مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۶۷/هفته سوم بهمن ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۹ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۵

شناسایی گونه‌های کاندیدای جدا شده از بیماران دارای کاندیدمی بستری در چند بیمارستان تهران با استفاده از برش آنزیمی ناحیه‌ی ITS–rDNA

دکتر محمد قهری[۱]، دکتر سید حسین میرهندی[۲]، دکتر عباسعلی ایمانی فولادی[۳]، صدیقه بیرقی[۴]

چکیده

مقدمه: کاندیدمی، عفونتی بسیار مهم از نظر ابتلا و مرگ و میر است که توسط گونه‌های متعددی از جنس کاندیدا ایجاد می‌شود و باید به سرعت تشخیص داده و درمان شود. با وجود این که هنوز کاندیدا آلبیکنس شایع‌ترین عامل کاندیدمی است ولی بروز عفونت‌های خونی ناشی از عوامل غیر آلبیکنس در سال‌های اخیر رو به فزونی گذارده است. تعیین گونه‌های عامل از حیث پایش مستمر تغییرات اپیدمیولوژیک بیماری و نیز از جنبه‌ی حساسیت یا مقاومت گونه‌های مختلف نسبت به داروهای ضد قارچی، ضروری است.

روش‌ها: در مطالعه‌ی حاضر، ۴۸ جدایه‌ی مخمری که طی ۱۵ ماه از کشت نمونه‌های خون ۳۲ بیمار مبتلا به کاندیدمی واجد زمینه‌های ایمونولوژیک بستری در بعضی از بیمارستان‌های تهران به دست آمده بود، با استفاده از مجموعه‌ای از آزمون‌های PCR-RFLP (Polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism) به طور دقیق تعیین گونه شدند.

یافته‌ها: بیشترین وفور گونه‌ای در مخمرهای جدا شده از خون بیماران مربوط به کاندیدا پاراپسیلوزیس و پس از آن به ترتیب کاندیدا گلابراتا، کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا کفیر بود.

نتیجه‌گیری: طبق یافته‌های این پژوهش، کاندیدا پاراپسیلوزیس شایع‌ترین عامل کاندیدمی در بیماران مطالعه شده بود. این یافته، کمی غیر منتظره بود و باید مورد توجه قرار گیرد؛ چرا که اغلب کاندیدا آلبیکنس شایع‌ترین عامل نه تنها در کاندیدمی بلکه در سایر اشکال بالینی کاندیدیازیس بوده است. در حالی که در بین جدایه‌های این پژوهش تنها مقام سوم را از لحاظ وفور دارا بود. با توجه به تعداد کم جدایه‌های مورد بررسی، به نظر می‌رسد که مطالعه‌ی وسیع‌تری برای تأیید این مسأله مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: کاندیدمی، کاندیدا، شناسایی، PCR-RFLP، ایران

مقدمه

بیش از یک صد گونه مخمر بیماری‌زا شناسایی شده‌اند که ۶ تا ۱۰ گونه‌ی آن‌ها از عوامل شایع عفونت‌های سطحی یا عمقی انسان هستند و بقیه به ندرت از انسان یا حیوان جدا می‌شوند. مهم‌ترین مخمرهای بیماری‌زا برای انسان شامل جنس‌های کاندیدا، کریپتوکوکوس، مالاسزیا و ترایکوسپورون می‌باشند. در بین همه‌ی مخمرها، کاندیداها از همه شایع‌تر هستند و با وجود این که اغلب اعضای میکروفلورای طبیعی دهان، دستگاه گوارش، واژن و پوست انسان هستند، اما می‌توانند به صورت فرصت‌طلب کاندیدیازیس پوست، ناخن و مخاط را ایجاد کنند و در شرایطی که سیستم دفاع طبیعی بیمار دچار آسیب جدی شده باشد، در اعضای عمقی‌تر بدن ایجاد عفونت‌های مهاجم خطرناک نمایند. واژه‌های مختلفی برای توصیف و تقسیم انواع متنوع کاندیدیازیس سیستمیک ذکر شده است، ولی در مجموع همه‌ی آن‌ها را در ۳ گروه کلی می‌توان

[۱] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران
[۲] دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۳] استادیار، گروه میکرب شناسی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران
[۴] دانشجوی کارشناسی علوم آزمایشگاهی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سید حسین میرهندی
Email: mirhendi@tums.ac.ir

www.mui.ac.ir

طبقه‌بندی کرد: کاندیدمی (وجود کاندیدا در خون)، کاندیدیازیس منتشره‌ی خونی حاد یا مزمن، عفونت یک اندام عمقی منفرد ایجاد شده توسط انتشار خونی یا تلقیح مستقیم (۱).

اغلب موارد کاندیدیازیس مهاجم ناشی از ورود اولیه‌ی کاندیدا به خون و آن گاه انتشار خونی آن به اندام‌های داخلی بدن می‌باشد. کاندیدمی به عنوان حداقل یک بار جداسازی گونه‌های کاندیدا از خون با یا بدون علایم بالینی نظیر تب، لرز و سندرم سپسیس تعریف شده است (۱). کاندیدمی به تنهایی و از این جهت که منجر به انتشار عفونت خونی به یک یا چند ارگان می‌شود، حایز اهمیت است. علاوه بر این، از آن جا که اغلب یک عفونت بیمارستانی است و در دهه‌های اخیر بروز آن روند رو به افزایشی داشته است، از لحاظ اپیدمیولوژیک نیز مورد توجه متخصصین عفونی قرار گرفته است. شیوع کاندیدمی به عنوان عامل سپسیس به اندازه‌ی شیوع باسیل‌های گرم منفی می‌باشد (۳-۲). مهم‌ترین عوامل خطر مستعد کننده‌ی وقوع کاندیدمی در بیماران بستری در بیمارستان، نوتروپنی، انجام عمل جراحی به ویژه جراحی شکم و استفاده‌ی طولانی از لوله‌های داخل وریدی ذکر شده است (۵-۴).

کاندیدمی و عفونت‌های مهاجم کاندیدایی توسط گونه‌های متعددی از کاندیدا ایجاد می‌شوند که کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کروزه‌ای و کاندیدا پاراپسیلوزیس مهم‌ترین و شایع‌ترین آن‌ها هستند (۶).

