DOI: 10.48305/jims.v40.i668.0248

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهلم/شماره‌ی ۶۶۸/هفته‌ی چهارم خرداد ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۳۰ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۴ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۳/۲۸

شناسایی کاندیدمی به روش آگلوتیناسیون با استفاده از نانوذرات طلا

زینب موسایی[۱]، حسین یوسفی دارانی[۲]، حسین هاشمی[۳]، ایمان زارعی[۴]، پروین دهقان[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کاندیدمی عفونتی بسیار مهم از نظر ابتلا و مرگ و میر است و باید به سرعت تشخیص داده و درمان شود. هدف از این مطالعه، ارائه‌ی یک روش ساده و سریع جهت تشخیص مستقیم مخمر *کاندیدا* در خون، با استفاده از آنتی‌بادی متصل به نانوذرات طلا به روش اگلوتیناسیون می‌باشد.

روش‌ها: در مطالعه‌ی حاضر، ۴۰ نمونه از BACTEC مثبت به لحاظ فونگمی تهیه شد. عوامل عفونی با استفاده از روش‌های مرفولوژی و روش مولکولی PCR-RFLP تعیین گونه شدند. ابتدا از عوامل جدا شده از کاندیدمی مخلوطی از آنتی‌ژن تهیه نموده و جهت تولید آنتی‌بادی به خرگوش سالم همراه با ادجوانت کامل تزریق شد. پس از تزریق چهار یادآور همراه با ادجوانت ناقص، نهایتاً از خرگوش خون‌گیری و سرم تهیه شد. تولید آنتی‌بادی و کارآیی آن به روش الایزا تأیید گردید و نانوذرات طلا به روش شیمیایی، به آنتی‌بادی‌ها متصل شدند. روش نانوذره برای تشخیص سریع کاندیدمی، بر روی خون مستقیم از بیماران و خون آلوده شده به تعداد مشخص مخمر *کاندیدا* در محیط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: *کاندیدا آلبیکنس* و پس از آن *کاندیدا گلابراتا* و کمپلکس *کاندیدا پاراپسیلوزیس* شایع‌ترین عوامل کاندیدمی بودند. در تعیین cut off روش نانوذره، حداقل مخمر قابل شناسایی در خون بیمار، یک مخمر بود. حساسیت و ویژگی روش نانوذره برای شناسایی مخمر *کاندیدا* در خون چهار بیمار در مقایسه با کشت خون، ۱۰۰ درصد محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: تحت شرایط آزمایشگاهی ما، اگر ۱۵ میکرولیتر از خون فرد مشکوک به کاندیدمی که حاوی ۱ مخمر یا حتی فقط آنتی‌ژن‌های کاندیدا باشد، در صورت مجاورت با ۳۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی کنژوگه شده با نانوذره، در کمتر از یک دقیقه آگلوتینه خواهد شد.

واژگان کلیدی: کاندیدمی؛ نانوذره؛ آگلوتیناسیون؛ آنتی‌بادی

ارجاع: موسایی زینب، یوسفی دارانی حسین، هاشمی حسین، زارعی ایمان، دهقان پروین. **شناسایی کاندیدمی به روش آگلوتیناسیون با استفاده از نانوذرات طلا.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۶۸): ۲۵۵-۲۴۸

مقدمه

گونه‌های مخمری *کاندیدا*، فلور طبیعی بدن بوده و به صورت فرصت‌طلب باعث کاندیدیازیس در پوست، ناخن و مخاط در افراد سالم شده و در صورت ضعف سیستم ایمنی، منجر به عفونت‌های عمقی، مهاجم و کشنده می‌گردند. اغلب، موارد کاندیدیازیس مهاجم ناشی از ورود اولیه‌ی *کاندیدا* به خون (کاندیدمی) و آن‌گاه انتشار خونی آن به اندام‌های داخلی می‌باشد. جدا شدن حداقل یک‌بار گونه‌های *کاندیدا* از کشت خون فرد، با یا بدون علائم بالینی، ابتلا به کاندیدمی تلقی می‌گردد. کاندیدمی به سه شکل محدود به خون، کاندیدیازیس خونی منتشره‌ی حاد یا مزمن و درگیری تنها یک ارگان می‌تواند بروز کند. گونه‌های *کاندیدا*، عامل شایع ۱۰-۸ درصد عفونت‌های جریان خون در آمریکا و ۳-۲ درصد در اروپا هستند. علائم بالینی کاندیدمی غیر اختصاصی و شامل تب، بی‌حالی، احساس خفگی، فشارخون بالا، اختلالات شکمی و هیپرگلیسمی است (۱).

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی پزشکی، گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استاد گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- PhD انگل‌شناسی، سازمان انتقال خون شهرکرد، شهرکرد، شهرکرد، ایران

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ‌شناسی پزشکی، گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران

۵- دانشیار گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: پروین دهقان: دانشیار گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: dehghan@med.mui.ac.ir

تشخیص کاندیدمی، دچار چالش‌های متعددی است. کشت خون که روش استاندارد طلایی تشخیص کاندیدمی است با وجود بهینه‌سازی‌های متعددی که روی آن صورت گرفته است در مراحل اولیه‌ی بیماری فقط ۵۰ درصد موارد کاندیدمی، مثبت خواهد شد. به علاوه همین امر ممکن است چند روز به طول بیانجامد و این در صورتی است که هنوز اطلاعاتی از گونه‌ی *کاندیدای* عامل و حساسیت ضد قارچی آن جهت درمان سریع به دست نیامده است. تست‌های سرولوژیک بر پایه‌ی شناخت آنتی‌بادی به دلیل ضعف سیستم ایمنی و عدم توانایی ساخت میزان کافی آنتی‌بادی مناسب نیستند (۲، ۳).

