مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۳۳/هفته اول خرداد ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۱۹ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۱۲

شناسایی و فراوانی گونه‌های کاندیدا در بیماران مبتلا به اشکال مختلف کاندیدیازیس در شهر اصفهان با استفاده از روش PCR-RFLP

رسول محمدی[۱]، دکتر سید حسین میرهندی[۲]، دکتر محمد حسین یادگاری[۳]،
دکتر شهلا شادزی[۴]، نیلوفر جلالی‌زند[۵]

خلاصه

مقدمه: کاندیدیازیس بیماری قارچی شایعی است که توسط گونه‌های مختلف جنس کاندیدا ایجاد می‌شود. از آن جایی که روش‌های سنتی برای شناسایی این مخمرها وقت‌گیر و در مواردی ناموفق است، تکنیک‌های جدید مولکولی مبتنی بر تفاوت‌های DNA رویکردی مفیدتر و دقیق‌تر است. هدف از مطالعه‌ی حاضر شناسایی گونه‌های رایج عامل ایجادکننده‌ی این بیماری و بررسی شیوع آن‌ها در شهر اصفهان با استفاده از روش PCR-RFLP بود.

روش‌ها: DNAی ژنومی مخمر از کشت تازه و با استفاده از فیلترهای FTA استخراج و ناحیه‌ی ITS1-ITS2 با روش PCR تکثیر و با استفاده از آنزیم محدودالاثر MspI برش داده شد. محصولات RFLP روی ژل آگارز الکتروفورز گردید و گونه‌ی مخمر بر حسب تفاوت الگوی باندهای به دست آمده شناسایی شد.

یافته‌ها: ۱۸۲ جدایه از نقاط مختلف بدن مورد بررسی قرار گرفت. ۸۶ جدایه (۴۷/۲ درصد) به عنوان کاندیدا آلبیکنس، ۳۱ جدایه (۱۷ درصد) کاندیدا پاراپسیلوزیس، ۱۹ جدایه (۱۰/۴ درصد) کاندیدای کفیر، ۱۵ جدایه (۸/۲ درصد) کاندیدا تروپیکالیس، ۱۴ جدایه (۷/۷ درصد) کاندیدا گلابراتا، ۱۴ جدایه (۷/۷ درصد) کاندیدا کروزه‌ای و ۳ جدایه (۱/۶ درصد) کاندیدا گیلیرموندی شناسایی شدند. در مجموع ۴۷/۲ درصد گونه‌های آلبیکنس و ۵۲/۸ درصد گونه‌ها غیر آلبیکنس بودند.

نتیجه‌گیری: افزایش گونه‌های غیر آلبیکنسی به دلیل مقاومت‌های دارویی بیش‌تر آن‌ها به داروهای ضد قارچی نسبت به گونه‌ی آلبیکنس از موضوعات مهم عفونت‌های قارچی است که بیانگر ضرورت بررسی‌های دقیق‌تر اپیدمیولوژیک است. این مطالعه می‌تواند راه‌گشای محققان برای مطالعات کاربردی‌تر باشد.

واژگان کلیدی: شناسایی، فراوانی، کاندیدا، PCR-RFLP.

مقدمه

کاندیدیازیس بیماری قارچی شایعی است که به وسیله‌ی گونه‌های مختلف جنس کاندیدا ایجاد می‌شود. جنس کاندیدا شامل حدود ۱۵۰ گونه می‌باشد (۱). این مخمرها اغلب ارگان‌های بدن انسان را مبتلا می‌نمایند. مدت‌های طولانی کاندیدا آلبیکنس به عنوان عامل اصلی کاندیدیازیس در نظر گرفته می‌شد اما در دهه‌های اخیر شیوع گونه‌های دیگر از قبیل کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کفیر، کاندیدا تروپیکالیس و دیگر گونه‌های غیر آلبیکنسی رو به افزایش است (۳-۲). برخی از این گونه‌ها دارای مقاومت ذاتی یا اکتسابی نسبت به داروها هستند. شواهدی وجود دارد که کاندیدا

[۱] دانشجوی دکترای تخصصی، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۲] دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده‌ی بهداشت و مؤسسه‌ی ملی تحقیقات سلامت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
[۳] دانشیار، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۴] استاد، گروه قارچ شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۵] کارشناس، مؤسسه‌ی ملی تحقیقات سلامت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سید حسین میرهندی
Email: mirhendi@tums.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

