

جدا سازی و شناسایی ملکولی گونه‌های کاندیدا جدا شده از بیماران مبتلا به اونیکومایکوزیس به روش PCR-RFLP

علی ناصری^۱، فاطمه کارگر^۲، عبدالمجید فتی^۳، لیدا جراحی^۴، محمود پریان نوغانی^۵، آسیه فاطمی اسفدن^۶

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: اونیکومایکوزیس، یکی از شایع‌ترین اختلالات ناخن محسوب می‌شود و مخمرها نیز از شایع‌ترین عوامل بروز عفونت‌های قارچی ناخن می‌باشند. در حال حاضر شناسایی عوامل مخمری به خصوص کاندیدا به عنوان عامل مسبب عفونت‌های قارچی ناخن افزایش یافته است. این مطالعه با هدف شناسایی گونه‌های کاندیدا در بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌های تشخیصی بیمارستان‌های دانشگاهی مشهد انجام شده است.

روش‌ها: در مطالعه‌ی حاضر، ۲۱۰ نمونه ناخن بدست آمده از افراد مشکوک به اونیکومایکوزیس مورد بررسی قرار گرفت. پس از آزمایش مستقیم نمونه‌ها، بخشی از آن‌ها در محیط‌های کشت قارچی کشت گردید و به منظور شناسایی اولیه و بدست آوردن کشت‌های خالص از محیط کاندیدا کروم آگار استفاده شد. سپس تعیین گونه‌های کاندیدا با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP انجام شد.

یافته‌ها: از ۲۱۰ نمونه ناخن مشکوک به اونیکومایکوزیس ۵۱ مورد (۲۴/۲ درصد) کلنی کاندیدایی جدا شد، که ۱۴ مورد (۲۷/۵ درصد) مربوط به مردها و ۳۷ مورد (۷۲/۵ درصد) مربوط به زن‌ها بود و در هر دو جنس گروه سنی ۳۰-۳۹ سال بیشترین میزان عفونت را نشان دادند. شایع‌ترین گونه کاندیدایی جدا شده کاندیدا پاراسیلوژیس ۲۳ مورد (۴۵/۱ درصد) و پس از آن کاندیدا آلبیکس، ۲۱ مورد (۴۱/۲ درصد)، کاندیدا گلابراتا، ۲ مورد (۳/۹ درصد)، کاندیدا تروپیکالیس، ۲ مورد (۳/۹ درصد)، کاندیدا گیلرموندی، ۲ مورد (۳/۹ درصد) و کاندیدا فماتا ۱ مورد (۲ درصد) بودند.

نتیجه‌گیری: این بررسی نشان داد که گونه‌های کاندیدا پاراسیلوژیس و کاندیدا آلبیکس شایع‌ترین گونه‌های دخیل در ایجاد اونیکومایکوزیس کاندیدایی می‌باشند.

واژگان کلیدی: اونیکومایکوزیس؛ کاندیدا؛ PCR

ارجاع: ناصری علی، کارگر فاطمه، فتی عبدالمجید، جراحی لیدا، پریان نوغانی محمود، فاطمی اسفدن آسیه. جدا سازی و شناسایی ملکولی گونه‌های کاندیدا

جدا شده از بیماران مبتلا به اونیکومایکوزیس به روش PCR-RFLP. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۳؛ ۴۲ (۷۷۲): ۵۱۱-۵۱۸.

اونیکومایکوزیس بیشتر در ناخن‌های دست مشاهده می‌شود (۲).
خصوصیات کلینیکی اونیکومایکوزیس مخمری بسته به محل ابتلا در ناخن متفاوت است. در فرم پارونیشیای حاصل از مخمرها، شیارهای جانبی و ابتدایی ناخن گرفتار می‌شود و نسج اطراف ناخن متورم و قرمز رنگ می‌شود و با افزوده شدن عوامل میکروبی دردناک می‌گردد. در فرم اونیکولیز مخمری که بیشتر در ناخن‌های دست اتفاق

مقدمه

اونیکومایکوزیس، عفونت قارچی ناخن است که توسط سه گروه از قارچ‌ها (درماتوفیت‌ها، مخمرها و ساپروفیت‌ها) ایجاد می‌شود (۱).
مخمرها، یکی از عوامل مهم بروز عفونت‌های ناخن هستند. اونیکومایکوزیس ناشی از مخمرها در بالغین بیشتر دیده می‌شود و شیوع آن در زنان ۳-۲ برابر مردان است (۲، ۳). عوامل مخمری ایجاد کننده‌ی

- ۱- دانشیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ‌شناسی پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۳- استاد، مرکز تحقیقات بیماری‌های سالک جلدی و گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۴- دانشیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۵- کارشناس ارشد انگل‌شناسی پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۶- کارشناس ارشد انگل‌شناسی پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: علی ناصری، دانشیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
Email: naseria@mums.ac.ir

(۱۴). هدف از این مطالعه، تعیین گونه‌های کاندیدا جدا شده از نمونه‌های بالینی بدست آمده از بیماران مشکوک به اونیکومایکوزیس مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌های تشخیصی بیمارستان‌های دانشگاهی مشهد بوده است.

روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها: این مطالعه با هدف بررسی عوامل کاندیدایی اونیکومایکوزیس در بیمارانی که توسط پزشکان و متخصصان پوست به آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی بیمارستان‌های دانشگاهی در مشهد ارجاع داده می‌شوند، انجام شد. بیمارانی که با توجه به معیارهای بالینی از جمله وجود پارونی شیا، بد شکلی ناخن، شکستگی ناخن، تغییر رنگ ناخن و غیره مشکوک به اونیکومایکوزیس بودند مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ثبت اطلاعات لازم، جهت نمونه‌برداری ابتدا ناخن‌ها و بافت اطراف ناخن با الکل ۷۰ درصد ضد عفونی شده، سپس ناخن درگیر کوتاه و با استفاده از اسکالپل استریل ترشحات و تراشه‌های ناخن اطراف ناخن، زیر صفحه و بستر ناخن جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌ها به دو قسمت تقسیم گردید، یک بخش از نمونه‌ها برای انجام آزمایش مستقیم و بخش دیگر برای کشت و جداسازی عوامل قارچی در نظر گرفته شد. قسمتی از تراشه‌های ناخن را روی لام تمیزی قرار داده، با استفاده از هیدروکسید پتاسیم ۲۰ درصد شفاف کرده و نمونه‌های شفاف شده مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند. جهت کشت اولیه نمونه‌ها، مطابق مطالعات قبلی، از دو محیط کشت سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل و محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل و سیکلوهاگزاماید استفاده شد (۱۴، ۱۵). نمونه‌ها به صورت نشاکاری در چند نقطه (بسته به میزان نمونه) در محیط‌های کشت تلقیح و در حرارت ۲۵-۳۰°C انکوبه شدند (۱۶). کشت‌های مثبت از نظر وجود مخمر ابتدا توسط روش‌های مرسوم مورد بررسی و پس از جداسازی و خالص‌سازی عوامل کاندیدایی در محیط کشت کاندیدا کروم آگار (هایمدیا، هند)، استخراج DNA صورت گرفت.

استخراج DNA و انجام PCR-RFLP برای استخراج DNA از روش جوشاندن (boiling) و کیت استخراج DNA (Biotechnology Gene A11) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. در روش جوشاندن، ابتدا میکروتیوب‌های حاوی نمونه‌ها در سانتیفریوژ گذاشته شد و محلول رویی را که حاوی آب مقطر و باقی مانده‌های احتمالی ژلوز محیط کشت است در شرایط استریل زیر هود برداشته و دور ریخته شد. مجدد مراحل قبل تکرار شد تا چنانچه نمونه‌ها حاوی ژلوز نباشد کاملاً خالص گردد. در انتها درب میکروتیوب‌ها را با پارافیلیم کاملاً بسته و نمونه‌ها حدود ۲۰ دقیقه جوشانده شد. بعد از سرد شدن سانتیفریوژ شده و پس از اتمام

می‌افتد، شیار لبه‌ی آزاد ناخن گرفتار می‌شود که به صورت هیپرکراتوز زیر ناخنی انتهایی و به شکل توده زرد مایل به خاکستری در زیر آن نمایان می‌شود. در بچه‌ها، کاندیدا قسمت سطحی ناخن را گرفتار کرده و ایجاد اونیکومایکوزیس سفید سطحی می‌نماید که کمتر اتفاق می‌افتد (۱، ۳).

اونیکومایکوزیس در برخی از مشاغل بیشتر دیده می‌شود به طوری که در خانم‌های خانه‌دار، مستخدمین، ظرفشورها، پرستاران، آشپزها و قنادان شیوع بیشتری دارد. در کودکان به علت خیس خوردگی ناخن‌های دست به دلیل مکیدن، عفونت کاندیدایی ناخن ایجاد می‌شود (۳).

بروز عفونت‌های مخمری ناخن به چندین عامل بستگی دارد. عوامل مهارکننده سیستم ایمنی مثل شیمی‌درمانی، پرتو درمانی، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف و کورتیکواستروئیدها، ایدز، دیابت شیرین، سن، جنس، شغل، آب و هوا و دیگر عوامل، زمینه‌ساز این عفونت هستند (۴، ۵). در بعضی از تحقیقات بیشترین مورد کاندیدیازیس ناخن در خانم‌های خنله‌دار گزارش شده است. در خانم‌های خنله‌دار عوامل زمینه‌ای مانند خیس خوردگی مکرر ناخن‌ها حین شستشو و تماس با مواد شوینده می‌تواند مؤثر باشد (۶، ۷).

گزارش‌های مختلفی از میزان شیوع اونیکومایکوزیس مخمری در کشورهای مختلف دنیا وجود دارد. در کشورهایمانند ایران (۸، ۹)، عربستان (۱۰)، ایتالیا (۱۱) و اسپانیا (۱۲) مخمرها شایع‌ترین عوامل اونیکومایکوزیس گزارش شده‌اند.

در بین مخمرها، کاندیدا آلیکنس شایع‌ترین عامل کاندیدایی مسئول عفونت در اشکال بالینی مختلف کاندیدیازیس از جمله اونیکومایکوزیس کاندیدایی بوده است ولی گونه‌های دیگر مانند پاراسیتیلوزیس، تروپیکالیس، گلابراتا، گیلرموندی، کروزه‌ای و غیره نیز از بیماران جدا می‌شوند. اهمیت گونه‌های غیر آلیکنس در سال‌های اخیر به واسطه بروز مقاومت آن‌ها به برخی از داروها و همچنین کاهش مقاومت ایمنی بسیاری از بیماران، افزایش پیدا کرده است. شناسایی گونه‌های مخمری بیماری‌زا، از نقطه نظر همه‌گیرشناسی و نیز از نظر انتخاب درمان مناسب و مؤثر بسیار اهمیت دارد چرا که عوامل ضدقارچی تأثیر متفاوتی بر علیه گونه‌های مختلف کاندیدا دارند (۱۳).

