مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۸۱/هفته‌ی اول تیر ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۸

شناسایی عوامل ایجاد کننده‌ی کاندیدوری به روش Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) در شهر اصفهان

محمد بهمئی[۱]، دکتر پروین دهقان[۲]، دکتر رسول محمدی[۲]، دکتر جواهر چعباوی‌زاده[۲]، دکتر بهزاد مهکی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Candidiasis منتشره، دیابت، حاملگی، مصرف بی‌رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف، عوامل مستعد کننده‌ی Candidiasis دستگاه ادراری می‌باشند. شیوع عفونت با گونه‌های غیر Candida albicans رو به افزایش است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان شیوع گونه‌های Candida مسبب کاندیدوری در شهر اصفهان با استفاده از روش Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) بود.

روش‌ها: از کشت تازه‌ی مخمری، DNA مربوط به کمک روش Fast technology for analysis-card (FTA-card) استخراج گردید. نواحی ITS1-5.8s-ITS2 به روش PCR تکثیر و سپس تحت تأثیر آنزیم MspI طی مراحل RFLP برش داده شد. محصولات در ژل آگارز الکتروفورز و بر اساس تفاوت‌های باندهای ایجاد شده، گونه‌های Candida شناسایی گردید.

یافته‌ها: از تعداد کل ۳۲۰۰ نمونه‌ی ادرار بیماران، تعداد ۸۰ نمونه شرایط ورود به مطالعه را داشتند؛ به این صورت، میزان شیوع کاندیدوری در مطالعه‌ی حاضر به میزان ۲/۵ درصد گزارش گردید. ۴ نفر (۵ درصد) از بیماران مورد مطالعه مرد و ۷۶ نفر (۹۵ درصد) زن بودند. عوامل زمینه‌ای شامل دیابت (۴۷/۵ درصد)، عفونت دستگاه ادراری (۳۸/۸ درصد)، سنگ کلیه (۵/۰ درصد) و سایر بیماری‌های زمینه‌ای (۷ نفر معادل ۸/۸ درصد) بودند. ۴۶/۳ درصد نمونه‌ها، دارای $۱۰^{۳} \times ۹۹-۱۰^{۳} \times ۵۰$ واحد کلنی در میلی‌لیتر ادرار (CFU/ml) بودند. Candida glabrata بالاترین فراوانی (۴۱/۳ درصد) را در بین انواع گونه‌ها به خود اختصاص داد.

نتیجه‌گیری: افزایش گونه‌های غیر Candida albicans و مقاومت ذاتی برخی گونه‌ها، درمان Candidiasis را با چالش‌هایی روبه‌رو کرده است. شناسایی و تعیین هویت دقیق گونه‌های Candida، به خصوص در افراد مبتلا به دیابت و با عفونت ادراری، به منظور درمان صحیح و مؤثر، امری لازم و حیاتی به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: شناسایی، کاندیدوری، Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

ارجاع: بهمئی محمد، دهقان پروین، محمدی رسول، چعباوی‌زاده جواهر، مهکی بهزاد. **شناسایی عوامل ایجاد کننده‌ی کاندیدوری به روش Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) در شهر اصفهان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۸۱): ۴۹۰-۴۸۴

مقدمه

عفونت‌های قارچی ادراری، توسط طیف گسترده‌ای از قارچ‌ها، از جمله گونه‌های Candida ایجاد می‌گردد (۲-۱). Candidiasis دستگاه ادراری به دنبال Candidiasis منتشره، دیابت، حاملگی، مصرف بی‌رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها، مشکلات دستگاه ادراری، استفاده از سوند ادراری، جراحی، مصرف داروهای سرکوب کننده‌ی ایمنی، بستری طولانی مدت در بیمارستان، وجود مثانه‌ی نوروژنیک، آنومالی‌های آناتومیک و بدخیمی ایجاد می‌شود (۳). وجود گونه‌های Candida در ادرار، می‌تواند از یک نشانه‌ی کلونیزاسیون خوش‌خیم ناحیه‌ی پرینه، مثانه و یا به دنبال سوند ادراری متمرکز تا علایمی همانند التهاب مثانه (Cystitis)، پیلونفریت (Pyelonephritis)، ایجاد توپ قارچی (Fungus ball) و یا به صورت انتشار در خون

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استادیار، گروه آمار زیستی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر پروین دهقان
Email: dehghan@med.mui.ac.ir

(Candidemia) ناشی از Candidiasis مهاجم به پارانشیم کلیه باشد (۴).