پاراپسیلوزیس‌های مقاوم به عوامل ضد قارچی امکان انتقال عفونت‌های بیمارستانی را در محیط‌های بیمارستانی از طریق دستان پرسنل بیمارستان، وسایل داخل رگی و مایعات، افزایش می‌دهد (۵-۴). بنابراین تشخیص دقیق گونه‌های کاندیدا در مطالعات اپیدمیولوژیک و در پیشگیری و مهار این عفونت‌ها نقش به سزایی دارد. شناسایی گونه‌های کاندیدا با استفاده از روش‌های مرسوم و سنتی از قبیل مشاهده‌ی مستقیم، کشت، جذب و تخمیر قندها هزینه‌بر بوده و به ۳ تا ۵ روز زمان نیاز دارد، ضمن این که تشخیص برخی گونه‌های غیرمعمول با این روش‌ها کاری مشکل و گاه غیرممکن است (۷-۶)، در حالی که با استفاده از روش‌های مولکولی نوظهور می‌توان گونه‌های کاندیدا را با دقت بالا از یکدیگر افتراق داد (۹-۸). هدف از مطالعه‌ی حاضر استفاده از روش مولکولی Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism یا PCR-RFLP در بررسی اپیدمیولوژیک گونه‌های مختلف جنس کاندیدا در شهر اصفهان بود. نتایج به دست آمده می‌تواند سرآغازی برای مطالعات جامع‌تر در این زمینه باشد و داده‌هایی مفید برای مسؤولین بهداشتی، درمانی و آزمایشگاهی فراهم آورد.

روش‌ها

از اواسط سال ۱۳۸۸ تا انتهای سال ۱۳۸۹، ۱۸۲جدایه‌ی کاندیدا تهیه گردید. نمونه‌ها اغلب از مراجعه‌کنندگان به یک آزمایشگاه اختصاصی قارچ‌شناسی و برخی از آن‌ها نیز از نمونه‌های آزمایشگاه مرکزی یک بیمارستان بزرگ در شهر اصفهان جداسازی، جمع‌آوری و نگهداری شد. کلیه‌ی جدایه‌ها بر روی محیط سابورو دکستروز آگار (Sabouraud Dextrose Agar یا SDA) منتقل شده و در ۳۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سوسپانسیونی غلیظ از هر قارچ در محلول آب-گلیسرول ۲۰ درصد تهیه و به ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شد تا در صورت نیاز قارچ مورد نظر بازیابی گردد. برخی از جدایه‌های مشکوک ابتدا با آزمایش مستقیم میکروسکوپی بررسی و سپس نگهداری شدند.

استخراج DNA: با توجه به این که FTA-card، روشی حساس و سریع برای استخراج DNA محسوب می‌شود (۱۱-۱۰)، در مطالعه‌ی حاضر از این سیستم برای استخراج DNA استفاده شد. در ابتدا با استفاده از دستگاه پانچر، دیسک‌هایی در اندازه‌های ۲ میلی‌متر از FTA-cardها جدا کرده و مقدار ۴ میکرولیتر از سوسپانسیون غلیظ تهیه شده از سلول‌های تازه مخمری به دیسک‌های آماده شده منتقل گردید. دیسک‌ها ۴-۳ ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند تا خشک شوند. هر دیسک در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به مدت ۳ تا ۵ ثانیه شستشو داده شد تا بقایای سلولی از آن جدا شوند. سپس هر دیسک به تیوب‌های حاوی ۳۰ میکرولیتر آب مقطر درجه‌ی مولکولی انتقال و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در دستگاه Thermal cycler گذاشته شد. آنگاه تیوب‌ها به مدت چند ثانیه میکروفیوژ شد و پس از خارج کردن و دور انداختن دیسک‌های FTA، مایع داخل تیوب حاوی DNA تا مصارف بعدی در ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شد.

