DOI: 10.48305/jims.v42.i772.0510

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهل و دوم/شماره‌ی ۷۷۲/هفته‌ی چهارم مرداد ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۲۳ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۱۴ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۳/۰۵/۳۱

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 پاراپسلوزیس* ۲۳ مورد (۴۵/۱ درصد) و پس از آن *کاندیدا آلبیکنس*، 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 پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا آلبیکنس* 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): ۵۱۰–۵۱۷.

مقدمه

اونیکومایکوزیس، عفونت قارچی ناخن ا ست که تو سط سه گروه از قارچ‌ها (درماتوفیت‌ها، مخمرها و ســاپروفیت‌ها) ایجاد می‌شــود (۱). مخمرهــا، یکی از عوامــل مهم بروز عفونــت‌هــای نــاخن هســتنــد. اونیکومایکوزیس ناشی از مخمرها در بالغین بیشتر دیده می‌شود و شیوع آن در زنان ۳–۲ برابر مردان ا ست (۲، ۳). عوامل مخمری ایجاد کننده‌ی اونیکومایکوزیس بیشتر در ناخن‌های دست مشاهده می‌شود (۲).

خصــوصــیات کلینیکی اونیکومایکوزیس مخمری بســته به محل ابتلا در ناخن متفاوت ا ست. در فرم پارونی شیای حا صل از مخمرها، شیارهای جانبی و ابتدایی ناخن گرفتار می شود و ن سج اطراف ناخن متورم و قرمز رنگ می شود و با افزوده شدن عوامل میکروبی دردناک می‌گردد. در فرم اونیکولیز مخمری که بیشتر در ناخن‌های دست اتفاق

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

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 مهارکننده‌ی سیستم ایمنی مثل شیمی‌درمانی، پرتو درمانی، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف و کورتیکوستروئیدها، 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 خانه‌دار گزارش شده است. در خانم‌های خانه‌دار عوامل زمینه‌ای مانند خیس‌خوردگی مکرر ناخن‌ها حین شستشو و تماس با مواد شوینده می‌توانند مؤثر باشند (۶، ۷).

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

در بین مخمرها، کاندیدا آلبیکنس شایع‌ترین عامل کاندیدایی مسئول عفونت در اشکال بالینی مختلف کاندیدیازیس از جمله اونیکومایکوزیس کاندیدایی بوده است ولی گونه‌های دیگر مانند پاراپسیلوزیس، تروپیکالیس، گلابراتا، گیلرموندی، کروزه‌ای و غیره نیز از بیماران جدا می‌شوند. اهمیت گونه‌های غیر آلبیکنس 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 برعلیه 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 (۱۴). هدف از این مطالعه، تعیین گونه‌های کاندیدا جدا شده از نمونه‌های بالینی بدست آمده از بیماران مشکوک به اونیکومایکوزیس مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌های تشخیصی بیمار ستان‌های 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 می‌شدند، 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 ناخنی 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 جدا سازی 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 کلرآمفنیکل و محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرآمفنیکل و سیکلوهگزامایدا 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 سانتریفیوژ 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 باشد کاملاً خالص گردد. در انتها درب میکروتیوب‌ها را با پارافیلم کاملاً بسته و نمونه‌ها حدود ۲۰ دقیقه جوشانده شد. بعد از سرد شدن سانتریفیوژ شده و پس از اتمام

سانتریفوژ با رعایت شرایط استریل محلول رویی که حاوی DNA می‌با شد، بردا شته شد و به و سیله‌ی د ستگاه نانودراپ غلظتDNA مورد سنجش قرار گرفت.

جهت انجام PCR منطقه ژنی ITS مربوط به ژن ریبوزومال DNA برای تکثیر انتخاب گردید. بدین منظور از پرایمر پیشرو ITS1 (5′ -TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3′) و معکوس ITS4 (3′-TCCTCCGCTTATTGATATGC -5′) 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 دردمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه

۵-Final Extension در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه.