از طرفی، اغلب مبتلایان به کاندیدوری، هیچ نشانه‌ای از عفونت دستگاه ادراری ندارند. با توجه به این که گونه‌های Candida به صورت ساپروفیت ساکن پوست و نواحی پرینه هستند و ۶۵-۱۰ درصد از نواحی تناسلی خانم‌ها با Candida کلونیزه شده است و از آن جایی که این بیماری اغلب فاقد علایم بالینی است، افتراق عفونت حقیقی از آلودگی در حین جمع‌آوری نمونه بسیار حایز اهمیت می‌باشد و با جدا کردن مکرر Candida از کشت ثابت می‌گردد. در این موارد، بهترین کار، آموزش نحوه‌ی صحیح جمع‌آوری نمونه (Clean catch midstream) به بیمار و تکرار آزمایش ادرار است (۵).

شمارش کلنی، اهمیت زیادی دارد و در صورت مشاهده‌ی بیشتر از 10^3 کلنی در کشت ۱ میلی‌لیتر ادرار، احتمال می‌رود یک عفونت حاد وجود داشته باشد، اما به طور کلی، میزان کلنی در میلی‌لیتر ادرار در مطالعات مختلف متفاوت گزارش شده است و هیچ دستورالعمل مشخصی در کاندیدوری برای تشخیص و تمایز کلونیزاسیون از عفونت واقعی وجود ندارد (۶). همه‌ی گونه‌های Candida قادر به ایجاد عفونت ادراری هستند؛ اگر چه ۶۰-۵۰ درصد موارد آن به وسیله‌ی گونه‌ی Candida albicans ایجاد می‌شود (۷)؛ اما شیوع عفونت با گونه‌های غیر Candida albicans در سال‌های اخیر، رو به افزایش گذاشته است (۸).

جایگزین شدن گونه‌های غیر Candida albicans از قبیل Candida glabrata، Candida krusei، Candida parapsilosis و Candida tropicalis در عفونت‌های قارچی از جمله کاندیدوری از یک طرف، مقاومت ذاتی برخی گونه‌ها مثل Candida krusei و برخی ایزوله‌های Candida glabrata به داروهای آزولی و مقاومت به آمفوتریسین B در گونه‌های Candida parapsilosis و Candida tropicalis، سبب افزایش قابلیت عفونت در بافت‌های مختلف و امکان بروز بیماری‌های سیستمیک و کشنده شده است (۱۱-۹). شناسایی و تعیین هویت دقیق گونه‌ها، چه به لحاظ اپیدمیولوژیک و چه به لحاظ درمان صحیح و مؤثر و جلوگیری از ایجاد مقاومت‌های دارویی ثانویه، لازم و حیاتی به نظر می‌رسد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان شیوع گونه‌های Candida مسبب کاندیدوری در شهر اصفهان به کمک روش Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) بود.

روش‌ها

بین سال‌های ۹۴-۱۳۹۳، تعداد ۳۲۰۰ نمونه‌ی ادرار از نظر وجود عفونت قارچی Candida مورد بررسی آزمایش مستقیم و کشت قرار گرفت و نمونه‌هایی با تعداد بیش از 10^4 واحد کلنی در میلی‌لیتر ادرار (CFU/ml) جداسازی و در مطالعه‌ی حاضر وارد گردید. نمونه‌ی ادرار در شرایط استریل توسط بیمار از بخش میانی ادرار گرفته شد تا اطمینان حاصل شود که هیچ گونه آلودگی میکروبی وارد نمونه نشده باشد. میزان ۱۰ میکرولیتر ادرار در کنار شعله در محیط سابورو دکستروز آگار (Sabouraud dextrose agar) حاوی کلرامفنیکل (SC) کشت داده شد و سپس در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت نگهداری گردید. پس از رشد، تعداد کلنی مخمر در هر میلی‌لیتر ادرار شمارش و محاسبه شد. کلیه‌ی ایزوله‌ها به کمک تکنیک مولکولی PCR-RFLP و با استفاده از آنزیم اختصاصی MspI شناسایی گردیدند.

