REVIEW ARTICLE

Multilocus Sequence Typing: a Molecular Typing Method with High Discriminatory Power for Identification of Candida Albicans Strains in Epidemiological Studies

Sayed Mohammad-Hosein Afsarian[1]
Hamid Badali[2]
Tahereh Shokohi[3]

[1] Student Research Committee, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari AND Department of Microbiology, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Invasive Fungal Research Center (IFRC), School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Invasive Fungal Research Center (IFRC), School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received July 2, 2013; Accepted October 1, 2013)

Abstract

Candida spp. are ubiquitous yeasts commonly. Those are commensally and opportunist pathogens in humans. Candidiasis in immunocompromised patients and patients with severe underlying diseases or critical illnesses need aggressive diagnosis or treatment procedures. *Candida albicans* (*C. albicans*) is the most frequently isolated species. For prevention of nosocomial infections caused by *C. albicans*, molecular characterization of the isolates is essential to understand the epidemiology of the infections and for tailoring prevention strategies. During the past two decades, different typing methods described for molecular characterization of *C. albicans*. Multilocus sequence typing (MLST), as one of these methods, is available for the development of global epidemiological studies. MLST relies on DNA sequence analysis of nucleotide polymorphisms within 7 housekeeping genes with highly discriminating power. For each locus, the different sequences are assigned as distinct alleles, and for each isolate, the alleles at each of the sequenced loci define a sequence type (ST). In this context, global internet-linked databases are now available at www.mlst.net and allow results from strains typed anywhere in the world to be integrated and managed. Analysis of a large number of *C. albicans* isolates from various hosts and clinical situations carried out with MLST method can provide important insights into the epidemiology of hospital-acquired *Candida* infections as well as the *C. albicans* population. With an increased use of this technique, worldwide epidemiological studies will be facilitated and should reveal the patterns of transmission and evolution of *C. albicans* and help to evaluate the genetic diversity and dynamics of *C. albicans* population.

Keywords: *Candida albicans*, Multilocus sequence typing (MLST), Genetic diversity, Molecular typing

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(106): 161-74. (Persian).

مروری

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۰۶ آبان سال ۱۳۹۲ (۱۷۴-۱۶۱)

تعیین توالی در چند ناحیه ژنی (MLST): یک روش تایپینگ مولکولی با قدرت تمایز بسیار بالا جهت شناسایی گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* در مطالعات اپیدمیولوژیکی

سید محمدحسین افسریان[۱]
حمید بدلی[۲]
طاهره شکوهی[۳]

چکیده

گونه‌های کاندیدا مخمرهایی هستند که در همه جا یافت می‌شوند و به راحتی از محیط جدا می‌شوند. آن‌ها جزء پاتوژن‌های فرصت طلب انسان‌ها هستند. *کاندیدیازیس* در بیماران با ضعف سیستم ایمنی، نیازمند تشخیص و اقدام درمانی سریع می‌باشد. *کاندیدا آلبیکنس* بیشترین گونه جدا شده از این بیماران است. جهت پیشگیری از عفونت‌های بیمارستانی ناشی از *کاندیدا آلبیکنس*، تشخیص مولکولی آن‌ها برای درک بهتر اپیدمیولوژی این عفونت‌ها و اتخاذ استراتژی‌های پیشگیری مناسب، ضروری است. در یکی دو دهه اخیر، روش‌های تایپینگ مولکولی مختلفی برای *کاندیدا آلبیکنس* شرح داده شده است. یکی از این روش‌ها، تعیین توالی در چند ناحیه ژنی (MLST یا Multilocus sequence typing) است که برای مطالعات اپیدمیولوژیکی و جمعیتی، بسیار کاربرد دارد. MLST روشی با قدرت تمایز بسیار بالا متکی بر آنالیز پلی مورفیسم‌های نوکلئوتیدی در توالی‌های ۷ ناحیه ژنی برای *کاندیدا آلبیکنس* است. توالی‌های به دست آمده از هر ناحیه ژنی به عنوان یک آلل و آلل‌های به دست آمده در هر ناحیه، در مجموع، یک سکانس تیپ (ST یا Sequence type) نامیده می‌شود. در این زمینه، پایگاه داده‌ها در سایت www.mlst.net قابل دسترس می‌باشد که با استفاده از نتایج تایپینگ گونه‌ها در این پایگاه، آنالیز داده‌ها انجام می‌گیرد. آنالیز تعداد زیادی *کاندیدا آلبیکنس* از میزبان‌های مختلف و مواضع بالینی متفاوت با روش MLST، باعث افزایش بینش محققان در اپیدمیولوژی عفونت‌های کاندیدایی کسب شده از بیمارستان به علاوه ساختار جمعیتی *کاندیدا آلبیکنس* می‌شود و الگوهای انتقال و تکامل *کاندیدا آلبیکنس* آشکار می‌گردد و به ارزیابی تنوع ژنتیکی و پویا شناسی جمعیت *کاندیدا آلبیکنس*، کمک می‌کند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، *کاندیدا آلبیکنس*، تایپینگ مولکولی، تعیین توالی در چند ناحیه ژنی (MLST)

مقدمه

گونه‌های کاندیدا مخمرهایی هستند که در همه جا یافت و به راحتی از محیط جدا می‌گردند. از میان ۲۰۰ گونه کاندیدای شناسایی شده، تعداد کمی به صورت فلور طبیعی انسان‌ها و چندین گونه حیوانی می‌باشند (۱).

گونه‌های کاندیدا همچنین جزء پاتوژن‌های فرصت طلب انسان و حیوانات هستند. بیشترین تظاهرات بالینی *کاندیدیازیس*، نوع سطحی شامل جلدی، حلقی-دهانی و ولوو واژنیت می‌باشد. این عفونت‌ها به طور معمول در افراد سالم، خوش خیم هستند. اما گونه‌های کاندیدا می‌توانند به ویژه برای افراد بستری در بیمارستان‌ها تهدید جدی به شمار آیند. ابتلا به *کاندیدیازیس* در بیماران با ضعف سیستم ایمنی و بیماری‌های زمینه‌ای شدید، نیاز به تشخیص و روند درمانی سریع دارد. میزان مرگ و میر در *کاندیدیازیس* تهاجمی، بین ۷۵-۴۶ درصد متغیر است. کاندیدمی

مولف مسئول: طاهره شکوهی – ساری: کیلومتر ۱۸ جاده دریا، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی. E-mail: shokohi.tahereh@gmail.com
۱. دانشجوی دکتری، کمیته تحقیقات دانشجویی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری و گروه میکروب شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران
۲. استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی ساری و مرکز تحقیقات قارچ‌های تهاجمی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی ساری و مرکز تحقیقات قارچ‌های تهاجمی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۴/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۶/۶ تاریخ تصویب : ۱۳۹۲/۷/۹

۲۰-۱۰ درصد *کاندیدیازیس* بیمارستانی را تشکیل می‌دهد که با وجود استفاده از داروهای ضد قارچی فعال در محیط آزمایشگاهی، ۴۹-۲۱ درصد مرگ و میر به آن نسبت داده می‌شود (۶-۲).

