Archive of SID

مجله علمی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
زمستان 1388،دوره یکم، شماره سوم، صفحه42-33

تعیین هویت کاندیداهای جدا شده از بیماران مبت لا به اونیکومایکوزیس با استفاده از روش های قارچ شناسی و مولکولی

محمد حسن شاه حسینی*[1و2]، دکتر محمد قهری[3]، محمد نعمتیان سوته[1]، دکتر سارا سعادتمند[1]، دکتر سید احمد حسینی[4]

1- گروه زیست‌شناسی ، واحد علوم و تحقیقات ،دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران،ایران.
2- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، ایران.
3- گروه میکروبشناسی، دانشگاه امام حسین، تهران، ایران.
4- آزمایشگاه رسالت، تهران،ایران.
*نویسنده مسئول: دکتر محمد حسن شاه حسینی- گروه میکروبیولوژی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی
shahhosseiny@yahoo.com

دریافت: 88/11/7 پذیرش: 88/12/17

چکیده

زمینه و هدف: اونیکومایکوزیس شایعترین بیماری ناخن محسوب می شود که توسط گونه های متفاوتی از قارچ ها شامل درماتوفیت ها، مخمرها و کپک های غیر درماتوفیتی ایجاد می شود. هدف از انجام این مطالعه تعیین هویت گونه های کاندیدای جدا شده از بیماران مبتلا به اونیکومایکوزیس کاندیدایی، با استفاده از روش مولکولی Seminested PCR است.

روش بررسی: نمونه های کاندیدا جدا شده از ناخن با آزمون های شناسایی فنوتیپی، بررسی رنگ کلنی روی محیط کروم آگار کاندیدا، تست لوله زایا و تولید کلامیدوسپور روی محیط کورن میل آگار و ژنوتیپی به نام Seminested PCR ، مورد بررسی قرار گرفتند. DNA ی همه نمونه ها با استفاده از روش جوشاندن استخراج شد و برای PCR مرحله اول از پرایمرهای CTSF و CTSR که قطعه Internal ITS2 (Transcribed Spacer2 را تکثیر می کند استفاده شد. محصول مرحله اول به عنوان DNAی الگو برای انجام PCR مرحله دوم با استفاده از پرایمر عقبی مرحله اول(CTSR) و در حضور پرایمرهای اختصاصی گونه به نام های CADET ، CPDET، CTDET، CGDET و CDDET که به ترتیب برای شناسایی گونه های کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا دابلینینسیس، استفاده شد. گونه مخمر با توجه به الگوی باندهای ایجاد شده روی ژل و اندازه آن تشخیص داده شد. جهت تائید محصول PCR از تعیین ترادف استفاده شد.

یافته ها : نتایج به دست آمده حاصل از بکارگیری روش تشخیصی Seminested PCR بر روی نمونه های بالینی، شامل شناسایی و تعیین هویت 12 مورد کاندیدا آلبیکنس، 8 مورد کاندیدا پاراپسیلوزیس، 6 مورد کاندیدا تروپیکالیس، و 4 مورد کاندیدا گلابراتا بود. کاندیدا دابلینینسیس در هیچ نمونه ای مشاهده نشد.

نتیجه گیری: با استفاده از روش Seminested PCR می توان، گونه های پاتوژن کاندیدا بدست آمده از افراد مبتلا به عفونت اونیکومایکوزیس کاندیدایی را، با حساسیت و ویژگی بالا شنا سایی نمود.