استخراج DNA: با توجه به این که FTA-card روش حساس و سریع برای استخراج DNA محسوب می‌شود، در مطالعه‌ی حاضر، از این سیستم برای استخراج DNA استفاده شد (۱۲). برای این کار، یک کلنی از مخمر رشد کرده، به ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل به کاغذهای ویژه‌ی FTA که به قطعاتی به قطر ۲ میلی‌متر پانچ شده بود، اضافه و گذاشته شد به مدت ۴-۳ ساعت در دمای اتاق خشک شود. یکی از این قطعات در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به مدت چند ثانیه غوطه‌ور و سپس به میکروتیوب دیگری که حاوی ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل بود، انتقال داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در دستگاه Thermal cycler انکوبه گردید. تیوب مورد نظر، به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی به عنوان DNA الگو در PCR استفاده گردید.

PCR: از این روش، برای تکثیر قسمتی از DNA ریبوزومال (rDNA یا Ribosomal DNA) به نام ITS1-5.8S-ITS4 استفاده شد. مخلوط اصلی PCR (Master mix) شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X بدون منیزیم، ۱/۵ میکرومولار $MgCl_2$، ۰/۲ میکرومولار پرایمر رفت (ITS1: (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´)، ۰/۲ میکرومولار پرایمر برگشت (ITS4: (5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´)، ۴۰۰ میکرومولار مخلوط دزوکسی نوکلئوزید تری‌فسفات (dNTP یا Deoxynucleoside triphosphate) و ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با آب مقطر تهیه شد. سپس، به هر تیوب PCR، ۲۳ میکرولیتر از مخلوط پیش‌گفته و ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده از هر قارچ اضافه و تیوب‌ها در دستگاه Thermal cycler قرار داده شد و مراحل PCR شامل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور جدا شدن دو رشته‌ی DNA (DNA denaturation)، ۳۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در

دمـای ۹۴ درجـه‌ی سـانتی‌گـراد، ۴۵ ثانیـه در دمـای ۶۰ درجـه‌ی سانتی‌گراد به منظـور اتصـال پرایمرهـا (Annealing) و ۴۵ ثانیـه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (Extension) و در نهایـت، ۵ دقیقـه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (Final extension) برای طویـل شـدن پرایمرها برنامه‌ریزی و انجام گردید.

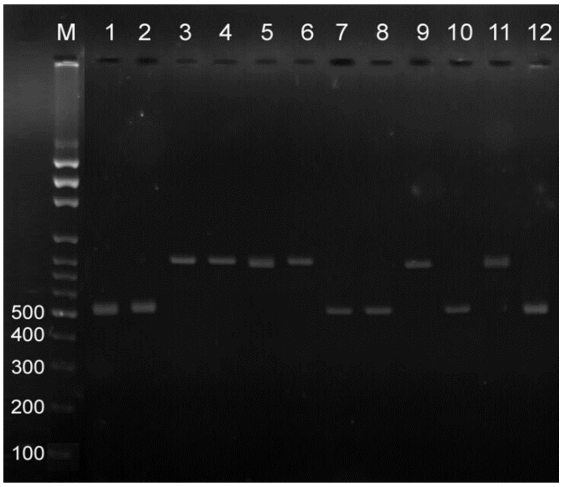
RFLP: ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR هر کدام از نمونه‌های بالینی، در واکـنش بـا ۳ میکرولیتـر آب مقطـر، ۱/۵ میکرولیتـر بـافر و ۰/۵ واحد آنزیم MspI (Fast digest, Fermentas, Lithuania) در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر به مـدت ۲۰ دقیقـه در دمـای ۳۷ درجـه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید.

الکتروفـورز: ۵ میکرولیتـر از DNA تکثیـر شـده در ژل آگـارز ۱/۵ درصد (برای محصولات PCR) و ۷ میکرولیتـر از DNA هضـم شده با آنزیم MspI در ژل آگارز ۲ درصد (برای محصولات RFLP) در تانک الکتروفـورز بارگـذاری شـد. پـس از رنـگ‌آمیـزی بانـدهای DNA با محلول Safe green، با اسـتفاده از اشـعه‌ی مـاورای بـنفش (UV یا Ultraviolet) مشاهده و عکس‌برداری گردید (۱۳)..