در تشخیص کاندیدمی دو چالش مهم وجود دارد یکی ردیابی و اثبات وجود کاندیدا در خون؛ به طوری که حداکثر موارد کاندیدمی به دقت کشف شود و دیگری تشخیص گونه‌ی مخمری عامل کاندیدمی. تشخیص گونه‌ی عامل از چندین نظر اهمیت دارد. نخست آن که کاندیدمی پدیده‌ای بسیار مهم از نظر ابتلا و مرگ و میر است و باید هر چه سریع‌تر درمان شود. دیگر این که، گرچه هنوز کاندیدا آلبیکنس شایع‌ترین عامل کاندیدمی است ولی بروز عفونت‌های خونی ناشی از گونه‌های غیر آلبیکنس نظیر کاندیدا گلابراتا، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا کروزه‌ای، کاندیدا دابلینینسیس، کاندیدا لوزیتانیا، کاندیدا گیلرموندی، کاندیدا کفیر و کاندیدا روگوزا در سال‌های اخیر رو به فزونی گذارده است. نظر به افزایش مقاومت برخی از گونه‌های مذکور به داروهای گروه آزول، تشخیص دقیق این عوامل حایز اهمیت است. بالاخره این که تشخیص گونه‌ها از حیث پایش مستمر تغییرات اپیدمیولوژیک بیماری نیز ضروری می‌باشد (۱۳-۷).

متأسفانه در کشور ما به این موضوع توجه کافی نشده است و اغلب موارد کاندیدمی چه از لحاظ تشخیص بیماری و چه از نظر شناسایی عوامل علیتی آن‌ها ناشناخته و پنهان باقی می‌ماند. در مطالعه‌ی حاضر، تعداد قابل توجهی از موارد کاندیدمی که در بعضی از بیمارستان‌های تهران اتفاق افتاده است، مورد بررسی قرار گرفتند. مخمرهای به دست آمده از کشت خون بیماران با استفاده از یک سری آزمون‌های PCR-RFLP (Polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism) به طور دقیق تعیین گونه شدند (۱۴). این پژوهش در نوع خود اولین کار در ایران است و می‌تواند مقدمه‌ی مناسبی برای مطالعات گسترده‌تر و حل معضلات بالینی اپیدمیولوژیک در زمینه‌ی عفونت‌های سیستمیک مخمری در کشور باشد.

روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه‌ی توصیفی به منظور شناسایی

www.mui.ac.ir

و تعیین گونه‌ی دقیق عوامل مخمری جدا شده از کشت خون بیماران مبتلا به کاندیدمی بستری در چند بیمارستان تخصصی تهران بوده است. طی یک دوره‌ی ۱۵ ماهه (شهریور ۱۳۸۷ تا آذر ۱۳۸۸)، تعداد ۳۲ نمونه‌ی مثبت کشت خون (از بین ۵۱۴۱ نمونه‌ی کشت خون) از لحاظ رشد مخمرها جمع‌آوری و مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه‌های خون جهت رشد عوامل عفونی در بطری‌های واجد محیط دو فازی کشت داده شد و آن گروه از کشت‌هایی که مشکوک به رشد مخمری بودند، به محیط سابورو (گلوکز ۴ درصد، پپتون ۱ درصد و آگار ۱/۵ درصد) منتقل و به مدت ۳-۲ روز در حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید و در صورت رشد، تعداد قابل ملاحظه‌ای کلنی با ظاهر یکسان به عنوان عامل عفونت خونی تلقی شد. آن گاه یک لوپ باکتریولوژیک از کلنی به آب مقطر استریل حاوی ۳۰ درصد گلیسرول منتقل و تا موقع لازم در برودت ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. با توجه به نمونه‌گیری مکرر از بعضی از بیماران، در مجموع ۴۸ ایزوله‌ی مخمری متعلق به ۳۲ بیمار جمع‌آوری شد. جدول ۱، اطلاعات مربوط به این ایزوله‌ها را نشان می‌دهد.

جهت تعیین گونه‌ی جدایه‌های مخمری، دو گروه آزمون تشخیصی شامل آزمون‌های فنوتایپی و آزمون‌های ملکولی روی جدایه‌ها انجام شد.

الف: آزمون‌های فنوتایپی

آزمون تولید کلامیدوسپور: مخمرها با ایجاد خراش یا شیار در سطح محیط کورن میل آگار حاوی ۱ درصد توین ۸۰، تلقیح و بعد از ۴۸ یا ۷۲ ساعت با عدسی‌های ۱۰ و ۴۰ تحت مشاهده‌ی میکروسکوپی قرار گرفتند. در صورت رشد سلول‌های گرد درشت دارای جدار ضخیم در انتهای رشته‌های کاذب (کلامیدوسپور)، جدایه‌ی مورد بررسی به عنوان کاندیدا آلبیکنس و در غیر این صورت به عنوان گونه‌ی مجهول قلمداد شد.

تست ایجاد لوله‌ی زایا: مخمر به لوله‌ی حاوی سرم تازه‌ی انسان منتقل و ۳-۲ ساعت در حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. در صورت ایجاد لوله‌ی زایا، جدایه‌ی مورد نظر به عنوان کاندیدا آلبیکنس و در غیر این صورت به عنوان مخمر مجهول ثبت گردید.

کشت روی محیط رنگ‌زا (کروموژنیک): مخمرها به صورت خطی روی پلیت‌های حاوی محیط تجاری CHROMagar Candida (CHROMagar France) منتقل و ۴۸ ساعت در حرارت ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. آن گاه رنگ یک کلنی منفرد مورد مطالعه قرار گرفت. کلنی‌های واجد رنگ سبز یا سبز-آبی به عنوان کاندیدا آلبیکنس، صورتی کم رنگ تا ارغوانی به عنوان کاندیدا کروزه‌ای، آبی تیره تا آبی خاکستری به عنوان کاندیدا تروپیکالیس، ارغوانی تا صورتی تیره به عنوان کاندیدا گلابراتا، کرم روشن مشکوک به کاندیدا پاراپسیلوزیس و کلنی‌های واجد سایر رنگ‌ها به عنوان گونه‌ی مجهول در نظر گرفته شدند.

ب: آزمون‌های مولکولی

استخراج و نگهداری DNA: برای استخراج و نگهداری طولانی مدت DNAهای مخمری، از سیستم FTA-Card (Whatman USA) استفاده شد. برای این کار، یک کلنی از جدایه‌ی مورد نظر به ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد و ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل به کاغذهای ویژه‌ی FTA که به قطعاتی به قطر ۳ میلی‌متر پانچ شده بود، افزوده گردید و اجازه داده شد تا حداقل به مدت سه ساعت در دمای اتاق خشک شود. یکی از این قطعات در ۵۰۰

www.mui.ac.ir

میکرولیتر آب مقطر به مدت چند ثانیه غوطه‌ور و سپس به میکروتیوب دیگر حاوی ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. تیوب مورد نظر به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی به عنوان DNAی الگو در PCR استفاده گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): برای تکثیر قطعه‌ی ITS1-5.8S-ITS2 موجود در کمپلکس ژنی DNA ریبوزومی (rDNA)، پرایمرهای همگانی ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') به غلظت ۰/۴ میکرومولار به کار رفت. علاوه بر پرایمرها، بافر PCR با غلظت ده برابر به مقدار ۵ /۲ میکرولیتر، ۴۰۰ میکرو مولار مخلوط dNTP، ۱/۵ میلی‌مولار کلرور منیزیم، ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، یک میکرولیتر DNAی استخراج شده از مخمرها و بالاخره آب مقطر تا رسیدن حجم واکنش به ۲۵ میکرولیتر در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. برای اجرای PCR مواد فوق در دستگاه Thermal cycler (مدل AB ۲۷۰۰) تحت برنامه‌ی حرارتی ۹۵ درجه به مدت ۶ دقیقه در یک چرخه، حرارت‌های ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه در سی چرخه‌ی متوالی و در نهایت، حرارت ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه برای یک چرخه قرار گرفتند.