واژه های کلیدی: اونیکومایکوزیس کاندیدایی، Seminested PCR ، ITS2

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

از واژه اونیکومایکوزیس برای توصیف عفونت های ناشی از قارچ ها که ناخن را درگیر می کنند، استفاده می شود. اونیکومایکوزیس شایعترین بیماری ناخن محسوب می شود(۲و۱). این عارضه توسط سه گروه از قارچ ها شامل درماتوفیت ها، مخمرها و کپک های غیر درماتوفیتی ایجاد می شود(۳). مهمترین عوامل عفونت های قارچی ناخن در انگشتان دست، عوامل کاندیدایی هستند در حالی که درماتوفیت ها عامل اصلی اونیکومایکوزیس ناخن پا هستند(٤). عوامل کاندیدایی، عامل بروز نزدیک به نیمی از موارد اونیکومایکوزیس ناخن دست هستند(۷-۵). میزان شیوع اونیکومایکوزیس با سن، فاکتورهای زمینه ای، شغل، آب و هوا، محیط زندگی و مسافرت های زیاد ارتباط دارد. اونیکومایکوزیس کاندیدایی در زنان رایج است. گونه های کاندیدا، مخمرهای کوچک با دیواره سلولی نازک هستند که از طریق جوانه زدن تکثیر می یابند. هفت گونه در جنس کاندیدا، عوامل فرصت طلب شناخته شده می باشند، در حالی که بیماری زایی سایر گونه ها به صورت موردی گزارش شده است(۹و۸). در حال حاضر، شناسایی عوامل کپکی و مخمری، بخصوص کاندیدا آلبیکنس به عنوان پاتوژن مسبب عفونت ناخن دست، افزایش یافته است(۱۰). اونیکومایکوزیس کاندیدایی در افرادی که دچار ضعف یا نقص سیستم ایمنی هستند، رو به افزایش است. عوامل مهار کننده سیستم ایمنی مثل: شیمی درمانی در بیماران سرطانی، پرتو درمانی، استفاده از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف، ایدز، دیابت شیرین، موجب مهاجم شدن این قارچ ها می شوند. آسیب در سیستم ایمنی موضعی ناخن در اثر ضربه ، در معرض رطوبت قرار داشتن انگشتان دست به مدت طولانی، مواد شیمیایی مضر ، مواد شوینده، از جمله عوامل مستعد کننده افراد به اونیکومایکوزیس کاندیدایی است(۱٤-۱۱). به دلایل فوق، تشخیص اونیکومایکوزیس کاندیدایی مهم است چرا که، وضعیت ایمنی شخص را نشان می دهد. شواهد زیادی وجود دارد که تشخیص اونیکومایکوزیس کاندیدایی به شناسایی عفونت پیشرفته HIV کمک کرده است(۱۲). مهمترین چالش در مواجهه با بیماری کاندیدیازیس، ضایعات با عوامل اتیولوژیک گونه های کاندیدا به غیر از کاندیدا آلبیکنس است، که به علت مقاومت دارویی، نسبت به داروهایی متداول ضد قارچی می باشد. به عنوان مثال، گونه های کاندیدا کروزئی و کاندیدا گلابراتا به فلوکونازول و گونه های کاندیدا لوزیتانیا و کاندیدا تروپیکالیس به آمفوتریسین B مقاوم می باشند. بنابراین تعیین هویت سریع گونه های بیماری زا الزامی است(۱٦و۱٥). خوشبختانه تکنیک های مولکولی شناسایی بر پایه DNA ، افتراق صحیح و سریع گونه های مختلف کاندیدا را ممکن می سازد. روش های متعددی از گذشته تا حال برای تعیین هویت گونه های بیماری زای کاندیدا به کار رفته است. این روش ها را به طور کلی می توان به دو گروه فنوتیپیک و ژنوتیپیک تقسیم نمود. روش های فنوتیپیک به طور مثال شامل بررسی مرفولوژی مخمرها در محیط عصاره مالت آگار، بررسی روش های جذب و تخمیر قندها، روش های سرولوژی، استفاده از محیط های رنگ زای تجاری همانند محیط کشت کروم آگار کاندیدا و روش های دیگر را نام برد(۱۸و۱۷). روش های تشخیصی ژنوتیپی نیز متنوع می باشند. از جمله آن می توان به استفاده از پرایمرهای اختصاصی در PCR ، تعیین توالی نواحی ژنی خاص، و real-time PCR اشاره نمود(۲۰و۱۹). تمام روش های اشاره شده مفید بوده و هر کدام مزایا و محدودیت های خاص خود را دارند. اگرچه روش های سنتی مانند جذب و تخمیر قندها برای تعیین گونه های مخمری، از جمله کاندیدا قابل استفاده است، ولی این روش بسیار وقت گیر بوده و برای بیمار و پزشک مفید نیست زیرا حداقل به یک تا دو هفته زمان برای خواندن نتایج نیاز است. این روش ها همچنین غیر حساس و پرزحمت است(۲۱). روش های دیگر تشخیص، شامل ردیابی آنتی بادی، عمدتا در افراد ایمنوساپرس غیرقابل استفاده است زیرا این افراد توانایی پاسخ به عفونت به وسیله تولید آنتی بادی را ندارند و یا در صورت تولید آنتی بادی، مقدار آن برای ردیابی ناکافی می باشد(۲۲). ولی استفاده از روش های تشخیصی بر پایه DNA همانند PCR دارای حساسیت و ویژگی بالا می باشد. در این مطالعه، ضمن انجام آزمایشات متداول جهت شناسایی گونه های پاتوژن و شایع کاندیداهای جدا شده از

www.SID.ir

Archive of SID

ناخن دست بیماران ،از روش مولکولی به نام Seminested PCR برای شناسایی کاندیداهای مهم پاتوژن شامل کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا دابلینینسیس استفاده شد(۲۳و۲۲).

روش بررسی

در این مطالعه، ۳۰ ایزوله مخمری جدا شده از بیماران مبتلا به اونیکومایکوزیس ناخن دست، جهت تعیین هویت گونه های کاندیدا با استفاده از روش های متداول و روش مولکولی Seminested PCR ، مورد بررسی قرار گفت. سوش ها شامل دو گروه بودند: الف) سویه های کاندیدا که واجد هویت مشخص بودند. ب) ایزوله های مخمری بدست آمده از ناخن افراد بیمار.

کشت بر روی محیط کروموژنیک کروم آگار کاندیدا: از نمونه های کاندیدا گروه اول که کاندیدا آلبیکنس،کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا دابلینینسیس را شامل می شد برای کنترل آزمایشات و همچنین بهینه نمودن PCR ، استفاده شد. با استفاده از لوپ استریل، مقدار کمی از مخمرهای گونه های مختلف بر روی محیط کشت افتراقی کروم آگار کاندیدا(CHROMagar Company, France) کشت داده شد. محیط های کشت تلقیح شده، درون انکوباتور با دمای۳۷°C نگهداری شد و بعد از گذشت ٤٨ ساعت، کلنی های ظاهر شده از نظر مورفولوژی کلنی و رنگ پیگمان تولید شده مورد بررسی قرار گرفتند.این تست بر روی ایزوله های جدا شده از نمونه های ناخن نیز انجام شد.

