مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۵۹/هفته سوم دی ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۹/۱۷

شناسایی مولکولی گونه‌های Candida در بیماران مبتلا به Candidiasis در بیرجند با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و برش آنزیمی

تکتم بخشی[۱]، دکتر سمیرا سالاری[۲]، دکتر علی ناصری[۳]، دکتر ایرج اسفندیارپور[۴]، محمد علی محمدی[۵]، پویا قاسمی‌نژاد آلمانی[۶]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر، بروز عفونت‌های فرصت طلب قارچی مانند Candidiasis به خصوص در بیماران دچار نقص ایمنی، به طور قابل توجهی افزایش یافته است. شناسایی سریع و دقیق ایزوله‌های Candida جهت درمان‌های ضد قارچی و مدیریت عفونت‌های بیمارستانی مؤثر است. هدف از این مطالعه، شناسایی مولکولی گونه‌های Candida در بیماران مبتلا به Candidiasis در بیماران بستری در بیمارستان ولی‌عصر (عج) بیرجند بود.

روش‌ها: ۹۸ جدایه‌ی Candida از ۹۰ بیمار مبتلا به Candidiasis در طول دوره‌ی یک ساله، از آذر ۱۳۹۲ تا آذر ۱۳۹۳ به دست آمد. این جدایه‌ها در محیط کشت Sabouraud Dextrose Agar حاوی کلرامفنیکل در دمای ۳۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مشدت ۴۸ ساعت و روی محیط CHROMagar، Candida در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت برای تولید رنگ خاص هر گونه کشت داده شد. سپس، شناسایی گونه‌های Candida با استفاده از روش PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) با آنزیم‌های محدودالاثر Msp I انجام شد.

یافته‌ها: در مجموع، ۹۸ جدایه‌ی Candida از نمونه‌های بالینی مختلف جدا و با روش PCR-RFLP با استفاده از Msp I تعیین گونه شدند. گروه سنی نوزادی تا ۱۰ سال، بیشترین فراوانی ابتلا به Candidiasis را داشتند. در بین نمونه‌های بالینی، بیشترین جدایه‌های Candida از ادرار جدا شد (۸۳/۸۶ درصد). شایع‌ترین جدایه‌ها شامل Candida albicans ۴۱ مورد (۴۱/۸۴ درصد) و پس از آن Candida glabrata ۱۶ مورد (۱۶/۳۲ درصد)، Candida tropicalis ۱۲ مورد (۱۲/۲۴ درصد)، Candida krusei ۱۰ مورد (۱۰/۲۰ درصد)، Candida parapsilosis ۸ مورد (۸/۱۶ درصد)، Candida lusitaniae ۷ مورد (۷/۱۴ درصد)، Candida guilliermondii و Candida kefir هر کدام ۲ مورد (۲/۰۴ درصد) بودند.

نتیجه‌گیری: استفاده از روش PCR-RFLP با آنزیم‌های محدودالاثر Msp I روشی آسان، سریع و قابل اعتماد برای شناسایی گونه‌های Candida است.

واژگان کلیدی: گونه‌های Candida، Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)، Msp I

ارجاع: بخشی تکتم، سالاری سمیرا، ناصری علی، اسفندیارپور ایرج، محمدی محمد علی، قاسمی‌نژاد آلمانی پویا. **شناسایی مولکولی گونه‌های Candida در بیماران مبتلا به Candidiasis در بیرجند با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و برش آنزیمی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۹): ۱۹۹۳-۱۹۸۶

مقدمه

Candidiasis، طیفی از بیماری‌های قارچی فرصت طلب است که در افراد مستعد به شکل عفونت‌های سطحی ساده تا عفونت‌های سیستمیک ایجاد می‌شود (۱). این عفونت به صورت حاد، تحت حاد و مزمن در پوست، ناخن، مخاط دهان، واژن، برنش، ریه و دستگاه گوارش ظاهر می‌گردد و در فرم سیستمیک، سایر اعضای بدن از قبیل کلیه، کبد، قلب و سایر قسمت‌های بدن را درگیر می‌سازد (۲). به طور عمده، گونه‌های بیماری‌زا شامل Candida albicans،

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۲- استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۳- استادیار، گروه قارچ‌شناسی و انگل‌شناسی پزشکی، بیمارستان قائم (عج)، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۴- استاد، گروه بیماری‌های پوست، مرکز تحقیقات لیشمانیوز، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۵- مربی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۶- دانشجوی دکتری، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سمیرا سالاری
Email: sa_salari@kmu.ac.ir

Candida dubliniensis، Candida famata، Candida glabrata، Candida guilliermondii، Candida kefir، Candida krusei، Candida lusitaniae، Candida parapsilosis و Candida tropicalis می‌باشند (۳). عوامل زمینه‌ساز جهت ابتلا شامل سرطان، لوسمی، جراحی، دیابت ملیتوس، درمان‌های طولانی مدت با آنتی‌بیوتیک‌ها، کورتیکو استروئیدها، داروهای سرکوب کننده‌ی ایمنی، ابتلا به ایدز، بارداری، سوختگی و دریافت پیوند است. طیف این عفونت‌ها از کلونیزاسیون مخاطی تا عفونت‌های مهاجم و کشنده، متغیر است. از میان اشکال بالینی مختلف عفونت‌های Candida، Candidiasis جلدی و مخاطی، از شیوع بالاتری برخوردارند. Candidiasis واژینال و برفک دهان در بین اشکال مخاطی و در فرم جلدی، عفونت ناخن (Onicomicosis) شایع‌تر هستند (۶-۴).