گونه‌های کاندیدا، چهارمین عامل عفونت‌های خونی بیمارستانی در ایالات متحده آمریکا و *کاندیدا آلبیکنس* بیشترین گونه جدا شده از بیماران می‌باشد (۸، ۷).

پیشگیری از عفونت‌های بیمارستانی ایجاد شده توسط *کاندیدا آلبیکنس* و گونه‌های وابسته، مشکل است؛ چون در مورد نحوه انتقال عفونت بین بیماران بستری شده در بیمارستان و مشخصات گونه‌های عفونی، اطلاعات کمی در دست است (۱۱-۹). بیمارانی که مدت زیادی بستری هستند، مخزن اصلی *کاندیدا آلبیکنس* در بیمارستان می‌باشند و آلودگی متقاطع که بین بیماران رخ می‌دهد، بیانگر این مطلب است که منشأ کلنیزاسیون، می‌تواند یک گونه از فلور طبیعی بیمار قبل از بستری شدن یا گونهی کسب شده در طول مدت بستری درون بیمارستان باشد (۱۵-۱۲).

هم اکنون پذیرفته شده است که منشأ عفونت‌های سیستمیک، گونه‌هایی هستند که از قبل در بیماران کلنیزه بوده‌اند (۱۱-۹). مطالعات بلند مدت نشان داده است که در بعضی موارد، بیماران حامل چندین گونه اندمیک در بخش‌های مختلف بیمارستان بوده‌اند و انتقال این گونه‌ها به بخش‌های مختلف توسط این بیماران صورت گرفته است (۱۲، ۹)؛ به عنوان مثال، یک بروز کاندیدمی توسط *کاندیدا آلبیکنس* در بخش مراقبت‌های ویژه نوزادان اتفاق افتاد که مخمر از طریق دستان کارکنان آن بخش به بیماران منتقل شده بود (۱۷، ۱۶). به هر حال، جهت کاهش میزان این عفونت‌ها، توصیف بهتر اپیدمیولوژی صحیح و مسیر انتقال عفونت‌های کاندیدایی بیمارستانی و برقراری اقدامات کنترلی اختصاصی نیاز است. در این زمینه، تشخیص مولکولی ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس* جهت درک بهتر اپیدمیولوژی این عفونت‌ها و استراتژی‌های پیشگیری مناسب، ضروری است. در طول دو دهه گذشته، روش‌های تایپینگ مولکولی گسترش پیدا کرده است که اهمیت خیلی زیادی در شناسایی گونه‌های عفونی جهت مطالعات اپیدمیولوژیکی و تعیین ساختار جمعیتی میکروبی و تنوع ژنتیکی درون یک گونه دارد (۱۸).

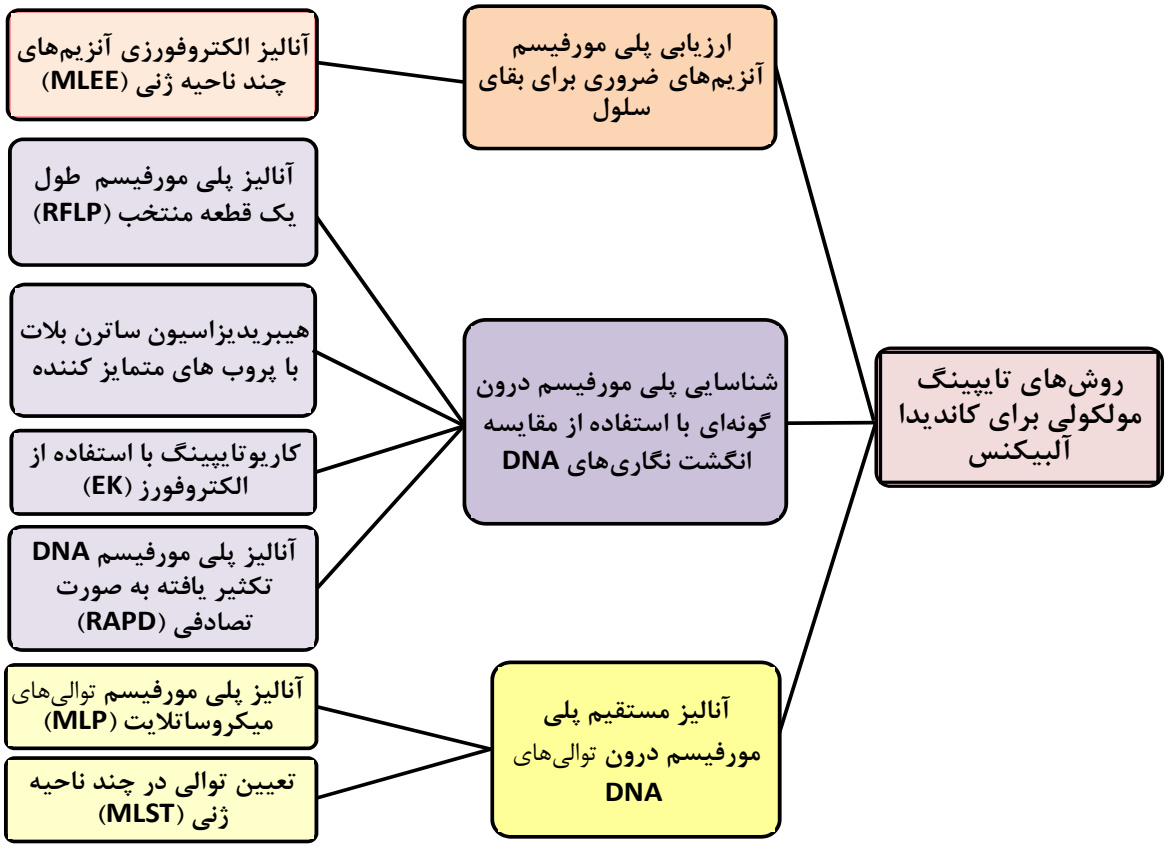
در این مطالعه، تعدادی از روش‌های تایپینگ مولکولی که در یکی دو دهه اخیر برای تعیین تنوع ژنتیکی *کاندیدا آلبیکنس* انجام گرفته است، شرح داده خواهد شد. یکی از این روش‌ها که در سال‌های اخیر جهت تایپینگ *کاندیدا آلبیکنس* توسعه پیدا کرده است، روش تعیین توالی در چند لوکوس ژنی (MLST یا Multilocus sequence typing) است که به صورت یک پایگاه داده‌ها برای مقایسه‌های بین آزمایشگاهی قابل دسترس است و برای مطالعات اپیدمیولوژیکی و جمعیتی بسیار کاربرد دارد. این مقاله به مروری جامع بر تعیین توالی در چند ناحیه ژنی به عنوان یک روش تایپینگ مولکولی با قدرت تمایز بسیار بالا جهت شناسایی گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* در مطالعات اپیدمیولوژیکی با استفاده از بانک های اطلاعاتی خارج کشور نظیر PubMed، Medline، Elsevier databases، Google scholar، Scopus و سایت www.mlst.net و با کلمات کلیدی *Candida albicans*، MLST، Genetic diversity، Molecular typing مقالات مرتبط منتشر شده طی سال‌های ۲۰۱۳-۱۹۸۹ پرداخته است.

