مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۷۰/هفته سوم اسفند ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۱۰

تایپینگ مولکولی جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس عامل کاندیدیازیس دهانی– حلقی در بیماران آلوده به Human immunodeficiency virus (HIV)

دکتر فرزاد کتیرائی[۱]، دکتر علیرضا خسروی[۲]، دکتر وحید خلج[۳]، ژیلا ترغیبی[۴]، دکتر محبوبه حاجی عبدالباقی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در بیماران آلوده به HIV (Human immunodeficiency virus)، کاندیدیازیس دهانی عفونت قارچی رایج است. هدف از این مطالعه، تایپینگ مولکولی جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس به دست آمده از بیماران آلوده به HIV مبتلا به کاندیدیازیس دهانی و مقایسه‌ی الگوی مولکولی جدایه‌های مقاوم و حساس به داروی فلوکونازول بود.

روش‌ها: تایپینگ مولکولی و تعیین الگوی DNA ژنومی ۴۸ جدایه‌ی کاندیدا آلبیکنس به دست آمده از بیماران آلوده به HIV با روش RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction) به انجام رسید. همچنین، حساسیت جدایه‌ها به فلوکونازول به روش میکرودایلوشن براث (Broth microdilution method) تعیین گردید.

یافته‌ها: جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس در دو شاخه‌ی اصلی، ۷ خوشه و ۲۴ ژنوتایپ قرار گرفتند. تفاوت معنی‌داری بین الگوی جدایه‌های جدا شده از بیماران بستری، بیماران سرپایی و فرم بالینی عفونت کاندیدیازیس دهانی مشاهده نگردید. ارتباط نسبی بین جدایه‌های مقاوم و حساس به دارو در قرارگیری در خوشه‌ها وجود داشت.

نتیجه‌گیری: تعدد ژنوتایپ‌های کاندیدا آلبیکنس در بیماران آلوده بهHIV اقدامات درمانی و پیشگیرانه را با مشکل مواجه می‌کند. عدم وجود ارتباط بین ژنوتایپ‌ها و فرم بالینی عفونت کاندیدیازیس دهانی– حلقی، نشانگر اهمیت شرایط میزبان در پاتوژنیسیتی قارچ است. عدم وجود رابطه‌ی فیلوژنتیک بین جدایه‌های به دست آمده از بیماران بستری، تأییدی بر اندوژن می‌باشد و عامل بیماری است. نتایج نشان داد که بیمار آلوده به HIV شرایط مساعد رشد و تکثیر ژنوتایپ‌های مختلف کاندیدا آلبیکنس را دارد. در نتیجه، تایپینگ مولکولی با استفاده از RAPD-PCR ناهمگونی ژنومی در جدایه‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس را در بیماران HIV نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: کاندیدیازیس دهانی، کاندیدا آلبیکنس، ژنوتایپینگ، بیماران آلوده به Human immunodeficiency virus

ارجاع: کتیرائی فرزاد، خسروی علیرضا، خلج وحید، ترغیبی ژیلا، حاجی عبدالباقی محبوبه. **تایپینگ مولکولی جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس عامل کاندیدیازیس دهانی- حلقی در بیماران آلوده به Human immunodeficiency virus (HIV).** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۷۰): ۲۳۷۲-۲۳۶۲

۱- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲- استاد، مرکز تحقیقات قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴- دانشجوی دامپزشکی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۵- استاد، مرکز تحقیقات ایدز ایران، بیمارستان امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر فرزاد کتیرائی
Email: f.katiraee@tabrizu.ac.ir

www.SID.ir

مقدمه

بیماری‌های قارچی فرصت طلب در بیماران مبتلا به نقایص سیستم ایمنی، به خصوص نقص ایمنی سلولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. از جمله‌ی این بیماران، می‌توان به بیماران آلوده به ویروس نقص سیستم ایمنی انسانی (HIV یا Human immunodeficiency virus) اشاره کرد. همچنین، با وجود اقدامات درمانی و پیشگیرانه، کاندیدیازیس به عنوان یک مشکل بالینی در بیمارانی مبتلا به مخاطرات سیستم ایمنی (Immunocompromised) باقی مانده است. در بیماران آلوده به HIV، کاندیدیازیس دهانی- حلقی (Oropharyngeal candidiasis) عفونت قارچی رایج است (۲-۱). گونه‌های کاندیدایی به طور معمول حفره‌ی دهانی بیماران آلوده به HIV را بیش از حد طبیعی کولونیزه می‌کنند که خود از عوامل مستعد کننده برای ایجاد بیماری کاندیدایی است. امروزه بروز مقاومت‌های دارویی از مشکلات اصلی در راه درمان بیماران مبتلا به عفونت‌های قارچی و به خصوص بیماری‌های کاندیدایی است و از طرفی، درمان عفونت‌های قارچی به دلیل طول مدت درمان، عود مکرر، عدم وجود تنوع در انتخاب داروهای مختلف به طور اولیه مشکل است (۴-۳). با وجود درمان وسیع ضد قارچی و درمان ضد ویروسی مؤثر که منجر به بهبود سیستم ایمنی در بیماران آلوده به HIV می‌گردد، بیماری کاندیدیازیس دهانی در این بیماران رایج است و البته میزان بروز بیماری، به گونه‌ی عامل ایجاد بیماری، شیوع مقاومت دارویی، درمان قبلی با داروی ضد قارچی و شرایط سیستم ایمنی میزبان بستگی دارد.