هضم محصولات با آنزیم‌های اندونوکلئاز (RFLP یا Restriction fragment length polymorphism): برای ایجاد برش آنزیماتیک در رشته‌های تکثیر یافته‌ی DNA و تولید الگوهای متفاوت در مخمرهای مختلف برای تشخیص آن‌ها، ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR با ۱/۵ میکرولیتر بافر آنزیم و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم MspI و ۳ میکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط شد و به مدت ۲ تا ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. علاوه بر MspI، آنزیم ClaI برای اطمینان از صحت تشخیص جدایه‌های تشخیص داده شده به عنوان کاندیدا پاراپسیلوزیس و آنزیم MboI برای تأیید قطعی جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس (به منظور افتراق از کاندیدا دابلینینسیس) در آزمون‌های RFLPی جداگانه مورد استفاده قرار گرفتند.

الکتروفورز: محصولات PCR و RFLP به ترتیب روی ژل آگارز ۱/۵ و ۲ درصد الکتروفورز گردید. بافر TBE (حاوی تریس ۰/۰۹ مولار، اسید بوریک ۰/۰۹ مولار و EDTA ۲ میلی‌مولار با pH ۸/۳) برای تهیه‌ی آگارز و پر کردن تانک الکتروفورز استفاده شد. الکتروفورز با جریان الکتریسیته‌ی مستقیم با اختلاف پتانسیل ۵ ولت به ازای هر سانتی‌متر طول ژل به مدت ۱ ساعت انجام شد. ژل آگارز در محلول ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با دستگاه ترانس ایلومیناتور بررسی گردید و از باندهای به دست آمده با دوربین دیجیتال، عکسبرداری به عمل آمد. تشخیص مخمرها بر حسب مقایسه‌ی پروفایل الکتروفورتیک RFLP به دست آمده برای هر نمونه با الگوهای الکتروفورتیک اختصاصی هر گونه (۱۴) انجام شد.

یافته‌ها

در مجموع ۴۹ جدایه‌ی مخمری از ۴۹ نمونه‌ی کشت خون، متعلق به ۳۲ بیمار جدا گردید (جدول ۱). از تعدادی از بیماران طی روزهای مختلف بستری در بیمارستان نمونه‌های خونی متعدد دریافت و به کرات

www.mui.ac.ir

نمونه‌های مخمری جدا شد. اغلب نمونه‌ها از بیمارستان بقیه ا... و تعدادی نیز از سایر بیمارستان‌ها دریافت گردید. یکی از ایزوله‌ها (به شماره‌ی ۴۷۰) از بین رفت و از مطالعه حذف گردید و تعداد جدایه‌ها به ۴۸ عدد رسید. ۲۰ نفر (۶۲/۵ درصد) از بیماران مرد و ۱۲ نفر (۳۷/۵ درصد) زن بودند. از لحاظ سنی، ۴ نفر از بیماران (۱۴/۳ درصد) زیر ۵ سال، ۶ نفر (۲۱/۴ درصد) بین ۱۵ تا ۴۵ سال و بقیه بالای ۴۵ سال داشتند.

جراحی در ۱۵ مورد، بدخیمی‌های هماتولوژیک در ۴ مورد، تومورهای توپر در ۶ مورد، درمان با آنتی‌بیوتیک در ۷ مورد، دیابت در ۳ مورد، نارسایی کلیه و همودیالیز هر کدام در ۲ مورد و نوزاد نارس در ۱ مورد زمینه‌های مستعد کننده‌ی ایمنولوژیک در بیماران بودند.

از ۲۲ بیمار طی یک نوبت، ۵ بیمار دو نوبت، ۳ بیمار ۳ نوبت و از ۲ بیمار نیز طی ۴ نوبت کشت خون انجام شد.

آزمون ایجاد لوله‌ی زایا برای ۹ نمونه مثبت بود و به عنوان کاندیدا آلبیکنس شناسایی شد و بقیه همچنان به عنوان گونه‌ی مخمری مجهول باقی ماندند. ۹ جدایه نیز در محیط کورن میل آگار حاوی توین ۸۰ کلامیدوسپور تولید کردند و بنابراین به عنوان کاندیدا آلبیکنس شناخته شدند و هویت ۳۰ جدایه‌ی باقی‌مانده نامعلوم باقی ماند. در آزمون رنگ‌زایی در محیط کروم آگار کاندیدا، ۹ جدایه به عنوان کاندیدا آلبیکنس، ۱۴ جدایه به عنوان کاندیدا پاراپسیلوزیس، ۹ جدایه به عنوان کاندیدا گلابراتا و ۲ جدایه نیز به عنوان کاندیدا تروپیکالیس شناسایی شدند و بقیه‌ی جدایه‌ها ناشناخته باقی ماندند (جدول ۱). به این ترتیب با روش‌های فنوتایپی انجام شده ۳۴ جدایه معادل ۷۰/۸ درصد کل نمونه‌ها در سطح گونه شناسایی شدند.