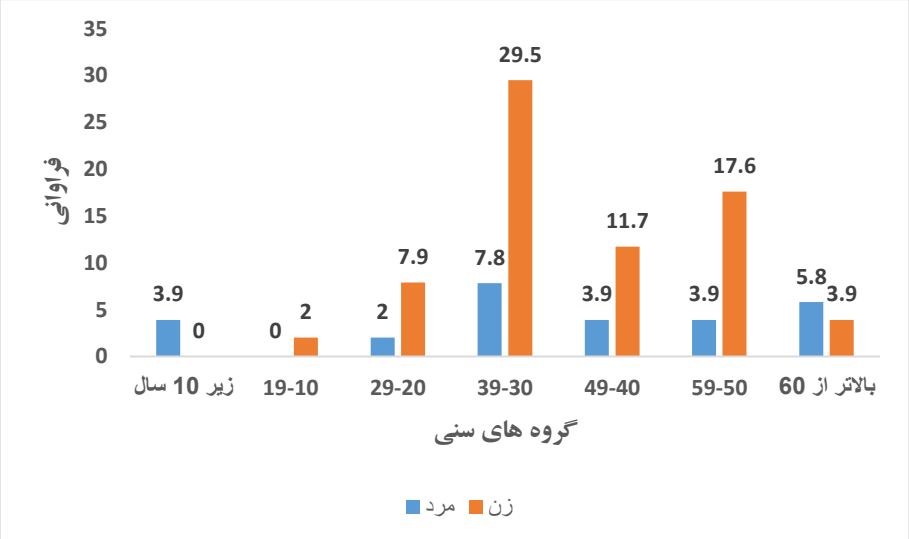
تعداد سیکل‌های واکنش ۴۰ سیکل تعریف شد و پس از اتمام واکنش PCR، محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از دستگاه UV document و تحت اشعه‌ی ماوراء بنفش تصویربرداری شد.

آزمایش مولکولی RFLP: برای انجام آزمایش RFLP، ۲ میکرولیتر محصول PCR با ۴ میکرولیتر بافر آنزیم و ۱ میکرولیتر آنزیم MsPI (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 بررر سی قرار گرفتند که با توجه به نتایج آزمایش م ستقیم و ک شت 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 در صد) 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 در صد) ابتلای ناخن د ست و پا به صورت توأم دا شتند. همچنین اکثر بیماران مبتلا به اونیکومایکوزیس را زنان خانه‌دار ۲۹ نفر (۵۶/۹ درصد) تشکیل می‌دادند.



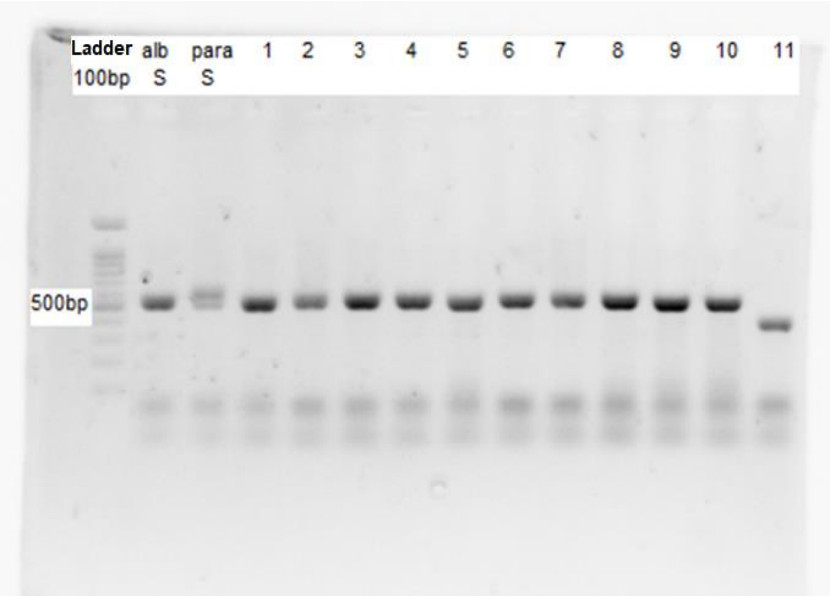
شکل ۱. توزیع فراوانی اونیکومایکوزیس کاندیدایی برحسب گروه‌های مختلف سنی و جنس

فراوان‌ترین 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).

