Archive OF SID

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۳، شماره ۱: از ۷۹-۹۱
بهار ۱۳۸۹

شناسایی مخمرهای بیماری‌زای جدا شده از عفونت‌های قارچی ناخن در تهران با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و برش آنزیمی

محمد قهری[۱]، سیدحسین میرهندی[۲*]، محمدحسین یادگاری[۳]، ابراهیم حاجی‌زاده[٤]، محمدرضا شیدفر[٥]

۱- دانشجوی دکتری، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت و انستیتو ملی تحقیقات سلامت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
٤- دانشیار، گروه آمار حیاتی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
٥- استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۰۶/۲۹ پذیرش مقاله: ۸۸/۱۲/۱۱

چکیده

هدف: عفونت قارچی ناخن (اونیکومایکوزیس) بیماری شایعی در همه جوامع است و حدود ۵۰ درصد بیماری‌های ناخن را تشکیل می‌دهد. مخمرها از جمله عوامل مهم بروز این عفونت‌ها هستند. شناسایی گونه‌های مخمری عامل، از نقطه نظر همه‌گیری‌شناسی و نیز از لحاظ انتخاب درمان مناسب، اهمیت دارد. هدف از مطالعه حاضر شناسایی دقیق گونه مخمرهای بیماری‌زای جدا شده از عفونت‌های قارچی ناخن درسطح گونه به‌وسیله روش‌های مبتنی بر DNA است.

مواد و روش‌ها: مخمرهای جدا شده از ضایعات ناخن با توجه به ویژگی‌های ریخت‌شناسی آن‌ها شناسایی اولیه شدند. برای تعیین هویت مخمرها در سطح گونه، DNA هر نمونه با استفاده از روش جوشاندن استخراج و ناحیه ITS موجود در DNA ریبوزومی به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تقویت شد. قطعه تکثیر شده به کمک آنزیم محدودالاثر *Msp*I هضم اندونوکلئازی شد و ماهیت هر مخمر با توجه به تفاوت الگوی الکتروفورزی هر گونه تعیین شد. در این مطالعه پروفایل آنزیمی جدیدی برای افتراق نهایی کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس به کار رفت. تعداد معدودی از مخمرها نیز به روش تعیین توالی ناحیه ITS شناسایی شدند.

نتایج: کاندیدا آلبیکنس به میزان ٤٥/٦ درصد شایع‌ترین گونه و سایر گونه‌های شایع غیر آلبیکنس شامل کاندیدا پاراپسیلوزیس با میزان ۲۲/۵ درصد و کاندیدا تروپیکالیس با میزان ۲۱/۸ درصد بودند. گونه‌های کمتر شایع مربوط به کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کروزئی، کاندیدا کفیر، کلاویسپس لوزیتانیا، کاندیدا گیلرموندی و مچنیکوویا پولچریما به‌ترتیب با میزان شیوع ۲/۷۲ درصد، ۲ درصد، ۱/۳٦ درصد، ۱/۳٦ درصد، ۰/٦۸ درصد و ۰/٦۸ درصد بود. در بین ایزوله‌های شناسایی شده تحت عنوان کاندیدا آلبیکنس در این مطالعه هیچ مورد کاندیدا دابلینینسیس مشاهده نشد. دو نمونه (۱/۳٦ درصد) مربوط به جنس تریکوسپورون نیز تعیین هویت شد. بیشترین شیوع اونیکومایکوزیس در این مطالعه مربوط به گروه سنی ٤۰ تا ۷۰ سال و اکثریت نمونه‌ها مربوط به زنان (اونیکومایکوزیس ناخن‌های دست) با شیوع ۸۳/۲ درصد بود.

نتیجه‌گیری: با وجودی که گونه آلبیکنس همچنان شایع‌ترین گونه جدا شده از ضایعات این بیماری است؛ اما افزایش موارد جداسازی گونه‌های غیر آلبیکنس از ضایعات اونیکومایکوزیس قابل توجه است. این مطالعه نشان

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه قارچ‌شناسی و انگل‌شناسی، کدپستی: ١٤٧١٦١٣١٥١
Email: mirhendi@tums.ac.ir

www.SID.ir

Archive OF SID

داد که برای شناسایی برخی از گونه‌ها، روش‌های معمول فنوتیپی برای شناسایی مخمرها کفایت نمی‌کند و استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP می‌تواند دامنه شناسایی مخمرها را تا سطح ۹۸ درصد افزایش دهد. برای شناسایی باقیمانده گونه‌ها می‌توان از روش‌های گران‌تری نظیر تعیین توالی ژن مورد نظر استفاده نمود.

کلیدواژگان: عفونت قارچی ناخن، مخمر، شناسایی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، برش آنزیمی

۱- مقدمه

اونیکومایکوزیس (Onychomycosis) بیماری قارچی ناخن‌های دست و پا است که به‌وسیله گونه‌های مختلف درماتوفیت‌ها (Dermatophytes)، مخمرها، و قارچ‌های ساپروفیت ایجاد شده و حدود ۵۰ درصد بیماری‌های ناخن را به خود اختصاص می‌دهد [۱]. همچنین در بعضی مطالعات ۳۰ درصد عفونت‌های قارچی سطحی مربوط به اونیکومایکوزیس است [۲]. گزارش‌های مربوط به شیوع اونیکومایکوزیس در جمعیت‌های مناطق مختلف دنیا بسیار متفاوت و متغیر است و از ۲ تا ۳ درصد در جمعیت ایالات متحده آمریکا، تا ۱۳ درصد در جمعیت مردان فنلاندی [۳] و نیز در برخی گزارش‌ها ۵ درصد [٤] یا ۱۰درصد [۵] ذکر شده است. اخیراً نیز شیوع اونیکومایکوزیس در سنین ٤۰ تا ٦۰ سالگی را در حدود ۲۰ درصد گزارش کرده‌اند [٦]. اونیکومایکوزیس یکی از نخستین تظاهرات عفونت ویروس نقص سیستم ایمنی اکتسابی انسان (Human Immunodeficiency Virus: HIV) با شیوع ۱۵ الی ٤۰ درصد است [۷]. این عارضه در تمام سنین دیده می‌شود؛ اما با افزایش سن بر شیوع و بروز آن افزوده می‌شود [۳، ۸]. شیوع عوامل مختلف درماتوفیتی، مخمری یا ساپروفیتی عامل اونیکومایکوزیس در مناطق مختلف جغرافیایی و جمعیت‌های انسانی متفاوت است. در اکثر نقاط دنیا، شایع‌ترین عامل درماتوفیتی اونیکومایکوزیس، تریکوفیتون روبروم (*Trichophyton rubrum*) [۲، ۹-۱۲] و شایع‌ترین عامل مخمری کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) [۱، ٤، ۹، ۱۱، ۱۳] است. به‌طور کلی اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌ها و درماتوفیت‌ها بیشتر در ناخن‌های پا و اونیکومایکوزیس ناشی از مخمرها اغلب در ناخن‌های دست مشاهده و گزارش شده‌اند [٦، ۱۱، ۱۲، ۱٤].