آزمون لوله زایا : برای انجام آزمون لوله زایا که یکی از ابتدایی ترین روش های تشخیصی کاندیدا آلبیکنس است، توسط یک آنس استریل از نمونه کشت تازه بیمار برداشت کرده و آن را درون نیم میلی لیتر از سرم انسان انتقال داده و بخوبی مخلوط گردید. سوسپانسیون فوق در دمای۳۷°C به مدت ۲ تا ۳ ساعت نگهداری شد، سپس وجود یا فقدان لوله زایا در زیر میکروسکوپ بررسی شد.

ایجاد کلامیدوکونیدی روی محیط کورن میل آگار دارای ۱ درصد توئین ۸۰ (*CMA-T80*): تمام مخمرهای مورد بررسی ابتدا بر روی محیط سابورو کشت داده شدند. سپس ایزوله های کشت داده شده بر روی محیط کورن میل آگار حاوی توئین۸۰ (Himedia) تلقیح شده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰°C نگهداری شدند. پس از طی مدت انکوباسیون، با استفاده از درشت نمایی ضعیف میکروسکوپ، وجود یا عدم وجود کلامیدوکونیدی مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج DNA ***کاندیدا از محیط کشت*** : جهت استخراج DNA از کاندیداهای رشد یافته در محیط کشت از روش جوشاندن استفاده گردید. برای این منظور یک لوپ از کلنی تازه را برداشته و به تیوب ۱/۵میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر منتقل گردید. سپس تیوب در درون آب در حال جوش قرار گرفت. پس از گذشت ۲۰ دقیقه تیوب را خارج و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع رویی که حاوی DNA مخمر می باشد را وارد تیوب جدید کرده و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰ – درجه سانتیگراد نگهداری شد.

واکنش PCR مرحله اول: برای انجام مرحله اول PCR از مواد زیر با غلظت های ذکر شده برای یک واکنش ۲۵ میکرولیتری استفاده شد: ۲/۵میکرولیتر از بافر 10X ، ۰/۷۵میکرولیتر MgCl2 (50mM) ، ۱ میکرولیتر dNTPs (10mM) ،۱میکرولیتر از پرایمر جلویی CTSF ، ۱میکرولیتر از پرایمر عقبی CTSR ، ۰/۲۵میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (5u/µl) ، ۳ میکرولیتر DNA الگو و ۱۵/۵میکرولیتر آب مقطر دیونیزه شده. سیکل های گرمایی دستگاه ترموسایکلر برای انجام PCR مرحله اول بدین شرح بود: دناتوراسیون ابتدایی ۹٤°C به مدت ۲ دقیقه که با ۳۰ سیکل به صورت زیر دنبال می شود: دناتوراسیون ۹٤°Cبه مدت ۱ دقیقه، اتصال ٦۰°C به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و یک مرحله تکثیر انتهایی ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه.

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش PCR مرحله دوم: ۲/۵میکرولیتر از بافر 10X ، ۰/۷۵میکرولیتر MgCl2 (50mM) ، 1 میکرولیتر dNTPs (10 mM)، ۱ میکرولیتر پرایمر عقبی CTSR ، ۱ میکرولیتر پرایمر اختصاصی گونه، ۰/۲۵میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase(5u/µl) ، ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۱۶/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه شده تا حجم کل را به ۲۵ میکرولیتر برساند. پروتکل دمایی برای انجام PCR مرحله دوم همانند مرحله اول است، ولی تعداد سیکل ها از ۳۰ سیکل به ۲۵ سیکل کاهش یافت.

مشاهده محصول PCR : محصول PCR مرحله اول(بین bp ۳۰۹ تا bp ۴۱۳ متناسب با نوع کاندیدا) در ژل آگارز ۱/۸% و محصول PCR مرحله دوم در ژل آگارز ۲/۵% حاوی اتیدیوم بروماید (سیناژن 10 mg/ml) در بافر TBE 1X الکتروفورز گردید.

تعیین اختصاصیت و حساسیت تست PCR بهینه شده : برای تعیین اختصاصیت تست PCR بهینه شده، DNA گونه های کاندیدا و DNA جنس های باکتریایی مختلف و همچنین نمونه DNA انسان را استخراج کرده و با انجام PCR روی این نمونه ها، ویژگی تست مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین حساسیت تست PCR بهینه شده، رقتهای سریال از گونه کاندیدا آلبیکنس تهیه شد و تعداد مخمرها با استفاده از لام نئوبار و زیر میکروسکوپ نوری شمارش شد. سپس از هر رقتی که به این ترتیب آماده گردید مقدار ی از آن را برداشته و DNA با روش جوشاندن استخراج شد. سپس با استفاده از DNA های استخراج شده و نمونه کنترل مثبت و منفی، حساسیت تست PCR تعیین گردید.

