

شناسایی مولکولی کاندیدا آلبیکنس های جدا شده از بیماران انکولوژی در چهار مرکز آموزشی- درمانی استان مازندران (۸۵-۸۴)

معصومه فتاحی (M.Sc.) * طاهره شکوهی (Ph.D.) ** محمدباقر هاشمی (Ph.D.) ***
محمدتقی هدایتی (Ph.D.) **** علی اخوتیان (M.D.) ***** احمد تمدنی (M.D.) *****
حسین کرمی (M.D.) ***** داریوش مسلمی (M.D.) ***** مسعود ایاز (M.D.) *****

چکیده

سابقه و هدف: تشخیص به موقع گونه‌های کاندیدایی، در بقای بیماران مبتلا به مهار سیستم ایمنی، بسیار کمک کننده است. به لحاظ این که می‌توان درمان ضد قارچی موثر را در شرایطی که هنوز میزان قارچ پایین است، آغاز نمود. هدف از این مطالعه، شناسایی کاندیدا آلبیکنس های (Candida Albicans) جدا شده از بیماران بخش تومور شناسی (Oncology) با روش های مولکولی بود.

مواد و روش‌ها: ۶۲ کاندیدا آلبیکنس مجزا با آزمون‌های فنوتیپی (رنگ کلونی روی محیط کروم آگار، تشکیل جرم تیوب و تولید کلامیدوسپور روی محیط کورن میل آگار دارای ۱ درصد توئین ۸۰) شناسایی شدند، DNA ژنومی آنها با استفاده از روش گلوس بید/ فنل - کلروفورم جدا گردید. منطقه متغیر D1/D2 در ناحیه ژنی rDNA (26S) در همه نمونه‌ها به روش PCR و با استفاده از بتونه‌های (NL1/NL4 Primers)، به اندازه ۶۲۰ (bp) تقویت شد. الکتروفورز محصولات روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد. تعیین توالی برای ۱۸ محصول انجام شد و نتایج با کمک نرم‌افزار BLAST در سایت NCBI ارزیابی شد. تطبیق توالی‌ها با استفاده از برنامه CLUSTAL-W (version 1.83) صورت گرفت.

یافته‌ها: کلیه محصولات در جست و جوی Blast به عنوان کاندیدا آلبیکنس شناسایی شدند. همه توالی‌های بررسی شده بیش از ۹۹ درصد با توالی مرجع خود در بانک ژنی شباهت داشتند. ۴ نژاد (Strain) مختلف برای گونه آلبیکنس شناسایی گردید، شامل: نژاد AA 1622b (۱۳ نمونه)، 24698 (۳ نمونه)، 62 TA (۱ نمونه) و 551 FC (۱ نمونه). به علاوه ۱۳۱ مکان متغیر نوکلئوتیدی نیز شناسایی شد.

استنتاج: کاندیدا آلبیکنس گونه غالب تعیین شده با روش های فنوتیپی (Phenotypic) بود. به علاوه، شناسایی کاندیدا آلبیکنس‌ها با تعیین توالی ناحیه ژنی rDNA (26S)، ۱۰۰ درصد با نتایج حاصل از روش های فنوتیپی مطابق بود.

واژه های کلیدی: بتا تالاسمی ماژور، بتا تالاسمی اینتر مدیا، سنگ صفراوی، هیدروکسی اوره

این تحقیق طی شماره ۶۶-۸۴ در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است.

* کارشناسی ارشد قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

** دکترای قارچ شناسی پزشکی، عضو هیات علمی (استاد) دانشگاه علوم پزشکی مازندران

✉ **مؤلف مسئول:** ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

*** دکترای ژنتیک، عضو هیات علمی (استادیار) مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

**** دکترای قارچ شناسی پزشکی، عضو هیات علمی (دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران

***** فوق تخصص خون و انکولوژی، عضو هیات علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران

***** فوق تخصص خون و انکولوژی اطفال، عضو هیات علمی (دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران

***** فوق تخصص خون و انکولوژی اطفال، عضو هیات علمی (استادیار) مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

***** متخصص رادیوتراپی انکولوژی، عضو هیات علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت: ۸۶/۶/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۶/۹/۴ تاریخ تصویب: ۸۶/۱۰/۹

مقدمه

کاندیدا آلیکس یک قارچ طبیعی ساکن (flora) حیوان‌های خون‌گرم و انسان‌ها است (۱). این قارچ بسته به طبیعت میزبان، دو گروه عفونت را به وجود می‌آورد: عفونت‌های سطحی (مانند: دهانی، مهبلی و کاندیدیازیس جلدی) که در افراد سالم هم دیده می‌شود، عفونت‌های عمقی (مانند: ریوی، گوارشی، ادراری و کاندیدی) که در افراد با اختلال شدید ایمنی رخ می‌دهد (۲). این مخمرها معمولاً ارگانسیم‌های فرصت طلب هستند (۳). عوامل مهارکننده سیستم ایمنی مثل: شیمی‌درمانی در بیماران سرطانی، پرتودرمانی، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف، ایدز، دیابت شیرین و... موجب مهاجم شدن این قارچ‌ها می‌شوند (۴). کاندیدیازیس مهاجم یکی از عوارض شایع و بالقوه کشنده ناشی از سرطان و شیمی‌درمانی مرتبط با آن است (۵ تا ۱۰). اکثر عفونت‌های کاندیدایی توسط کاندیدا آلیکس به وجود می‌آیند (۴ تا ۶). تقریباً در نیمی از بیماران سرطانی که تحت پرتو درمانی سر و گردن قرار می‌گیرند، گونه‌های کاندیدایی تجمع می‌یابند و تولید عفونت می‌کنند که اگر این عفونت توسعه موضعی یا عمومی پیدا کند، به مرگ بیمار منتهی می‌شود (۱۱). در حالی که استفاده از داروهای ضد قارچی جدید روند کنترل عفونت‌های قارچی را بهبود بخشیده، مشکل اصلی در تشخیص به موقع عامل عفونت هنوز باقی است. لذا آغاز به موقع درمان در کاهش سرعت مرگ و میر بیماران دچار مهار سیستم ایمنی، معیار مهمی است (۱۲).