عوامل مستعد کننده متعددی برای این بیماری مطرح شده است که برخی از مهم‌ترین آن‌ها، وقوع اختلال در خون‌رسانی موضعی، نوروپاتی (Neuropathy) محیطی، دیابت ملیتوس (Diabetes Mellitus)، آسیب ناشی از ضربات کوچک مکرر، نقایص محدود ایمونولوژیکی و ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) [۷] است. علی‌رغم وجود مواد ضد قارچی مؤثر، درمان اونیکومایکوزیس همچنان به‌عنوان یک مشکل بهداشتی باقی مانده است. با توجه به افزایش جمعیت افراد دارای سیستم ایمنی آسیب دیده و نیز تغییرات مربوط به قدرت بیماری‌زایی قارچ‌ها و بروز مقاومت دارویی، گونه‌های مختلف کاندیدا به‌عنوان بیماری‌زاهای با اهمیتی تلقی می‌شوند [٦]. تشخیص دقیق اونیکومایکوزیس از طریق آزمایش میکروسکوپی، کشت قارچ و آزمایش‌های بافت‌شناسی (هیستوپاتولوژی) صورت می‌گیرد؛ اما برای تعیین هویت گونه عامل بیماری از روش‌های مختلفی که تقریباً همگی آن‌ها بر پایه مطالعه ویژگی‌های فنوتیپی نظیر ریخت‌شناسی (Morphology) کلونی، بیوشیمی و فیزیولوژی (الگوهای جذب و تخمیر قندها) است، استفاده می‌شود. این روش‌ها با وجود دقت و اعتبار خوبی که دارند، اغلب وقت‌گیر بوده و گاهی نیز محدودیت‌هایی برای تشخیص برخی از گونه‌ها وجود دارد. روش‌های جدیدتر بیشتر براساس مطالعه خصوصیات ژنوتیپی مانند بررسی اختلاف ترادف قطعات خاصی از زنجیره اسید نوکلئیک ژنومی در هر مخمر است.

www.SID.ir

Archive OF SID

در اغلب مطالعاتی که در ایران انجام شده است، علاوه بر کاندیدا آلبیکنس به شناسایی برخی از گونه‌های شایع‌تر نیز اشاره شده ولی در نهایت گونه‌های کمتر شایع شناسایی نشده و از آن‌ها با عبارت «سایر گونه‌ها» نام برده شده است [٤، ١٣]. هدف مطالعه حاضر به‌کارگیری روش ژنوتیپی با استفاده از روش PCR و هضم آنزیمی قطعه تکثیر شده به کمک آنزیم محدودالاثر یعنی روش PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) برای تعیین هویت دقیق و صحیح عوامل مخمری عامل اونیکومایکوزیس بوده است، ضمن این‌که نتایج به‌دست آمده با نتایج حاصل از به‌کارگیری سه روش مبتنی بر ریخت‌شناسی از قبیل آزمایش تولید لوله زایا، کشت خطی در محیط کورن میل آگار (Corn Meal Agar: CMA) محتوی توین ۸۰ و کشت در محیط «کروم آگار کاندیدا» (CHROMagar Candida) مقایسه شده است. همچنین با توجه به این‌که هیچ‌کدام از روش‌های رایج قادر به تفکیک کاندیدا دابلینینسیس (*C. dubliniensis*) از کاندیدا آلبیکنس نیست، برای حصول اطمینان از تأیید هویت قطعی ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس از یک پروفایل آنزیمی جدید استفاده شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری نمونه‌ها و کشت

در این مطالعه از ۹ سویه مخمری به‌عنوان گونه‌های استاندارد و مرجع استفاده شد. فهرست این سویه‌ها در جدول ۱ درج شده است. تعداد ۱۳۸ نمونه کشت مثبت مربوط به عوامل مخمری جدا شده از ضایعات قارچی ناخن از طریق دو آزمایشگاه اختصاصی قارچ‌شناسی در تهران از شهریور ١٣٨٦ تا اسفند ۱۳۸۷ به‌مدت ۱۸ ماه جمع‌آوری شد. اطلاعات اولیه مربوط به بیماران و مشخصات ظاهری کلونی‌ها و تعداد آن‌ها ثبت و از آن‌ها در محیط کروم آگار کاندیدا (ساخت فرانسه) کشت مجدد انجام شد. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری و بعد از ٤٨ ساعت اقدام به بررسی مشخصات کلونی و واکنش رنگی ایجاد شده، گردید. ایزوله‌ها با مقایسه رنگ کلونی‌های متعلق به سویه‌های استاندارد و نیز رنگ‌های معرفی شده از طرف شرکت سازنده شناسایی شدند.

۲-۲- آزمون ایجاد لوله زایا

از کلونی‌های رشد کرده در محیط سابورو دکستروز آگار (Sabouraud' s dextrose agar) به لوله حاوی نیم میلی‌لیتر سرم تازه انسان اضافه و به‌خوبی مخاوط شد و بعد از ۲ ساعت انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌صورت میکروسکوپی از نظر وجود یا فقدان لوله زایا بررسی شد.

۲-۳- کشت خطی در محیط CMA حاوی توین ۸۰

با کمک آنس نوک تیز، کمی از یک کلونی روی محیط CMA حاوی توین ۸۰ که در پلیت‌های به قطر ۸ سانتی‌متر تهیه شده بود، به‌صورت خطی کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای اتاق نگهداری و بعد از سه روز با کمک عدسی ضعیف میکروسکوپ بررسی شد.

جدول ۱ سویه‌های مخمری استاندارد تهیه شده از کلکسیون‌های بین‌المللی، مورد استفاده در این تحقیق

نام مخمر	منبع تهیه مخمر	شماره سویه
کاندیدا آلبیکنس	ATCC	۱۰۲۳۱
کاندیدا دابلینینسیس	CBS	۷۹۸۷ و ۷۹۸۸
کاندیدا گلابراتا (*C. glabrata*)	ATCC	۹۰۰۳۰
کاندیدا پاراپسیلوزیس (*C. parapsilosis*)	ATCC	۹۰۰۱۸
کاندیدا کروزئی (*C. krusei*)	ATCC	٦٢٥٨
کاندیدا تروپیکالیس (*C. tropicalis*)	ATCC	۰۷۵۰
کاندیدا روگوزا (*C. rugosa*)	TIMM	٢٩٤١
کاندیدا لوزیتانیا (*C. lusitaniae*)	JCM	١٦١٩

www.SID.ir

Archive OF SID

۲-٤- آزمایش‌های مولکولی

۲-٤-۱- ذخیره‌سازی سویه‌ها برای نگهداری و انجام آزمایش‌های مولکولی

یک یا چند کلونی خالص و تازه از روی محیط سابورو دکستروز آگار برداشته و در لوله‌های دربدار یک و نیم میلی‌لیتری محتوی گلیسرول استریل ۳۵ درصد منتقل شد. این لوله‌ها در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش نگهداری شد.

۲-٤-۲- انتخاب آغازگرها (Primers) و DNA ی هدف

براساس مطالعات قبلی انجام شده راجع به مولکول‌های مختلف DNA در میکروارگانیسم‌های مختلف، ازجمله تجربیات میرهندی و همکاران [۱۵] برای شناسایی شش گونه مهم بیماری‌زا، در این مطالعه نیز روش PCR-RFLP در مورد ژن مسئول کد کردن RNA ریبوزومی (rDNA)، استفاده شد. از آغازگرهای ITS1 به‌عنوان آغازگر رفت و ITS4 به‌عنوان آغازگر برگشت استفاده شد. توالی آغازگرهای فوق عبارت بود از:

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

۲-٤-۳- استخراج DNA

مطابق روش قبلاً توصیف شده [۱٦]، یک لوپ باکتریولوژی (حدود ۱۰ میلی‌متر مکعب) از کلونی تازه برداشته و به لوله یک و نیم میلی‌لیتری محتوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده و بعد از مخلوط کردن، به‌مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری جوش قرار داده و سپس با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. بخش رویی حاوی DNA خام به‌عنوان الگو استفاده شد.