روش‌های تایپینگ برای کاندیدا آلبیکنس

روش‌های تایپینگ برای تعیین مشخصات مولکولی *کاندیدا آلبیکنس* در ۳ کلاس و بر مبنای خط مشی‌های مختلف تقسیم‌بندی می‌شود (تصویر شماره ۱).

۱. ارزیابی پلی مورفیسم آنزیم‌های ضروری برای بقای سلول

این روش بر مبنای ارزیابی پلی مورفیسم آنزیم‌های ضروری برای بقای سلول (Housekeeping) می‌باشد که به طور غیر مستقیم ژنوتیپ را ارزیابی می کند. یکی از این روش‌ها، MLEE (Multilocus enzyme electrophoresis) است که در حقیقت با آنالیز حرکت الکتروفورزی آنزیم‌ها روی ژل، پلی مورفیسم این آنزیم‌ها را بررسی می کند. با استفاده از



تصویر شماره ۱: روش‌های مختلف تایپینگ برای تعیین مشخصات مولکولی کاندیدا آلبیکنس

MLEE: Multilocus enzyme electrophoresis
EK: Electrophoretic karyotyping
MLP: Microsatellite length polymorphism
RFLP: Restriction fragment length polymorphism
RAPD: Randomly amplified polymorphic DNA
MLST: Multilocus sequence typing

این روش، تغییراتی را که به مرور زمان در یک گونه ایجاد می‌شود، می‌توان بررسی کرد. آلل‌های هر ناحیه (Locus) یک الکتروفورتیک تیپ را مشخص می‌کنند. چون تعداد کمی از آلل‌ها را با استفاده از این نوع تغییرات می‌توان شناسایی کرد؛ بنابراین برای به دست آوردن قدرت تمایز بالا توسط این روش، باید تعداد نواحی زیادی آنالیز شود. اگر چه MLEE روش وقت‌گیری است، به هر حال اولین روش مؤثر در مطالعه ساختار جمعیتی *کاندیدا آلبیکنس* به شمار می‌رود (۲۰، ۱۹).

Pujol و همکاران پلی مورفیسم‌های آنزیمی ۲۱ ناحیه ژنی از ۵۵ گونه *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از بیماران HIV^+ (Human immunodeficiency virus) را به روش MLEE گزارش کردند. داده‌های آن‌ها بر اساس فعالیت ۱۹ آنزیم (که ۲ آنزیم هر کدام توسط ۲ ناحیه بیان می‌شدند) مثل مالات دهیدروژناز، هگزوکیناز و ... به دست آمد. از ۲۱ ناحیه ژنی، ۱۳ ناحیه قابلیت تغییر پذیری نشان دادند. تعداد متوسط آلل‌ها در نواحی قابل تغییر ۲/۸۵ و هتروزیگوسیتی به طور متوسط ۰/۱۶۸ (۰/۳۳۳-۰/۰۴۸) نشان داده شد (۱۹).

۲. شناسایی پلی مورفیسم درون گونه‌ای با استفاده از مقایسه انگشت نگاری‌های DNA

شامل روش‌هایی است که پلی مورفیسم درون گونه‌ای را با استفاده از مقایسه انگشت نگاری‌های DNA شناسایی می‌کنند. این تکنیک‌ها شامل EK (Electrophoretic karyotyping)، RFLP (Restriction fragment length polymorphism)، SBH (Southern blot hybridization) و RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA) (تصویر شماره ۱) می‌باشد.

روش RFLP با هضم یک قطعه منتخب از رشته DNA با

استفاده از اندونوکلئازهای محدود کننده برای افتراق گونه‌ها کاربرد دارد. در این تکنیک، به عنوان مثال می‌توان از ناحیه rDNA شامل ITS۱ و ITS۲ و ژن کد شونده ۵/۸S rRNA استفاده کرد (۲۵-۲۱، ۱۰).

سلطنت‌پوری و همکاران در ایران روش RFLP را برای افتراق بین *کاندیدا آلبیکنس* و کاندیدا دابلنینسیس از بیماران سرطانی به کار گرفتند. آن‌ها از آنزیم BlnI (DNA restriction enzyme) استفاده کردند. باند ایجاد شده روی ژل الکتروفورز برای آلبیکنس ۵۳۵ bp و برای دابلنینسیس ۲ باند ۲۰۰ bp و ۳۳۵ bp می‌باشد. کلیه گونه‌های آن‌ها *کاندیدا آلبیکنس* بودند (۲۶).

روش الکتروفورتیک کاریوتایپینگ EK اطلاعات جدیدی را در مورد ساختار ابتدایی ژنوم بسیاری از گونه‌های قارچی مهیا می‌سازد. این تکنیک بر مبنای جداسازی الکتروفورزی DNA ژنومی غیر هضم شونده (Undigested) یا مقایسه الگوهای ژنومی درشت برگرفته از هضم ژنوم (Macrorestriction) توسط اندونوکلئازهای محدود کننده با تکرار پذیری پایین می‌باشد (۲۹-۲۷، ۱۱).

