Evaluating the Relative Frequency of Fungal Infections in the Serum of Patients with Multiple Sclerosis and Healthy Subjects Using PCR

Amineh Zarinnezhad*
Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, Iran, tohidpirie@yahoo.com
Mohamad Hassan Shahhoseini
Department of Biology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran, ana.zarinnezhad@gmail.com
Tohid Piri Gharaghie
Department of Biotechnology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran, tohidpirie1@gmail.com

Abstract

Introduction: Various genetic and environmental factors are associated with multiple sclerosis (MS) and its progression. Environmental factors include infectious agents especially fungi. The immunological basis of MS and the effects of fungal infections on the immune system led us to compare the relative frequency of fungal infections in the serum of MS patients with controls.

Materials and methods: One-hundred serum samples of patients with MS and control individuals were collected. After the DNA extraction, the specificity and sensitivity of the PCR test for universal fungal primers were investigated. Then, an optimal PCR test was performed on control and patient samples.

Results: In this study, 575 base pairs (bp) of genes were considered as the target product using universal fungal primers. The PCR test was performed to check for the specificity with fungal, bacterial, and viral DNAs, along with fungal DNA replication and other reproductive DNAs. The positive cases were 11 and 4 among 100 patients and 100 healthy samples, respectively. Also, the detection limit in this reaction was 40 copies of DNA. The results using SPSS software and Fisher's exact test showed a significant difference between the two groups (P value= 0.052).

Discussion and conclusion: MS patients have a higher relative frequency of fungal infections due to weaker immune systems and immunosuppressive drugs. The presence of an active infectious agent in such patients can increase the duration of the destruction of the nervous system. Therefore, diagnosing the active infectious agent and prescribing an appropriate medication regimen can be considered as a contributing factor in preventing the progression of the disease. Therefore, more studies are needed on the types of effective fungal species and their pathogenesis mechanism.

Key words: Multiple Sclerosis, Fungi, Pathogenesis, PCR

* Corresponding author
Received: April 6, 2020 / **Accepted:** June 23, 2020

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)
سال دهم، شماره ۳۷، بهار ۱۴۰۰ ، ص، ۳۷-۵۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۱۸ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۰۳
Doi: 10.22108/BJM.2020.122265.1288

بررسی فراوانی نسبی عفونت‌های قارچی در سرم بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس و افراد سالم به روش PCR

امینه زرین‌نژاد*: کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران، tohidpirie@yahoo.com
محمدحسن شاه‌حسینی: استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران ، ana.zarinnezhad@gmail.com
توحید پیری قراقیه: استاد گروه زیست‌فناوری، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران، tohidpirie1@gmail.com

چکیده

مقدمه: عوامل ژنتیکی و محیطی مختلفی با بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) و پیشرفت آن ارتباط دارند؛ ازجمله عوامل محیطی مؤثر می‌توان به عوامل عفونی و به‌ویژه قارچ‌ها اشاره کرد. مبنای ایمونولوژیک بیماری MS و آثار عفونت‌های قارچی بر سیستم ایمنی سبب شد فراوانی نسبی ابتلا به عفونت‌های قارچی در بیماران مبتلا به MS با افراد شاهد مقایسه شود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۰۰ نمونه سرم بیمار مبتلا به بیماری MS و افراد شاهد جمع‌آوری شدند. پس‌از استخراج DNA، اختصاصیت و حساسیت آزمون PCR در زمینهٔ آغازگرهای عمومی قارچی بررسی و سپس آزمون PCR بهینه روی نمونه‌های شاهد و بیمار انجام شد.

نتایج: قطعهٔ ۵۷۵ جفت بازی به کمک آغازگرهای عمومی تکثیر و روی ژل آگارز مشاهده شد. آزمون PCR به‌منظور بررسی اختصاصیت با DNAهای قارچ، باکتری و ویروس انجام شد و تکثیر تنها با DNA قارچی مشاهده شد و تکثیری با سایر DNAها مشاهده نشد. تعداد ۱۱ نمونه از ۱۰۰ نمونهٔ بیمار و تعداد ۴ نمونه از ۱۰۰ نمونهٔ سالم مثبت شد؛ همچنین حد تشخیص در این واکنش برابر ۴۰ کپی DNA به دست آمد. بررسی نتایج با نرم‌افزار SPSS و آزمون دقیق فیشر نشان دادند تفاوت معناداری (P value=0.052) بین گروه بیمار و شاهد وجود دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: بیماران MS به‌علت سیستم ایمنی ضعیف‌تر و استفاده از داروهای سرکوب‌کنندهٔ سیستم ایمنی، فراوانی نسبی بیشتری در میزان آلودگی به عفونت‌های قارچی دارند. وجود عامل عفونی فعال در این بیماران می‌تواند مدت زمان تخریب سیستم عصبی را افزایش دهد؛ ازاین‌رو، تشخیص عامل عفونی فعال و تجویز رژیم دارویی متناسب می‌تواند عامل کمک‌کننده‌ای در جلوگیری از پیشرفت بیماری تلقی شود و بنابراین، لازم است مطالعه‌های بیشتری در زمینهٔ انواع گونه‌های قارچی مؤثر و سازوکار بیماری‌زایی آنها انجام شود.

واژه‌های کلیدی: مالتیپل اسکلروزیس، قارچ‌ها، بیماری‌زایی، PCR

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2021, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