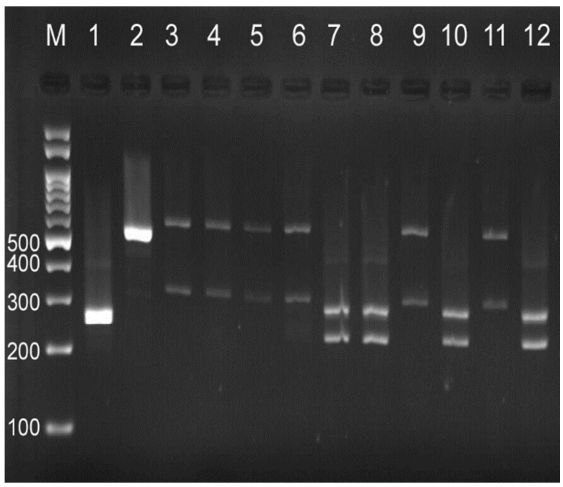
یافته‌ها

از تعداد کل ۳۲۰۰ نمونـه‌ی ادرار، تعـداد ۸۰ نمونـه شـرایط ورود بـه مطالعه را داشتند؛ به این صورت، میزان شیوع کاندیدوری در مطالعه‌ی حاضر بـه میـزان ۲/۵ درصـد گـزارش گردیـد. در آزمـایش مسـتقیم نمونـه‌هـا، وجـود سـلول‌هـای مخمـری و یـا پسـودوهایف (Pseudohyphae) و بلاسـتوکونیدی (Blastoconidia) محـرز گردیـد. همچنـین، فراوانـی سـلول‌هـای مخمـری و یـا مشـاهده‌ی پسودوهایف و بلاستوکونیدی در لام مستقیم نمونه‌ها با مقـادیر کلنـی شمارش شده در کشت هر نمونه، همخوانی داشت. ۴ نفر (۵ درصـد) از بیماران مورد مطالعه مرد و ۷۶ نفـر (۹۵ درصـد) زن بودنـد. محـدوده‌ی سـنی افـراد مبـتلا، بـین ۸۶-۱۴ سـال بـود کـه گـروه سـنی ۷۰-۶۱ سال با ۲۲ مورد (۲۷/۵ درصد) بالاترین میزان آلودگی را داشتند.

همچنین، ۳۸ نفر (۴۷/۵ درصد) از بیماران مبتلا به دیابت، ۳۱ نفر (۳۸/۸ درصد) مبـتلا بـه عفونـت ادراری، ۴ نفـر (۵/۰ درصـد) دارای سابقه‌ی سنگ کلیه و ۷ نفر (۸/۸ درصد) نیز مبتلا به سایر بیماری‌های زمینه‌ای بودنـد. از ۳۸ مـورد افـراد مبـتلا بـه دیابـت، تعـداد ۳۶ نفـر (۹۴/۷ درصد) دارای گلوکزوری با بیش از ۱۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر گلوکز در ادرار بودند. شمارش کلنی در ۶ مورد (۷/۵ درصد) کمتر از $۱۰^۴$، ۱۹ مـورد (۲۳/۸ درصـد) $۱۰^۳ \times ۴۹-۱۰^۴ \times ۱$، ۳۷ مـورد (۴۶/۳ درصد) $۱۰^۳ \times ۹۹-۱۰^۳ \times ۵۰$ و در ۱۸ مورد (۲۲/۵ درصـد) بـالاتر از $۱۰^۵$ واحد کلنی در میلی‌لیتر ادرار به دست آمد. شـکل ۱، مراحـل PCR بر روی DNA استخراج شده از نمونه‌هـای بـالینی مـورد نظـر، بـه کمـک پرایمرهای یونیورسال ITS1 و ITS4 و شکل ۲، برش محصـولات PCR توسط آنزیم محدودالاثر MspI طی مراحل RFLP را نشان می‌دهد.



شکل ۱. محصول Polymerase chain reaction (PCR) ۱۲گونه‌ی Candida مورد مطالعه به ترتیب از چپ به راست: M: نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (bp)، ۱: Candida krusei، ۲: Candida parapsilosis، ۳-۶: Candida glabrata، ۷-۸: Candida albicans، ۹: Candida glabrata، ۱۰: Candida albicans، ۱۱: Candida glabrata و ۱۲: Candida albicans تشخیص داده شد.