تکنیک RAPD که از آن به عنوان یک روش انگشت نگاری نیز یاد می‌شود، بر مبنای تقویت PCR (Polymerase chain reaction) از DNA ژنومی با استفاده از یک پرایمر کوتاه منفرد که اغلب ۱۰ نوکلئوتیدی است. به علت استفاده از دمای پایین در مرحله اتصال پرایمر (Annealing) (۳۹-۳۵ درجه سانتی‌گراد)، پرایمر به نواحی غیر اختصاصی باند می‌شود، که این نواحی به صورت تصادفی در طول ژنوم توزیع شده‌اند. آمپلیکون توسط ژل الکتروفورز جدا و مشاهده می‌شوند. RAPD ترکیباتی از تعداد متفاوتی آمپلیکون با سایزهای مختلف و بیانگر الگوی یک گونه یا حتی گونه اختصاصی می‌باشد. استفاده از RAPD باعث افزایش مارکرهای ژنتیکی درون چندین گونه و تمایز بین واریته‌های مخمرهای پاتوژن می‌شود (۳۳-۳۰، ۱۳).

در بین روش‌های انگشت نگاری، هیبریدیزاسیون ساترن بلات (Southern blot hybridization) با پروب Ca۳، روش بسیار خوب و جدیدی است که به خصوص برای درک بهتر اپیدمیولوژی عفونت‌های *کاندیدا آلبیکنس* و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های این مخمر بسیار کمک کننده است (۳۵، ۳۴). این یک روش با قابلیت تکرار پذیری (Reproducible) قادر به تمایز بسیار بالای گونه‌های غیر مرتبط است. قابلیت پروب Ca۳ برای تعیین کمیت فواصل ژنتیکی بین گونه‌ها، مشخصه برجسته این روش می‌باشد. چون الگوهای ایجاد شده، بازتابی از فواصل ژنتیکی بین گونه‌ها هستند و داده‌های به دست آمده در آنالیز خوشه‌بندی جمعیت‌های *کاندیدا آلبیکنس* مورد استفاده است. به علاوه این که پروب Ca۳، تأثیر بسیار بالایی در شناسایی ریز تکامل‌ها (Microevolution) بین گونه‌های عفونی دارد (۳۶). در حقیقت پروب Ca۳، شامل توالی‌های عناصر تکرار شونده است که در سرتاسر ژنوم *کاندیدا آلبیکنس* پراکنده‌اند و تغییرات ریز تکاملی شناسایی شده درون گونه‌ها، الحاق‌ها و حذف‌های توالی‌های تکراری تمام قد در جایگاه‌های ژنومی خاص را در بر می‌گیرد (۳۷). انگشت نگاری با استفاده از پروب Ca۳ بسیاری از مشکلات موجود در انجام اپیدمیولوژی *کاندیدا آلبیکنس* را حل کرده است؛ به خصوص زمانی که مطالعات اپیدمیولوژی گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از میزبان‌ها و موضع‌های بالینی مختلف انجام می‌گیرد.

این مسأله شناخته شده است که گونه‌های مختلف *کاندیدا آلبیکنس*، می‌توانند به صورت فلور طبیعی در قسمت‌های مختلف بدن یک فرد سالم وجود داشته باشند و یا حتی ممکن است که گونه های متفاوت از این گونه مخمری در یک محل یکسان از بدن یک فرد یافت شوند (۳۹، ۳۸).

در عفونت‌های عود کننده مثل ولوو واژنیت و *کاندیدیازیس* حلقی- دهانی، گونه‌های شروع کننده عفونت می‌توانند هم مقاوم شوند و هم توسط گونه‌های دیگر یا تحت ریز تکامل جایگزین شوند (۴۰). در زمینه عفونت‌های بیمارستانی، به طور معمول گونه‌های کلنیزه شده بیماران قبل از ایجاد یک عفونت سیستمیک، عامل ایجاد آن به شمار می‌روند. گونه‌ها می‌توانند بین بیماران بستری در یک بخش یا

بین بخش‌های یک بیمارستان انتقال متقاطع داشته باشند (۱۴). بعضی ویژگی‌های جغرافیایی بین گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از عفونت‌های خونی شناسایی شده‌اند. مطالعات جمعیتی با استفاده از پروب Ca۳ پنج گروه (E، SA، III، II، I :Clades) ژنتیکی بزرگ از *کاندیدا آلبیکنس* را شناسایی کرده است. گروه‌های I و III مربوط به همه جای دنیا، گروه II در همه جای دنیا به جز آمریکای جنوبی و جنوب غرب ایالات متحده آمریکا، گروه E در اروپا و گروه SA در آفریقای جنوبی می‌باشند. ضمن این که گونه‌های مربوط به گروه I مقاوم و یا حداقل حساسیت را نسبت به فلوسیتوزین دارند (۴۳-۴۱، ۳۵).

۳. آنالیز مستقیم پلی مورفیسم درون توالی‌های DNA

روش‌های تایپینگ شامل تکنیک‌هایی است که به طور مستقیم پلی مورفیسم درون توالی‌های DNA را آنالیز می‌کند و شامل MLST و MLP (Microsatellite length polymorphism) می‌باشد (۴۷-۴۴).

روش MLP متکی بر تقویت توالی‌های میکروساتلایت که توالی‌های تکراری پشت سر هم ۲ تا ۵ نوکلئوتیدی است، می‌باشد. آلل‌های میکروساتلایت به طور کلی قطعات DNA با اندازه‌های مختلف است که از تقویت با پرایمرهای ناحیه میکروساتلایت به دست آمده‌اند. با توجه به این که MLP با حضور آلل‌های متفاوت در ناحیه ژنی، معین می‌شود، وجه تمایز هتروزیگوت‌ها امکان پذیر می‌گردد. چندین مطالعه با این روش برای تایپینگ *کاندیدا آلبیکنس* انجام شده است (۵۳-۴۸).

در این مطالعه، سعی شده است روش MLST به طور کامل تری مورد بحث قرار گیرد.