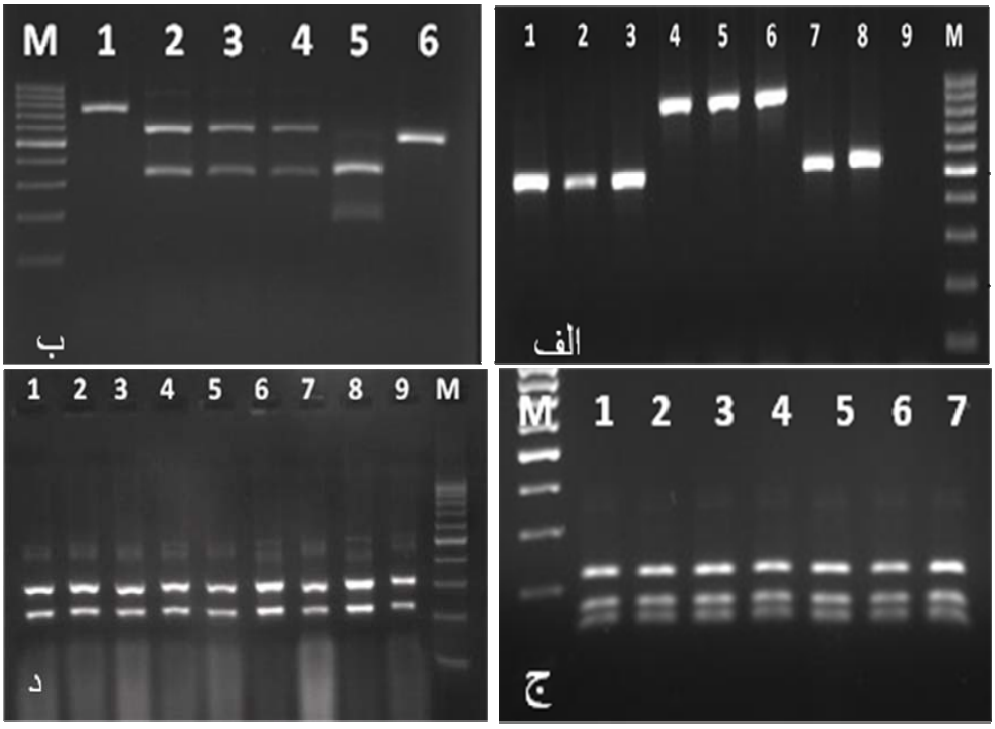
تقویت نواحی ITS-rDNA در مورد تمام جدایه‌ها با موفقیت انجام شد. شکل ۱- الف، نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات PCR چند جدایه‌ی مخمری را نشان می‌دهد. چنانچه ملاحظه می‌شود، وزن DNAهای محصول PCR در جدایه‌های مختلف حدود ۴۰۰ الی ۹۰۰ جفت باز است که با آن چه از بررسی توالی گونه‌های مخمری مختلف به دست آمده بود، مطابقت داشت. شکل ۱- ب نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات ITS-RFLP با آنزیم MspI و الگوهای برش آنزیمی حاصله را نشان می‌دهد. پس از مقایسه الگوی الکتروفورتیک به دست آمده برای جدایه‌ها با الگوهای برشی در گونه‌های شناخته شده، معلوم شد که گونه‌ی عامل عفونت خون در ۱۱ بیمار (۳۳/۳ درصد) کاندیدا پاراپسیلوزیس، ۹ بیمار (۳۰ درصد) کاندیدا گلابراتا، ۸ بیمار (۲۶/۶ درصد) کاندیدا آلبیکنس، ۲ بیمار (۶/۷ درصد) کاندیدا تروپیکالیس و در یک بیمار (۳/۳ درصد) نیز کاندیدا کفیر بود.

محصولات PCR آن گروه از جدایه‌ها که به عنوان کاندیدا آلبیکنس تشخیص داده شده بودند، دوباره با آنزیم MboI که قادر به افتراق دو گونه‌ی کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس می‌باشد (۱۵)، تحت عمل هضم آنزیم قرار گرفتند. تمام نمونه‌ها دارای الگوی یکسان و اختصاصی کاندیدا آلبیکنس بودند و لذا هیچ موردی از کاندیدا دابلینینسیس در جدایه‌های خون یافت نشد (شکل ۱- ج). همچنین، نظر به این که کاندیدا پاراپسیلوزیس در الگوی به دست آمده از ITS-RFLP با MspI فاقد محل برش بود، برای

www.mui.ac.ir

حصول اطمینان از صحت شناسایی جدایه‌های مشکوک به این گونه، همگی آن‌ها دوباره با آنزیم ClaI برش داده شدند و مشخص گردید که تمام نمونه‌ها دارای الگوی برشی اختصاصی و مورد انتظار با این آنزیم بودند و تعیین گونه‌ی آن‌ها به عنوان کاندیدا پاراپسیلوزیس قطعی گردید (شکل ۱- د).

جدول ۱ خلاصه‌ی نتایج تشخیص جدایه‌های مخمری خونی با استفاده از آزمون‌های فنوتایپی و ملکولی را نشان می‌دهد. از بین ۴۸ جدایه‌ی مورد بررسی در این پژوهش، همگی(۱۰۰ درصد) توسط



شکل ۱. شناسایی جدایه‌های خونی با PCR-RFLP

الف: الکتروفورز محصولات PCR تعدادی از جدایه‌ها با پرایمرهای ITS-ITS4. چاهک‌های ۱ تا ۸ به ترتیب مربوط به نمونه‌های شماره‌ی ۳۰۵، ۴۶۲، ۴۷۱، ۴۶۸، ۴۶۹، ۶۴۵، ۷۳۶، و ۷۴۴ و به ترتیب شامل گونه‌های کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا آلبیکنس می‌باشد. چاهک شماره‌ی ۹ کنترل منفی است.

ب: الکتروفورز محصولات ITS-RFLP با آنزیم MspI تعدادی از جدایه‌ها: چاهک‌های ۱ تا ۶ به ترتیب مربوط به نمونه‌های شماره‌ی ۲۲۹، ۴۶۷، ۴۷۲، ۴۷۳، ۷۶۷ و ۷۵۹ به ترتیب شامل گونه‌های کاندیدا کفیر، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا پاراپسیلوزیس می‌باشد (شماره‌های ۴۶۷، ۴۷۲ و ۴۷۳ از سه کشت خون مختلف، متعلق به یک بیمار جدا شدند).

ج: پروفایل‌های الکتروفورتیک ITS-RFLP پس از هضم آنزیمی با MboI در تعدادی از جدایه‌ها. چاهک‌های ۱ تا ۷ به ترتیب مربوط به نمونه‌های شماره ۲۳۶، ۴۹۷، ۷۳۷، ۷۳۸، ۷۳۹، ۷۴۴ و ۷۴۶ می‌باشد. با توجه به الگوی به دست آمده، تمام جدایه‌ها متعلق به گونه‌ی کاندیدا آلبیکنس هستند.

د: الکتروفورز محصولات ITS-RFLP با آنزیم ClaI مربوط به تعدادی از جدایه‌ها. تمام نمونه‌ها دارای الگوی الکتروفورتیک یکسان و ویژه‌ی کاندیدا پاراپسیلوزیس می‌باشند. در تمام شکل‌ها M مارکر ملکولی ۱۰۰ جفت بازی می‌باشد.

آزمون‌های ملکولی ITS-RFLP تشخیص داده شدند، در حالی که از طریق کشت در محیط کروم آگار کاندیدا تعداد ۳۴ جدایه (۷۰/۸ درصد)، در کورن میل آگار تعداد ۹ جدایه (۱۸/۷۵درصد) و به وسیله‌ی آزمون تولید لوله‌ی زایا نیز تنها ۹ مورد (۱۸/۷۵ درصد) از کل جدایه‌ها شناسایی شدند.