کاندیدا آلیکس به‌عنوان قوی‌ترین گونه کاندیدایی مهم پزشکی شناخته می‌شود (۱۳، ۱۴). اخیراً کاندیدا دابلینسیس به‌عنوان یک گونه جدید معرفی شده که از نظر مرفولوژی و فیزیولوژی، بسیار شبیه کاندیدا آلیکس است و در آزمایشگاه‌ها اشتباهاً به‌عنوان کاندیدا آلیکس مقاوم به فلوکونازول تشخیص داده

می‌شود. خوشبختانه تکنیک‌های مولکولی، افتراق صحیح کاندیدا آلیکس را از این گونه، ممکن می‌سازند (۱۵). لذا شناسایی صحیح گونه‌ها به منظور درمان ضد قارچی مؤثر، با توجه به آگاهی از مقاومت به داروهای ضد قارچی، ضروری است (۱۶).

وسایل قدیمی شناسایی گونه‌های کاندیدایی شامل آزمون‌های زمان بر مرفولوژیکی و جذب، برای شناسایی ایزوله‌ها در یک کشت، چندین روز زمان لازم دارند. از طرفی هنگام استفاده از سیستم‌های بیوشیمیایی خودکار، ایزوله‌های مخمری بالینی گاهاً اشتباه شناسایی می‌شوند (۱۷). لذا روش‌های مولکولی توسعه یافته، شناسایی سریع‌تر و صحیح‌تری را نسبت به روش‌های فنوتیپی قدیمی فراهم می‌کنند (۱۸). از طرفی بررسی مولکولی یک عامل عفونی برای مطالعات اپیدمیولوژیک و همچنین برای کنترل عفونت مهم است (۲). روش‌های دیگر تشخیص شامل ردیابی آنتی‌بادی، عمدتاً در جمعیت ایمونوساپرس یک عیب عمده دارند، زیرا این افراد توانایی پاسخ به عفونت به وسیله تولید آنتی‌بادی را ندارند. روش‌های ردیابی آنتی ژن مفید بوده اما هنوز در حال ارزیابی هستند. تعدادی از محققین، ایزوله‌های بالینی مخمری جدا شده از بیماران مبتلا به ولووانیت (۱۹)، کاندیدیازیس جلدی (۲۰)، و بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی، دیابت، سوختگی (۲) و مبتلایان به سرطان و بیماران مبتلا به اختلال ایمنی (۲۱) که با روش‌های متداول (مانند آزمون جرم تیوب، آزمون جذب کربوهیدرات، آزمون کلامیدوسپور، آزمون بررسی رنگ کلنی در روی کروم آگار کاندیدا و...) به‌عنوان کاندیدا آلیکس شناسایی شده بود را با روش‌های مختلف مورد بررسی مولکولی قرار داده و قدرت تشخیصی این روش‌ها را مورد بررسی قرار داده‌اند. هم‌اکنون PCR به‌عنوان یک روش کامل، ساده، ویژه، حساس و قابل اطمینان به طور

آوری و در اسرع وقت به آزمایشگاه حمل شده بودند. نمونه‌های خون زمانی که بیماران علی‌رغم درمان آنتی‌بیوتیکی همچنان تبشان ادامه داشت، گرفته شده بودند. معیار خروج از مطالعه، استفاده از درمان ضد قارچی طی دو هفته قبل بود. برای هر بیمار اطلاعات: سن، جنس، نوع بدخیمی، مکان نمونه‌گیری و استفاده از ضد قارچ‌ها ثبت گردید.

شناسایی ایزوله‌های کاندیداایی:

آزمایش مستقیم با ۱۰ درصد KOH انجام شده بود. خون به بطری‌های BHI بی‌فازیک (کوشافرآور گیتی- ایران) تلقیح شده بود و در شرایط هوازی و 30°C انکوبه شده بودند. نمونه‌های دیگر به دو محیط منتقل شده بودند: (۱) سابورودکستروز آگار (LAB M, Bury, UK) با کلرآمفنیکل ($50\ \mu\text{g/ml}$) به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در 30°C - 20°C ؛ (۲) استفاده از کروم آگار کاندیدا (CHROMagar Company, Paris, France) و نتایج بر اساس رنگ و مرفولوژی کلونی رشد یافته در مدت ۴۸ ساعت در 37°C قرائت گردید. ایزوله‌های کاندیداایی به وسیله آزمون تشکیل جرم تیوب در سرم اسب و آزمون تشکیل کلامیدوسپور روی محیط کورن‌میل آگار (DIFCO Laboratories, Detroit, Mich., USA) دارای ۱ درصد توئین ۸۰ (CMA-T₈₀) شناسایی شدند.