شکل ۲. محصول Polymerase chain reaction (PCR) بعد از تأثیر آنزیم محدودالاثر MspI به ترتیب از چپ به راست: M: نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (bp)، ۱: Candida krusei، ۲: Candida parapsilosis ، ۳-۶: Candida glabrata، ۷-۸: Candida albicans، ۹: Candida glabrata، ۱۰: Candida albicans، ۱۱: Candida glabrata و ۱۲: Candida albicans

Candida glabrata گونه‌ی غالب Candida جدا شده از نمونه‌های بالینی بود که از ۳۳ مورد (۴۱/۳ درصد) جدا گردید. پس از آن Candida albicans ۲۸ مورد (۳۵ درصد)، Candida krusei ۸ مورد (۱۰ درصد)، Candida parapsilosis ۵ مورد (۶/۳ درصد)، Candida kefyr ۵ مورد (۶/۳ درصد) و Candida tropicalis ۱ مورد (۱/۲ درصد) جدا شد.

بحث

میزان شیوع عفونت در این مطالعه ۲/۵ درصد تعیین شد که نزدیک به میزان شیوع به دست آمده در مطالعه‌ی Yashavanth و همکاران است (۶). شیوع آلودگی در مطالعه‌ی نادمی و همکاران به میزان ۴/۳ درصد (۱۴)، در مطالعه‌ی سیفی و همکاران ۵/۲ درصد (۲)، در مطالعه‌ی فراست و همکاران ۱۶ درصد (۱۵) و در مطالعه‌ی زارعی محمودآبادی و همکاران ۱۶/۵ درصد (۱۶) گزارش شد که این اختلاف در میزان شیوع در مطالعات مختلف، به عواملی مثل شرایط اقلیمی، جمعیت مورد مطالعه و شرایط بهداشتی و اقتصادی بستگی دارد (۱۷). ۷۶ نفر (۹۵ درصد) افراد دچار عفونت در این مطالعه، زن و ۴۷/۵ درصد افراد نیز مبتلا به بیماری زمینه‌ای دیابت بودند. دیابت، شایع‌ترین عامل زمینه‌ای در کاندیدوری تلقی می‌شود. در زنان مبتلا به دیابت، به عللی مانند کاهش مقاومت میزبان به تهاجم گونه‌های قارچی به دلیل کاهش سطح ایمنی بدن به خاطر اختلال در فعالیت فاگوسیتوز، کوتاه‌تر بودن مجرای ادراری، کلونیزه شدن دستگاه تناسلی به علت وجود گلوکزوری و استاز در مثانه‌ی نوروژنیک (۱۸، ۱) شرایط کاندیدوری بیشتر فراهم می‌شود. تظاهرات بالینی کاندیدوری در افراد مبتلا به دیابت، می‌تواند شامل گرفتاری دستگاه ادراری تحتانی، التهاب مثانه، پیلونفریت و آبسه‌ی کلیوی باشد (۳).

Safdar و همکاران، اپیدمیولوژی کاندیدوری را در طول یک دوره‌ی ۸ ساله مورد بررسی قرار دادند. شایع‌ترین پاتوژن (۵۱ درصد) در این دسته از بیماران، مربوط به گونه‌ی Candida glabrata بوده است. اغلب بیماران، بدون علامت بودند. عوامل خطر در بین آنان شامل جنس مؤنث با نسبت شانس ۱۲/۵ و دیابت با نسبت شانس ۲/۲ برابر تعیین گردید (۱۹).

در مطالعه‌ی زینی و همکاران در ۲۰۱ نمونه از ادرار بیماران دارای زمینه‌های دیابت ملیتوس، لوسمی، بیماری‌های دستگاه ادراری و بیماری‌های عفونی، در مجموع ۲۱ مورد عفونت قارچی ادراری تشخیص داده شد. در این بررسی، دیابت مستعد کننده‌ترین بیماری زمینه‌ای و Candida glabrata بیشترین میزان بیماری‌زایی را به خود اختصاص دادند (۲۰).