PCR: از این روش برای تکثیر قسمتی از DNA ریبوزومال (rDNA) به نام ITS1-5.6S-ITS2 استفاده شد. در ابتدا مخلوط اصلی PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X بدون منیزیوم، ۱/۵ میکرومولار $MgCl_2$، ۰/۲ میکرومولار پرایمر رفت: ITS1 (5'-TCC GTA GGT

Archive of SID
www.SID.ir

('GAA CCT GCG G-3، ۰/۲ میکرومولار پرایمر برگشت: ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'، ۴۰۰ میکرومولار مخلوط دزوکسی نوکلئوزید تری‌فسفات (dNTP) و ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. آن‌گاه به هر تیوب PCR، ۲۳ میکرولیتر از پرمیکس مذکور و ۲ میکرولیتر DNAی استخراج شده از هر قارچ اضافه شد. در مرحله‌ی بعدی تیوب‌ها در دستگاه Thermal cycler قرار داده شد و مراحل PCR شامل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه به منظور جدا شدن دو رشته‌ی DNA (DNA Denaturation)، ۳۰ سیکل شامل ۴۵ ثانیه‌ی ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱ دقیقه‌ی ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (Annealing)، ۱ دقیقه‌ی ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (Extension) و در نهایت ۷ دقیقه‌ی ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (Final extension) برنامه‌ریزی و انجام شد.

RFLP ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR هر کدام از جدایه‌های کلینیکی، در واکنش ۱۵ میکرولیتری RFLP حاوی ۳ میکرولیتر آب مقطر، ۱/۵ میکرولیتر بافر و ۱ واحد آنزیم MspI (Fast Digest, Fermentas Lithuania) اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد.

الکتروفورز: ۵ میکرو لیتر از DNAی تکثیر شده و ۷ میکرولیتر از DNAی هضم شده در ژل آگارز ۱/۵ درصد (برای محصولات PCR) و ۲ درصد (برای محصولات RFLP) در تانک الکتروفورز حاوی ۹۰ میکرومولار تریس، ۹۰ میکرومولار بوریک اسید و ۲ میکرومولار EDTA (بافر TBE) بارگذاری گردید. پس از رنگ آمیزی باندهای DNA با محلول اتیریوم بروماید، با استفاده از اشعه‌ی ماورای بنفش مشاهده و عکس‌برداری شد.

با توجه به اطلاعات قبلی (۸) در کاندیدا آلبیکنس اندازه‌ی ناحیه‌ی ITS1-ITS4 قبل از اثر آنزیم MspI، ۵۳۵ جفت باز (bp) و بعد از اثر آن bp ۲۳۸ و ۲۹۷ می‌باشد. این مقادیر در سایر گونه‌ها به ترتیب تروپیکالیس ۵۲۴ (۱۸۴ و ۳۴۰)، گلابراتا ۸۷۱ (۵۵۷ و ۳۱۴)، کروزه‌ای ۵۱۰ (۲۶۱ و ۲۴۹)، گیلیرموندی ۶۰۸ (۸۲ و ۱۵۵ و ۳۷۱)، پاراپسیلوزیس ۵۲۰ (۵۲۰) و کفیر ۷۲۲ (۷۲۲) می‌باشد.

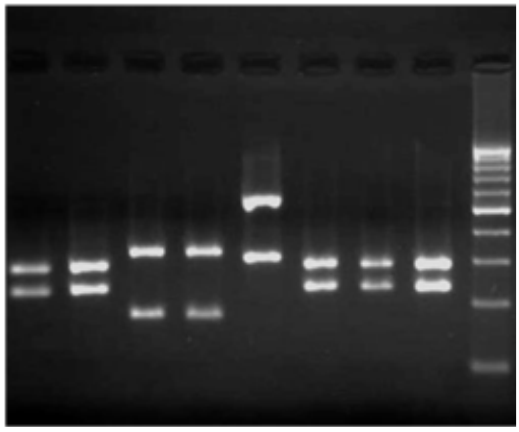
یافته‌ها

۱۸۲ جدایه‌ی مخمری از بیماران مبتلا به کاندیدیازیس در شهر اصفهان جدا شد. ۴۶ جدایه (۲۵/۲ درصد) از مردان و ۱۳۶ جدایه (۷۴/۸ درصد) از زنان به دست آمد.