بیماری مالتیپل اسکلروزیس[1] (MS) یکی از بیماری‌های التهابی دمیلینه‌کنندهٔ سیستم اعصاب مرکزی (CNS) است که عمدتا به بروز ناتوانی‌های نورولوژیکی در جمعیت جوان منجر می‌شود. تظاهرات بالینی MS در بیماران متفاوت است و به موقعیت اعصاب آسیب‌دیده بستگی دارد (۱ و ۲). علت MS ناشناخته است، اما آشکارا عوامل محیطی و عوامل وراثتی در احتمال ابتلا به MS دخالت دارند (۳). عوامل ژنتیکی مانند پلی‌مورفیسم‌های خاص در ژن‌های کمپلکس سازگاری نسجی (۴)، سایتوکین‌ها و دیگر ژن‌ها (۵) در افزایش استعداد ابتلا به بیماری تأثیر دارند و عوامل محیطی ممکن است آثار خود را از طریق سازوکارهای اپی‌ژنتیک نشان دهند (۶)؛ از میان عوامل محیطی تأثیرگذار در افزایش احتمال ابتلا به MS می‌توان میزان ویتامین D، سیگارکشیدن، موقعیت جغرافیایی و همچنین عفونت با ویروس‌ها را نام برد (۷). بیشترین شیوع MS در نژاد سفیدپوست است و این بیماری در نژاد زرد و سیاه شیوع کمتری دارد (۸). دانشمندان معتقدند دست‌کم یک یا چند عامل محیطی برای بروز بیماری مالتیپل اسکلروزیس ضروری‌اند و شواهد نشان می‌دهند برخی از انواع ویروس‌ها ازجمله سرخک، اوریون، سرخجه، آبله و اپشتن‌بار (۹) یکی از عوامل محیطی به شمار می‌آیند که ممکن است به روش‌های مختلف در بیماری مالتیپل اسکلروزیس درگیر باشند (۱۰). شیوع عفونت‌های سیستمیک قارچی طی سال‌های اخیر رو به گسترش بوده است (۱۱). عوامل مختلفی افراد را مستعد عفونت‌های سیستمیک قارچی می‌کنند که ازجمله می‌توان به درمان‌های ضدسرطان و داروهای سرکوب‌کنندهٔ ایمنی، آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف، بیماران نوتروپنی، نوزادان نارس، دیابت و ایدز اشاره کرد (۱۲). باتوجه‌به افزایش بیماری MS و بیماری‌های قارچی طی سال‌های اخیر و احتمال دخالت عوامل عفونی در MS (۱۳)، این نکته مطرح است که آیا قارچ‌ها ازجمله عوامل مستعدکنندهٔ این بیماری هستند یا ابتلا به MS سبب ایجاد زمینهٔ مناسب برای عفونت‌های قارچی می‌شود. قارچ‌ها با انسان رابطهٔ هم‌سفرگی دارند و درحقیقت، بخشی از میکروفلور طبیعی بدن انسان را تشکیل می‌دهند (۱۴). عفونت قارچی در اثر ورود قارچ به بافت درونی بدن ایجاد می‌شود؛ پس‌از ورود قارچ به بدن، ممکن است هیچ نشانه‌ای ازنظر بالینی دیده نشود یا بیماری در اثر آسیب سلولی ناشی از متابولیسم قارچ، آزادسازی متابولیت‌های سمی، تکثیر قارچ‌ها یا بروز پاسخ‌های ایمونولوژیک ایجاد شود (۱۵)؛ پاسخ‌های ایمونولوژیک به قارچ‌ها ممکن است سلولی، همورال یا ترکیبی از هر دو باشند (۱۶). بسیاری از قارچ‌ها به‌شکل اندوژن در بدن موجودات زنده وجود دارند و پس‌از بروز شرایط خاصی مانند آسیب، تروما یا تضعیف سیستم ایمنی به‌شکل بیماری‌زا درمی‌آیند و به بروز عفونت و بیماری منجر می‌شوند که به این قارچ‌ها، فرصت‌طلب گفته می‌شود (۱۷). در اثر تضعیف سیستم ایمنی به‌واسطهٔ دریافت داروهای سرکوبگر سیستم ایمنی یا ابتلا به ویروس نقص ایمنی (HIV)، بدن قادر به بروز پاسخ‌های ایمونولوژیک نیست و درنتیجه، قارچ‌ها با کلونیزه‌شدن و آزادکردن متابولیت‌های خود به‌شکل بیماری‌زا به حیات خود ادامه می‌دهند (۱۸). مطالعه‌هایی در زمینهٔ عفونت قارچی در بیماران MS انجام شده‌اند؛ ازجمله در پژوهشی دیده شده است آنتی‌بادی ضد

کاندیدا آلبیکنس[۲] و گونه‌های پارازیتیکوس[۳]، *فاماتا*[۴]، *گلابراتا*[۵] و *کروزه‌ای*[۶] در سرم و مایع مغزی‌نخاعی بیماران MS وجود دارد (۱۹)؛ علاوه‌براین، در پژوهشی دیگر به حضور آنتی‌بادی ضدقارچی و DNA قارچی در بیماران MS اشاره شده است که نشانه‌ای از وجود عفونت قارچی در بیماران MS در مقایسه با افراد سالم است (۲۰). حضور عامل عفونی فعال در بدن بیماران سبب بروز پاسخ ایمنی بدن می‌شود. پروتئیناز A یکی از آنزیم‌های درون‌سلولی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* است که فعالیت پروتئولیتیک زیادی دارد. آنزیم یادشده در شرایط تنش سبب مقاومت بیشتر قارچ می‌شود. مقاومت قارچ در شرایط تنش به تحریک سیستم ایمنی بدن در تولید سایتوکین‌ها منجر می‌شود؛ با افزایش تولید سایتوکین، پاسخ‌های ایمنی افزایش می‌یابند و به افزایش التهاب در بدن منجر می‌شوند که عاملی مهم در تخریب سیستم عصبی بیماران MS شناخته شده است (۲۱). باتوجه‌به استفاده از داروهای خودایمن در بیماران MS، این بیماران سیستم ایمنی ضعیف‌تری دارند و شرایط برای رشد عوامل عفونی فراهم است. هدف پژوهش حاضر، بررسی فراوانی نسبی عفونت قارچی در بیماران MS و بروز مشکلات ثانویه است؛ ازاین‌رو، تشخیص DNA به‌منظور تعیین وجود عامل عفونی فعال اهمیت زیادی دارد؛ از سویی، وجود عامل بیماری در بدن سبب تداوم تولید توکسین و ایجاد التهاب می‌شود که میزان آسیب را افزایش می‌دهد. پایداری قارچ‌هایی مانند *کاندیدا آلبیکنس* در سرم افراد سبب فعال‌شدن واکنش‌های التهابی با تولید سایتوکین‌ها می‌شود که تخریب بیشتر سیستم عصبی را در پی دارد (۲۱)؛ ازاین‌رو، تعیین فراوانی نسبی عفونت‌های قارچی در بیماران MS دارای اهمیت بسیاری است که آزمون‌های سرولوژی این قابلیت را ندارند. هدف مطالعهٔ حاضر، بررسی فراوانی نسبی عفونت‌های قارچی در بیماران مبتلا به MS به روش مولکولی و حساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و مقایسهٔ آن با افراد سالم است؛ به این منظور، حضور عوامل قارچی با استفاده از روش PCR روی نمونه‌های سرم افراد مبتلا به MS و سالم بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های سرم افراد مبتلا به MS و سالم: در مطالعهٔ حاضر، دو گروه از افراد مطالعه شدند:

گروه اول (P): این گروه شامل ۱۰۰ نمونه سرم افراد مبتلا به MS بود که متخصص نورولوژی بیماری آنها را تأیید کرده بود.