جداسازی DNA:

ابتدا کشت خالص از هر ایزوله کاندیدا آلیکسنس تهیه و در 30°C به مدت ۲ روز انکوبه شد. DNA با استفاده از روش فروپاشی گلس بید، جدا شده بود (۱۶). به طور مختصر بدین شرح بود: یک لوپ کامل از کاندیدا آلیکسنس تازه در $300\ \mu\text{l}$ از بافر لیز کننده ($10\ \text{mM Tris}$ ، $1\ \text{mM EDTA}$ pH:8، $1\% \text{ SDS}$ ، $100\ \text{mM NaCl}$ Triton X-100 2%) معلق شده بود. بعد

فزاینده‌ای برای تشخیص کاندیدا استفاده می‌شود. تقویت توالی اسیدهای نوکلئیک و تعیین توالی ژن‌های کد کننده rDNA هنوز به عنوان استاندارد طلایی شناسایی، اجرا می‌شود. آزمایش PCR برای تقویت منطقه متغیر ۶۰۰ نوکلئوتیدی D1/D2 به عنوان هدف در پایانه ۵' ناحیه ژنی rDNA (26S) طراحی شده بود. این منطقه rDNA برای این که جداسازی مطمئن همه گونه‌های مهم مخمری بالینی را اجازه دهد، به طور مؤثری متغیر است (۲۲). در این تحقیق ما ضمن جداسازی و شناسایی کاندیدا آلیکسنس از بیماران انکولوژی به روش کلاسیک، بررسی مولکولی به عمل آمد.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه:

این مطالعه توصیفی، در ۴ مرکز آموزشی-درمانی استان مازندران طی سال‌های ۸۵-۸۴ انجام شده بود. نمونه‌ها به طور غیر تصادفی از ۱۱۶ بیمار (۷۶ مرد و ۴۰ زن) بخش انکولوژی (بستری و سرپایی) در مرکز آموزشی-درمانی امام خمینی و بوعلی ساری، امیرکلاهی بابل و مرکز رادیوتراپی و رادیولوژی مرکز آموزشی-درمانی شهید رجائی بابل جمع‌آوری شده بودند.

جمع‌آوری نمونه:

نمونه‌ها بر اساس وجود ضایعات جلدی و جلدی-مخاطی، علائمی چون تب و همچنین علائمی که دال بر عفونت ادراری و عفونت ریوی در بیمار پس از تأیید انکولوژیست مبنی بر احتمال حضور عفونت قارچی در محل تهیه می‌گردید. نمونه‌های جلدی با روش خراشیدن (Scraping) به وسیله سوزن اسکالپل و نمونه از ضایعات مخاطی با ابزار پاک کننده پنبه‌ای (Swab) جمع‌آوری شده، نمونه‌های خلط صبحگاهی با سرفه عمیق و قسمت میانی ادرار صبحگاهی در ظروف مناسب استریل جمع

دقیقه) (تکثیر: 72°C به مدت ۲ دقیقه)؛ و یک مرحله تکثیر انتهایی 72°C به مدت ۵ دقیقه.

مقدار $8\ \mu\text{l}$ از هر محصول PCR در یک ژل آگارز $1/5$ درصد و بافر $1\times\text{TBE}$ (Boric acid, Tris base)، EDTA PH:8 (الکتروفورز شده بود. یک (100 bp) DNA Marker (محصول شرکت BIRON) همراه با نمونه‌ها برای تعیین اندازه باندها همراه شده بود. سپس ژل با اتیدیوم برماید ($0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$) رنگ آمیزی و تصویر با دستگاه UV doc (Gel Documentation and Analysis Systems user manual; Model: GAS تهیه 9000/9010: version 12; Cambridge, UK شد.

تعیین توالی محصولات PCR:

تخلیص محصولات با روش (Column based purification Kit (Millipore) using vacuum for filtering) انجام شد. منطقه D_1/D_2 در ناحیه ژنی rDNA (26S) با پرایمر NL_1 تعیین توالی گردید. تعیین توالی DNA به کمک دستگاه DNA Sequencing (ABI 3730.XL) و با روش استاندارد سنگر (Dideoxy nucleotide chain termination) صورت پذیرفت، سپس توالی های DNA به دست آمده با استفاده از نرم افزار Online Blast 2.0 به نام Blast 2.0 آنالیز گردید. گونه‌ها و استرین‌ها به وسیله جستجوی اطلاعات در سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> و ارزیابی بیشترین hit تعیین شده بودند. تطبیق توالی‌ها با استفاده از برنامه CLUSTAL-W (version 1.83) صورت گرفت.

