Archive of SID

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2016; 19(113): 8-15

Identification of Clinical Isolates of *Candida* using Duplex PCR

Homeyra Babaei[1], Javaher Chabavizadeh[2], Parvin Dehghan[2], Rasoul Mohammadi[3*]

1- MSc Student, Department of Medical Parasitology and Mycology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Received: 28 Aug 2016, Accepted: 9 Oct 2016

Abstract

Background: *Candida albicans* is still the main etiologic agent of candidiasis. However, infections of non-*albicans Candida* species are increasing. *Candida dubliniensis* is similar to *C. albicans* phenotypically and must be identified due to the better management of infection. The aim of the present study is to defferentiate and identify *Candida* species by Duplex PCR for getting an epidemiological data of *Candida* species among clinical specimens.

Materials and Methods: DNA was extracted using phenol-chloroform method from fresh colonies. Internal Transcribed Spacer region was amplified by polymerase chain reaction using specific primers. Based on differences of bands sizes on agarose gel electrophoresis, species were identified.

Results: Ninety four out of 100 patients (49 males and 51 females) had predisposing factors in the present study. Diabetes (73.4%), use of antibiotic (6.3%), vitamin deficiency (4.3%) were the main predisposing factors. The most specimens belonged to mouth (75%), vagina (5%), and blood (4%). All isolates were identified as *C. albicans.*

Conclusion: Duplex PCR is a rapid and precise method for the detection and differentiation of *Candida* species carefully, and in this method, phenotypic tests like germ-tube and chlamydoconidia production, as well as biochemical tests are not required for clinical laboratories that have limited resources and time for response to the patients, and it can replace with the traditional methods.

Keywords: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, Differentiation, Duplex PCR

*Corresponding Author:
Address: Department of Medical Parasitology and Mycology, Infectius Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
Email: Dr.rasoul_mohammadi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۹، شماره۸(شماره پیاپی ۱۱۳)، آبان ۱۳۹۵، ۱۵-۸

شناسایی ایزوله‌های بالینی کاندیدا با استفاده از روش Duplex-PCR

حمیرابابایی[۱]، جواهرچعباوی زاده[۲]، پروین دهقان[۲]، رسول محمدی[۳]*

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل و قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۲- استادیار،گروه انگل و قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۳- استادیار، گروه انگل و قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۶/۰۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۷/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: کاندیدا آلبیکنس عامل اصلی کاندیدیازیس می‌باشد. با این حال عفونت‌های ایجاد شده توسط گونه‌های غیر آلبیکنس نیز به طورچشم‌گیری افزایش یافته است. کاندیدا دابلینینسیس گونه‌ای است که از لحاظ فنوتیپی بسیار شبیه کاندیدا آلبیکنس است که به منظور درمان مناسب باید از هم متمایز گردند. هدف از این مطالعه، تفکیک و شناسایی دقیق گونه‌های کاندیدا با روش PCR Duplex به منظور دسترسی به اطلاعات اپیدمیولوژیک این گونه‌ها در نمونه‌های بالینی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: از کشت تازه مخمری، DNA قارچ به کمک روش فنل کلروفرم استخراج گردید. ناحیه فواصل رونویسی شده‌ی داخلی به روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیرشد. محصولات حاصله در ژل آگارز الکتروفورز بررسی شده و براساس تفاوت در سایز باندهای ایجادشده،گونه‌ها شناسایی شدند.