پس از انجام PCR بر روی DNAهای جدا شده با استفاده از پرایمرهای عمومی ITS1 و ITS4، باندهایی با اندازه‌ی ۴۰۰ تا ۹۰۰ جفت باز ایجاد شد. پس از برش این باندها با آنزیم MspI نواحی واجد توالی CCGG بریده می‌شود (۱۲). هضم ناحیه‌ی ITS گونه‌های کاندیدا توسط آنزیم MspI در کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا کروزه‌ای، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا گلابراتا دو باند و در کاندیدا گیلیرموندی سه باند ایجاد می‌کند ولی در کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا کفیر اندازه‌ی محصول PCR و RFLP یکسان است و در حقیقت محصول PCR در دو گونه‌ی اخیر توسط آنزیم MspI بریده نمی‌شود (شکل ۱).

کاندیدا آلبیکنس گونه‌ی غالب جدا شده از نمونه‌های بالینی بود که از ۸۶ مورد (۴۷/۲ درصد) جدا شد. پس از آن کاندیدا پاراپسیلوزیس از ۳۱ مورد (۱۷ درصد)، کاندیدای کفیر از ۱۹ مورد (۱۰/۴ درصد)، کاندیدا

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱. الکتروفورز محصولات RFLP برخی از ایزوله‌های مخمری در این مطالعه. ردیف ۱ تا ۹ به ترتیب از چپ به راست گونه‌های آلبیکنس، آلبیکنس، تروپیکالیس، تروپیکالیس، گلابراتا، آلبیکنس، آلبیکنس، آلبیکنس، مارکر ۱۰۰ جفت بازی (bp)

تروپیکالیس از ۱۵ مورد (۸/۲ درصد)، کاندیدا گلابراتا از ۱۴ مورد (۷/۷ درصد)، کاندیدا کروزه‌ای از ۱۴ مورد (۷/۷ درصد) و کاندیدا گیلیرموندی از ۳ مورد (۱/۶ درصد) جدا شد. نتایج نشان داد که گروه سنی ۲۱ تا ۳۰ سال بیش‌ترین و گروه سنی ۷۱ تا ۸۰ سال کم‌ترین موارد ابتلا را به خود اختصاص دادند (جدول ۱).

جدایه‌ها از نقاط مختلف بدن بیماران به دست آمدند که بیش‌تر آن‌ها متعلق به ناخن (۱۰۰ مورد معادل ۵۴/۹ درصد)، واژن (۳۷ مورد معادل ۲۰/۳ درصد) و کم‌ترین آن‌ها متعلق به خون (۱ مورد معادل ۰/۵ درصد) بود (جدول ۲).

جدول ۱. فراوانی موارد ابتلا به کاندیدیازیس در گروه‌های سنی مختلف

محدوده‌ی سنی (سال)	(درصد) تعداد
۱–۱۰	۱۱ (۶)
۱۱–۲۰	۱۰ (۵/۴)
۲۱– ۳۰	۴۳ (۲۳/۶)
۳۱–۴۰	۳۸ (۲۰/۸)
۴۱–۵۰	۲۵ (۱۳/۷)
۵۱–۶۰	۲۶ (۱۴/۲)
۶۱–۷۰	۲۱ (۱۱/۵)
۷۱-۸۰	۸ (۴/۳)

جدول ۲. فراوانی گونه‌های کاندیدای جدا شده از نقاط مختلف بدن

محل ضایعه	گونه کاندیدا (تعداد)	(درصد) تعداد
ناخن	ک. آلبیکنس(۳۴)	۱۰۰ (۵۴/۹)
	ک. پاراپسیلوزیس(۲۶)	
	ک. تروپیکالیس (۱۴)	
	ک. کفیر (۱۱)	
	ک. کروزه‌ای (۱۰)	
	ک. گیلیرموندی (۳)	
	ک. گلابراتا (۲)	
واژن	ک. آلبیکنس (۲۳)	۳۷ (۲۰/۳)
	ک. گلابراتا (۱۰)	
	ک. کفیر (۲)	
	ک. پاراپسیلوزیس (۱)	
	ک. کروزه ای (۱)	
پوست	ک. آلبیکنس (۵)	۱۱ (۶)
	ک. پاراپسیلوزیس (۳)	
	ک. کفیر (۲)	
	ک. کروزه ای (۱)	
مایع شستشوی برونش (BAL)	ک. آلبیکنس (۸)	۹ (۴/۹)
	ک. گلابراتا (۱)	
خلط	ک. آلبیکنس (۴)	۸ (۴/۳)
	ک. کروزه ای (۱)	
	ک. پاراپسیلوزیس (۱)	
	ک. گلابراتا (۱)	
	ک. کفیر (۱)	
کشاله‌ی ران	ک. آلبیکنس (۴)	۶ (۳/۲)
	ک. کفیر (۲)	
زخم	ک. آلبیکنس (۳)	۴ (۲/۲)
	ک. کفیر (۱)	
گلو	ک. آلبیکنس (۲)	۴ (۲/۲)
	ک. کفیر (۲)	
ادرار	ک. آلبیکنس (۱)	۲ (۱/۱)
	ک. تروپیکالیس (۱)	
خون	ک. آلبیکنس (۱)	۱ (۰/۵)