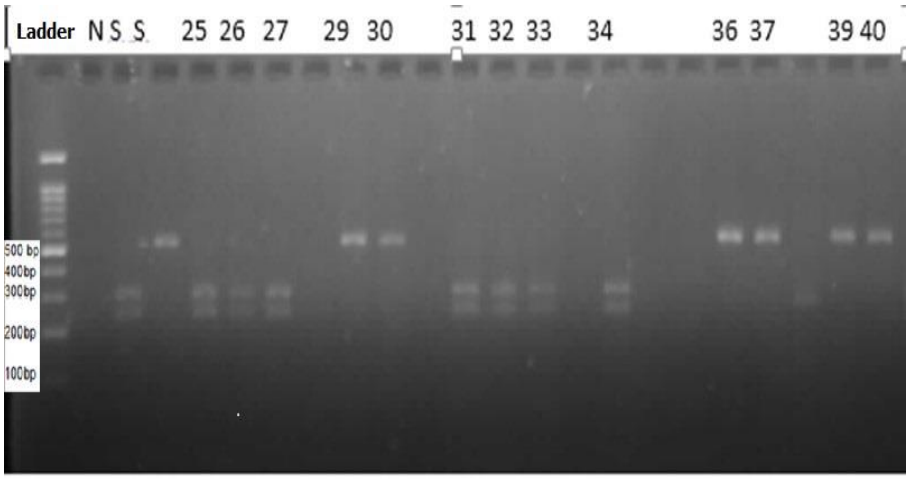
شکل ۲، الکتروفورز محصولات PCR برخی گونه های کاندیدایی جدا شده از موارد اونیکومایکوزیس و شکل ۳، الکتروفورز محصولات RFLP بعد از اثر آنزیم MspI در مطالعه‌ی حاضر را نشان می‌دهد.

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

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



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR برخی گونه‌های کاندیدایی جدا شده از موارد اونیکومایکوزیس.
S: سوش‌های استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* (PTCC 5027) و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* (ATCC 22019) و ۱-۱۱ جدایه‌های کاندیدا



شکل ۳: الکتروفورز محصولات RFLP با آنزیم MspI برخی ایزوله‌های کاندیدا شماره‌های ۲۹،۳۰،۳۶،۳۷،۳۹،۴۰: *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، شماره‌های ۲۵،۲۶،۲۷،۳۱،۳۲،۳۳،۳۴: *کاندیدا آلبیکنس*، N : کنترل منفی و Ladder: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی

بحث

اونیکومایکوزیس، یکی از شایع‌ترین اختلالات ناخن می باشد. بطوری‌که حدود ۵۰ درصد ناهنجاری‌های ناخن به دلیل این عفونت به وجود می‌آید و می‌تواند اثرات منفی قابل توجهی بر وضعیت عملکرد احساسی، شغلی، اجتماعی و کیفیت زندگی افراد بگذارد. افزایش سن، وجود کچلی در نقطه‌ای دیگر از بدن، قرار گرفتن در معرض افراد مبتلا به اونیکومایکوزیس، ضربه به ناخن‌ها و ضعف سیستم ایمنی از عوامل خطر رایج برای ابتلا به اونیکومایکوزیس ذکر شده‌اند (۳، ۵، ۱۷). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که عفونت‌های ناخن ناشی از عوامل غیر درماتوفیتی به ویژه اونیکومایکوزیس کاندیدایی ناخن بیشتر از آنچه قبلاً تصور می‌شد، شایع هستند به طوریکه این عوامل مسئول بیش از ۳۰ درصد عفونت‌های قارچی ناخن می‌باشند (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 Chadeganipour و Mohammadi 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، ۴۶/۸ و ۳۰ درصد گزارش کردند که نشان‌دهنده‌ی فراوانی نسبتاً بالای این عفونت می‌باشد. شیوع اونیکومایکوزیس به ویژه اونیکومایکوزیس کاندیدایی می‌تواند تحت تأثیر عوامل مختلف از جمله جنس، 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 می‌تواند توجیه کننده‌ی تفاوت در مناطق مختلف کشور باشد.