جدول ۱. مشخصات بیماران و نتایج شناسایی مخمرهای جدا شده از موارد کاندیدمی توسط آزمونهای فنوتایپی و ملکولی

شماره‌ی جدایه	نام بیمارستان	سن	عوامل خطر	آزمون‌های فنوتایپی			آزمون‌های ملکولی PCR-RFLP			نتیجه‌ی نهایی جدایه
				لوله‌ی زایا	CMA+ TW80	کروم آگار	MspI	MboI	ClaI	
۲۲۹	کودکان مفید	۳/۵	؟	–	کاندیدا	?	کفیر	انجام نشد	انجام نشد	کفیر
۲۳۶	شهید لواسانی	۷۱	جراحی GABG، آنتیبیوتراپی	+	آلبیکنس	آلبیکنس	آلبیکنس	انجام نشد	انجام نشد	آلبیکنس
۲۴۶	بقیه ا...	۳۴	سرطان معده، آنتی‌بیوتراپی، کاندیدوز دهانی	–	کاندیدا	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس	انجام نشد	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس
۳۰۵	شهید لواسانی	۶۲	جراحی GABG، آنتیبیوتراپی	–	کاندیدا	تروپیکالیس	تروپیکالیس	انجام نشد	انجام نشد	تروپیکالیس
۴۶۲	آزمایشگاه بهار	۸۲	؟	–	کاندیدا	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس	انجام نشد	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس
۴۶۷	بقیه ا...	؟	؟	–	مخمر	گلابراتا	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا
۴۷۲	بقیه ا...	؟	؟	–	مخمر	گلابراتا	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا
۴۷۳	بقیه ا...	؟	؟	–	مخمر	گلابراتا	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا
۴۶۸	بقیه ا...	۶۸	سرطان متاستاتیک کیسه‌ی صفرا، لاپاراتومی	–	مخمر	گلابراتا	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا
۴۶۹	بقیه ا...	۶۸	لاپاراتومی، اسپلنکتومی	–	مخمر	؟	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا
۴۷۰	بقیه ا...	۲۸	لاپاراتومی، اسپلنکتومی	نمونه از بین رفته بود						
۴۷۱	بقیه ا...	۴۸	جراحی GABG، جراحی میترال	–	کاندیدا	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس	انجام نشد	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس
۴۹۲	بقیه ا...	؟	سرطان مغزی، شانت گذاری	–	مخمر	گلابراتا	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا
۴۹۳	بقیه ا...	؟	سرطان مغزی، شانت گذاری	–	مخمر	گلابراتا	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا
۴۹۴	بقیه ا...	"	؟	–	مخمر	گلابراتا	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا
۴۹۵	بقیه ا...	؟	سرطان مغزی، شانت گذاری	–	مخمر	گلابراتا	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا
۴۹۶		؟	سرطان مغزی، شانت گذاری	–	مخمر	گلابراتا	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا

www.mui.ac.ir

جدول ۱. مشخصات بیماران و نتایج شناسایی مخمرهای جدا شده از موارد کاندیدمی توسط آزمونهای فنوتایپی و ملکولی (ادامه)

شماره‌ی جدایه	نام بیمارستان	سن	عوامل خطر	لوله‌ی زایا	آزمون‌های فنوتایپی CMA+TW80	کروم آگار	آزمون‌های ملکولی PCR-RFLP MspI	MboI	ClaI	نتیجه‌ی نهایی جدایه
۴۹۷	شهید لواسانی	۶۵	جراحی GABG، آنتی‌بیوتراپی، سابقه‌ی خلط مثبت از نظر کاندیدا	+	آلبیکنس	آلبیکنس	آلبیکنس	آلبیکنس	انجام نشد	آلبیکنس
۴۹۸	بقیه ا...	۷۳	نارسایی کلیه، زخم ژنیتال کشاله‌ی ران و ساکروم	–	کاندیدا	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس	انجام نشد	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس
۵۸۳	آزمایشگاه بهار	؟	؟	–	کاندیدا	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس	انجام نشد	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس
۶۴۵	بقیه ا...	۶۸	سرطان پانکراس، همودیالیز	–	مخمر	گلابراتا	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا
۷۳۶	دکتر شریعتی	۲۹	لوسمی حاد	–	کاندیدا	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس	انجام نشد	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس
۷۳۷	بقیه ا...	۴۶	سل استخوان، جراحی ستون فقرات، دیابت	+	آلبیکنس	آلبیکنس	آلبیکنس	آلبیکنس	انجام نشد	آلبیکنس
۷۳۸	بقیه ا...	۴۷	پانکراتیت عفونی نکروزان، لاپاراتومی	+	آلبیکنس	آلبیکنس	آلبیکنس	آلبیکنس	انجام نشد	آلبیکنس
۷۳۹	بقیه ا...	۴۷	پانکراتیت عفونی نکروزان، لاپاراتومی	+	آلبیکنس	آلبیکنس	آلبیکنس	آلبیکنس	انجام نشد	آلبیکنس
۷۴۰	بقیه ا...	۷۵	؟	–	مخمر	گلابراتا	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا
۷۴۱	بقیه ا...	"	؟	–	کاندیدا	تروپیکالیس	تروپیکالیس	انجام نشد	انجام نشد	تروپیکالیس
۷۴۲	بقیه ا...	"	؟	–	مخمر	گلابراتا	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا
۷۴۳	بقیه ا...	"	؟	–	مخمر	گلابراتا	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا
۷۴۴	دکتر شریعتی	۷۰	جراحی قلب	+	آلبیکنس	آلبیکنس	آلبیکنس	آلبیکنس	انجام نشد	آلبیکنس
۷۴۶	بقیه ا...	۴۴	دیابت، پیوند کلیه، دیالیز	+	آلبیکنس	آلبیکنس	آلبیکنس	آلبیکنس	انجام نشد	آلبیکنس
۷۴۹	بقیه ا...	۵۰	سرطان متاستاتیک پستان، جراحی گردن	–	مخمر	گلابراتا	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا
۷۵۰	بقیه ا...	۶۶"	سرطان متاستاتیک کولون، پلورال افیوژن وسیع	–	مخمر	گلابراتا	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا
۷۵۱	بقیه ا...	۳	لوسمی‌حاد، آنتی‌بیوتراپی	–	کاندیدا	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس	انجام نشد	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس
۷۵۲	بقیه ا...	۳	لوسمی‌حاد، آنتی‌بیوتراپی	–	کاندیدا	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس	انجام نشد	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس
۷۵۳	بقیه ا...	۳	لوسمی‌حاد، آنتی‌بیوتراپی	–	کاندیدا	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس	انجام نشد	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس
۷۵۴	بقیه ا...	۳	لوسمی‌حاد، آنتی‌بیوتراپی	–	کاندیدا	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس	انجام نشد	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس
۷۵۵	دکتر شریعتی	۲۱	لوسمی‌حاد، پیوند مغز استخوان	–	کاندیدا	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس	انجام نشد	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس
۷۵۶	دکتر شریعتی	۲۱	لوسمی‌حاد، پیوند مغز استخوان	–	کاندیدا	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس	انجام نشد	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس
۷۵۷	بقیه ا...	۶۹	دیابت، کولسیستکتومی	–	کاندیدا	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس	انجام نشد	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس

www.mui.ac.ir

جدول ۱. مشخصات بیماران و نتایج شناسایی مخمرهای جدا شده از موارد کاندیدمی توسط آزمونهای فنوتایپی و ملکولی (ادامه)