تشخیص دقیق Candida تا سطح گونه، از آن رو مهم است که درمان عفونت‌های Candida به صورت موضعی یا سیستمیک با داروهایی مثل پلی‌انها و آزول‌ها انجام می‌شود و عوامل ضد قارچی تأثیر متفاوتی علیه گونه‌های مختلف Candida دارند (۷). روش‌های مختلفی برای تعیین عوامل بیماری‌زا که بیشتر آن‌ها بر اساس مشخصات فنوتیپی مثل مورفولوژی کلونی و آزمایش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمی (الگوی جذب و تخمیر قندها) وجود دارد. با وجود دقت و اعتبار این روش‌ها وقت گیر هستند و برای تعیین بعضی گونه‌ها کافی نیستند. بنا بر این، روش‌های جدیدتری از فنون مولکولی مورد توجه قرار گرفته‌اندکه استفاده از آن‌ها نیازمند هزینه‌ی بیشتری است؛ اما صحت، دقت بیشتر و سرعت آن‌ها غیر قابل انکار می‌باشد. انواع روش‌ها و تکنیک‌های مولکولی مانند PCR (Polymerase chain reaction)، PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism)، AFLP (Amplified fragment length polymorphism)، RAPD (Random amplified polymorphic DNA)، Multiplex PCR، Nested PCR، Real-time PCR، DNA sequencing، SSCP (Single-strand conformation polymorphism) و DNA-fingerprinting در تشخیص و شناسایی گونه‌های Candida مناسب هستند (۸). بعضی از تکنیک‌های مدرن PCR مثل Multiplex PCR و Real-time PCR به تجهیزات گران و اختصاصی نیاز دارند، در حالی که PCR-RFLP به نسبت ساده و آسان است و الگوی به دست آمده قابل تشخیص، قابل تکرار و قابل اعتماد است (۹).

DNA ریبوزومی دارای چند ناحیه‌ی متعدد می‌باشد. اندازه‌ی نواحی 5.8S، 18S و 26S به طور معمول در گونه‌های مختلف Candida برابر است، اما اندازه‌ی ناحیه‌ی ITS (Internal transcribed spacer) در گونه‌های مختلف متفاوت است. این ناحیه بین ژن 18S و 28S rDNA قرار گرفته است. اختلاف اندازه و توالی این ناحیه، به تعیین هویت مخمرها در سطح گونه کمک می‌کند (۱۰). هدف از انجام این مطالعه، تعیین گونه‌های Candida جدا شده از نمونه‌های بالینی به دست آمده از بیماران بستری در بیمارستان ولی‌عصر (عج) بیرجند با استفاده از روش PCR-RFLP بود.

روش‌ها

تهیه‌ی ایزوله‌های Candida: از ۹۰ بیمار بستری شده در بیمارستان ولی‌عصر (عج) بیرجند که به آزمایشگاه میکروبیولوژی این بیمارستان ارجاع شده بودند، ۹۸ جدایه‌ی Candida طی یک سال، از آذر ۱۳۹۲ تا آذر ۱۳۹۳، جمع‌آوری شد و پس از اخذ رضایت‌نامه از بیماران، اطلاعات آن‌ها (جنس، سن، محل ضایعه، محل ابتلا و غیره) در پرسش‌نامه ثبت شد. جدایه‌ها در محیط سابورو دکستروز آگار (Sabouraud Dextrose Agar) در لوله‌ی درپیچ‌دار نگهداری شد. سپس به محیط سابورو آگار جدید منتقل گردید و پس از گذشت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، از آن برای انجام آزمایش‌های مولکولی استفاده شد.

استخراج DNA و انجام PCR-RFLP: در این مرحله، DNA جدایه‌ی Candida با به کار گیری کیت استخراج (GeneAll Biotechnology) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. یکی از بهترین روش‌های مورد استفاده جهت شناسایی و تشخیص قارچ ها از جمله مخمرها به کمک روش‌های مولکولی، بررسی مناطق ITS می‌باشد. یکی از گزینه های مناسب، انتخاب مناطق ITS1-5.8S-ITS2 از ژن‌های RNA ریبوزومی قارچ‌ها است که توسط پرایمرهای عمومی ITS1 و ITS4 تکثیر می‌گردد. لازم به ذکر است که pITS1 و pITS4 مناطق ITS1 و ITS2 را به طور کامل پوشش می‌دهد.