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، ۳۷ مورد (۷۳ درصد) از عفونت‌های کاندیدایی ناخن مربوط به زن‌ها بود. سایر تحقیقات انجام شده نیز میزان شیوع اونیکومایکوزیس مخمری را در بین زن‌ها بیشتر نشان می‌دهد (۴، ۵، ۱۹-۲۱). علاوه بر این بیشترین عوامل مخمری جدا شده مربوط به زنان خانه‌دار با ۵۶/۹ درصد بود که در مطالعات شکوهی و همکاران (۷)، Chadeganipour و Mohammadi (۱۸) و نیز Razavyoon و همکاران (۲۲) نیز مورد تأکید قرار گرفته است. علت گزارش و شیوع بیشتر عوامل مخمری در خانم‌ها به ویژه خانم‌های خانه‌دار می‌تواند عوامل زمینه‌ای مثل خیس‌خوردگی ناخن‌ها در اثر تماس بیشتر ناخن‌های خانم‌ها با آب و مواد شوینده، ابتلای احتمالی به واژنیت و همچنین توجه بیشتر خانم‌ها به جنبه‌های زیبایی ناخن‌ها نسبت به مردها باشد که مراجعه‌ی آنها به مراکز تشخیصی و درمانی را سبب می‌شود. در مطالعه‌ی حاضر، دو بیمار زیر ۱۰ سال به کاندیدیازیس ناخن مبتلا بودند که یک مورد علت آن ناشی از خیس‌خوردگی ناخن‌های دست به دلیل مکیدن انگشت و مورد دیگر به دلیل نقص ایمنی که سبب ابتلا به کاندیدیازیس در ناخن‌های 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 دست 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 می‌دهد اما همانطور که در مطالعه‌ی حاضر و نتایج مطالعات ذکر شده مشاهده می شود شیوع آن در سنین بالاتر بیشتر می‌باشد. که احتمالاً می‌تواند ناشی از ابتلا به دیابت، نقص سیستم ایمنی و ضعف در گردش خون باشد.

در مطالعه‌ی حاضر، فراوان‌ترین گونه‌ی کاندیدایی جدا شده *کاندیدا پاراپسیلوزیس* با ۲۳ مورد (۴۵/۱ درصد) بود و پس از آن به ترتیب گونه‌های *آلبیکنس* 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 (۲درصد) را شامل شدند.

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

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

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر و سایر مطالعات مورد اشاره گونه‌های غیر آلبیکنس کاندیدا (Non Alibicans Candida- NAC) نقش بیشتری در ایجاد عفونت‌های ناخن داشته‌اند که این مسأله توجه به اهمیت گونه‌های غیر آلبیکنس در ایجاد عفونت‌های کاندیدایی را

مضـــاعف می‌نماید. به طور کلی گونه‌های کاندیدا، شـــایع‌ترین علت عفونت‌های قارچی در ســراســر جهان می‌باشـند. این عوامل ســومین علت غالب عفونت‌های مرتبط با مراقبت‌های بهداشـــتی به حســـاب می‌آیند. اگرچه *کاندیدا آلبیکنس* عامل اصـــلی کاندیدیازیس اســـت. با این حال، افزایش گونه‌های غیر آلبیکنس کاندیدا به طور قابل توجهی در طول دو دهه‌ی گذشته مشاهده شده است که این افزایش هم در عفونت‌های کاندیدایی ناخن و هم در ســـایر عفونت‌های کاندیدایی مشهود بوده است. اکثر عفونت‌های NAC توسط گونه‌های گلابراتا، تروپیکالیس، پاراپسیلوزیس، گیلرموندی، دابلینسیس و کروزه‌ای ایجاد می‌شـــوند. تعداد فزاینده‌ی گونه‌های غیر آلبیکنس کاندیدا می‌تواند به علت مواجهه‌ی قبلی با داروهای آزولی و پلی‌ان، بهبود روش های تشخیصی آزمایشگاهی، استفاده از کاتترهای طولانی‌مدت، بدخیمی‌ها، تعداد روزافزون بیماران دچار نقص ایمنی و استفاده‌ی طولانی‌مدت از داروهای سرکوب‌کننده‌ی ایمنی باشد. اعتقاد بر این است که افزایش اســـتفاده از داروهای آزولی در کلینیک‌های درمانی ممکن اســـت با افزایش گونه‌های غیر آلبیکنس کاندیدا مرتبط باشد. رشد این گونه‌های مقاوم به داروهای ضـــد قارچی مانند اکینوکاندین‌ها و فلوکونازول در بیماران مبتلا به عفونت های کاندیدایی، نگرانی هایی را ایجاد کرده است. مقاومت به آزول‌ها در *کاندیدا آلبیکنس* کم می‌باشد (کمتر از ۵ درصـــد) اما این میزان در *کاندیدا پاراپســـیلوزیس* ۱۰-۴ درصـــد و در کاندیدا گلابراتا ۱۶-۴ درصـــد و در برخی مطالعات به میزان بســـیار بیشتری گزارش شده است (۲۵-۲۷).

