مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۳٤/هفته دوم خرداد ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱/۲۰

فراوانی گونه‌های جدید کاندیدا (کاندیدا ارتوپسیلوزیس و کاندیدا متاپسیلوزیس) در بین گروه کاندیدا پاراپسیلوزیس‌های جدا شده از بیماران با استفاده از ژن SADH و روش PCR-RFLP در ایران

رسول محمدی[۱]، دکتر سید حسین میرهندی[۲]، دکتر محمد حسین یادگاری[۳]، دکتر محمد قهری[۴]، دکتر شهلا شادزی[۵]، نیلوفر جلالی زند[۶]، دکتر محمد تقی هدایتی[۷]

خلاصه

مقدمه: کاندیدا ارتوپسیلوزیس و کاندیدا متاپسیلوزیس گونه‌های مخمری تازه کشف شده‌ای هستند که از لحاظ فنوتیپی از گونه‌ی کاندیدا پاراپسیلوزیس غیرقابل تشخیص می‌باشند. در مطالعه‌ی حاضر، با استفاده از روش‌های مولکولی فراوانی و انتشار کاندیدا ارتوپسیلوزیس و کاندیدا متاپسیلوزیس در بین جدایه‌های کاندیدا پاراپسیلوزیس در نمونه‌های مختلف بالینی در ایران بررسی شده است.

روش‌ها: DNA ژنومی مخمری ۹۳۵ جدایه‌ی مخمری با استفاده از فیلتر FTA از کشت تازه استخراج شد. ابتدا ناحیه‌ی ITS مخمرها با پرایمرهای عمومی ITS1 و ITS4 تقویت و پس از برش آنزیمی با MspI گروه کاندیدا پاراپسیلوزیس شناسایی شد. سپس ژن SADH تقویت و سه گونه‌ی کاندیدا پاراپسیلوزیس، متاپسیلوزیس و ارتوپسیلوزیس به کمک هضم آنزیمی با NlaIII افتراق داده شد.

یافته‌ها: در مجموع ۱۱۱ جدایه به عنوان گروه پاراپسیلوزیس شناسایی شد که از بین آن‌ها ۱۸ جدایه (۱۶/۲ درصد) کاندیدا ارتوپسیلوزیس و ۹۳ جدایه (۸۳/۷ درصد) کاندیدا پاراپسیلوزیس بودند. هیچ یک از جدایه‌ها به عنوان کاندیدا متاپسیلوزیس شناسایی نشد. بیشترین جدایه‌های کاندیدا ارتوپسیلوزیس مربوط به نمونه‌های ناخن بود.

نتیجه‌گیری: کاندیدا ارتوپسیلوزیس گونه‌ی کمیابی در ایران نبوده و به نظر می‌رسد تعداد زیادی از استرین‌هایی که ممکن است در ایران به عنوان کاندیدا پاراپسیلوزیس شناسایی شوند، در واقع گونه‌ی ارتوپسیلوزیس باشند.

واژگان کلیدی: کاندیدا ارتوپسیلوزیس،کاندیدا متاپسیلوزیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، PCR-RFLP، ایران.

مقدمه

کاندیدیازیس مجموعه‌ای از بیماری‌های حاد یا مزمن قارچی فرصت طلب است که توسط گونه‌های مختلف جنس کاندیدا (Candida) ایجاد می‌شود و می‌تواند ارگان‌های مختلفی مانند پوست، ناخن، مخاط، واژن و گاهی ارگان‌های عمیق بدن را مبتلا نماید (۱). از آن جا که بسیاری از این مخمرها میکرو فلورای طبیعی بدن می‌باشند، گاهی می‌توانند در افراد مستعد تکثیر یافته و ایجاد عفونت‌های کشنده‌ی سیستمیک نمایند (۲). جنس کاندیدا شامل حدود ۱۵۰ گونه می‌باشد که

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران.
[۲] دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌ی بهداشت و مؤسسه‌ی ملی تحقیقات سلامت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
[۳] دانشیار، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۴] استادیار، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران.
[۵] استاد، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۶] کارشناس، مؤسسه‌ی ملی تحقیقات سلامت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
[۷] استاد، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سید حسین میرهندی
Email: mirhendi@tums.ac.ir