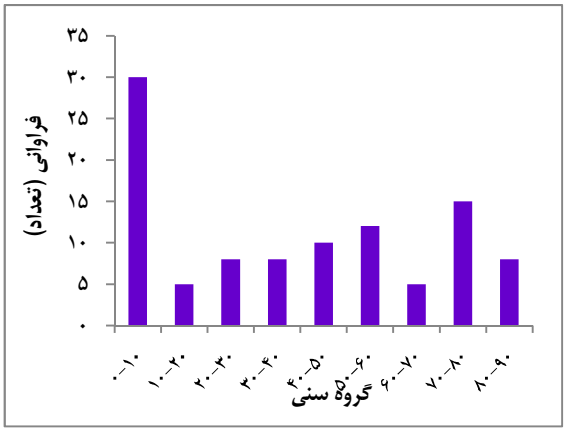
برای شناسایی گونه‌های مهم کاندیدا از جمله Candida albicans، Candida parapsilosis، Candida tropicalis، Candida krusei، Candida glabrata، Candida guilliermondii و ...، قسمتی از DNA ریبوزومال (rDNA یا Ribosomal DNA) به نام ITS1-5.8S-ITS2 هدف تکثیر توسط PCR قرار گرفت. پرایمر ITS1 به عنوان پرایمر رفت و پرایمر ITS4 به عنوان پرایمر برگشت به کار گرفته شد. توالی این آغازگرها ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') و ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') بود.

برای انجام آزمایش PCR مخلوط واکنش در حجم نهایی

۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲ میکرولیتر مستر میکس Ampliqon و ۰/۵ میکرولیتر پرایمر رفت و برگشت، ۱۰ میکرولیتر آب مقطر و ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده تهیه شد. برنامه‌ی PCR در دستگاه ترمال سایکلر بر روی ۵ دقیقه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور جدا شدن دو رشته‌ی DNA (DNA Denaturation)، ۳۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (Annealing)، ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (Extension) و در نهایت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (Final extension) تنظیم شد. ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR هر کدام از ایزوله‌های کلینیک، در واکنش ۲۰ میکرولیتری RFLP حاوی ۸ میکرولیتر آب مقطر، ۱/۵ میکرولیتر بافر، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم Msp I (شرکت Fermentas) اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد (۱۱). در نهایت، پس از انجام الکتروفورز بر روی ژل ۲ درصد و بر اساس اندازه و تعداد باندهای به دست آمده، گونه‌های مختلف Candida تشخیص داده شد.

یافته‌ها

در مطالعه‌ی حاضر، ۹۸ ایزوله از بیماران مبتلا به Candidiasis بستری در بیمارستان ولی‌عصر (عج) بیرجند جدا شد. این تحقیق شامل بررسی ۳۴ بیمار مرد (۳۷/۷۸ درصد) و ۵۶ بیمار زن (۶۲/۲۲ درصد) بود. حداقل سن بیماران، ۳ روز و حداکثر سن ۸۸ سال بود. بیشترین فراوانی در گروه سنی نوزادی تا ۱۰ سال و بعد از آن در گروه سنی ۸۰-۷۱ سال و کمترین فراوانی را در گروه سنی ۷۰-۶۱ سال و سپس ۲۰-۱۱ سال به دست آمد. شکل ۱ فراوانی موارد ابتلا به Candidiasis را در گروه‌های سنی مختلف نشان می‌دهد.

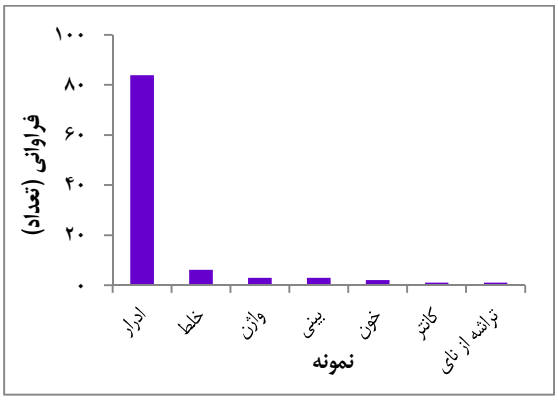


شکل ۱. فراوانی موارد ابتلا به Candidiasis در گروه‌های سنی مختلف

در این مطالعه، جدایه‌های Candida از نقاط مختلف بدن بیماران به دست آمدند که بر اساس شکل ۲، بیشترین میزان جداسازی جدایه‌ها به ترتیب از ادرار (۸۳/۸۶ درصد) و بعد خلط (۶/۱۰ درصد) و کمترین آن از کاتتر و تراشه از نای هر کدام (۱/۰۲ درصد) بود. بر اساس جدول اندازه‌ی قطعات برشی حاصل از آنزیم Msp I بر روی نواحی ITS1-5.8S-ITS2 در گونه‌های استاندارد Candida (جدول ۱).