۲-٤-٤- PCR

بعد از انجام آزمایش‌های متعدد مواد زیر با غلظت‌های ذکر شده برای یک واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR استفاده شد: ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X، ۱/۵ میلی‌مولار کلرور منیزیم، آغازگرهای رفت و برگشت هرکدام ۲۵ پیکومول، ٤۰۰ میکرومولار از ٤ نوع نوکلئوتید (dNTPs)، ۱/۲۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز *Taq* (*Taq* DNA polymerase)، ۲ میکرولیتر DNA الگو و مقدار کافی آب مقطر تا رسیدن به حجم کلی ۲۵ میکرولیتر. برنامه اجرا شده برای PCR عبارت بود از: واسرشتگی (Denaturation) اولیه؛ حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه- یک چرخه، تکثیر DNA؛ حرارت‌های ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ٥٦ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٥ ثانیه طی ۳۰ چرخه و بالاخره برای تکثیر نهایی؛ دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه طی یک چرخه. برای انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر مدل Corbett Research ساخت استرالیا استفاده شد.

۲-٤-٥- الکتروفورز

برای تفکیک قطعات DNA، آگاهی از موفقیت در واکنش و اندازه محصول PCR و نیز رنگ‌آمیزی و قابل مشاهده کردن آن‌ها، ۷ میکرولیتر از محصول PCR به ۳ میکرولیتر محلول رنگ‌کننده (حاوی رنگ‌های برومونفل بلو (Bromophenole blue) و گزیلن سیانول (Xylene Cyanol) افزوده و سپس تمام حجم آن در چاهک‌های ژل آگارز انتقال داده شد و به کمک جریان الکتریسیته مستقیم با ولتاژ ۵ الی ۱۰ ولت به ازای هر سانتی‌متر طول ژل (بین ۸۰ الی ۱۰۰ ولت) الکتروفورزشد. بافر TBE (تریس ۹۰ میلی‌مولار، اسید بوریک ۹۰ میلی‌مولار و EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ۲ میلی‌مولار، pH=۸/۳) برای ساختن ژل و نیز پر کردن تانک الکتروفورز استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی ژل از رنگ اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) به غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد و سپس با طول موج ۳۱۲ نانومتر با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور (Transilluminator) مشاهده و با

www.SID.ir

Archive OF SID

کمک دستگاه ژل داک (Uvidoc, England) (Gel doc) به روش دیجیتال عکس‌برداری شد.

۲-٤-٦- PCR-RFLP

محصولات PCR با استفاده از آنزیم محدودالاثر *Msp*I (شرکت Fermentas، لیتوانی) مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. برای هر واکنش ۱۵ میکرولیتری مقدار ۱/۵ میکرولیتر از بافر اختصاصی آنزیم، ۵ واحد (۰/۵ میکرولیتر) آنزیم، ۳ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR مخلوط و به‌مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد و سپس ۷ میکرولیتر از آن در ژل آگارز ۱/۸ درصد الکتروفورز و گونه‌های مخمری با توجه به الگوی الکتروفورزی به‌دست آمده [۱۵] و با در نظر گرفتن اندازه‌های به‌دست آمده از آنالیز توالی‌ها (جدول ۲) شناسایی شد.

جدول ۲ اندازه محصول PCR (قطعات تکثیر شده ITS1-ITS2) مربوط به گونه‌های مختلف کاندیدا قبل و بعد از هضم آنزیمی با MspI

گونه های کاندیدا	اندازه قطعه ITS1-ITS4	اندازه محصول هضم شده با آنزیم
کاندیدا آلبیکنس	۵۳۵	۲۳۸ و ۲۹۷
کاندیدا پاراپسیلوزیس	۵۲۰	۵۲۰
کاندیدا تروپیکالیس	۵۲٤	۱۸٤ و ۳٤۰
کاندیدا کروزئی	۵۱۰	۲٤۹ و ۲٦۱
کاندیدا گیلرموندی (*C. guilliemondi*)	٦۰۸	۸۲ و ۱۵۵ و ۳۷۱
کاندیدا گلابراتا	۸۷۱	۳۱٤ و ۵۵۷
کاندیدا لوزیتانیا	۳۸۳	۲٦٦و ۱۱۷
کاندیدا روگوزا	۳۹۸	۲۷۷ و ۱۲۱
کاندیدا کفیر (*C. kefyr*)	۷۲۱	۷۲۱

۲-۵- افتراق کاندیدا دابلینینسیس از کاندیدا آلبیکنس

با توجه به این‌که هیچ‌کدام از روش‌های ذکر شده فوق قادر به تفکیک دوگونه دابلینینسیس و آلبیکنس نبود، پس از آنالیز توالی‌های ناحیه ITS، یک الگوی جدید PCR-RFLP با بهره‌گیری از آنزیم محدودالاثر *Mbo*I (شرکت Fermentas، لیتوانی) برای تفکیک قطعی این دو گونه از یکدیگر در نظر گرفته شد. نمونه‌های مخمری که با کمک آزمایش‌های فنوتیپی و نیز با آزمایش PCR-RFLP با آنزیم *Msp*I، کاندیدا آلبیکنس در نظر گرفته شده، به‌منظور حصول اطمینان از تعیین هویت قطعی آن‌ها مجدداً آزمایش PCR انجام شد و محصول آن با آنزیم *Mbo*I مورد هضم آنزیمی قرار گرفت.

۳- نتایج

از مجموع ۱۳۸ نمونه واجد کشت مثبت بررسی شده طی این مطالعه، ۹٤/۲ درصد نمونه‌ها مربوط به اونیکومایکوزیس ناخن‌های دست و ۵/۸ درصد آن‌ها مربوط به ناخن‌های پا بوده‌اند. ۸۳/۲ درصد نمونه‌ها مربوط به زنان و ۱٦/۸ درصد مربوط به مردان، شایع‌ترین سن مبتلایان در فاصله سنی ٤۱ تا ۷۰ و بیشترین موارد آن ۵۰ تا ٦۰ سالگی بود. ۸۱/٤۸ درصد نمونه‌ها دارای نتایج مثبت در آزمایش مستقیم میکروسکوپی و ۱۸/۵۲ درصد آن‌ها دارای نتایج منفی بود. با توجه به این‌که از برخی از نمونه‌های بیماران بیش از یک نوع مخمر جدا شد جمعاً ۱٤۷ کلونی مخمری جداسازی و مورد آزمایش‌های بعدی قرار گرفت. جدول ۳ اطلاعات جمعیت‌شناختی مربوط به بیماران تحت مطالعه را به‌طور خلاصه نشان می‌دهد.

