DOI: 10.48305/jims.v42.i766.369

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهل و دوم/شماره‌ی ۷۶۶/هفته‌ی دوم تیر ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۲۱ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۰۳ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۳/۰۴/۱۵

تعیین فراوانی انواع مخمرهای بیماری‌زا در نمونه‌های بالینی ادرار و ردیابی مخمر *ترایکوسپورون* با استفاده از نانوذرات طلا

ایمان زارعی[۱]، حسین یوسفی دارانی[۲]، پروین دهقان[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: شناسایی و درمان به موقع *ترایکوسپورونوزیس* به علت شدت بیماری‌زایی و درمان متفاوت از کاندیدیازیس و در نتیجه مرگ و میر بالای آن اهمیت دارد. در این مطالعه علاوه بر تعیین میزان فراوانی این قارچ در نمونه‌های بالینی ادرار با استفاده تجربه‌های گذشته در کارکرد نانوذرات طلا، شناسایی این مخمر بر اساس روش‌های سرولوژیک جهت تشخیص سریع مخمر قارچ در نمونه ادرار ارائه شده است.

روش‌ها: تعداد ۲۴۹ نمونه از افراد مشکوک عفونت قارچی ادرار با استفاده از روش‌های مورفولوژیک و مولکولی PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. از گونه‌های مختلف *ترایکوسپورون*، سوسپانسیون آنتی‌ژنی تهیه شد. این مخلوط به همراه ادجوانت کامل به خرگوش سالم تزریق گردید پس از تزریق ۴ نوبت یادآور به همراه ادجوانت ناقص، از خرگوش خونگیری شد. توانایی آنتی‌بادی ایجاد شده‌ی سرم خرگوش با استفاده از روش الایزا تأیید گردید. سپس آنتی‌بادی ضد قارچ به صورت شیمیایی در سطح نانوذرات طلا قرار داده شد و عملکرد روش مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: گونه‌های *کاندیدا گلابراتا* و *آلبیکنس* بیشترین فراوانی مخمر در نمونه‌های بالینی ادرار را داشتند. در این میان تعداد ۴ نمونه (۱/۶ درصد) *ترایکوسپورون* در ادرار گزارش شد. حساسیت و ویژگی روش نانوذرات طلا در شناسایی *ترایکوسپورون* ۱۰۰ درصد تعیین شد.

نتیجه‌گیری: فراوانی *ترایکوسپورون* در نمونه‌ی بالینی ادرار در بازه‌ی زمانی پژوهش ۱/۶ درصد بود. در این پژوهش، دیابت و بیماری کرونا بیشتر عامل زمینه‌ای بودند، که پژوهش‌های مشابه نقش این عوامل را تأیید می‌کنند. روش سرولوژیک بر اساس نانوذرات طلا در مطالعات دیگری نیز در تشخیص عوامل بیماری‌زا استفاده شد.

واژگان کلیدی: *ترایکوسپورون*؛ عفونت دستگاه ادراری؛ نانو ذرات؛ PCR

ارجاع: زارعی ایمان، یوسفی دارانی حسین، دهقان پروین. **تعیین فراوانی انواع مخمرهای بیماری‌زا در نمونه‌های بالینی ادرار و ردیابی مخمر *ترایکوسپورون* با استفاده از نانوذرات طلا.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۳؛ ۴۲ (۷۶۶): ۳۶۹-۳۷۶.

مقدمه

ترایکوسپورون، قارچی مخمری از خانواده‌ی بازیدیومایست ها ست، این قارچ در طبیعت به صورت گسترده وجود دارد و عمدتاً در مناطق استوایی و گرم یافت می‌گردد. این قارچ عامل بیماری پیدرای سفید می‌باشد، در این بیماری *ترایکوسپورون* به صورت گره‌هایی سفید رنگ بر روی ساقه‌ی مو ظهور می یابد (۱). همچنین گونه های *ترایکوسپورون*، عامل پنومونی آلرژیک و به ندرت بیماری‌های مهاجم گزارش شده است. موارد متعددی از عفونت های سیستمیک آن در افراد دارای نقص ایمنی، بیماران سرطانی، افراد دچار سوختگی، دریافت‌کنندگان عضو، بیماران تحت درمان با استروئیدها و به خصوص افراد دارای بدخیمی‌های خونی مشاهده شده است (۲-۴). مخمر های *ترایکوسپورون* در نمونه های ادراری و خونی نمای میکروسکوپی مشابهی با گونه‌های *کاندیدا* دارند، از سوی دیگر درمان تریکوسپورونوزیس با درمان‌های متداول کاندیدیازیس متفاوت است. در درمان موارد سیستمیک و منتشره‌ی کاندیدیازیس بیشتر از داروهای آمفوتریسین B، فلوکونازول و فلوسیتوزین استفاده می‌گردد، این داروها نتایج متفاوتی در درمان بیماری تریکوسپورونوزیس داشته و داروهای وریکونازول و پوسوکونازول نتایج بهتری در درمان این

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ‌شناسی 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

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

Email: dehghan@med.mui.ac.ir

بیماری داشته‌اند (۵-۷). فاکتورهای ویرولانس متعددی در قارچ *ترایکوسپورون* مشاهده شده است. یکی از آن‌ها، توانایی قارچ در ایجاد بیوفیلم یا زیست لایه می‌باشد. قارچ از طریق ایجاد زیست لایه در سطح وسایل و تجهیزات پزشکی نظیر کتترهای عروقی و سوندهای ادراری و لوله‌های تراشه می‌چسبد و از خود در برابر استرس‌های فیزیکی نظیر خشکی و کاهش pH و داروهای ضدقارچی نظیر آمفوتریسین B، کاسپوفانژین، فلوکونازول و وریکونازول محافظت می‌کند. بنابر این بیمارانی که از این وسایل مصنوعی استفاده می‌کنند، در معرض خطر هستند (۸، ۹).