www.mui.ac.ir

کاندیدا آلبیکنس عامل اصلی‌ایجاد کننده‌ی بیماری در انسان است اما از دهه‌ی ۱۹۹۰ میلادی تا کنون شیوع گونه‌های غیر آلبیکنسی رو به افزایش است (۳). در بین گونه‌های غیر آلبیکنسی کاندیدا پاراپسیلوزیس دومین گونه‌ی مخمری جدا شده از خون بیماران در آمریکای لاتین و آسیا می‌باشد (۵-۴). این مخمر پاتوژن فرصت‌طلبی است که با کلنیزه شدن بر روی پوست افراد باعث افزایش عفونت ها ی بیمارستانی می‌شود (۷-۶). مطالعات ژنتیکی بر روی گونه‌ی پاراپسیلوزیس نشان داده که این مخمر یک گونه‌ی هتروژن می‌باشد (۹-۸). همچنین پاره‌ای از تحقیقات نشانگر تغییرپذیری در بیماری‌زایی این مخمر از قبیل توانایی تولید بیوفیلم و ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌باشد (۱۱-۱۰). کاندیدا پاراپسیلوزیس پیش از این در سه تیپ I، II، III طبقه‌بندی می‌شد تا این که Tavanti و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر اساس تفاوت توالی تعداد زیادی از ژن‌ها، گروه پاراپسیلوزیس را به سه گونه‌ی پاراپسیلوزیس، ارتوپسیلوزیس و متاپسیلوزیس تقسیم کردند (۳). مطالعات تکمیلی حاکی از متغیر بودن مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این سه گونه بود (۱۳-۱۲). بنابراین تشخیص دقیق گونه‌های این گروه در مطالعات اپیدمیولوژیک موضوعی مهم تلقی شده و در نتیجه در پیش‌گیری و مهار این عفونت‌ها نقش به سزایی دارد. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اپیدمیولوژیکگونه‌های جدید کشف شده‌ی کاندیدا ارتوپسیلوزیس و کاندیدا متاپسیلوزیس در ایران با استفاده از روش مولکولی Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism یا PCR-RFLP می‌باشد. این مطالعه برای اولین بار در کشور انجام شده و می‌تواند راهگشای مطالعات تکمیلی در این زمینه توسط سایر محققان باشد.

روش‌ها

در خلال سال‌های ۱۳۸۸ تا ۱۳۸۹ از شهرهای مختلف کشور از جمله تهران، اصفهان، کاشان و ساری تعداد ۹۳۵ مخمر جداسازی و شناسایی شد. کلیه‌ی جدایه‌ها بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار (Sabouraud Dextrose Agar یا SDA) منتقل شده و در ۳۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. از کشت‌های تازه یک لوپ پر، از کلنی‌های تک هر مخمر برداشته و با انتقال به محلول آب-گلیسرول ۲۰ درصد سوسپانسیونی غلیظ از هر قارچ تهیه و به ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شد تا در صورت نیاز قارچ مورد نظر بازیابی گردد. برخی از جدایه‌های مشکوک ابتدا با آزمایش مستقیم میکروسکوپی بررسی و سپس نگهداری شدند.

استخراج DNA با توجه به این که سیستم FTA-card، روشی حساس و سریع برای استخراج DNA محسوب می‌شود، در مطالعه‌ی حاضر از این سیستم برای استخراج DNA استفاده شد. FTA-card فیلترهای کاغذی حاوی مواد شیمیایی هستند که برای استخراج و تلخیص DNA و حذف مهار کننده‌ها طراحی شده‌اند. در این روش نیازی به مراحل فیزیکوشیمیایی آماده‌سازی و استخراج DNA که در روش‌های دیگر از قبیل فنل- کلروفرم وجود دارد، نمی‌باشد. این کاغذها باعث تخریب دیواره‌ی سلولی و لیز غشای سلولی قارچ شده و به DNA اجازه می‌دهند از سلول خارج شده و در ماتریکسی از سلولز به دام افتد (۱۴). در ابتدا با استفاده از دستگاه پانچر، دیسک‌هایی در اندازه‌های ۲

www.mui.ac.ir

میلی‌متر از FTA-cardها جدا کرده و مقدار ۴ میکرولیتر از سوسپانسیون غلیظ تهیه شده از سلول‌های تازه‌ی مخمری به دیسک‌های آماده شده منتقل گردید. دیسک‌ها ۳ تا ۴ ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند تا به طور کامل خشک شوند. هر دیسک در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به مدت ۳ تا ۵ ثانیه شستشو داده شد تا بقایای سلولی از آن جدا شود. سپس هر دیسک را به تیوب‌های حاوی ۳۰ میکرولیتر آب مقطر درجه‌ی مولکولی انتقال و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در دستگاه Thermal cycler گذاشته شد. آنگاه تیوب‌ها به مدت چند ثانیه میکروفیوژ شدند و پس از خارج کردن و دور انداختن دیسک‌های FTA، مایع داخل تیوب حاوی DNA تا مصارف بعدی در ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شد.