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

یافته ها

در این مطالعه ، ۳۰ ایزوله مخمری جدا شده از ناخن دست بیماران مبتلا به اونیکومایکوزیس به روش مولکولی Seminested PCR در کنار روش های متداول تشخیصی بر اساس خصوصیت مرفولوژی، تعیین هویت شدند. ۳۰ گونه کاندیدا شامل ۱۲ مورد کاندیدا آلبیکنس، ۸ مورد کاندیدا پاراپسیلوزیس، ٦ مورد کاندیدا تروپیکالیس و ٤ مورد کاندیدا گلابراتا بود. در هیچ یک از نمونه های بالینی کاندیدا دابلینینسیس مشاهده نشد.

شناسایی فنوتیپی: گونه های کاندیدا که از قبل هویت آن برای ما مشخص بود، در محیط کشت کروم آگار کاندیدا کشت داده شدند. کلنی های کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا دابلینینسیس به ترتیب به رنگ سبز، صورتی پر رنگ، کرم- صورتی کم رنگ، آبی و سبز در این محیط نمایان شدند. البته شناسایی از روی رنگ (با توجه به رنگ های معرفی شده در کاتالوگ شرکت سازنده) بین گونه های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس دشوار می باشد و در ضمن رنگ کلنی حاصل از مخمر کاندیدا پاراپسیلوزیس غیر اختصاصی می باشد. آزمون لوله زایا در گونه های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس مثبت بود. بر روی این پنج گونه کاندیدا، تست کورن میل آگار توئین ۸۰ انجام شد. نتایج به دست آمده شامل مشاهده بلاستوسپور، هایف های کاذب و حقیقی به همراه کلامیدوکونیدی در کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس، و در مورد کاندیدا گلابراتا فقط بلاستوسپور و در کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا تروپیکالیس علاوه بر بلاستوسپور، هایف های کاذب نیز مشاهده گردید.

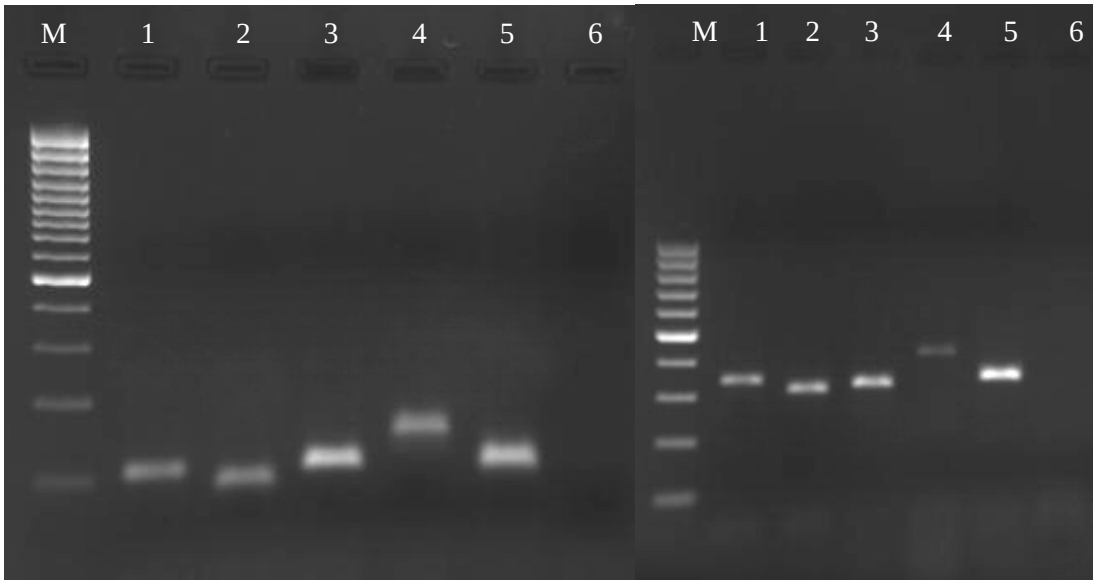
نمونه های کاندیدایی جدا شده از ناخن دست بیماران به محیط کشت سابورو و سپس کروم آگار کاندیدا تلقیح شدند .آزمون لوله زایای ۱۲ ایزوله از ۳۰ ایزوله جدا شده از نمونه های ناخن، که بر روی کروم آگار کاندیدا کلنی های سبز روشن تولید کرده بودند، مثبت بود و روی محیط CMA T80 کلامیدوکونیدی تولید کردند. ۸ ایزوله، کلنی های صورتی کم رنگ ایجاد ایجاد نمودند و روی محیط CMA T80 ، بلاستوسپور به همراه هایف های کاذب تولید کردند و جواب آزمون لوله زایا در آن ها منفی بود. ٤مورد نیز در محیط رنگ زای کروم آگار کاندیدا، کلنی های صورتی براق

www.SID.ir

Archive of SID

و گنبدی شکل تولید کردند و تست لوله زایای آن ها، منفی و روی محیط CMA T80 فقط بلاستوسپور تولید کردند. ایزوله نیز، کلنی هایی به رنگ آبی ایجاد کرده و آزمون لوله زایای آنها منفی، و در ضمن روی محیط CMA T80، بلاستوسپور به همراه هایف های کاذب تولید کردند.