MLST و کاربرد آن در ارگانیسم‌های دیپلوئید

یکی از اشکالات بزرگ روش‌های انگشت نگاری DNA که در بالا به آن اشاره شد، عدم استانداردسازی تکنیکی است که باعث کاهش پتانسیل برای مقایسه‌های بین آزمایشگاهی و در عین حال، مطالعات جمعیتی و اپیدمیولوژیکی می‌شود؛ مگر این که در یک آزمایشگاه واحد انجام پذیرد. در حقیقت بیشتر داده‌های تولید شده توسط این روش‌ها، تحت تأثیر آزمایشگاه‌ها است که علت آن کاربرد دستگاه‌های مختلف PCR و شرایط متفاوت آزمایشگاهی در مورد روش RAPD و الکتروفورز برای تکنیک‌های انگشت نگاری است. علاوه بر این، یک پایگاه داده یا منبع بین‌المللی واحدی وجود ندارد تا کاربران داده‌های خود را در آن جا با داده‌های دیگران مقایسه کنند.

MLST اولین بار توسط Maiden و همکاران برای تایپینگ باکتری‌ها معرفی شد (۵۴)، این روش برای نایسریا مننژیتیدیس گسترش یافت و اکنون برای بسیاری از گونه‌های باکتری‌ها بسط پیدا کرده است و یک روش انتخابی برای ایزوله‌های باکتری‌ها محسوب می‌شود (۵۵). MLST یک روش با قدرت تمایز بسیار بالا است که بر آنالیز پلی مورفیسم‌های نوکلئوتیدی در توالی‌های ۷ قطعه‌ی داخلی bp ۵۰۰-۴۰۰ از ژن‌های (لوکوس) مولد آنزیم‌های ضروری برای سلول -که با واکنش PCR ایجاد شده است-، متکی می‌باشد. توالی‌های به دست آمده از هر لوکوس ژنی، در یک گونه باکتریایی به عنوان یک آلل شناخته می‌شود و آلل‌های به دست آمده در هر لوکوس را در مجموع یک پروفایل آللی یا یک سکانس تیپ (ST یا Sequence type) می‌نامند.

بنابراین هر ایزوله از یک گونه به طور آشکار با یک سری شماره‌های آللی در لوکوس‌های مختلف یا با یک عدد واحد به عنوان ST شناسایی می‌شود. چون MLST یک روش متکی بر توالی‌های نوکلئوتیدی است و تکنولوژی وابسته به آن به طور قابل ملاحظه‌ای از نظر بازدهی و قابل اعتماد بودن در دو دهه گذشته پیشرفت کرده است، بنابراین یک روش تایپینگ با قابلیت تکثیر پذیری بسیار بالا همراه با مزایای خیلی زیاد از نظر تولید داده‌های استاندارد می‌باشد. این روش، تبادل داده‌های حاصل از تایپینگ مولکولی بین آزمایشگاه‌ها از طریق اینترنت را به آسانی امکان پذیر می‌سازد و باعث توسعه مطالعات اپیدمیولوژیکی در سطح جهان می‌شود (۵۵).

در این زمینه، هم اکنون پایگاه داده‌ها از طریق اینترنت برای چندین ارگانیسم در سایت www.mlst.net قابل دسترس می‌باشد و این اجازه را می‌دهد تا نتایج تایپینگ

گونه‌ها در هر کجای جهان مدیریت و به صورت یکپارچه در آید. از طریق این سایت، آنالیز جمعیتی هم به صورت اینترنتی و سریع و هم به صورت گاهنامه برای همه یا بخشی از داده‌های قابل دسترس امکان پذیر می گردد.

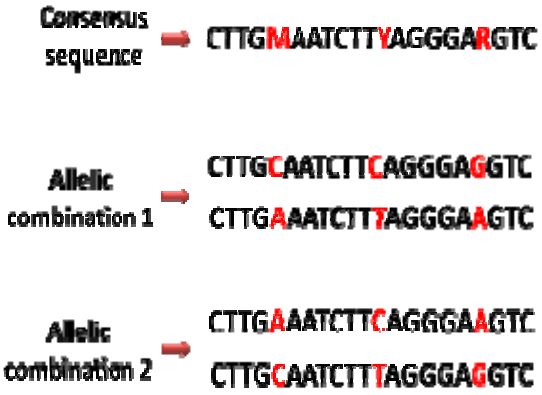
با توجه به این که بیشتر ارگانیسم‌های دیپلوئید موجود در طبیعت، هتروزیگوت می‌باشند و MLST بر مبنای تعیین توالی محصولات PCR ایجاد شده، از فزون‌سازی همزمان دو ناحیه مکمل در گونه‌های دیپلوئید است، بنابراین احتمال می‌رود توالی‌های نوکلئوتیدی ایجاد شده طی روش MLST، هتروزیگوسیتی را در نواحی پلی مورفیک نشان خواهد داد. بر این اساس، در گونه‌های هاپلوئید در هر ناحیه پلی مورفیک ۴ تغییر امکان پذیر است (G، T، C، A). در حالی که در گونه‌های دیپلوئید، ممکن است ۱۰ تغییر مشاهده شود (G/T، C/G، C/T، A/G، A/C، A/T، T/T، G/G، C/C، A/A). در نتیجه، این باعث افزایش تنوع آللی در هر لوکوس می گردد.

شناسایی جایگاه‌های هتروزیگوس، هم از طریق وارسی منحنی کروماتوگرام و هم با استفاده از نرم‌افزارهای آنالیز سکانس مثل SeqScape™ و Applied biosystems صورت می گیرد. ژنوتیپ‌های هتروزیگوس بر اساس قرار گرفتن دو آلل مکمل روی یکدیگر، یک کد واحد که از طریق اتحادیه بین‌المللی فهرست واژه‌های شیمی کاربردی و محض (International union of pure and applied chemistry یا IUPAC) تعریف شده است، دریافت می کند (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: کدهای جایگاه‌های هتروزیگوس

IUPAC/IUB Ambiguities		
کد اختصاصی	دو آلل مکمل	نوع نوکلئوتید
R	{AG}	[puRine]
Y	{CT}	[pYrimidine]
M	{AC}	[aMino]
K	{GT}	[Keto]
S	{GC}	[Strong]
W	{AT}	[Weak]
H	{ACT}	[not G]
B	{CTG}	[not A]
V	{ACG}	[not T]
D	{ATG}	[not C]
N	{ACTG}	[unkNown]

همان‌طور که در تصویر شماره ۲ مشاهده می‌شود، به عنوان مثال در یک ترکیب آللی ممکن است چند جایگاه هتروزیگوس وجود داشته باشد. در این دو ترکیب، آللی دیده می‌شود که هر دو یک ژنوتیپ یکسان دارند؛ بنابراین دو گونه متفاوت ممکن است دو ترکیب آللی متفاوت اما یک ژنوتیپ یکسان داشته باشند (تصویر شماره ۲) (۵۷، ۵۶، ۴۵، ۱۸).