***PCR-RFLP** برای شناسایی کاندیداهای گروه پاراپسیلوزیس:*

PCR: در غربال‌گری اولیه برای جداسازی گونه‌های مهم کاندیدا از جمله آلبیکنس، پاراپسیلوزیس، تروپیکالیس، کروزه‌ای، گلابراتا و گیلیرموندی قسمتی از DNAی ریبوزومال (rDNA) به نام ITS1-5.6S-ITS2 هدف تکثیر توسط PCR قرار گرفت. در ابتدا پرمیکس PCR را شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X بدون منیزیوم، ۱/۵ میکرومول $MgCl_2$، ۰/۲ میکرومولار پرایمر رفت (ITS1)، ۰/۲ میکرومولار پرایمر برگشت (ITS4)، ۴۰۰ میکرومولار مخلوط دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات (dNTP) و ۱/۲۵ واحد آنزیم Tag DNA polymerase در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. آن گاه به هر تیوب PCR، ۲۳ میکرولیتر از پرمیکس مذکور و ۲ میکرولیتر DNAی استخراج شده از هر قارچ اضافه شد. تیوب‌ها در دستگاه Thermal cycler قرار داده شدند و مراحل PCR شامل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه به منظور جدا شدن دو رشته‌ی DNA (DNA Denaturation)، ۳۰ سیکل شامل ۴۵ ثانیه ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱ دقیقه ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (Annealing)، ۱ دقیقه ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (Extension) و در نهایت ۷ دقیقه ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (Final extension) برنامه‌ریزی و انجام شد.

RFLP: ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR هر کدام از جدایه‌های کلینیکی، در واکنش ۱۵ میکرولیتری RFLP حاوی ۳ میکرولیتر آب مقطر، ۱/۵ میکرولیتر بافر و ۱ واحد آنزیم MspI (Fast Digest, Fermentas Lithuania) اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد.

با توجه به اطلاعات قبلی (۱۵)، در کاندیدا پاراپسیلوزیس اندازه‌ی ناحیه‌ی ITS1-ITS2 قبل و بعد از اثر آنزیم MspI، ۵۲۰ جفت باز (bp) می‌باشد در حالی که این مقادیر در سایر گونه‌ها به این ترتیب است: آلبیکنس ۵۳۵ (۲۳۸ و ۲۹۷)، تروپیکالیس ۵۲۴ (۱۸۴ و ۳۴۰)، گلابراتا ۸۷۱ (۵۵۷ و ۳۱۴)، کروزه‌ای ۵۱۰ (۲۶۱ و ۲۴۹) و گیلیرموندی ۶۰۸ (۸۲، ۱۵۵ و ۳۷۱).

الکتروفورز: ۵ میکرولیتر از DNAی تکثیر شده و ۷ میکرولیتر از DNAی هضم شده در ژل آگارز ۱/۵ درصد (برای محصولات PCR) و ۲ درصد (برای محصولات RFLP) و در تانک الکتروفورز حاوی ۹۰ میکرومولار تریس، ۹۰ میکرومولار بوریک اسید و ۲ میکرومولار EDTA (بافر TBE) بارگذاری گردید. پس از رنگ آمیزی باندهای DNA با استفاده از اشعه‌ی ماورای بنفش مشاهده و عکس‌برداری شد.

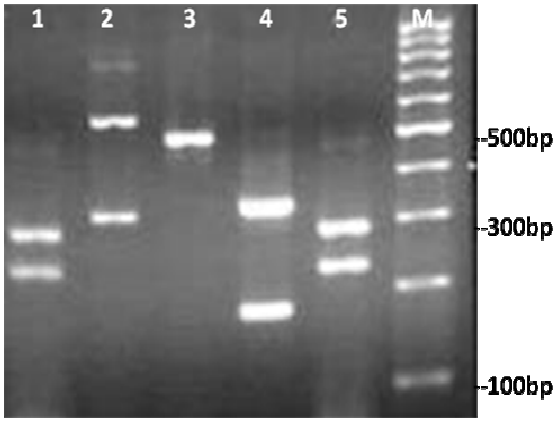
PCR-RFLP برای افتراق گونه‌های پاراپسیلوزیس،

www.mui.ac.ir

متاپسیلوزیس و ارتوپسیلوزیس: تا این مرحله گونه‌های پاراپسیلوزیس از سایر گونه‌های کاندیدا افتراق داده شد. در غربال‌گری ثانویه هدف ما شناسایی و جداسازی گونه‌های ارتوپسیلوزیس و متاپسیلوزیس از گونه‌ی پاراپسیلوزیس بود. برای این منظور ژن Secondary Alcohol Dehydrogenase یا SADH در روش PCR تکثیر و محصولات PCR توسط آنزیم محدودالاثر NlaIII برش داده شد و با توجه به الگوهای الکتروفورتیک به دست آمده، این گونه‌ها از هم تمیز داده شد. در اینجا نیز با توجه به مطالعات گذشته (۱۶) باندهای متمایزی با اندازه‌های ۱۳۱ و ۵۰۵ جفت باز (bp)، ۷۴، ۲۸۸ و ۳۴۸ جفت باز (bp) و ۱۳۱، ۲۱۷ و ۲۸۸ جفت باز (bp) به ترتیب برای گونه‌های پاراپسیلوزیس، متاپسیلوزیس و ارتوپسیلوزیس ایجاد می‌شود که با انتقال این قطعات DNA بر روی آگارز ۲ درصد در تانک‌های الکتروفورز و عکس‌برداری با اشعه‌ی ماورای بنفش این باندهای متمایز کننده قابل رؤیت گردید.