یافته‌ها: از تعدادکل ۱۰۰ نمونه بالینی در مطالعه حاضر، ۴۹ نفر مرد و ۵۱ نفر زن بودندکه ۹۴ نفر بیماری زمینه‌ای داشتند. دیابت (۷۳/۴ درصد)، مصرف آنتی بیوتیک (۶/۳ درصد) و کمبود ویتامین (۴/۳ درصد) فاکتورهای زمینه‌ای اصلی بودند. بیشتر نمونه‌ها مربوط به دهان (۷۵ درصد)، واژن (۵ درصد) و خون (۴ درصد) بودند. تمامی ایزوله‌ها به عنوان کاندیداآلبیکنس شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: روشDuplex PCR روشی سریع برای تشخیص وتمایز دقیق گونه‌های کاندیدا می‌باشد که در این روش احتیاجی به تست‌های اولیه فنوتیپیک مانند تولید لوله زایا، کلامیدوکونیدیا و سایرتست‌های بیوشیمیایی نبوده و برای آزمایشگاه‌های بالینی که منابع و زمان محدودی برای پاسخ‌گویی به بیمار دارند، می‌تواند جایگزین روش‌های سنتی گردد.

واژگان کلیدی: افتراق،کاندیداآلبیکنس،کاندیدادابلینینسیس، Duplex PCR

* **نویسنده مسئول:** ایران، اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری، گروه انگل و قارچ شناسی پزشکی
Email: Dr.rasoul_mohammadi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

جنس کاندیدا ارگانیسم‌های تک سلولی یوکاریوتی بوده که طیف وسیعی از عفونت‌ها را در بیماران نقص سیستم ایمنی ایجاد می‌کنند. در دودهه اخیر تعداد گزارشات مربوط به عفونت‌های کاندیدایی به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده است. این عوامل از عفونت‌های سطحی، مخاطی یا سیستمیک جدا می‌شوند که می‌توانند زندگی را به مخاطره بیندازند.کاندیدا آلبیکنس گونه غالبی است که در نمونه‌های بالینی دیده می‌شود اما در سال‌های اخیر تعدادعفونت‌های ایجاد شده توسط گونه‌های غیر آلبیکنس نیز به طور چشم‌گیری افزایش یافته است (۱۲- ۳۴). هدف و ضرورت انجام مطالعه حاضر تفکیک گونه‌های کاندیدا با استفاده از روش Duplex- (reaction Polymerase chain PCR به منظور ارائه یک تابلوی اپیدمیولوژیک از گونه‌های کمیاب مانند کاندیدا دابلینینسیس با استفاده از یک روش سریع مولکولی می‌باشد تا بدین وسیله بتوان با آگاهی از مقاومت برخی گونه‌ها به فلوکونازول و برخی دیگر از داروهای آزولی(۵) پزشک را در درمان هرچه بهتر و موثر تر عفونت یاری نمود. کاندیدا دابلینینسیس از لحاظ فنوتیپی بسیار شبیه کاندیدا آلبیکنس است که باید ازلحاظ اپیدمیولوژیکی، بیماری‌زایی و پیشرفت سریع مقاومت به داروی فلوکونازول از هم متمایز گردند(۶). کاندیدادابلینینسیس یک گونه جدیدکاندیدا است که اولین بار در سال ۱۹۹۵ به عنوان گونه مجزا معرفی شد و تقریبا ۲ درصد واردکاندیدمی را سبب می‌شود. این گونه اصولا با کاندیدیازیس دهانی ارتباط دارد و به ویژه در بیماران مبتلا به HIV، به وفور دیده می‌شود(۷). در آزمایشگاه‌ها این گونه اشتباهات به عنوان کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول تشخیص داده می‌شود(۸). گونه دابلینینسیس از مناطق جغرافیایی زیادی جدا شده و به علت افزایش مقاومت این گونه به فلوکونازول در محیط In vitro بسیار مورد توجه قرار گرفته است(۹). تعیین هویت کاندیدا دابلینینسیس به علت تشابهات فنوتیپی این دوگونه در آزمایشگاه‌های روتین یک مساله مهم تلقی می‌شود، از جمله این‌که هر دوکاندیدا می‌توانند جرم تیوب وکلامیدوکونیدی ایجاد کنند. از آنجا که آزمون‌های فنوتیپیکی مرسوم کارآمدی لازم را جهت تشخیص این دو گونه ندارند، لذا روش‌های مولکولی توسعه یافته، تنها راهکار شناسایی این دو گونه می‌باشند (۱۱۱۲-۱۰). شناسایی صحیح گونه‌ها به منظور درمان ضد قارچی موثر، با توجه به آگاهی از مقاومت به داروهای ضد قارچی، امری ضروری است(۱۳). در این بین روش Duplex-PCR که با استفاده از دو جفت پرایمر اختصاصی گونه انجام می‌شود و نیازی به هضم آنزیمی محصول ایجاد شده ندارد، یکی از روش های مولکولی سریع و دقیقی است که در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضرکه یک مطالعه مقطعی (Cross Sectional) ازنوع توصیفی و تحلیلی بود، گونه‌های کاندیدا به عنوان متغیرهای وابسته کیفی و سن و جنس بیماران به عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شد. معیارهای ورود مطالعه، کاندیدا آلبیکنس‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی و شناسایی شده با تکنیک(polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism) RFLP -PCR بوده و معیارهای خروج شامل گونه‌های میکس شده و نمونه‌های آلوده به باکتری و کپک بودند. تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی مورد بررسی آزمایش مستقیم و کشت قرار گرفت. ۶۰ نمونه از مطالعات قبلی جمع آوری و ۴۰ نمونه از بیماران دیابتیک گرفته شد. نمونه‌های قبلی با آنزیم I Msp (Lithuania ,Vilnius ,Fermentas) و با استفاده از روش مولکولیPCR-RFLP به عنوان کاندیدا آلبیکنس شناسایی شده بودند. لازم به ذکر است که روش مذکور قادر به تفکیک دو گونه آلبیکنس و دابلینینسیس نمی‌باشد.کلیه نمونه‌ها بر روی محیط (glucose agar Sabouraud) SGA (Detroit, MI, USA ,Difco پاساژ داده شده و