یافته‌ها

۱۱۶ بیمار مبتلا به بدخیمی (۷۶ مرد و ۴۰ زن) در ۴ مرکز آموزشی-درمانی بررسی شدند. رنج سنی بیماران ۸۳-۲ سال و متوسط سنی آنها $25/20 \pm 43/52$ بود. بیشترین موارد مثبت کاندیدایی در رنج سنی ۶۳-۷۴

از افزودن $300\ \mu\text{l}$ فنل - کلروفرم به نسبت (۱:۱) و 300 mg گلس بید (با قطر 0.5 mm)، نمونه‌ها با شدت به مدت ۵ دقیقه تا فروپاشی کامل دیواره سلولی مخلوط شدند. بقایای سلولی به وسیله سانتریفوژ با دور 10000 rpm به مدت ۵ دقیقه مجزا شدند و لایه فوقانی ی کبار دیگر با یک حجم معادل از کلروفرم جدا شده بود. DNA با اتانول ۱۰۰ درصد در سوپرناتانت رسوب کرده بود، با اتانول ۷۰ درصد شسته شده بود؛ در هوا خشک گردیده و در بافر TE (10 mM Tris-HCL، 1mM EDTA pH:8) معلق شده بود. غلظت DNA و نسبت جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر (A_{260}/A_{280}) به روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. ژنومیک DNA جداسازی شده در -20°C تا زمان استفاده نگهداری می‌شد.

روش PCR

جفت پرایمرهای اولیگونوکلوئیدی:

(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' (forward) NL_1) و (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3' (reverse) NL_4) به منظور تقویت یک قطعه (bp) ۶۲۰ از منطقه D_1/D_2 در ناحیه ژنی rDNA (26S)، استفاده شد.

PCR در یک حجم نهایی $50\ \mu\text{l}$ انجام گردید، شامل: $2\ \mu\text{l}$ از DNA الگو، $5\ \mu\text{l}$ از $10\times\text{PCR buffer}$ ، $5\ \mu\text{l}$ از گلیسرول ۵۰٪، $1\ \mu\text{l}$ داکسی نوکلئوزید تری فسفات (5mM، محصول شرکت BIRON)، $0.5\ \mu\text{l}$ از هر پرایمر (با غلظت $25\ \mu\text{M}$ ، محصول شرکت فزیوتک ایران)، $3\ \mu\text{l}$ از $1.5\ \text{mM}$ MgCl_2 ، $0.4\ \mu\text{l}$ از Taq DNA polymerase (250 U، محصول Roche). واکنش PCR در دستگاه ترموسیکلر مدل (Thermal cycler techne- TC- 312) انجام گردید. سیکل‌های گرمایی بدین شرح بود: دناتوره ابتدایی 94°C به مدت ۵ دقیقه، که با ۳۶ سیکل به صورت زیر دنبال می‌شد: (دناتوره: 94°C به مدت ۱ دقیقه) (اتصال: 52°C به مدت ۲

جداسازی ک. آلیکس از ضایعات مخاطی و جلدی در محل دهان بوده است. در ۳۴/۲۹ درصد موارد کلینزاسیون بیش از یک گونه کاندیدایی از یک مکان مشاهده گردید.

روش‌های مولکولی برای تشخیص ایزوله‌های کاندیدا آلیکس:

آزمایش PCR: با پرایمرهای NL₁ و NL₄ برای ۶۲ DNA کاندیدا آلیکس جدا شده انجام گردید، و قطعه هدف ۶۲۰ نوکلئوتیدی از منطقه D₁/D₂ ژن rDNA (26S) برای کلیه ایزوله‌ها با موفقیت تقویت شد (شکل شماره ۱).

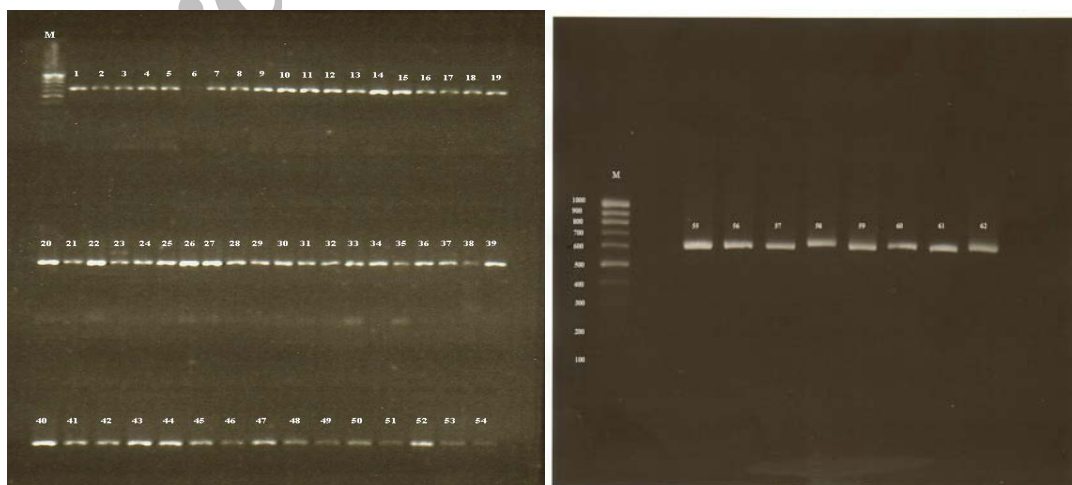
تعیین توالی محصولات PCR:

۱۸ تا از محصولات PCR با پرایمر NL₁ تعیین توالی شدند. نتایج تعیین توالی بعد از تطبیق با DNAهای موجود در بانک ژنی (Gene Bank) از طریق سایت NCBI Online (NCBI) با کمک نرم افزار BLAST برای ۱۸ محصول به وضوح گونه آلیکس را تأیید نمود و با