یافته‌ها

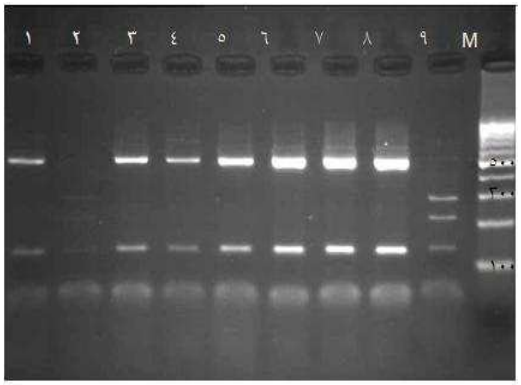
غربال‌گری اولیه: از بین ۹۳۵ مخمر جمع آوری شده ۵۹۹ جدایه (۶۴ درصد) مر بوط به شهر تهران، ۱۸۲ جدایه (۱۹/۴درصد) مربوط به شهر اصفهان، ۱۳۵ جدایه (۱۴/۴ درصد) مربوط به شهر کاشان و ۱۹ جدایه (۲ درصد) متعلق به شهر ساری بود. از نمونه‌های مختلف بالینی از جمله ناخن، واژن، خون، ترشحات چشم، پوست، کشاله‌ی ران و غیره، تعداد ۱۱۱ گونه (۱۱/۸ درصد) پاراپسیلوزیس شناسایی شد. بیشتر جدایه‌های پاراپسیلوزیس متعلق به ناخن، بین انگشتان پا، خون و کشاله‌ی ران بود. ۷۲ جدایه (۶۴/۸ درصد) از گونه‌های پاراپسیلوزیس متعلق به شهر تهران، ۳۱ جدایه (۲۷/۹ درصد) متعلق به شهر اصفهان و ۸ جدایه (۷/۲ درصد) مربوط به شهر ساری بود. در نمونه‌های مربوط به ترشحات چشم و گوش کاندیدا پاراپسیلوزیس تنها عامل ایجادکننده‌ی بیماری شناسایی شد. شکل شماره‌ی ۱ نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات RFLP با استفاده از آنزیم MspI است که برای غربال‌گری اولیه‌ی گروه پاراپسیلوزیس به کار رفت. در بین همه‌ی گونه‌های شایع، کاندیدا پاراپسیلوزیس فاقد نقطه‌ی برش برای MspI است، لذا وزن محصولات PCR قبل و بعد از RFLP یکسان است.



شکل ۱. الکتروفورز محصولات RFLP برخی ازایزوله‌های مخمری دراین مطالعه. ردیف‌های ۱ تا ۶ به ترتیب کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا آلبیکنس و مارکر ۱۰۰جفت بازی (bp)

غربال‌گری ثانویه: که بر روی گونه‌های پاراپسیلوزیس انجام شد، ۱۸ جدایه (۱۶/۲ درصد) کاندیدا ارتوپسیلوزیس (۹ جدایه متعلق به شهر تهران، ۷ جدایه مربوط به شهر ساری و ۲ جدایه مربوط به شهر اصفهان بود) و ۹۳ جدایه (۸۳/۸ درصد) کاندیدا پاراپسیلوزیس شناسایی شد. شکل شماره ی ۲ نمونه ای از الکتروفورز محصولات PCR پس از برش آنزیمی با NlaIII می‌باشد. مشاهده می‌شود که نمونه‌هایی که پیش از این به عنوان کاندیدا پاراپسیلوزیس شناسایی شده بودند دارای دو نوع الگوی الکتروفورتیک می‌باشند (۱۶).

www.mui.ac.ir



شکل ۲. الکتروفورز محصولات RFLP برخی ازایزوله‌های مخمری گروه پاراپسیلوزیس دراین مطالعه. ردیف‌های ۱ تا ۱۰ به ترتیب گونه‌های: پاراپسیلوزیس، ارتوپسیلوزیس، پاراپسیلوزیس، پاراپسیلوزیس، پاراپسیلوزیس، پاراپسیلوزیس، پاراپسیلوزیس، پاراپسیلوزیس، مارکر ۱۰۰ جفت بازی (bp)

در بین جدایه‌ها کاندیدا متاپسیلوزیس وجود نداشت. گونه‌ی ارتوپسیلوزیس از نمونه‌های ناخن، بین انگشتان پا، پوست و مایع صفاقی به دست آمد. اکثر جدایه‌های ارتوپسیلوزیس متعلق به ناخن بود (جدول شماره‌ی ۱).