روش سرولوژیک اندازه‌گیری بتادی‌گلوکان که در بیماران مبتلا به عفونت اثبات شده، حساسیت و اختصاصیت آن به ترتیب ۸۷/۷-۷۹/۱ و ۸۷ درصد گزارش شده است، تحت تأثیر گلوکان محیط، مثبت کاذب خواهد شد (۲-۴). روش‌های مولکولی روش‌های سریع، دقیق و دارای اختصاصیت بالا هستند که می‌توانند در حد گونه‌ی جنس *کاندیدا* را در خون شناسایی کنند اما در این روش‌ها به دلیل حساسیت بالا، احتمال آلودگی و مثبت کاذب بالاست و همچنین این تست‌ها استانداردسازی نشده‌اند و همه‌جا در دسترس نیستند (۱، ۴).

ذرات نانو موادی با ابعاد ۱-۱۰۰ نانومتر هستند و در زمینه‌های مختلف فیزیک، شیمی، علوم مواد، پزشکی و زیست‌شناسی به علت ویژگی‌های منحصر به فرد الکترونیکی، مغناطیسی، نوری، مکانیکی و فیزیکی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. نانو ذره‌های طلا به علت ثبات شیمیایی نسبی، سهولت فرایند سنتز، سازگاری زیستی و عدم مداخلات زیستی با سایر مواد، نسبت سطح به حجم بالا جهت شناسایی اهداف خاص و حد پایین تشخیص، کاربردهای متعددی در سیستم‌های تصویربرداری، درمان و تشخیص پیدا کرده‌اند (۵-۷).

با توجه به اهمیت تشخیص سریع کاندیدمی جهت کاهش عوارض ناشی از آن و همچنین وجود چالش‌های فوق‌الذکر برای روش‌های تشخیصی موجود، بر آن شدیم تا از علم نانو که فرصتی بزرگ برای توسعه‌ی تکنیک‌های سریع، حساس، اختصاصی و مقرون به صرفه برای شناسایی عفونت‌های میکروبی ارائه کرده جهت تشخیص سریع کاندیدمی بهره جوئیم. هدف ما ارائه‌ی یک روش ساده و سریع جهت تشخیص مستقیم مخمر *کاندیدا* در خون فرد مشکوک به کاندیدمی با استفاده از نانوذرات طلای کونژوگه شده با آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های *کاندیدا* بود.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر از نوع تجربی می‌باشد و نمونه‌گیری در بیمارستان الزهرا (س) اصفهان طی یک دوره‌ی ۱۶ ماهه انجام گردید. تعداد ۴۰ نمونه‌ی خون BACTEC مثبت از نظر وجود مخمر *کاندیدا* در خون و ۴ نمونه‌ی مستقیم از بیمارانی که کشت خون مثبت به لحاظ کاندیدمی داشتند جمع‌آوری شد. ابتدا جهت تهیه‌ی آنتی‌ژن، *کاندیدا*های جدا شده از BACTEC بیماران در حد گونه شناسایی شدند، آنتی‌بادی ضد *کاندیدا* تهیه و روش نانوذره set up گردید.

۱- بررسی نمونه‌ی BACTEC بیماران

پس از دریافت نمونه‌ی کشت خون مثبت به لحاظ فونگمی، آزمایش مستقیم و رنگ‌آمیزی به روش گیمسا انجام گرفت. یک قطره از خون نمونه BACTEC جهت رشد عوامل عفونی بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل کشت داده شد و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. کلنی‌های مخمری جدا شده تا انجام مراحل بعدی آزمایش، در آب مقطر استریل نگهداری شدند. جهت تعیین گونه‌ی جدایه‌ها، از روش مولکولی (PCR-RFLP) استفاده شد.

تشخیص مخمرها با استفاده از روش مولکولی

استخراج و نگهداری DNA: جهت استخراج DNA قارچ، از روش جوشاندن استفاده گردید. بدین صورت که یک لوپ از کلنی تازه به میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل منتقل شد. سپس میکروتیوپ به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی که حاوی DNA قارچ بود به میکروتیوپ جدید منتقل شد و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت (۸).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction) PCR: برای تکثیر قطعه‌ی ژنی ITS1-5.8S-ITS2 موجود در کمپلکس ژنی DNA ریبوزومی و برای یک واکنش ۲۵ میکرولیتری، ۱۲/۵ میکرولیتر Mastermix2x، ۰/۷۵ میکرولیتر از هر پرایمر ITS1 (5′TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3′) و پرایمر ITS4 (5′TCCTCCGCTTATTGATATGC 3′) به غلظت ۱۰ پیکومول، ۲ میکرولیتر DNAی استخراج شده از مخمرها و ۹ میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده شد. برای اجرای PCR مواد فوق در دستگاه Thermal cycler تحت برنامه‌ی حرارتی ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، از دمای ۹۵ تا ۷۲ به صورت ۳۵ سیکل و در انتها ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند (۸).