روش‌های مختلفی برای تعیین هویت عوامل بیماری‌زا وجود دارد که بیشتر آن‌ها بر اساس مشخصات فنوتیپی، فیزیولوژیکی و بیوشیمی است. با وجود دقت و اعتبار، این روش‌ها وقت‌گیر هستند و برای تعیین برخی از گونه‌ها کافی نمی‌باشند، بنابراین روش‌های جدیدتری از جمله روش‌های ملکولی که دقت و سرعت بیشتری دارند مورد توجه قرار گرفته‌اند. از جمله PCR-RFLP که روشی است به نسبت ساده و الگوی بدست آمده قابل تشخیص و مورد اعتماد می‌باشد

UV document و تحت اشعه‌ی ماوراء بنفش تصویربرداری شد. آزمایش مولکولی RFLP برای انجام آزمایش RFLP، ۲ میکرولیتر محصول PCR با ۴ میکرولیتر بافر آنزیم و ۱ میکرولیتر آنزیم (MsPI Fast MsPI Digest, Fermentas Lithuania) و ۶ میکرولیتر آب مقطر در داخل میکروتیوب‌ها مخلوط و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و در نهایت پس از انجام الکتروفورز بر روی ژل ۲/۵ درصد بر اساس اندازه و تعداد باندهای بدست آمده، گونه‌های کاندیدا شناسایی گردید. تحلیل داده‌ها با استفاده از روش‌های آمار توصیفی انجام شد.

یافته‌ها

در این مطالعه در مجموع ۲۱۰ بیمار مشکوک به اونیکومایکوزیس مورد بررسی قرار گرفتند که با توجه به نتایج آزمایش مستقیم و کشت ۵۱ بیمار (۲۴/۲ درصد) مبتلا به اونیکومایکوزیس کاندیدایی بودند. از این تعداد، ۱۴ بیمار مرد (۲۷/۴ درصد) و ۳۷ بیمار (۷۲/۶ درصد) زن بودند. محدوده‌ی سنی بیماران از ۲ سال تا ۷۸ سال متغیر و میانگین سنی آنان ۳۸ سال بود. بیشترین فراوانی اونیکومایکوزیس در گروه سنی ۳۰ تا ۳۹ سال (۳۹/۲ درصد) و بعد از آن در گروه سنی ۵۰-۵۹ سال و کمترین فراوانی در گروه سنی ۱۰-۱۹ سال بدست آمد (شکل ۱).

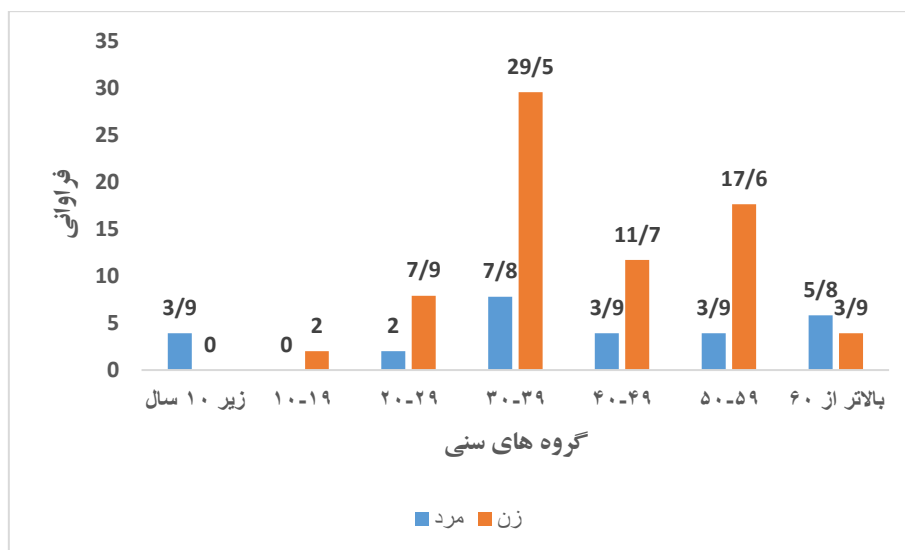
از ۵۱ بیمار مبتلا به اونیکومایکوزیس ۳۸ بیمار (۷۴/۵ درصد) ابتلای ناخن‌های دست، ۱۱ بیمار (۲۱/۵ درصد) ابتلای ناخن پا و ۲ بیمار (۳/۹ درصد) ابتلای ناخن دست و پا به صورت توأم داشتند. همچنین اکثر بیماران مبتلا به اونیکومایکوزیس را زنان خانه‌دار ۲۹ نفر (۵۶/۹ درصد) تشکیل می‌دادند.

سانتریفوژ با رعایت شرایط استریل محلول رویی که حاوی DNA می‌باشد، برداشته شد و به وسیله‌ی دستگاه نانودراپ غلظت DNA مورد سنجش قرار گرفت.

جهت انجام PCR منطقه ژنی ITS مربوط به ژن ریبوزومال DNA برای تکثیر انتخاب گردید. بدین منظور از پرایمر پیش‌رو (۳' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - ۵') و معکوس (۵' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - ۳') استفاده شد. با توجه به تعداد نمونه در یک میکروتیوب به ازای هر نمونه، ۲۰ میکرولیتر مسترمیکس، ۱/۵ میکرولیتر پرایمر، ۳ میکرولیتر آب مقطر استریل خالص و در نهایت ۰/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده تهیه شد. سپس میکروتیوب‌ها به دستگاه ترمال سایکلر (Bio system) منتقل و برنامه‌ی حرارتی و زمانی زیر تعریف گردید:

- ۱- مرحله‌ی Denaturation اولیه در دمای ۹۶ درجه به مدت ۷ ثانیه
- ۲- مرحله‌ی Denaturation ثانویه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه
- ۳- مرحله‌ی Annealing در دمای ۵۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه
- ۴- مرحله‌ی Extension در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه
- ۵- Final Extension در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه.