Archive of SID

www.SID.ir

کاندیدا آلبیکنس در همه‌ی نمونه‌های بالینی دیده شد. کاندیدا کفیر از همه‌ی نمونه‌ها به جز مایع شستشوی برونش (Bronchoalveolar Lavage یا BAL)، ادرار و خون جدا شد. شایع‌ترین گونه در همه‌ی نمونه‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس بود. کاندیدا گیلیرموندی تنها از نمونه‌های ناخن جدا شد. در مجموع ۸۶ مورد (۴۷/۲ درصد) از جدایه‌ها کاندیدا آلبیکنس و ۹۶ مورد (۵۲/۸ درصد) از جدایه‌ها غیرآلبیکنس بودند.

بحث

روش‌های متفاوتی برای تعیین گونه‌های قارچی از جمله کاندیدا وجود دارد که در این بین روش‌های مولکولی به دلیل سرعت و دقت بالا از توجه ویژه‌ای برخوردارند. استخراج DNA به منظور انجام PCR با روش‌های مختلفی انجام می‌شود که در این تحقیق استخراج DNA با روش FTA-card انجام شد. FTA-card فیلترهای کاغذی حاوی مواد شیمیایی هستند که برای استخراج و تلخیص DNA و حذف مهارکننده‌ها طراحی شده‌اند. در این روش نیازی به مراحل فیزیکوشیمیایی آماده‌سازی و استخراج DNA که در روش‌های دیگر از قبیل فنل-کلروفرم وجود دارد، نمی‌باشد. این کاغذها باعث تخریب دیواره‌ی سلولی و لیز غشای سلولی قارچ شده و به DNA اجازه می‌دهد از سلول خارج شده و در ماتریکسی از سلولز به دام افتد (۱۱-۱۰). DNAی ریبوزومی دارای نواحی متعددی می‌باشد. اندازه‌ی نواحی ۵/۸S، ۱۸S و ۲۶S در گونه‌های مختلف کاندیدا اغلب برابر است در حالی که اندازه‌ی ناحیه‌ی ITS بسته به نوع گونه تا حدود زیادی متفاوت است. ناحیه‌ی ITS بین ژن ۱۸S و rDNA۲۸S واقع شده است. اختلاف موجود در اندازه و نوع توالی این ناحیه فرصتی عالی برای تعیین هویت قارچ‌ها از جمله مخمرها را در سطح گونه فراهم می‌کند. کاندیدا گلابراتا، کاندیدا گیلیرموندی و کاندیدا کفیر بدون نیاز به برش آنزیمی در RFLP و تنها از روی سایز محصول PCR با اطمینان بالایی قابل شناسایی هستند اما وزن مولکولی محصولات PCR در کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا کروزه‌ای نزدیک به هم بوده و نیازمند برش با آنزیمی افتراق‌دهنده می‌باشد که در این بین آنزیم محدودالاثر MspI گزینه‌ی مناسبی است (۱۳، ۸). تشخیص این هفت گونه‌ی مهم پزشکی با استفاده از این آنزیم در روش PCR-RFLP در خلال یک روز میسر می‌باشد. در این مطالعه کاندیدا آلبیکنس بیش‌ترین گونه‌ی جدا شده از نمونه‌های بالینی بود اما افزایش گونه‌های غیر آلبیکنس نسبت به گذشته از جمله کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا کفیر و کاندیدا تروپیکالیس به نوبه‌ی خود دارای اهمیت ویژه‌ای است. به دلیل مقاومت بیش‌تر گونه‌های غیر آلبیکنس به داروهای ضد قارچی نسبت به گونه‌ی آلبیکنس (۱۴، ۹)، مطالعات مداوم و پی‌گیرانه‌ی اپیدمیولوژیک در هر جامعه‌ای ضروری می باشد. برای مثال کاندیدا تروپیکالیس یکی از عوامل مهم کاندیدیازیس مهاجم است که وفور آن در نمونه‌های مختلف بالینی رو به فزونی است (۱۵).

