مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره های ۱و۲، بهار و تابستان ۱۳۸۹، صفحات۹۹-۹۱

شناسایی گونه‌های *کاندیدا* جدا شده از نمونه خون بیماران مبتلا به کاندیدمی به روش Seminested PCR

محمد حسن شاه حسینی[1*]، محمد نعمتیان سوته[2]، محمد قهری[3] سارا سعادتمند[2] سید احمد حسینی[4]

۱) گروه میکرب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس
۲) گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
۳) گروه میکرب شناسی، دانشگاه امام حسین(ع)
٤) آزمایشگاه رسالت، تهران
نویسنده رابط: دکتر محمد حسن شاه حسینی، گروه میکرب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس
همراه ۰۹۱۲۲۳۰٤۰٦۹ shahhosseiny@yahoo.com

تارخ دریافت مقاله: ۸۸/۱۱/۲٤ تاریخ پذیرش مقاله:۸۹/٦/۱۰

چکیده:

زمینه و هدف: شاهد شیوع عفونت‌های قارچی از جمله *کاندیدا* و شیوع بیشتر بیماری ایدز، بدخیمی ها و افزایش اختلالات سیستم ایمنی هستیم. این امر زمینه را برای افزایش شیوع کاندیدیازیس سیستمیک و سپتی‌سمی کاندیدایی خصوصا با گونه‌های غیر *آلبیکنس کاندیدا* فراهم کرده است. هدف از این مطالعه تعیین هویت گونه‌های *کاندیدا* جدا شده از نمونه‌های کشت خون با استفاده از روش Seminested PCR بود.

روش بررسی: ۲۵۱٦ نمونه کشت خون در بیمارستان بقیه ا... در سال ۱۳۸۸از نظر رشد عوامل مخمری بررسی شد. نمونه‌های مثبت از جهت حضور *کاندیدا* با آزمون های فنوتیپی (مورفولوژی، بررسی رنگ کلنی روی محیط کروم آگار کاندیدا، آزمون لوله زایا و تولید کلامیدوسپور)و ژنوتیپی (Seminested PCR)، بررسی شد. DNAی همه نمونه‌ها به‌طور مستقیم ازکشت خون و با استفاده از کیت DNG-plus استخراج شد. برای PCR مرحله اول از پرایمرهای CTSF و CTSR که قطعه ITS2 (Internal Transcribed Spacer2) را تکثیر می کند استفاده شد. محصول مرحله اول به عنوان DNAی الگو برای انجام PCR مرحله دوم با استفاده از پرایمر عقبی مرحله اول(CTSR) و در حضور پرایمرهای اختصاصی گونه به نام های CADET ، CPDET، CTDET، CGDET و CDDET استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی به ترتیب برای شناسایی گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا دابلینینسیس* بود. گونه مخمر با توجه به الگوی باندهای ایجاد شده روی ژل و اندازه آن تشخیص داده شد.

یافته ها: از۱٤ (۰.۵٪) نمونه کشت خون ۱٦ ایزوله *کاندیدا* جدا و شناسایی شد. از این تعداد، ٦ ایزوله *کاندیدا آلبیکنس*، ٤ ایزوله *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، ٤ ایزوله *کاندیدا گلابراتا*، ۲ ایزوله *کاندیدا تروپیکالیس* بود. در دو نمونه خون، به‌طور همزمان دو گونه *کاندیدا* مشاهده و تعیین هویت شد(عفونت مخلوط). *کاندیدا دابلینینسیس* از هیچ نمونه‌ای جدا نشد.

نتیجه گیری: با استفاده از روش مولکولی Seminested PCR ، امکان تشخیص سریع گونه های پاتوژن *کاندیدا* از نمونه‌های خون با حساسیت و ویژگی بالا، فراهم شد.

کلید واژه‌ها: *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیداهای غیر آلبیکنس*، کشت خون، Seminested PCR ، ITS2 .

مقدمه:

کاندیدا مخمرهای کوچکی با دیواره نازک هستند(٦-٤ میکرون) که از طریق جوانه زدن تکثیر می یابند. جنس *کاندیدا*، متعلق به رده ساکارومایستال و خانواده ساکارومایستاسه می باشد. هفت گونه در جنس *کاندیدا*، عامل فرصت طلب شناخته شده‌اند. در حالی که، بیماری-زایی سایر گونه‌ها به صورت موردی گزارش شده است (۱، ۲). کاندیدیازیس، عفونتی است که توسط گونه‌های مختلف *کاندیدا*، به‌خصوص *کاندیدا آلبیکنس*، ایجاد می شود. در طی دو دهه اخیر فراوانی و شدت این عفونت‌ها به‌دنبال استفاده وسیع از آنتی‌بیوتیک‌ها، استروئیدها و سایر داروهای سرکوبگر ایمنی، افزایش چشمگیر یافته است. گونه‌های *کاندیدا* به صورت همزیست انسانی و حیوانی، در همه جا یافت می شوند. گونه‌های متعددی باعث کاندیدیازیس پوست، کاندیدیازیس دهان، واژینیت کاندیدایی، اونیکومایکوزیس(عفونت ناخن) کاندیدایی و سایر عفونت‌های سطحی می شوند. این موارد در افراد سالم نیز دیده می شود. عفونت‌های عمقی کاندیدایی که خون و یا سایر احشاء داخلی را درگیر می سازد (کاندیدیازیس سیستمیک) در افرادی که دچار ضعف یا نقص سیستم ایمنی هستند، دیده می شود(۵-۳).