تعداد سیکل‌های واکنش ۴۰ سیکل تعریف شد و پس از اتمام واکنش PCR، محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از دستگاه



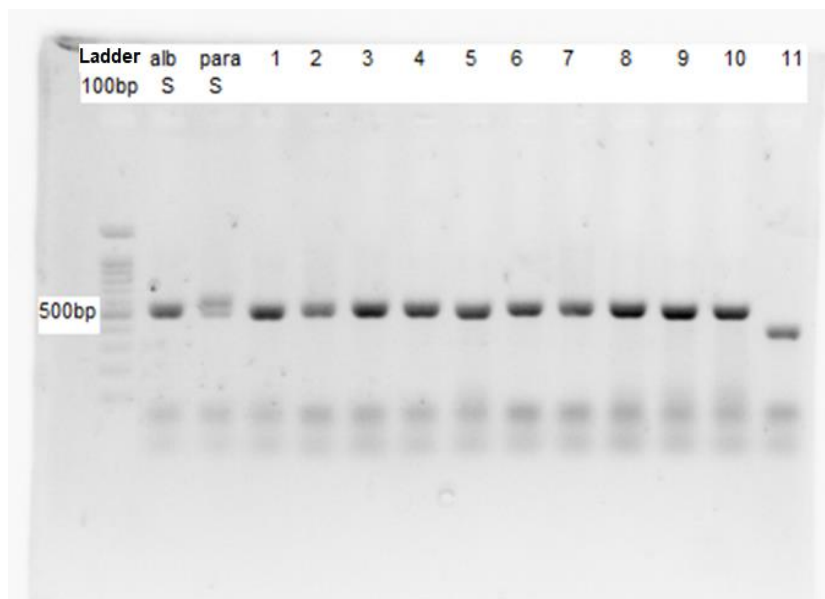
شکل ۱. توزیع فراوانی اونیکومایکوزیس کاندیدایی بر حسب گروه‌های مختلف سنی و جنس

جدول ۱- توزیع فراوانی گونه های کاندیدایی جدا شده از مبتلایان به اونیکومایکوزیس کاندیدایی

درصد	فراوانی	گونه ی کاندیدایی
۴۵/۱	۲۳	کاندیدا پاراپسیلوزیس
۴۱/۲	۲۱	کاندیدا آلبیکنس
۳/۹	۲	کاندیدا تروپیکالیس
۳/۹	۲	کاندیدا گلابراتا
۳/۹	۲	کاندیدا گیلرموندی
۲	۱	کاندیدا فماتا
۱۰۰	۵۱	جمع

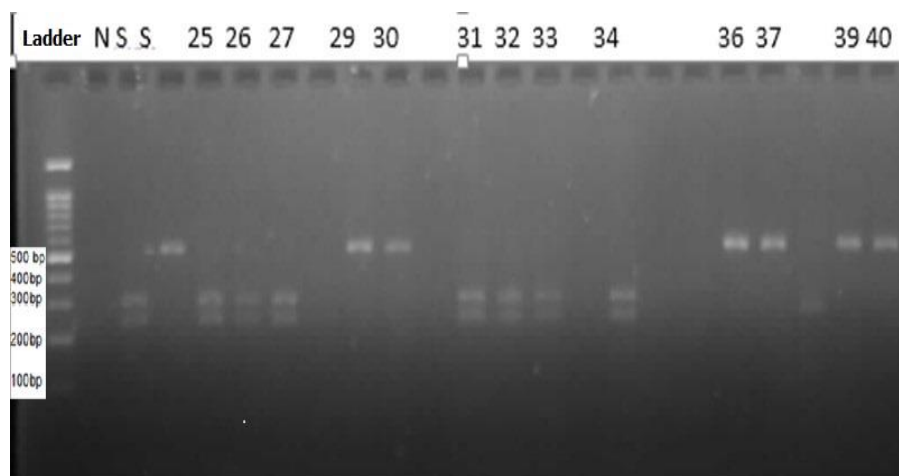
فراوان ترین عامل کاندیدایی جدا شده، کاندیدا پاراپسیلوزیس با ۲۳ مورد (۴۵ درصد) بود و پس از آن به ترتیب کاندیدا آلبیکنس با ۲۱ مورد (۴۱/۱ درصد)، کاندیدا تروپیکالیس، ۲ مورد (۳/۹ درصد)، کاندیدا گلابراتا، ۲ مورد (۳/۹ درصد)، کاندیدا گیلرموندی، ۲ مورد (۳/۹ درصد) و کاندیدا فماتا، ۱ مورد (۲ درصد) قرار داشتند (جدول ۱).

شکل ۲، الکتروفورز محصولات PCR برخی گونه های کاندیدایی جدا شده از موارد اونیکومایکوزیس و شکل ۳، الکتروفورز محصولات RFLP بعد از آنزیم MsPI در مطالعه ی حاضر را نشان می دهد.



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR برخی گونه های کاندیدایی جدا شده از موارد اونیکومایکوزیس.