۳۱ جدایه پاراپسیلوزیس (۳۳/۳ درصد) متعلق به مردان و ۶۲ جدایه (۶۶/۷ درصد) متعلق به زنان بود. این مقادیر در رابطه با ارتوپسیلوزیس به این ترتیب بود: مردان ۴ جدایه (۲۲/۲ درصد) و زنان ۱۴ جدایه (۷۷/۸ درصد).

جدول ۱. تعدادگونه‌های **پاراپسیلوزیس و ارتوپسیلوزیس** جدا شده از نقاط مختلف بدن **در اصفهان**

محل ضایعه	گونه‌ی کاندیدا نام (تعداد= درصد)	فراوانی (درصد) تعداد
ناخن	پاراپسیلوزیس (۶۷ =۸۱/۷) ارتوپسیلوزیس (۱۵=۱۸/۲)	۸۲ (۷۳/۸)
بین انگشتان پا	پاراپسیلوزیس (۷=۶/۳) ارتوپسیلوزیس (۱=۰/۹)	۸ (۷/۲)
خون	پاراپسیلوزیس (۵=۴/۵)	۵ (۴/۵)
کشاله ران	پاراپسیلوزیس (۴=۳/۶)	۴ (۳/۶)
پوست	پاراپسیلوزیس (۳=۲/۷) ارتوپسیلوزیس (۱=۰/۹)	۴ (۳/۶)
ترشحات چرکی گوش	پاراپسیلوزیس (۳=۲/۷)	۳ (۲/۷)
خلط	پاراپسیلوزیس (۱=۰/۹)	۱ (۰/۹)
واژن	پاراپسیلوزیس (۱=۰/۹)	۱ (۰/۹)
ترشحات چرکی چشم	پاراپسیلوزیس (۱=۰/۹)	۱ (۰/۹)
مایع شستشوی برونش	پاراپسیلوزیس (۱=۰/۹)	۱ (۰/۹)
مایع صفاق	ارتوپسیلوزیس (۱=۰/۹)	۱ (۰/۹)

www.mui.ac.ir

بحث

واژه‌ی "Psilosis" به معنای "Sprue" یا همان اسهال گرمسیری است و اصطلاح "Parapsilosis" برای اولین بار توسط Ashford در سال ۱۹۲۸ به کار برده شد که معرف مخمر جدیدی بود که از اسهال بیماری در پورتوریکو جداسازی شده بود (۱۷). در مطالعات انجام شده‌ی بعدی تفاوت‌هایی در DNAی پاراپسیلوزیس‌های مختلف مشاهده شد که بدین علت قارچ‌شناسان از اصطلاحات گروه و زیر گروه برای گونه‌ی پاراپسیلوزیس استفاده می‌کردند (۱۹-۱۸). Tavanti و همکاران برای اولین بار در سال ۲۰۰۵ با استفاده از روش‌های مولکولی مانند RAPD-PCR و همچنین آنالیز سکوانس نواحی ITS و D1-D2 موجود در rDNA جدایه‌های گروه پاراپسیلوزیس، نشان دادند که تفاوت‌های موجود در این قسمت‌ها به اندازه‌ای است که می‌توان از اصطلاح گونه به جای زیرگروه استفاده کرد (۳). همچنین او نشان داد که اختلاف کافی در چهار ژن COX3، L1A1،SADH و SYA1 بین این سه گونه موجود بوده است و شباهت ناحیه‌ی ژن SADH در این سه گونه زیر ۹۰ درصد می‌باشد؛ به طوری که در تحقیق حاضر نیز با استفاده از اختلاف در ناحیه‌ی همین ژن گونه‌های ارتوپسیلوزیس به راحتی از پاراپسیلوزیس جدا شدند. ژن SADH که برای اولین بار در ساکارومیسس سرویسیه شناسایی شد کد کننده ی نوعی آنزیم گروه الکل دهیدروژناز است که اکسیداسیون الکل‌های ثانویه به آلدئید و کتون را تسهیل می‌کند (۲۰).

اگر چه خطی یا حلقوی بودن DNA میتوکندری (mtDNA) معیاری برای تاکسونومی نمی‌باشد، اما جالب است که اکثر جدایه‌های مربوط به گروه II (کاندیدا ارتوپسیلوزیس) دارای DNA میتوکندری حلقوی بوده، در حالی که DNA میتوکندریال در اکثر جدایه‌های گروه I (کاندیدا پاراپسیلوزیس) و گروه III (کاندیدا متاپسیلوزیس) به صورت خطی است (۲۱).