www.SID.ir

Archive of SID

از کلنی تک حاصل از کشت ۲۴ ساعته، جهت انجام آزمون‌های مولکولی استفاده شد.

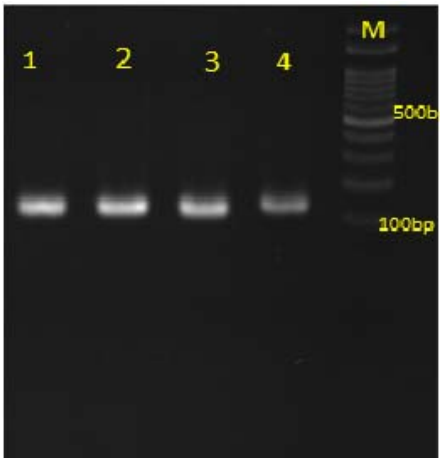
استخراجDNA:DNA ژنومیک تمامی ایزوله‌ها به روش فنل کلروفرم جداگردید.

PCR Duplex: مخلوط اصلی PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر X۱۰ بدون منیزیوم، ۱/۵ میکرومولار MgCl2، ۲/. میکرومولار پرایمر رفت CALF (۵'-TGGTAAGGCGGGATCGCTT-3') و ۲/. میکرومولار پرایمر برگشت CALR (۵'-GGTCAAAGTTTGAAGATATAC) برای آلبیکنس و ۲/. میکرومولار پرایمر رفت CDUF (۵۰-AAACTTGTCACGAGATTATTTTT) و۲/. میکرومولار پرایمر برگشت CDUR (۵'-AAAGTTTGAAGAATAAAATGGC-3') برای دابلینینسیس(۱۴)، ۴۰۰ میکرومولار مخلوط دزوکسی نوکلئوزیدتری فسفات (dNTP) و ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq polymerase DNA در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. سپس به هر تیوب PCR، ۲۳ میکرولیتر از پرمیکس مذکور و ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده از هر مخمر اضافه گردید. تیوب‌ها در دستگاهGene Amp PCR System 9700 (Foster City, CA, USA ,Biosystems Applied) قرار داده شده و مراحل PCR شامل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه به منظور جدا شدن دو رشته DNA(Denaturation DNA) ۳۰ سیکل شامل ۴۵ ثانیه ۹۴ درجه سانتی گراد،۱ دقیقه ۵۵ درجه سانتی‌گراد به منظور اتصال پرایمرها (Annealing) و ۱ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد (Extension) و در نهایت ۷ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد (extension Final) برای طویل شدن پرایمرها برنامه‌ریزی شد. در این روش اگر نمونه کاندیدا آلبیکنس باشد یک محصول ۱۰۰bp و اگر کاندیدا دابلینینسیس باشد یک محصول bp ۳۲۵ایجاد می کند(۶).