هضم محصولات PCR با آنزیم‌های اندونوکلئاز RFLP (Restriction fragment length polymorphism): برای انجام PCR-RFLP برای یک واکنش ۱۵ میکرولیتری، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، ۱/۵ میکرو لیتر از بافر ۱۰x، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم

*Msp*I و ۳ میکرولیتر آب مقطر استریل تزریقی استفاده شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت (۹).

الکتروفورز: محصولات PCR و RFLP به ترتیب در ژل ۱ و ۱/۵ درصد آگارز به مدت ۴۰ دقیقه با جریان الکتریسیته‌ی مستقیم الکتروفورز شدند. اندازه‌ی طول قطعات پس از انجام برش با آنزیم در رفرنس ۹ آمده است.

۲- ساخت نانوذرات کونژوگه شده با آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد کاندیدا

نانوذرات کونژوگه شده با آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد *کاندیدا* مطابق روشی که قبلاً در گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان توسط Hashemi و همکاران در سال ۲۰۱۹ انجام شده، ساخته شدند. به صورت مختصر گونه‌های مختلف جدا شده از کاندیدمی با استفاده از روش فریز- ذوب و دستگاه سونیکاتور، دیواره‌ی مخمرها شکسته شد و آنتی‌ژن مخلوط تهیه گردید. جهت سنجش میزان پروتئین آنتی‌ژن تهیه شده از روش Bradford و مطابق روش Hashemi و همکاران استفاده گردید (۱۰).

تهیه‌ی آنتی‌بادی ضد *کاندیدا*: یک خرگوش ۲ ماهه‌ی سالم خریداری و پس از سازگاری با محیط، از قلب آن خون‌گیری شد و جهت اطمینان از عدم وجود آنتی‌بادی ضد *کاندیدا* در سرم، به روش الایز عمل شد. یک میلی‌لیتر از آنتی‌ژن مخمری تهیه شده همراه با ۱ میلی‌لیتر ادجوانت کامل فروند مخلوط و پس از نیم ساعت که با روتاتور شیک شد، به صورت زیر جلدی به خرگوش تزریق گردید. یادآورهای دوم، سوم و چهارم به فاصله‌ی دو هفته از هم و به همان میزان آنتی‌ژن با ادجوانت ناقص فروند به خرگوش تزریق شد. یک هفته پس از یادآور چهارم از قلب خرگوش خون‌گیری و سرم آن تهیه و در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۰).

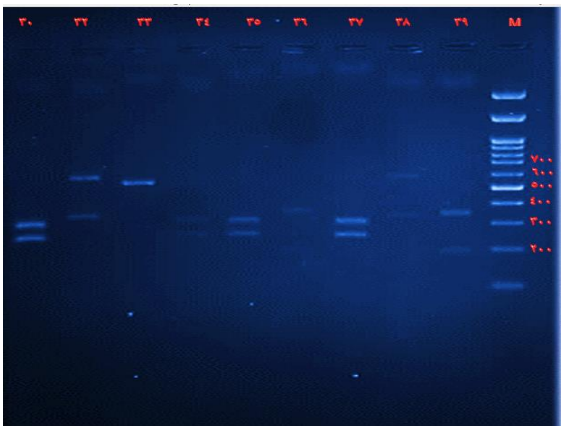
الایزا: جهت اطمینان از تولید آنتی‌بادی در خون خرگوش پس از تزریق آنتی‌ژن *کاندیدا*، از روش الایزا استفاده شد. جهت کوت (coat) کردن آنتی‌ژن مخمر *کاندیدا* در کف پلیت، از آنتی‌ژن به دست آمده در بافر پوشاننده (۰/۷۹۵ گرم کربنات سدیم و ۱/۴۶۵ سدیم هیدروژن کربنات در ۵۰۰ سی‌سی آب مقطر) رقت‌های ۱/۵، ۱/۱۰ و ۱/۲۰ تهیه شد. از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک پلیت الایزا اضافه و پلیت به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۲۴ ساعت در دمای ۸-۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. محتویات پلیت خالی و ۳ بار چاهک‌ها با محلول شستشو (۸/۵ گرم کلریدسدیم و ۰/۵ سی‌سی توئین ۲۰ در یک لیتر آب مقطر)، شستشو داده شدند. ۲۰۰ میکرولیتر از آلبومین ۱/۱۰۰ رقیق شده در بافر انکوباسیون (۰/۲ سی‌سی توئین ۲۰ با ۵۰۰ سی‌سی بافر فسفات سایلین) جهت پر کردن فضاهای خالی کف پلیت که آنتی‌ژن کوت نشده، به تمامی چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۱ ساعت که پلیت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت، چاهک‌ها ۳ بار شستشو داده شدند. از سرم خرگوش حاوی آنتی‌بادی و سرم کنترل (سرم خرگوش سالم) با استفاده از بافر انکوباسیون، رقت ۱/۱۰۰ تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن‌ها به چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۱ ساعت که در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند، شستشو مجدداً ۳ بار تکرار شد. ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه (Goat-anti-rabbit secondary antibody) کونژوگه شده با آنزیم (Horseradish peroxidase) ۱/۱۰۰۰ رقیق شده در بافر انکوباسیون به چاهک‌ها اضافه و ۱ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا (TMB stabilized substrate) و پس از ۵ دقیقه، ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده (اسید سولفریک ۲ نرمال) به چاهک‌ها اضافه شد و در نهایت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط الایزاریدر خوانش شد. تولید آنتی‌بادی در خرگوش به روش الایزا اثبات گردید. برای تخلیص آنتی‌بادی‌ها از سرم خرگوش از روش آمونیوم سولفات استفاده شد. آنتی‌بادی‌های تخلیص شده مطابق روش Hashemi و همکاران به نانو ذرات طلا متصل شدند (۱۰).