فراوانی گونه‌های جدا شده به ترتیب Candida albicans ۴۱ مورد (۴۱/۸۴ درصد)، Candida glabrata ۱۶ مورد (۱۶/۳۲ درصد)، Candida tropicalis ۱۲ مورد (۱۲/۲۴ درصد)، Candida krusei ۱۰ مورد (۱۰/۲۰ درصد)، Candida parapsilosis ۸ مورد (۸/۱۶ درصد)، Candida lusitaniae ۷ مورد (۷/۱۴ درصد)، Candida guilliermondii و Candida kefir هر کدام ۲ مورد (۲/۰۴ درصد) بودند.

شکل ۳، الکتروفورز محصولات PCR برخی ایزوله‌های بالینی و شکل ۴ الکتروفورز محصولات RFLP بعد از اثر آنزیم Msp I در مطالعه‌ی حاضر را نشان می‌دهند. جدول ۲، فراوانی گونه های Candida جدا شده از نمونه های بالینی در این تحقیق را نشان می‌دهد. جدول ۳ فراوانی گونه‌های Candida جدا شده از نمونه‌های بالینی را بر حسب جنس نشان می‌دهد. بر اساس این جدول، همه‌ی ۸ گونه‌ی Candida از بیماران زن مورد مطالعه جدا شدند؛ در حالی که دو گونه‌ی Candida guilliermondii و Candida kefir از مردان مورد مطالعه جدا نشدند.



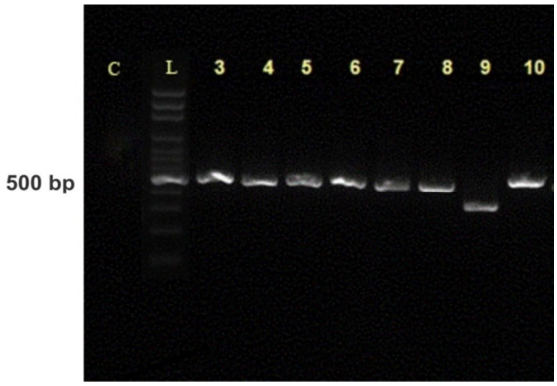
شکل ۲. فراوانی گونه‌های Candida جدا شده بر حسب نمونه‌ی بالینی

بحث

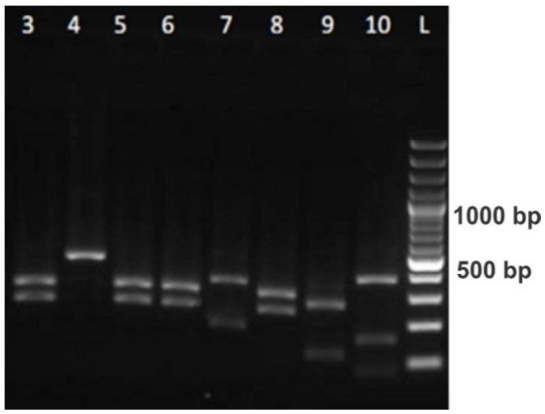
در دهه‌های اخیر، شیوع عفونت‌های فرصت طلب ناشی از مخمرهای Candida افزایش یافته است. عواملی مانند مصرف آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف، کورتیکو استروئیدها و ابتلا به بیماری‌های ناتوان کننده مثل ایدز، دیابت ملیتوس، بدخیمی‌ها، کاربرد کاتترهای وریدی و پیوند اعضا از جمله زمینه‌های مساعد کننده‌ی ابتلا به عفونت‌های مخمری است (۱۳-۱۲).

جدول ۱. اندازه‌ی قطعات برشی حاصل از آنزیم **Msp I** بر روی نواحی **ITS1-5.8S-ITS2** در گونه‌های **Candida**

گونه‌ی Candida	اندازه‌ی قطعه‌ی ITS1-ITS4	اندازه‌ی محصول هضم شده با آنزیم
Candida albicans	۵۳۵	۲۹۷ و ۲۳۸
Candida parapsilosis	۵۲۰	۵۲۰
Candida tropicalis	۵۲۴	۳۴۰ و ۱۸۴
Candida krusei	۵۱۰	۲۶۱ و ۲۴۹
Candida guilliermondii	۶۰۸	۳۷۱ و ۱۵۵ و ۸۲
Candida glabrata	۸۷۱	۵۵۷ و ۳۱۴
Candida lusitaniae	۳۸۳	۱۱۷ و ۲۶۶
Candida kefir	۷۲۱	۷۲۱



شکل ۳. الکتروفورز محصولات **PCR** (**Polymerase chain reaction**) برخی ایزوله‌های بالینی گونه‌های کاندیدا، ۱۰-۳: جدایه‌های **Candida**، **L**: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی (**bp**)، **C**: شاهد منفی



شکل ۴. الکتروفورز محصولات **RFLP** (**Restriction fragment length polymorphism**) با آنزیم **MspI** برخی از ایزوله‌های مخمری. ۳، ۵، ۶ و ۸: **Candida albicans**، ۴: گونه‌ی **Candida parapsilosis**، ۷: گونه‌ی **Candida tropicalis**، ۹: گونه‌ی **Candida lusitaniae**، ۱۰: گونه‌ی **Candida guilliermondii** و **L**: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی (**bp**)