گروه دوم (C): این گروه شامل ۱۰۰ نمونه از افراد شاهد بود که به‌طور تصادفی از افراد سالم تهیه شده بود؛ این افراد پیشینهٔ بیماری مزمن و عفونی نداشتند.

رضایت‌نامهٔ کتبی از بیماران دریافت شد.

به‌منظور تشخیص DNA قارچ از سرم افراد هر دو گروه استفاده شد. هر دو گروه جنسیت و میانگین سن تقریبا مشابهی داشتند؛ به‌طوری‌که در هر دو گروه، تعداد ۶۹ مرد و ۳۱ زن حضور داشتند و انحراف معیار میانگین سن در گروه P و C به‌ترتیب ۱۱±۵۵ و ۸±۶۳/۵ بود. طول مدت بیماری، عامل مهمی در هر دو گروه و از ۲ تا ۱۱ سال (با میانگین ۲/۸ ± ۴/۵ سال) متغیر بود. پیشینهٔ خانوادگی فشار خون زیاد، مصرف سیگار و بیماری‌های عفونی در گروه P بیشتر از گروه C بود.

استخراج DNA: به‌منظور استخراج DNA از سرم بیماران مبتلا به MS و افراد شاهد از روش ارائه‌شده در کیت DNG-PLUS (سیناکلون، ایران) استفاده شد؛ مطابق این روش، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر نمونهٔ سرم به لوله منتقل و ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیزکنندهٔ DNG هم‌دماشده با محیط به آن اضافه شد و نمونه به‌مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه ورتکس شد؛ پس‌ازآن، ۳۵۰ میکرولیتر محلول رسوب‌دهنده (ایزوپروپانول) به لوله اضافه و لوله ده بار وارونه یا اینورت شد و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی تخلیه یا دکانته و ۱ میلی‌لیتر محلول شستشو (الکل ۷۰ درصد) به نمونه اضافه شد؛ پس‌از مخلوط‌شدن نمونه با محلول شستشو، لوله ده مرتبه وارونه و سپس به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شد. پس از تخلیهٔ محلول رویی، رسوب موجود در ته لوله به‌مدت ۱۰ تا ۵۰ دقیقه در ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد (دستگاه هیتر بلاک) خشک شد و پس‌از خشک‌شدن، ۳۰ تا ۵۰ میکرولیتر آب دوبارتقطیر استریل دیونیزه به لوله اضافه و رسوب به‌آرامی با ضربه‌های انگشت و ورتکس حل شد و سپس نمونه به‌مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. DNA استخراج‌شده برای استفادهٔ طولانی‌مدت در منفی ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد ذخیره شد. درنهایت، آزمون بهینه‌شده روی تمام نمونه‌های بیمار و شاهد در کنار کنترل مثبت و منفی انجام شد. به‌منظور تأیید استخراج DNA از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد.

بهینه‌کردن عوامل اساسی روش PCR: به‌منظور بهینه‌کردن روش PCR در مطالعهٔ حاضر، لازم بود غلظت و مقدار تمام مواد و عوامل این روش بررسی و ارزیابی شود. به‌منظور تأیید درستی نتایج و بررسی آلودگی، در هر بار PCR، کنترل مثبت و کنترل منفی همراه با نمونه‌ها گذاشته شد. وجود کنترل مثبت که در همهٔ آزمون‌های PCR استفاده می‌شود، سبب اطمینان‌خاطر از درستی انجام کار در آزمون PCR می‌شود؛ وجودنداشتن باند مربوط به کنترل مثبت روی ژل آگارز به معنای حضور عنصری ممانعت‌کننده در سیستم، نبود یکی از اجزای لازم برای تکثیر یا نامناسب بودن برنامهٔ حرارتی پیش‌بینی‌شده برای تکثیر توالی هدف است. در نمونهٔ کنترل منفی به‌جای DNA الگو، ۵ میکرولیتر آب دیونیزهٔ استریل به مخلوط اصلی اضافه شد؛ وجود کنترل منفی که در همهٔ آزمون‌های PCR استفاده می‌شود، آزمون انجام‌شده را ازنظر وجودنداشتن آلودگی بررسی می‌کند. آلوده‌شدن فضای کار، مواد یا وسایل استفاده‌شده با DNA الگوی خارج از سیستم تکثیر به‌شکل باند ناخواسته در نمونهٔ کنترل منفی روی ژل دیده می‌شود؛ با مشاهدهٔ چنین باندی که نشان‌دهندهٔ آلودگی است، امکان بررسی هیچ نمونه‌ای وجود ندارد و باید آلودگی به‌سرعت با موادی مانند آب‌ژاول، الکل و نور UV رفع شود و کار پس‌از اطمینان‌یافتن از وجودنداشتن آلودگی در سیستم ادامه یابد. وجود نمونهٔ کنترل منفی (به‌ویژه هنگام بررسی نمونه‌های بالینی) اهمیت زیادی دارد؛ زیرا وجود آلودگی سبب تشخیص اشتباه و جواب‌های مثبت کاذب می‌شود.

انجام PCR: در مطالعهٔ حاضر، آزمون PCR مطابق روش ShahlaAmri و همکاران (۲۱) با اندکی تغییر انجام شد. آغازگرهای استفاده‌شده در پژوهش حاضر از مطالعهٔ Van Burik و همکاران (۱۹۹۸) انتخاب شدند (جدول ۱)؛ این آغازگرها برای تکثیر قطعهٔ ۵۷۵ جفت بازی طراحی شده‌اند. چنانچه ژن *18S rRNA* در نمونهٔ

بررسی‌شده وجود داشته باشد و پس‌از تکثیر، قطعه‌ای با اندازهٔ ۵۷۵ جفت باز به دست می‌آید. برنامهٔ ترموسایکلر PCR برای تعداد ۳۵ چرخه به‌شکل دناتورهٔ اولیه به‌مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد، اتصال به‌مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد، بسط به‌مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد. حد تشخیص آزمون PCR برابر ۴۰ کپی از DNA قارچ عامل عفونت تعیین شد (شکل ۱). حجم مواد لازم برای انجام PCR در جدول ۲ ارائه شده است. پس‌از افزودن آغازگرها به مخلوط حاوی بافر PCR، dNTP، $MgCl_2$ و آنزیم Taq پلیمراز، حجم نهایی محلول با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد و سپس الکتروفورز محصول PCR انجام شد.