تعیین cut off نانوذرات کونژوگه شده با آنتی‌بادی‌های ضد کاندیدا: برای تعیین حداقل میزان مخمری که کیت توانایی شناسایی آن در خون را دارد، ابتدا سوسپانسیونی از کلنی تازه سویه‌های مختلف *کاندیدا* در آب مقطر استریل، تهیه شد. با استفاده از لام نئوبار، میزان مخمر موجود در ۱ سی‌سی از این سوسپانسیون تعیین و از آن سوسپانسیونی با غلظت 10^6 مخمر در ۱ سی‌سی سرم فیزیولوژی تهیه شد. از این سوسپانسیون به روش تیتراسیون رقت‌های 10^5، 10^4، 10^3، 10^2، 10^1 و 10^0 تهیه گردید و جهت داشتن سوسپانسیونی با تعداد مشخص مخمر و آنتی‌ژن و با استفاده از دستگاه هموژنایزر با دور ۶۰۰۰ و در ۳ نوبت ۳۰ ثانیه‌ای هموژنیزه شدند. در ۷ لوله‌ی جداگانه، در هر کدام ۴۵۰ میکرولیتر از خون سالم (از نظر وجود قارچ کاندیدا) که به نسبت ۱ به ۳ با سرم فیزیولوژی رقیق شده بود، ریخته شد و ۵۰ میکرولیتر از هر رقت مشخص به این لوله‌ها اضافه شد. پس از مخلوط شدن، روش نانوذره روی همه‌ی لوله‌ها انجام گردید و از جهت رؤیت آگلوتیناسیون با چشم غیر مسلح مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

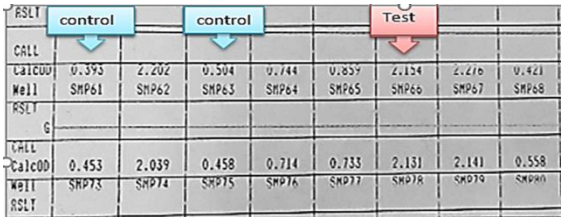
پس از هماهنگی‌های لازم با بیمارستان الزهرا(س) اصفهان، بیماران مشکوک به فونگمی از نظر پزشک متخصص که کشت خون برای آن‌ها درخواست داده شده بود، مورد مطالعه قرار گرفتند. حاصل آن

۴۰ نمونه BACTEC مثبت به لحاظ فونگمی و ٤ نمونه‌ی مستقیم از بیمار جهت بررسی روش نانوذره بوده است. در بررسی کشت خون‌های مثبت به صورت لام مستقیم، مخمر، بلاستوکونیدی و هایف مشاهده شد. در شناسایی گونه‌ها به روش PCR-RFLP، ۲۱ مورد (۵۳/۸ درصد) به عنوان *کاندیدا آلبیکنس/ دابلینینسیس*، ۸ مورد (۲۰/۵ درصد) به عنوان *کاندیدا گلابراتا*، ۸ مورد (۲۰/۵ درصد) به عنوان کمپلکس *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و ۲ مورد (۵/۲ درصد) به عنوان *کاندیدا تروپیکالیس* شناسایی شدند (شکل ۱).



شکل ۱. شناسایی جدایه‌های مخمری به روش PCR-RFLP (۳۰، ۳٤، ۳۵ و ۳۷ *کاندیدا آلبیکنس*- ۳۲ و ۳۸ *کاندیدا گلابراتا*- ۳۳ کمپلکس *کاندیدا پاراپسیلوزیس*- ۳٦ و ۳۹ *کاندیدا تروپیکالیس*) و M مارکر ۱۰۰ bp

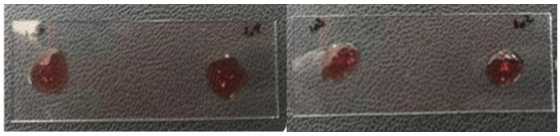
در تولید کیت نانوذره‌ی طلا برای تأیید تولید آنتی‌بادی ضد *کاندیدا* در خرگوش پس از تزریق آنتی‌ژن *کاندیدا* به آن، از روش الایزا استفاده شد. که جذب نوری ٤ برابری سرم خرگوش (از ۰/۵۰٤ به ۲/۱۵٤) پس از تزریق آنتی‌ژن نسبت به سرم خرگوش قبل از تزریق آنتی‌ژن، تولید آنتی‌بادی ضد کاندیدایی را تأیید کرد (شکل ۲).



شکل۲. جذب نوری سرم خرگوش قبل از تزریق آنتی‌ژن (کنترل) و جذب نوری سرم خرگوش بعد از تزریق آنتی‌ژن (تست) جهت بررسی تولید آنتی‌بادی در سرم خرگوش پس از تزریق آنتی‌ژن

حساسیت و ویژگی روش نانوذره برای شناسایی مخمر *کاندیدا* در خون چهار نمونه‌ی خون بیمار مشکوک به کاندیدمی به روش مستقیم و پس از انجام کشت خون، با دستگاه BACTEC، ۱۰۰ درصد محاسبه شد.