جدول ۲. فراوانی گونه‌های **Candida** جدا شده از نمونه‌های بالینی

گونه‌ی Candida	تعداد (درصد)
Candida albicans	۴۱ (۴۱/۸۴)
Candida glabrata	۱۶ (۱۶/۳۲)
Candida tropicalis	۱۲ (۱۲/۲۴)
Candida krusei	۱۰ (۱۰/۲۰)
Candida parapsilosis	۸ (۸/۱۶)
Candida lusitaniae	۷ (۷/۱۴)
Candida guilliermondii	۲ (۲/۰۴)
candida kefir	۲ (۲/۰۴)
مجموع	۹۸ (۱۰۰)

برای بررسی‌های تشخیصی، درمانی و اپیدمیولوژیک، تشخیص دقیق گونه‌های Candida ضروری است. روش‌های معمول، شامل کشت و یا مشاهده‌ی میکروسکوپی و استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی مثل جذب کربوهیدرات و مطالعات فنوتیپی می‌باشد. استفاده از این روش‌های معمول، اغلب هزینه‌بر و وقت‌گیر است و باعث شناسایی سه تا چهار گونه می‌شود (۱۴). در حالی که تشخیص سریع این گونه‌ها، عامل مهمی در درمان مبتلایان به Candidiasis به خصوص افراد در معرض خطر می‌باشد (۱۵).

با توجه به سهم رو به افزایش Candida غیر albicans در عفونت‌های Candidiasis و حساسیت متفاوت آن‌ها به داروهای ضد قارچی، تعیین گونه‌ی این مخمرها هم به منظور اهداف اپیدمیولوژیک و هم درمان مؤثرتر لازم است (۱۶). به عنوان مثال، حساسیت Candida tropicalis و Candida glabrata نسبت به فلوکونازول ۳۲-۴ برابر کمتر از Candida albicans است. همچنین، Candida lusitaniae دارای مقاومت نسبی ذاتی به آمفوتریسین می باشد (۱۷). یکی از روش‌های ساده، تکرار پذیر و قابل مقایسه که در آزمایش‌های تشخیصی کاربرد زیادی پیدا کرده است،

جدول ۳. فراوانی گونه‌های **Candida** جدا شده از نمونه‌های بالینی بر حسب جنس

گونه‌ی Candida	مردان	زنان	مجموع
Candida albicans	۱۶	۲۶	۴۲
Candida glabrata	۵	۱۱	۱۶
Candida tropicalis	۵	۶	۱۱
Candida krusei	۴	۵	۹
Candida parapsilosis	۵	۴	۹
Candida lusitaniae	۲	۵	۷
Candida kefir	۰	۲	۲
Candida guilliermondii	۰	۲	۲
مجموع	۳۷	۶۱	۹۸

استفاده از روش هضم آنزیمی یا RFLP است که امکان شناسایی گونه‌ها را فراهم می‌کند. در این مطالعه، از روش PCR-RFLP جهت شناسایی گونه‌های Candida جدا شده از نمونه‌های بالینی به دست آمده از بیماران بیمارستان ولی‌عصر (عج) بیرجند استفاده شد.

برای جداسازی دقیق گونه‌های مهم Candida در زمینه‌ی پزشکی و بیماری‌های عفونی، بهتر است که محصولات PCR را با آنزیم های مناسب برش زد. اساس RFLP، ایجاد قطعات DNA با استفاده از آنزیم محدودالاثر می‌باشد. آنزیم‌های محدودالاثر توالی خاصی از DNA را شناسایی می‌کنند و هضم آنزیمی صورت می‌گیرد. پس از هضم، قطعات برش یافته با اندازه‌های متفاوت ایجاد می‌شوند که به راحتی در ژل الکتروفورز قابل مشاهده هستند. تا کنون ۶ آنزیم برای تمایز ۱۲ مخمر شناخته شده‌ی کلینیک در سطح گونه استفاده شده اند که از طریق تکثیر زیر واحدهای کوچک 18S DNA ریبوزومی و شناسایی آن‌ها توسط PCR-RFLP به کار می‌روند (۱۸).

از آنزیم های مورد استفاده و پرکاربرد، می توان به چهار گروه از آنزیم‌های محدودالاثر مانند (DdeI،HaeIII، CfoI و MspI) اشاره کرد. مطالعات نشان داده‌اند که آنزیم Msp I توانایی بالایی جهت افتراق گونه‌های Candida دارد و برش قطعات تکثیر شده‌ی ITS با Msp I، الگوی اختصاصی برای هر گونه را به وجود می‌آورد (۱۹). این آنزیم، برای Candida albicans، Candida tropicalis، Candida krusei، Candida glabrata و Candida lusitaniae ۲ باند اما با اندازه‌های متفاوت و برای Candida guilliermondii ۳ باند ایجاد می‌کند. در Candida parapsilosis و Candida kefir اندازه‌ی محصول PCR و RFLP یکسان است؛ به طوری که این اندازه‌ی باند به ترتیب ۵۲۰ و ۷۲۱ جفت باز برای Candida parapsilosis و Candida kefir می‌باشد (۲۰).