روش‌های شناسایی این قارچ روش‌های فنوتیپی و مولکولی، روش جستجوی آنتی‌ژنی و بررسی پروتئین‌های قارچ می باشد. در روش فنوتیپی، مشخصات میکروسکوپی و ماکروسکوپی قارچ و همچنین مشخصات بیوشیمیایی مخمر نظیر جذب و تخمیر قندها برر سی می‌گردد. قارچ در محیط سابورو دکستروز آگار کلنی‌هایی با قوام خامه‌ای سفید رنگ تا زرد ایجاد می‌کند که مدتی بعد قسمت مرکزی برآمده و چین خورده می شود و شباهت بسیار زیادی به کلنی سایر مخمرها به ویژه کلنی‌های *کاندیدا* دارد. در محیط کورن میل آگار توئین ۸۰ هایفا های حقیقی و کاذب همراه با بلاستوکونیدی و آرتروکونیدی می‌کند که ممکن است با آرتروکونیدی قارچ ژئوتریکوم اشتباه گرفته شود. روش‌های مولکولی بر اساس تجزیه و تحلیل محتوای ژنی سلول ما را در تشخیص سلول‌ها یاری می‌کنند. روش جستجوی آنتی‌ژنی بر پایه‌ی شناسایی آنتی‌ژن‌هایی نظیر بتا دی‌گلوکان در سلول‌های قارچی استوار است. یکی از روش‌های جدید روش پروتئونومی است که بر اساس شناسایی محتوای پروتئینی نمونه با استفاده اسپکترومتری حجیم تشخیص را امکان‌پذیر می‌سازد (۱۰).

هدف از پژوهش حاضر، تعیین میزان *ترایکوسپورونوری* و شناسایی آن به روش سرولوژی با استفاده از نانو ذرات طلا می‌باشد. در این روش، آنتی‌بادی ضد قارچ به صورت شیمیایی، در سطح نانوذرات طلا قرار داده می‌شود. سپس از طریق واکنش بین آنتی‌بادی متصل به نانوذره و آنتی‌ژن قارچ موجود در نمونه واکنش مشاهده می‌گردد.

روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه تشخیصی و کاربردی بوده که هدف از آن ارائه یک روش سریع در تشخیص *ترایکوسپورونوری* می‌باشد. جمعیت مورد مطالعه نمونه‌های ادرار مشکوک به عفونت قارچی ارسال شده آزمایشگاه بیمارستان الزهرا (س) از مهرماه سال ۱۳۹۹ تا مهرماه سال ۱۴۰۰ می‌باشد. تمامی بخش کار با حیوانات زیر نظر اساتید محترم با رعایت اصول اخلاقی صورت گرفت. در زمینه‌ی کار با نمونه‌های بالینی در مورد بیماران هوشیار از خود بیمار و در مورد بیماران غیرهوشیار از همراهان بیمار پرسش‌نامه جهت اجازه‌ی مطالعه تهیه گردید. این مقاله در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان با کد اخلاق IR.MUI.MED.REC.1399.222 به تصویب رسیده است.

۱- بررسی فراوانی قارچ

کشت و بررسی خواص ماکروسکوپی و میکروسکوپی: نمونه‌ها در محیط سابورودکستروزآگار حاوی کلرامفنیکل و محیط کروم آگار (Bio Life, Italy) کشت داده شدند. ویژگی های ماکرو سکوپی و میکرو سکوپی کلنی‌های قارچی برر سی شده و ثبت گردید. در ادامه کلنی های قارچ جدا و در آب مقطر استریل برای مراحل بعدی پژوهش نگهداری شد. با استفاده از نتایج حاصل از مشاهدات میکروسکوپی و نتایج حاصل از کشت برروی محیط کروم آگار تعداد ۱۸۳ گونه تشخیص داده شد و تعداد ۶۲ مورد که قابل تشخیص با استفاده روش فوق نبودند از روش PCR-RFLP جهت تشخیص استفاده شد. در این میان تعداد ۴ نمونه مشکوک به قارچ *ترایکوسپورون* نیز برای توالی یابی انتخاب شدند.

استخراج DNA: در این پژوهش از جوشاندن برای استخراج ماده ژنتیک سلول استفاده شد. برای این کار یک لوپ از کلنی تازه قارچ در میکروتیوب حاوی ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ لاندا آب مقطر استریل حل شد. میکروتیوب در بن ماری آب جوش ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گشت. مایع رویی به دقت جدا شد و به میکروتیوب جدید انتقال داده شد و برای ادامه‌ی مراحل در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت (۱۱).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR: جهت انجام PCR تکثیر قطعات ژنی ITS1 و ITS4 صورت گرفت. حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. ۱۰ میکرولیتر از Mastermix 2X، ۱ میکرولیتر پرایمر ITS1 با غلظت ۱۰ پیکومول، ۱ میکرولیتر پرایمر ITS4 با غلظت ۱۰ پیکومول، ۲ میکرولیتر DNA و ۶ میکرولیتر آب مقطر استریل دیونیزه به یک میکروتیوب اضافه شد.

توالی پرایمرها به شرح زیر است:

ITS1: 5′TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3′
ITS4: 5′TCCTCCGCTTATTGATATGC 3′

برای دستگاه ترمو سایکلر یک سیکل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، و ۳۵ سیکل به صورت ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه تعریف شد (۱۱).