در برخی مطالعات انجام شده، *کاندیدا آلبیکنس* به عنوان شایع‌ترین مخمر عامل اونیکومایکوزیس گزارش شده است. در بررسی‌های Zaini و همکـاران در تهران (۲۰)، Chadeganipour و Mohammadi در اصفهان (۱۸) و Otašević و همکاران در صربستان (۲۸) با استفاده از روش‌های مورفولوژیک و بیوشـــیمیایی *کاندیدا آلبیکنس* به ترتیب با ۱۶/۷، ۳۴/۹ و ۳۶/۵ درصـــد بیشـــترین فراوانی را داشـــت. علت این مغایرت می‌تواند تفاوت در روش‌های مورد استفاده در شناسایی عوامل ایجادکننده‌ی اونیکومایکوزیس و همچنین شـــرایط مختلف زیســـتی و اقتصادی- اجتماعی در بیماران باشد. روش‌های مولکولی برای شناسایی قارچ‌های عامل اونیکومایکوزیس اغلب بر درماتوفیت‌ها و کپک‌های غیردرماتوفیتی متمرکز بوده اســـت و در این رابطه تحقیقات مختلفی به چشـــم می‌خورد (۲۹، ۳۰)، اما در مورد شـــناســـایی عوامل مخمری اونیکومایکوزیس مطالعات کمتری صـــورت گرفته اســـت. از طرفی با توجه به سهم رو به افزایش گونه‌های غیر آلبیکنس در ایجاد عفونت‌های کاندیدایی ناخن و حســـاســـیت متفاوت آن‌ها به داروهای ضـــد قارچی، تعیین گونه این مخمرها ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

این نتایج نشـــان داد که اونیکومایکوزیس، یکی از عفونت‌های قارچی شـــایع در بیمارانی اســـت که از اختلالات ناخنی رنج می‌برند. در این میان گونه‌های *کاندیدا پاراپســـیلوزیس* و پس از آن *کاندیدا آلبیکنس*، بیشـــترین نقش را در ایجاد اونیکومایکوزیس کاندیدایی دارند. بنابراین شناسایی دقیق این مخمرهای بیماری‌زا از لحاظ درمان مناسب و مؤثر، اهمیت قابل توجهی دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته قارچ شناسی پزشـــکی (۹۶۰۸۴۹) می‌باشـــد که در دانشـــگاه علوم پزشـــکی مشـــهد تصـــویب شـــد و با حمایت مالی معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از زحمات این معاونت و همکاری پرسنل محترم بخش انگل شناسی و قارچ شناسی بیمارستان امام رضا (ع) مشهد تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Ghannoum M, Isham N. Fungal nail infections (onychomycosis): a never-ending story. PLoS Pathog 2014; 10(6): e1004105.
2. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. Amsterdam: Elsevier Health Sciences; 2009.
3. Zeini F, Mehbod A, Emami M. Comprehensive medical mycology [in Persian]. 6nd ed. Tehran, Iran: University of Tehran Publications; 2021. p. 151-8 .
4. Gupta AK, Venkataraman M, Talukder M. Onychomycosis in older adults: prevalence, diagnosis, and management. Drugs Aging 2022; 39: 191-8.
5. Rubin AI. Onychomycosis. JAMA Dermatol 2024; 160(6): 691 .
6. Andrés T-S, Alexandro B. Candida onychomycosis: an old problem in modern times. Curr Fungal Infect Rep 2020; 14: 209-16.
7. Shokohi T, Heidari Z, Haqhani I, Khalilian A, Aghili R, Miahi S. The study of 101 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 2009; 19(71): 33-43 .
8. Adibpour M, Kazemi A. Prevalence of onychomycosis in examined patient in the medical mycology lab of Tabriz University of Medical Sciences (1999-2000) [in Persian]. Med J Tabriz Univ Med Sci 2013; 27(2): 13-6.