شماره‌ی جدایه	نام بیمارستان	سن	عوامل خطر	آزمون‌های فنوتایپی: لوله‌ی زایا	CMA+ TW80	کروم آگار	آزمون‌های ملکولی PCR-RFLP: MspI	MboI	ClaI	نتیجه‌ی نهایی جدایه
۷۵۸	بقیه ا...	۶۹	دیابت، کولسیستکتومی	–	کاندیدا	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس	انجام نشد	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس
۷۵۹	بقیه ا...	۶۹	دیابت، کولسیستکتومی	–	کاندیدا	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس	انجام نشد	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس
۷۶۰	بقیه ا...	۳	لوسمی‌حاد	–	کاندیدا	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس	انجام نشد	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس
۷۶۱	بقیه ا...	۲۱	کاتتر داخل وریدی، رینوپلاستی	–	کاندیدا	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس	انجام نشد	پاراپسیلوزیس	پاراپسیلوزیس
۷۶۲	بقیه ا...	۷۲	؟	+	آلبیکنس	آلبیکنس	آلبیکنس	آلبیکنس	انجام نشد	آلبیکنس
۷۶۴	بقیه ا...	۶۹	جراحی فمور، آنتی بیوتراپی، نارسایی کلیه	–	مخمر	گلابراتا	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا
۷۶۵	بقیه ا...	۶۹	؟	–	مخمر	گلابراتا	گلابراتا	انجام نشد	انجام نشد	گلابراتا
۷۶۶	بقیه ا...	۱ ماه	نوزاد نارس	+	آلبیکنس	آلبیکنس	آلبیکنس	آلبیکنس	انجام نشد	آلبیکنس
۷۶۷	بقیه ا...	۷۳	؟	–	کاندیدا	تروپیکالیس	تروپیکالیس	انجام نشد	انجام نشد	تروپیکالیس

بحث

شناسایی گونه‌های عامل از نقطه نظر اپیدمیولوژی میکروبی مهم است. روش‌های آزمایشگاهی متعددی برای شناسایی جدایه‌های مخمری به کار رفته است. برخی از این روش‌ها برای شناسایی به نسبت سریع کاندیداهای شایع طراحی شده است مانند تولید لوله‌ی زایا در سرم و یا تولید کلامیدوکونیدی در محیط کورن میل آگار جهت شناسایی کاندیدا آلبیکنس، تست هیدرولیز سریع ترهالوز در حضور سیکلوهگزامید برای شناسایی کاندیدا گلابراتا و رنگ آمیزی منفی با مرکب هندی یا فعالیت فنل اکسیدازی در محیط دانه‌ی سیاه یا تست اوره‌آز سریع برای کریپتوکوکوس نئوفرمنس (۱۶). برخی روش‌ها برای شناسایی دامنه‌ی وسیع‌تری از کاندیداهای رایج طراحی شده‌اند مثل کشت روی محیط کروموژنیک کروم آگار کاندیدا که بر اساس فعالیت β -N-acetylhexosaminidase و آنزیم‌های فسفاتاز، جهت افتراق ۳ یا ۴ گونه‌ی شایع کاندیدا مفید است (۱۶). گروه دیگری از روش‌ها جهت افتراق دامنه‌ی نامحدودی از مخمرها کاربرد دارند. بهترین مثال از این دست، آزمون‌های جذب و تخمیر قندها می‌باشند که در گذشته با عنوان روش Wickerham یا تست‌های اگزانوگرافی مورد استفاده قرار می‌گرفتند و به تازگی به شکل بهتری تحت عناوین تجاری نظیر کیت‌های API یا سیستم اتوماتیک Vitek عرضه شده‌اند.

برخی از آزمون‌ها نیز برای افتراق دو یا چند گونه‌ی بسیار نزدیک و شبیه به هم مثل افتراق کاندیدا آلبیکنس از کاندیدا دابلینینسیس (۱۴) و یا کاندیدا پاراپسیلوزیس از کاندیدا ارتوپسیلوزیس و کاندیدا متاپسیلوزیس (۱۷)، کاندیدا براکارنسیس و کاندیدا نیوارینسیس از کاندیدا گلابراتا (۱۸) و یا به منظور شناسایی سویه‌های مقاوم به دارو یا بیوتیپ‌های خاص طراحی شده‌اند. اغلب رویکردهای پیش گفته، بر پایه‌ی تفاوت‌های فیزیولوژیکی مخمرها با یکدیگر استوار هستند و محصولات تجاری متعددی نیز بر اساس آن‌ها عرضه شده است که هر کدام مزایا و محدودیت‌های خاص

www.mui.ac.ir

خود را دارا می‌باشند. پیشرفت‌های اخیر دانش بیولوژی ملکولی به خصوص در حیطه‌ی اسیدهای نوکلئیک (DNA و RNA)، ابزارهای نوینی را برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها و از جمله مخمرها فراهم آورده‌اند. تکثیر قطعاتی از ملکول‌های DNA که دارای ارزش شناسایی و تاکسونومی هستند، توسط تکنولوژی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و آن گاه تعیین توالی (Sequencing) آن‌ها نقطه‌ی کمال این روش‌ها است. ولی با توجه به زمان بر بودن و هزینه‌های به نسبت بالای آماده سازی و تعیین توالی، روش‌های متعدد دیگری معرفی و استفاده شده‌اند که اغلب آن‌ها بر پایه‌ی PCR است مثل PCR-EIA (۱۲)، real-time PCR (۷)، Multiplex-PCR (۸)، Specific-PCR (۹)، Nested-PCR (۱۰)، AFLP (۱۶، ۱۱)، PCR-FSP (۱۴)، RAPD-PCR (۱۳) و PCR-RFLP (۱۴). همچنین سیستم‌های ملکولی غیر PCR نظیر NASBA، PNA-FISH، DNA microarray، DHPI PSCA و Flow cytometry نیز به تازگی معرفی شده‌اند (۱۶). اغلب روش‌های مذکور، تنها در مراکز تحقیقاتی به کار رفته‌اند و هنوز حتی در آزمایشگاه‌های تخصصی قارچ شناسی کاربرد و استفاده‌ی روزمره ندارند. علاوه بر تنوع در روش‌های ردیابی DNA، ملکول‌های متعددی نیز به عنوان هدف ردیابی (Target) مد نظر بوده‌اند. رایج‌ترین ملکول‌های مورد ردیابی در روش‌های ژنوتیپی، بخش‌های مختلف کمپلکس ژنی DNA ریبوزومی (rDNA) مانند ITS1، ITS2 یا مجموع این دو است و سایر ملکول‌ها کمتر به کار رفته‌اند. در پژوهش حاضر، تعداد قابل توجهی از مخمرهای جدا شده از کشت نمونه‌های خون به دست آمده از موارد کاندیدمی مورد شناسایی دقیق قرار گرفتند. ملکول هدف در این مطالعه، مجموع دو ناحیه‌ی ITS1 و ITS2 و قطعه‌ی ۵/۸S مابین این دو بود. ارزش تشخیصی این ملکول‌ها در شناسایی یا تاکسونومی مخمرها پیش از این طی تحقیقات متعددی به اثبات رسیده است (۱۹).