در این مطالعه، فراوانی گونه‌های جدا شده به ترتیب شامل Candida albicans (بیشترین فراوانی)، Candida glabrata، Candida tropicalis، Candida krusei، Candida parapsilosis، Candida lusitaniae، Candida guilliermondii و Candida kefir بودند. البته لازم به ذکر است که همه‌ی ۸ گونه‌ی Candida شناسایی شده، از بیماران زن مورد مطالعه جدا شدند؛ در حالی که دو گونه‌ی Candida guilliermondii و Candida kefir از مردان مورد مطالعه جدا نشدند.

در مطالعه‌ی قهری و همکاران، بیشترین فراوانی مربوط به Candida albicans (۴۵/۶ درصد) و پس از آن Candida parapsilosis و Candida tropicalis و گونه‌های کمتر شایع شامل Candida glabrata، Candida krusei، Candida kefir، Candida lusitaniae، Candida guilliermondii و Metschnikowia pulcherrima گزارش شد (۱۶).

محمدی و همکاران در بررسی ۱۸۲ ایزوله‌ی Candida، فراوانی Candida albicans را ۴۷/۲ درصد و فراوانی Candida parapsilosis، Candida kefir، Candida tropicalis، Candida krusei و Candida glabrata را به ترتیب ۱۰/۴، ۸/۲، ۷/۷ و ۷/۷ درصد و کمترین فراوانی را Candida guilliermondii با ۱/۶ درصد گزارش کردند (۱۰).

در بررسی ۸۵۵ نمونه‌ی کلینیک به روش RFLP-PCR، Candida albicans بیشترین فراوانی (۵۸/۶ درصد) و بعد از آن Candida parapsilosis، Candida glabrata، Candida tropicalis، Candida kefir، Candida krusei، Candida orthopsilosis و Candida guilliermondii معرفی شدند (۲۱).

در بررسی آیت‌اللهی موسوی و همکاران بر روی نمونه‌های جدا شده از دهان بیماران مبتلا به ایدز، فراوانی Candida albicans ۸۲/۲ درصد گزارش شد (۱۱). از میان آنزیم های محدودالاثر، آنزیم Haelll

بهترین افتراق دهنده‌ی Candida albicans از سایر گونه‌های Candida می‌باشد و آنزیم Bfal به خوبی می‌تواند انواع غیر از Candida albicans را افتراق دهد و آنزیم Ddel برای تأیید گونه های Candida albicans مناسب است (۲۲).

مشابه مطالعه‌ی حاضر، در اکثر مطالعات انجام شده، گونه‌ی غالب شناسایی شده Candida albicans است. اگر چه فراوانی آن در مطالعات مختلف، متفاوت می‌باشد. در این مطالعه، دومین گونه‌ی شایع Candida یا اولین گونه‌ی شایع غیر Candida albicans، Candida glabrata بود. در بررسی شکوهی و همکاران (۱۳)، دیبا و همکاران (۲۳) و مولایی و همکاران (۲۴) هم به طور مشابه دومین گونه‌ی Candida پس از Candida albicans، Candida glabrata بود. در مطالعه‌ی سلیمانی و همکاران (۱۹) دومین گونه‌ی شایع Candida، Candida parapsilosis بود.

از نظر دومین گونه‌ی شایع غیر Candida albicans، نتایج این مطالعه با مطالعه‌ی فهمی و همکاران (۲۵) که Candida tropicalis را معرفی می‌کند، مشابه است. همچنین در این بررسی، گونه‌های کمتر شایع Candida guilliermondii و Candida kefir بودند؛ در حالی که فولادی و همکاران (۱۷) و رودباری و همکاران (۲۶) Candida parapsilosis، فهمی و همکاران (۲۵) گونه‌های Candida guilliermondii و Candida lusitaniae، فلاحی و همکاران (۲۷) گونه‌های Candida krusei و Candida famata (۲۷)، فراست و همکاران (۲۸) گونه‌های Candida Pulcherrima و Candida lusitaniae و سهرابی و همکاران (۱۴) گونه‌ی Candida tropicalis را گونه‌هایی با کمترین فراوانی مشخص کردند.

اختلاف در تعداد و تنوع فراوانی گونه‌های جدا شده به عواملی مانند تفاوت در ناحیه‌ی آناتومیک تهیه‌ی نمونه، تفاوت در بیماری‌های زمینه‌ای در بیماران، سن، جنس بیماران و همچنین تفاوت در تعداد بیماران مورد بررسی و روش‌های مورد استفاده جهت تشخیص و مهارت و تجربه‌ی افراد هنگام به کارگیری این روش‌ها بستگی دارد. در این مطالعه، بیشترین موارد ابتلا به Candidiasis، در گروه سنی نوزادی تا ۱۰ سال و بعد از آن در گروه سنی ۸۰-۷۱ سال و کمترین موارد در گروه سنی ۷۰-۶۱ سال و سپس ۲۰-۱۱ سال مشاهده شد.