9. Rafat Z, Hashemi S, Saboor-Yaraghi AA, Pouragha B, Taheriniya A, Moosavi A, et al. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology, casual agents and demographic characteristics of onychomycosis in Iran. J Mycol Med 2019; 29(3): 265-72.
10. Moursi SA, Al Baqawi RA, Alshammari MN, Al Enzi NS. Prevalence of Onychomycosis in Hail Region, Saudi Arabia. National Journal of Laboratory Medicine 2018; 7(2): 1-5.
11. Gallo L, Cinelli E, Fabbrocini G, Vastarella M. A 15-year retrospective study on the prevalence of onychomycosis in psoriatic vs non-psoriatic patients: A new European shift from dermatophytes towards yeast. Mycoses 2019; 62(8): 659-64.
12. 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) 2021; 7(8): 623.
13. 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 2019; 9(1): 3838.
14. 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 2015; 33(359): 1986-93 .
15. 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 2020; 38(577): 367-75 .
16. Criseo G, Scordino F, Romeo O. Current methods for identifying clinically important cryptic Candida species. J Microbiol Methods 2015; 111: 50-6.
17. Maskan Bermudez N, Rodríguez-Tamez G, Perez S, Tosti A. Onychomycosis: Old and New. J Fungi (Basel) 2023; 9(5): 559.
18. Chadeganipour M, Mohammadi R. Causative agents of onychomycosis: a 7-year study. J Clin Lab Anal 2016; 30(6): 1013-20.
19. Afshar P, Khodavaisy S, Kalhori S, Ghasemi M, Razavyoon T. Onychomycosis in north-East of Iran. Iran J Microbiol 2014; 6(2): 98-103.
20. Zaini F, Mahmoudi M, Mehbod A, Kordbacheh P, Safara M. Fungal nail infections in Tehran, Iran. Iran J Public Health 2009; 38(3): 46-53.
21. Aghamirian MR, Ghiasian SA. Onychomycosis in Iran: epidemiology, causative agents and clinical features. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi 2010; 51(1): 23-9.
22. Razavyoon T, Hashemi SJ, Mansouri P, Rafat Z, Saboor-Yaraghi AA, Kamali Sarvestani H, et al. The epidemiology and etiology of onychomycosis in 2 laboratory centers affiliated to Tehran University of Medical Sciences during 2019-2020. Iran J Microbiol 2022; 14(2): 268-75.
23. 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 2015; 1(4): 26-32.
24. Afsarian MH, Sharafi Z. Molecular identification of candida species isolated from onychomycosis with in vitro antifungal susceptibility profiles. Jundishapur J Microbiol 2023; 16(8): e139906
25. 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 2023; 54(4): 2879-92.
26. 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) 2023; 9(1): 11.
27. 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 identifcation of etiologic agents. BMC Res Notes 2019; 12(1): 779.
28. Otašević S, Barac A, Pekmezovic M, Tasic S, Ignjatović A, Momčilović S, et al. The prevalence of Candida onychomycosis in Southeastern Serbia from 2011 to 2015. Mycoses 2016; 59(3): 167-72.
29. Arca E, Saracli MA, Akar A, Yildiran ST, Kurumlu Z, Gur AR. Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis. European Journal of Dermatology 2004; 14(1): 52-5.
30. 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 2018; 28(1): 45-50.

DOI: *10.48305/jims.v42.i772.0510*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 42, No. 772, 4th Week, August 2024**

Received: 11.04.2024 Accepted: 04.08.2024 Published: 21.08.2024

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

Ali Naseri[1], Fatemeh Kargar[2], Abdolmajid Fata[3], Lida Jarahi[4], Mahmoud Parian Noghani[5], Asieh Fatemi Esfedan[6]

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 (24.2%) 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): 510-17.

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