سال بود. از نمونه مشکوک ۷۰ بیمار (۶۰/۳۴ درصد)، کاندیدا جدا گردید. نوع غالب بدخیمی، تومور مغزی (۱۸/۵۷ درصد) بود. اکثر بیماران (۵۷/۹۸ درصد) مبتلا به کاندیدیازیس حلقی - دهانی بودند. تعداد ۱۰۲ ایزوله کاندیدایی شناسایی گردید. در ۲۴ بیمار (۲۹/۳۴ درصد) بیش از یک گونه کاندیدایی جدا گردید. که در ۱۷ بیمار (۲۹/۲۴ درصد) دو گونه متفاوت و در ۷ بیمار (۱۰ درصد) سه گونه مختلف تجمع یافته بود.

شناسایی فنوتیپی:

۶۲ ایزوله از ۱۰۲ ایزوله کاندیدایی (۷۸/۶۰ درصد) که بر روی کروم آگار کلونی‌های سبز روشن تولید کرده بودند، جرم تیوب مثبت بودند و روی محیط CMA-T₈₀ کلامیدوسپوره‌های تکی و گاهاً دوتایی تولید کرده بودند، به عنوان کاندیدا آلیکس شناسایی شده بودند. ۳۱ ایزوله مخمری به عنوان کاندیدای غیر آلیکس (به ترتیب ک. گلابراتا، ک. تروپیکالیس، ک. کروزئی و ک. کفایر) و ۸ ایزوله مخمری ناشناخته و یک ایزوله رودوترولا شناسایی گردید. تمامی موارد



شکل شماره ۱: محصولات PCR از ۶۲ DNA کاندیدا آلیکس ایزوله شده از بیماران انکولوژی که بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد رانده شده و در قطعه ۶۲۰ (bp) تولید باند نموده اند. Lane M: DNA Marker 100 (bp).

درصد با توالی مرجع خود شباهت داشتند: ۹ نمونه ۱۰۰ درصد با توالی مرجع خود در بانک ژنی شباهت داشتند و ۹ نمونه دیگر شامل نمونه کنترل (کاندیدا تروپیکالیس) ۹۹ درصد با توالی مرجع خود مشابه بود (جدول شماره ۲). برای ۱۸ محصول ذکر شده، ۱۳۱ مکان متغیر نوکلئیدی شناسایی شد، شامل: ۱۲۳ (۹۳/۸۹ درصد) منطقه هتروزیگوت که هر دو حالت آللی ظاهر شده بودند و ۸ (۶/۱۱ درصد) منطقه که جانشینی نوکلئیدی صورت گرفته بود.

نتایج آزمون‌های فنوتیپی ۱۰۰ درصد مطابقت داشت. یکی از محصولات که در شناسایی فنوتیپی (کلونی سبز تیره، جرم تیوب منفی و بلاستوسپور همراه با هیف کاذب روی CMA-T₈₀) ناشناخته بود، به عنوان کنترل تعیین توالی شد و به عنوان کاندیدا تروپیکالیس شناسایی گردید. ۴ استرین مختلف برای گونه آلیکنس شناسایی گردید، شامل: استرین AA 1622b (۱۳ نمونه)، 24698 (۳ نمونه)، TA 62 (۱ نمونه) و 551 FC (۱ نمونه). از نمونه‌های متوالی ۳ بیمار، دو استرین متفاوت 24698 و AA 1622b جدا گردید. همه توالی‌های بررسی شده بیش از ۹۹

جدول شماره ۱: تعیین گونه و تعیین استرین‌های کاندیدا آلیکنس با استفاده از تعیین توالی ژن 26S.

شماره بیمار	شماره نمونه	Strain no.	Accession no.	% Similariy	Identity ¹	Bit Score ²
P _I	CAF ₁	24698	AY 601154	99	566/567	1018
	CAF ₂	AA 1622b	AF 156536	100	560/560	1011
P _{II}	CAF ₃	24698	AY 601154	99	564/566	1012
	CAF ₄	AA 1622b	AF 156536	99	562/563	1011
P _{III}	CAF ₅	24698	AY 601154	99	566/568	1018
	CAF ₆	AA 1622b	AF 156536	100	560/560	1011
P _{IV}	CAF ₇	AA 1622b	AF 156536	100	562/562	1014
	CAF ₈	AA 1622b	AF 156536	99	558/560	1002
P _V	CAF ₉	AA 1622b	AF 156536	100	568/568	1025
P _{VI}	CAF ₁₀	AA 1622b	AF 156536	100	570/570	1029
P _{VII}	CAF ₁₁	AA 1622b	AF 156536	99	572/573	1029
P _{VIII}	CAF ₁₂	AA 1622b	AF 156536	100	557/557	1005
P _{IX}	CAF ₁₃	AA 1622b	AF 156536	99	558/559	1003
P _X	CAF ₁₄	AA 1622b	AF 156536	100	567/567	1023
P _{XI}	CAF ₁₅	AA 1622b	AF 156536	100	567/567	1023
P _{XII}	CAF ₁₆	TA 62	AF 156537	100	555/555	1002
P _{XIII}	CAF ₁₇	551 FC	DQ 318814	99	526/527	946
P _{XIV}	CAF ₁₈	AA 1622b	AF 156536	99	555/557	989
P _{III}	CAF ₁₉	C. tropicalis (XJURML)	EF 151501	99	557/558	1002