امروزه بیماری کاندیدیازیس به عنوان یک مشکل مهم و به‌خصوص در بیماران بستری در بیمارستان قلمداد می شود. تا سال ۱۹۸۰ گونه *کاندیدا آلبیکنس* به عنوان شایع ترین گونه بیماری‌زا معرفی می شد. ولی از دو دهه گذشته با شیوع روزافزون ایدز، بدخیمی‌ها و افراد دچار سرکوب ایمنی ، روز به روز بر شیوع کاندیدیازیس سیستمیک و سپتی‌سمی کاندیدایی خصوصا با عواملی غیر از گونه *کاندیدا آلبیکنس* افزوده شده است (٦). مهم ترین چالش در مواجهه با کاندیدیازیس، ضایعات ناشی از گونه‌های غیر از *کاندیدا آلبیکنس* است، که به علت مقاومت دارویی آنها به داروهای متداول ضد قارچی می باشد. این گونه‌ها که تحت عنوان پاتوژن‌های نوپدید مطرح‌اند، عامل عفونت‌های غیرقابل کنترل بیمارستانی هستند. به‌عنوان مثال، گونه‌های *کاندیدا کروزئی* و *کاندیدا گلابراتا* به فلوکونازول و گونه-های *کاندیدا لوزیتانیا* و *کاندیدا تروپیکالیس* به آمفوتریسین B مقاوم می باشند. بنابراین، تعیین هویت سریع گونه‌های بیماری‌زا و تشخیص عوامل اتیولوژیک با چندین عامل بیماری‌زای کاندیدایی (عفونت مخلوط) الزامی است(٦، ۷). خوشبختانه فناوری‌های مولکولی شناسایی بر پایه DNA، افتراق صحیح و سریع گونه‌های *کاندیدا* را ممکن می سازد. روش‌های متعددی از گذشته تا حال برای تعیین هویت گونه‌های بیماری زای *کاندیدا* به کار رفته است. این روش ها را به‌طور کلی می توان به دو گروه فنوتیپی و ژنوتیپی تقسیم کرد. از روش های فنوتیپی می‌توان بررسی خصوصیات مورفولوژی مخمرها در محیط عصاره مالت آگار، جذب و تخمیر قندها، روش‌های سرولوژی، استفاده از محیط‌های رنگ زای تجاری همانند محیط کشت کروم آگار کاندیدا و روش‌های دیگر را نام برد(۸، ۹). روش‌های ژنوتیپی نیز متنوع می باشند. از جمله می توان به استفاده از پرایمرهای اختصاصی در PCR ، تعیین توالی نواحی ژنی خاص، و real-time PCR اشاره کرد(۱۰، ۱۱). تمام این روش‌ها مفید هستند و هر کدام مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند. روش‌های سنتی مانند جذب و تخمیر قندها برای تعیین گونه‌های مخمری از جمله *کاندیدا* قابل استفاده است. ولی این روش بسیار وقت گیر است و برای بیمار و پزشک مفید نیست. زیرا، حداقل به یک تا دو هفته زمان نیاز دارند. این روش‌ها همچنین غیر حساس، پرهزینه و پرزحمت است(۱۲). روش های دیگر تشخیص، نظیر ردیابی آنتی بادی، عمدتا در افراد مبتلا به سرکوب ایمنی غیرقابل استفاده است. زیرا، این افراد توانایی پاسخ به عفونت از طریق تولید آنتی بادی را ندارند و یا در صورت تولید ، مقدار آن برای ردیابی ناکافی می باشد. ولی استفاده از روش‌های تشخیصی بر پایه DNA همانند PCR دارای حساسیت و ویژگی بالا است. روش مولکولی Seminested PCR برای تشخیص *کاندیداهای* مهم پاتوژن شامل *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا دابلینینسیس* استفاده می‌شود(۱۳، ١٤). هدف از انجام این مطالعه تعیین هویت گونه‌های *کاندیدا* جدا شده از نمونه‌های کشت خون با استفاده از روش Seminested PCR بود.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه توصیفی مقطعی برای شناسایی و تعیین هویت گونه‌های *کاندیدا* در نمونه خون بیماران، با استفاده از روش مولکولی Seminested PCR (snPCR) انجام شده است. بین ماه‌های اردیبهشت تا آذر ۱۳۸۸، از ۲۵۱٦ نمونه خون بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان بقیه ا... که به آزمایشگاه میکرب شناسی آن بیمارستان ارسال

شده بود، کشت ١٤ نمونه (۰.۵٪) از نظر عوامل مخمری مثبت بود. این دسته از نمونه‌های خون جمع‌آوری شد تا با انجام آزمون‌های مختلف فنوتیپی و آزمون مولکولی، تعیین هویت شوند.

سویه‌ها: شامل دو گروه بودند: الف) سویه‌های استاندارد که عبارت بودند از: *کاندیدا آلبیکنس* (ATCC 10231)، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* (ATCC 22092) ، *کاندیدا تروپیکالیس* (ATCC 0750) ، *کاندیدا گلابراتا* (ATCC 90030) و *کاندیدا دابلیننسیس* (CD36) . این سویه‌ها در لوله‌های حاوی گلیسرول ۲۰٪، در فریزر با دمای ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند). ب) ایزوله‌های مخمری جدا شده از نمونه کشت خون بیماران. ١٦ ایزوله *کاندیدایی* که از ١٤ نمونه خون بیمار جدا و شناسایی شد.