شایع‌ترین عامل این بیماری، کاندیدا آلبیکنس است و بعد از آن، به میزان کمتر کاندیدا گلابراتا، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا کروزئی، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا کفیر و کاندیدا دابلی نینسیس اهمیت دارند (۵).

توانایی کاندیدا آلبیکنس در ایجاد عفونت‌های انسانی غیر قابل انکار است. در رابطه با کاندیدا آلبیکنس، باید گفت شایع‌ترین عامل قارچی ایجاد عفونت در انسان، شایع‌ترین عامل قارچی عفونت‌های بیمارستانی و چهارمین علت ایجاد عفونت‌های خونی در بین تمام عوامل میکروبی ایجاد عفونت هستند. عوامل مختلفی در توانایی کاندیدا آلبیکنس در حفظ رتبه‌ی برتر در ایجاد عفونت‌های قارچی دخیل هستند.

گونه‌های کاندیدا ساکنین در همه جای بدن انسان و حیوانات خونگرم هستند. آن‌ها به طور اولیه در مجاری گوارشی مستقر می‌شوند؛ اما به صورت همسفره در واژن و پیشابراه (Urethra)، پوست و لای انگشتان پا یافت می‌شوند و از منابع مختلفی از طبیعت جدا می‌شوند (۶).

کاندیدا آلبیکنس که به طور همزیست در حفرات دهانی ساکن است، تحت شرایط محیطی به فرم مهاجم تبدیل می‌شود. مخمرهای کاندیدا به صورت چند جانبه شروع به جوانه زایی می‌کنند و تبدیل به اشکال هایفی و میسلیومی می‌شوند. چند شکلی بودن (پلی مرفیسم) کاندیدا آلبیکنس عامل مهم بیماری‌زایی و ایجاد معضلات بالینی و درمانی در بیماران است. عوامل بیماری‌زای کاندیدا آلبیکنس متعددند که از آن جمله به آنزیم‌های ترشحی، توانایی رشد در دماهای بالا و مقاومت دارویی می‌توان اشاره کرد. از سویی، برای درک بهتر و مطالعه‌ی عوامل مؤثر در عفونت‌زایی

Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

یک میکروارگانیسم در جمعیت انسانی، کشف ارتباط پیچیده بین همسفرگی (Commensalisms) و عفونت (Infection)، تشخیص منبع عفونت، کنترل سویه‌های مقاوم به داروی ظهور یافته و بررسی وجود ارتباط ژنتیکی بین سویه ها، از روش های تایپینگ (Typing) استفاده می‌شود.

با وجود آن که مقاومت دارویی در گونه‌های کاندیدای جدا شده در بیماران در مطالعات قبلی به اثبات رسیده است (۷)، مطالعه‌ی مشخصی در رابطه با اپیدمیولوژی مولکولی گونه‌های کاندیدا به ویژه در بیماران آلوده به HIV در ایران صورت نگرفته است. اغلب مطالعات مولکولی با تمرکز بر تشخیص انواع گونه‌های کاندیدا بوده است.

هدف از این مطالعه، تایپینگ مولکولی و بررسی ژنوتایپی جمعیت جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران آلوده به HIV مبتلا به کاندیدیازیس دهانی و مقایسه‌ی الگوی مولکولی جدایه‌های مقاوم و حساس به داروی فلوکونازول بود. همچنین، الگوی مولکولی جدایه‌های جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان و بیماران غیر بستری (سرپایی) مقایسه شد. این احتمال در نظر گرفته شد که جمعیت کاندیدایی عامل ایجاد عفونت کاندیدیازیس دهانی در بیماران آلوده به HIV، دارای تنوع و پلی مرفیسم ژنتیکی هستند و امکان دسته‌بندی ژنتیکی گونه‌های مقاوم و حساس به دارو وجود دارد. همچنین، در این مطالعه احتمال ارتباط ژنوتایپ های تعیین شده با شکل خاصی از عفونت بالینی بررسی گردید.

روش‌ها

در این مطالعه، ۴۸ جدایه‌ی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران آلوده به ویروس نقص سیستم ایمنی مراجعه کننده به مرکز مشاوره‌ی بیماری‌های رفتاری و بخش عفونی واقع در بیمارستان امام خمینی تهران در سال ۱۳۸۸ انتخاب شدند و مورد بررسی قرار گرفتند. عفونت بیماران به ویروس HIV با روش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) و Western blot به تأیید رسیده بود و بیماران دارای پرونده‌ی پزشکی در رابطه با عفونت HIV بودند.

ضایعات دهانی در کلیه ی بیماران از نظر بالینی بررسی شد و از هر بیمار، نمونه‌ی سواب دهانی از نواحی مخاط دهان، زبان و لثه در محیط سابورو دکستروز آگار (Merck) و محیط کروم آگار کاندیدا (Paris France company) به طور مستقیم کشت داده شد. پلیت‌های کشته داده شده‌ی کروم آگار برای تشخیص احتمالی گونه‌های مخمری و شکل و رنگ کلنی به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۵ $^{\circ}$C و در تاریکی انکوبه شدند و پلیت‌های سابورو دکستروز آگار در شرایط هوازی به مدت هفت روز در دمای ۳۰ $^{\circ}$C انکوبه گردیدند تا تمام عوامل احتمالی در این محیط رشد یابند. پس از طی زمان انکوباسیون کاندیدا آلبیکنس با روش‌های مرسوم شناسایی شدند (۷-۱۱).