در بررسی حداقل میزان مخمر قابل تفکیک توسط روش نانوذره در خون، با انجام آزمایشات مکرر بر روی نمونه‌ی خون فرد سالم که با تعداد مشخص *کاندیدا* آلوده شده بود و همچنین بر روی کشت خون‌های BACTEC از افراد مبتلا به کاندیدمی به این نتیجه رسیدیم که در صورت وجود تنها یک مخمر و یا نیز تنها آنتی‌ژن‌های مخمر در خون و بدون حضور خود مخمر هم این تست در صورتی که خون بیمار به نسبت ۱ به ۳ با سرم فیزیولوژی رقیق شود، فارغ از نوع گونه‌ی کاندیدا، در کمتر از یک دقیقه مثبت خواهد شد (شکل ۳).



شکل ۳. واکنش آگلوتیناسیون ایجاد شده حاصل از هم‌جوار شدن محلول ساخته شده‌ی نانوذره با خون حاوی مخمر

همچنین در بررسی تست از سوسپانسیون ترایکوسپورون، لاکتوفرین و مایع کیست به عنوان کنترل استفاده شد.

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، روش نانوذره‌ی طلا جهت شناسایی سریع کاندیدمی مورد بررسی و عوامل قارچی جدا شده از خون بیماران مشکوک به فونگمی نیز مورد مطالعه قرار گرفتند.

همانند مطالعات پیشین در ایران و خارج از ایران، *کاندیدا آلبیکنس*، شایع‌ترین و اصلی‌ترین عامل قارچی مسبب فونگمی بود. طبق مطالعات اپیدمیولوژی، گونه‌های ایجاد کننده‌ی کاندیدمی بسته به منطقه‌ی جغرافیایی مختلف، بیماری‌های زمینه‌ای، سن و ایجاد مقاوت دارویی در بین کشورهای مختلف متفاوت بود (۱۱). طبق نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر، گونه‌های غیر*آلبیکنس* عامل کاندیدمی، گونه‌های *کاندیدا گلابراتا* و کمپلکس *کاندیدا پاراپسیلوزیس* می‌باشد که این نتیجه با نتایج گزارش شده توسط Charsizadeh و همکاران (۱۳)، Jabari و همکاران (۱٤)، Razzaghi و همکاران (۱۵) در ایران و با مطالعه‌ی Agnelli و همکاران (۱۲) در برزیل هم‌پوشانی داشت. اگرچه فراوانی گونه‌های *تروپیکالیس* معادل ۱۰۰ در برزیل تقریباً همپای *کاندیدا گلابراتا* با فراوانی ۱۰۲ گزارش شده است. اما با نتایج گزارش شده توسط Montagna و همکاران در ایتالیا که گونه‌ی *گلابراتا* و سپس *تروپیکالیس* (۱۷)، Alp و همکاران که کمپلکس

پاراپسیلوزیس و بعد *تروپیکالیس* را از کاندیدمی جدا کرده‌اند، مطابقت نداشت (۱۶).

روش کشت خون که در حال حاضر، روش استاندارد طلایی جهت تشخیص کاندیدمی است، ۵-۳ روز به طول می‌انجامد تا مخمر به قدری تکثیر شود که موجب مثبت شدن کشت خون گردد، چرا که زمان مثبت شدن کشت خون برای گونه‌های مختلف کاندیدا متفاوت است (۱۸). در اکثر موارد، نتایج کشت خون در مراحل اولیه‌ی بیماری و حتی در بیماران در حال احتضار، نامشخص است و حساسیت کشت خون بیش از ۵۰ درصد نبوده است (۱۹-۲۴).

در بررسی حداقل میزان مخمر موجود در خون جهت مثبت شدن روش نانوذره، این مطالعه نشان داد که در صورت وجود تنها آنتی‌ژن‌های مخمر در خون و بدون حضور خود مخمر هم این تست در صورتی که خون بیمار به نسبت ۱ به ۳ با سرم فیزیولوژی رقیق شود فارغ از نوع گونه‌ی *کاندیدا*، در کمتر از یک دقیقه مثبت خواهد شد. شاید بتوان گفت تست از حساسیت خوبی برخوردار می‌باشد. با توجه به عدم واکنش تست با سوسپانسیون مخمر تریکوسپورون، مایع کیست و لاکتوفرین که به عنوان کنترل استفاده شدند، اختصاصیت تست هم قابل قبول می‌باشد.

تشخیص کاندیدمی با استفاده از نانوذرات طلا و به روش تهیه شده شاید بتوان گفت مراحل اولیه را گذرانده است و جهت اثبات کاربردی بودن آن در تشخیص کاندیدمی نیاز به مطالعات بسیار بیشتری بر روی نمونه‌ی مستقیم خون بیماران مشکوک به کاندیدمی می‌باشد. این کار در آینده‌ی نزدیک بر روی بیماران انجام خواهد شد و با استاندارد طلایی که آزمایش BACTEC می‌باشد، ملزم به مقایسه‌ی مثبت کاذب و منفی کاذب و محاسبه‌ی دقیق اختصاصیت و حساسیت روش می‌باشیم. در مطالعه‌ی حاضر متأسفانه پس از ست‌آپ روش تنها توانستیم بر روی چهار بیمار به روش مستقیم تست را محک بزنیم و با وجود آنکه هر چهار مورد قبل و بعد از انجام کشت خون به روش نانوذره‌ی تهیه شده مثبت بودند، اما نیاز به ادامه‌ی انجام کار در تعداد افراد بسیار بیشتری داشته و در زمان پروژه‌ی اخیر امکان‌پذیر نبوده است.