کشت بر روی محیط کروموژنیک کروم آگار کاندیدا: سویه‌های استاندارد برای کنترل آزمایش‌ها و همچنین بهینه نمودن PCR استفاده شد.این گونه‌ها روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار(Merck) کشت شد و در انکوباتور با دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از ٤٨ تا ۷۲ ساعت با فیلدوپلاتین حلقه‌ای استریل مقدار کمی از کلنی آنها بر روی محیط کشت افتراقی کروم آگار کاندیدا(CHROMagar Company,France) کشت داده شد. محیط‌های کشت تلقیح شده در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از ٤٨ ساعت، کلنی‌ها از نظر مورفولوژی و رنگ پیگمان بررسی شدند. این آزمایش بر روی ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های خون هم انجام شد.

آزمون لوله زایا : با یک فیلدوپلاتین حلقه‌ای استریل از نمونه کشت تازه بیمار برداشت شد و درون نیم میلی‌لیتر سرم انسان کاملا مخلوط گردید. سوسپانسیون فوق در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۳ ساعت نگهداری شد. سپس با یک فیلدوپلاتین حلقه‌ای استریل یک قطره از سوسپانسیون فوق روی لام گذاشته شد و روی آن لامل قرار گرفت. وجود یا فقدان لوله زایا در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ضعیف (X ٤٠) بررسی شد.

بررسی ایجاد کلامیدوکونیدی روی محیط کورن میل آگار دارای ۱ درصد توئین ۸۰ (*CMA-T80*): مخمرهای هر دو گروه (سویه‌های استاندارد و جدا شده از نمونه کشت خون بیماران) ابتدا بر روی محیط سابورودکستروز آگار کشت داده شدند. سپس با یک فیلدوپلاتین حلقه‌ای استریل به صورت شیارهای کم عمق و موازی بر روی محیط کورن میل آگار حاوی توئین۸۰ (Himedia) تلقیح شد. محیط های کشت به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. با استفاده از درشت نمایی ضعیف میکرسکوپ وجود یا عدم وجود کلامیدوکونیدی بررسی شد.

استخراج *DNA* کاندیدا: جهت استخراج DNA از سویه های استاندارد *کاندیدا* که در محیط سابورو دکستروز آگار رشد کرده بودند، از روش جوشاندن استفاده شد. برای این منظور یک حلقه از کلنی تازه برداشته شد و به لوله ۱/۵میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر منتقل شد. سپس لوله در آب در حال جوش قرار گرفت. پس از ۲۰ دقیقه لوله خارج شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. مایع رویی که حاوی DNA مخمر بود وارد لوله جدید شد و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای استخراج DNA از نمونه‌های کشت خون بیماران از کیت DNG-plus شرکت سیناژن و مطابق با دستورالعمل آن استفاده گردید.

واکنش PCR مرحله اول: برای انجام مرحله اول PCR از مواد زیر با غلظت‌های ذکر شده برای یک واکنش ۲۵ میکرولیتری استفاده شد: ۲/۵میکرولیتر بافر 10X ، ۰/۷۵میکرولیتر (50mM) MgCl2 ، ۱ میکرولیتر(10mM) dNTPs،۱میکرولیتر پرایمر جلویی CTSF ، ۱میکرولیتر پرایمر عقبی CTSR ، ۰/۲۵میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (5u/µl) ، ۳ میکرولیتر DNA الگو و ۱۵/۵میکرولیتر آب مقطر دیونیزه شده. سیکل‌های گرمایی دستگاه ترموسایکلر برای انجام PCR مرحله اول بدین شرح بود: دناتوراسیون ابتدایی ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه که با ۳۰ سیکل به صورت زیر دنبال می شد: دناتوراسیون ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و یک مرحله تکثیر انتهایی ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت ۷ دقیقه.

واکنش PCR مرحله دوم: ۲/۵میکرولیتر از بافر 10X ، ۰/۷۵میکرولیتر (50mM) MgCl2 ، ۱ میکرولیتر(10 mM) dNTPs، ۱ میکرولیتر پرایمر عقبی CTSR ، ۱ میکرولیتر پرایمر اختصاصی گونه، ۰/۲۵میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase(5u/µl) ، ۲ میکرولیتر DNA الگو و ١٦/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه شده تا

حجم کل را به ۲۵ میکرولیتر برساند. دستور دمایی برای انجام PCR مرحله دوم همانند مرحله اول است، ولی تعداد سیکل‌ها از ۳۰ به ۲۵ کاهش یافت.

جهت بهینه سازی تستPCR ، غلظت پرایمر، MgCl2، dNTP ، آنزیم Taq DNA Polymerase و همینطور دستور حرارتی طبق قواعد استاندارد آزمایش شد.

مشاهده محصول PCR : محصول PCR مرحله اول(بینbp ۳۰۹ تا bp ۴۱۳ متناسب با نوع *کاندیدا*) در ژل آگارز ۱/۸٪ و محصول PCR مرحله دوم در ژل آگارز ۲/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید (سیناژن 10 mg/ml) در بافر TBE 1X الکتروفورز گردید.

تعیین اختصاصیت و حساسیت تست PCR بهینه شده : برای تعیین اختصاصیت تست PCR بهینه شده، DNA گونه‌های *کاندیدا* و DNA جنس‌های مختلف باکتریایی از قبیل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس*، *پسودوموناس آئرژنوزا* و همچنین نمونه DNA انسان استخراج شد. با انجام PCR روی این نمونه‌ها، ویژگی تست ارزیابی شد. برای تعیین حساسیت تست PCR بهینه شده، رقت‌های سریال از گونه *کاندیدا آلبیکنس* تهیه شد و تعداد مخمرها با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری شمارش شد. از هر رقت برداشته شد و DNA با روش جوشاندن استخراج شد. سپس با استفاده از DNA های استخراج شده و نمونه شاهد مثبت و منفی، حساسیت تست PCR تعیین گردید.