تأیید نهایی گونه‌ی کاندیدا آلبیکنس با روش PCR (Polymerase chain reaction) با آمپلیفیکاسیون قطعه‌ی ۵۱۹ نوکلئوتیدی از ژن استیل کوآنزیم آ کاندیدا آلبیکنس (CaACC1) که اختصاصی برای این گونه است، صورت گرفت. این قطعه در سایر گونه‌های کاندیدا و همچنین، کاندیدا دابلی نینسیس (به عنوان گونه‌ی نزدیک به آلبیکنس) در این واکنش تکثیر نمی‌شود (۱۲).

Archive of SID
www.SID.ir

آزمایش ارزیابی حساسیت بـه داروی فلوکونـازول به روش میکرودایلوشن براث

از روش رقـت‌سـازی سـریالی در محـیط مـایع در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای بر طبـق روش پیشـنهادی CLSI تحت عنوان M۲۷-A۲ اسـتفاده گردیـد (۱۳). حداقل غلظت داروی ضد قارچی که مانع از رشد ۹۰ درصد از جدایه‌های مورد بررسی گردد، به عنـوان ۹۰ MIC (Minimum inhibitory concentration ۹۰) تلقـی مـی‌گـردد. مـلاک حساسـیت یـا مقاومـت بـرای برخـی از داروهـا توسـط CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) پیشنهاد شده است. برای فلوکونـازول MIC ≤ ۸ µg/ml به عنوان حسـاس، MIC = ۱۶-۳۲ µg/ml بـه عنـوان حساس وابسته به دوز و MIC ≥ ۶۴ µg/ml به عنوان مقاوم شناخته می‌شود (۱۵-۱۴).

استخراج DNA و آزمایش RAPD-PCR

به منظور تایپینـگ مولکـولی و تعیـین الگـوی DNA ژنـومی کاندیـدا آلبیکـنس از روش RAPD-PCR (Random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction) استفاده شد. استخراج DNA ژنومی بـر طبـق روش از قبـل توصـیف شـده (۱۱)، به انجام رسید. آزمون PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. پرایمرهای مـورد اسـتفاده در این تحقیق بر اساس مطالعات قبلی و بر طبق جـدول ۱ استفاده شد (۱۶).

علت استفاده از شش تـوالی پرایمـری بـه جهـت افزایش تعداد باندهای به دست آمده، کسب بانـدهای اختصاصی و پایدار و افزایش تکرار پذیری آزمایش با توجه به رقابت پرایمرها برای اتصال به جایگـاه‌هـای نوکلئوتیـدی بـود. مقـدار ۱۲/۵ میکرولیتـر PCR master mixed (حـاوی مقـادیر اسـتاندارد dNTPs یـا Deoxynucleotide triphosphates، Taq پلیمراز، بافر PCR و $MgCl_2$)، ۲/۵ میکرولیتر مخلوط شش پرایمـر، ۲۰ نـانوگرم (۱/۵ میکرولیتـر) از DNA ژنومی با آب مقطر اسـتریل بـه حجـم ۲۵ میکرولیتـر رسانده شد و برنامه‌ی واکنش به دستگاه ترموسـایکلر ASTEC تنظیم گردید.

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
$RAPD_1$	5′-GGTGGGGGAA-3′
$RAPD_2$	5′-GTTTCGGTCC-3′
$RAPD_3$	5′-GTAGACCCGT-3′
$RAPD_4$	5′-AAGAGCCCGT-3′
$RAPD_5$	5′-AACGCGCAAC-3′
$RAPD_6$	5′-CCCGTCAGCA-3′

در این برنامه، پس از یک سیکل دناتوراسـیون بـه مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ °C، واکنش بـا ۴۰ سـیکل واکنشی بـه ترتیـب ۱ دقیقـه در دمـای ۹۵ °C درجـه (دنـاتوره)، ۱ دقیقـه در دمـای ۳۶ °C (اتصـال) و ۲ دقیقه در دمـای ۷۲ °C (تکثیـر) ادامـه یافـت و در سیکل نهایی، تکثیر به مدت ۵ دقیقه در دمـای ۷۲ °C صورت گرفت. سپس مقدار ۷ میکرولیتر از محصـول PCR بـر روی ژل آگـارز ۲ درصـد در بـافر TBE (Tris-borate-EDTA) با ولتاژ ۸۰ الکتروفورز گردید و باندهای تشکیل شده مورد بررسی قرار گرفت.

در آزمایش RAPD-PCR بر اساس تعـداد و وزن مولکولی باندهایی که در الکتروفـورز محصـول PCR به دست می‌آید، نتایج ارزیابی می‌گردد و هـر نمونـه، الگوی مخصوص به خود را نشـان مـی‌دهـد. جهـت تعیـین وزن مولکـولی بانـدهای بـه دسـت آمـده، از نرم‌افزار Seqaid II که بدین منظـور طراحـی گردیـده

Archive of SID

www.SID.ir

است، استفاده شد. بر اساس الگوی باندهای تشکیل شده، دندروگرام فیلوژنتیک بر طبق روش UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) ترسیم گردید (۱۷).