در مطالعه‌ی محمدی و همکاران ، گروه سنی ۸۰-۷۱ سال کمترین و گروه سنی ۵۰-۲۰ سال بیشترین موارد ابتلا به Candidiasis را داشتند (۲۱). همچنین در یک مطالعه‌ی دیگر، بیشترین فراوانی موارد ابتلا در گروه سنی ۳۰-۲۱ سال و کمترین فراوانی در گروه سنی ۸۰-۷۱ سال به دست آمد (۱۰). محدوده‌ی سنی در مطالعه‌ی حاضر با مطالعات ذکر شده از نظر بیشترین و کمترین موارد ابتلا به Candidiasis متفاوت بود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد خانم تکتم بخشی به شماره‌ی ۹۲/۷۸ در دانشگاه علوم پزشکی کرمان است که در معاونت تحقیقات و فن آوری این دانشگاه، تصویب و با همکاری و مساعدت این معاونت انجام شد. نویسندگان مقاله از حمایت‌های ایشان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Wingard JR. Importance of Candida species other than C. albicans as pathogens in oncology patients. Clin Infect Dis 1995; 20(1): 115-25.
2. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of Candida albicans. Trends Microbiol 2001; 9(7): 327-35.
3. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev 2007; 20(1): 133-63.
4. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical mycology. 1st ed. New York, NY: Churchill Livingstone; 2002. p. 195-239.
5. Goldman GH, da Silva Ferreira ME, dos Reis ME, Savoldi M, Perlin D, Park S, et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in Candida albicans clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 50(1): 25-32.
6. Kofla G, Ruhnke M. Development of a new real-time TaqMan PCR assay for quantitative analyses of Candida albicans resistance genes expression. J Microbiol Methods 2007; 68(1): 178-83.
7. 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.
8. Allam AA, Salem IM. Evaluation of rapid molecular identification of clinically important candida Spp isolated from immuno-compromised patients using RF-PCR. Journal of American Science 2012; 8(2): 463-8.
9. Fatahi M, Shokohi T, Hashemi Sooteh TMB, Hedayati MT, Okhovatian A, Tamadoni A, et al. Molecular identification of Candida albicans isolated from the oncology patients at four university hospitals in Mazandaran province (2005-6). J Mazandaran Univ Med Sci 2007; 1761(1): 11. [In Persian].
10. 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(133): 336-43. [In Persian].
11. Ayatollahi Mousavi SA, Salari S, Rezaie S, Shahabi Nejad N, Hadizadeh S, Kamyabi H, et al. Identification of Candida species isolated from oral colonization in

Iranian HIV-positive patients, by PCR-RFLP method. Jundishapur J Microbiol 2012; 5(1): 336-40.
12. Salari S, Khosravi AR, Katiraee F, Katiraee F, Ayatollahi Mousavi SA, Shokri H, et al. Evaluation of inhibitory effects of cuminum cyminum oil on the fluconazaole resistant and susceptible Candida albicans isolated from HIV patients in Iran. J Am Sci 2012; 8(5): 54-60.
13. Shokohi T, Hashemi Soteh MB, Saltanat PZ, Hedayati MT, Mayahi S. Identification of Candida species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran. Indian J Med Microbiol 2010; 28(2): 147-51.
14. Sohrabi H, Sarookhani MR, Ezani A. Identification of Candida species associated with vulvovaginal candidiasis by comparison of new molecular and culture methods in 2013. J Arak Univ Med Sci 2013; 16(8): 46-54. [In Persian].
15. Skandari A, Mesbah Namin A, Yadeghari M. Identification of important pathogenic yeast candida species in acute candidiasis using PCR. Trauma Mon 2008; 13(02 SP 115-123).
16. Ghahri M, Mirhendi SH, Yadegari MH, Hajizadeh E, Shidfar MR. Identification of pathogenic yeasts isolated from onychomycosis in Tehran, using polymerase chain reaction and enzymatic digestion. Modares J Med Sci Pathol 2010; 13(1): 79-91. [In Persian].
17. Fouladi B, Yadegari MH, Rajabibazl M, Fazaeli A, Hashemzadeh Chaleshtori M. Identification of Candida species in patients with vulvovaginitis presenting different clinical symptoms. J Zanjan Univ Med Sci 2015; 23(98): 53-67. [In Persian].
18. Alinejad M, Nasrollahi OA, Hashemi S. Drug resistance of Candida species isolated from fungal peritonitis by PCR-RFLP method. J Babol Univ Med Sci 2012; 14(64): 53-62. [In Persian].
19. Solimani P, Salari S, Khalizadeh S, Hassanzad M, Khodavaisy S, Abastabar M, et al. Use of PCR-RFLP and PCR-HWP1 for identification of Candida species isolated from cystic fibrosis patients. Res Mol Med 2014; 2(3): 24-8.
20. Ayatollahi Mousavi SA, Khalesi E, Shahidi Bonjar GH, Aghighi S, Sharifi SF, Aram F. Rapid molecular diagnosis for Candida species using PCR-RFLP. Biotechnology 2007; 6(4): 583-7.
21. Mohammadi R, Mirhendi H, Rezaei-Matehkolaei A, Ghahri M, Shidfar MR, Jalalizand N, et al. Molecular identification and distribution profile of Candida species isolated from Iranian patients. Med Mycol 2013; 51(6): 657-63.
22. EL-Mashad N, Raafat D, Elewa A, Othman W. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for characterization of Candida species causing onychomycosis. J Adv Med 2012; 1(2): 77-84.
23. Diba K, Namaki A, Ayatolahi H, Hanifian H. Comparison of biochemical and molecular methods for the identification of Candida species causing vulvovaginal candidiasis and recurring vulvovaginal candidiasis. Iran J Med Microbiol 2014; 9(3): 45-50.
24. Molaei H, Mirhendi SH, Brandao J, Mirdashti R, Rosado L. Comparison of enzymatic method rapid yeast plus system with RFLP-PCR for identification of isolated yeast from vulvovaginal candidiasis. Iran J Basic Med Sci 2011; 14(5): 443-50.
25. Fahami S, Kordbacheh P, Moazeni M, Mahmoodi M, Mirhendi H. Species identification and strain typing of candida isolates by PCR-RFLP and RAPD-PCR analysis for determining the probable sources of nosocomial infections. Iran Red Crescent Med J 2010; 12(5): 539-47.
26. Roudbary M, Roudbarmohammadi Sh, Bakhshi B, Farhadi Z, Nikoomanesh F. Identification of Candida species isolated from Iranian women with vaginal candidiasis by PCR-RFLP method. Eur J Exp Biol 2013; 3(6): 365-9.
27. Fallahi AA, Korbacheh P, Zaini F, Mirhendi H, Zeraati H, Noorbakhsh F, et al. Candida species in cutaneous candidiasis patients in the Guilan province in Iran; identified by PCR-RFLP method. Acta Med Iran 2013; 51(11): 799-804.
28. Farasat A, Ghahri M, Mirhendi H, Beiraghi S. Morphological and molecular characteristics of candida pulcherrima, an opportunistic yeast, isolated from nail lesions in Iran. Adv Stud Biol 2012; 4(6): 297-306.