Manzano-Gayosso و همکاران، عوامل ایجاد کننده‌ی کاندیدوری را در افراد مبتلا به دیابت شناسایی و بررسی کردند. گونه‌ی غالب، Candida glabrata (۴۸ درصد) و بعد از آن Candida albicans (۳۵ درصد) تعیین گردید (۲۱). این بررسی، با مطالعه‌ی حاضر از نظر میزان فراوانی Candida albicans در ادرار نیز همخوانی دارد. Candida glabrata، یک پاتوژن با طیف گسترده‌ی عفونت در دستگاه ادراری می‌باشد (۲۲) که در مطالعه‌ی حاضر، عامل ۴۱/۳ درصد موارد کاندیدوری در افراد تشخیص داده شد و با دیگر مطالعات انجام شده نیز همخوانی دارد (۲۰-۱۸).

برخی از محققان، تعداد 10^3 کلنی در میلی‌لیتر ادرار را دلیل عفونت دستگاه ادراری قارچی در افراد فاقد سوند می‌دانند. همچنین، برخی تحقیقات، تعداد 10^4 کلنی را در بیماران دارای سوند ادراری، عفونت تلقی می‌کنند. در حالی که کلونیزاسیون بین 10^5-10^4 گزارش می‌شود، در Candidiasis کلیوی، تعداد ۱۰۰۰ کلنی نیز گزارش شده است. شمارش کلنی ادرار در جدا کردن عفونت از کلونیزاسیون ارزش محدودی دارد و فقط در غیاب سوند ادراری می‌تواند ارزشمند باشد. در بیمارانی که فاقد سوند هستند، بعضی حضور صرف گونه‌های Candida در ادرار را بدون توجه به تعداد، به عنوان عفونت واقعی تلقی می‌کنند.

بنا بر این، بر خلاف شمارش کلنی باکتری‌ها، تفسیر عفونت ادراری قارچی در افراد به سایر عوامل بالینی دیگر مرتبط است و کشت به تنهایی تعیین کننده‌ی نهایی در تصمیم‌گیری درمانی نمی‌باشد (۲۳). زارعی محمودآبادی و همکاران در ۳۴/۱ درصد موارد شمارش کلنی، تعداد بیش از 10^3 کلنی در میلی‌لیتر ادرار را گزارش کردند (۱۶).

همچنین، سیفی و همکاران در ۵۷/۲ درصد موارد شمارش کلنی، ۶۰۰-۱۰۰ کلنی در میلی‌لیتر ادرار، در ۲۸/۵ درصد موارد 10^3-۶۰۰ کلنی در میلی‌لیتر ادرار و در ۱۴/۳ درصد موارد، تعداد بالاتر از 10^3 کلنی در میلی‌لیتر ادرار را گزارش کردند (۲). مهم‌ترین چالش در مواجهه با کاندیدوری، افزایش ضایعات ناشی از گونه‌های غیر از Candida albicans است، که به علت مقاومت دارویی آن‌ها به داروهای متداول ضد قارچی می‌باشد (۲۴). این موضوع، باعث افزایش وفور نسبی این گونه‌ها می‌گردد. در مطالعه‌ی حاضر، ۶۵ درصد موارد تشخیص داده شده، مربوط به گونه‌های غیر Candida albicans است که با دیگر مطالعات نیز همخوانی دارد (۱۶-۱۵، ۶).

ضمن این که مقاومت دارویی این گونه‌ها در سال‌های اخیر، رو به افزایش بوده است و این در حالی است که الگوی حساسیت دارویی گونه‌ها در مناطق جغرافیایی مختلف، متفاوت می‌باشد (۲۵، ۱۶). همین موضوع، اهمیت پی‌گیری و مطالعات مستمر اپیدمیولوژیک را در هر منطقه نشان می‌دهد. به عنوان مثال، Candida tropicalis از عوامل مهم در ایجاد Candidiasis مهاجم

می‌باشد (۲۶). در حالی که Candida parapsilosis یک عامل شایع کاندیدمی در بزرگسالان و نوزادان است و کمتر از ادرار بزرگسالان جدا می‌شود (۲۷).

گونه‌های فرصت‌طلب که در شرایط غیر طبیعی بیمار مانند نقص سیستم ایمنی ثانویه و ابتلا به بیماری‌های زمینه‌ای رشد و توسعه پیدا می‌کنند، به طور معمول، در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های معمول از خود مقاومت نشان می‌دهند و در چنین شرایطی، لازم است با روش‌های اختصاصی نسبت به شناسایی گونه‌های پیش‌گفته اقدام شود. ضمن این که، تعیین فراوانی گونه‌ها از نقطه نظر اپیدمیولوژیک و کنترل عفونت‌ها به خصوص در عفونت‌های بیمارستانی ناشی از انواع Candida حایز اهمیت می‌باشد.