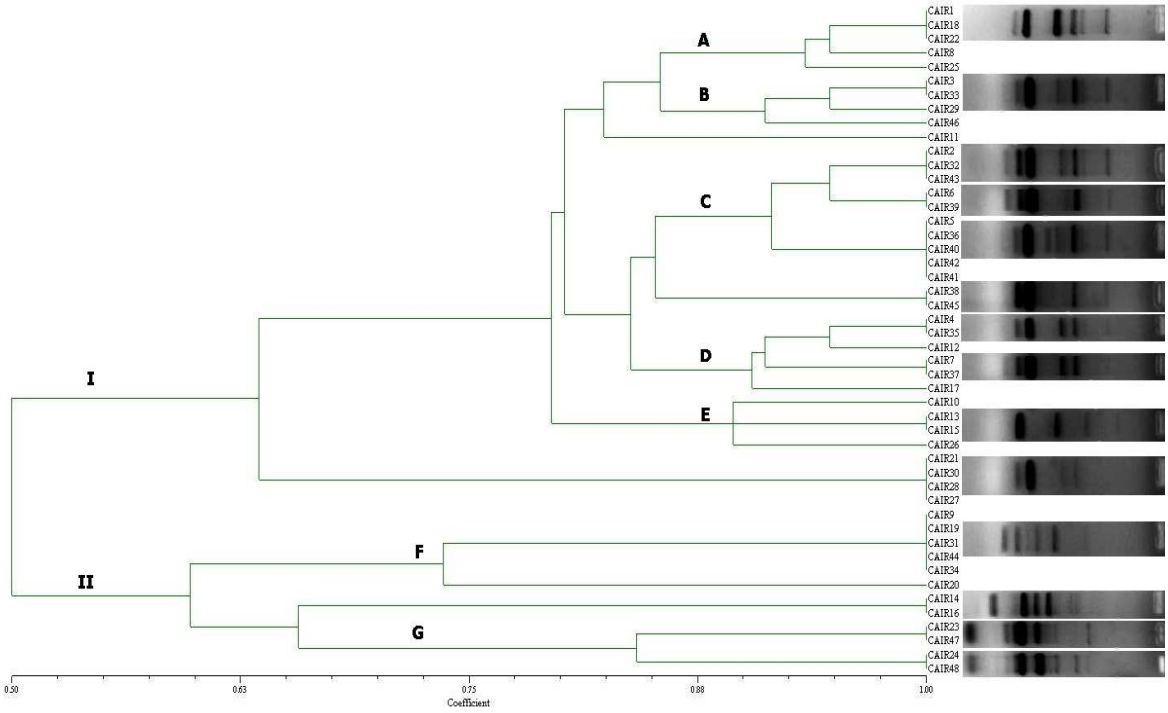
یافته‌ها

از ۴۸ جدایه‌ی کاندیدا آلبیکنس مورد بررسی در این مطالعه، ۲۱ جدایه دارای MIC ≤ ۸ µg/ml و به عنوان حساس، ۹ جدایه دارای MIC = ۱۶-۳۲ µg/ml و به عنوان حساس وابسته به دوز و ۱۸ جدایه دارای MIC ≥ ۶۴ µg/ml و به عنوان مقاوم شناسایی شد.

در آزمایش تایپینگ مولکولی، از یک مخلوط متشکل از ۶ پرایمر استفاده شد. تمام جدایه‌ی مورد بررسی با انجام آزمایش PCR دارای محصول (Amplicon) بودند. این آزمایش بر ۴۸ جدایه‌ی کاندیدا آلبیکنس صورت گرفت و در مجموع، ۱۹ قطعه یا باند آمپلیفیه پلی مرفیک با وزن مولکولی متفاوت از RAPD-PCR به دست آمد. تعداد باندهای پلی مرفیک اعم از فرعی یا اصلی در جدایه‌های مورد بررسی از ۳ تا ۹ باند بود و میانگین تعداد باند برای هر جدایه، ۶ باند بود (شکل ۱).

برای بررسی واکنش RAPD میزان وزن مولکولی باندها بر اساس حرکتشان در الکتروفورز بررسی شد و بر اساس فقدان یا وجود هر یک از باندها، اعداد صفر و یک به آن اختصاص داده شد.

برای رسم دندروگرام بین ژنوتیپ های مورد مطالعه،



شکل ۱. دندروگرام بر اساس آنالیز RAPD-PCR از ۴۸ استرین کاندیدا آلبیکنس که به دو شاخه‌ی اصلی (I, II) و هفت خوشه (A-G) تقسیم شده است. کلیه‌ی استرین‌های قرار گرفته در شاخه‌ی II به فلوکونازول حساس هستند و شاخه‌ی I جمعیت مخلوطی از استرین‌های حساس و مقاوم را شامل می‌شود. خوشه‌های A، B و C حاوی تعداد بیشتری از استرین‌های مقاومند. الگوی باند خوشه‌ها و زیر خوشه‌ی اصلی روبه‌روی هر کدام نشان داده شده است

www.SID.ir

جدول ۲. مقایسه‌ی خصوصیات مهم استرین‌های هر خوشه که با استفاده از تایپینگ مولکولی تفکیک شده‌اند