الکتروفورز: ۵ میکرولیتر از DNA تکثیر شده در ژل آگارز ۱/۵ درصد در تانک الکتروفورز بارگذاری شد. پس از رنگ آمیزی باندهای DNA با محلول Safe stain، با استفاده از اشعه ماورای بنفش (UV) مشاهده و عکس برداری و شواهد به وسیله خط‌کش ژنی (مارکر)DNA۱۰۰bp(International, Fermentas Znc) بررسی گردید.

یافته‌ها

انجام آزمایش مولکولی Duplex-PCR بر روی نمونه‌های حاضر در مطالعه نشان داد تمامی ۱۰۰ نمونه متعلق به گونه کاندیدا آلبیکنس بودند (تصویر ۱).



تصویر ۱. تقویت ناحیه ITS با استفاده از پرایمرهای اختصاصی. ردیف ۴-۱: کاندیدا آلبیکنس، ردیف M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی

رنج سنی بیماران در این تحقیق صفر تا ۸۲ سال با میانگین ۴۴/۸ سال بودکه گروه سنی ۶۱ تا ۷۰ سال بالاترین میزان ابتلا را داشتند (۲۲ درصد). ۴۹ نفر (۴۹ درصد) از بیماران مورد مطالعه مرد و ۵۱ نفر (۵۱ درصد) زن بودند. هم‌چنین۹۴ نفر(۹۴ درصد) دارای انواع بیماری زمینه‌ای بوده که از این ۹۴ مورد ۶۹ نفر(۷۳/۴ درصد) مبتلا به دیابت، ۶ نفر(۶/۳ درصد) سابقه مصرف آنتی بیوتیک، ۴ نفر (۴/۳ درصد) دچار کمبود ویتامین و ۱۵ مورد(۱۶ درصد) دارای سایر بیماری‌های زمینه‌ای بودند (جدول ۱). نمونه‌های بالینی مورد استفاده در این طرح، شامل ۴۰ نمونه ازحفره دهان، ۳۵ نمونه برفک دهانی، ۵ نمونه واژینیت کاندیدایی، ۴ نمونه خون و ۱۶ نمونه شامل انواع

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌های بالینی دیگر بودند. تمامی نمونه‌های فوق بر اساس تقویت قطعه ITS در DNA ریبوزومی(rDNA) به روش PCR مورد آزمایش قرارگرفته که مطابق با سایز محصول تکثیر شده همگی کاندیداآلبیکنس بوده و نتیجه حاصل شده عدم وجود سویه دابلینینسیس بین نمونه‌ها را نشان داد.