Irobi و همکاران با استفاده از روش RFLP گونه‌های آلبیکنس، دابلینینسیس و کروزه‌ای را در بین ۱۱۴ جدایه کاندیدا از هم افتراق دادند (۱۶).

Okungbowa و همکاران در مطالعه‌ای گزارش کردند که محدوده‌ی سنی ۲۶ تا ۳۰ سال بیش‌تر موارد مثبت کاندیدا را به خود اختصاص داده‌اند (۱۷)، در حالی که در تحقیق حاضر این محدوده‌ی سنی ۲۱ تا

Archive of SID
www.SID.ir

۳۰ سال می‌باشد.

Sehgal گزارش کرد که ۵۴ درصد عفونت‌های دستگاه تناسلی در نیجریه مربوط به محدوده‌ی سنی ۲۱ تا ۳۰ سال است (۱۸)، که این میزان مشابه با میزان شیوع عفونت‌های کاندیدایی در تحقیق حاضر می‌باشد.

در مطالعه‌ی Okungbowa و همکاران گونه‌ی غالب گلابراتا گزارش شد (۱۷)، در حالی که در مطالعه‌ی حاضر گونه‌ی آلبیکنس بیش‌ترین جدایه به دست آمده از نمونه‌های کلینیکی بود.

Enweani و همکاران گونه‌ی غالب جدا شده از زنانی که داروهای ضد بارداری مصرف می‌کنند را گیلیرموندی گزارش کردند (۱۹).

Clark و همکاران در تحقیقی که بر روی خون ۳۸ بیمار مبتلا به کاندیدیازیس انجام دادند، گزارش کردند که عامل کاندیدیازیس ۲۲ بیمار (۵۷/۸ درصد) کاندیدا پاراپسیلوزیس است (۲۰).

در این راستا، هیچ‌گونه مطالعه‌ای راجع به بررسی‌های اپیدمیولوژیک مبتنی بر روش‌های مولکولی در اصفهان یافت نشد اما در شهرهای دیگر ایران تحقیقاتی انجام شده است. به عنوان مثال قهری و همکاران ۱۳۸ جدایه‌ی کاندیدای به دست آمده از ضایعات اونیکومایکوزیس در شهر تهران را با روش PCR-RFLP تعیین گونه کردند که گونه‌ی غالب کاندیدا آلبیکنس (۴۵/۶ درصد) بود و بیش‌ترین شیوع اونیکومایکوزیس مربوط به گروه سنی ۴۰ تا ۷۰ سال گزارش شد (۲۱).

در مطالعه‌ی دیگری در مازندران فتاحی و همکاران با روش PCR و استفاده از پرایمرهای NL1/NL4 منطقه‌ی متغیر D1/D2 را در ۶۲ جدایه‌ی کاندیدا آلبیکنس تقویت کرده و با استفاده از نرم‌افزار BLAST چهار نژاد برای گونه‌ی آلبیکنس شناسایی کردند (۲۲).