خصوصیت		خوشه‌ها (تعداد)							
		A (۵)	B(۴)	C (۱۲)	D (۶)	E (۸)	F (۶)	G (۷)	مقدار P
میانگین سن		۳۰	۳۴/۸	۳۳/۶	۳۰/۸	۳۷/۵	۳۲/۶	۳۳/۱	۰/۸۱
جنسیت	مرد	۳	۴	۹	۵	۷	۵	۶	۰/۸۰
	زن	۲	۰	۳	۱	۱	۱	۱	
فرم بالینی عفونت	تراش	۲	۲	۹	۱	۲	۴	۳	۰/۹۴
	التهاب گوشه‌ی لب	۲	۲	۳	۲	۴	۱	۲	
	ازوفاژیت	۱	۱	۰	۳	۲	۱	۱	
دریافت درمان ضد ویروسی		۳	۳	۷	۴	۵	۴	۵	۰/۹۰
دریافت داروی ضد قارچی		۰	۲	۳	۴	۱	۱	۲	۰/۲۰
حساسیت به فلوکونازول	حساس	۰	۱	۷	۱	۳	۵	۴	۰/۰۱
	وابسته به دوز	۲	۱	۱	۰	۲	۱	۲	
	مقاوم	۳	۳	۴	۵	۳	۰	۰	

از ماتریس تشابه دایس (Dice similarity matrix) و به منظور انتخاب بهترین برابر UPGMA دندروگرام برای تفسیر نتایج، از ضریب همبستگی Cophenetic (Cophenetic correlation coefficient) استفاده شد. ضریب همبستگی Cophenetic بین ماتریس تشابه دایس با الگوریتم ۰/۴۷ به دست آمد. این مقدار، نشان دهنده‌ی همبستگی بالایی بین داده‌ها نمی‌باشد.

بر اساس آنالیز آماری و منطبق با دندروگرام (شکل ۱) جدایه‌ی کاندیدا آلبیکنس در دو شاخه‌ی اصلی و ۷ خوشه (A-G) قرار گرفتند. همچنین، از ۴۸ جدایه‌ی کاندیدا آلبیکنس ۲۴ ژنوتایپ یا پروفایل متفاوت به دست آمد. نتایج به دست آمده حاکی از این است که ژنوتیپ‌ها به طور کامل به گروه‌های مشخص با جمعیت‌های تعریف شده تقسیم نشدند و وجود تنوع ژنتیکی زیاد درون جمعیت‌ها را تأیید می‌کند. تعداد و خصوصیات باندهای به دست آمده از جدایه، الگوی تشخیصی و ثابتی را از کاندیدا آلبیکنس ارایه نداده است.

تفاوت معنی‌داری بین الگوی جدایه‌های جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان و بیماران سرپایی مشاهده نگردید. در رابطه با مقاومت دارویی و الگوی ژنتیکی به دست آمده از جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس، جدایه‌های متعلق به شاخه‌ی دو، بر طبق دندروگرام (شکل ۱) اغلب به گروه حساس به دارو تعلق داشتند.

شاخه‌ی یک جمعیت مخلوطی از جدایه‌های مقاوم و حساس به داروی آزول بود، هر چند بر اساس دندروگرام (شکل ۱) جدایه‌های مقاوم به دارو در خوشه‌های مشابهی قرار دارند. ارتباط معنی‌داری بین ژنوتایپ تعیین شده و فرم بالینی عفونت کاندیدیازیس دهانی از جمله تراش، ازوفاژیت یا التهاب گوشه‌ی لب یافت نشد. دریافت درمان ضد ویروسی و مصرف قبلی داروهای ضد قارچی در قرارگیری جدایه‌ها در دندروگرام فیلوژنتیک بی‌تأثیر بوده است (جدول ۲).

بحث

کاندیدیازیس دهانی، شایع‌ترین عفونت فرصت طلب

www.mui.ac.ir
www.SID.ir
Archive of SID

در بیماری ایدز است و بیماران مبتلا با درد و محدودیت در خوردن غذا همراهند که می‌تواند منجر به کاشکسی (Cachexia) در بیماران شود. برخی از اشکال بیماری کاندیدیازیس دهانی برای بیماران مبتلا، صعب‌العلاج و در مواردی کشنده است.

با افزایش تعداد بیماران دچار نقص ایمنی، مانند بیماران آلوده به HIV و بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه، موارد ابتلا به این عفونت رو به گسترش بوده است و مشکل مقاومت دارویی نیز بر معضلات این بیماران افزوده است. ظهور گونه‌های کاندیدای مقاوم به داروهای ضد قارچی و افزایش بیماران مبتلا به نقایص سیستم ایمنی از مهم‌ترین عوامل دخیل در اپیدمیولوژی بیماری کاندیدیازیس و به خصوص کاندیدیازیس دهانی است.

با وجود مطالعات مختلفی که در رابطه با اپیدمیولوژی مولکولی کاندیدا در بیماران آلوده به HIV در سایر کشورها صورت گرفته است، در ایران مطالعه‌ی مشخصی در این رابطه صورت نگرفته است و به نظر می‌رسد که مطالعه‌ی حاضر، از معدود مطالعات به انجام رسیده در این خصوص است.