شناسایی ژنوتیپی: شکل ۱ الکتروفورز محصولات PCR مرحله اول و دوم تکنیک snPCR ، بعد از بهینه سازی است. در این مورد DNA ی الگو، به طریق جوشاندن از گونه های کاندیدا که هویت آن ها مشخص بود استخراج گردید.



شکل 1b　　شکل1a

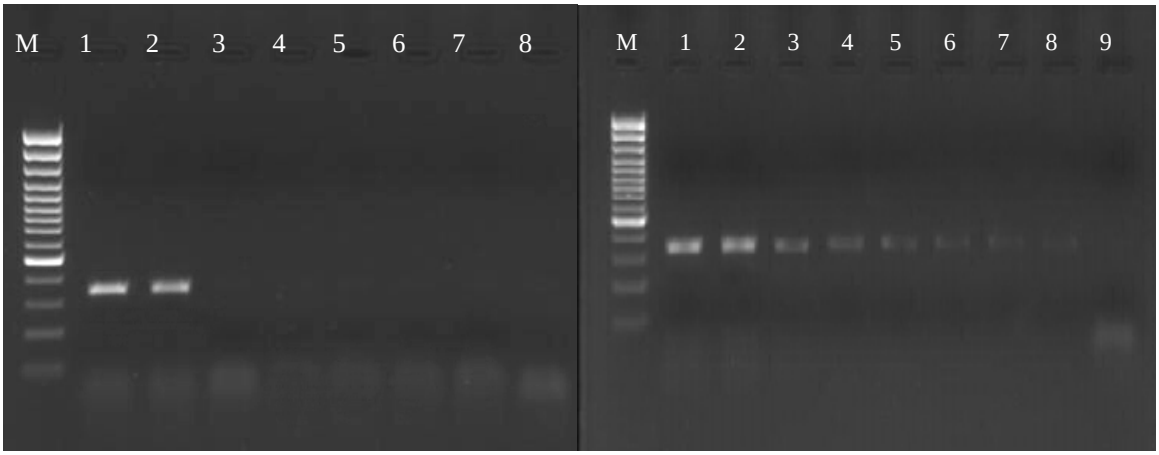
شکل ۱ - محصولات مرحله اول و دوم PCR بهینه سازی شده.

شکل 1a – لاین M : سایز مارکر فرمنتاس 100bp DNA ladder ، 1: محصول PCR مرحله اول حاصل از DNAی ژنومی کاندیدا آلبیکنس، 2: کاندیدا پاراپسیلوزیس، 3: کاندیدا تروپیکالیس، 4: کاندیدا گلابراتا، 5: کاندیدا دابلینینسیس، 6: کنترل منفی. شکل 1b- لاین M : سایز مارکر فرمنتاس 100bp DNA Ladder plus ، 1 : محصول snPCR حاصل از DNAی کاندیدا آلبیکنس، 2: کاندیدا پاراپسیلوزیس، 3: کاندیدا تروپیکالیس، 4: کاندیدا گلابراتا، 5: کاندیدا دابلینینسیس، 6: کنترل منفی.

حساسیت تست snPCR در این مطالعه، ۷ سلول مخمر کاندیدا آلبیکنس تعیین شد. همچنین این تست دارای ویژگی بسیار بالا بوده به طوری که بجز با DNA کاندیدا آلبیکنس با هیچ کدام از DNA های بکار رفته در این آزمایش واکنش نشان نداد. (شکل ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 2 a شکل 2 b

شکل ۲- حساسیت و ویژگی تست PCR .

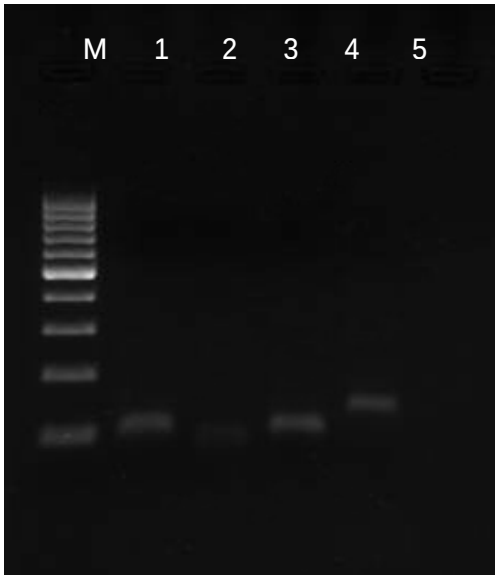
شکل 2a- لاین M: سایز مارکر فرمنتاس 100bp DNA Ladder plus ، 1: نمونه کنترل مثبت، 9-2 : نمونه های مشخص و به ترتیب شامل2: 42250 CFU ، 3: 7605 CFU ، 4: 1690 CFU ، 5: 338 CFU ، 6: 64 CFU ، 7: 18 CFU ، 8: 7 CFU ، 9: کنترل منفی.