۱. NCBI BLAST terminology: طول توالی مورد آزمایش (Query) در مقایسه با توالی گزارش شده در (Subject) Gene Bank

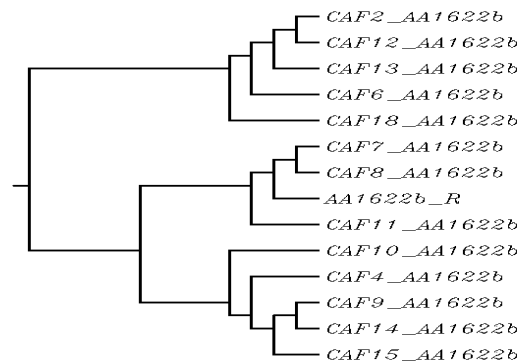
۲. NCBI BLAST terminology: ارزش معمول تطبیق، که از امتیاز خام تطبیق مشتق شده (برای مقایسه امتیاز تطبیقی در جستجوهای مختلف استفاده می‌شود).

قابل ذکر است که استرین‌های تعیین شده در این مطالعه توسط نرم‌افزار BLAST و نتایج مرتبط با آن نیاز به تایید با روش‌های دقیق تری چون RFLP و RAPD دارد که هم اکنون در حال انجام است.

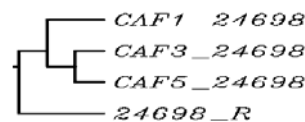
نتایج ارزیابی ارتباط فیلوژنتیکی استرین‌ها به دنبال آنالیز تطبیق توالی‌ها با برنامه Clustal-W، در اشکال (۵-۲) نشان داده شده است. آنچه که موجب شده بعضی استرین‌های مشابه در یک شاخه نباشند، عدم تطبیق ابتدا و انتهای سکانس‌ها می‌باشد.

ارزیابی شد (۵،۴)؛ و چنانچه برآورد گردید، کاندیدایزاس سرطانی حلقی-دهانی یک عفونت معمول در بیماران سرطانی است (۲۳،۱۱،۴). کلنیزه شدن بیش از یک گونه کاندیدایی در یک مکان ویژه واقعه غیر معمولی نیست، و در مبتلایان سرطان نازوفارنکس حتی بیش از ۴۴ درصد هم می‌تواند باشد (۲۴). همچنان که در مطالعه حاضر میزان کلنیزاسیون ۳۴/۲۹ درصد و در بررسی Davies و همکاران (۲۰۰۲) ۲۳ درصد گزارش شده بود (۲۳). در هر دو مطالعه از محیط کروموزنیکی مثل کروم آگار جهت شناسایی استفاده شده بود، زیرا این محیط برای تخمین جمعیت مخلوط (mix) کاندیدایی محیطی حساس شناخته شده است (۲۵). در بررسی حاضر گونه‌های غالب شناسایی شده با روش‌های فوتویی: کاندیدا آلیکس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس بود؛ گونه‌های مذکور در کل بیش از ۸۰ درصد ایزوله‌های کاندیدایی را شامل می‌شدند، که با نتایج Safdar و همکاران (۲۰۰۱) مطابقت دارد (۲۶). از طرفی Davies و همکاران (۲۰۰۲)، گونه‌های رایج در مطالعه خود را، کاندیدا آلیکس (۴۶ درصد)، کاندیدا گلابراتا (۱۸ درصد) و کاندیدا دابلینسیس (۵ درصد) اعلام کردند (۲۳). لذا حضور گونه‌های دیگر جنس کاندیدا، مانند: کاندیدا دابلینسیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا کروژنی، کاندیدا لوسیتانیا، کاندیدا استلاتوئیده و کاندیدا گیلر موندی نیز رو به افزایش است (۲۷) و این افزایش با گستردگی استفاده از درمان‌های تری آزولی (۲۸) و پروفیلاکسی فلوکونازولی (۵) مرتبط است. لذا ضرورت شناسایی صحیح و سریع گونه‌ها به منظور درمان ضد قارچی موثر احساس می‌شود.

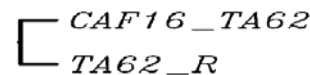
امروزه روش‌های مولکولی در شناسایی صحیح و سریع گونه‌ها کمک شایانی نموده‌اند. اهداف ریبوزومی، خصوصاً حوضه D1/D2 از ژن DNA، انتظارات ویژه‌ای برای شناسایی مولکولی نشان داده‌اند. در حال حاضر،



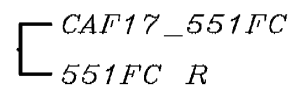
شکل شماره ۲: شاخه فیلوژنتیکی از استرین‌های AA 1622b



شکل شماره ۳: شاخه فیلوژنتیکی از استرین‌های 24698



شکل شماره ۴: شاخه فیلوژنتیکی از استرین‌های TA 62



شکل شماره ۵: شاخه فیلوژنتیکی از استرین‌های 551 FC

بحث

کاندیدایزاس مهاجم یکی از عوارض شایع و بالقوه کشنده ناشی از درمان بالاحص شیمی درمانی، در بیماران سرطانی است. در این بررسی و بررسی‌های مشابه، شیوع موارد مثبت کاندیدا، بیش از ۵۰ درصد

و خاطر نشان ساخته‌اند که در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی جایگزین روش‌های متداول گردیده و به صورت روزمره مورد استفاده قرار گیرد، و این در حالی است که تکنیک‌های مولکولی تخمین گونه‌های کاندیدایی در حد یک ابزار تحقیقاتی باقی مانده است و تا زمانی که به صورت ارزان و کارا در نیاید، احتمال کمی است که جایگزین روش‌های شناسایی سنتی شود.