جدول ۱- اندازهٔ محصول، توالی آغازگرها و ژن‌های هدف

اندازهٔ محصول PCR	توالی آغازگر	نام آغازگر
۵۷۵ جفت باز	F= 5'-CGGGGAAACTCACCAG-3' R= 5'-AAGGGCATCACAGACC -3'	*18Sr RNA*

جدول ۲- مواد و عوامل لازم برای هر آزمون PCR

Material	Concentration	Volume
10X PCP Buffer	-	2.5µl
dNTP (10 mM)	0.2 mM	0.5 µl
$MgCl_2$ (50 mM)	1.5 Mm	0.75 µl
Forward Primer (10 µM)	0.2 µM	0.5 µl
Reverse Primer (10 µM)	0.2 µM	0.5 µl
Taq DNA Pol (5 unit/ µl)	1.5 unit	0.3 µl
DNA Template or Pos. Control	-	5 µl
D.D.W	-	15 µl
Total Volume	-	25 µl

الکتروفورز محصول PCR: پس‌از انجام واکنش PCR، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR همراه با ۲ میکرولیتر بافر راهنمای 6X روی ژل آگارز ۱/۵ درصد که از قبل با رنگ SYBR SAFE (سیناکلون) مخلوط شده بود، ریخته شد و پس‌از انجام عمل الکتروفورز به‌مدت ۴۵ دقیقه در ولتاژ ۷۰ ولت، محصول PCR در طول ژل حرکت کرد و سپس به کمک دستگاه ترانس ایلومینیتور بررسی شد (۲۲).

تعیین حد تشخیص (LOD) آزمون PCR بهینه‌شده: به‌منظور تعیین حد تشخیص (LOD) آزمون PCR بهینه‌شده باید رقت‌هایی از DNA با تعداد قارچ مشخص تهیه کرد تا با انجام واکنش PCR روی آنها، حداقل تعداد قارچ لازم برای انجام واکنش تعیین شود. به‌منظور تعیین حد تشخیص آزمون PCR بهینه‌شده از DNA استخراج‌شده از *کاندیدا آلبیکنس* استفاده و رقت سریال از DNA سوش تهیه شد؛ به‌این‌ترتیب که ۷ میکروتیوب استریل برداشته و به هرکدام ۹۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد؛ به نخستین میکروتیوب، مقدار ۱۰ میکرولیتر DNA قارچی استخراج‌شده اضافه و با ورتکس کردن، رقت مدنظر در تمام تیوب به‌طور یکنواخت ایجاد شد. تهیهٔ رقت‌ها به‌ترتیب یادشده ادامه

یافت تا رقت‌های سری تا رقت 10^{-7} به دست آمدند؛ سپس یک آزمون PCR همراه با کنترل مثبت و کنترل منفی برای هر رقت به‌دست‌آمده انجام شد. تعداد DNA موجود در تیوب اولیه از طریق اندازه‌گیری غلظت DNA در تیوب با استفاده ازدستگاه نانودراپ و رابطهٔ Genome-copy-number و اندازهٔ ژنوم قارچی (۵۷۵ جفت باز) به دست آمد. باتوجه‌به غلظت DNA موجود در تیوب اولیه، میزان LOD آزمون PCR بهینه‌شده برای این قارچ تعیین شد.

تعیین اختصاصیت آزمون PCR تشخیص قارچ‌ها: به منظور تعیین اختصاصیت آزمون PCR از DNA انسان، موش، *ویروس هرپس سیمپلکس ۱*[7]، *ویروس هرپس سیمپلکس ۲*[8]، *ویروس هپاتیت B*، *آدنوویروس*[9] و *استافیلوکوکوس اورئوس*[10] برای نمونهٔ کنترل منفی و از نمونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* ATCC 14053، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*[11] ATCC 56775 و *کریپتوکوکوس نئوفورمنس*[12] ATCC 36556 برای کنترل مثبت استفاده شد. نتایج آزمون PCR در تمام نمونه‌های قارچی اختصاصیت آغازگر استفاده شده برای عفونت‌های قارچی را نشان دادند.

نتایج

بهینه کردن آزمون PCR: روش گرادیان PCR در بازهٔ دمایی ۵۵ تا ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد برای بهینه کردن پروفایل حرارتی و انتخاب دمای انیلینگ[13] مناسب مطابق جدول ۳ استفاده شد. مناسب‌ترین دما برای مرحلهٔ انیلینگ به‌منظور شناسایی قارچ‌ها برابر ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به دست آمد. به‌منظور بهینه‌کردن مقدار آغازگرهای رفت و برگشت واکنش، غلظت‌های ۰/۱ تا ۱ میکرومولار از آغازگرها در واکنش بررسی و آزمایش شدند و درنهایت، زمانی بیشترین میزان تکثیر DNA مشاهده شد که غلظت در ۰/۲ میکرومولار تثبیت شد. به‌منظور بهینه‌کردن غلظت $MgCl_2$، واکنش PCR در مقادیر مختلفی از $MgCl_2$ (۰/۵ تا ۵ میلی‌مولار) انجام و مناسب‌ترین غلظت برای انجام واکنش برابر ۱/۵ میلی‌مولار حاصل شد. به‌منظور بهینه‌کردن مقدار dNTP (نوکلئوتیدهای پیش‌ساز واکنش)، واکنش در غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۳ میلی‌مولار بررسی شد و بهترین پاسخ در غلظت ۰/۲ میلی‌مولار به‌دست آمد.