جدول ۳ فراوانی اونیکومایکوزیس در گروه‌های سنی مختلف

گروه‌های سنی (سال)	تعداد	درصد
۱۰-۰	۱۱	۷/۹۷
۲۰-۱۱	٦	٤/۳۵
۳۰-۲۱	۱۹	۱۳/۷۷
٤۰-۳۱	۱۵	۱۰/۸۷
۵۰-٤۱	۲۲	۱۵/۹٤
٦۰-۵۱	٤۰	۲۸/۹۹
۷۰-٦۱	۱۸	۱۳
۸۰-۷۱	٤	۲/۹
نامشخص	۳	۲/۱۷

www.SID.ir

Archive OF SID

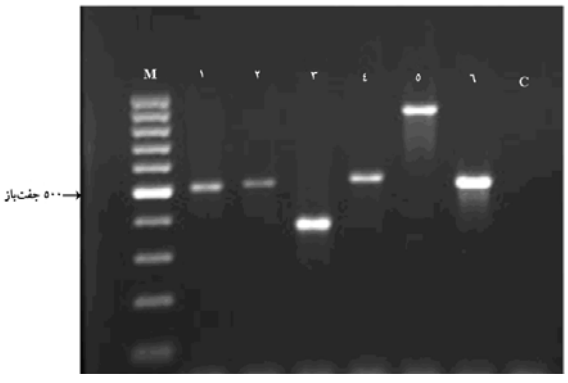
۳-۱- نتایج تشخیص به کمک سه روش فنوتیپی

با استفاده از سه روش فنوتیپی آزمایش تولید لوله زایا در سرم انسان، بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی در محیط کشت CMA حاوی توین ۸۰ و ویژگی‌های ریخت‌شناسی و خاصیت رنگ‌زایی در محیط کروم آگار کاندیدا، ۱۲۳ ایزوله از تعداد ۱٤۷ نمونه اولیه شناسایی دقیق شد که این مقدار، ۸۳/٦۷ درصد نمونه‌ها را شامل می‌شود (جدول ٤). از این تعداد، ٦۲ نمونه (۵۰/٤ درصد) مربوط به کاندیدا آلبیکنس، ۳۰ نمونه (۲٤/۳ درصد) مربوط به کاندیدا پاراپسیلوزیس و ۲۹ نمونه (۲۳/۵۸ درصد) نیز مربوط به کاندیدا تروپیکالیس و ۲ نمونه (۱/٦۳ درصد) نیز مربوط به کاندیدا گلابراتا بود. ۱٦ نمونه (۱۰/۸۸ درصد) با کمک روش‌های سه‌گانه فوق شناسایی نشد و ۸ مورد (۵/٤ درصد) نیز به‌طور اشتباهی تشخیص داده شد (آزمایش‌های بعدی مولکولی هویت دقیق آن‌ها را مشخص نمود). از تعداد ٦۷ نمونه کاندیدا آلبیکنس جدا شده در این تحقیق ٦۲ مورد آن با روش‌های فنوتیپی مورد بحث شناخته شدند که این میزان شامل ۹۲/۵ درصد سویه‌های مربوط بود.

۳-۲- نتایج تشخیص با کمک روش PCR-RFLP و تعیین توالی

روش PCR-RFLP قادر به شناسایی ۱٤٤ مورد از ۱٤۷ ایزوله مخمری یعنی ۹۷/۹٦ درصد ایزوله‌ها بود و ۲/۰٤ درصد نمونه‌های جدا شده از ضایعات اونیکومایکوزیس حتی با این روش نیز قابل شناسایی نبود (جدول ٤). ۲ نمونه از سه نمونه فوق در آزمایش‌های اولیه PCR مشکوک به کاندیدا لوزیتانیا (*C. lusitania*) یا کاندیدا روگوزا (*C. rugosa*) و نمونه سوم دارای الگوی متفاوتی از تمام نمونه‌های دیگر بود. بنابراین به سویه‌ای جدید مظنون شده و به همین دلیل محصول PCR برای تعیین توالی ارسال شد. نتایج آزمایش تعیین توالی گونه‌های مشکوک را به‌عنوان کاندیدا لوزیتانیا و گونه ناشناس را به‌عنوان مچنیکوویا (کاندیدا) پولچریما (*C. pulcherrima*) مشخص کرد. در شکل ۱ الگوی الکتروفورزی مربوط به قطعه تقویت شده ITS در گونه‌های کروزئی، تروپیکالیس، پولچریما، آلبیکنس، گلابراتا، و پاراپسیلوزیس در مقابل نشانگر (Marker) مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی مشاهده می‌شود. در شکل ۲ محصول هضم آنزیمی قطعه مذکور در مورد گونه‌های ذکر شده به همان ترتیب نشان داده شده است.

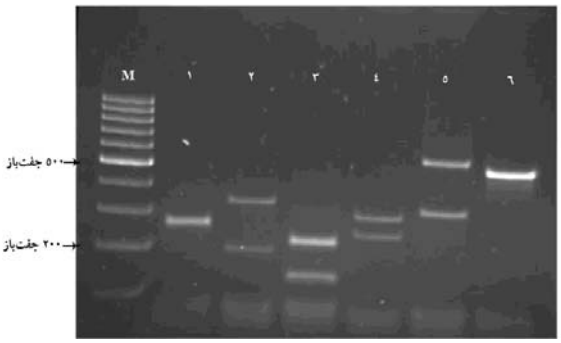
در شکل ۳ که در آن از دو سویه استاندارد کاندیدا دابلینینسیس استفاده شده است، الگوی الکتروفورزی مربوط به هضم آنزیمی قطعه تکثیر شده ITS با کمک آنزیم *Mbo*I نشان داده شده است. با توجه به داده‌های به‌دست آمده از آنالیز توالی‌ها، انتظار می‌رفت که پس از برش با این آنزیم، در کاندیدا آلبیکنس ٤ باند به وزن‌های ۲۲، ۱۳٦، ۱٦۲ و ۲۱۷ و در کاندیدا دابلینینسیس ۳ باند به وزن‌های ۲۲، ۱٦۱ و ۳٦۳ دیده شود. این وزن‌ها با آنچه که عملاً از الکتروفورز محصولات هضم اندونوکلئازی به‌دست آمد، تطابق دارد (باندهای با وزن بسیار کم در ژل آگارز دیده نمی‌شود). در مطالعه حاضر تمامی ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس مورد آزمایش PCR-RFLP با آنزیم محدودالاثر *Mbo*I قرار گرفت و در بین آن‌ها هیچ موردی از کاندیدا دابلینینسیس مشاهده نشد.



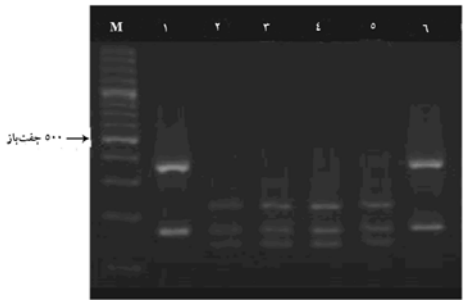
شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR (تقویت ناحیه ITS) مربوط به بعضی از گونه‌های مختلف کاندیدا روی ژل آگارز؛ **M)** نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی، **چاهک ۱)** کاندیدا کروزئی، **چاهک ۲)** کاندیدا تروپیکالیس، **چاهک ۳)** کاندیدا (مچنیکوویا) پولچریما، **چاهک ٤)** کاندیدا آلبیکنس، **چاهک ۵)** کاندیدا گلابراتا، **چاهک ٦)** کاندیدا پاراپسیلوزیس و **C)** کنترل منفی

www.SID.ir

Archive OF SID



شکل ۲ الگوی الکتروفورزی PCR-RFLP با آنـزیم *MspI* روی ژل آگـارز؛ **M)** نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی، **چاهک ۱)** کاندیدا کروزئی، **چاهک ۲)** کاندیدا تروپیکالیس، **چاهـک ۳)** کاندیـدا (مچنیکوویـا) پولچریمـا، **چاهـک ٤)** کاندیـدا آلبیکنس، **چاهک ٥)** کاندیدا گلابراتا و **چاهک ٦)** کاندیدا پاراپسیلوزیس