در این مطالعه، کاندیدا آلیکنس گونه غالب تعیین شده با روش‌های فنوتیپی بود. به علاوه این که، شناسایی کاندیدا آلیکنس‌ها با تعیین توالی ناحیه ژنی rDNA (26S)، ۱۰۰ درصد با نتایج حاصله از روش‌های فنوتیپی مطابق بود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاون محترم آموزشی و پژوهشی دانشکده پزشکی، جناب آقای دکتر علیرضا رفیعی به خاطر راهنمایی‌های ارزنده و همکاری صمیمانه، تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین مراتب تشکر خود را از مسؤولین بخش‌های آنکولوژی بیمارستان‌های: امیر کلاهی بابل (خانم خبیری)، امام (ره) ساری (خانم مهدوی)، بوعلی ساری (خانم امین اسلامی) و کارکنان مرکز رادیوتراپی شهید رجایی بابل (آقای دکتر صفیری، خانم دکتر کریمی) و کارکنان محترم آزمایشگاه ابراز می‌دارد. در ضمن متذکر می‌گردد که این مقاله حاصل پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد قارچ شناسی خانم معصومه فتاحی از دانشگاه علوم پزشکی مازندران می‌باشد.

توالی منطقه D1/D2 تقریباً در همه مخمرها تعیین شده است (۳۰،۲۴). در مطالعه حاضر و بررسی‌های دیگر (۳۱،۳۰،۱۸)؛ آنالیز توالی D1/D2 واقع در ناحیه 26S rDNA مورد استفاده قرار گرفت. نتایج تعیین توالی این ناحیه برای استرین‌های مورد آزمایش، بیش از ۹۹ درصد با استرین مرجع شباهت داشت که با مطالعه پرایس (Pryce) (۲۰۰۶) همخوانی دارد. در هر دو مطالعه، DNA از کلونی‌های حاصل از کشت مجدد جدا شده بود. در این تکنیک جداسازی، احتمال ترکیب ایزوله‌ها کاهش یافته و درصد شباهت با استرین مرجع افزایش می‌یابد. از چهار استرین شناسایی شده در مطالعه حاضر، دو استرین (AA 1622b و TA 62) با استرین‌های شناسایی شده در بررسی فورچ (Forche) و همکاران (۱۹۹۹) مشابه بود. مطالعه فورچ (Forche) و همکاران (۱۹۹۹) بیان کرده‌اند که جهت ترسیم دندروگرام‌ها از اطلاعات PCR fingerprinting و Multilocus Genotype (MLG) استفاده نموده‌اند (۳۰). لذا می‌توان گفت تعیین استرین با توالی (sequencing) نیاز به تایید با آزمایش‌های دقیق‌تری چون: MLG, PCR fingerprinting, RFLP, RAPD و ... دارد. در مطالعه حاضر نتایج آزمون‌های فنوتیپی و مولکولی کاملاً انطباق داشت، که با نتایج سایر مطالعات مشابهت دارد (۳۴ تا ۳۲، ۱۶). با توجه به شناسایی سریع‌تر و صحیح‌تر روش‌های مولکولی نسبت به آزمون‌های تشخیصی متکی بر فنوتیپ، سایر محققین (۳۷-۳۵) ارجحیت این روش را بر روش‌های متداول نشان داده‌اند

فهرست منابع

1. Dalle F, Franco N, Lopez J. Comparative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and non-bloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4554-9.
2. Karahan Z.C, Guriz H, Agirbasli H, Balaban N, Gocmen J.S, Aysev D, et al. Genotype distribution of *Candida albicans* isolates by 25S intron analysis with regard to invasiveness. *Mycoses* 2004;47:465-469.