در این مطالعه از روش RAPD-PCR برای بررسی ارتباط و تنوع ژنتیکی سویه‌های کاندیدا آلبیکنس در بیماران آلوده به ویروس ایدز مبتلا به کاندیدیازیس دهانی استفاده شد. با وجود آن که تعداد جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه تنها ۴۸ جدایه بود، بر اساس این روش مولکولی ۲۴ ژنوتایپ به دست آمد که نشان دهنده‌ی وجود ژنوتایپ‌های متعدد در بین جمعیت مورد بررسی است. مطالعات قبلی در سایر گروه‌های بیمار و بیماران بستری در بیمارستان، پلی مورفیسم ژنتیکی در جمعیت کاندیدا آلبیکنس را نشان داده است (۱۹-۱۸). مطالعات مختلف با سایر روش‌های ژنوتایپینگ از جمله MLST (Multilocus sequence typing) و AFLP (Amplified fragment length polymorphisms) در بیماران مختلف نیز مؤید این تنوع ژنتیکی است (۲۱-۲۰).

Chong و همکاران نیز در مطالعه بر روی بیماران مبتلا به کاندیدیازیس واژینال در مالزی بر اساس الگوی آنالیز RAPD به پلی مرفیسم گونه‌های کاندیدا دست یافتند (۲۲).

در مطالعه‌ی دیگری توسط فهامی و همکاران بر روی گونه های مختلف کاندیدای به دست آمده از عفونت‌های بیمارستانی، بر اساس این روش الگوهای متفاوتی به دست آمد؛ به طوری که با استفاده از ۸ پرایمر، ۱۳ الگوی باند در کاندیدا آلبیکنس به دست آمد (۲۳). Pinto و همکاران نیز تنوع ژنتیکی را در بین جدایه های کاندیدا آلبیکنس به دست آمده از نمونه های مختلف بالینی با این روش نشان دادند (۲۴).

قابل توجه این که در مطالعه‌ی حاضر تنها با بررسی جدایه های دهانی، تعداد ۲۴ ژنوتایپ به دست آمد و بدون شک، با بررسی تعداد جدایه های بیشتر از مکان‌های آناتومیک متفاوت، ژنوتایپ‌های بیشتری به دست خواهد آمد. پر واضح است که وجود ژنوتایپ‌های بیشتر به حضور، بقا و بیماری‌زایی عامل عفونی در میزبان کمک خواهد کرد و اقدامات درمانی و پیشگیرانه را با معضل مواجه خواهد ساخت؛ به ویژه آن که ژنوتایپ‌های مشتق از یک گونه، در خصوصیات مختلف از جمله بیماری‌زایی و مقاومت به داروهای ضد قارچی متفاوت باشند. این که بیماری‌زایی جدایه‌ها با

Archive of SID
www.SID.ir

خصوصیات ژنوتایپی مرتبط است یا با شرایط میزبان، مسأله‌ای نامشخص است. همواره این احتمال وجود دارد که هر دو این عوامل، در پاتوژنیستی قارچ دخالت داشته باشند.

از طرفی، عدم وجود ارتباط بین ژنوتایپ‌های به دست آمده در این مطالعه و فرم بالینی عفونت کاندیدیازیس دهانی، نشان می‌دهد که شرایط میزبان در این مسأله اهمیت بیشتری دارد. عدم وجود رابطه‌ی فیلوژنتیک بین جدایه‌های به دست آمده از بیماران بستری در بیمارستان نیز نشانگر عدم وجود منشأ خارجی برای ایجاد عفونت در این بیماران و تأییدی بر اندوژن بودن عامل بیماری است (۲۵). البته این به معنی نفی منشأ اگزوژن در عفونت کاندیدیازیس نیست، بلکه بیانگر کم اهمیت بودن آن در بیماری کاندیدیازیس دهانی است.

هدف اصلی این مطالعه، بررسی میزان تنوع ژنتیکی در بین استرین‌های کاندیدا آلبیکنس در بیماران مبتلا به HIV بود که با توجه به نتایج حاصل از RAPD، وجود تنوع ژنتیکی و الگوهای متعدد در این بیماران به اثبات رسیده است. وجود ژنوتایپ‌های متعدد علاوه بر آن که نشانگر وجود پلی مرفیسم گونه‌ی کاندیدا آلبیکنس است، نشان می‌دهد که بیماران مبتلا به ویروس نقص سیستم ایمنی انسانی، زمینه‌ی مساعدی برای رشد و تکثیر جمعیت‌های مختلفی از کاندیدا آلبیکنس است.

بر اساس این مطالعه، روش RAPD-PCR روش مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی و ژنوتایپینگ این گونه با اهمیت قارچی شناخته شد، که البته با برخی از مطالعات قبلی منطبق است. در واقع، الگوهای به دست آمده نشان می‌دهد که این روش برای نشان دادن اختلافات بین استرین‌ها یا زیر گونه‌های احتمالی در کاندیدا آلبیکنس روشی مناسب است (۲۶).