تست‌های ایمونولوژیک مبتنی بر فناوری لاتکس از دیرباز به عنوان روش‌های تشخیصی سریع و آسان مورد استفاده قرار گرفته‌اند. آزمایشات لاتکس آگلوتیناسیون، بر پایه‌ی پیوند آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی در سطوح وسیعی از ذرات پلیمری لاتکس و ایجاد اگلوتیناسیون جهت تشخیص بیماری‌ها استفاده می‌شوند. بار سطحی و ماهیت آب‌گریز یا آب‌دوست بودن ذرات لاتکس ممکن است سبب بر هم‌کنش مستقیم عوامل عفونی با سطح لاتکس گردد. در حالی که به طور کلی حساسیت و ویژگی این تست‌ها در سال‌های گذشته بهبود یافته اما مشکلات ناشی از واکنش‌های غیر اختصاصی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌ها و در نتیجه نتایج مثبت و منفی کاذب همچنان وجود دارد (۲۵، ۲۶).

در روش‌های مولکولی، اگرچه مدت زمان آزمایش جهت تشخیص میکروارگانیسم کوتاه بوده، اما نیازمند مواد و دستگاهایی خاص هستند که همه‌جا در دسترس نیستند. تشخیص قارچ به طور مستقیم از نمونه هنوز در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی صورت می‌گیرد و در بالین دچار چالش‌های متعددی است. با توجه به حساسیت بالای روش‌های مولکولی، احتمال آلودگی و مثبت کاذب در آن‌ها بالاست. روش نانوذره هر چند یک متد هزینه‌بر خواهد بود، اما نیازمند دستگاه‌های خاص نیست و در کمتر از ۱ دقیقه در صورت وجود قارچ، مثبت خواهد شد و پزشک می‌تواند سریع درمان قارچی خود را آغاز کند که این باعث مقرون به صرفه بودن این متد خواهد بود.

از جمله تست‌های سرولوژیک بر پایه‌ی شناخت آنتی‌ژن در قارچ‌شناسی، تست بتا دی‌گلوکان است که علاوه بر اینکه یک آنتی‌ژن دیواره در قارچ‌های مخمری جنس کاندیدا می‌باشد، در دیواره‌ی قارچ‌های دیگر چون قارچ‌های رشته‌ای آسپرژیلوس و فوزاریوم و همچنین در برخی مواد غذایی وجود دارد. این تست تحت تأثیر گلوکان موجود در محیط نیز قرار گرفته و واکنش مثبت کاذب می‌دهد. بزرگ بودن اندازه‌ی لاتکس می‌تواند باعث ایجاد مشکلاتی در ماندگاری مواد و محلول‌های کیت سرولوژی و یا تکرارپذیری آزمایش گردد. نانوذرات طلا به علت داشتن چگالی خاص و نسبت سطح به حجم بالا، باعث ایجاد واکنش‌های قوی آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی کونژوگه شده به این نانوذرات با میکروارگانیسم مورد تجسس و احتمالاً آنتی‌ژن‌های موجود در نمونه می‌گردد. بدین شکل با دستیابی به آنتی‌ژن در مقادیر جزئی نیز، موجب حساسیت بالا در این روش می‌شود. به همین دلیل امروزه در تست‌های تشخیصی از جمله تست‌های سرولوژیک، نانوذرات جایگاه به خصوص پیدا کرده‌اند.

Hashemi و همکاران در سال ۲۰۱۹، برای شناسایی مخمر کاندیدا با استفاده از نانوذرات طلا، پس از تهیه‌ی آنتی‌بادی کونژوگه شده با نانوذرات طلا بر ضد عوامل عفونی واژینال، نمونه‌های به دست آمده از زنان شاکی از واژینیت را مورد بررسی و در مقایسه با کشت بررسی نمودند که حساسیت و اختصاصیت این روش را برای مخمر کاندیدا ۱۰۰ درصد گزارش کرده‌اند (۱۰).

Bansod و همکاران (۲۷)، عینلو و همکاران (۲۸)، Zhao و همکاران (۲۹) و Hu و همکاران (۳۰)، از جمله محققین دیگری هستند که برای شناسایی مخمر *کاندیدا* از نانوذرات طلا استفاده کرده‌اند. لازم به یادآوری است که تعیین گونه‌ی مخمر حتی با روش استاندارد طلایی کنونی نیز میسر نبوده و نیاز به انجام ازمایشات تکمیلی دارد. دستگاه BACTEC و روش کشت، تنها قادر است

مخمر بودن میکروارگانیسم را نشان دهد که پزشک داروی آنتی‌فونگال را شروع می‌کند. در صورت عدم پاسخ گونه‌ی مخمری به درمان ممکن است درخواست به شناسایی گونه‌ی قارچی نماید یا نوع دارو را تغییر دهد. برای پزشک معالج تشخیص میکروارگانیسم که باکتری باشد یا قارچ بسیار مهم است. قابل ذکر است داروهای ضد قارچی بسیار اندک می‌باشند اما برخی گونه‌ها همانند کروزه‌ای به طور ذاتی به داروی فلوکونازول مقاوم می‌باشد.