S: سوش های استاندارد کاندیدا آلبیکنس (PTCC ۵۰۲۷) و کاندیدا پاراپسیلوزیس (ATCC ۲۲۰۱۹) و ۱-۱۱ جدایه های کاندیدا



شکل ۳: الکتروفورز محصولات RFLP با آنزیم MsPI برخی ایزوله های کاندیدا شماره های ۲۹،۳۰،۳۶،۳۷،۳۹،۴۰: کاندیدا پاراپسیلوزیس، شماره های

۲۵،۲۶،۲۷،۳۱،۳۲،۳۳،۳۴: کاندیدا آلبیکنس، N: کنترل منفی و Ladder: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی

بحث

اونیکومایکوزیس، یکی از شایع ترین اختلالات ناخن می باشد. بطوری که حدود ۵۰ درصد ناهنجاری های ناخن به دلیل این عفونت به وجود می آید و می تواند اثرات منفی قابل توجهی بر وضعیت عملکرد احساسی، شغلی، اجتماعی و کیفیت زندگی افراد بگذارد. افزایش سن، وجود کچلی در نقطه ای دیگر از بدن، قرار گرفتن در معرض افراد مبتلا به اونیکومایکوزیس، ضربه به ناخن ها و ضعف سیستم ایمنی از عوامل خطر رایج برای ابتلا به اونیکومایکوزیس ذکر شده اند (۳، ۵، ۱۷). مطالعات مختلف نشان داده اند که عفونت های ناخن ناشی از عوامل غیر درماتوفیتی به ویژه اونیکومایکوزیس کاندیدایی ناخن بیشتر از آنچه قبلاً تصور می شد، شایع هستند به طوری که این عوامل مسئول بیش از ۳۰ درصد عفونت های قارچی ناخن می باشند (۱۷).

در این مطالعه، تعداد افراد مبتلا به اونیکومایکوزیس کاندیدایی ۲۴/۳ درصد بود، طبق تحقیقاتی که در ایران انجام شده است اونیکومایکوزیس مخمری و به خصوص کاندیدایی شیوع قابل توجهی دارد. بطوری که در مطالعه‌ی Mohammadi و Chadeganipour در اصفهان (۱۸)، Afshar و همکاران در ساری (۱۹)، Zaini و همکاران در تهران (۲۰)، Aghamirian و Ghiasian در قزوین (۲۱) و همچنین شکوهی و همکاران در ساری (۷)، شیوع اونیکومایکوزیس مخمری را به ترتیب ۵۱/۱، ۶۱/۹، ۳۹/۲، ۶۷/۸ و ۳۰ درصد گزارش کردند که نشان دهنده‌ی فراوانی نسبتاً بالای این عفونت می باشد. شیوع اونیکومایکوزیس به ویژه اونیکومایکوزیس کاندیدایی می تواند تحت تأثیر عوامل مختلف از جمله سن، شغل، تعداد جمعیت مورد مطالعه، منطقه‌ی جغرافیایی و نوع آب و هوا، سبک زندگی و فرهنگ متفاوت و همچنین بیماری های زمینه‌ای مثل دیابت قرار گیرد که می تواند توجه کننده‌ی تفاوت در مناطق مختلف کشور باشد.

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، ۳۷ مورد (۷۳ درصد) از عفونت های کاندیدایی ناخن مربوط به زنها بود. سایر تحقیقات انجام شده نیز میزان شیوع اونیکومایکوزیس مخمری را در بین زنها بیشتر نشان می دهد (۴، ۵، ۲۱-۱۹). علاوه بر این بیشترین عوامل مخمری جدا شده مربوط به زنان خانه دار با ۵۶/۹ درصد بود که در مطالعات شکوهی و همکاران (۷)، Mohammadi و Chadeganipour (۱۸) و نیز Razavyoon و همکاران (۲۲) نیز مورد تأکید قرار گرفته است. علت گزارش و شیوع بیشتر عوامل مخمری در خانم ها به ویژه خانم های خانه دار می تواند عوامل زمینه‌ای مثل خیس خوردگی ناخن ها در اثر تماس بیشتر ناخن های خانم ها با آب و مواد شوینده، ابتلای احتمالی به واژینیت و همچنین توجه بیشتر خانم ها به جنبه های زیبایی ناخن ها نسبت به مرد ها باشد که مراجعه ی آنها به مراکز تشخیصی و

درمانی را سبب می شود. در مطالعه‌ی حاضر، دو بیمار زیر ۱۰ سال به کاندیدایزیس ناخن مبتلا بودند که یک مورد علت آن ناشی از خیس خوردگی ناخن های دست به دلیل مکیدن انگشت و مورد دیگر به دلیل نقص ایمنی که سبب ابتلا به کاندیدایزیس در ناخن های دست و پا به صورت توأم شده بود.

در این مطالعه، گروه سنی ۳۰-۳۹ سال و در هر دو جنس بیشترین میزان عفونت را نشان دادند (۳۹/۲ درصد) در بررسی Afshar و همکاران (۱۹) و همچنین شکوهی و همکاران (۷) در ساری نیز بیشترین فراوانی مربوط به گروه سنی ۳۰-۳۹ سال بود. علاوه بر این عوامل مخمری در اکثر موارد از ناخن جدا شدند که با مطالعات دیگر انجام شده در این زمینه مطابقت داشت (۷، ۸، ۱۰). اونیکومایکوزیس ناشی از عوامل کاندیدایی افراد در سنین مختلف را تحت تأثیر قرار می دهد اما همانطور که در مطالعه‌ی حاضر و نتایج مطالعات ذکر شده مشاهده می شود شیوع آن در سنین بالاتر بیشتر می باشد. که احتمالاً می تواند ناشی از ابتلا به دیابت، نقص سیستم ایمنی و ضعف در گردش خون باشد.

در مطالعه‌ی حاضر، فراوان ترین گونه‌ی کاندیدایی جدا شده کاندیدا پاراپسیلوزیس با ۲۳ مورد (۴۵/۱ درصد) بود و پس از آن به ترتیب گونه های آلیکنس ۲۱ مورد (۴۱/۲ درصد)، تروپیکالیس، ۲ مورد (۳/۹ درصد)، گلابراتا، ۲ مورد (۳/۹ درصد)، گیلرموندی، ۲ مورد (۳/۹ درصد) و فماتا، ۱ مورد (۲ درصد) را شامل شدند.