الکتروفورز: جهت حصول اطمینان از استخراج صحیح DNA از محصول PCR الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۵ درصد صورت گرفت.

فرایند PCR-RFLP: در این مرحله، حجم واکنش ۱۵ میکرولیتر تعیین شد و ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۱/۵ میکرولیتر بافر X10، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم MspI و ۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه به میکروتیوب اضافه شده و به مدت ۹۰ در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد (۱۲).

الکتروفورز محصولات PCR-RFLP: در این مرحله نمونه PCR-RFLP در ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و باندهای ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت.

توالی‌یابی نمونه‌های *ترایکوسپورون*: نمونه‌های مشکوک به قارچ *ترایکوسپورون* جهت توالی‌یابی جداسازی شد.

تخلیص محصول PCR جهت توالی‌یابی: برای این منظور دو برابر حجم نمونه PCR به نمونه الکل مطلق اضافه شد. سپس میکروتیوب به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی خارج شده و ۲۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به نمونه اضافه شد. جهت بررسی کیفیت نمونه، نمونه‌ها را بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتوفورز کرده و کیفیت باندهای ایجاد شده بررسی شدند. سپس نمونه‌ها جهت تعیین توالی به آزمایشگاه جامع تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ارسال گردید.

نتایج توالی‌یابی: از طریق سایت NCBI و نرم‌افزار BLAST توالی‌یابی انجام شد و تشخیص نهایی ثبت گردید.

۲- روش سرولوژی با استفاده از نانوذره

تهیه‌ی آنتی‌ژن *ترایکوسپورون*: از گونه‌های قارچی *ترایکوسپورون* از مطالعه پیشین که تعیین گونه شده بودند، سوسپانسیون غلیظ تهیه شد. در طول یک هفته، نمونه‌ها با استفاده از روش فریز و ذوب ۵ بار ذوب شده و هر بار با استفاده از دستگاه سونیکاتور به مدت ۳۰ دقیقه سونیکه شدند. با استفاده از میکروسکوپ تخریب دیواره‌ی سلولی قارچ‌ها بررسی شد. همچنین با استفاده از روش Bradford میزان پروتئین آنتی‌ژن موجود در نمونه بررسی شد (۱۳).

تهیه‌ی آنتی‌بادی ضد *ترایکوسپورون*: یک عدد خرگوش بالغ برای این پژوهش تهیه شد. ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون آنتی‌ژنی قارچ با ادجوانت کامل فروند ترکیب کرده و به مدت ۳۰ دقیقه به وسیله میکسر به خوبی مخلوط شد. ترکیب حاصل به صورت زیر جلدی به صفاق خرگوش تزریق شد و هر دو هفته یکبار سه تزریق دوز یادآور با استفاده از ادجوانت ناقص فروند صورت گرفت. یک هفته پس از آخرین دوز با استفاده از سرنگ از قلب خرگوش خون‌گیری شد. نمونه به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و سرم خرگوش جداسازی در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۳).

الایزا: جهت اطمینان از تولید مناسب وکافی آنتی‌بادی توسط خرگوش مناسب، از آزمایش الیزا استفاده شد. ابتدا چاهک‌های پلیت ۳ مرتبه با محلول شستشو (۴/۲۵ گرم NaCl با ۲۵۰ میکرولیتر توئین ۲۰ در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) شسته شد. آنتی‌ژن قارچ با استفاده از بافر پوشاننده (۰/۸ گرم کربنات سدیم Na2CO3 به همراه ۱/۴۸ گرم سدیم هیدورژن کربنات در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به نسبت‌های ۱/۲، ۱/۴ تا غلظت ۱/۱۲۸ رقیق شده و ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت داخل ۳ چاهک ریخته شد. پلیت به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به مدت یک شب در دمای ۸-۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. محتویات داخل چاهک‌ها تخلیه شده و سه بار شستشو شد. ۲۰۰ میکرولیتر آلبومین ۱/۱۰۰ رقیق شده با بافر انکوباسیون به چاهک‌های پلیت اضافه شده و پلیت به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. چاهک‌های پلیت، ۳ بار شستشو شد. دو نمونه سرم خرگوش دارای آنتی‌بادی وکنترل منفی با استفاده از محلول انکوباسیون (۱۲۵ میکرولیتر محلول توئین ۲۰ همراه ۲۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین) نسبت ۱/۱۰۰ رقیق گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت‌ها در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد.

محتویات تخلیه شده و پلیت ۳ بار شستشو داده شد. محلول کنژوگه شده با آنزیم HRP (Horseradish peroxidase) با استفاده از بافر انکوباسیون به نسبت ۱/۱۰۰ رقیق شده و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شده و پلیت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. بار دیگر پلیت شستشو داده شد. ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا حاوی تترامتیل بنزیدین (TMB Stabilized Substrate) به هر چاهک اضافه شد. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (اسید سولفوریک ۲ نرمال) به هر چاهک اضافه و جذب چاهک ها در ۴۵۰ نانومتر با استفاده از الایزا ریدر خوانش شد. نتایج نشان دهنده‌ی تولید قابل توجه آنتی‌بادی در خرگوش بود. برای تخلیص آنتی‌بادی موجود در سرم خرگوش از روش رسوب پروتئین در نمک آمونیوم سولفات اشباع استفاده شد.

ساخت نانوذرات طلا متصل به آنتی‌بادی ضد *ترایکوسپورون*: تهیه و اتصال نانوذرات طلا به آنتی‌بادی ضد قارچ مطابق روش Hashemi و همکاران در سال ۲۰۱۹، انجام گردید (۱۳).