کاندیدا متاپسیلوزیس با فراوانی کمتری از نمونه‌های بالینی جدا می‌شود (۲۳-۲۲) و در مقایسه‌ی با کاندیدا ارتوپسیلوزیس و کاندیدا پاراپسیلوزیس در شرایط آزمایشگاهی فاقد ویرولانس می‌باشد (۲۴) که دراین زمینه نیز مطالعه‌ی حاضر با فراوانی صفر درصد در مورد متاپسیلوزیس مؤید این مطلب می‌باشد.

کاندیدا ارتوپسیلوزیس از نمونه‌های بالینی از قبیل خون، ناخن، پوست، ریه و ادرار جدا شده است (۲۵) که در تحقیق ما علاوه بر ناخن و پوست، دو نمونه از بین انگشتان پا و مایع صفاق نیز جداسازی شد.

Kosa و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی اندازه ژنوم میتوکندریایی این سه گونه انجام دادند، دریافتند که اندازه‌ی این ژنوم در کاندیدا ارتوپسیلوزیس و کاندیدا متاپسیلوزیس ۲/۳ اندازه mtDNA در کاندیدا پاراپسیلوزیس می‌باشد. آن‌ها نشان دادند که اختلاف در اندازه‌ی این ژنوم مربوط به نواحی اینترون است که در کاندیدا پاراپسیلوزیس ۷ اینترون، در کاندیدا ارتوپسیلوزیس ۲ اینترون و در کاندیدا متاپسیلوزیس ۱ اینترون وجود دارد. در همین مطالعه آن‌ها با ترسیم درخت فیلوژنتیکی به دو روش NJ و ML نشان دادند که کاندیدا متاپسیلوزیس از اجداد پاراپسیلوزیس و ارتوپسیلوزیس به وجود آمده است (۲۶).

Silva و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی ۶۷ جدایه ی به دست آمده از کشور پرتغال انجام دادند، میزان شیوع کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا ارتوپسیلوزیس و کاندیدا متاپسیلوزیس را به ترتیب

www.mui.ac.ir

۹۱/۳ درصد، ۶/۱ درصد و ۱/۸ درصد گزارش کردند (۲۷). Borman و همکاران در بین ۷۰ جدایه میزان شیوع پاراپسیلوزیس، ارتوپسیلوزیس و متاپسیلوزیس را به ترتیب ۹۷/۱ درصد، ۱/۴ درصد و ۱/۴ درصد گزارش کردند (۲۸).

میرهندی و همکاران در تحقیقی که بر روی ۷۹ جدایه‌ی کاندیدا پاراپسیلوزیس جمع‌آوری شده از نمونه‌های خون در کشور دانمارک انجام دادند، میزان شیوع کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا ارتوپسیلوزیس و کاندیدا متاپسیلوزیس را به ترتیب ۹۵ درصد (۷۵ جدایه)، ۲/۵ درصد (۲ جدایه) و ۲/۵ درصد (۲ جدایه) گزارش کردند (۱۶). این مقادیر در مطالعه‌ی ما ۱۸ جدایه (۱۶/۲ درصد) کاندیدا ارتوپسیلوزیس و ۹۳ جدایه (۸۳/۸ درصد) کاندیدا پاراپسیلوزیس بود. آنزیم‌های برش‌دهنده‌ی BanI و NlaIII در این مطالعه استفاده شدند که آنزیم مطلوب برای تمایز این سه گونه از یکدیگر، NlaIII معرفی گردید.