توالی یابی : تعیین توالی DNA در هر دو جهت با استفاده از روش ختم زنجیره(Dideoxy ChainTermination) و به‌وسیله کمپانی ماکروژن کره انجام گردید.

یافته ها:

۱۶ایزوله *کاندیدا* جدا شده از نمونه‌های خون به ترتیب به صورت ذیل تعیین هویت شدند: ٦ ایزوله *کاندیدا آلبیکنس*، ٤ ایزوله *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، ٤ ایزوله *کاندیدا گلابراتا* و ۲ ایزوله *کاندیدا تروپیکالیس*. در دو نمونه خون به طور همزمان، دو گونه مختلف *کاندیدا* مشاهده شد (*کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا تروپیکالیس* در نمونه بیمار اول، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* در نمونه بیمار دوم). در هیچ یک از نمونه‌های بالینی *کاندیدا دابلینینسیس* جدا نشد.

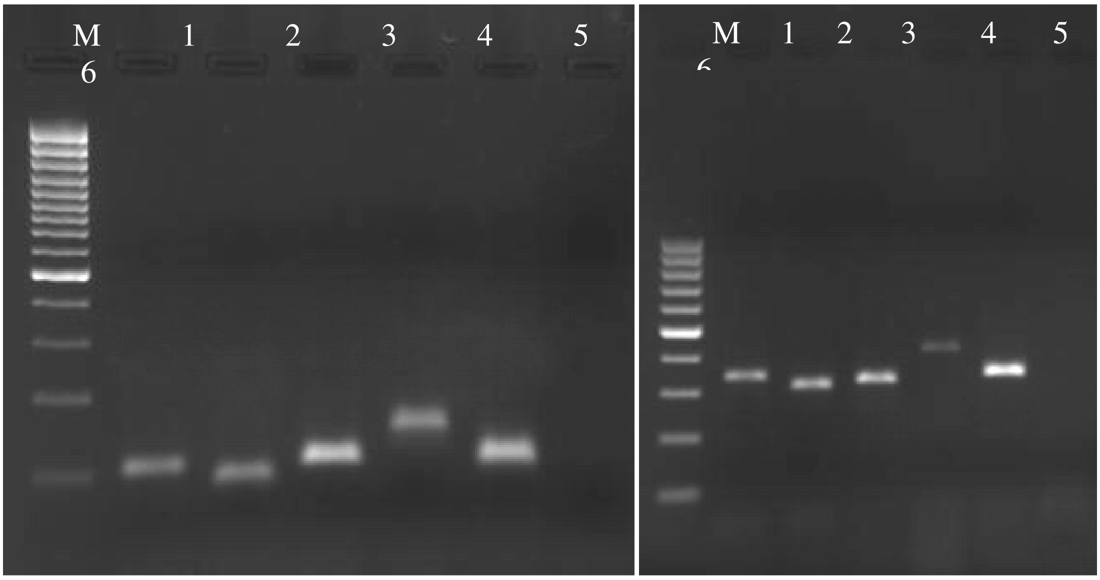
شناسایی فنوتیپی:الف) گونه‌های *کاندیدا* که از قبل هویت آنها مشخص بود. در محیط کشت کروم آگار کاندیدا ، کلنی های *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، *کاندیدا تروپیکالیس* و *کاندیدا دابلینینسیس* به ترتیب به رنگ سبز، صورتی پر رنگ، کرم- صورتی کم رنگ، آبی و سبز نمایان شدند. البته شناسایی از روی رنگ (با توجه به رنگ‌های معرفی شده در دفترچه شرکت سازنده) بین گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا دابلینینسیس* دشوار بود. در ضمن رنگ کلنی *کاندیدا پاراپسیلوزیس* غیر اختصاصی بود. آزمون لوله زایا در گونه-های *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا دابلینینسیس* مثبت بود.

بر روی این پنج گونه *کاندیدا*، تست کورن میل آگار توئین ۸۰ انجام شد. نتایج عبارت بودند از: مشاهده بلاستوسپور، هایف‌های کاذب و حقیقی به همراه کلامیدوکونیدی در *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا دابلینینسیس*، در *کاندیدا گلابراتا* فقط بلاستوسپور ، در *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا تروپیکالیس* علاوه بر بلاستوسپور، هایف‌های کاذب نیز مشاهده شد.

در این آزمون، کلنی‌های مربوط به دو بیمار که مبتلا به عفونت مخلوط بودند به صورت تک رنگ نبود. از این‌رو با دقت کلنی‌ها جدا شدندو به محیط کشت جدید برای بررسی بیشتر منتقل شدند. آزمون لوله زایا ٦ ایزوله از ١٦ ایزوله جدا شده از نمونه خون، که بر روی کروم آگار کاندیدا کلنی های سبز روشن تولید کرده بودند، مثبت بود. این ٦ ایزوله در محیطCMA T80 کلامیدوکونیدی تولید کردند. ٤ایزوله، کلنی‌هی صورتی کم رنگ ایجاد کرده بودند و روی محیط CMA T80 ، بلاستوسپور به همراه هایف-های کاذب تولید کردند. آزمون لوله زایا در آنها منفی بود. ٤ ایزوله در محیط رنگ زای کروم آگار کاندیدا کلنی‌های صورتی براق و گنبدی شکل تولید کردند. آزمون لوله زایا در آنها، منفی بود و روی محیط CMA T80 فقط بلاستوسپور تولید کردند. ۲ایزوله نیز کلنی‌هایی به رنگ آبی ایجاد کرد و آزمون لوله زایا آنها منفی بود. این ایزوله‌ها در محیط CMA T80 بلاستوسپور به همراه هایف‌های کاذب تولید کردند.