تعیین Cut off روش: جهت تعیین حساسیت روش، از کلنی‌های گونه‌های مختلف قارچ سوسپانسیون تازه انجام شد، سپس یک لوپ پر از هر نمونه در ۵ سی‌سی آب مقطر استریل به خوبی حل شد. با استفاده لام نئوبار تعداد مخمر موجود در آب مقطر شمارش شد و با استفاده از سرم فیزیولوژی از مخمر غلظت‌های 10^{1}، 10^{2}، 10^{3}، 10^{4}، 10^{5} تهیه شد. از هر غلظت ۳۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از سمپلر برداشت کرده و روی یک لام شیشه تمیز و تازه قرار

گرفت سپس هر بار مقادیر مختلف (۳۰ و ۵۰ میکرولیتر) از معرف یعنی نانوذرات طلا متصل به آنتی‌بادی به هر کدام اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه لام شیشه‌ای رو روتاتور قرار گرفت. لام با استفاده از یک زمینه‌ی سیاه و با چشم غیرمسلح و سپس میکروسکوپ نمونه‌ها از نظر آگلوتیناسیون مورد بررسی قرار گرفت. جهت کنترل منفی از سوسپانسیون مخمر *کاندیدا* استفاده شد.

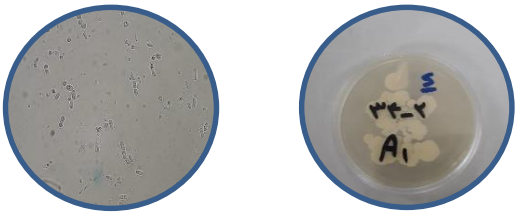
یافته‌ها

نتایج پژوهش نشان داد، فراوانی عفونت قارچی در رده‌ی سنی بالای ۶۰ سال (۶۴/۷ در صد) بیشترین فراوانی را داشت. از ۲۴۹ نمونه‌ی وارد شده در پژوهش ۲۱۲ نمونه (۸۵ درصد) مربوط به بیمارستان بستری و بقیه مربوط به بیماران سرپایی بود. توزیع فراوانی عفونت قارچی مجاری ادرار (funguria) در بخش‌های مختلف بیمارستان الزهرا(س) بیانگر این بود که بخش ICU با ۳۹/۸ درصد بیشترین موارد فونگوری را داراست همچنین بخش‌های اتاق عمل، اطفال و عفونی کمترین فراوانی (۰/۴) را دارند. همچنین پژوهش نشان داد افراد مبتلا به دیابت با ۲۹/۳ در صد و کرونا با ۲۵/۳ در صد، بیشترین بیماری زمینه‌ای افراد بستری در بیمارستان بود (جدول ۱).

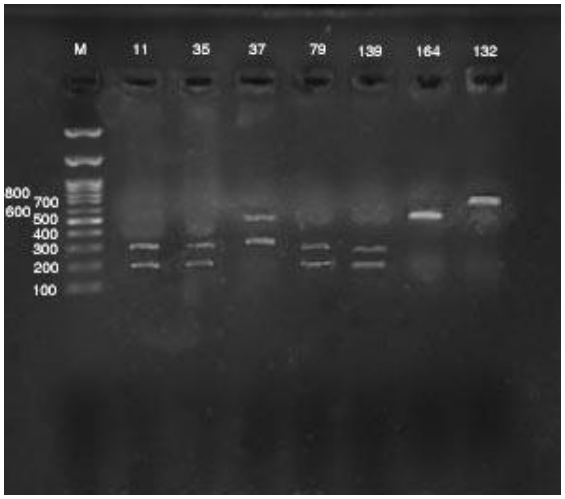
جدول ۱. توزیع فراوانی بیماری‌های زمینه‌ای بر اساس عفونت قارچی ادرار

بیماری زمینه‌ای	فراوانی	درصد فراوانی
کرونا	۶۳	۲۵/۳
دیابت	۷۳	۲۹/۳
مشکل کلیوی	۲۱	۸/۴
سرطان	۷	۲/۸
خونریزی گوارشی	۲	۰/۸
عفونت باکتریایی ادرار	۵	۲
تروما	۱	۰/۴
جراحی	۳	۱/۲
سپتی سمی	۳	۱/۲
مشکلات قلبی- عروقی	۳	۱/۲
هیدروسفالی	۴	۱/۶
آبسه اطراف لوزه	۱	۰/۴
سقط جنین	۱	۰/۴
تومور مغزی	۲	۰/۸
تنگی نفس	۱۰	۴
کاهش سطح هوشیاری	۱	۰/۴
پیوند کلیه	۳	۱/۲
بدون بیماری زمینه‌ای شناخته شده	۱۱۰	۴۴/۲

تعداد ۱۵۵ نمونه (۶۲/۲ درصد) متعلق به زنان و ۹۴ نمونه (۳۷/۸ درصد) به مردان تعلق داشت. نتایج حاصل از تشخیص عوامل عفونت قارچی مجاری ادرار بر اساس روش‌های فنوتیپی و مولکولی نشان داد که فراوانی گونه‌های مختلف بصورت کاندیدا گلابراتا (۴۱/۷ درصد)، کاندیدا آلبیکنس (۳۶/۵ درصد)، کاندیدا کروزه‌ای (۷/۶ درصد)، کاندیدا پاراپسیلوزیس (۵/۲ درصد)، کاندیدا کفایر (۵/۶ درصد)، کاندیدا تروپیکالیس (۱/۶ درصد) و *تراکوسپورون* آساهی (۱/۶ درصد) بود. شکل کلنی و نمای میکروسکوپی کلنی‌های *تراکوسپورون* در شکل ۱ مشاهده می‌گردد. همچنین قطعات DNA حاصل از تأثیر آنزیم MspI بر روی ژل آگارز در *کاندیداهای* جدا شده از ادرار در شکل ۲ مشاهده می‌گردد.