اسکندری و همکاران در تحقیقی که بر روی ۶۰ جدایه کاندیدا انجام دادند با استفاده از روش PCR و تک جفت پرایمر ویژه ژن CHS1، نشان دادند که ۸۰ درصد جدایه‌ها کاندیدا آلبیکنس بود. در این گزارش کاندیدا گلابراتا با فراوانی ۱/۶ درصد کم‌ترین مقدار را به خود اختصاص داد (۲۳). به طور خلاصه می‌توان ذکر کرد که افزایش گونه‌های غیر آلبیکنسی و مقاومت بیش‌تر این گونه‌ها به ترکیبات ضد قارچی و در نتیجه افزایش میزان مرگ و میر در مبتلایان به کاندیدیازیس هشداری برای جامعه‌ی پزشکی بوده است و مطالعات بیش‌تر محققان این راه را مطالبه می‌نماید (۲۴). همچنین به دلیل آن که بسیاری از مطالعات مولکولی انجام شده در ایران جنبه‌ی متدلوژی داشته (۲۶-۲۵) و یا بررسی‌های اپیدمیولوژیک با روش‌های سنتی است (۲۷)، انجام مطالعات مستمر در رابطه با بررسی‌های اپیدمیولوژیک با استفاده از روش‌های مولکولی ضروری به نظر رسیده و رواج این تست‌ها در آزمایشگاه‌های بالینی توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از کلیه‌ی کارکنان آزمایشگاه قارچ‌شناسی شفا، بیمارستان الزهرا (س) و پرسنل و مدیریت مؤسسه‌ی ملی تحقیقات سلامت که صمیمانه در این تحقیق ما را یاری دادند، صمیمانه سپاسگزاریم.

References

1. Ayatollahi Mousavi S A, Khalesi E, Shahidi Bonjar G H, Aghighi S, Sharifi F, Aram F. Rapid molecular diagnosis for Candida species using PCR-RFLP. Biotechnol 2007; 6: 583-587.
2. Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, et al. Epidemiology of

Archive of SID
www.SID.ir

candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23(4): 317-22.
3. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, et al. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. Clin Infect Dis 2004; 38(3): 311-20.
4. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Rev 1996; 9(4): 499-511.
5. Pfaller MA. Epidemiology of candidiasis. J Hosp Infect 1995; 30(Suppl): 329-38.
6. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature 1989; 339(6221): 237-8.
7. Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. Rapid identification of Candida species with species-specific DNA probes. J Clin Microbiol 1998; 36(11): 3260-5.
8. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important Candida species. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 2006; 47(3): 225-9.
9. Cirak MY, Kalkanci A, Kustimur S. Use of molecular methods in identification of Candida species and evaluation of fluconazole resistance. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98(8):1027-32.
10. Ferrer C, Colom F, Frases S, Mulet E, Abad JL, Alio JL. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. J Clin Microbiol 2001; 39(8): 2873-9.
11. Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, Campbell CK, Johnson EM. Ultra-rapid preparation of total genomic DNA from isolates of yeast and mould using Whatman FTA filter paper technology - a reusable DNA archiving system. Med Mycol 2006; 44(5): 389-98.
12. Shokohi T, Hashemi Soteh MB, Pouri ZS, Hedayati MT, Mayahi S. Identification of Candida species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran. Indian J Med Microbiol 2010; 28(2): 147-51.
13. Williams DW, Wilson MJ, Lewis MA, Potts AJ. Identification of Candida species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. J Clin Microbiol 1995; 33(9): 2476-9.
14. Nho S, Anderson MJ, Moore CB, Denning DW. Species differentiation by internally transcribed spacer PCR and HhaI digestion of fluconazole-resistant Candida krusei, Candida inconspicua, and Candida norvegensis strains. J Clin Microbiol 1997; 35(4): 1036-9.
15. Graybill JR, Najvar LK, Holmberg JD, Luther MF. Fluconazole, D0870, and flucytosine treatment of disseminated Candida tropicalis infections in mice. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(4): 924-9.
16. Irobi J, Schoofs A, Goossens H. Genetic identification of Candida species in HIV-positive patients using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of its DNA. Mol Cell Probes 1999; 13(6): 401-6.
17. Okungbowa FI, Isikhuemhen OS, Dede AP. The distribution frequency of Candida species in the genitourinary tract among symptomatic individuals in Nigerian cities. Rev Iberoam Micol 2003; 20(2): 60-3.
18. Sehgal SC. Epidemiology of male urethritis in Nigeria. J Trop Med Hyg 1990; 93(2): 151-2.
19. Enweani IB, Ogbonna CI, Kozak W. The incidence of candidiasis amongst the asymptomatic female students of the University of Jos, Nigeria. Mycopathologia 1987; 99(3):135-41.
20. Clark TA, Slavinski SA, Morgan J, Lott T, Arthington-Skaggs BA, Brandt ME, et al. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of Candida parapsilosis bloodstream infections in a community hospital. J Clin Microbiol 2004; 42(10): 4468-72.
21. Ghahri M, Mirhendi H, Yadegari M H, Hajizadeh E, Shidfar M. Identification of pathogenic yeasts isolates from nail fungal infections in Tehran using PCR and enzyme digestion. J Med Sci. 2010; 1: 79-91
22. Fattahi M, Shokohi T, Hashemi Sooteh MB. Molecular identification of C. albicans isolates from onchology patients in four educational-therapeutic centre in Mazandaran.Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2007; 17:10-1.
23. Scandari A, Mesbah Namin A R, Yadegari M H. Usage of PCR method for identification of main pathogenic species of candida in patients with acute candidiasis. J Kosa Med. 2008; 13: 115-124.
24. Capoor MR, Nair D, Deb M, Verma PK, Srivastava L, Aggarwal P. Emergence of non-albicans Candida species and antifungal resistance in a tertiary care hospital. Jpn J Infect Dis 2005; 58(6): 344-8.
25. Mirhendi S H, Adin H, Shidfar MR, Kordbacheh P, Hashemi SJ, Moazeni M, Hosseinpur L, Rezaie Matehkolaie A. Identification of pathogenic Candida species: PCR-FSP method. Tehran University Medical Journal 2008; 9: 639-645.
26. Mirhendi SH, Kordbacheh P, Pezeshki M, Khorramizadeh R. Simple and rapid identification medically important Candida species by a PCR restriction enzyme method. Acta Medica Iranica. 2003; 41(2): 79-83.
27. Pakshir K, Yazdani M, Kimiaghalam R. Etiology of vaginal candidiasis in Shiraz, southern Iran. Research J of Microb. 2007; 2(9): 696-700.