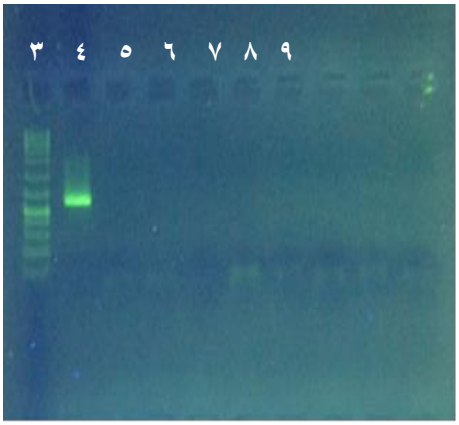
جدول ۳- پروفایل حرارتی استفاده‌شده در مطالعهٔ حاضر

مراحل	زمان	درجه‌حرارت
Denaturation	۲ دقیقه	۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد
Annealing	۱ دقیقه	۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد
Extension	۱ دقیقه	۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد
	۳۵ چرخه	

آزمون PCR با استفاده از DNA استخراج‌شدهٔ قارچ‌های *کاندیدا آلبیکنس*، *آسپرژیلوس فلاووس*[14]، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* بهینه شد. آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و طبق دستورعمل حرارتی مناسب به‌دست‌آمده انجام و محصول آن با اندازهٔ ۵۷۵ جفت باز روی ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد با شناساگر DNA Ladder شرکت bioflux (مالزی) مشاهده شد. به‌منظور

575 bp

تعیین اختصاصیت آزمون PCR برای تشخیص قارچ‌ها، در آزمون ویژگی از DNA انسان، موش، *ویروس هرپس سیمپلکس ۱*، *ویروس هرپس سیمپلکس ۲*، ویروس هپاتیت B، *آدنوویروس* و DNA *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد. در آزمون ویژگی، آزمون تنها با DNA قارچ به محصول ۵۷۵ جفت بازی منتج شد و هیچ محصول PCR با DNA سایر موجودات آزموده‌شده به دست نیامد که درنتیجه، ویژگی و اختصاصیت زیاد این آغازگرها را برای تشخیص قارچ تأیید می‌کند (شکل ۱).

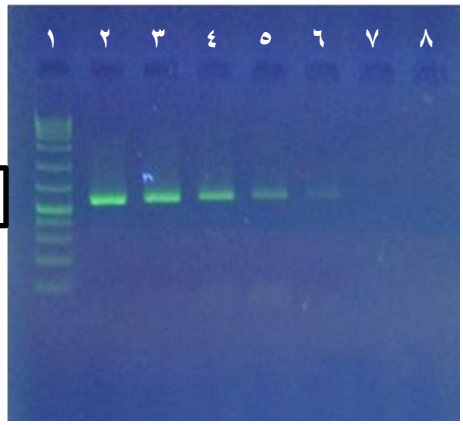


شکل ۱- تعیین اختصاصیت (ویژگی) آزمون PCR بهینه‌شده برای شناسایی قارچ‌ها؛ ۱. اندازهٔ شناساگر 1kb DNA Ladder، ۲. نمونهٔ کنترل مثبت (قارچ ۵۷۵ جفت بازی)، ۳. DNA انسان، ۴. DNA موش، ۵. DNA *هرپس سیمپلکس ویروس ۱*، ۶. DNA *هرپس سیمپلکس ویروس ۲*، ۷. DNA ویروس هپاتیت B، ۸. DNA *آدنوویروس*، ۹. DNA *ساکارومایسس سرویزیه*[۱۵]، ۱۰. نمونهٔ کنترل منفی

حد تشخیص آزمون PCR، ۴۰ DNA قارچی یعنی ۴۰ کپی از ژنوم در واکنش PCR مشخص شد. نتیجهٔ PCR برای تعیین حد تشخیص آزمون PCR بهینه‌شده با استفاده از رقت‌های سری که تعداد ژنوم در هرکدام از آنها مشخص بود، نمونهٔ کنترل منفی و نمونهٔ کنترل مثبت با DNA استخراج‌شده از سوش استاندارد روی ژل الکتروفورز در شکل ۲ مشخص شده است.

نتایج آزمون PCR بهینه‌شده روی نمونه‌های DNA سرم افراد مبتلا به MS و شاهد: در مطالعهٔ حاضر، تعداد ۱۰۰ نمونهٔ بیمار مبتلا به MS و ۱۰۰ نمونهٔ شاهد سالم جمع‌آوری شد. DNA نمونه‌های بیمار و شاهد به روش DNG plus استخراج و سپس آزمون PCR روی آن انجام شد. تعداد ۱۱ نمونه از ۱۰۰ نمونهٔ بیمار در واکنش PCR مثبت شد و از میان ۱۰۰ نمونهٔ سالم بررسی‌شده، تعداد ۴ نمونهٔ مثبت مشاهده شد. طبق نتایج آزمون PCR، حضور DNA قارچی به‌ترتیب در ۱۱ و ۴ نمونه از گروه بیماران و شاهد تأیید شد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، شمارهٔ ۱، نشانگر ۱ کیلو جفت بازی است و باند مشخص‌شده (۵۷۵ جفت باز) هدف در نظر گرفته شده است؛ همچنین شماره‌های ۲ و ۳ به‌ترتیب کنترل‌های مثبت و منفی هستند.

575 bp



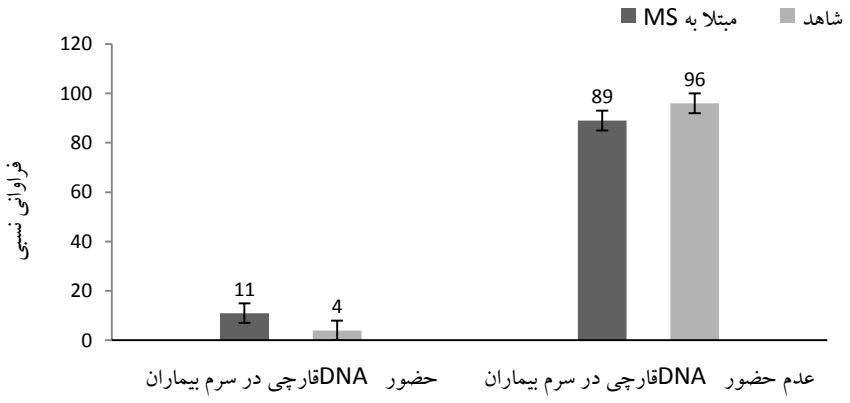
شکل ۲- تعیین حد تشخیص (LOD) آزمون بهینه‌شده با استفاده از DNA قارچی؛ ۱. اندازهٔ شناساگر 100bp DNA Ladder، ۲. محصول ۵۷۵ جفت بازی با استفاده از DNA قارچی، ۳. تعداد ۴۰۰۰۰ DNA قارچی در یک واکنش PCR، ۴. تعداد ۴۰۰۰ DNA قارچی در یک واکنش PCR، ۵. تعداد ۴۰۰ DNA قارچی در یک واکنش PCR، ۶. تعداد ۴۰ DNA قارچی در یک واکنش PCR، ۷. تعداد ۴ DNA قارچی در یک واکنش PCR، ۸. تعداد ۱۰ DNA قارچی در یک واکنش PCR

نتایج تجزیه‌وتحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS: پس‌از تأیید حضور DNA قارچی در هر دو گروه بیمار و شاهد، فراوانی نسبی حضور DNA قارچی با استفاده از آزمون دقیق فیشر در سطح معناداری ۰/۰۵۲ تعیین شد (مطابق جدول ۴) و تفاوت درخور توجه گروه بیمار و شاهد را نشان داد. تفاوت یادشده نشان‌دهندهٔ رابطهٔ معنادار بین حضور DNA قارچی در بیماران مالتیپل اسکلروزیس با فراوانی نسبی ۱۱ درصد و گروه شاهد با فراوانی نسبی ۴ درصد بود و احتمال دخالت عفونت قارچی در بروز بیماری مالتیپل اسکلروزیس را نشان داد (شکل ۳).