3. Mannarelli B.M, Kurtzman C.P. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36(6): 1634-1641.
4. AL-Abeid H.M, Abu-Elteen K.H, Elkarmi A.Z and Hamad M.A. Isolation and characterization of *Candida* Spp. in Jordanian cancer patients: prevalence, pathogenic determinants, and antifungal sensitivity. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57: 279- 284.
5. Dinubile M.J, Hille D, Sable C.A, Kartsonis N.A. Invasive candidiasis in cancer patients: observation from a randomized clinical trial. *J Infect* 2005; 50: 443- 449.
6. Bodey G.P, Mardani M, Hanna H.A. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am J Med* 2002; 112: 380-5.
7. el Mahallawy H.A, Attia I, Ali- el- Din N.H, Salem AE and Abo-el-Naga S. A prospective study on fungal infection in children with cancer. *J Med Microbiol* 2002; 51: 601- 5.
8. Marr K.A. The changing spectrum of candidemia in oncology patients: therapeutic implications. *Curr Opin Infect Dis* 2000; 13: 615-20.
9. Uzun O, Anaissie E.J. Predictors of outcome in cancer patients with candidemia. *Ann Oncol* 2000; 11: 1517- 21.
10. Viscoli C, Girmenia C, Marinus A. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the invasive fungal infection group (IFIG) of the European organization for research and treatment of cancer (EORTC). *Clin Infect Dis* 1999; 28: 1071- 9.
11. Koc M, Aktas E. Prophylactic treatment of mycotic mucositis in radiotherapy of patients with head and neck cancers. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33(2): 57- 60.
12. Martin C, Roberts D, Weide M, Rossau R, Jannes G, Smith T, et al. Development of a PCR- based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 2000; 38(10): 3735- 3742.
13. Galan A, Veses V, Murgui A, Casanova M, Martinez J.P. Rapid PCR- based test for identifying *Candida albicans* by using primers derived from the PH-regulated *KER1* gene. *FEMS Yeast Res* 2006; 6: 1094- 1100.
14. Calderone R.A. *Candida and candidiasis*, 1st edn. ASM press, Washington, DC. 2002.
15. Dignani M.C, Solomkin J.S, Anaissie E.J. *Candida*. In: Anaissie E.J, McGinnis M.R, Pfaller M.A; editors. *Clinical Mycology*. New York: Churchill Livingstone; 2003, P: 196.
16. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one- enzyme PCR-RFLP assay for identification of six

- medically important *Candida* species. *Jpn J Med Mycol* 2006; 47: 225- 229.
17. Munoz C.B, Boldo X.M, Tanaca L.V, Rodriguez C.H. 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- 420.
 18. Leaw S.N, Chang H.C, Sun H.F, Barton R, Bouchara J.P, Chang T.C. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J Clin Microbiol* 2006; 44(3): 693- 699.
 19. Tabrizi SN, Pirota MV, Rudland E, Garland SM. Detection of *Candida* species by PCR in self- collected vaginal swabs of women after taking antibiotics. *Mycoses* 2006; 49: 523- 524.
 20. Kamiya A, Kikuchi A, Tomita Y, Kanbe T. Epidemiological study of *Candida* mix specific for the DNA topoisomerase II gene. *J of Dermatol Science* 2005; 37: 21- 28.
 21. Bu R, Sathiapalan RK, Ibrahim MM, et al. Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *J Med Microbiol* 2005; 54: 243- 248.
 22. Kurtzman C.P, Robnett C.J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the Large- Subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol* 1997; 35(5): 1216- 1223.
 23. Davies A.N, Brailsford S, Broadley K, Beighton D. Oral yeast carriage in patients with advanced cancer. *Oral Microbiol Immunol* 2002; 17: 79- 84.
 24. Leung W.K, Dassanayake R.S, Yau J.Y, et al. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. *J Clin. Microbiol* 2000; 38: 2219.
 25. Pfaller M.A, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 58- 61.
 26. Safdar A, Chaturvedi V, Cross E.W, Park S, Bernard E.M, Armstrong D, et al. Prospective study of *Candida* species in patients at a comprehensive cancer center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45(7): 2129-2133.
 27. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis: a review. *Postgrad Med J* 2002; 78: 455- 459.
 28. Pfaller M.A, Messer S.A, Hollis R.J, Jones R.N, Doern G.V, Brandt M.E, et al. Trend in species distribution and susceptibility to fluconazole among blood stream isolates of *Candida*

- species in the United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 33: 217- 222.
29. Fell J.W, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell- Tallman A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by Large- Subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evoi Microbiol* 2000; 50: 1351- 1371.
30. Forche A, Schonian G, Graser Y, Vilgalys R, Mitchell T.M. Genetic structure of typical and atypical populations of *Candida albicans* from Africa. *Fungal Genetics and Biology* 1999; 28: 107-125.
31. Li J, Xu Y.C, Bai F.Y. *Candida pseudorugosa* sp. nov; a novel yeast species from sputum. *J Clin Microbiol* 2006; 44(12): 4486- 4490.
32. Pryce T.M, Palladino S, Price D.M, Gardam D.J, Campbell P.B, Christiansen K.J, et al. Rapid identification of fungal pathogens in BacT/ALERT, BACTEC, and BBL MGIT media using Polymerase Chain Reaction and DNA sequencing of the internal transcribed spacer regions. *Diagn microbial Infect Dis* 2006; 54: 289- 297.
33. Unzaga M.j, Gallego L, Berdonces P, Dones J.R, Cisterna R. Diagnosis of candidosis by amplification of small subunit of 18S rRNA gene. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 23-25.
34. Bu R, Sathiapalan R.K, Ibrahim M.M, Al- Mohsen I, Almodavar E, Gutierrez M.I, et al. Monochrome lightcycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *J Med Microbiol* 2005; 54: 243- 248.
35. Chen Y.C, Eisner J.D, Kattar M.M, Rassoulia- Barrett S.L, Lafe K, Yarfitz S.L, et al. 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 Microbiol* 2000; 38(6): 2302- 2310.
36. Millar B.C, Moore J.E, Xu J, Walker M.J, Hedderwick S, McMullan R. Genotypic subgrouping of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by 25S intron analysis. *Letters in Applied Microbiology* 2002; 35: 102- 106.
37. klingspor L, Jalal S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real- time PCR. *Clin Microbiol Infect Dic, CMI* 2006; 12: 745- 753.