نتیجه‌گیری

روش نانو ذره‌ی تهیه شده در مطالعه‌ی اخیر به نظر می‌رسد که محدودیت‌های روش‌های قبل از جمله زمان‌بر بودن و نیاز به دستگاه ها و تجهیزات خاص را نداشته و اگرچه تاحدی هزینه‌بر است اما با توجه به اهمیت سرعت در تشخیص کاندیدمی جهت جلوگیری از عوارض ناشی از آن، همچنان انجام آن مقرون به صرفه خواهد بود. جهت استفاده روش آگلوتیناسیون با استفاده از نانوذره در تشخیص فونگمی، مطالعات بیشتری توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد قارچ‌شناسی پزشکی به شماره‌ی ۳۹۹۱۰۱ و دارای کد اخلاق IR.MUI.MED.REC.1399.221 می‌باشد. بدین‌وسیله از دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تقدیر به عمل می‌آید.

References

1. Calandra T, Roberts JA, Antonelli M, Bassetti M, Vincent JL. Diagnosis and management of invasive candidiasis in the ICU: an updated approach to an old enemy. Crit Care 2016; 20(1): 125.
2. He S, Hang JP, Zhang L, Wang F, Zhang DC, Gong FH. A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1, 3-β-D-glucan for invasive fungal infection: focus on cutoff levels. J Microbiol Immunol Infect 2015; 48(4): 351-61.
3. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, et al. β-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). Clin Infect Dis 2012; 54(5): 633-43.
4. Willinger B. Laboratory diagnosis and therapy of invasive fungal infections. Curr Drug Targets 2006; 7(4): 513-22.
5. Mieszawska AJ, Mulder WJM, Fayad ZA, Cormode DP. Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease. Mol Pharm 2013; 10(3): 831-47.
6. Kumar A, Mazinder Boruah B, Liang XJ. Gold nanoparticles: promising nanomaterials for the diagnosis of cancer and HIV/AIDS. J Nanomater 2011; 2011.
7. Raghvendra R, Kanthadeivi A, Sathesh K, Aarrthy M. Diagnostics and therapeutic application of gold nanoparticles. Medicine 2014; 6(2): 74-87.
8. Kianipour S, Emami Ardestani M, Dehghan P. Identification of Candida albicans and Candida dubliniensis species Isolated from bronchoalveolar lavage samples using genotypic and phenotypic methods. Adv Biomed Res 2018; 7: 66.
9. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important Candida species. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 2006; 47(3): 225-9.
10. Hashemi H, Varshosaz J, Fazeli H, Sharafi SM, Mirhendi H, Chadeganipour M, et al. Rapid differential diagnosis of vaginal infections using gold nanoparticles coated with specific antibodies. Med Microbiol Immunol 2019; 208(6): 773-80.
11. Vaezi A, Fakhim H, Khodavaisy S, Alizadeh A, Nazeri M, Soleimani A, et al. Epidemiological and mycological characteristics of candidemia in Iran: a systematic review and meta-analysis. J Mycol Med 2017; 27(2): 146-52.
12. Agnelli C, Valerio M, Bouza E, Guinea J, Sukiennik T, Guimarães T, et al. Prognostic factors of Candida spp. bloodstream infection in adults: A nine-year retrospective cohort study across tertiary hospitals in Brazil and Spain. Lancet Reg Health Am 2022; 6: 100117.
13. Charsizadeh A, Mirhendi H, Nikmanesh B, Eshaghi H, Rahmani M, Farhang A, et al. Candidemia in children caused by uncommon species of Candida. Arch Pediatr Infect Dis 2018; 6(2): e11895.
14. Jabari SK, Chadeganipour M, Ghahri M, Mohammadi R. Etiologic agents of Candidemia in pediatric immunocompromised patients. Iran J Ped Hematol Oncol 2016; 6(4): 209-15.
15. Razzaghi R, Momen-Heravi M, Erami M, Nazeri M. Candidemia in patients with prolonged fever in Kashan, Iran. Curr Med Mycol 2016; 2(3): 20-6.
16. Alp S, Arikan-Akdagli S, Gulmez D, Ascioglu S, Uzun O, Akova M. Epidemiology of candidaemia in a tertiary care university hospital: 10-year experience with 381 candidaemia episodes between 2001 and 2010. Mycoses 2015; 58(8): 498-505.
17. Montagna MT, Caggiano G, Lovero G, De Giglio O, Coretti C, Cuna T, et al. Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). Infection 2013; 41(3): 645-53.
18. Cuenca-Estrella M, Bernal-Martinez L, Buitrago MJ, Castelli MV, Gomez-Lopez A, Zaragoza O, et al. Update on the epidemiology and diagnosis of invasive fungal infection. Int J Antimicrob Agents 2008; 32(Suppl 2): S143-7.