جدول ۴- نتایج آزمون دقیق فیشر

گروه	فراوانی/درصد	حضور DNA قارچی در سرم بیماران	حضورنداشتن DNA قارچی در سرم بیماران	جمع کل
مبتلا به MS	فراوانی	۱۱	۸۹	۱۰۰
	درصد	۱۱ درصد	۸۹ درصد	٪۱۰۰
شاهد	فراوانی	۴	۹۶	۱۰۰
	درصد	۴ درصد	۹۶ درصد	٪۱۰۰

نتایج نشان‌دهندهٔ سیستم ایمنی ضعیف‌تر بیماران MS و همبستگی احتمالی عفونت قارچی با بیماری MS است. باتوجه‌به نتایج، به نظر می‌رسد بیماران مالتیپل اسکلروزیس به دلایل مختلف مستعد عفونت‌های قارچی هستند، اما باید مطالعه‌های بیشتری برای تعیین نقش عفونت‌های قارچی در بروز بیماری مالتیپل اسکلروزیس انجام شوند. بیماران MS به‌علت سیستم ایمنی ضعیف‌تر و داروهای سرکوب‌کنندهٔ سیستم ایمنی، فراوانی نسبی بیشتری ازنظر میزان آلودگی به عفونت‌های قارچی دارند. وجود عامل عفونی فعال در این بیماران سبب افزایش مدت زمان تخریب سیستم عصبی می‌شود؛ ازاین‌رو، تشخیص عامل عفونی فعال و تجویز رژیم دارویی متناسب می‌تواند عامل کمک‌کننده در جلوگیری از پیشرفت بیماری تلقی شود.



شکل ۳- بررسی فراونی نسبی میزان DNA قارچی در سرم بیماران MS در مقایسه با افراد سالم

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری مالتیپل اسکلروزیس، بیماری خودایمن مزمن دستگاه اعصاب مرکزی است. در بیماری MS، لنفوسیت‌های T و B، پلاسماسل‌ها و اولیگودندروسیت‌ها نقش مرکزی را ایفا می‌کنند (۲۳). اطلاعات دقیقی در زمینهٔ اتیولوژی بیماری وجود ندارد و علاوه‌بر عوامل ژنتیکی، عوامل محیطی مانند شیوهٔ زندگی، عرض جغرافیایی، تغذیه و عفونت‌ها ازجمله علت‌های احتمالی بروز و پیشرفت بیماری MS به شمار می‌آیند. عفونت‌های باکتریایی، ویروسی و قارچی به‌سبب تأثیر بر سیستم ایمنی بدن و بروز التهاب‌های شدید و شیفت پاسخ‌های ایمنی به‌سمت سلول‌های Th1، ممکن است در بروز و پیشرفت بیماری MS تأثیر بگذارند (۲۴). به نظر می‌رسد عفونت‌های قارچی با اثر بر پاسخ‌های سیستم ایمنی می‌توانند بر بیماری MS مؤثر باشند؛ هرچند چگونگی این تأثیر مشخص نیست (۲۵). باتوجه‌به اینکه بیماری MS نوعی بیماری خودایمن است، هر تغییری در سیستم ایمنی با بیماری خودایمن MS مرتبط است؛ باوجوداین، به نظر می‌رسد عفونت‌های قارچی به‌علت افزایش پاسخ‌های التهابی و همچنین تقلید مولکولی به‌شکلی با بیماری MS مرتبط باشند (۲۵)؛ ازاین‌رو، در پژوهش حاضر به بررسی و تشخیص مولکولی DNA قارچی در سرم بیماران مبتلا به MS و افراد سالم به روش PCR پرداخته شد. ایدهٔ پژوهش حاضر، بررسی فعالیت عفونت قارچی در بیماری MS در مقایسه با افراد سالم بود؛ درحقیقت، هرچه فراوانی نسبی عفونت‌های قارچی در بیماران MS بیشتر باشد، کنترل پاسخ سیستم ایمنی و التهاب ناشی از آن سخت‌تر است؛ ازاین‌رو، تعداد ۱۰۰ نمونه سرم بیماران مبتلا به MS و ۱۰۰ نمونه شاهد سالم جمع‌آوری و عمل استخراج DNA از نمونه‌ها به روش DNG انجام شد. روش PCR، روش فوق‌العاده ساده و قدرتمند تشخیص بالینی محسوب می‌شود که سرعت و دقت زیادی دارد. نمونهٔ بیماران و گروه سالم ازنظر حضور DNA قارچی با استفاده از ژن هدف *18S rRNA* بررسی شدند.

نتایج آزمون آماری دقیق فیشر در نرم‌افزار SPSS نشان دادند درصد درخور توجهی (۱۱ درصد) از نمونه‌های افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس در مقایسه با افراد سالم ازنظر حضور DNA قارچی و با استفاده از روش حساس PCR، مثبت هستند؛ این در حالیست که در گروه شاهد، تنها ۴ درصد افراد به عفونت قارچی مبتلا بودند. نتایج ازنظر آماری بحث‌برانگیز و معنادار هستند و تفاوت مشاهده‌شده بین افراد بیمار و شاهد، لزوم مطالعه‌های بیشتر را گوشزد می‌کند.