تصویر شماره ۲: دو ترکیب آللی با یک ژنوتیپ یکسان

کاربرد MLST در تایپینگ کاندیدا آلبیکنس

چندین روش تایپینگ برای *کاندیدا آلبیکنس* توسعه داده شده است که بر مبنای مطالعه پلی مورفیسم‌های نوکلئوتیدی در لوکوس‌های مختلف می‌باشد (۴۷، ۴۶). به هر حال، یکی از محدودیت‌های این روش‌ها این است که هم در کاوش الیگونوکلئوتیدی و تعیین توالی و هم در آنالیز آنزیمی محدود شونده، تعداد محدودی از جایگاه‌های پلی مورفیک (۱۳-۱) در هر لوکوس آنالیز می‌شود و در نهایت، تعداد ۱۶-۱۲ لوکوس برای دستیابی به تمایز کافی و خوب ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس، آنالیز می‌شود. از این‌رو در سال‌های اخیر، برای *کاندیدا آلبیکنس* فقط روش MLST است که می‌تواند در بر گیرنده مشخصات همه جایگاه‌های پلی مورفیک در نواحی ۵۰۰ نوکلئوتیدی در ۷ ناحیه ژنی باشد (۱۸).

MLST برای *کاندیدا آلبیکنس* اولین بار توسط Bougnoux و همکاران ارایه شد (۴۵) که مبنای آن بر تعیین توالی نواحی داخلی ۶ ژن ضروری برای سلول (SYA۱، RPN۲، ADP۱، VPS۱۳، GLN۴، ACC۱) می‌باشد.

Bougnoux و همکاران با استفاده از این روش بر روی ۲۶ ایزوله غیر مرتبط *کاندیدا آلبیکنس* و ۲ گونه رفرنس، قدرت تمایز تا ۹۹/۷ درصد را ارایه دادند (۴۵) که نشان دهنده پتانسیل این روش در مطالعات اپیدمیولوژیکی است. قدرت این روش با آنالیز اپیدمیولوژیکی گونه‌های مرتبط -که نشانگر تغییرات خیلی کم و همچنین تکامل تدریجی بین گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* یک بخش یکسان در بیمارستان است-، مشخص می‌شود (۱۸).

Tavanti و همکاران برای *کاندیدا آلبیکنس* روش MLST دیگری را ارایه نمودند (۵۷). در این روش، ۴ لوکوس ژنی که توسط Bougnoux و همکاران (۴۵) ارایه شده بود (SYA۱، RPN۲، ADP۱، VPS۱۳)، به همراه ۴ لوکوس ژنی جدید (MPIb، ZWF۱، AAT۱b، AAT۱a) ارایه شد. این نواحی بر اساس آنزیم‌های متناظر که پیش از این در آنالیزهای MLEE پلی مورفیک نشان داده بودند، انتخاب شدند (۱۹). با استفاده از این روش، بر روی ۴۹ ایزوله *کاندیدا آلبیکنس* و ۳ گونه رفرنس، ژنوتیپ STs را با قدرت تمایز مشابه با روش Bougnoux و همکاران (۴۵) شناسایی کردند.

Bougnoux و همکاران (۵۶) از ترکیب ۲ روش بالا، به یک ترکیب بهینه و توافقی دست یافتند و آنالیز STs با ترکیب این تایپینگ‌ها برای لوکوس‌های مختلف، نشان داد که ترکیب ۷ لوکوس در تمایز تمام ایزوله‌ها بهترین نتیجه را می‌دهد و توصیه شد که از آن به بعد، جهت آنالیز MLST برای *کاندیدا آلبیکنس* از ۷ لوکوس زیر استفاده شود (جدول شماره ۲).

مدیریت و نحوه دسترسی به داده‌ها در روش MLST برای کاندیدا آلبیکنس

همان‌طور که در بالا به آن اشاره شد، از MLST داده‌های واضحی حاصل می‌شود که می‌تواند به آسانی در یک پایگاه داده گردآوری شود. Bougnoux و همکاران (۴۵) و Bougnoux و همکاران (۵۶) پایگاه داده‌های MLST برای *کاندیدا آلبیکنس* را در سایت http://calbicans.mlst.net ایجاد کردند که برای همه قابل دسترس می‌باشد. به طور خلاصه، از طریق این سایت هر کاربری می‌تواند داده‌های خود را با اطلاعاتی که در پایگاه داده‌ها وجود دارد، مقایسه کند. تعداد آلل‌های شناخته شده تا ماه ژوئن ۲۰۱۳ در جدول شماره ۳ نشان داده شده است.

در این وب سایت http://calbicans.mlst.net، دو پنجره به نام‌های Locus query و Profile query وجود دارد: اولی شامل multiple or batch locus query، Single و دومی حاوی Allelic Profile query، simple or advanced می‌باشد. به عنوان مثال یک کاربر، توالی به دست آمده از هر یک از لوکوس‌های ژنی ایزوله‌های

جدول شماره ۲: معرفی ۷ لوکوس ژنی به همراه تولیدات آن‌ها

قطعه ژنی	محصول ژن	اندازه کلی (BP)	اندازه قطعه سکانس شده (bp)
AAT۱a	آسپارتات آمینو ترانسفراز	۴۷۸	۳۷۳
ACC۱	استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز	۵۱۹	۴۰۷
ADP۱	پریمه آز وابسته به ATP	۵۳۷	۴۴۳
MPIb	مانوز فسفات ایزومراز	۴۸۶	۳۷۵
SYA۱	آلانیل RNA سنتتاز	۵۴۳	۳۹۱
VPS۱۳	پروتئین مرتب‌سازی پروتئین واکوئلی	۷۴۱	۴۰۳
ZWF۱b	گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز	۷۰۲	۴۹۱

جدول شماره ۳: تعداد آلل‌ها و ژنوتیپ گونه‌های کاندیدا آلبیکنس

تعداد STهای ثبت شده کاندیدا البیکنس	ZWF۱b	VPS۱۳	SYA۱	MPIb	ADP۱	ACC۱	AAT۱a	اطلاعات موجود در سایت http://calbicans.mlst.net
۲۱۰۴	۲۳۶	۲۴۴	۱۸۱	۱۳۰	۱۲۳	۹۰	۱۴۲	تعداد آلل‌های ثبت شده هر لوکوس

آلبیکنس خود را می‌تواند در قسمت Single Locus query وارد و به صورت Online آن‌ها را چک کند (آنالیز توالی‌ها بر اساس ابزار Jalview Java می‌باشد) (۵۸).