Journal of Isfahan Medical School Received: 18.09.2015

Vol. 33, No. 359, 3rd Week, January Accepted: 08.12.2015

Molecular Identification of Candida Species in Patients with Candidiasis in Birjand, Iran, Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Assay

Toktam Bakhshi MSc[1], Samira Salari PhD[2], Ali Naseri PhD[3], Iraj Esfandiarpour MD[4], Mohammad Ali Mohammadi MSc[5], Pooya Ghasemi Nejad Almani PhD[6]

Original Article

Abstract

Background: In recent years, the incidence of opportunistic fungal infections such as candidiasis, especially in immunocompromised patients, has considerably increased. Rapid and accurate identification of candida isolates is necessary for effective antifungal therapy and hospital infections management. In this study, polymerase chain reaction (PCR)-based technique using a one-enzyme restriction fragment length polymorphism (RFLP) was used for discrimination of candida species.

Methods: 98 yeast strains were obtained from 90 patients with candidiasis during one-year period, from December 2013 to December 2014, in Birjand city, Iran. Clinical samples were cultured on Sabouraud dextrose agar with choramphenicol at 32°C and CHROMagar™ at 35°C for 48 hours to produce species-specific colors. In next stage, identification of Candida species was performed using PCR-RFLP method with the MspI restriction enzyme.

Findings: Totally, 98 candida isolates successfully were isolated from different clinical samples and identified via PCR-RFLP method using MspI. The age group of infancy to 10-year-old had the highest prevalence of candidiasis. In clinical samples, most of the Candida isolates were isolated from urine (83.86%). The most commonly identified species were Candida albicans in 41 cases (41.84%), Candida glabrata in 16 case (16.32%), Candida tropicalis in 12 cases (12.24%), Candida krusei in 10 cases (10.2%), Candida parapsilosis in 8 cases (8.08%), Candida Lusitania in 7 cases (7.14%), and Candida kefyr and Candida guilliermondii each one in 2 cases (2.04%).

Conclusion: PCR-RFLP assay with restriction enzyme MspI is an easy, rapid, and reliable method for identification of Candida species.

Keywords: Candida species, Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), MspI

Citation: 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.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(359): 1986-93

1- MSc Student, Department of Medical Parasitology and Mycology, Afzalipour Medical School, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2- Assistant Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Afzalipour Medical School, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3- Assistant Professor, Department of Medical Mycology and Parasitology, Ghaem Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
4- Professor, Department of Dermatology, Leishmaniasis Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
5- Instructor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Afzalipour Medical School, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
6- PhD Student, Department of Medical Parasitology and Mycology, Afzalipour Medical School, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
Corresponding Author: Samira Salari PhD, Email: sa_salari@kmu.ac.ir