هر چند مطالعات مختلف روش RAPD را روشی مناسب برای تشخیص گونه‌های قارچی معرفی نموده‌اند، اما امروزه این روش کمتر برای تشخیص، مورد توجه قرار می‌گیرد و تشخیص گونه با سایر روش‌های مولکولی و اغلب با روش‌های مبتنی بر تعیین توالی نوکلئوتیدی یک یا چند ژن انجام می‌شود (۲۸-۲۷). با این وجود، روش پیش‌گفته دارای مزایا و معایب خاص خود است؛ که از آن جمله می‌توان به هزینه‌ی کم، سرعت زیاد در انجام و بررسی آن، امکان بررسی در مورد DNAهایی که اطلاعاتی در مورد آن‌ها وجود ندارد، طراحی آسان پرایمر، عدم نیاز به نشانگرها و امکان بررسی کل ژنوم به عنوان مزایا و عدم تکرار پذیری در برخی موارد، حساسیت بالا و ایجاد باندهای غیر مرتبط به عنوان معایب آن اشاره کرد. البته در این مطالعه، با به کار بردن همزمان ۶ پرایمر در یک واکنش، مشکل تکرار پذیری به حداقل رسید؛ زیرا پرایمرها برای نشستن در رشته‌ی DNA بر خلاف شرایط معمولی، در واکنش RAPD شرایط آسانی ندارند.

روش RAPD-PCR روشی است که مورد انتخاب تحقیقات اپیدمیولوژیکی می‌باشد. این روش نیازمند هیچ دانش قبلی از سکانس‌های DNA ارگانیسم مورد مطالعه نیست و با افزایش تعداد پرایمرهای مورد استفاده در واکنش، حجم بالایی از پلی مورفیسم DNA را می‌توان نشان داد (۳۰-۲۹).

نتیجه‌گیری

تعدد ژنوتایپ‌های کاندیدا آلبیکنس در بیماران آلوده

Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

به HIV اقدامات درمانی و پیشگیرانه را با مشکل مواجه می‌کند. عدم وجود ارتباط بین ژنوتایپ‌ها و فرم بالینی عفونت کاندیدیازیس دهانی- حلقی، نشانگر اهمیت شرایط میزبان در پاتوژنیسیتی قارچ است. عدم وجود رابطه‌ی فیلوژنتیک بین جدایه‌های به دست آمده از بیماران بستری، تأییدی بر اندوژن بودن عامل بیماری است. نتایج نشان می‌دهد بیمار آلوده به HIV، شرایط مساعد رشد و تکثیر ژنوتایپ‌های مختلف کاندیدا آلبیکنس را دارد. در نتیجه، تایپینگ مولکولی با استفاده از RAPD-PCR ناهمگونی ژنومی در جدایه‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس را در بیماران مبتلا به HIV نشان می‌دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از کلیه‌ی همکارانی که در این تحقیق یاری نمودند، به خصوص مرکز مشاوره‌ی بیماری‌های رفتاری و بخش عفونی بیمارستان امام خمینی (ره) تقدیر و تشکر می‌نمایند و بر محققینی که خدمت به بیماران پر خطر را پیشه کرده‌اند، درود می‌فرستند.

References

1. Pelletier R, Peter J, Antin C, Gonzalez C, Wood L, Walsh TJ. Emergence of resistance of Candida albicans to clotrimazole in human immunodeficiency virus-infected children: in vitro and clinical correlations. J Clin Microbiol 2000; 38(4): 1563-8.
2. Fidel PL, Huffnagle GB. Fungal immunology: from an organ perspective. New York, NY: Springer; 2005. p. 59-83.
3. Morgan J. Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. Curr Infect Dis Rep 2005; 7(6): 429-39.
4. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. Emerg Infect Dis 2004; 10(1): 14-9.
5. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. Candida dubliniensis sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology 1995; 141 (Pt 7): 1507-21.
6. Wade JC. Epidemiology of candida infection. In: Bodey GP, editor. Candidiasis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. 2nd ed. New York, NY: Ravan Press; 1993. p. 85.
7. Katiraee F, Khosravi AR, Khalaj V, Hajiabdolbaghi M, Khaksar AR, Rasoulinejad M. In vitro antifungal susceptibility of oral candida species from Iranian HIV infected patients. Tehran Univ Med J 2012; 70(2): 96-103. [In Persian].
8. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. J Clin Microbiol 1994; 32(8): 1923-9.
9. Sanguinetti M, Porta R, Sali M, La SM, Pecorini G, Fadda G, et al. Evaluation of VITEK 2 and RapID yeast plus systems for yeast species identification: experience at a large clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2007; 45(4): 1343-6.
10. Odds FC, Davidson A. "Room temperature" use of CHROMagar Candida. Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 38(3): 147-50.
11. Katiraee F, Khosravi AR, Khalaj V, Hajiabdolbaghi M, Khaksar A, Rasoolinejad M, et al. Oropharyngeal candidiasis and oral yeast colonization in Iranian Human Immunodeficiency Virus positive patients. J Mycol Med 2010; 20(1): 8-14.
12. Bougnoux ME, Morand S, d'Enfert C. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of Candida albicans. J Clin Microbiol 2002; 40(4): 1290-7.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution testing of yeasts. Approved standard (M27-A2). 2nd ed. Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2002.
14. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and candida infections. Subcommittee on