از مقایسه‌ی نتایج مطالعه‌ی حاضر با موارد ذکر شده در بالا به راحتی در می‌یابیم که میزان شیوع کاندیدا پاراپسیلوزیس در ایران همانند دیگر کشورها از جمله پرتغال و دانمارک بسیار بیشتر از دو گونه‌ی ارتوپسیلوزیس و متاپسیلوزیس می‌باشد. هر چند در این مقایسه توزیع نمونه‌ها از لحاظ بالینی یکسان نمی‌باشد اما نکته‌ی جالب توجه در این مقایسه میزان شیوع بالای کاندیدا ارتوپسیلوزیس در ایران نسبت به دیگر کشورهایی است که مطالعات مشابه در آن انجام شده است. از دیگر موارد پر اهمیت در تحقیق حاضر، عدم وجود کاندیدا متاپسیلوزیس در بین جدایه‌ها می‌باشد، در حالی که در سایر بررسی‌ها با وجودی که تعداد جدایه‌های مورد بررسی کمتر از مطالعه‌ی ما بوده است، این گونه جداسازی شده است. اما نقطه‌ی اشتراک دیگر تمام این مطالعات، میزان شیوع کمتر گونه‌ی متاپسیلوزیس نسبت به ارتوپسیلوزیس می‌باشد. شیوع بالای گونه‌ی ارتوپسیلوزیس در جدایه‌های به دست آمده از شهر ساری در مطالعه‌ی حاضر جالب توجه بود. در مجموع ۱۹ جدایه (۲ درصد) متعلق به شهر ساری بود که از این تعداد ۸ جدایه (۴۲/۱ درصد) کاندیدا پاراپسیلوزیس شناسایی شد. در غربال‌گری نهایی، از این ۸ جدایه، ۷ جدایه (۸۷/۵ درصد) کاندیدا ارتوپسیلوزیس بود. از آنجا که هیچ گونه مطالعه‌ای راجع به بررسی‌های اپیدمیولوژیک این گونه‌های جدید کشف شده در کشور ایران یافت نشد و تعداد گونه‌های ارتوپسیلوزیس شناسایی شده در مطالعه‌ی حاضر کم نبود، شاید بتوان اظهار داشت که تعداد زیادی از استرین‌هایی که تا کنون در ایران کاندیدا پاراپسیلوزیس شناسایی شده‌اند، گونه‌ی ارتوپسیلوزیس باشند. در ضمن از آنجا که جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه مربوط به چند شهر از کشور ایران بود، لذا ادامه‌ی این مسیر و بررسی‌های تکمیلی راجع به این گونه‌های نوظهور در شهرهای مختلف، به محققان این عرصه توصیه می‌گردد. به نظر می‌رسد به دلیل نسبت بالای وفور گونه‌ی ارتوپسیلوزیس در نمونه‌های جمع‌آوری شده از شهر ساری در این تحقیق، با انجام مطالعات تکمیلی در مناطق شمالی کشور می‌توان نتایج قابل توجهی را آشکار ساخت.

تشکر و قدردانی

از کلیه‌ی کارکنان آزمایشگاه قارچ‌شناسی شفا، بیمارستان الزهرا (س)، آقای رضا جعفری مدیر محترم مؤسسه‌ی ملی تحقیقات سلامت، دانشگاه علوم پزشکی

www.mui.ac.ir

تهران، دانشگاه علوم پزشکی ساری، دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، آزمایشگاه رسالت در تهران، آزمایشگاه قارچ‌شناسی دکتر شیدفر در تهران که در این تحقیق ما را یاری دادند، صمیمانه سپاسگزاریم.

References

1. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of Candida albicans. Trends Microbiol 2001; 9(7): 327-35.
2. Merz WG, Hay R J. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 10th ed. London: Hodder Arnold Publishers; 2005.
3. Tavanti A ,Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis spp. nov. to replace Candida parapsilosis groups II and III. J Clin Microbiol 2005; 43(1): 284-92.
4. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, et al. Bloodstream infections due to Candida species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(3): 747-51.
5. Sandven P. Epidemiology of candidemia. Rev Iberoam Micol 2000; 17(3): 73-81.
6. Lupetti A, Tavanti A, Davini P, Ghelardi E, Corsini V, Merusi I, et al. Horizontal transmission of Candida parapsilosis candidemia in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol 2002; 40(7): 2363-9.
7. Almirante B, Rodriguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, et al. Epidemiology, risk factors, and prognosis of Candida parapsilosis bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J Clin Microbiol 2006; 44(5): 1681-5.
8. Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus Candida by using random amplified polymorphic DNA. J Clin Microbiol 1992; 30(12): 3249-54.
9. Scherer S, Stevens DA. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of Candida species. J Clin Microbiol 1987; 25(4): 675-9.
10. Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD. Candida parapsilosis, an emerging fungal pathogen. Clin Microbiol Rev 2008; 21(4): 606-25.
11. Dagdeviren M, Cerikcioglu N, Karavus M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of Candida parapsilosis strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. Mycoses 2005; 48(5): 321-6.
12. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. In vitro activities of anidulafungin against more than 2,500 clinical isolates of Candida spp., including 315 isolates resistant to fluconazole. J Clin Microbiol 2005; 43(11): 5425-7
13. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. Global surveillance of in vitro activity of micafungin against Candida: a comparison with caspofungin by CLSI-recommended methods. J Clin Microbiol 2006; 44(10): 3533-8.
14. 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.
15. 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.
16. Mirhendi H, Bruun B, Schonheyder HC, Christensen JJ, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, et al. Molecular screening for Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis among Danish Candida parapsilosis group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation. J Med Microbiol 2010; 59(Pt 4): 414-20
17. Ashford B K. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. Am J Trop Med Hyg. 1928; 8: 507-538.
18. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie Van Leeuwenhoek 1998; 73(4): 331-71.
19. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. J Clin Microbiol 1997; 35(5): 1216-23.
20. Sofer W, Martin PF. Analysis of alcohol dehydrogenase gene expression in Drosophila. Annu Rev Genet 1987; 21: 203-25.
21. Rycovska A, Valach M, Tomaska L, Bolotin-Fukuhara M, Nosek J. Linear versus circular mitochondrial genomes: intraspecies variability of mitochondrial genome architecture in Candida parapsilosis. Microbiology 2004; 150(Pt 5): 1571-80.