شکل ۳ الکتروفورز محصولات PCR بعد از هضم اندونوکلئازی (RFLP) با آنزیم *MboI* برای افتراق گونه دابلینینسیس از آلبیکنس؛ **M)** نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفـت‌بـازی، **چاهــک ۱)** کاندیـدا دابلینینـسیس (سـویه اسـتاندارد شماره۷۹۸۷)، **چاهک‌های ۲-٥)** کاندیدا آلبیکنس (سـویه‌هـای جـدا شـده از بیماران) و **چاهک ٦)** کاندیدا دابلینینسیس (سویه استاندارد شماره۷۹۸۸)

جدول ٤ مقایسه موفقیت در شناسایی گونه‌های کاندیدا با روش‌های مولکولی و غیرمولکولی

گونه‌های شناسایی شده	تشخیص نهایی	روش لوله زایا	روش CMA	روش کروم آگار کاندیدا	روش PCR-RFLP	روش تعیین توالی
کاندیدا آلبیکنس	٦٧ (٤٥/٦ درصد)	٥٢/٥٦ (٩٣ درصد)	٤٨/٥٤* (٨٩ درصد)	٦٠/٦٣ (٩٥ درصد)	٦٧/٦٧ (١٠٠ درصد)	–
کاندیدا پاراپسیلوزیس	٣٣ (٢٢/٥ درصد)	–	–	٢١/٢٦ (٨١ درصد)	٣٣/٣٣ (١٠٠ درصد)	–
کاندیدا تروپیکالیس	٣٢ (٢١/٨ درصد)	–	–	٢٤/٣١ (٧٧ درصد)	٣٢/٣٢ (١٠٠ درصد)	–
کاندیدا گلابراتا	٤ (٢/٧ درصد)	–	–	٢/٤ (٥٠ درصد)	٤/٤ (١٠٠ درصد)	–
کاندیدا کروزئی	٣ (٢ درصد)	–	–	٢/٣ (٦٧ درصد)	٣/٣ (١٠٠ درصد)	–
کاندیدا کفیر	٢ (١/٣٦ درصد)	–	–	٠/٢ (٠ درصد)	٢/٢ (١٠٠ درصد)	–
کاندیدا لوزیتانیا	٢ (١/٣٦ درصد)	–	–	٠/٢ (٠ درصد)	٢/٢ (١٠٠ درصد)	٢/٢ (١٠٠ درصد)
کاندیدا گیلرموندی	١ (٦٨/.درصد)	–	–	٠/١ (٠ درصد)	١/١ (١٠٠ درصد)	١/١ (١٠٠درصد)
کاندیدا پولچریما (C. pulcherrima)	١ (٦٨/. درصد)	–	–	٠/١ (٠درصد)	–	١/١ (١٠٠ درصد)
گونه تریکوسپورون (Trichosporon)	٢ (١/٣٦ درصد)	–	٢/٢ (١٠٠ درصد)	–	–	–

* منظور ٤٨ از ٥٤ است. یعنی این آزمایش روی ٥٤ نمونه انجام شده و ٤٨ نمونه با این آزمایش شناسایی شده است. سایر موارد جدول نیز به همین ترتیب است.

٤- بحث

عفونت قارچی ناخن بیماری رو به افزایشی در نقاط مختلـف جهان است. علل مختلفی برای افزایش شیوع آن گفته شـده اسـت که از آن جمله، می‌توان به افزایش جمعیـت افـراد مـستعد واجـد اخـتلالات سیـستم ایمنـی موضـعی یـا عمـومی اشـاره کـرد. اونیکومایکوزیس، می‌تواند آثار قابل توجه منفی روی عملکرد احساسی، اجتماعی، مالی و شغلی بیمار داشته باشد. بیماران ممکن است ترس و نگرانی از انتقال بیماری خود به دیگران داشته باشـند و این مسئله در برخی مشاغل نظیر آشـپزها، تایپیـست‌هـا و امثـال این‌ها با اهمیت‌تر است. اونیکومایکوزیس یک بیماری خودبه‌خـود بهبود یابنده نیست و ممکن است منبعی بـرای ایجـاد و گـسترش ضایعات قارچی در دیگر نواحی پوست فرد بیمار باشد.

www.SID.ir

Archive OF SID

عوامل کاندیدایی دومین عامل شایع اونیکومایکوزیس بعد از درماتوفیت‌ها است [۱۷]؛ اما در سالیان اخیر میزان بالایی از اونیکومایکوزیس به‌علت گونه‌های مختلف جنس کاندیدا از نقاط مختلف جهان گزارش می‌شود. به‌عنوان مثال می‌توان به مطالعات انجام شده در کشورهای هند [۱۸، ۱۹]، مالزی [۲۰]، پاکستان [۲۱]، ایران [٤، ۱۳، ۲۲-۲٦]، ترکیه [۲۷]، لبنان [۲۸]، لیبی [۲۹]، تونس [۱۰]، مراکش [۳۰]، ایتالیا [۳۱]، هلند [۳۲]، کلمبیا [۹]، آرژانتین [١٤]، و برزیل [۳۳] که حکایت از شیوع نسبتاً بالای عوامل مخمری و در رأس آن کاندیدا آلبیکنس به‌عنوان عامل مسبب اونیکومایکوزیس ناخن‌های دست دارند، اشاره کرد. در مناطق دیگری از قبیل اسپانیا [۱۲]، نپال [۱]، مناطق دیگری از هند [٣٤] و هنگ کنگ [۳۵] شیوع این عوامل کمتر و در فلسطین اشغالی [۳٦] شیوع کاندیدا پاراپسیلوزیس بیشتر از سایر گونه‌ها گزارش شده است.

برای شناسایی گونه‌های مختلف کاندیدا در تمام این مطالعات، از روش‌های سنتی و مرسوم که به بررسی ویژگی‌های فیزیولوژی، بیوشیمی، و ریخت‌شناسی می‌پردازند، استفاده شده است. بنابراین در بسیاری از آن‌ها فقط به شناسایی گونه آلبیکنس اکتفا شده است یا این‌که گونه‌های غیر از آلبیکنس را تحت عنوان سایر گونه‌ها نام برده‌اند [۳۷]. با توجه به دخالت گونه‌های مختلف کاندیدا در ایجاد آسیب و سهم رو به افزایش انواع غیر آلبیکنس در عفونت‌های تهاجمی و نیز حساسیت متفاوت و غیرمعمول آن‌ها در مقابل داروهای ضد قارچی، شناسایی و تعیین هویت این مخمرها در سطح گونه به دلیل اهداف اپیدمیولوژیکی و نیز در نظر گرفتن تدابیر درمانی مناسب و مطلوب برای بیمار، ضروری می‌نماید [۳۷].

در آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی آزمون‌های شناسایی مخمرها معمولاً با کمک کیت‌های از قبل آماده تجارتی که اغلب از ترکیب آزمایش‌های فنوتیپی کلاسیک (نظیر آزمایش‌های جذب و تخمیر قندها و آزمایش‌های بیوشیمیایی و ریخت‌شناسی) بهره می‌برند، استفاده می‌کنند. از آن‌جا که خصوصیات فنوتیپی این قارچ‌ها ممکن است متغیر باشد، بنابراین چنین روش‌هایی قادر به تفکیک گونه‌های بسیار مشابه نیست و نتایج مشکوک یا کاذبی را ایجاد می‌کند؛ در این رابطه می‌توان به مشکل تشخیص افتراقی کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس اشاره کرد. از طرف دیگر؛ این روش‌ها معمولاً قادر به شناسایی گونه‌های جدید نیست. به‌عنوان مثال کاندیدا لوزیتانیا و کاندیدا پولچریما از مخمرهای آسکومیستی هتروتالیک از خانواده مچنیکوویاسه (Metschnikowiaceae) می‌باشند از جمله این مخمرهای بیماری‌زای جدید هستند [۳۸]. روش‌های مبتنی بر خصوصیات فنوتیپی در کنار مزایایی که دارند، هریک دارای محدودیت‌های خاص خود نیز هست، به‌طوری که تقریباً اکثر این مطالعات قادر به تشخیص دقیق و تعیین هویت قطعی همه گونه‌های جدا شده نبوده‌اند. شاهد این ادعا، مطالعات مختلفی است که در سالیان اخیر در کشور انجام شده و تقریباً در تمام آن‌ها به شناسایی کل گونه‌های جدا شده اشاره‌ای نشده است. در این رابطه می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

زینی در سال ۱۳٦۵ شایع‌ترین عامل اونیکومایکوزیس در تهران را کاندیدا آلبیکنس با شیوع ٦۹/٦ درصد گزارش کرده است [۲۳]. مقدمی و شیدفر در سال ۱۳٦۸ عوامل کاندیدایی را مسئول ٦٦/٤ درصد موارد اونیکومایکوزیس ذکر کرده‌اند و شیدفر در سال ۱۳۷۰، ٦۱/۹ درصد عوامل اونیکومایکوزیس را عوامل مخمری گزارش کرده است [۲۳]. خسروی در سال ۱۳۷۹ کاندیدا آلبیکنس را با فراوانی ۲۵/۸ درصد و کاندیدا پاراپسیلوزیس با فراوانی ۷/۲ درصد گزارش کرده است [۲۵]. بصیری جهرمی در سال ۱۳۸۱ کاندیدا آلبیکنس را عامل ٤۰/۹ درصد موارد اونیکومایکوزیس گزارش کرده و از ٤٦ درصد نمونه‌ها به‌عنوان گونه‌های غیر آلبیکنس نام برده است [۲۲]. گرامی‌شعار در سال ۱۳۸۱ کاندیدا آلبیکنس را با شیوع ۱۳/۷ درصد و سایر گونه‌های کاندیدا را با شیوع ٦/۹ درصد در بین عوامل مخمری جدا شده از ضایعات اونیکومایکوزیس گزارش کرده است. در این مطالعه ۲۱ درصد نمونه‌ها از نظر عوامل کاندیدایی مثبت بوده است [۱۳]. خسروی در سال ۱۳۸۷ در مطالعه دیگری، کاندیدا آلبیکنس را

www.SID.ir

Archive OF SID

مسئول ٥١/٤ درصد موارد اونیکومایکوزیس گزارش کرده است و گونه‌های غیر آلبیکنس به‌ترتیب شیوع در این گزارش عبارتند از: کاندیدا گلابراتا (١١/٤ درصد)، کاندیدا تروپیکالیس (٨/٦ درصد)، کاندیدا پاراپسیلوزیس (٥/٧ درصد)، کاندیدا کفیر (٢/٩ درصد) و از بقیه عوامل تحت عنوان «سایر گونه‌ها» نام برده شده است که میزانی برابر ١٧/١ درصد داشته‌اند. در مطالعه خسروی و همکاران علاوه بر دو روش آزمون ایجاد لوله زایا و کشت در محیط CMA حاوی توین ٨٠ از کشت در محیط کروموژنیک کروم آگار کاندیدا، آزمون بتاگلوکوزیداز و کیت Rapid yeast plus system نیز استفاده شده است [٤]. هاشمی در سال ١٣٨٨ مخمرها را عامل ٥٩/٧ درصد عوامل اونیکومایکوزیس گزارش کرده است. در مطالعه وی ٤٢ مورد کاندیدا آلبیکنس و ٥٦ مورد کاندیدای غیر آلبیکنس گزارش شده است [٢٦]. چادگانی‌پور در سال ١٣٨٨ در اصفهان مخمرها را از ٥٧/٧ درصد ضایعات اونیکومایکوزیس جدا کرده و کاندیدا آلبیکنس را با فراوانی ٨٤ درصد، شایع‌ترین گونه جدا شده گزارش نموده است [٢٤]. در مطالعه حاضر نیز هنگامی که از سه روش فنوتیپی شامل آزمون ایجاد لوله زایا، تولید کلامیدوسپور در محیط CMA حاوی توین ٨٠ و خصوصیات کلونی و رنگ‌زایی آن در محیط کروم آگار کاندیدا استفاده شد ٨٣/٧ درصد ایزوله‌ها در سطح گونه شناسایی و ١٦/٣ درصد باقیمانده تحت عنوان سایر گونه‌ها در نظر گرفته شد.

روش‌های مولکولی برای شناسایی قارچ‌های عامل اونیکومایکوزیس اغلب بر درماتوفیت‌ها یا کپک‌های غیر درماتوفیتی متمرکز بوده و در این رابطه تحقیقات فراوانی به چشم می‌خورد [٣٩-٤٢]. به‌عنوان مثال بیک (Baek) و همکاران به‌منظور افزایش حساسیت در نشان دادن حضور عوامل قارچی در اونیکومایکوزیس از روش PCR و تقویت قطعه 18srDNA و آنزیم *Hae*III استفاده کرده‌اند [٤٣]. اما در مورد شناسایی عوامل مخمری اونیکومایکوزیس تحقیقات چندانی مشاهده نمی‌شود.

در مطالعه حاضر برای شناسایی تمام این ایزوله‌ها از روش مولکولی PCR-RFLP با استفاده از یک آنزیم محدودالاثر که کارایی آن در مطالعات قبلی میرهندی و همکاران [١٥] به اثبات رسیده بود، استفاده شد و به کمک این روش ٩٨ درصد ایزوله‌ها در سطح گونه شناسایی شدند که نتایج آن با سه روش فنوتیپی فوق مطابقت داشت. اما از آن‌جا که نتایج حدود ٢ درصد آن‌ها با استفاده از دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی مورد اشاره نتایج قابل انطباقی نداشت، بنابراین برای تعیین هویت آن‌ها از روش تعیین توالی قطعه اسید نوکلئیک تکثیر شده با PCR استفاده شد. دو گونه از این نمونه‌ها کاندیدا لوزیتانیا و یک گونه نیز تحت عنوان کاندیدا (مچنیکوویا) پولچریما شناسایی شد. گونه‌های اخیر برای اولین بار در ایران گزارش می‌شود. همچنین تعیین هویت یک ایزوله کاندیدا گیلرموندی نیز با روش تعیین توالی تأیید شد.

آزمایش PCR و بررسی چند شکلی (Polymorphism) طولی قطعه تکثیر شده توسط آنزیم محدودالاثر *Msp*I قادر به شناسایی دقیق ٦ گونه از جنس کاندیدا است. از آن‌جا که الگوی الکتروفورزی دو گونه آلبیکنس و دابلینینسیس در این آزمایش کاملاً یکسان است، برای جداسازی این دو گونه از یکدیگر و حصول اطمینان از هویت قطعی آلبیکنس از یک الگوی جدید الکتروفورزی با استفاده از آنزیم *Mbo*I استفاده شد و با وجود بهره‌گیری از این الگوی جدید، در بین ١٤٧ ایزوله مورد مطالعه کاندیدا دابلینینسیس مشاهده نشد.