شناسایی ژنوتیپی: شکل ۱ الکتروفورز محصولات PCR مرحله اول و دوم بعد از بهینه سازی را نشان می‌دهد. در این مورد DNAی الگو به طریق جوشاندن از سویه‌های استاندارد *کاندیدا* استخراج شد.

حساسیت تست Seminested PCR در این مطالعه ۷ سلول *کاندیدا آلبیکنس* تعیین شد. همچنین این تست دارای ویژگی بسیار بالا بود. به‌طوری که جز با DNA *کاندیدا آلبیکنس* با هیچ کدام از DNA های بکار رفته در این آزمایش واکنش نشان نداد.(شکل ۲).



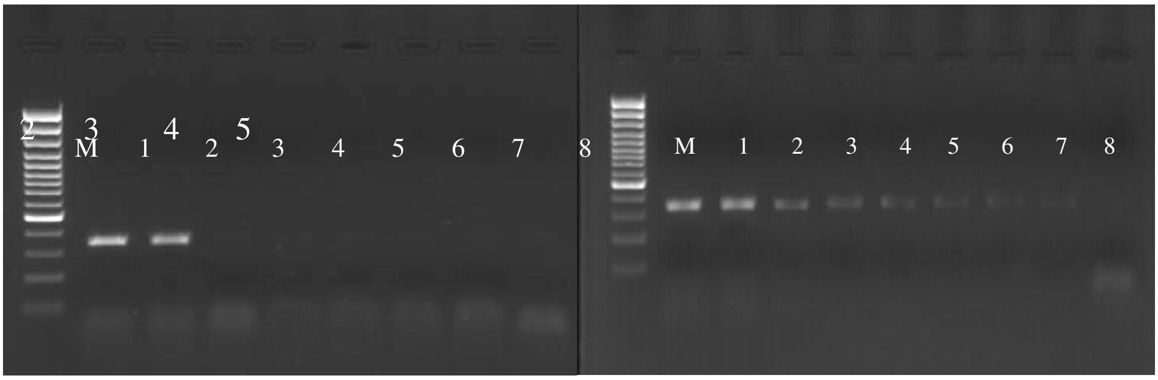
شکل 1b

شکل1a

شکل۱- محصولات مرحله اول و دوم PCR بهینه سازی شده.

شکل ۱a : ستون M ،سایز مارکر شرکت فرمنتاس 100bp DNA ladder ۱: محصول PCR مرحله اول حاصل از DNAی ژنومی *کاندیدا آلبیکنس*،۲: *کاندیدا پاراپسیلوزیس*،۳: *کاندیدا تروپیکالیس*،٤: *کاندیدا گلابراتا*، ٥: *کاندیدا دابلینیسیس*،٦: شاهدمنفی.

شکل ۱b: ستون M : سایز مارکر شرکت فرمنتاس 100bp DNA Ladder plus ، ۱ : محصول snPCR حاصل از DNAی *کاندیدا آلبیکنس*، ۲: *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، ۳: *کاندیدا تروپیکالیس*، ٤: *کاندیدا گلابراتا*، ٥: *کاندیدا دابلینیسیس*، ٦: شاهد منفی.



شکل ۲b

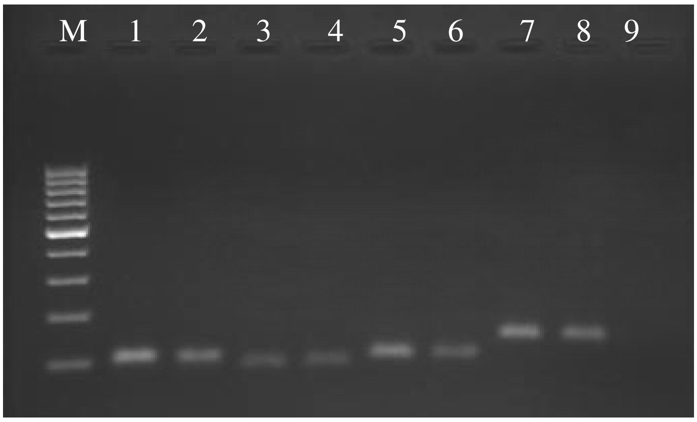
شکل2 a

شکل ۲- حساسیت و ویژگی تست PCR .

شکل ۲a: ستون M، سایز مارکر شرکت فرمنتاس 100bp DNA Ladder plus ، ۱: شاهد مثبت، ۹-۲: نمونه های مشخص وبه ترتیب شامل۲: 42250 CFU ، ۳: 7605 CFU ،٤: 1690 CFU ،٥: 338 CFU ،٦: 64 CFU ، ۷: 18 CFU ، ۸: 7 CFU ، ۹: شاهد منفی.

شکل b ۲ – ستون M : سایز مارکر شرکت فرمنتاس 100bp DNA Ladder plus ، ۱: شاهد مثبت *(کاندیدا آلبیکنس)*، ۲: *کاندیدا آلبیکنس*، ۳: DNAی انسان، ٤: DNAی *استافیلوکوکوس اورئوس*، ٥: DNAی *پسودوموناس آئرژنوزا*، ٦: DNAی *اشریشیا کلی* ، ۷: DNAی *باسیلوس سرئوس*، ۸: شاهد منفی.

نتـایج روش تشخیصـی Seminested PCR بـر روی نمونه‌های بالینی شامل شناسایی و تعیین هویـت ٦ ایزولـه *کاندیدا آلبیکنس*،٤ ایزوله *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، ٤ ایزولـه *کاندیـدا گلابراتـا* و ۲ ایزولـه *کاندیـدا تروپیکـالیس* بـود (شکل۳). نتیجه آزمون ژنوتیپی با آزمون‌های فنوتیپی کـاملا مطابقت داشت. جهت بررسـی و تاییـد محصـولات PCR مرحله دوم مربوط به گونه‌های مختلـف *کاندیـدا*، قطعـات DNA توسط تکنیک sequencing تعیین تـوالی شـدند. مقایسه توالی های حاصل با سکانس های موجود از طریـق برنامه BLAST ، مطابقت حدود ۱۰۰درصد را نشان داد.