جدول ۱: فاکتورهای زمینه‌ای در بیماران بررسی شده در مطالعه حاضر

زن/مرد	رنج سنی بیماران	تعداد (درصد)	بیماری زمینه ای
۳۷/۳۲	۸۲ – ۱۰	۶۹ (۷۳/۴ درصد)	دیابت
۳/۳	۷۲ – ۱	۶ (۶/۳ درصد)	مصرف آنتی بیوتیک
۲/۲	۶۱ – ۱۷	۴ (۴/۳ درصد)	کمبود ویتامین
۳/۰	۵۵ – ۱۷	۳ (۳/۲ درصد)	لوسمی
۲/۱	۶۵ – ۱۰	۳ (۳/۲ درصد)	سرطان
۰/۳	۴۷ – ۱/۵	۳ (۳/۲ درصد)	سوند
۳/۰	۲۹ – ۲۱	۳ (۳/۲ درصد)	حاملگی
۱/۰	۴۹	۱ (۱/۰۶ درصد)	پیوند کلیه
۰/۱	۴۵	۱ (۱/۰۶ درصد)	پیوند ریه
۰/۱	۳۲	۱ (۱/۰۶ درصد)	لوپوس

بحث

در مطالعه حاضر کلیه ایزوله‌های بالینی شناسایی شده کاندیدا آلبیکنس بودند. رنج سنی بیماران در این تحقیق ۸۲-۰ سال با میانگین ۴۴/۸ سال بوده و ۹۴ درصد افراد دارای بیماری‌های زمینه‌ای بوده‌اندکه دیابت فاکتور اصلی زمینه‌ای در بین بیماران شناسایی شد (۷۳/۴ درصد). اکثرنمونه‌ها (۷۵ نمونه) از دهان بودند. محمدی و همکاران روی بیماران نوتروپنیک با روش PCR-RFLP گونه‌های کاندیدا را مشخص کرد. آنها رنج مرگ و میر در بیماران مورد مطالعه را ۱۳/۶ درصد گزارش کردند (۱۵). از محدودیت‌های مطالعه‌ای که ما انجام دادیم، نداشتن آماری از مرگ و میر افراد تحت مطالعه و نیز عدم استفاده از داروهای آنتی فونگال و تعیین حساسیت دارویی سویه‌های مورد مطالعه بود. امروزه به دلیل شیوع بیماری کاندیدیازیس و هم‌چنین مقاومت دارویی بعضی ازگونه‌های کاندیدا مانند دابلینینسیس به داروهای آزولی، تعیین هویت این دوگونه‌ی بیماری‌زا بسیار ضروری به نظرمی‌رسد. روش‌های فنوتیپیک مرسومی برای جداسازی این دوگونه وجود دارد، مانند آزمون Vitek و API ID 32 که بسیارگران بوده و در دسترس نیستند(۱۶). از آزمون Bichro Dubli Fumouze نیز می‌توان برای جداسازی این دوگونه استفاده کرد که حساسیت و ویژگی بالایی دارد اما نیازمند یک‌سری آزمون‌های اولیه مانند استفاده از جرم تیوپ یا لاتکس آگلوتیناسیون می‌باشدکه این امر موجب افزایش هزینه و زمان برای آزمون فوق می‌شود(۱۷). محققان دیگر از روش‌هایی بر پایه PCR با هدف قراردادن توالی اینترونی برای تمایزکاندیدا دابلینینسیس از آلبیکنس استفاده کردند(۱۸). در روش‌های مذبورکه توالی اینترونی مورد هدف قرار داده می‌شوند، برخی ازایزوله‌ها علی‌رغم این‌که در این توالی‌ها قرار دارند شناسایی نمی‌گردند(۱۹). در تحقیق میرهندی و همکاران در سال ۲۰۰۵ از آنزیم محدودگر برای جداسازی این دو گونه استفاده گردید. آنها از تکنیک Single-Enzyme-PCR-RFLP و با استفاده از آنزیم *Bln*- جهت جداسازی گونه دابلینینسیس از آلبیکنس بهره بردند. در این مطالعه که بر روی ۱۴۰ نمونه کلینیکی انجام گرفت، ۱۲ ایزوله کاندیدا دابلینینسیس شناسایی شد که تعداد ۵ نمونه آن درافرادHIV مثبت بود (۲۰). Suhail Ahmad و همکاران درسال ۲۰۰۲ از روشSeminested PCR برای جداسازی کاندیداهای بیماری‌زا از سرم بیماران استفاده کردند که این

