PCR is necessary to cryptococosis diagnosis. Different methods to detect this pathogen exist. Generally, culturing based methods are time consuming and have low sensitivity and need enough experience and equipments to data analyzing. Further painting based methods have no sufficient sensitivity as well. As a result, molecular techniques such as PCR are more appropriate to diagnosis purposes, but different data gathered from non standard tests supposed to be one of the deficiencies of this powerful molecular technique.
This aim of this study was to design and produce the plasmid amplification internal control (IAC) to identify the restrictors in *Cryptococcus neoformans* PCR test and its future applications in the routine diagnostic laboratories.

Materials and methods: In this study to produce internal control, first the special PCR primers based on Gene target 16SrRNA for optimized molecular detection and then sensitivity and character were identified. Then, the composite primers for IAC *C. neoformans* was designed, replicated and clonized as well. The replicated IAC *C. neoformans* was attached to pTZ57R and transformed and colonized in *E.coli* JM107. The minimum IC number of each PCR reaction was studied using dilution and PCR reaction spectrum with IC.

Results: The size of *C. neoformans* diagnostic product with its special primers was 415 bp and IAC *C. neoformans* amplicon is 661 bp, which have desired deference in the size (246 bp). The minimum IC number was identified 1000 in each reaction. The min/max sensitivity of PCR test with IC for *C. neoformans* DNA was identified between 100 particle to 3 million yeasts. There was no unwanted product in the character test with different agents.

Conclusion: In spite of high rate and exclusivity of PCR technique, one of the main difficulties of this exacting method is the false positive and negative results which occur because of different reasons which may led to decrease its performance. Using an internal control for molecular diagnosis of Cryptococcus neoformans as inside controlling systemcan detect these errors.

Key words: Amplification internal control, *Cryptococcus neoformans*, PCR

*****Address for correspondence***:** Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qods branch, Tehran, IRAN., Email: shahosseiny@yahoo.com

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]