شکل 2 b – لاین M : سایز مارکر فرمنتاس 100bp DNA Ladder plus ، 1: نمونه کنترل مثبت(کاندیدا آلبیکنس)، 2: کاندیدا آلبیکنس، 3: DNAی انسان، 4: DNAی استافیلوکوکوس اورئوس، 5: DNAی سودوموناس آئرژنوزا، 6: DNAی اشریشیا کلی ، 7: DNAی باسیلوس سرئوس، 8: کنترل منفی.

نتایج به دست آمده حاصل از بکارگیری روش تشخیصی Seminested PCR بر روی نمونه های بالینی، شامل شناسایی و تعیین هویت ۱۲ مورد کاندیدا آلبیکنس، ۸ مورد کاندیدا پاراپسیلوزیس، ٦ مورد کاندیدا تروپیکالیس و ٤ مورد کاندیدا گلابراتا بود. (شکل۳). نتیجه آزمون ژنوتیپی با آزمون های فنوتیپی کاملا مطابقت داشت. جهت بررسی و تایید محصولات PCR مرحله دوم مربوط به گونه های مختلف کاندیدا، قطعات DNA توسط تکنیک تعیین ترادف، تعیین توالی شدند. مقایسه توالی های حاصل با ترادفهای موجود از طریق برنامه BLAST ، مطابقت حدود ۱۰۰درصد را نشان داد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- محصولات PCR مرحله دوم گونه های کاندیدا مربوط به نمونه های بالینی.

لاین M: سایز مارکر فرمنتاس DNA Ladder 1oobp .1: کاندیدا آلبیکنس. 2: کاندیدا پاراپسیلوزیس. 3: کاندیدا تروپیکالیس. 4: کاندیدا گلابراتا. 5: کنترل منفی.

بحث

عفونت های فرصت طلب ناشی از مخمرها در دهه های اخیر اهمیت زیادی یافته است. عوامل مهار کننده سیستم ایمنی مثل شیمی درمانی در بیماران سرطانی، پرتو درمانی، استفاده از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف، درمان با کورتیکواستروییدها ، ایدز، دیابت شیرین و سایر عوامل، موجب مهاجم شدن این قارچ ها می شوند(۱۴-۱۱). اونیکومایکوزیس عفونت قارچی شایعی است که توسط قارچ های مختلف از جمله کاندیداها بوجود می آید(۲و۱). یکی از عواملی که موجب کاهش مرگ و میر و شیوع عفونت و نیز کاهش هزینه های بیماری های عفونی می گردد، تشخیص سریع و دقیق می باشد. با استفاده از روش های تشخیص آزمایشگاهی مرسوم، همانند به کارگیری محیط های کشت معمولی، مانند سابورو دکستروز آگار، امکان تعیین گونه های کاندیدا وجود ندارد. در میان روش های ساده تشخیص گونه های شایع و مهم مخمرها، روش کشت روی محیط کروموژنیک کروم آگار کاندیدا، بسیار ساده و در عین حال معتبر به نظر می رسد(۱۸). مطالعات انجام شده در این زمینه نشان داد که استفاده از محیط کشت کروم آگار کاندیدا تنها محدود به شناسایی چند گونه از کاندیداهای پاتوژن می باشد. پس از کشت مخمرها روی این محیط، کلنی های کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپکالیس و کاندیدا کروزئی به ترتیب به رنگ های سبز، آبی و صورتی و سایز مخمرها به رنگ غیر اختصاصی سفید، خاکستری و غیره رشد می کنند. همچنین در این محیط، کشت گونه های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس هر دو به رنگ سبز رشد می کنند در نتیجه شناسایی آنها دشوار است. بعلاوه نسبت به روش های مولکولی نوین ، به زمان بیشتری برای دستیابی به جواب نیازمند است. هر چند این محیط کشت برای شناسایی گونه های شایع و پاتوژن کاندیداها معتبر و مفید بوده ولی شناسایی کلیه گونه ها با بکارگیری این محیط امکان پذیر نبوده و بایستی از سایر روش های فنوتیپیک یا ژنوتیپیک کمک گرفت(۲۷-۲۵). امروزه روش های مولکولی در شناسایی صحیح و سریع گونه ها کمک شایانی می نماید لذا در این مطالعه استفاده از روش مولکولی بر پایه PCR برای تعیین هویت گونه های شایع و بیماریزای کاندیدا مورد بررسی قرار گرفت. در طی دهه اخیر، جهت تشخیص PCR کاندیدیازیس، ژن های هدف مختلفی، همچون منطقه متغیر D1/D2 در ناحیه ژنی