www.mui.ac.ir

22. Iida S, Imai T, Oguri T, Okuzumi K, Yamanaka A, Moretti-Branch, et al. Genetic diversity of the internal transcribed spacers (ITS) and 5.8S rRNA genes among the clinical isolates of Candida parapsilosis in Brazil and Japan. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 2005; 46(2): 133-7.

23. Kocsube S, Toth M, Vagvolgyi C, Doczi I, Pesti M, Pocsi I, et al. Occurrence and genetic variability of Candida parapsilosis sensu lato in Hungary. J Med Microbiol 2007; 56(Pt 2):190-5.

24. Gacser A, Schafer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD. Virulence of Candida parapsilosis, Candida orthopsilosis, and Candida metapsilosis in reconstituted human tissue models. Fungal Genet Biol 2007; 44(12): 1336-41.

25. Tavanti A, Hensgens LA, Ghelardi E, Campa M, Senesi S. Genotyping of Candida orthopsilosis clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. J Clin Microbiol 2007; 45(5): 1455-62.

26. Kosa P, Valach M, Tomaska L, Wolfe KH, Nosek J. Complete DNA sequences of the mitochondrial genomes of the pathogenic yeasts Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis: insight into the evolution of linear DNA genomes from mitochondrial telomere mutants. Nucleic Acids Res 2006; 34(8): 2472-81.

27. Silva AP ,Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of Candida parapsilosis, C. orthopsilosis, and C. metapsilosis in a tertiary care hospital. J Clin Microbiol 2009; 47(8): 2392-7.

28. Borman AM, Linton CJ, Oliver D, Palmer MD, Szekely A, Odds FC, et al. Pyrosequencing analysis of 20 nucleotides of internal transcribed spacer 2 discriminates Candida parapsilosis, Candida metapsilosis, and Candida orthopsilosis. J Clin Microbiol 2009; 47(7): 2307-10.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29, No 134, 2nd week, June 2011 Received: 16.2.2011 Accepted: 9.4.2011

Evaluation of Prevalence of the New *Candida* Species (*C. Orthopsilosis* and *C. Metapsilosis*) among *C. Parapsilosis* Group Isolated from Patients by PCR-RFLP of SADH Gene in Iran

Rasoul Mohammadi[1], Hossein Mirhendi PhD[2], Mohammad Hossein Yadegari PhD[3], Mohammad Ghahri PhD[4], Shahla Shadzi PhD[5], Nilufar Jalalizand[6], Mohammad Taghi Hedayati PhD[7]

Abstract

Background: *Candida orthopsilosis* and *C. metapsilosis* are recently introduced species that phenotipically indistinguishable from *C. parapsilosis.* In the present study, we evaluated the incidence and distribution of *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* among 111 *C. parapsilosis,* isolated from different body locations by molecular methods.

Methods: Yeast genomic DNAs were extracted from 935 isolates using Whatman FTA filter matrix technology from fresh cultures. First, ITS region of yeasts, were amplified by ITS1 and ITS4 primers, then *Candida parapsilosis* group were identified with digestion by *Msp*I. SADH gene was amplified and three species of Candida including *C. parapsilosis, C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* were differentiated with digestion by *Nla*III enzyme.

Findings: Totally 111 isolates were identified as *Candida parapsilosis* among them, 18 isolates (16.2%) were identified as *C. orthopsilosis* and 93 isolates (83.7%) as *C. parapsilosis*. No isolates were identified as *C. metapsilosis.* The most isolates of *C. orthopsilosis,* were obtained from nail.

Conclusion: *C. ortopsilosis* is not a rare species in Iran and it seems that a significant amounts of *Candida* strains which are considered as *C. parapsilosis* might be *C. ortopsilosis*.

Key words: *Candida orthopsilosis***,** *C. metapsilosis***,** *C. parapsilosis***,** PCR-RFLP, Iran.

[1] PhD Student, Department of Medical Mycology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[2] Associate Professor, Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Public Health and Institute of Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[3] Associate Professor, Department of Medical Mycology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[4] Assistant Professor, Department of Medical Mycology, School of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.
[5] Professor, Department of Medical Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[6] National Institute of Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran Iran.
[7] Professor, Department of Medical Mycology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
Corresponding Author: Hossein Mirhendi PhD, Email: mirhendi@tums.ac.ir

www.mui.ac.ir