در سال ۲۰۰۸، Rasmos و همکاران حضور آنتی‌بادی ضد *کاندیدا آلبیکنس* و گونه‌های *پارازیتیکوس*، *فاماتا*، *گلابراتا* و *کروزه‌ای* را در سرم بیماران MS با استفاده از روش وسترن‌بلات، ایمونوفلورسنس و اسلات‌بلات (slot-blot) بررسی کردند و نتایج روش اسلات‌بلات (slot-blot) نشان دادند برخلاف افراد شاهد، گونه‌های مختلف بیماری‌زا در بیماران (به‌جز یک نفر) حضور دارند. در ادامه، این پژوهشگران اقدام به استخراج DNA از خون کامل بیماران کردند و به بررسی مولکولی حضور DNA قارچی با استفاده از PCR پرداختند و مشاهده کردند برخلاف افراد شاهد، DNA قارچی در خون محیطی بیماران MS وجود دارد (۲۶). نتایج مطالعهٔ حاضر در زمینهٔ تشخیص DNA قارچی در سرم بیماران MS کاملا با نتایج گروه Rasmos مطابقت دارند و به نظر می‌رسد بیماران MS مستعد عفونت‌های قارچی باشند،

اما تأثیر عفونت قارچی در بروز یا پیشرفت بیماری MS نیازمند مطالعه‌های بیشتر است.

در سال ۲۰۱۱، Pisa و همکاران عفونت قارچی کاندیدا فاماتا[۱۶] را در بیمار مبتلا به MS گزارش کردند. یافته‌های slot blot، PCR و ایمونوفلورسنس همگی گویای وجود این عفونت قارچی در بیمار و لزوم بررسی بیشتر در زمینهٔ انواع عفونت‌های قارچی در بیماران MS برای تجویز داروهای مناسب بودند (۲۷). نتایج مطالعهٔ حاضر مطابق با مطالعهٔ Pisa بر ضرورت استفاده از داروهای ضدقارچی در بیماران MS دلالت دارند.

مطالعهٔ درخور توجه دیگری را Yoshitomi و همکاران در سال ۲۰۰۵ انجام دادند. مطالعهٔ این گروه در زمینهٔ ارتباط احتمالی عفونت‌های قارچی و بیماری‌های سیستم اعصاب مانند آلزایمر و پارکینسون بود. حضور DNA قارچی در مغز بیماران مبتلا به آلزایمر به روش PCR بررسی و حضور DNA قارچی در مغز بیماران مبتلا به آلزایمر در مقایسه با افراد شاهد دیده شد. این مطالعه‌ها مطابق با مطالعهٔ حاضر به احتمال دخالت عفونت‌های قارچی در بروز بیماری‌های مرتبط با سیستم اعصاب دلالت می‌کنند. باتوجه‌به اینکه عفونت قارچی سبب تحریک ترشح سایتوکین‌های التهابی می‌شود، ممکن است سبب تخریب بیشتر سیستم عصبی به‌ویژه در بیماری MS شود. نکتهٔ درخور توجه اینست که التهاب و دیستروفی عروقی در بسیاری از بیماران آلزایمر وجود دارد که منطبق بر این یافته است که عوامل قارچی سبب بروز واکنش‌های التهابی عروقی می‌شوند (۲۸).

در سال ۲۰۱۳، Rumah و همکاران روی بیمار مبتلا به MS مطالعه کردند. آنها سویه‌های *کلستریدیوم پرفرنجنس*[۱۷] نوع B را از مدفوع زن مبتلا به MS جداسازی و مشاهده کردند در مغز این بیمار، ضایعات دمیلینهٔ فعال وجود دارد و طبق پژوهش‌هایی که پیش از آن انجام شده بود، نتیجه گرفتند توکسین اپسیلون ۲۹ کیلودالتونی تولیدشده از این باکتری سبب نفوذپذیری سد خونی‌مغزی و نهایتا هجوم لنفوسیت‌های T به مغز و آغاز پاسخ‌های خودایمن می‌شود؛ در ادامه، گروه پژوهشی یادشده نشان دادند این توکسین در افراد مبتلا به MS ده برابر بیشتر از افراد سالم در سیستم ایمنی واکنش‌پذیری دارد (۲۹). مطالعهٔ Rumah به تأثیر مستقیم عفونت‌ها بر افزایش و گسترش بیماری MS اشاره دارد. در مطالعهٔ حاضر دریافتیم تراکم عفونت‌ها و به‌ویژه عفونت قارچی در بیماران MS بیشتر از افراد سالم است و بیماران MS به‌علت مصرف داروهای خودایمن، سیستم ایمنی ضعیف‌تری دارند؛ ازاین‌رو، زمینهٔ فعالیت عفونت‌ها به‌ویژه عفونت‌های قارچی فراهم است. عفونت‌های قارچی با تولید ترکیبات پروتئولیتیک مانند پروتئیناز A سبب افزایش فعالیت التهابی در اعصاب می‌شوند و شدت ضایعات دمیلینه را افزایش می‌دهند (۲۹)؛ ازاین‌رو، وجود عفونت قارچی در این بیماران سبب گسترش و پیشرفت بیماری می‌شود. مطالعه‌های بیشتر در زمینهٔ ارتباط عفونت‌ها (عوامل محیطی) و ایجاد بیماری MS ضروری به نظر می‌رسند.

در سال ۲۰۰۵، Sriram و همکاران گزارش کردند باکتری کلامیدیا پنومونیه[۱۸] در سیستم اعصاب مرکزی بیماران MS وجود دارد و عفونت این باکتری سبب ترشح سایتوکین‌های التهابی در سیستم اعصاب مرکزی می‌شود (۳۰).

نتایج مطالعه‌های یادشده به وجود عفونت در بیماران MS اشاره و با نتایج مطالعهٔ حاضر مطابقت دارند؛

ازاین‌رو، بررسی فراوانی بیماری‌زاهای فعال در سرم بیماران مالتیپل اسکلروزیس می‌تواند عامل تعیین‌کننده‌ای در تشخیص پیشرفت بیماری یا حتی جلوگیری از پیشرفت بیماری با تجویز رژیم دارویی مناسب باشد. باتوجه‌به نقش عوامل قارچی در پیشرفت بیماری‌های خودایمن مانند MS، پیشنهاد می‌شود مطالعه‌های بیشتری در این زمینه انجام شوند. بیماران MS به‌علت سیستم ایمنی ضعیف‌تر، فراوانی نسبی بیشتری در میزان آلودگی به عفونت‌های قارچی دارند. استفاده از آنتی‌بادی برای سنجش نمی‌تواند عامل مناسبی برای تعیین مدت زمان ادامهٔ تخریب یا فعال‌بودن عامل بیماری‌زا باشد؛ ازاین‌رو، در مطالعهٔ حاضر با تعیین حد تشخیص عامل عفونی (یعنی دست‌کم ۴۰ کپی DNA) می توان به فعال بودن تخریب و طول دورهٔ درمان پی برد. تشخیص عامل عفونی فعال و تجویز رژیم دارویی متناسب، عامل کمک‌کننده‌ای در جلوگیری از پیشرفت بیماری تلقی می‌شود؛ درحقیقت، عفونت قارچی را می‌توان با سایر روش‌های مولکولی و در کنار روش‌های سرولوژیک و کشت بررسی کرد. همچنین پیشنهاد می‌شود، ژن‌های هدف مقاومت و البته حضور DNA، آنتی‌ژن و آنتی‌بادی قارچی در مایع مغزی‌نخاعی بیماران بررسی شود.