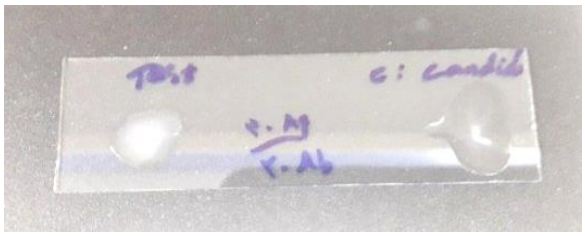
شکل ۱. نمای ماکروسکوپی کلنی (سمت راست) و میکروسکوپی مخمر *تراکوسپورون* (سمت چپ)



شکل ۲. قطعات DNA حاصل از تأثیر آنزیم MspI بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد شماره‌های ۱۱، ۳۵، ۷۹ و ۱۳۹ کاندیدا آلبیکنس (۲۳۷ bp و ۲۹۷)، شماره‌ی ۳۷ کاندیدا گلابراتا (۳۱۴ bp و۵۱۷)، شماره‌ی ۱۶۴ کاندیدا پاراپسیلوزیس (۵۲۰ bp) و شماره‌ی ۱۳۲ کاندیدا کفایر (۷۲۲ bp) تشخیص داده شد.

در روش سرولوژی، نانوذرات طلا هر ۴ نمونه ادرار واجد *تراکوسپورون* مثبت دارای اگلوتیناسیون و با کنترل *کاندیدا* و رودوتورولا منفی و فاقد اگلوتیناسیون مشاهده شد. همچنین نتایج Cut

off نشـان داد اگر یک مخمر در ۵ میکرولیتر ادرار وجود داشـته باشـد روش نانوذرات قادر به شناسایی آن خواهد بود. برای این منظور اگر ۵۰ میکرولیتر ادرار بر روی یک اسـلاید شـیشـه‌ای تمیز قرار بگیرد و ۵۰ میکرولیتر معرف نانوذرات طلا متصل به آنتی‌بادی ضد *ترایکوسپورون* به آن اضافه شده به مدت ۲ دقیقه بر روی شیکر قرار بگیرد آگلوتیناسیون با چشـم غیر مسـلح قابل مشـاهده خواهد بود. آگلوتناسـیون معرف (نانوذرات طلا متصـل به آنتی‌بادی) با آنتی‌ژن *ترایکوسـپورون* و کنترل منفی (*کاندیدا*) در شکل ۳ نمایش داده شده است.



شکل ۳. آگلوتیناسیون نانوذرات طلا متصل به آنتی‌بادی با آنتی‌ژن قارچ

بحث

در این پژوهش، از نانوذرات طلا برای ساخت معرف جهت شناسایی سـریع قارچ *ترایکوسـپورون* اسـتفاده شـد. Hashemi و همکاران در سـال ۲۰۱۹ از این روش در تشـخیص کاندیدیازیس واژینال اسـتفاده کرده بودند (۱۳).

در پژوهش مشابهی که در سال ۲۰۰۷ تا ۲۰۰۹ توسط Mattede و همکاران در برزیل انجام شد، فراوانی *ترایکوسپورونوروی* در بخش ICU در حدود ۶ درصـد گزارش شـد (۱۴). در مطالعه‌ی حاضـر، فراوانی *ترایکوسـپورونوری* در بیمارسـتان الزهرا در بازه‌ی زمانی پژوهش حدود ۲ درصد بود.

در پژوهشی که توسط Bizuayehu و همکاران در اتیوپی انجام شـد، اسـتفاده از کتتر ادراری، عامل ۵۱/۴ درصـد از عفونت قارچی معرفی گردید (۱۵). در پژوهش ۲ نمونه از ۴ نمونه ترایکوسـپورون جدا شده از بیماران مربوط به بیمارانی بود که از کتتر ادراری استفاده می‌کردند. در بین عوامل زمینه‌ای در بیماران دارای عفونت قارچی ادرار، دیابت و کرونا به ترتیب با ۲۹/۳ و ۲۵/۳ در صد بیشترین عامل بودند و بعد از آن‌ها افراد دارای اختلالات کلیوی (۸/۴ درصـد) قرار داشـتند. دیابت از طریق ایجاد ضـعف سـیسـتم ایمنی، یکی از عوامل مستعدکننده در ایجاد بیماری‌های فرصت‌طلب بود (۱۶).

در مطالعه‌ی Bassiri Jahromi و Khaksar در تهران بر روی انواع قارچ‌ها در بیماران دارای نقص سـیسـتم ایمنی، بیشـترین قارچ، *کاندیدا* با ۶۹/۴ درصـد گزارش شـد. بیشـتر آنها از پوسـت، مجاری ادراری و مجاری تنفسـی جدا شـده اسـت. بیشـترین بیماری زمینه‌ای مشابه مطالعه‌ی ما، دیابت گزارش شده است که با ۲۸/۴ درصد، یک فاکتور خطر مهم در بیماران به شمار می‌آید (۱۷).