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون دارای ویژگی و حساسیت بالایی بوده اما دارای دو مرحله PCR می‌باشد. در بررسی Davies و همکاران در سال ۲۰۰۲ از محیط کروم آگارکاندیدا برای جداسازی این دوگونه استفاده شد و آنها میزان دابلینینسیس را ۵ درصد گزارش کردند و افزایش درصد این گونه را به افزایش استفاده ازداروهای تری آزولی نسبت دادند (۲۱). درمطالعه Suhail Ahmad و همکاران در سال ۲۰۱۲ از روش Duplex-PCR و از پرایمرهای اختصاصی CALF,CALR, CDUF,CDUR برای جداسازی دوگونه مذبور استفاده گردید که مطالعه حاضر نیز مطابق با همین روش انجام گرفت. آنها از مجموع ۲۳۹ نمونه کلینیکی، تعداد ۱۴ ایزوله کاندیدا آلبیکنس و ۵۰ ایزوله کاندیدا دابلینینسیس را شناسایی کردند(۶). در مطالعه‌ای که پاکشیر و همکاران در سال ۲۰۱۵ در شیراز انجام دادند از تعداد ۹۷ سویه کاندیدا که از اونیکومایکوزیس به دست آمده بود یک سویه کاندیدا دابلینینسیس و ۲۳ مورد کاندیدا آلبیکنس گزارش کردند(۲۲). سلطنت پوری و همکاران درمطالعه‌ای که بر روی بیماران سرطانی با استفاده از تکنیک PCR-PFLP و با آنزیم *BLN*1 انجام دادند،کاندیدا دابلینینسیس را از کاندیدا آلبیکنس جداسازی نمودندکه در این مطالعه ۶۲ درصد از سویه‌ها آلبیکنس و فقط یک سویه دابلینینسیس جداسازی شد(۲۳). مطالعات گذشته نشان دهنده تفاوت میزان شیوع کاندیدا دابلینینسیس در مناطق مختلف جغرافیایی بوده و نیز بسته به محل کلینیکی که نمونه‌گیری انجام شده میزان متفاوتی از کاندیدادابلینینسیس یافت می‌شود. همان طوری که در جدول ۱ مشاهده می‌کنیم ۹۴ درصد از نمونه‌های بالینی که در این طرح مورد مطالعه قرارگرفته‌اند دارای بیماری زمینه‌ای مستعدکننده برای عفونت کاندیدایی بودند، به خصوص دیابت که به تنهایی ۷۳/۴ درصد از افراد مورد مطالعه را در بر می‌گیرد و این نشان دهنده اهمیت و شیوع بسیار بالای این بیماری در جامعه بوده و اهمیت آن درتضعیف سیستم ایمنی و مستعد شدن افراد در برابر عفونت‌های کاندیدایی می‌باشد. در مطالعه حاضر۵۱ نمونه (۵۱ درصد) از زنان گرفته شده بود و ۴۹ نمونه(۴۹ درصد) از مردان که این نشان دهنده عدم تاثیر جنسیت در درگیری به عفونت‌های کاندیدایی مختلف با داشتن عامل زمینه ای می‌باشد. Robert و همکاران با استفاده از روش MALDI-TOF-MS (matrix-assisted desorption ionization–time-of-flight laser mass spectrometry) و فرمیک اسید مستقیم، دو گونه آلبیکنس و دابلینینسیس را تفکیک کردن (۲۴) که از معایب روش مذکور می‌توان به هزینه‌های بالا و عدم وجود این دستگاه و مواد و تجهیزات مربوط به آن در ایران اشاره نمود. Pfaller و همکاران، در خلال سال‌های ۲۰۰۸-۲۰۰۴ عامل ۱/۵ درصد موارد بیماری کاندیدیازیس مهاجم را کاندیدا دابلینینسیس گزارش کردند (۲۵) در حالی‌که در مطالعه حاضر، کاندیدا دابلینینسیس جداسازی نشد. در مطالعه بدیعی و همکاران (۲۶)، ۴ درصد عوامل ایجاد کننده کاندیدیازیس در افراد با ضعف سیستم ایمنی کاندیدا دابلینینسیس بود که بر خلاف انتظار، کلیه جدایه‌های دابلینینسیس به آنتی فانگال‌های نیستاتین، وریکونازول، فلوکونازول و آمفوتریسین حساس بودند. مشابه با سایر مطالعات انجام شده در این زمینه، مطالعه حاضر نشان داد که گونه دابلینینسیس در ایران نیز نادر بوده و دارای فراوانی صفر تا ۳ درصد می‌باشد.