Archive of SID
www.SID.ir

Journal of Isfahan Medical School **Original Article**

Vol 29, No 133, 1st week June 2011 Received: 10.12.2010 Accepted: 3.3.2010

Identification and Frequency of *Candida* Species in Patients with Different Forms of Candidiasis in Isfahan, Using PCR-RFLP Method

Rasoul Mohammadi[1], Hossein Mirhendi PhD[2], Mohammad Hossein Yadegari PhD[3], Shahla Shadzi PhD[4], Nilufar Jalalizand[5]

Abstract

Background: Candidiasis is a widespread fungal disease caused by different *candida* spp. Traditional methods for these yeasts, are time-consuming and in some cases are not successful. New molecular techniques based on differences in DNA targets are faster and more useful. The aim of this study was identification of the most medically common *Candida* species by PCR-RFLP analysis and their prevalence in Isfahan, central Iran.

Methods: Yeast genomic DNA was extracted from living cultures using FTA-filters and ITS1-ITS2 region was amplified by PCR and was digested by the restriction enzyme MspI. RFLP products were loaded on agarose gel and yeast species were identified acorging to differences in their band patterns.

Findings: One hundered and eighty two isolates were evaluated from different body locations comprising nail, vagina, groin, blood, wound etc, from which 86 isolates (47.2%) were identified as *C. albicans*, 31 (17%) as *C. parapsilosis*, 19 (10.4%) as *C. kefyr*, 15 (8.2%) as *C. tropicalis*, 14 (7.7%) as *C. glabrata*, 14 isolates (7.7%) as *C. krusei*, 3 isolates (1.6%) as *C. guilliermondii*. Totally 47.2% isolates were *C. albicans* and 52.8% isolates were non-*albicans* spp.

Conclusion: Increasing of non-*albicans* species and their more resistance to antifungal drugs than *C. albicans* is an important topic of fungal infections that needed precise epidemiological surveys. This study can be a leader for more applicable studies.

Key words: Identification, Frequency, *Candida*, PCR-RFLP.

Archive of SID

[1] PhD Student, Department of Medical Mycology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[2] Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Public Health and National Institute of Health Research, Tehran University of Medical Sciences,Tehran, Iran.
[3] Associate Professor, Department of Medical Mycology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[4] Professor, Department of Medical Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[5] National Institute of Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Corresponding Author: Hossein Mirhendi PhD, Email: mirhendi@tums.ac.ir

www.SID.ir