در این پژوهش، ۴۸ جدایه‌ی مخمری که طی ۱۵ ماه از نمونه‌های خون بیماران واجد زمینه‌های ایمونولوژیک بستری در برخی بیمارستان‌های تهران جدا شده بودند، توسط دو گروه آزمون‌های فنوتایپی و ملکولی مورد مطالعه قرار گرفت. در حالی که در بسیاری از کشورهای پیشرفته، پایش عوامل عفونت‌های خونی جزء وظایف روزمره‌ی آزمایشگاه‌های رفرانس و گاه بیمارستان‌ها می‌باشد ولی متأسفانه در کشور ما کاندیدمی را می‌توان از جمله عفونت‌های "مورد غفلت واقع شده" (Neglected diseases) بر شمرد که تاکنون هیچ گزارش قابل اعتنایی دال بر وفور آن یا عوامل موجد آن منتشر نشده است. مطالعه‌ی حاضر، اولین کار از این دست در کشور بوده است. همچنین، در مطالعه‌ی حاضر از روش مبتنی بر PCR-RFLP برای شناسایی جدایه‌های خونی استفاده شد که در نوع خود روش دقیق‌تر و قابل اعتمادتری در مقایسه با روش‌های سنتی مرسوم است و با اطمینان بالا موفق به تعیین گونه‌ی تمام جدایه‌ها شد. نتایج این پژوهش نشان داد که بیشترین میزان وفور در بین جدایه‌های مخمری مربوط به کاندیدا پاراپسیلوزیس و پس از آن به ترتیب کاندیدا گلابراتا و کاندیدا آلبیکنس بود. این یافته کمی غیر منتظره بود و باید مورد توجه قرار گیرد؛ چرا که در اغلب موارد کاندیدا آلبیکنس شایع‌ترین عامل نه تنها در کاندیدمی، که در تمام اشکال بالینی کاندیدیازیس بوده است (جدول ۲)، در حالی که گونه‌ی مذکور در میان

جدول ۲. فراوانی عوامل کاندیدمی در برخی از مطالعات مربوط به کشورهای دیگر

تعداد موارد کاندیدمی مورد مطالعه	شایع‌ترین عوامل کاندیدمی	گونه‌های کاندیدای ناشایع‌تر	منبع
۲۶	کاندیدا آلبیکنس (۷۳ درصد)	گلابراتا، پاراپسیلوزیس، تروپیکالیس، کفیر	۲۰
۴۱۵	کاندیدا آلبیکنس (۶۸/۹ درصد)	پاراپسیلوزیس، گلابراتا، تروپیکالیس، کروزی، لوزیتانیا، گیلرموندی	۲۱
؟	کاندیدا آلبیکنس (۴۵ درصد)	گلابراتا، پاراپسیلوزیس، تروپیکالیس، کروزی	۲۲
۱۳۰	کاندیدا آلبیکنس (۵۲/۳ درصد)	گلابراتا، پاراپسیلوزیس، تروپیکالیس	۲۳
۷۱۲	کاندیدا آلبیکنس (۴۱ درصد)	تروپیکالیس، پاراپسیلوزیس	۲۱

؟: تعداد موارد کاندیدمی‌در مقاله ذکر نشده بود.

جدایه‌های این پژوهش، حایز رتبه‌ی سوم فراوانی بود. با این حال با توجه به تعداد به نسبت کم جدایه‌های مورد بررسی، به نظر می‌رسد که مطالعه‌ی بزرگ‌تری برای تأیید این یافته‌ها مورد نیاز است.

بیشترین زمینه‌ی مستعد کننده در مبتلایان به کاندیدمی در این مطالعه شامل جراحی دستگاه گوارش یا قلب (۱۵ مورد) و پس از آن بدخیمی‌ها شامل بدخیمی‌های هماتولوژیک (۴ مورد) و تومورهای توپر(۶ مورد) و درمان با آنتی‌بیوتیک (۷ مورد) بود. دیابت (۳ مورد)، نارسایی کلیه و همودیالیز (هر کدام ۲ مورد)، نوزاد نارس (یک مورد) نیز جزء سایر عوامل مستعد کننده بودند. در ۵ مورد از ۶ مورد کاندیدمی ناشی از کاندیدا گلابراتا عامل زمینه‌ای ثبت شده برای بیماران، سرطان بافت سخت بود و در یک مورد دیگر سابقه‌ی جراحی استخوان فمور و نارسایی کلیه ذکر شد. در کاندیدمی‌های ناشی از کاندیدا پاراپسیلوزیس در ۴ مورد لوسمی، یک مورد تومور بافت سخت، یک مورد نارسایی کلیه، یک مورد دیابت و جراحی شکم، یک مورد جراحی قلب باز و یک مورد جراحی و استفاده از کاتتر داخل وریدی به عنوان عوامل زمینه‌ای مستعد کننده‌ی عفونت عنوان شدند. در کاندیدمی مربوط به کاندیدا آلبیکنس در ۴ بیمار، در یک بیمار عمل جراحی قلب یا دستگاه گوارش، در یک بیمار دیابت، در یک بیمار پیوند کلیه و بالاخره در یک مورد نیز نوزاد نارس به عنوان عوامل زمینه ساز عفونت ذکر شدند. عوامل زمینه‌ای مذکور در مطالعات انجام شده در سایر کشورها نیز اغلب به عنوان زمینه‌های مستعدساز عفونت خونی کاندیدایی مطرح بودند (۶، ۲-۱).

بیماران دارای کاندیدمی با عامل کاندیدا گلابراتا، همگی در سنین بالای ۵۰ سال و اغلب بالاتر از ۶۶ سال بودند. در برخی مطالعات دیگر نیز نشان داده شد که کاندیدیازیس منتشره با عامل کاندیدا گلابراتا در افراد بالاتر از ۶۰ سال و مبتلایان به لوسمی بیشتر دیده می‌شود (۲۰). بیماران واجد کاندیدمی ناشی از کاندیدا پاراپسیلوزیس در یک دامنه‌ی سنی گسترده از ۳ تا ۷۳ سال و به طور عمده کمتر از ۴۸ سال قرار داشتند و مبتلایان به کاندیدمی ناشی از کاندیدا آلبیکنس را، افراد در سنین مختلف از نوزاد نارس تا ۷۲ سال و اغلب کمتر از ۵۰ سال تشکیل دادند. سرنوشت ۸ نفر از بیماران، معادل ۲۵/۸ درصد کل بیماران مطالعه با مرگ رقم خورد که شامل ۳ مورد کاندیدمی با کاندیدا گلابراتا، ۳ مورد عفونت خون ناشی از کاندیدا آلبیکنس و ۲ مورد نیز کاندیدمی با عامل کاندیدا پاراپسیلوزیس بود.