Li و همکاران در سـال ۲۰۲۰، با بررسـی عفونت‌های ناشـی از *ترایکوسپورون* آسیاهی در طی ۲۳ سال، نشان دادند بیماری‌های خونی بیشترین عامل زمینه‌ای در ایجاد بیماری هستند (۶). پژوهش‌ها نشان داد، در همه‌گیری بیماری کرونا به دلیل بسـتری طولانی‌مدت بیماران، استفاده از داروهای کروتیکواستروئیدها و استفاده از سوندهای ادراری موارد ابتلا به عفونت قارچی افزایش می‌یابد (۱۸-۲۰). در مطالعه‌ی Haghighatfard و همکـاران، ۱۸ مورد کلنیزاسـیون مخمری در نمونه‌های ادراری گزارش شد که شایع‌ترین گونه ها به ترتیب *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* بود. ۹۳ درصد از بیماران آنتی‌بیوتیک‌های وسـیع‌الطیف و ۱۲ درصـد نیز مصـرف کورتیکواسـتروئید داشـتند و این عوامل دارویی باعث تشـدید کلینزاسـیون مخمری در بیماران شـده بود. کنترل عوامل مخمری در بیماران بسـتری با شـرایط حاد میتواند به مدیریت صـحیح بیماری و کاهش مرگ و میر بیانجامد. با این حال مهم‌ترین ریسـک فاکتورها در ایجاد کلنیزاسیون مخمری استفاده از کاتتر وریدی، تنفس مکانیکی و سوندهای ادراری می‌باشد (۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر، شناسایی عامل عفونت قارچی ادرار بر اساس روش های فنوتیپی (برای محیط سـابورو دکسـتروز آگار حاوی کلرافنیکل و کروم آگار) و مولکولی (روش PCR-RFLP و تعیین توالی) صـورت گرفت و بیشـترین عامل عفونت ادرار بر اسـاس داده‌های پژوهش گونه‌های مختلف جنس *کاندیدا* بودند. از این میان، گونه گلابراتا با ۴۱/۷ درصـد و *آلبیکنس* با ۳۶/۵ درصـد، بیشـترین موارد ایجاد عفونت قارچی را به خود اختصـاص دادند. که این داده‌ها با نتایج پژوهش بهمئی و همکاران که در آن فراوانی کاندیدوری به ترتیب برای قارچ *کاندیدا گلابراتا* و *آلبیکنس* ۴۱/۳ و ۳۵ درصـد گزارش شده بود، مطابقت داشت.

اما Haghighatfard و همکاران، گونه *آلبیکانس* را غالب در کاندیدوری گزارش کردند (۲۱). فراوانی *کاندیدا* گلابراتا و *آلبیکنس* در ادرار، در پژوهش آزاد و همکاران به ترتیب ۴۲/۸ و ۲۱/۴ درصـد می‌باشد (۲۲، ۲۳).

Khan و همکاران در سال ۲۰۱۲، نانوذرات طلا را با استفاده از روش‌های فیزیوشیمیایی مورد بررسی قرار دادند (۲۴).

یکی از نانوذراتی که به صـورت گسـترده در تشـخیص‌های سرولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. نانوذرات لاتکس هستند. این ذرات به دلیل قیمت پایین‌تر نسبت به سایر مواد مورد توجه هستند. این ذرات به دلیل بار سطحی و ماهیت آب دوست یا آب گریز بودن می‌توانند باعث ایجاد واکنش‌های غیراختصـاصـی با ذرات عفونی و

دیگر ذرات گردند. گاهی برای ایجاد واکنش‌هایی که بتوان آن‌ها را با چشم غیر مسلح مشاهده گردد. نیاز است که از ذرات لاتکس بزرگتر استفاده شود. این ذرات بزرگ‌تر به دلیل بار سطحی با یکدیگر واکنش داده و منجر به تجمع و مشکلاتی در نگهداری از این مواد برای طولانی‌مدت می‌گردد (۲۵). نانوذرات طلا به واسطه نسبت سطح به حجم بالا توانایی اتصال به تعداد بیشتری لیگاند دارند که باعث می‌گردد پیوند مؤثرتری با ذرات داشته باشند. این ذرات دارای چگالی بالایی بوده که باعث سهولت در تشخیص واکنش آن‌ها با ذرات دیگر با چشم غیر مسلح می‌گردد (۲۶).

Hashemi و همکاران، اختصاصیت و حساسیت این روش را در تشخیص عفونت واژینال ناشی از *کاندیدا* را ۱۰۰ درصد گزارش کردند (۱۳). عینلو و همکاران در سال ۲۰۱۳، از نانوذرات طلا برای تشخیص *کاندیدا گلابراتا* بر پایه‌ی رنگ‌سنجی استفاده کردند (۲۷).

در پژوهشی که در سال ۲۰۲۲ توسط موسایی و همکاران انجام شد، از نانوذرات طلا برای شناسایی کاندیدمی استفاده شد (۲۸). در آن پژوهش مانند پژوهش حاضر از روش Hashemi و همکاران استفاده گردید (۱۳). نمونه‌ی مورد مطالعه در آن پژوهش، نمونه‌ی کشت خون بیماران بود. حساسیت و اختصاصیت روش کار در پژوهش موسایی و همکاران، ۱۰۰ درصد گزارش شد (۲۸).

Hu و همکاران در سال ۲۰۲۱ از نانوذرات نقره در تشخیص *کاندیدا* استفاده کردند (۲۹). در این پروژه از روش ساخت نانوذرات طلایی که Hashemi و همکاران در پژوهش خود استفاده کردند (۱۳)، برای تشخیص قارچ *تریکوسپورون* استفاده شد. نتایج حاصل از انجام روش نانو ذره طلا در مطالعه‌ی حاضر با مطالعات Hashemi و همکاران (۱۳) و موسایی و همکاران (۲۸) کاملاً همخوانی داشته و ۱۰۰ درصد قادر به تشخیص جنس *تریکوسپورون* از سایر مخمرها می‌باشد.