اگر آلل‌های او مشابه یکی از آلل‌های موجود در پایگاه داده‌ها باشد، شماره آللی آن مشخص می‌گردد، و در صورتی که مشابه هر کدام از آلل‌های موجود در پایگاه داده‌ها نباشد، آن آلل به عنوان آلل جدید قلمداد می‌شود. در این حال، برای ثبت آلل جدید باید توالی به دست آمده را به صورت داده خام برای متصدی سایت (برای *کاندیدا آلبیکنس* پرفسور Bougnoux) ارسال نمود تا پس از بررسی، برای آن شماره آللی جدید منظور و در سایت ثبت گردد. پس از به دست آوردن شماره آللی هر ۷ لوکوس برای هر گونه کاندیدا آلبیکنس، باید شماره آلل‌های مربوط به هر لوکوس را در قسمت Allelic profile query وارد کرد. در این حال، اگر گونه مربوط، مشابه یکی از گونه‌های موجود در پایگاه داده‌ها باشد، شماره STs آن نشان داده می‌شود و اگر مشابه نباشد، به عنوان یک گونه جدید شناخته می‌شود. در این مواقع، لازم است مشخصات کامل گونه مربوط (شامل کشور، شهر، منبع نمونه، اگر از بیمار جدا شده باشد: محل نمونه‌گیری، تشخیص اولیه و قطعی، سن، جنس و ...) برای متصدی سایت ارسال شود تا اطلاعات این شماره STs جدید در سایت درج گردد. در این روش، هر استرین (STs) پس از تعیین توالی ۷ ناحیه ژنی، در مجموعا دارای ۲۸۸۳ نوکلئوتید می‌باشد. پس از آن به کمک نرم‌افزار eBURST نسبت‌های بین ایزوله‌های مرتبط در کمپلکس کلونال مشخص می‌گردد. بنابراین، وارد کردن داده‌های جدید در وب سایت توسط گروه‌های مختلف از سرتاسر جهان، باعث گسترش سریع پایگاه داده‌های *کاندیدا آلبیکنس* و ارزیابی تنوع آن در کل جهان و مقایسه سریع داده‌های اپیدمیولوژیکی ایزوله‌های مرتبط در مکان‌های مختلف می‌شود (۶۱-۵۹، ۱۸).

کاربرد MLST در اپیدمیولوژی کاندیدا آلبیکنس در بیمارستان‌ها

همان‌طور که اشاره شد، روش MLST با قدرت تمایز بسیار بالا برای کلکسیونی از ایزوله‌های غیر مرتبط اپیدمیولوژیکی کاربرد دارد (۵۶، ۴۵). در نتیجه، ایزوله‌هایی که پروفایل‌های آللی یکسان یا خیلی مشابه دارند، یکسان یا با وابستگی نزدیک فرض می‌شوند. بنابراین، MLST دارای اهمیت ویژه‌ای در زمینه عفونت‌های کاندیدایی بیمارستانی دارد؛ چرا که با این روش، می‌توان درک بهتری از خویشاوندی بین گونه‌هایی که از بیماران جدا می‌شود یا گونه‌هایی که از کارکنان بهداشتی جدا می‌گردد، به دست آورد. حتی با این روش، می‌توان الگوهای اختصاصی انتقال *کاندیدا آلبیکنس* را آشکار ساخت و در تدوین استراتژی‌های پیشگیری مناسب، از آن‌ها به طور اختصاصی استفاده کرد. این روش به ویژه اطلاعات ارزشمندی را از مخازن اختصاصی ایزوله‌ها (به عنوان مثال محل ضایعات عفونی بیماران) که بالقوه قابلیت انتشار و گسترش *کاندیدا آلبیکنس* را در محیط بیمارستان دارا هستند، فراهم می‌سازد. MLST می‌تواند برای مطالعات اپیدمیولوژیکی محدود به یک مکان (Local epidemiological study) نیز استفاده شود.

مثال‌هایی از کاربرد MLST در اپیدمیولوژی کاندیدا آلبیکنس

Bougnoux و همکاران، در فرانسه ۶ لوکوس ژنی از ۴۰ ایزوله بالینی *کاندیدا آلبیکنس* را تعیین توالی کردند. حداقل ژنوتیپ شناسایی شده، ۱۰ ژنوتیپ در لوکوس ACC۱ و حداکثر ۲۴ ژنوتیپ در VPS۱۳ بود. همچنین در کل، ۶۸ ناحیه پلی مورفیک نوکلئوتیدی در ۶ لوکوس ژنی شناسایی شد. آن‌ها ۲۸ ایزوله غیر مرتبط با اپیدمیولوژی و ۱۴ ایزوله مرتبط با اپیدمیولوژی را به روش MLST آنالیز کردند. در ۲۸ ایزوله غیر مرتبط با اپیدمیولوژی، فقط ۲ ایزوله DST_S (Diploid sequence type) یکسان داشتند و ایندکس قدرت تمایز ۹۹/۷ درصد به دست آمد. در ۱۴ ایزوله مرتبط با اپیدمیولوژی که به مدت ۳ ماه از بیماران بستری در بخش ICU (Intensive care unit) جدا گردیده بود، ۳ ایزوله از یک عفونت مادر و جنین او DST_S یکسان داشتند که انتقال

از مادر به جنین مطرح گردید. ۸ گونه نیز DST_S بسیار نزدیک داشتند که تفاوت آن‌ها فقط در یک یا دو لوکوس دیده شد که مؤید این مطلب است که این گونه‌ها از یک جد مشترک مشتق شده‌اند (۴۵).

Tavanti و همکاران در انگلستان اعتبار و کارایی بالای MLST در ۸ لوکوس ژنی از ۵۰ ایزوله بالینی *کاندیدا آلبیکنس* را مورد ارزیابی قرار دادند. در کل، از ۵۰ ایزوله متفاوت ۸۷ ناحیه پلی مورفیسم و ۴۶ DST_S به دست آمد. ایزوله‌های ۱۵ و ۱۶ DST_S یکسان، ایزوله‌های ۲۳ و ۲۴ DST_S یکسان و ایزوله‌های ۳۰، ۳۱ و ۳۲ DST_S یکسان داشتند (۵۷).