شکل ۳: محصول PCR مرحله دوم چهار گونه کاندیدا شناسایی شده در نمونه های خون در کنار شاهد مثبت را نشان می دهد.
ستون M: سایز مارکر شرکت فرمنتاس 1oobp DNA Ladder ، ۱: شاهد مثبت *کاندیدا آلبیکنس*، ۲: *کاندیدا آلبیکنس جدا شده*، ۳: شاهد مثبت *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، ٤: *کاندیدا پاراپسیلوزیس* جدا شده ، ٥: شاهد مثبت *کاندیدا تروپیکالیس*، ٦: *کاندیدا تروپیکالیس* جدا شده ، ۷: شاهد مثبت *کاندیدا گلابراتا*، ۸: *کاندیدا گلابراتا جدا شده* ، ۹: *شاهد منفی*.

بحث:

در مطالعه حاضر DNA گونه‌های مختلف *کاندیدا* به‌طور مستقیم از نمونه‌های خون استخراج شد و به عنوان DNA الگـو مـورد اسـتفاده قرارگرفـت. بـا اسـتفاده از روش Seminested PCR ، عفونت‌های مخلوط تشخیص داده شد و گونه‌های *کاندیدا* درگیر در این نـوع عفونـت تعیـین هویت شد. کارایی ایـن روش تشخیصـی بـرای شناسـایی سویه های استاندارد و همچنین برای شناسایی ایزولـه‌هـای خونی مجهول بیماران، نشان داده شد.

امروزه بـه‌دلیـل شـیوع بیمـاری کاندیـدیازیس و همچنـین مقاومت دارویی بعضی از گونه‌های *کاندیدا*، تعیـین هویـت عوامل بیماریزا در سطح گونه بسیار ضـروری بـه‌نظـر مـی رسد. کاندیدیازیس خونی با مرگ و میر چشمگیری همـراه است. بنابراین، این دسته از بیماران باید هر چـه سـریع تـر تحـت درمـان ضـد قـارچی قـرار بگیرنـد. اغلـب مـوارد کاندیدیازیس عمقی در میزبان تضعیف شده دیده می شود. اشـکال احشـایی و کشـنده کاندیـدایی بیشـتر در افـراد نوتروپنیک مبتلا بـه بـدخیمی تحـت درمـان و یـا بیمـاران بخش جراحی یا سوختگی دیده می شود. سـرکوب ایمنـی منجر به عفونت خونی کاندیـدیازیس مـی شـود (٤، ۱٥ و ۱٦). مهم ترین عوامل مستعد کننـده عبارتنـد از: بـدخیمی خونی، پیوند مغز استخوان یا پیوند عضو و درمان سرکوب کننـده ایمنـی شـامل شـیمی درمـانی سـرطان، درمـان بـا کورتیکواستروییدها و غیره (۱۷، ۱۸).

با اسـتفاده از روش‌هـای تشـخیص آزمایشـگاهی مرسـوم همانند به‌کارگیری محیط‌های کشت معمولی مانند سـابورو دکستروز آگار، امکان تعیین گونه‌های *کاندیدا* وجود نـدارد. به‌کارگیری محیط کشت افتراقـی کـروم آگـار کاندیـدا کـه کروموژنیک می باشد، محدود بـه شناسـایی چنـد گونـه از کاندیداهای پاتوژن است. بـه‌عـلاوه نسـبت بـه روش‌هـای مولکولی نوین، به زمان بیشتری برای دسـتیابی بـه جـواب نیازمند است (۹، ۱۹). آزمون‌های بیوشیمیایی وقـت گیـر و یا در بعضی موارد پرهزینه است. به‌طور کلی آزمایش‌هـای سرولوژی که در حال حاضر در دسترس هستند، حساسیت یا جنبه اختصاصی محدودی دارنـد. آنتـی بـادی سـرمی و

ایمنی با واسطه سلولی در اکثر افراد قابل مشاهده هستند که ناشی از تماس دائمی با *کاندیدا* است. متاسفانه شناسایی آنتی‌بادی‌های *کاندیدا* در مدت زمان کوتاهی به سرعت، حساسیت و ویژگی خود را از دست می دهد. در ضمن آنتی بادی در افراد با ایمنی سرکوب شده به علت عدم توانایی پاسخ به عفونت ، دشوار است. در مورد آشکار سازی آنتی‌ژن‌ها، ردیابی مانان دیواره سلولی در گردش خون، با استفاده از آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس یا الیزا، بسیار اختصاصی تر است. ولی این آزمایش فاقد حساسیت می باشد، چون بسیاری از بیماران فقط به‌طور گذرا مثبت می شوند، بنابراین عیارهای قابل توجه و قابل ردیابی از آنتی ژن پیدا نمی کنند(۲۰). آزمون بررسی تولید لوله زایا یکی از ابتدایی‌ترین روش های تشخیص *کاندیدا آلبیکنس* است. ۹۵تا ۹۷ درصد ایزوله‌های بالینی *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا دابلینینسیس* توانایی تولید لوله زایا را دارند. بنابراین، با مثبت بودن جواب آزمایش، نمی توان آن را به-طور یقین به *کاندیدا آلبیکنس* نسبت داد. برای متمایز نمودن این دو گونه *کاندیدا* نیاز به آزمایش‌های تکمیلی ضروری به‌نظر می رسد. جهت جدا نمودن *کاندیداهای غیر آلبیکنس* از *کاندیدا آلبیکنس* از محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰ استفاده می شود. در این محیط، علاوه بر *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا دابلینینسیس* نیز قادر به ایجاد کلامیدوکونیدی(کلامیدوسپور) می باشد، به‌علاوه، این آزمایش نیز وقت گیر است.