Archive of SID
www.SID.ir

Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clin Infect Dis 1997; 24(2): 235-47.
15. Matar MJ, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH. Correlation between E-test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(5): 1647-51.
16. Riederer KM, Ramanathan J, Barczak J, Baran J, Jr., Khatib R. Utility of a pre-optimized kit for random amplified polymorphic DNA in typing Candida albicans. Can J Microbiol 2002; 48(4): 369-73.
17. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics 2001; 17(12): 1244-5.
18. Vrioni G, Matsiota-Bernard P. Molecular typing of Candida isolates from patients hospitalized in an intensive care unit. J Infect 2001; 42(1): 50-6.
19. Darce BM, Gonzalez A, Barnabe C, Larrouy G. First characterization of Candida albicans by random amplified polymorphic DNA method in Nicaragua and comparison of the diagnosis methods for vaginal candidiasis in Nicaraguan women. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97(7): 985-9.
20. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. Clin Microbiol Rev 2000; 13(2): 332-70.
21. Odds FC. Molecular phylogenetics and epidemiology of Candida albicans. Future Microbiol 2010; 5(1): 67-79.
22. Chong PP, Lee YL, Tan BC, Ng KP. Genetic relatedness of Candida strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. J Med Microbiol 2003; 52(Pt 8): 657-66.
23. Fahami S, Kordbacheh P, Moazeni M, Mahmoodi M, Mirhendi H. Species identification and strain typing of candida isolates by PCR-RFLP and RAPD-PCR analysis for determining the probable sources of nosocomial infections. Iran Red Crescent Med J 2010; 12(5): 539-47.
24. Pinto PM, Resende MA, Koga-Ito CY, Tendler M. Genetic variability analysis among clinical Candida spp. isolates using random amplified polymorphic DNA. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(2): 147-52.
25. Fanello S, Bouchara JP, Jousset N, Delbos V, LeFlohic AM. Nosocomial Candida albicans acquisition in a geriatric unit: epidemiology and evidence for person-to-person transmission. J Hosp Infect 2001; 47(1): 46-52.
26. Costa F, Manaia CM, Figueiral MH, Pinto E. Genotypic analysis of Candida albicans isolates obtained from removable prosthesis wearers. Lett Appl Microbiol 2008; 46(4): 445-9.
27. Bautista-Munoz C, Boldo XM, Villa-Tanaca L, Hernandez-Rodriguez C. Identification of Candida spp. by randomly amplified polymorphic DNA analysis and differentiation between Candida albicans and Candida dubliniensis by direct PCR methods. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 414-20.
28. Meyer W, Maszewska K, Sorrell TC. PCR fingerprinting: a convenient molecular tool to distinguish between Candida dubliniensis and Candida albicans. Med Mycol 2001; 39(2): 185-93.
29. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 1990; 18(24): 7213-8.
30. Caetano-Anolles G. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. PCR Methods Appl 1993; 3(2): 85-94.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Isfahan Medical School Received: 08.11.2013

Vol. 31, No. 270, 3rd Week, March 2014 Accepted: 30.01.2014

Molecular Typing of *Candida Albicans* Isolates Recovered from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected Patients with Oropharyngeal Candidiasis

Farzad Katiraee PhD[1], Ali Reza Khosravi PhD[2], Vahid Khalaj PhD[3], Jila Targhibi[4], Mahbobeh Hajiabdolbaghi MD[5]

Original Article

Abstract

Background: In human immunodeficiency virus HIV-infected patients, oropharyngeal candidiasis is a common infection. The aim of present study was molecular typing of *Candida albicans* isolates recovered from HIV-infected patients with oropharyngeal candidiasis and comparing the molecular patterns of fluconazole-resistant and susceptible isolates.

Methods: The molecular typing of genomic DNA of 48 *Candida albicans* isolated from HIV-infected patients were assessed by the random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) fingerprinting. Sensitivity of strains to fluconazole was determined by the broth microdilution method.

Findings: We detected two main clusters and seven sub-clusters, comprising 24 genotypes of *Candida albicans* strains. No associations between the patterns of strains isolated from hospitalized patients and outpatients and clinical forms of oropharyngeal candidiasis were detected. There was also a relative correlation between fluconazole susceptibility and strain clustering.

Conclusion: The presence of several genotypes of *Candida albicans* in HIV-infected patients would lead to problems in the treatment and prevention of oral candidiasis. The lack of correlation between genotypes and clinical forms of oropharyngeal candidiasis shows the importance pf host condition in the pathogenesis of candida infections. The lack of phylogenetic relationships among strains from hospitalized patients approves endogenous origin of *candida* infection. The results indicate that HIV-infected patients have favorable conditions for the growth and proliferation of different genotypes of *Candida albicans*. In conclusion, molecular typing using RAPD-PCR revealed a genomic heterogeneity in the *Candida albicans* clinical isolates studied in HIV-infected patients.

Keywords: Oropharyngeal candidiasis, *Candida albicans*, Genotyping, Human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients

Citation: Katiraee F, Khosravi AR, Khalaj V, Targhibi J, Hajiabdolbaghi M. **Molecular Typing of Candida Albicans Isolates Recovered from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected Patients with Oropharyngeal Candidiasis.** J Isfahan Med Sch 2014; 31(270): 2362-72

1- Assistant Professor, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2- Professor, Mycology Research Center, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran
3- Associate Professor, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
4- Student of Veterinary, School of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
5- Professor, Iranian Research Center for HIV/AIDS (IRCHA), Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Iran
Corresponding Author: Farzad Katiraee PhD, Email: f.katiraee@tabrizu.ac.ir

www.SID.ir