References

(1) Goldenberg MM. Multiple sclerosis review. *Pharmacy and Therapeutics* 2012; 37(3): 124-175.

(2) Bertelson JA., Price BH. Depression and psychosis in neurological practice. *Neurology in Clinical Practice* 2004; 1(15): 75-103

(3) Lublin FD., Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology* 1996; 46(4): 907-911.

(4) Ransohoff RM., Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology* 2012; 12(9): 623-635.

(5) Ramagopalan SV., Herrera BM., Bell JT., Dyment DA., DeLuca GC., Lincoln MR., et al. Parental transmission of HLA-DRB1* 15 in multiple sclerosis. *Human Genetics* 2008; 122(6): 661-663.

(6) Ascherio A., Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 2007; 61(6): 504-513.

(7) Rolak LA. MS: The basic facts. *Clinical Medicine and Research* 2003; 1(1): 61-62.

(8) Amezcua L., McCauley JL. Race and ethnicity on MS presentation and disease course. *Multiple Sclerosis Journal* 2020; 26(5): 561-567.

(9) Sundström P., Juto P., Wadell G., Hallmans G., Svenningsson A., Nyström L., et al. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology* 2004; 62(12): 2277-2282.

(10) Handel AE., Giovannoni G., Ebers GC., Ramagopalan SV. Environmental factors and their timing in adult-onset multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology* 2010; 6(3): 156-166.

(11) Popescu BF., Pirko I., Lucchinetti CF. Pathology of multiple sclerosis: where do we stand? *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology* 2013; 19(4): 901-921.

(12) Farah CS., Lynch N., McCullough MJ. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Australian Dental Journal* 2010; 55(6): 48-54.

(13) Richardson M., Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections.

(15) Steyn L. Managing fungal skin infections in the pharmacy. *South African Pharmacist's Assistant* 2020; 20(3): 24-26.

(16) Shoham S., Levitz SM. The immune response to fungal infections. *British Journal of Haematology* 2005; 129(5): 569-582.

(17) Selosse MA., Strullu-Derrien C., Martin FM., Kamoun S., Kenrick P. Plants, fungi and oomycetes: a 400-million year affair that shapes the biosphere. *British Journal of Haematology* 2015; 129(5): 501-506.

(18) Wüthrich M., Deepe Jr GS., Klein B. Adaptive immunity to fungi. *Annual Review of Immunology* 2012; 23 (30): 115-148.

(19) Klein AS., Tortora GT., Malowitz R., Greene WH. Hansenula anomala: A new fungal pathogen: Two case reports and a review of the literature. *Archives of Internal Medicine* 1988; 148(5): 1210-1213.

(20) Benito-León J., Laurence M. The role of fungi in the etiology of multiple sclerosis. *Frontiers in Neurology* 2017; 16(8): 535-547.

(21) Saroukolaei SA., Ghabaee M., Shokri H., Khosravi A., Badiei A. Evaluation of APR1 gene expression in Candida albicans strains isolated from patients with multiple sclerosis. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2016; 9(5): 103-125.

(22) Shah Hosseini MH., Gharib Doust F., Allahyary E., Khoram Khourshid HR., Vand Yusef J. Detection of Mycoplasma DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. *Journal of Medical Council of I.R.I.* 2007; 25(2):178-191.

(23) Häusser-Kinzel S., Weber MS. The role of B cells and antibodies in multiple sclerosis, neuromyelitis optica, and related disorders. *Frontiers in Immunology* 2019; 8(10): 201-218.

(24) Virtanen JO., Jacobson S. Viruses and multiple sclerosis. *CNS and Neurological Disorders Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS and Neurological Clinical Microbiology and Infection* 2008; 14(7): 5-24.

(14) Lai GC., Tan TG., Pavelka N. The mammalian mycobiome: A complex system in a dynamic relationship with the host. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 2019; 11(1): e1438.
Disorders) 2012; 11(5): 528-544.

(25) Castelo-Branco A., Chiesa F., Conte S., Bengtsson C., Lee S., Minton N., et al. Infections in patients with multiple sclerosis: A national cohort study in Sweden. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 2020; 1(45): 102420.

(26) Ramos M., Pisa D., Molina S., Rábano A., Juarranz A., Carrasco L. Fungal infection in patients with multiple sclerosis. The Open Mycology Journal 2008; 2(1): 22-28.

(27) Pisa D., Alonso R., Carrasco L. Fungal infection in a patient with multiple sclerosis. *European Journal of Clinical Mmicrobiology and Infectious Diseases* 2011; 30(10): 1173-1180.

(28) Yoshitomi H., Sakaguchi N., Kobayashi K., Brown GD., Tagami T., Sakihama T., et al. A role for fungal β-glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *Journal of Experimental Medicine* 2005; 201(6): 949-960.

(29) Rumah KR., Linden J., Fischetti VA., Vartanian T. Isolation of Clostridium perfringens type B in an individual at first clinical presentation of multiple sclerosis provides clues for environmental triggers of the disease. *PloS one* 2013; 8(10): 759-763.

(30) Sriram S., Ljunggren-Rose A., Yao SY., Whetsell Jr WO. Detection of chlamydial bodies and antigens in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *The Journal of Infectious Diseases* 2005; 192(7): 1219-1228.

[1]- Multiple sclerosis
[2]- *Candida albicans*

[3]- *parasiticus*
[4]- *C. famata*
[5]- *C. glabrata*
[6]- *C. krusei*
[7]- *Herpes simplex virus 1*
[8]- *Herpes simplex virus 2*
[9]- *Adenoviruses*
[10]- *Staphylococcus aureus*
[11]- Aspergillus parasiticus
[12]- *Cryptococcus neoformans*
[13]- Anneling
[14]- *Aspergillus flavus*
[15]- *Saccharomyces cerevisiae*
[16]- *C. famata*
[17]- *Clostridium perfringens*
[18]- *Chlamydia pneumoniae*