تحقیقات نشان داده است، ژن‌های ریبوزومی شامل مناطق ژنی حفظ شده D1/D2 از srDNA۲۸ و مناطق ژنی متغیر ITS و IGS1 می‌توانند بهترین شاخص برای شناسایی گونه های مختلف *تریکوسپورون* باشد. برخلاف این دستاوردها در حوزه‌ی مولکولی و نیز کارآیی و دقت بالای آن‌ها، این روش‌ها گران قیمت بوده و نیاز به نیروی متخصص دارند (۱۰).

روش‌های آنتی‌ژنی نظیر تشخیص بتا دی‌گلوکان و گالاکتومنان در سال‌های اخیر به طور گسترده‌ای در بیماری‌های قارچی مهاجم مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این روش‌ها گرچه می‌تواند وجود عفونت قارچی را اثبات کنند اما اختصاصی عمل نمی‌کنند و در تمامی بیماران مبتلا به بیماری قارچی مقادیر افزایش یافته آن‌ها در سرم بیماران قابل ردیابی است. یکی دیگر از ایرادات روش آنتی‌ژن حساسیت پایین این روش است. مطالعه‌ی Suzuk و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داد که تنها در نیمی از فانگمی های *تریکو سپورون* این دو مارکر زیستی در خون بیماران قابل ردیابی است (۳۰).

یکی دیگر از روش‌ها، روش پروتئونومی است. در این روش از محتوای پروتئینی قارچ نظیر آنزیم‌ها و پروتئین ساختاری قارچ جهت شناسایی آن استفاده می‌شود. از معایب این روش می‌توان به بانک اطلاعاتی ناقص، هزینه‌ی بالا و نیز نیاز به نیروی متبحر اشاره کرد (۱۰).

نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر نیز همانند اغلب مطالعات در ایران، گونه‌های *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا آلبیکنس* از نظر فراوانی، شایع‌ترین گونه‌ها حتی در زمان شیوع کرونا گزارش گردید. همچنین مشخص شد که روش اتصال آنتی‌بادی ضد قارچ *تریکوسپورون* به نانوذرات طلا نسبت به سایر روش‌های تشخیصی می‌تواند امکان تشخیص قارچ را در مدت زمان کمتر و با سهولت بیشتری فراهم سازد. بررسی عملکرد روش در تشخیص قارچ *تریکوسپورون* در سایر نمونه بالینی در مطالعات بعدی توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر حاصل پایان‌نامه جهت اخذ کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۹۹۰۷ در رشته‌ی قارچ‌شناسی پزشکی می‌باشد. بدین‌وسیله از زحمات استاتید و مسئولان محترم دانشگاه علوم پزشکی اصفهان قدردانی می‌گردد.

References

1. Lima YP, Dias VC. Trichosporon spp.: what's new? Future Microbiol 2024; 19(5): 373-5.
2. Kourti M, Roilides E. Invasive trichosporonosis in neonates and pediatric patients with malignancies or hematologic disorders. Pathogens 2022; 11(2): 242.
3. Mukherjee DN, Seal S. P279 Invasive Trichosporonosis: an emerging blood stream fungal infection in immunocompromised patients. Medical Mycology 2022; 60(Suppl1): myac072P279.
4. Ramírez I, Moncada D. Fatal disseminated infection by Trichosporon asahii under voriconazole therapy in a patient with acute myeloid leukemia: A review of breakthrough infections by Trichosporon spp. Mycopathologia 2020; 185(2): 377-88.
5. Barantsevich N, Barantsevich E. Diagnosis and treatment of invasive candidiasis. Antibiotics (Basel) 2022; 11(6): 718.
6. Li H, Guo M, Wang C, Li Y, Fernandez AM, Ferraro TN, et al. Epidemiological study of Trichosporon asahii infections over the past 23 years. Epidemiol