نتیجه‌گیری نهایی این که در مطالعه‌ی حاضر، دیابت و عفونت ادراری در مجموع به میزان ۸۶/۳ درصد، مهم‌ترین عوامل مستعد کننده جهت کاندیدوری تشخیص داده شد. با توجه به این که گونه‌های غیر Candida albicans افزایش یافته و ایجاد مقاومت ذاتی برخی گونه‌ها درمان Candidiasis ادراری را با چالش‌هایی روبرو کرده است؛ لازم است متخصصین بالینی به شناسایی و تعیین هویت دقیق گونه‌های Candida به منظور درمان صحیح و مؤثر توجه بیشتری معطوف دارند

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد محمد بهمئی به شماره‌ی طرح تحقیقاتی به شماره‌ی ۳۹۴۰۶۵ مصوب دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. از کلیه‌ی پرسنل محترم گروه قارچ‌شناسی و مدیریت و کارکنان مؤسسه‌ی ملی تحقیقات که صمیمانه و با صبر و حوصله ما را یاری رساندند، سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Lundstrom T, Sobel J. Nosocomial candiduria: a review. Clin Infect Dis 2001; 32(11): 1602-7.
2. Seifi Z, Azish M, Salehi Z, Zarei MA, Shamsizadeh A. Candiduria in children and susceptibility patterns of recovered Candida species to antifungal drugs in Ahvaz. J Nephropathol 2013; 2(2): 122-8.
3. Bukhary ZA. Candiduria: a review of clinical significance and management. Saudi J Kidney Dis Transpl 2008; 19(3): 350-60.
4. Singla N, Gulati N, Kaistha N, Chander J. Candida colonization in urine samples of ICU patients: determination of etiology, antifungal susceptibility testing and evaluation of associated risk factors. Mycopathologia 2012; 174(2): 149-55.
5. Goldberg PK, Kozinn PJ, Wise GJ, Nouri N, Brooks RB. Incidence and significance of candiduria. JAMA 1979; 241(6): 582-4.
6. Yashavanth R, Shiju MP, Bhaskar UA, Ronald R, Anita KB. Candiduria: prevalence and trends in antifungal susceptibility in a tertiary care hospital of mangalore. J Clin Diagn Res 2013; 7(11): 2459-61.
7. Padawer D, Pastukh N, Nitzan O, Labay K, Aharon I, Brodsky D, et al. Catheter-associated candiduria: Risk factors, medical interventions, and antifungal susceptibility. Am J Infect Control 2015; 43(7): e19-e22.
8. Goetz LL, Howard M, Cipher D, Revankar SG. Occurrence of candiduria in a population of chronically catheterized patients with spinal cord injury. Spinal Cord 2010; 48(1): 51-4.
9. Yang YL, Li SY, Cheng HH, Lo HJ. The trend of susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of Candida species from 1999 to 2002 in Taiwan. BMC Infect Dis 2005; 5: 99.
10. Fisher JF, Sobel JD, Kauffman CA, Newman CA. Candida urinary tract infections--treatment. Clin Infect Dis 2011; 52 Suppl 6: S457-S466.
11. Fraisse T, Crouzet J, Lachaud L, Durand A, Charachon S, Lavigne JP, et al. Candiduria in those over 85 years old: a retrospective study of 73 patients. Intern Med 2011; 50(18): 1935-40.
12. Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, Campbell CK, Johnson EM. Ultra-rapid preparation of total genomic DNA from isolates of yeast and mould using Whatman FTA filter paper technology - a reusable DNA archiving system. Med Mycol 2006; 44(5): 389-98.
13. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important Candida species. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi 2006; 47(3): 225-9.
14. Nademi A, Shahrokh H, Kordbacheh P, Zaini F, Rezaie S, Mahmoudi M, et al. Identification and antifungal susceptibility pattern of Candida species isolated from patients with nosocomial candiduria. Journal of Mycology Research 2015; 2(2): 77-84.
15. Farasat A, Ghahri M, Mirhendi H, Beiraghi S. Identification of candida species screened from catheter using patients with PCR-RFLP method. Eur J Exp Biol 2012; 2(3): 651-6.
16. Zarei-Mahmoudabadi A, Zarrin M, Ghanatir F, Vazirianzadeh B. Candiduria in hospitalized patients in teaching hospitals of Ahvaz. Iran J Microbiol 2012; 4(4): 198-203.
17. Behzadi P, Behzadi E, Ranjbar R. Urinary tract infections and Candida albicans. Cent European J Urol 2015; 68(1): 96-101.
18. Guler S, Ural O, Findik D, Arslan U. Risk factors for nosocomial candiduria. Saudi Med J 2006; 27(11): 1706-10.
19. Safdar N, Slattery WR, Knasinski V, Gangnon RE, Li Z, Pirsch JD, et al. Predictors and outcomes of candiduria in renal transplant recipients. Clin Infect Dis 2005; 40(10): 1413-21.
20. Zaini F, Azordegan F, Chabavizadeh J. Study of fungal infection in urine. Iran J Public Health 1993; 22(1-4): 13-31.