در مطالعه‌ی Pakshir و همکاران سال ۱۳۹۴ در شیراز که بر روی ۹۷ گونه‌ی کاندیدایی جدا شده از بیماران اونیکومایکوزیس به روش PCR-RFLP انجام شد، بیشترین فراوانی مربوط به کاندیدا پاراپسیلوزیس بود و پس از آن به ترتیب گونه های آلیکنس، تروپیکالیس، گلابراتا، کروزه‌ای و گیلرموندی بیشترین فراوانی را داشتند (۲۳).

Afsarian و Sharafi، در سال ۱۴۰۲، به شناسایی و تعیین گونه های کاندیداهایی جدا شده از نمونه های بالینی بیماران مبتلا به اونیکومایکوزیس با روش PCR-RFLP پرداختند. بر اساس مطالعه‌ی آنها کاندیدا پاراپسیلوزیس واجد بیشترین فراوانی بود و پس از آن گونه های آلیکنس، گلابراتا، کروزه‌ای، تروپیکالیس، گیلرموندی، فماتا و کفیر قرار داشتند (۲۴). نتایج مطالعات فوق از نظر فراوان ترین گونه‌ی کاندیدایی عامل اونیکومایکوزیس کاندیدایی با نتایج مطالعه‌ی حاضر مطابقت داشت.

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر و سایر مطالعات مورد اشاره گونه های غیر آلیکنس کاندیدا (Non Alibicans Candida- NAC) نقش بیشتری در ایجاد عفونت های ناخن داشته اند که این مسأله توجه به اهمیت گونه های غیر آلیکنس در ایجاد عفونت های کاندیدایی را

۱۶۷۷، ۳۴/۹ و ۳۶/۵ درصد بیشترین فراوانی را داشت. علت این مغایرت می تواند تفاوت در روش های مورد استفاده در شناسایی عوامل ایجادکننده ی اونیکومایکوزیس و همچنین شرایط مختلف زیستی و اقتصادی- اجتماعی در بیماران باشد. روش های مولکولی برای شناسایی قارچ های عامل اونیکومایکوزیس اغلب بر درماتوفیت ها و کپک های غیردرماتوفیتی متمرکز بوده است و در این رابطه تحقیقات مختلفی به چشم می خورد (۲۹، ۳۰)، اما در مورد شناسایی عوامل مخمری اونیکومایکوزیس مطالعات کمتری صورت گرفته است. از طرفی با توجه به سهم رو به افزایش گونه های غیر آلبیکنس در ایجاد عفونت های کاندیدایی ناخن و حساسیت متفاوت آن ها به داروهای ضد قارچی، تعیین گونه این مخمرها ضروری به نظر می رسد.

نتیجه گیری

این نتایج نشان داد که اونیکومایکوزیس، یکی از عفونت های قارچی شایع در بیمارانی است که از اختلالات ناخنی رنج می برند. در این میان گونه های کاندیدا پاراپسیلوزیس و پس از آن کاندیدا آلبیکنس، بیشترین نقش را در ایجاد اونیکومایکوزیس کاندیدایی دارند. بنابراین شناسایی دقیق این مخمرهای بیماری زا از لحاظ درمان مناسب و مؤثر، اهمیت قابل توجهی دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته قارچ شناسی پزشکی (۹۶۰۸۴۹) می باشد که در دانشگاه علوم پزشکی مشهد تصویب شد و با حمایت مالی معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه به انجام رسیده است. بدین وسیله از زحمات این معاونت و همکاری پرسنل محترم بخش انگل شناسی و قارچ شناسی بیمارستان امام رضا (ع) مشهد تقدیر و تشکر می شود.

مضاعف می نماید. به طور کلی گونه های کاندیدا، شایع ترین علت عفونت های قارچی در سراسر جهان می باشند. این عوامل سومین علت غالب عفونت های مرتبط با مراقبت های بهداشتی به حساب می آیند. اگرچه کاندیدا آلبیکنس عامل اصلی کاندیدیازیس است. با این حال، افزایش گونه های غیر آلبیکنس کاندیدا به طور قابل توجهی در طول دو دهه ی گذشته مشاهده شده است که این افزایش هم در عفونت های کاندیدایی ناخن و هم در سایر عفونت های کاندیدایی مشهود بوده است. اکثر عفونت های NAC توسط گونه های گلابراتا، تروپیکالیس، پاراپسیلوزیس، گیلرموندی، دابلینسیس و کروزه ای ایجاد می شوند. تعداد فزاینده ی گونه های غیر آلبیکنس کاندیدا می تواند به علت مواجهه ی قبلی با داروهای آزولی و پلی ان، بهبود روش های تشخیصی آزمایشگاهی، استفاده از کاترهای طولانی مدت، بدخیمی ها، تعداد روزافزون بیماران دچار نقص ایمنی و استفاده ی طولانی مدت از داروهای سرکوب کننده ی ایمنی باشد. اعتقاد بر این است که افزایش استفاده از داروهای آزولی در کلینیک های درمانی ممکن است با افزایش گونه های غیر آلبیکنس کاندیدا مرتبط باشد. رشد این گونه های مقاوم به داروهای ضد قارچی مانند اکینوکاندین ها و فلوکونازول در بیماران مبتلا به عفونت های کاندیدایی، نگرانی هایی را ایجاد کرده است. مقاومت به آزول ها در کاندیدا آلبیکنس کم می باشد (کمتر از ۵ درصد) اما این میزان در کاندیدا پاراپسیلوزیس ۱۰-۴ درصد و در کاندیدا گلابراتا ۱۶-۴ درصد و در برخی مطالعات به میزان بسیار بیشتری گزارش شده است (۲۵-۲۷).