نتیجه گیری

روشDuplex PCR روشی سریع برای تشخیص و تمایز دقیق گونه‌های کاندیدا می‌باشد که در این روش احتیاجی به تست‌های اولیه فنوتیپیک مانند تولید لوله زایا، کلامیدوکونیدیا و سایرتست‌های بیوشیمیایی نبوده و برای آزمایشگاه‌های بالینی که منابع و زمان محدودی برای پاسخ‌گویی به بیمار دارند، می‌تواند جایگزین روش‌های سنتی گردد. در مطالعه حاضر دیابت به عنوان مهم‌ترین عامل مستعدکننده جهت ابتلا به عفونت‌های کاندیدایی تشخیص داده شد. از طرفی به علت پراکندگی متفاوت گونه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

کاندیدا در مناطق مختلف جغرافیایی و با توجه به مقاومت این گونه‌ها به داروهای آزولی معمول، لازم است با روش‌های اختصاصی و دقیق نسبت به شناسایی استرین‌های مذکور به ویژه در بیماران دیابتیک اقدام گردد.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر حاصل از طرح تحقیقاتی دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی پزشکی به شماره ۳۹۴۷۹۳ مصوب در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. از کلیه پرسنل محترم گروه انگل و قارچ شناسی که صمیمانه و با صبر وحوصله ما را یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1.Zaini F, Mehbod ASA, Emami M. [Comprehensive Medical Mycology]. Third edition. Tehran University Press; 2014.p.330-44.

2.Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Maeda N, Ohshima T, Yamaguchi H. Differentiation of Candida albicans and Candida dubliniensis using a single enzyme PCR-RFLP method. Japanese J Infect Dis. 2005; 58(4): 235.

3.Dalle F, Franco N, Lopez J. Comparative genotyping of Candida albicans bloodstream and non- bloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. J Clic Microbiol. 2000;38(5): 4554-9.

4.Reef SE, Meyer KH. Opportunistic candidal infections inpatients infected with human immunodeficiency virus: prevention issues and priorities. Clin Infect Dis.1995;21(1): 99–102.

5.Porte, Lorena, et al. Susceptibilidad a azoles y anfotericina B de aislados de Candida spp: xperiencia de una red de salud universitaria, entre 2004 y 2010. Revista chilena de infectología 2012;29(2): 149-155.

6.Ahmad S, Khan Z, Asadzadeh M, Theyyathel A, Chandy R. Performance comparison of phenotypic and molecular methods for detection and differentiation of Candida albicans and Candida dubliniensis. BMC Infect Dis. 2012;12(1):1.

7.Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C, et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of Candida dubliniensis and Candida albicans. FEMS Yeast Res. 2004; 4 (5):369-376.

8.Akbarzadeh M, Bonyadpoure B, Pacshir K, Mohagheghzadeh A. Causes and clinical ymptoms of vaginal candidiasis in patients referring to selective clinics of Shiraz University of Medical Sciences (2009). AMUJ. 2010;13(3):12- 20.

9.Sullivan D, Coleman D. Candida dubliniensis Characteristics and Identification. J Clin Microbiol 1998; 36:329-334.