Infect 2020; 148: e169.
7. Bourusly MJ, Adel Obaid M, Burahma M. Successful treatment of trichosporon asahii infection with combinationtherapy of voriconazole and liposomal amphotericin B in a child with acute lymphoblastic leukemia: a case report. Int J Med Invest 2022; 11(2): 157-66.
8. Malacrida AM, Corrêa JL, Barros ILE, Veiga FF, Pereira EdCA, Negri M, et al. Hospital Trichosporon asahii isolates with simple architecture biofilms and high resistance to antifungals routinely used in clinical practice. J Mycol Med 2023; 33(2): 101356.
9. Wongsuk T, Boonsilp S, Pumeesat P, Homkaew A, Sangsri T, Chongtrakool P. Genotyping, antifungal susceptibility testing, and biofilm formation of Trichosporon spp. isolated from urine samples in a University Hospital in Bangkok, Thailand. Acta Microbiol Immunol Hung 2022; 69(3): 247-57.
10. Mehta V, Nayyar C, Gulati N, Singla N, Rai S, Chandar J, et al. A comprehensive review of Trichosporon spp.: an invasive and emerging fungus. Cureus 2021; 13(8): e17345.
11. Kianipour S, Ardestani ME, 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(1): 66.
12. 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.
13. 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.
14. Mattede MdGS, Piras C, Mattede KDS, Ferrari AT, Baldotto LS, Assbu MSZ. Urinary tract infections due to Trichosporon spp. in severely ill patients in an intensive care unit. Rev Bras Ter Intensiva 2015; 27(3): 247-51.
15. Bizuayehu H, Bitew A, Abdeta A, Ebrahim S. Catheter-associated urinary tract infections in adult intensive care units at a selected tertiary hospital, Addis Ababa, Ethiopia. PLoS One 2022; 17(3): e0265102.
16. Berbudi A, Rahmadika N, Tjahjadi AI, Ruslami R. Type 2 diabetes and its impact on the immune system. Curr Diabetes Rev 2020; 16(5): 442-9.
17. Bassiri Jahromi S, Khaksar AA. Deep-Seated Fungal Infections in Immunocompromised Patients in Iran before and after Treatments. Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology 2005; 4(1): 27-32.
18. Hoenigl M, Seidel D, Sprute R, Cunha C, Oliverio M, Goldman GH, et al. COVID-19-associated fungal infections. Nat Microbiol 2022; 7(8): 1127-40.
19. Hughes S, Troise O, Donaldson H, Mughal N, Moore LS. Bacterial and fungal coinfection among hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study in a UK secondary-care setting. Clin Microbiol Infect 2020; 26(10): 1395-9.
20. 20. Prestel C, Anderson E, Forsberg K, Lyman M, de Perio MA, Kuhar D, et al. Candida auris outbreak in a COVID-19 specialty care unit—Florida, July–August 2020. Morbidity and Mortality Weekly Report 2021; 70(2): 56-7.
21. Haghighatfard A, Abbasi S, Alijani P, Akbari FA, Rashidi H, Dehghan P. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia in intensive care units in Isfahan, Iran. Curr Med Mycol 2022; 8(3): 30-4.
22. Azad M, Chabavizadeh J, Dehghan P, Mohammadi R. The frequency of candiduria in hospitalized patients at nephrology department, Labbafinejad hospital, Tehran, Iran [in Persian]. J Isfahan Med Sch 2017; 35(450): 1364-9.
23. Dehghan P, Bahmaei M, 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 [in Persian]. J Isfahan Med Sch 2016; 34(381): 484-90.
24. Khan S, Alam F, Azam A, Khan AU. Gold nanoparticles enhance methylene blue–induced photodynamic therapy: a novel therapeutic approach to inhibit Candida albicans biofilm. Int J Nanomedicine 2012; 7: 3245-57.
25. Becker K, Almasri AS, Von Eiff C, Peters G, Heilmann C, Fegeler W. Systematic survey of nonspecific agglutination by Candida spp. in latex assays. Journal of clinical microbiology. 2007;45(4):1315-8.
26. Khan MAR, Al Mamun MS, Habib MA, Islam AN, Mahiuddin M, Karim KMR, et al. A review on gold nanoparticles: biological synthesis, characterizations, and analytical applications. Results in Chemistry 2022; 4: 100478.
27. Einloo A, Dehghan P, Saluti M, Mirzaahmadi S. Specific identification of candida glabrata via colorimetric assay based on gold nanoparticles [in Persian]. J Isfahan Med Sch 2015; 33(325): 231-41.
28. Mussaie Z, Yousofi-Darani H, Hashemi H, Zareie I, Dehghan P. Evaluation of Rapid diagnosis of candidemia by agglutination test using gold nanoparticles [in Persian]. J Isfahan Med Sch 2022; 40(668): 248-55.
29. 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.
30. Suzuki K, Nakase K, Kyo T, Kohara T, Sugawara Y, Shibazaki T, et al. Fatal Trichosporon fungemia in patients with hematologic malignancies. Eur J Haematol 2010; 84(5): 441-7.

DOI: *10.48305/jims.v42.i766.369*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 42, No. 766, 2nd Week, July 2024**

Received: 09.04.2024 Accepted: 23.06.2024 Published: 05.07.2024

Determining the Frequency of Pathogenic Yeasts in Clinical Urine Samples and Tracking the *Trichosporon* Using Gold Nanoparticles

Iman Zareie [1], Hossein Yousofi Darani [2], Parvin Dehghan [2]

Original Article

Abstract

Background: Timely identification and treatment of trichosporonosis is consequential due to the severity of pathogenesis and different therapies for candidiasis and its high mortality. In this study, in addition to determining the abundance of this fungus in clinical urine samples using past experiences in the function of gold nanoparticles, identification of this yeast based on serological methods for rapid detection of yeast in urine samples has been presented.

Methods: 249 samples of people suspected of urinary fungal infection were analyzed using morphological and molecular PCR-RFLP methods. Antigenic suspension was prepared from different species of *Trichosporon*. This mixture was injected with a complete adjuvant to a healthy rabbit. After injecting four booster doses using incomplete adjuvant, blood was drawn from the rabbit. The anti-fungal antibody ability in the rabbit serum was confirmed using the ELISA method. Then, the antibody was placed chemically on the surface of gold nanoparticles, and the method's performance was investigated.

Findings: *C. glabrata and C. albicans* species were the most common yeasts isolated. Among isolated yeasts, four cases of *Trichosporon* in urinary samples (1.6%) were reported. In this study, diabetes and corona disease were the underlying factors, and similar studies confirm the role of these factors. The serological method based on gold nanoparticles has been used in other studies to detect pathogens.

Conclusion: The frequency of *trichosporon* in urine was 1.6% during the study period. In this study, diabetes and Coronavirus disease were the main predisposing factors, and similar studies confirm the role of these factors. The serological method based on gold nanoparticles has been used in other studies to detect pathogens.

Keywords: Trichosporon; Urinary tract infection; Nanoparticles; PCR

Citation: Zareie I, Yousofi Darani H, Dehghan P. **Determining the Frequency of Pathogenic Yeasts in Clinical Urine Samples and Tracking the *Trichosporon* Using Gold Nanoparticles.** J Isfahan Med Sch 2024; 42(766): 369-76.

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

Corresponding Author: Parvin Dehghan, Professor, Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: dehghan@med.mui.ac.ir