21. Manzano-Gayosso P, Hernandez-Hernandez F, Zavala-Velasquez N, Mendez-Tovar LJ, Naquid-Narvaez JM, Torres-Rodriguez JM, et al. Candiduria in type 2 diabetes mellitus patients and its clinical significance. Candida spp. antifungal susceptibility. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2008; 46(6): 603-10. [In Spanish].
22. Fidel PL, Jr., Vazquez JA, Sobel JD. Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to C. albicans. Clin Microbiol Rev 1999; 12(1): 80-96.
23. Kauffman CA. Candiduria. Clin Infect Dis 2005; 41(Suppl 6): S371-S376.
24. Cirak MY, Kalkanci A, Kustimur S. Use of molecular methods in identification of Candida species and evaluation of fluconazole resistance. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98(8): 1027-32.
25. Capoor MR, Nair D, Deb M, Verma PK, Srivastava L, Aggarwal P. Emergence of non-albicans Candida species and antifungal resistance in a tertiary care hospital. Jpn J Infect Dis 2005; 58(6): 344-8.
26. Mohammadi R, Mirhendi H, Hossein Yadegari MH, Shadzi S, 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(133): 336-43. [In Persian].
27. Achkar JM, Fries BC. Candida infections of the genitourinary tract. Clin Microbiol Rev 2010; 23(2): 253-73.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 10.03.2016
Vol. 34, No. 381, 1st Week, July 2016
Accepted: 28.05.2016

Identification of Candida Species Isolated from Candiduria Patients Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism in Isfahan, Iran

Mohammad Bahmaei[1], Parvin Dehghan[2], Rasoul Mohammadi[2], Javaher Chabavizadeh[2], Behzad Mahaki[3]

Original Article

Abstract

Background: Disseminated candidiasis, diabetes mellitus, pregnancy, and consumption of widespread antibiotics are predisposing factors of urinary tract infections due to Candida species. The prevalence of non-albicans species is increasing. The aim of the present study is to identify Candida spp. isolated from candiduria patients in Isfahan, Iran using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method.

Methods: The genomic DNA was extracted by fast technology for analysis-card (FTA-card). Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify ITS1-5.8s-ITS2 region then PCR products were digested with MspI restriction enzyme. PCR and RFLP products were revealed on 1.5 and 2% agarose gel electrophoresis, respectively.

Findings: Out of 3200 urine samples 80 samples with more than 10^4 CFU/ml were involved in this study. Patients including 4 (5%) were males and 76 patients (95%) were females. Predisposing factors were diabetes (47.5%), urinary tract infection (38.8%) and kidney stone (5.0%). The colony count of 46.3% of the urine samples were with 50×10^3-99×10^3 CFU/ml. Candida glabrata was the most prevalent species among isolates (41.3%).

Conclusion: Increasing of non-albicans Candida species and drug resistance of isolates are main challenges of Candida infection treatment particularly in patients with diabetes and urinary infections. Identification of Candida species is inevitable for better management of infection.

Keywords: Identification, Candiduria, Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

Citation: Bahmaei M, Dehghan P, Mohammadi R, Chabavizadeh J, Mahaki B. **Identification of Candida Species Isolated from Candiduria Patients Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism in Isfahan, Iran.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(381): 484-90.

1- MSc Student, Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Assistant Professor, Department of Biostatistics, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan Iran
Corresponding Author: Parvin Dehghan, Email: dehghan@med.mui.ac.ir