www.mui.ac.ir

نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر داده‌های دست اول قابل اعتمادی راجع به عوامل علیتی کاندیدمی در ایران ارائه نموده است؛ اما از آن جایی که در مقیاس وسیع انجام نشده است، آگاهی و قضاوت بهتر در مورد میزان فراوانی کاندیدمی، تنوع و فراوانی گونه‌های کاندیدایی عامل عفونت و نیز بررسی شرایط و عوامل زمینه ساز عفونت‌های خونی کاندیدیایی در بیماران ایرانی مستلزم انجام پژوهشی فراگیرتر در این رابطه می‌باشد. همچنین با توجه به دقت، سهولت و سرعت انجام بالاتر روش RFLP-PCR، در قیاس با روش‌های مرسوم فنوتایپی، روش مذکور برای استفاده در مقاصد تشخیصی و غربالگری اپیدمیولوژیکی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان، مراتب سپاسگزاری خود را از آقای دکتر سلطان پور و سرکار خانم مجیدی که نمونه‌های کشت خون مورد درخواست را از بیمارستان بقیه ا... (عج) فراهم نمودند و نیز از آقای دکتر سید احمد حسینی و آقای رضا داورزنی در آزمایشگاه تشخیص طبی رسالت که در فراهم آوردن امکانات آزمایشگاهی همکاری صمیمانه‌ای داشتند، و نیز خانم زینب محمودیان جهت کمک‌های کامپیوتری ابراز می‌دارند.

References

1. Calderone RA. Candida And Candidiasis. Washington DC: ASM Press; 2002.
2. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different Candida species. Clin Infect Dis 1997; 24(6): 1122-8.
3. Beck-Sague C, Jarvis WR. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. J Infect Dis 1993; 167(5): 1247-51.
4. Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR, Conn LA, Perkins BA, Stephens DS, et al. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. Clin Infect Dis 1999; 29(5): 1164-70.
5. 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.
6. Richardson MD, Warnock DW. Fungal Infection: Diagnosis and Management. 3rd ed. New York: Wiley-Blackwell; 2003.
7. Merz WG. Candida lusitaniae: frequency of recovery, colonization, infection, and amphotericin B resistance. J Clin Microbiol 1984; 20(6): 1194-5.
8. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against Candida species infrequently isolated from blood. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 78-83.
9. Walsh TJ, Melcher GP, Rinaldi MG, Lecciones J, McGough DA, Kelly P, et al. Trichosporon beigelii, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. J Clin Microbiol 1990; 28(7): 1616-22.
10. Hitchcock CA, Pye GW, Troke PF, Johnson EM, Warnock DW. Fluconazole resistance in Candida glabrata. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37(9): 1962-5.
11. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of Candida species to fluconazole. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(1): 1-8.
12. Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, McCreary CE, Harrington BJ, Shanley DB, et al. Antifungal drug susceptibilities of oral Candida dubliniensis isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41(3): 617-23.
13. 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;

www.mui.ac.ir

43(11): 5425-7.
14. Mirhendi H, Kordbacheh P, Pezeshki M, Khoramizadeh MR. Simple and rapid identification of most medically important Candida species by a PCR-restriction enzyme method. Acta Medica Iranica 2003; 41(2): 79-83.
15. Pounder JI, Williams S, Hansen D, Healy M, Reece K, Woods GL. Repetitive-sequence-PCR-based DNA fingerprinting using the Diversilab system for identification of commonly encountered dermatophytes. J Clin Microbiol 2005; 43(5): 2141-7.
16. Pincus DH, Orenga S, Chatellier S. Yeast identification--past, present, and future methods. Med Mycol 2007; 45(2): 97-121.
17. 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.
18. Mirhendi H, Bruun B, Schonheyder HC, Christensen JJ, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, et al. Differentiation of Candida glabrata, C. nivariensis and C. bracarensis based on fragment length polymorphism of ITS1 and ITS2 and restriction fragment length polymorphism of ITS and D1/D2 regions in rDNA. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 30(11): 1409-16.
19. Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. Med Mycol 2002; 40(1): 87-109.
20. Nieto-Rodriguez JA, Kusne S, Manez R, Irish W, Linden P, Magnone M, et al. Factors associated with the development of candidemia and candidemia-related death among liver transplant recipients. Ann Surg 1996; 223(1): 70-6.
21. Yamamura DL, Rotstein C, Nicolle LE, Ioannou S. Candidemia at selected Canadian sites: results from the Fungal Disease Registry, 1992-1994. Fungal Disease Registry of the Canadian Infectious Disease Society. CMAJ 1999; 160(4): 493-9.
22. Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, et al. Incidence of bloodstream infections due to Candida species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. J Clin Microbiol 2004; 42(4): 1519-27.
23. Cheng MF, Yang YL, Yao TJ, Lin CY, Liu JS, Tang RB, et al. Risk factors for fatal candidemia caused by Candida albicans and non-albicans Candida species. BMC Infect Dis 2005; 5: 22.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29, No 167, 3rd week, February 2012 Received: 31.10.2011 Accepted: 16.12.2011

Species Identification of Candida Strains Isolated from Patients with Candidemia, Hospitalized in Tehran, by Enzymatic Digestion of ITS–rDNA

Mohammad Ghahri PhD[1], Hossein Mirhendi PhD[2], Abass-Ali Imani Fooladi PhD[3], Sedigheh Beyraghi[4]

Abstract

Background: Candidemia is a very important infection in terms of incidence and mortality. It can be caused by several species of the genus Candida and should be diagnosed and treated quickly. Although Candida albicans is still the most common causative agent of candidemia, the incidence of blood infections due to non-albicans Candida species has increased in the recent years. Species identification of the agents is necessary from the viewpoints of continuous epidemiological survey and susceptibility or resistance of different species to the antifungal drugs.

Methods: In this study, forty eight clinical isolates of Candida species obtained from blood specimen cultures belonging to 32 immunocompromised patients with candidemia who were hospitalized in some therapeutic centers in Tehran, Iran, were precisely identified at the species level by a set of PCR-RFLP assays.

Findings: C. parapsilosis was the most frequent agent of candidemia followed by C. glabrata, C. albicans, C. tropicalis and C. kefyr. These findings were unexpected and should be specifically mentioned because C. albicans is almost always the most common cause of candidemia and all other clinical forms of candidiasis, while among the isolates of the current study it only ranked third in terms of abundance.

Conclusion: We found that C. parapsilosis as the most common causative agent of candidemia in our samples. Considering the relatively low number of studied isolates, it seems that a larger study is needed to confirm these results.

Keywords: Candidemia, Candidiasis, Identification, PCR-RFLP, Iran.

[1] Assistant Professor, Department of Biology, School of Applied Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
[2] Associate Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Microbiology, Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Department of Medical Technology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Hossein Mirhendi PhD, Email: mirhendi@tums.ac.ir