در برخی مطالعات انجام شده، کاندیدا آلبیکنس به عنوان شایع ترین مخمر عامل اونیکومایکوزیس گزارش شده است. در بررسی های Zaini و همکاران در تهران (۲۰)، Chadeganipour و Mohammadi در اصفهان (۱۸) و Otašević و همکاران در صربستان (۲۸) با استفاده از روش های مورفولوژیک و بیوشیمیایی کاندیدا آلبیکنس به ترتیب با

References

- Ghannoum M, Isham N. Fungal nail infections (onychomycosis): a never-ending story. PLoS Pathog ۲۰۱۴; ۱۰(۶): e۱۰۰۴۱۰۵.
- Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. Amsterdam: Elsevier Health Sciences; ۲۰۰۹.
- Zeini F, Mehbod A, Emami M. Comprehensive medical mycology [in Persian]. ۶th ed. Tehran, Iran: University of Tehran Publications; ۲۰۲۱. p. ۱۵۱-۸.
- Gupta AK, Venkataraman M, Talukder M. Onychomycosis in older adults: prevalence, diagnosis, and management. Drugs Aging ۲۰۲۲; ۳۹: ۱۹۱-۸.
- Rubin AI. Onychomycosis. JAMA Dermatol ۲۰۲۴; ۱۶۰(۶): ۶۹۱.
- Andrés T-S, Alexandro B. Candida onychomycosis: an old problem in modern times. Curr Fungal Infect Rep ۲۰۲۰; ۱۴: ۲۰۹-۱۶.
- Shokohi T, Heidari Z, Haqhani I, Khalilian A, Aghili R, Miah S. The study of ۱۰۱ cases of onychomycosis and associate factors in patients referred to Boali Sina Hospital and Toba dermatology outpatient clinics in Sari [in Persian]. J Mazandaran Univ Med Sci ۲۰۰۹; ۱۹(۷۱): ۳۳-۴۳.
- Adibpour M, Kazemi A. Prevalence of onychomycosis in examined patient in the medical mycology lab of Tabriz University of Medical Sciences (۱۹۹۹-۲۰۰۰) [in Persian]. Med J Tabriz Univ Med Sci ۲۰۱۲; ۲۷(۲): ۱۳-۶.

۹. Rafat Z, Hashemi S, Saboor-Yaraghi AA, Pouragha B, Taheriniya A, Moosavi A, et al. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology, casual agents and demographic characteristics of onychomycosis in Iran. *J Mycol Med* ۲۰۱۹; ۲۹(۳): ۲۶۵-۷۲.
۱۰. Moursi SA, Al Baqawi RA, Alshammari MN, Al Enzi NS. Prevalence of Onychomycosis in Hail Region, Saudi Arabia. *National Journal of Laboratory Medicine* ۲۰۱۸; ۷(۲): ۱-۵.
۱۱. Gallo L, Cinelli E, Fabbrocini G, Vastarella M. A ۱۵-year retrospective study on the prevalence of onychomycosis in psoriatic vs non-psoriatic patients: A new European shift from dermatophytes towards yeast. *Mycoses* ۲۰۱۹; ۶۲(۸): ۶۵۹-۶۴.
۱۲. Marcos-Tejedor F, Mota M, Iglesias-Sánchez MJ, Mayordomo R, Gonçalves T. Identification of fungi involved in onychomycosis in patients of a Spanish rural area. *J Fungi (Basel)* ۲۰۲۱; ۷(۸): ۶۲۳.
۱۳. Lindberg E, Hammarström H, Ataollahy N, Kondori N. Species distribution and antifungal drug susceptibilities of yeasts isolated from the blood samples of patients with candidemia. *Sci Rep* ۲۰۱۹; ۹(۱): ۳۸۳۸.
۱۴. Bakhshi T, Salari S, Naseri A, Esfandiarpour I, Mohammadi MA, Ghasemi Nejad Almani P. Molecular identification of Candida species in patients with candidiasis in Birjand, Iran, using polymerase Chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay [in Persian]. *J Isfahan Med Sch* ۲۰۱۵; ۳۳(۳۵۹): ۱۹۸۶-۹۳.
۱۵. Akbari F, Naseri A, Fata A, Najafzadeh MJ, Jarahi L, Parian M. The drug susceptibility of aspergillus species isolated from the patients with onychomycosis to Itraconazole, Voriconazole, and Amphotericin B [in Persian]. *J Isfahan Med Sch* ۲۰۲۰; ۳۸(۵۷۷): ۳۶۷-۷۵.
۱۶. Criseo G, Scordino F, Romeo O. Current methods for identifying clinically important cryptic Candida species. *J Microbiol Methods* ۲۰۱۵; ۱۱۱: ۵۰-۶.
۱۷. Maskan Bermudez N, Rodríguez-Tamez G, Perez S, Tosti A. Onychomycosis: Old and New. *J Fungi (Basel)* ۲۰۲۳; ۹(۵): ۵۵۹.
۱۸. Chadeganipour M, Mohammadi R. Causative agents of onychomycosis: a ۷-year study. *J Clin Lab Anal* ۲۰۱۶; ۳۰(۶): ۱۰۱۳-۲۰.
۱۹. Afshar P, Khodavaisy S, Kalhori S, Ghasemi M, Razavyoon T. Onychomycosis in north-East of Iran. *Iran J Microbiol* ۲۰۱۴; ۶(۲): ۹۸-۱۰۳.
۲۰. Zaini F, Mahmoudi M, Mehdob A, Kordbacheh P, Safara M. Fungal nail infections in Tehran, Iran. *Iran J Public Health* ۲۰۰۹; ۳۸(۳): ۴۶-۵۳.
۲۱. Aghamirian MR, Ghiasian SA. Onychomycosis in Iran: epidemiology, causative agents and clinical features. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* ۲۰۱۰; ۵۱(۱): ۲۳-۹.
۲۲. Razavyoon T, Hashemi SJ, Mansouri P, Rafat Z, Saboor-Yaraghi AA, Kamali Sarvestani H, et al. The epidemiology and etiology of onychomycosis in ۷ laboratory centers affiliated to Tehran University of Medical Sciences during ۲۰۱۹-۲۰۲۰. *Iran J Microbiol* ۲۰۲۲; ۱۴(۲): ۲۶۸-۷۵.
۲۳. Pakshir K, Zomorodian K, Zakaei A, Motamedi M, Ghiasi MR, Karamitalab M. Molecular identification and in-vitro antifungal susceptibility testing of Candida species isolated from patients with onychomycosis. *Curr Med Mycol* ۲۰۱۵; ۱(۴): ۲۶-۳۲.
۲۴. Afsarian MH, Sharafi Z. Molecular identification of candida species isolated from onychomycosis with in vitro antifungal susceptibility profiles. *Jundishapur J Microbiol* ۲۰۲۳; ۱۶(۸): e۱۳۹۹۰۶.
۲۵. Abdel Hamid RM, El Mahallawy HA, Abdelfattah NE, Wassef MA. The impact of increasing non albicans Candida trends on diagnostics in immunocompromised patients. *Braz J Microbiol* ۲۰۲۳; ۵۴(۴): ۲۸۷۹-۹۲.
۲۶. Gómez-Gaviria M, Ramírez-Sotelo U, Mora-Montes HM. Non-albicans Candida Species: Immune Response, Evasion Mechanisms, and New Plant-Derived Alternative Therapies. *J Fungi (Basel)* ۲۰۲۲; ۹(۱): ۱۱.
۲۷. Taei M, Chadeganipour M, Mohammadi R. An alarming rise of non-albicans Candida species and uncommon yeasts in the clinical samples; a combination of various molecular techniques for identification of etiologic agents. *BMC Res Notes* ۲۰۱۹; ۱۲(۱): ۷۷۹.
۲۸. Otašević S, Barac A, Pekmezovic M, Tasic S, Ignjatović A, Momčilović S, et al. The prevalence of Candida onychomycosis in Southeastern Serbia from ۲۰۱۱ to ۲۰۱۵. *Mycoses* ۲۰۱۶; ۵۹(۳): ۱۶۷-۷۲.
۲۹. Arca E, Saracli MA, Akar A, Yildiran ST, Kurumlu Z, Gur AR. Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis. *European Journal of Dermatology* ۲۰۰۴; ۱۴(۱): ۵۲-۵.
۳۰. Babayani M, Salari S, Hashemi S, Almani PGN, Fattahi A. Onychomycosis due to dermatophytes species in Iran: Prevalence rates, causative agents, predisposing factors and diagnosis based on microscopic morphometric findings. *J Mycol Med* ۲۰۱۸; ۲۸(۱): ۴۵-۵۰.