امروزه روش های مولکولی در شناسایی صحیح و سریع گونه‌ها کمک شایانی می کند. لذا، در این مطالعه استفاده از روش مولکولی بر پایه PCR برای تعیین هویت گونه‌های شایع و بیماریزای *کاندیدا* مورد بررسی قرار گرفت. در طی دهه اخیر، جهت PCR برای تشخیص کاندیدیازیس، از ژن‌های مختلف چون منطقه متغییر D1/D2 در ناحیه ژنی rDNA ، hsp90 ، ERG11 ، کیتین سنتاز، آسپارتیل پروتئیناز ترشحی، DNA میتوکندریایی، اکتین، توبولین، تعدادی از قطعات ژنی rRNA مشتق از نواحی نسخه برداری شده درونی(ITS) و 5S rRNA ، 18S rRNA و 28S rRNA انجام شده است. در این مطالعه DNA هدف، قطعه rDNA بود. از این قطعه ژنی چندین نسخه در هر ژنوم کاندیدا وجود دارد(۱۰۰-۵۰کپی). به-طور معمول تست PCR در صورتی که DNA هدف واجد توالی‌های تکرار شونده باشد نسبت به اهداف تک نسخه ، از حساسیت بیشتری برخوردار است (۲۱، ۲۲). از جمله زیر مجموعه‌های فوق العاده حفاظت شده rDNA ، قطعات ITS می باشد که در میان گونه‌های مختلف *کاندیدا* دارای سکانس‌های منحصر بفرد است. بنابراین، با استفاده از پرایمرهای مرتبط به این نقاط، شناسایی گونه-های مختلف *کاندیدا* امکان پذیر شد. اگرچه اخیرا چندین آزمون PCR برای تکثیر rDNA گزارش شده، اما شناسایی گونه‌ها شامل انجام آزمون‌های بیشتر روی محصول تکثیر یافته است. از جمله این مراحل می توان به هضم آنزیمی محصول PCR به‌وسیله آنزیم‌های محدودالاثر(۲۴و۲۳)، استفاده از پروب‌های نشان دار با مواد رادیو اکتیو ، آنزیم‌های نشان دار و تعیین توالی محصول تکثیر شده را نام برد (۲۸-۲۵). بسیاری از این فرایندها، زمان بر، پر هزینه و با توجه به بکارگیری مواد رادیو اکتیو خطرناک هستند. در مقابل روش Seminested PCR که در این مطالعه به‌کار گرفته شد به مدت زمان کمتر (به طور میانگین ۷ تا ۸ ساعت) نیاز دارد و به پروب‌های هیبریدیزاسیون و مواد رادیو اکتیو احتیاج ندارد. اما از معایب آن می توان به خطر بالاتر آلودگی و همینطور زمان طولانی تر نسبت با آزمون‌های تک مر حله‌ای اشاره کرد.

Fujita و همکاران از سیستم Multiplex PCR برای تکثیر قطعات ژنی ITS1وITS2 استفاده کردند. در آن روش به تعداد DNA الگو بیشتری احتیاج بود در نتیجه نسبت به روش Seminested PCR از حساسیت کمتری برخوردار است (۱۳، ۲۶). میرهندی و همکاران روش PCR-FSP را برای تکثیر قطعه ITS1 و ITS2 و شناسایی گونه‌های *کاندیدا* استفاده کردند. اما افتراق *کاندیدا آلبیکنس* از *کاندیدا دابلینینسیس* با این روش میسر نبود (۳۰). سهیل احمد و همکاران در کنار سیستم‌های تشخیصی Vitekو ID32C برای شناسایی *کاندیداهای* بیماری‌زا از نمونه های سرم بیماران از روش Seminested PCR استفاده کردند. با توجه به نتایج به دست آمده، ویژگی این آزمون ۹۹ درصد و حساسیت آن به اندازه تشخیص یک ژنوم *کاندیدا* در هر میلی لیتر سرم بیان شد (۱۳).

در مطالعه حاضر کارایی Seminested PCR ، برای شناسایی سویه‌های استاندارد و ایزوله‌های خونی مجهول بیماران، نشان داده شد. این روش به عنوان یک روش سریع، مطمئن و دارای حساسیت و ویژگی بالا در تشخیص گونه‌های بیماریزای *کاندیدا* در آزمایشگاه‌های بالینی توصیه می شود.

نتیجه گیری:

با توجه به نتایج به‌دست آمده می توان بیان کـرد کـه روش Seminested PCR ، که در این مطالعه بـرای شناسـایی *کاندیداهای* پاتوژن استفاده شد، حساسـیت و ویژگـی بـالا دارد. این روش نسبت به روش‌های متداول تشخیصـی بـه مدت زمان کمتری نیاز دارد.

تقدیر و تشکر:

بدین وسیله از آقای داورزنی سوپروایزر آزمایشگاه رسالت، خانم بیرقی، خانم عبـدلی و کارکنـان آزمایشـگاه رسالت به خاطر راهنمـایی‌هـای ارزنـده و همکـاری هـای صمیمانه تشکر و قدردانی می شود. همچنین مراتب تشـکر خود را از آقای دکتر سلطان پور، خـانم مجیـدی و خـانم جدی و آقای افشار از بیمارستان بقیـه ا... بـرای در اختیـار گذاشتن نمونه‌های کشت خون و خانم آقاپور از بیمارستان شریعتی ابراز می دارد.