www.SID.ir

Archive of SID

rDNA ، hsp90 ، ERG11 ، کیتین سنتاز، آسپارتیل پروتئیناز ترشحی، DNA میتوکندریایی، اکتین، توبولین، تعدادی از قطعات ژنی rRNA مشتق از نواحی نسخه برداری شده درونی(ITS) و 5S rRNA ، 18S rRNA و 28S rRNA بکار گرفته شده است. در این مطالعه، DNA هدف، قطعه rDNA بود. از این قطعه ژنی، کپی های متعددی(۵۰ تا ۱۰۰) در هر ژنوم کاندیدا وجود دارد. بطور معمول تست PCR در صورتی که DNA هدف واجد توالی های تکرار شونده باشد نسبت به اهداف تک کپی ، از حساسیت بیشتری برخوردار می باشد(۲۹و۲۸). از جمله زیر مجموعه های فوق العاده حفاظت شده rDNA ، قطعات ITS می باشد که در میان گونه های مختلف کاندیدا دارای سکانس های منحصر بفرد است. بنابراین با استفاده از پرایمر های مرتبط به این نقاط، شناسایی گونه های مختلف کاندیدا، امکان پذیر شد. اگرچه اخیرا چندین آزمون PCR برای تکثیر rDNA گزارش شده، اما شناسایی گونه ها شامل انجام آزمون های بیشتر روی محصول تکثیر یافته است. از جمله این مراحل می توان به هضم آنزیمی محصول PCR بوسیله آنزیم های محدودالاثر(۳۱و۳۰)، استفاده از پروب های نشان دار با مواد رادیو اکتیو و آنزیم های نشان دار و تعیین توالی محصول تکثیر شده را نام برد(۳۵-۳۲). بسیاری از این پروسه ها، زمان بر، پر هزینه و با توجه به بکارگیری مواد رادیو اکتیو، خطرناک هستند. در مقابل روش snPCR که در این مطالعه بکار گرفته شد به مدت زمان کمتری (به طور میانگین ۵ تا ٦ ساعت) نیاز داشته و به پروب های هیبریدیزاسیون و مواد رادیو اکتیو، احتیاج ندارد. Fujita و همکاران از سیستم Multiplex PCR برای تکثیر قطعات ژنی ITS1 و ITS2 استفاده کردند. در روش بکار گرفته شده فوجیتا، به تعداد DNA الگو بیشتری احتیاج بود در نتیجه نسبت به روش snPCR از حساسیت کمتری برخوردار است(۳۳و۲۳). میرهندی و همکاران روش PCR-FSP را برای تکثیر قطعه ITS1 و ITS2 و شناسایی گونه های کاندیدا استفاده نمود، اما افتراق کاندیدا آلبیکنس از کاندیدا دابلینینسیس با این روش میسر نبود(۳٦). کارایی روش تشخیصی snPCR با توجه به نتایج به دست آمده برای تشخیص و تعیین هویت ایزوله های جدا شده از ناخن، نشان داده شد. لذا این روش به عنوان یک روش سریع، مطمئن و دارای حساسیت و ویژگی بالا در تشخیص گونه های بیماری زای کاندیدا در آزمایشگاه های بالینی توصیه می شود.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از روش های متداول تشخیصی برای شناسایی گونه های پاتوژن کاندیدا، همانند بکارگیری محیط کشت افتراقی کروم آگار کاندیدا، محدود به چند گونه می باشد و به زمان بیشتری برای دستیابی به جواب نیازمند است. از طرفی با استفاده از روش مولکولی snPCR ، در مدت کوتاه و با حساسیت و ویژگی بالا، گونه های پاتوژن کاندیدا تعیین هویت شدند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقای داورزنی سوپروایزر آزمایشگاه رسالت ، خانم بیرقی، خانم عبدلی و پرسنل آزمایشگاه رسالت به خاطر راهنمایی های ارزنده و همکاری های صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R, Knnikov N, Gupa AK, Summerbell R. *A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns*. J Am Acad Dermatol 2000; 43: 641-648.

2- Veer P, Patwardhan NS, Damle AS. *Study of onychomycosis: Prevailing Fungi and Pattern of infection*. Indian J Med Microbiol 2007; 25(1): 53-56.

3- Midgley G, Moore MK. *Nail infections*. Dermatol Clin 1996; 14(1): 41-49.

4- Anaisse E. Mecinnis MR , Pfaller , MA. Clinical Mycology. Churchill Livingstone, *2003*: 95-239.

5- Lange M, Roszkiewicz J, Sczerknowska-Dobosz A, Jasiel-Walikowska E, Bykowska B. *Onychomycosis is no longer a rare finding in children.* Mycoses. 2006; 49:55-59.

6- Chi CC, Wang SH, Chou MC. *The causative pathogens of onychomycosis in southern Taiwan.* Mycoses . 2005;48: 413-420.

7- Foster KW, Ghannoum MA, Elewski BE. *Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United states from 1999 to 2002*. J Am Acad Dermatol .2004;50: 748-752.

8- Dalle F, Franco N, Lopez J. *Comparative genotyping of Candida albicans bloodstream and non-bloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus.*J Clin Microbial 2000;38:4554-4559.

9- Karahan ZC, Guriz H, Agirbasli H,Balaban N, Gocmen JS, Aysev D, et al. *Genotype distribution of Candida albicans isolates by 25S intron analysis with regard to invasiveness.*Mycoses 2004;47:465-469.

10- Veer p, Patwardhan NS, Damle AS. *Study of onychomycosis: prevailing fungi and pattern of infection.* Indian J Med Microbiol. 2007;25: 53-56.

11- Gupta AK, Taborda P, Taborda V, Gilmour J, Rachlis A, Salit I, et al. *Epidemiology and prevalence of onychomycosis in HIV positive individuals*. Int J Dermatol . 2000;39: 746-753.

12- Surjushe A, Kamath R, Oberai C, Saple D, Thakre M, Dharmshale S, et al. *A clinical and Mycological study of onychomycosis in HIV infection.* Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2007;73:397-401.