Isolation and Molecular Identification of *Candida* Species Isolated from Patients with Onychomycosis by PCR-RFLP Method

Ali Naseri¹, Fatemeh Kargar², Abdolmajid Fata³, Lida Jarahi⁴,
Mahmoud Parian Noghani⁵, Asieh Fatemi Esfedan⁶

Original Article

Abstract

Background: Onychomycosis is the most common nail disorder, and Yeast is one of the most common causes of nail fungal infections. Now, the identification of yeast agents, especially *Candida*, has been increased as a pathogen responsible for nail infections. This study was designed to identify *Candida* species in patients with onychomycosis referred to diagnostic laboratories of Mashhad University Hospitals.

Methods: In the present study, 210 nail samples obtained from people suspected of onychomycosis were examined. After direct examination of the samples, some were cultured in fungal culture media, and *Candida* chrome agar medium was used for initial identification and obtaining pure cultures. Then, the *Candida* species were determined using the PCR-RFLP molecular method.

Findings: From 210 nail samples suspected of onychomycosis, 51 cases (24.3%) of *Candida* colonies were isolated, of which 14 cases (27.5%) were men and 37 cases (72.5%) were women, and in both sexes, those who were of 30-39 years old more infected. The most common *Candida* species isolated was *Candida parapsilosis* 23 cases (45.1%), followed by *C. albicans* 21 cases (41.2%), *C. glabrata* 2 cases (3.9%), *C. tropicalis* 2 cases (3.9%), *C. guilliermondii* 2 cases (3.9%). And there were 1 case (2%) of *C. famata*.

Conclusion: This study showed that *Candida parapsilosis* and *Candida albicans* are the most common species involved in the development of *Candida* onychomycosis.

Keywords: Onychomycosis; *Candida*; PCR

Citation: Naseri A, Kargar F, Fata A, Jarahi L, Parian Noghani M, Fatemi Esfedan A. **Isolation and Molecular Identification of *Candida* Species Isolated from Patients with Onychomycosis by PCR-RFLP Method.** J Isfahan Med Sch 2024; 42(772): 511-8.

1- Associate Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

2- MSc Student, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

3- Professor, Department of Parasitology and Mycology and Cutaneous Leishmaniosis Research Center, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

4- Associate Professor, Department of Social Medicine, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

5- MSc of Medical Parasitology, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

6- MSc of Medical Parasitology, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Corresponding Author: Ali Naseri; Associate Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. Email: NaseriA@mums.ac.ir