علت تفاوت در آمارهای فوق و اختلاف در میزان شیوع کاندیدا آلبیکنس و گونه‌های غیر آلبیکنس را می‌توان مربوط به تفاوت زمانی در انجام این مطالعات و روش‌های مورد استفاده در شناسایی عوامل مخمری دانست. شیوع کاندیدا آلبیکنس در مطالعه حاضر براساس استفاده از روش سه گانه فنوتیپی ٥٠/٤ درصد است که تقریباً با گزارش مربوط به خسروی و همکاران (١٣٨٧) که فراوانی این گونه را ٥١/٤ درصد گزارش کرده است، مطابقت می‌نماید. با توجه به این‌که خسروی در همان مطالعه ١٧/١ درصد نمونه‌ها را تحت عنوان سایر عوامل

www.SID.ir

Archive OF SID

مخمری ذکر کرده است، اما در مطالعه حاضر با کمک روش‌های مولکولی اقدام به شناسایی همه نمونه‌ها شد. بنابراین بعد از شناسایی نهایی تمام نمونه‌ها، فراوانی کاندیدا آلبیکنس معادل ٤٥/٦ درصد به‌دست آمده است. در مطالعه حاضر از محیط کشت کروموژنیک کروم آگار کاندیدا استفاده شد. برطبق اظهار شرکت سازنده گونه آلبیکنس با ایجاد رنگ سبز روی این محیط به‌خوبی قابل شناسایی است. در مطالعه حاضر، حداقل سه رنگ سبز مختلف مربوط به این گونه مشاهده شد: رنگ سبز روشن، سبز تیره و سبز مایل به آبی، که تمام این رنگ‌ها در آزمایش مولکولی مربوط به گونه آلبیکنس بود. با توجه به رنگ سبز آبی مربوط به بعضی از گونه‌های کاندیدا در محیط کروم آگار کاندیدا و در نظر گرفتن این ایزوله‌ها به‌عنوان کاندیدا آلبیکنس به‌نظر می‌رسد که در روش‌های فنوتیپی نسبت به روش PCR، تعداد بیشتری تحت عنوان گونه آلبیکنس شناسایی شده است. جداسازی ایزوله‌های نادر در بررسی حاضر نشان می‌دهد که برای شناسایی عوامل مخمری ایجاد کننده اونیکومایکوزیس نمی‌توان صرفاً به روش‌های مبتنی بر فنوتیپ تکیه نمود، کاندیدا پولچریما دارای خصوصیات فنوتیپی کاملاً مشابه با کاندیدا لوزیتانیا است و آزمایش فنوتیپی که برای جدا کردن این دو گونه از یکدیگر به‌کار رود وجود ندارد و جداسازی این دو گونه تنها به کمک روش‌های مولکولی نظیر تعیین توالی ژن مورد نظر یا آزمایش سوش‌های سازگار (Mating type) میسر است [٣٨]. مطالعات محدودی در مورد جداسازی و شناسایی این گونه وجود دارد، کانتروس (Canteros) و همکاران در مطالعه خود ٤١ گونه غیر آلبیکنسی شناسایی کرده بودند که کاندیدا پولچریما ٦ درصد این ایزوله‌ها را شامل شده است [١٤]. پاسپیسیلی (Pospisil) در چک و اسلواکی در فاصله سال‌های ١٩٧١ الی ١٩٧٦ در بین ١٧٢٠ نمونه مربوط به پوست، ناخن، مو وخلط بیمارانی که دارای مشکلات پوستی بودند، یک مورد از این گونه را گزارش کرده است. در حالی که در فاصله زمانی ١٩٧٧ الی ١٩٨٤ در بین ٤٦٤٤ نمونه، ٤٤ مورد کاندیدا پولچریما شناسایی و گزارش شده است. اکثر این نمونه‌ها مربوط به ناخن بوده‌اند [٤٤]. کوزاک (Kozak) و همکاران نیز این قارچ را از ضایعه پوستی در سگ جدا کرده‌اند [٤٥].

با توجه به این‌که درمان ضایعات اونیکومایکوزیس همچنان به‌عنوان یک مشکل طبی و بهداشتی باقی مانده است، نمی‌توان علت را تنها در حضور عوامل مساعد کننده همراه جستجو کرد و شاید عدم آشنایی و شناخت هویت دقیق عوامل مخمری و یافتن گونه‌های نادر و غیرعادی که دارای رفتارهای متفاوتی در مقابل مواد ضد قارچی نیز هستند و نیز مشکل مقاومت دارویی از علل دیگری باشند که مورد غفلت قرار می‌گیرند. شناسایی عوامل قارچی به‌ویژه عوامل مخمری به‌صورت دقیق و در حد گونه با استفاده از روش‌های ساده مولکولی نظیر PCR-RFLP برای آزمایشگاه‌های مرجع قارچ‌شناسی در سطح کشور توصیه می‌شود.

٥- تشکر و قدردانی

این تحقیق به‌عنوان بخشی از رساله دکتری قارچ‌شناسی پزشکی با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. از آقای دکتر سیدجمال هاشمی و خانم لیلا حسین‌پور به دلیل مساعدت و همکاری در دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، و از خانم صدیقه بیرقی و خانم نیلوفر جلالی‌زند به دلیل همکاری‌های فنی و آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌نماییم.

٦- منابع

[1] Agarwalla A, Agrawal S, Khanal B. Onychomycosis in eastern Nepal. Nepal Med Coll J 2006; 8(4): 215-9.

[2] Midgley G, Moore MK, Cook JC, Phan QG. Mycology of nail disorders. J Am Acad Dermatol 1994; 31(3 pt 2): S68-74.

www.SID.ir

Archive OF SID

[3] Elewski BE. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. Clin Microbiol Rev 1998; 11(3): 415-29.

[4] Khosravi AR, Shokri H, Mansouri P, Katiraee F, Ziglari T. Candida species isolated from nails and their in vitro susceptibility to antifungal drugs in the department of Dermatology (University of Tehran, Iran). J Myc Med 2008; 18(4): 210-5.

[5] Korting HC, Schaller M. [New developments in medical mycology]. Hautarzt 2001; 52(2): 91-7.

[6] Staats CC, Korstanje MJ. [Fungi causing onychomycoses in The Netherlands]. Ned Tijdschr Geneeskd 1994; 138(47): 2340-3.

[7] Surjushe A, Kamath R, Oberai C, Saple D, Thakre M, Dharmshale S, Gohil A. A clinical and mycological study of onychomycosis in HIV infection. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2007; 73(6):397- 401.

[8] Borkowski P, Williams M, Holewinski J, Bakotic B. Onychomycosis: an analysis of 50 cases and a comparison of diagnostic techniques. J Am Podiatr Med Assoc 2001; 91(7): 351-5.

[9] Alvarez MI, González LA, Castro LA. Onychomycosis in Cali, Colombia. Mycopathologia 2004; 158(2): 181-6.

[10] Anane S, Aoun K, Zallagua N, Bouratbine A. [Onychomycosis in Tunis area: epidemiological and mycological data]. Ann Dermatol Venereol 2001; 128(6-7): 733-6.