13- Chun DK, Lee UH, Park HS, Choi JC. *Onychomycosis in a premature infant caused Candida tropicalis.* J Eur Acad Dermatol Venereol. 2004;18:617-618.

14- Daniel CR, Gupta AK, Daniel MP, Sullivan S. *Candida infection of the nail: role of Candida as a secondary pathogen*. Int J Dermatol. 1998;37:904-907.

15- Yun-liang Y, Shu-Ying L , Hsiao-Hsu C, Hsiu-jung L. *The trend of susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of Candida species from 1990 to 2002 in Taiwan*, BMC Infection Diseases 2005;5:99.

16- Papass PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ et al. *Guidelines for treatment of candidiasis.* Clin. Infect. Dis. 2004. 15, 161-189.

17- Del Castillo L, Bikandi J, Nieto A, Quindos G, Sentandreu R, Ponton J: *Comparison Of morphotypic and genotypic methods for strain delineation in Canada.* Mycoses 1997, 40:445-450.

18- Freydie're AM, Parant F, Chaux C, Gille Y. *Candida ID, a new chromagenic medium compared to Albicans ID2.* Clin Microbial Infect 2000, 6(supp1.1): 181.

19- Lott TJ, Burns BM, Zancope-Oliveira R, Elie DM, Reiss E: *Sequence analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) from yeast species within genus Candida*. Current Microbiol 1998,36:63-69.

20- Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, Limaye P, Cookson BT: *Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes.* J Clin Mirobiol 2000, 38:2302-2310.

21- Ajello L, Hay RJ . Medical mycology. Ninth edition, Arnold Publication Unicelluar Ascomycetous . Candida species 1999; 423-450.

22- Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU: *Seminested PCR for diagnosis of candidemia: Comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification.* J Clin Microbiol 2002; 40: 2483–2489.

www.SID.ir

Archive of SID

23- Suhail Ahmad Eiman Mokaddas Noura Al-Sweih ZiaU. *Khan Phenotypic and Molecular Characterization of Candida dubliniensis Isolates from Clinical Specimens in Kuwait*. Med Princ Pract 2005;14(suppl 1):77–83.

24- Arjuna NB. Ellepola and Christine J. Morrison. *Laboratory diagnosis of invasive Candidiasis.* The Journal of Microbiology. 2005;43: 65- 84.

25- Fricker-Hidalgo H, Orenga S, Lebeau B, Pelloux H, Brenier-Pinchart MP. *Evaluation of Candida ID, a new chromogenic medium for fungal isolation and preliminary identification of some yeast species.* J Clin Microbial 2005; 39:1647-1649.

26- Jafari A, Anvari MH. , Ghaforzade M. *Identification of 150 Candida isolates by using Candida CHROM agar and Candida ID agar*. Kosar Med. J. 2007; 11(4): 325-330.

27- Mirhendi H, Makimora K, Shidfar MR , Hosseinpour L. *Identification of Candida species by using CHROMagar Candida.* Hamedan Med. J. 2008; 13(4):11-15.

28- Mitchel T G, Sandin RL, Bowman BH, Meyer W, Merz WG. *Molecular mycology: DNA probes and application of PCR technology*. J. Med. Vet. Mycol.1994. 32(Suppl. 1): 351- 366.

29- Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeaupuis J P et al .*Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections.* Med. Mycol.1998; 36(Suppl. 1):249- 257.

30- Morace G, Pagano L , Sanghinetti M, Posteraro B, Mele L , Equitani F et al. *PCR-restriction enzyme analysis for detection of Candida DNA in blood from febrible patiens with hematological malignancies*. J. Clin. Microbiol. 1999;37:1871-1875.

31- Williams D W, Wilson M J, Lewis M A, Potts A J. *Identification of Candida species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA.* J. Clin. Microbiol.1995; 33:2476-2479.

32- Botelho AR, Planta RJ. *Specific identification of Candida albicans by hybridization with oligonucleotides derived from ribosomal DNA internal spacers*. Yeast 1994; 10:709-717.

33- Fugita S, Senda Y, Nakagughi S, Hashimoto T. *Multiplex PCR using internal transcribed spwcer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strain*. J. Clin. Microbiol.2001; 39:3617-3622.

34- Loeffler J, Hebart H , Magga S , Schemidt D , Kligspor L , Tollemar et al.*Identification of rare Candida species and other yeast by polymerase chain reaction and slot blot hybridization.* Diag. Microbiol. Infect. Dis. 2000a. 38, 207-212.

35- Graf B, Troast A , Eucker J , Gobel UB, Adam T. *Rapid and simple differentiation of C. dubliniensis from C. albicans.* Diag. Microbiol. Infect. Dis. 2004. 48, 149-151.

36- Mirhendi SH, Adin H , Shidfar MR , ordbacheh P , Hashemi SJ , Moazeni M , Hosseinpur L , Rezaie Matehkolaie A. *Identification of pathogenic Candida species by PCR-Fragment Size Polymorphism (PCR-FSP) method.* . Med. Faculty J. Tehran medical school.2008; 66(9): 639-645.

www.SID.ir