19. Berenguer J, Buck M, Witebsky F, Stock F, Pizzo PA, Walsh TJ. Lysis-centrifugation blood cultures in the detection of tissue-proven invasive candidiasis disseminated versus single-organ infection. Diagn Microbiol Infect Dis 1993; 17(2): 103-9.
20. Ness MJ, Vaughan WP, Woods GL. Candida antigen latex test for detection of invasive candidiasis in immunocompromised patients. J Infect Dis 1989; 159(3): 495-502.
21. Van Burik JH, Leisenring W, Myerson D, Hackman RC, Shulman HM, Sale GE, et al. The effect of prophylactic fluconazole on the clinical spectrum of fungal diseases in bone marrow transplant recipients with special attention to hepatic candidiasis. An autopsy study of 355 patients. Medicine (Baltimore) 1998; 77(4): 246-54.
22. Singer C, Kaplan MH, Armstrong D. Bacteremia and fungemia complicating neoplastic disease: a study of 364 cases. Am J Med 1977; 62(5): 731-42.
23. Kami M, Machida U, Okuzumi K, Matsumura T, Mori Si, Hori A, et al. Effect of fluconazole prophylaxis on fungal blood cultures: an autopsy-based study involving 720 patients with haematological malignancy. Br J Haematol 2002; 117(1): 40-6.
24. Thorn JL, Gilchrist KB, Sobonya RE, Gaur NK, Lipke PN, Klotz SA. Postmortem candidaemia: marker of disseminated disease. J Clin Pathol 2010; 63(4): 337-40.
25. Coletta G, Amendola V. Numerical modelling of the optical properties of plasmonic and latex nanoparticles to improve the detection limit of immuno-turbidimetric assays. Nanomaterials (Basel) 2021; 11(5): 1147.
26. Becker K, Almasri AS, Von Eiff C, Peters G, Heilmann C, Fegeler W. Systematic survey of nonspecific agglutination by Candida spp. in latex assays. J Clin Microbiol 2007; 45(4): 1315-8.
27. Bansod S, Bonde S, Tiwari V, Bawaskar M, Deshmukh S, Gaikwad S, et al. Bioconjugation of gold and silver nanoparticles synthesized by Fusarium oxysporum and their use in rapid identification of Candida species by using bioconjugate-nano-polymerase chain reaction. J Biomed Nanotechnol 2013; 9(12): 1962-71.
28. Einloo A, Dehghan P, Saluti M, Mirzaahmadi S. Specific identification of candida glabrata via colorimetric assay based on gold nanoparticles. J Isfahan Dent Sch 2015; 33(325): 231-41. [In Persian].
29. Zhao F, Niu L, Yan L, Nong J, Wang C, Wang J, et al. Establishment and application of multiple cross displacement amplification coupled with lateral flow biosensor (MCDA-LFB) for visual and rapid detection of Candida albicans in clinical samples. Front Cell Infect Microbiol 2019; 9: 102.
30. Hu S, Kang H, Gu F, Wang C, Cheng S, Gong W, et al. Rapid detection method for pathogenic Candida captured by magnetic nanoparticles and identified using SERS via AgNPs+. Int J Nanomedicine 2021; 16: 941-50.

DOI: *10.48305/jims.v40.i668.0248*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 40, No. 668, 4th Week, June 2022**

Received: 20.01.2022 Accepted: 05.03.2022 Published: 18.06.2022

Evaluation of Rapid Diagnosis of Candidemia by Agglutination Test Using Gold Nanoparticles

Zainab Mussaie[1], Hossein Yousofi-Darani[2], Hossein Hashemi[3], Iman Zareie[4], Parvin Dehghan[5]

Original Article

Abstract

Background: Candidemia showed high morbidity and mortality and should be diagnosed immediately. The aim of this study was to provide a simple and rapid method for direct detection of *Candida* in the blood, using conjugated antibodies with gold nanoparticles by *the*agglutination method.

Methods: In this study, yeast species isolated from 40 blood samples of patients tested by the BACTEC method were used. After identifying the etiologic agents by morphological and molecular methods, a mixture of yeast antigens was prepared. Briefly, a mixture of antigens was prepared from the *Candida* isolates detected from candidemia, and injected into healthy rabbit skin with complete adjuvant to produce antibodies. After injecting the incomplete adjuvant in four reminders, blood samples and serum were finally prepared from the rabbit. Antibody production and its efficacy were confirmed by ELISA method. Gold nanoparticles were chemically conjugated with antibodies. For rapid diagnosis of candidemia, the nanoparticle method was examined on the blood of four patients and blood contaminated with a certain number of *Candida* yeasts in the laboratory.

Findings: *Candida albicans* was the most common etiologic agent of candidemia, followed by *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* complex. In determining the *off-cut* nanoparticle method, the least yeast detectable in the patient's blood was one yeast. The sensitivity and specificity of the nanoparticle method for detecting *Candida* in the blood of four patients compared to blood culture was 100%.

Conclusion: Under our laboratory conditions, if testing 15 µl blood of a suspected patient to candidemia containing one yeast or even just *Candida* antigens *exposed* to 35 microliters of the *nanoparticles* conjugated antibodies, it shows agglutination during one minute.

Keywords: Candidemia; Nanoparticles; Agglutination; Antibody

Citation: Mussaie Z, Yousofi-Darani H, Hashemi H, Zareie I, Dehghan P. **Evaluation of Rapid Diagnosis of Candidemia by Agglutination Test Using Gold Nanoparticles.** J Isfahan Med Sch 2022; 40(668): 248-55.

1- MSc Student of Medical Mycology, Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Professor, Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- PhD in Medical Parasitology, Shahrekord Blood Transfusion Organization, Shahrekord, Shahrekord, Iran
4- MSc Student of Medical Mycology, Mycology and Parasitology Department, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- Associate Professor, Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Parvin Dehghan, Associate Professor, Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: dehghan@med.mui.ac.ir