فهرست مراجع:

1. Dalle F, Franco N, Lopez J. comparative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and non-bloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. *J. Clin Microbial* 2000; 38:4554-9.

2. Karahan Z.C, Guriz H, Agirbasli H,Balaban N, Gocmen J.S, Aysev D, *et al.* Genotype distribution of *Candida albicans* isolates by 25S intron analysis with regard to invasiveness.*Mycoses* 2004;47:465-469.

3.Reise E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D C, ebeaupuis J P, *et al.* Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med Mycol.*1998; 36(Suppl.1):249-25.

4.Martin GS, Mannimo DM, Eaton S, Moss M: The epidemiology of sepsis in the united states from 1979 through 2000. *New Engl J Med* 2003; 348:1546-1554.

5. Bodey GP, Anaissie Ey, Edwards JE. Definition of *Candida* infection – In: Bedey GP, ed. *Candidiasis : pathogenesis, diagnosis, and treatment*. New York, Raven Press, 1993; pp:407-408.

6. Yun-liang Y, Shu-Ying L, Hsiao-Hsu C, Hsiu-jung L. The trend of susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species from 1990 to 2002 in Taiwan. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 83-99.

7. Sandven P. lassen G. Importance of selective media for recovery of Yeasts from clinical speciments. *J Clin Microbiol* 1990; 37(11): 3731- 3733.

8.Del Castillo L, Bikandi J, Nieto A, Quindos G, Sentandreu R, Ponton J: Comparison Of morphotypic and genotypic methods for strain delineation in *Canada*. *Mycoses* 1997; 40 :445-450.

9. Freydie're AM, Parant F, Chaux C, Gille Y. *Candida* ID. A new chromagenic medium compared to *Albicans* ID2. *Clin Microbial Infect* 2000; 6(supp1.1): 181.

10.Lott TJ, Burns BM, Zancope-Oliveira R, Elie DM, Reiss E: Sequence analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) from yeast species within genus *Candida*. *Current Microbiol* 1998; 36:63-69.

11.Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, *et al.* Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J Clin Mirobiol* 2000; 38: 2302-2310.

12. Ajello L, Hay RJ. Unicelluar Ascomycetous, *Candida* species. *Medical mycology* , Arnold Publication, Ninth edition. 1999; PP:423-450.

13. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU: Seminested PCR for diagnosis of candidemia: Comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2483–2489

14. Suhail Ahmad, Eiman Mokaddas, Noura Al-Sweih, Zia U Khan. Phenotypic and molecular characterization of *Candida dubliniensis* isolates from clinical specimens in Kuwait. *Med Princ Pract* 2004;14(suppl 1):77–83

15.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; 40:87-109.

16. Mannarelli B.M, Kurtzman C.P. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *J. Clin. Microbial* 1998; 36(6): 1634-1641.

17. Dinubile M.J, Hille D, Sable C.A, Kartsonis N.A. Invasive candidiasis in cancer patients: observation from a randomized clinical trial. *J Infect*. 2005; 50: 443-449.
18. Body G.P, Mardani M, Hanna H.A. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am J Med*.2002; 112:380-5.
19. Fricker-Hidalgo H, Orenga S, Lebeau B, Pelloux H, Brenier-Pinchart MP. Evaluation of *Candida* ID, a new chromogenic medium for fungal isolation and preliminary identification of some yeast species. *J Clin Microbial* 2005; 39:1647-1649.
20. Arjuna N.B Ellepola , Christine J. Morrison. Laboratory diagnosis of invasive Candidiasis. *J Microbiol* .2005; 43:64-85.
21.Mitchel, T. G., R. L. Sandin, B. H. Bowman, W. Meyer, W, G. Merz. Molecular mycology: DNA probes and application of PCR technology . *J. Med. Vet. Mycol.*1994; 32(Suppl. 1): 351- 366.
22.Reiss, E., K. Tanaka, G. Bruker, V. Chazalet, D. Coleman. J. P. Debeaupuis, *et al*. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med. Mycol.*1998;36(Suppl. 1) :249- 257.
23.Morace, G., L. Pagano, M. Sanghinetti, B. Posteraro, L. Mele, F. Equitani, G. *et al*. PCR-restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrible patiens with hematological malignancies. *J. Clin. Microbiol.*1999; 37:1871-1875.
24. Williams, D. W., M. J. Wilson, M. A. Lewis, A. J. Potts. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.*1995; 33:2476-2479.
25.Botelho, A. R. , and R. J. Planta. Specific identification of *Candida albicans* by hybridization with oligonucleotides derived from ribosomal DNA internal spacers. *Yeast* 1994; 10:709-717.
26. Fugita, S., Y.Senda, S. Nakagughi, T. Hashimoto. Multiplex PCR using internal transcribed spwcer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strain. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:3617-3622.
27. Kan, V. L. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *J. Infect. Dis.*1993; 168:779-783.
28. Shin, J. H., F. S. Nolte, and C. J. Morrison. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J.Clin. Microbiol* 1997;35: 1454-1459.
29. Chang, H. C., S. N. Leaw, A. H. Huang, T. L. Whu, and T. C. Chang. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J. Clin. Microbiol.*2001; 39: 3466-3471.
30. Mirhendi H, Idin H , Shidfar MR , Kordbacheh P , Hashemi SJ , Moazeni M, *et al*. Identification of pathogenic *Candida* species by PCR-Fragment Size Polymorphism (PCR-FSP) method. *Ira J Public Health*. 2008; 66(9): 639-645.