10.Karahan Z, Guriz H, Agirbasli H,Balaban N, Gocmen J, Aysev D, et al. Genotype distribution of Candida albicans isolates by 25S intron analysis with regard to invasiveness. Mycoses 2004; 47(4):465-469.

11.Mohammadi R, Mirhendi H, Yadegari MH, Shadzi SH, Jalalizand N. Identification and Frequency of Candida species in patients with different forms of candidiasis in Isfahan, Using PCR-RFLP Method. J Isfahan Med Sch. 2011; 29(1):133.

12.Santos MS, Souza ES, Talhari S, Souza JV. Identification of fungemia agents using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Brazilian J Med Biolog Res. 2010;43(8):712-6.

13.Park S, Wrong M, Marras SA, Cross E, Kiehn TE, Chaturvedi V, et al. Rapid identification of Candida dubliniensis using a species –specific molecular beacon J Clin Microbiol. 2000; 38(4):2829-2836.

14.Mannarelli BM, Kurtzman CP. Rapid indentification of Candida albicans and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. J Clin Microbio.1998; 36(6): 1634-1641.

www.SID.ir

Archive of SID

15.Mohammadi, Rasoul, and Elham Foroughifar. Candida infections among neutropenic patients. Caspian Journal of Internal Medicine 2016;7(2) 71.
16.Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Chandy R: Simplified sunflower (Helianthus annuus) seed agar for differentiation of Candida dubliniensisfrom Candida albicans. Clin Microbiol Infect. 2004;10:590-592.
17.Chryssanthou E, Fernandez V, Petrini B: Performance of commercial latex agglutination tests for the differentiation of Candida dubliniensis and Candida albicans in routine diagnostics. APMIS. 2007, 115:1281-1284.
18.Romeo O, Criseo G: First molecular method for discriminating between Candida africana, Candida albicans and Candida dubliniensis by using hwp1 gene. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008, 62:230-233.
19.Riberio PM, Querido SM, Back-Brito GN, Mota AJ, Koga-Ito CY, Jorge AO. Research on Candida dubliniensis in a Brazilian yeast collection obtained from cardiac transplant, tuberculosis, and HIV-positive patients, and evaluation of phenotypic tests using agar screening methods. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;71:81-86.
20.Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Maeda N, Ohshima T, Yamaguchi H. Differentiation of Candida albicans and Candida dubliniensis using a single-enzyme PCR-RFLP method."Japanese J Infect Dis.2005;58(4): 235-7.
21.Davies AN, Brailsford S, Broadley K, Beighton D. Oral yeast carriage in patients with advanced cancer. Oral Microbiol Immunol. 2002; 17: 79- 84.
22.Pakshir, Zomorodian K, Zakaei A, Motamedi M, Rahimi Ghiasi M, Karamitalab M. Molecular identification and invitro antifungal susceptibility testing of Candida species isolated from patients with onychomycosis. Curr Med Mycol. 2015;1(4): 26-32.
23.Saltanatpouri Z, Shokouhi T, Hashemi Soteh MB, Hedayati MT. PCR-RFLP Is a Useful Tool to Distinguish between C. dubliniensis and C. albicans in cancer patients in Iran. Inter J Hematol Oncol Stem Cell Res. 2010;4(2): 14-18.
24.Roberts AL, Alelew A, Iwen PC. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry to differentiate between Candida albicans and Candida dubliniensis. Diag Microbiol Infect Dis. 2016; 85(1):73-76.
25.Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, et al. Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis Due to Non-albicans Species of Candida in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004–2008. PLOS One. 2014; doi.org/10.1371/journal.pone.0101510.
26.Badiee P, Alborzi A, Shakiba E, Ziaeyan M, Rasuli M. Molecular Identification and In-Vitro Susceptibility of Candida albicans and C. dubliniensis Isolated from Immunocompromised Patients. Iranian Red Cres Med J. 2009; 11(4): 391-7.

www.SID.ir