[11] Anane S, Chtourou O, Chedi A, Triki S, Belhaj S, Kaouech E, Kallel K, Chaker E. [Onychomycosis in the elderly]. Ann Dermatol Venereol 2007; 134(10 Pt 1): 743-7.

[12] Vélez A, Linares MJ, Fenández-Roldán JC, Casal M. Study of onychomycosis in Córdoba, Spain: prevailing fungi and pattern of infection. Mycopathologia 1997; 137(1): 1-8.

[13] Gerami shoar M, Zomorodian K, Emami M, Tarazoei B, Saadat F. Study and identification of the etiological agents of onychomycosis in Tehran, Capital of Iran. Iranian J Publ Health 2002; 31(3-4):100-4.

[14] Canteros GE, Davel GO, Vivot W. [Causal agents of onychomycosis]. Rev Argent Microbiol 1994; 26(2): 65-71.

[15] 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.

[16] Rezaee Matekalaee A. Quantitative assessment of Bead-beating, Boiling, and freez and thaw for Genomic DNA extraction from some medically important yeasts. Presented for the M.Sc., Tehran, Tehran University of Medical Sciences, 2005. (Persian)

[17] Jayatilake JA, Tilakaratne WM, Panagoda GJ. Candidal onychomycosis: a mini-review. Mycopathologia 2009; 168(4): 165-73.

[18] Sarma S, Capoor MR, Deb M, Ramesh V, Aggarwal P. Epidemiologic and clinico-mycologic profile of onychomycosis from north India. Int J Dermatol 2008; 47(6): 584-7.

[19] Gupta M, Sharma NL, Kanga AK, Mahajan VK, Tegta GR. Onychomycosis: Clinico-mycologic study of 130 patients from Himachal Pradesh, India. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2007; 73(6): 389-92.

www.SID.ir

Archive OF SID

[20] Ng KP, Saw TL, Madasamy M, Soo Hoo T. Onychomycosis in Malaysia. Mycopathologia 1999; 147(1): 29-32.

[21] Bokhari MA, Hussain I, Jahangir M, Haroon TS, Aman S, Khurshid K. Onychomycosis in Lahore, Pakistan. Int J Dermatol 1999; 38(8): 591-5.

[22] Basiri Jahromi SH, Khaksar AA. Onychomycosis among patients referring to Mycology Department of Institute Pasteur of Iran: 1993- 2000. Archive of SID 2002; 60: 364-70. (Persian)

[23] Zaini F, Mehbod ASA, Emami M. Comprehensive Medical mycology. Tehran: Tehran University Press 2004; p: 140. (Persian)

[24] Chadeganipour M, Nilipour S, Ahmadi G. Study of onychomycosis in Isfahan, Iran. Mycoses 2009; [Epub ahead of print].

[25] Khosravi AR, Mansouri P. Onychomycosis in Tehran, Iran: prevailing fungi and treatment with itraconazole. Mycopathologia 2000; 150(1): 9-13.

[26] Hashemi SJ, Gerami M, Zibafar E, Daei M, Moazeni M, Nasrollahi A. Onychomycosis in Tehran: mycological study of 504 patients. Mycoses 2009; [Epub ahead of print].

[27] Ilkit M. Onychomycosis in Adana, Turkey: a 5-year study. Int J Dermatol 2005; 44(10): 851-4.

[28] El Sayed F, Ammoury A, Haybe RF, Dhaybi R. Onychomycosis in Lebanon: a mycological survey of 772 patients. Mycoses 2006; 49(3): 216-9.

[29] Ellabib MS, Agaj M, Khalifa Z, Kavanagh K. Yeasts of the genus Candida are the dominant cause of onychomycosis in Libyan women but not men: results of a 2-year surveillance study. Br J Dermatol 2002; 146(6): 1038-41.

[30] Boukachabine K, Agoumi A. [Onychomycosis in Morocco: experience of the parasitology and medical mycology laboratory from Rabat children hospital (1982-2003)]. Ann Biol Clin (Paris) 2005 63(6): 639-42.

[31] Romano C, Gianni C, Difonzo EM. Retrospective study of onychomycosis in Italy: 1985-2000. Mycoses 2005; 48(1): 42-4.

[32] Kuijpers AF, Tan CS. [Fungi and yeasts isolated in mycological studies in skin and nail infections in The Netherlands, 1992-1993]. Ned Tijdschr Geneeskd 1996; 140(19): 1022-5.

[33] Pontes ZB, Lima Ede O, Oliveira NM, Dos Santos JP, Ramos AL, Carvalho MF. Onychomycosis in João Pessoa City, Brazil. Rev Argent Microbiol 2002; 34(2): 95-9.

[34] Garg A, Venkatesh V, Singh M, Pathak KP, Kaushal GP, Agrawal SK. Onychomycosis in central India: a clinicoetiologic correlation. Int J Dermatol 2004; 43(7): 498-502.

[35] Kam KM, Au WF, Wong PY, Cheung MM. Onychomycosis in Hong Kong. Int J Dermatol 1997; 36(10): 757-61.

[36] Segal R, Kimchi A, Kritzman A, Inbar R, Segal Z. The frequency of Candida parapsilosis in onychomycosis. An epidemiological survey in Israel. Mycoses 2000; 43(9-10): 349-53.

[37] Tulumoglu S, Kariptas`E, Erdem B. Identification and antifungal susceptibility of Candida isolates from various clinical specimens in Doctor Behcet Uz hospital. Anatol J Clin Investig 2009; 3(3): 170-3.

www.SID.ir

Archive OF SID

methods for detection and identification of dermatophytes in nail and skin samples. J Dermatol 2009; 36(4): 200-8.

[42] Walberg M, Mørk C, Sandven P, Jorde AT, Bjørås M, Gaustad P. 18S rDNA polymerase chain reaction and sequencing in onychomycosis diagnostics. Acta Derm Venereol 2006; 86(3): 223-6.

[43] Baek SC, Chae HJ, Houh D, Byun DG, Cho BK. Detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis using PCR amplification and restriction enzyme analysis. Int J Dermatol 1998; 37(9): 682-6.

[44] Pospisil L. The significance of Candida pulcherrima findings in human clinical specimens. Mycoses 1989; 32(11): 581-3.

[45] Kozak M, Bilek J, Beladicova V, Beladicova K, Baranova Z, Bugarsky A. Study of the dermatophytes in dogs and the risk of human infection. Bratisl Lek Listy 2003; 104(7-8): 211-7.

[38] Noël T, Favel A, Michel-Nguyen A, Goumar A, Fallague K, Chastin C, Leclerc F, Villard J. Differentiation between atypical isolates of Candida lusitaniae and Candida pulcherrima by determination of mating type. J Clin Microbiol 2005; 43(3): 1430-2.

[39] Arca E, Saracli MA, Akar A, Yildiran ST, Kurumlu Z, Gur AR. Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis. Eur J Dermatol 2004; 14(1):52-5.

[40] Baek SC, Chae HJ, Houh D, Byun DG, Cho BK. Detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis using PCR amplification and restriction enzyme analysis. Int J Dermatol 1998; 37(9): 682-6.

[41] Uchida T, Makimura K, Ishihara K, Goto H, Tajiri Y, Okuma M, Fujisaki R, Uchida K, Abe S, Iijima M. Comparative study of direct polymerase chain reaction, microscopic examination and culture-based morphological

www.SID.ir