Robles و همکاران در آمریکا روش MLST را با روش‌های MLEE، RAPD و ca۳SHPT جهت تمایز استرین‌های *کاندیدا آلبیکنس* مورد مقایسه قراردادند. آن‌ها ۷ لوکوس ژنی از ۲۹ ایزوله بالینی *کاندیدا آلبیکنس* را مورد مطالعه قرار دادند و در کل، ۶۱ ناحیه نوکلئوتیدی متغیر را گزارش کردند. حداقل نواحی نوکلئوتیدی متغیر در لوکوس‌های ACC۱ و PMA۱ و حداکثر در لوکوس SYA۱ شناسایی شد. آن‌ها از ۲۲ ایزوله غیر وابسته، ۲۱ DST_S مستقل را شناسایی کردند. ایندکس قدرت تمایز در سه روش MLST، ca۳SHPT و MLEE ۹۹/۶ درصد و با روش RAPD ۹۶/۹ درصد بود (۶۲).

Bougnoux و همکاران در فرانسه انتقال و سیر تکاملی درون فامیلی ایزوله‌های بالینی *کاندیدا آلبیکنس* را در ۶ لوکوس ژنی به روش MLST مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها نمونه‌های دهانی و مدفوع ۲۳۴ نفر از خانواده‌های مختلف و متفرقه شامل خانواده‌های با بیماری Crohn's، خانواده‌های سالم و خانواده‌های شاهد را مورد بررسی قرار دادند. در ۱۵ خانواده از ۱۹ خانواده، ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس* از افراد مختلف جدا شد و در این خانواده‌ها، ۲۲ مورد از ۵۲ ایزوله DST_S یکسان داشتند. از این ۲۲ مورد، ۱۷ مورد در یک منطقه یکسان و ۵ مورد در منطقه مجاور زندگی می‌کردند. از نظر سیر تکاملی ایزوله‌ها، ایزوله‌های دهانی و مدفوعی ۳ فرد در ناحیه ACC۱، یک فرد در ناحیه VPS۱۳ و یک فرد در ناحیه ADP۱ متفاوت بودند. از نظر سیر تکاملی ایزوله‌های درون فامیلی، ایزوله‌های ۲ فرد در خانواده شماره ۶ و ۲ نفر در خانواده شماره ۱۲ در ناحیه ACC۱، ۲ نفر در خانواده شماره ۱۲ در ناحیه SYA۱ و ۲ نفر از خانواده شماره ۱۵ در ناحیه ADP۱ متفاوت بودند (۶۳).

Chen و همکاران، در تایوان ۷ لوکوس ژنی از ۵۱ ایزوله بالینی *کاندیدا آلبیکنس* را تعیین توالی کردند. لوکوس ACC۱ دارای حداقل جایگاه پلی مورفیک (۶ جایگاه) و حداقل ژنوتیپ شناسایی شده (۱۱ ژنوتیپ) و لوکوس VPS۱۳ دارای حداکثر جایگاه پلی مورفیک (۱۶ جایگاه) و حداکثر ژنوتیپ شناسایی شده (۲۰ ژنوتیپ) بودند. همچنین در مجموع، ۸۳ ناحیه نوکلئوتیدی پلی مورفیک در ۷ لوکوس ژنی شناسایی شد. آن‌ها از ۵۱ ایزوله، ۴۵ DST_S شناسایی کردند (۶۴).

Cliff و همکاران، در انگلستان ۶۶ ایزوله *کاندیدا آلبیکنس* از ۲۶ بیمار بستری در ICU و ۱۱ ایزوله از ۱۱ پرسنل آن بخش را در ۷ لوکوس ژنی تعیین توالی کردند. از ۶۶ ایزوله جدا شده از بیماران، ۳۰ DST_S و از ۱۱ ایزوله جدا شده از کارکنان، ۷ DST_S به دست آوردند که ۵ ایزوله از ۵ بیمار و ۵ ایزوله از ۵ نفر از کارکنان (در مجموع ۱۰ ایزوله) دارای DST_S یکسان (شماره ۶۹) بودند. همچنین ۲ ایزوله از ۲ بیمار نیز دارای DST_S (شماره ۱۵۵) یکسان بودند. یک ایزوله از بیمار با یک ایزوله از کارکنان با DST_S یکسان (شماره ۲۰۸) و یک ایزوله از بیمار با یک ایزوله از کارکنان با DST_S یکسان (شماره ۲۷۷) مشخص شدند. نتایج این تحقیق مدرک مستدلی جهت اثبات انتقال متقاطع عفونت بیمارستانی *کاندیدا آلبیکنس* بین بیماران و همچنین بین بیماران و کارکنان -که همزمان در یک بخش قرار داشتند- ارایه نمود (۶۵).

da Matta و همکاران، در برزیل ۶ ایزوله *کاندیدا آلبیکنس* از بیمار با کاندیدمی مقاوم و ۲ ایزوله از بیمار با کاندیدمی عود کننده را در ۷ لوکوس ژنی تعیین توالی

کردند. یک بیمار با کاندیدمی عود کننده و ۲ بیمار با کاندیدمی مقاوم، دارای DSTs یکسان (شماره ۶۹) بودند. از نتایج جالب توجه آن‌ها، به دست آوردن ۳ DSTs متفاوت از ۷ ایزوله جدا شده از یک بیمار با کاندیدمی مقاوم در یک فاصله زمانی ۱۰ روزه بود (۶۶).

Shin و همکاران در کره جنوبی تنوع ژنتیکی ایزوله‌های خونی *کاندیدا آلبیکنس* را با روش MLST بررسی کردند. آن‌ها ۱۵۶ ایزوله را مورد بررسی قرار دادند و ۱۱۲ DSTs به دست آوردند که ۹۵ DSTs از یک جد مشتق شده بودند و ۱۷ DSTs مربوط به ۶۱ ایزوله بودند. جالب این که ۱۱۱ ایزوله در Cladeهایی که از قبل شناسایی شده بودند، قرار گرفتند و آن‌ها یک Clade جدید شامل استرین‌های آسیایی حاوی ۲۹ ایزوله را معرفی کردند (۶۷).

Gammelsrud و همکاران در نروژ ۶۲ ایزوله *کاندیدا آلبیکنس* را از ۱۰ بچه با بیماری سرطان، ۶ بچه با بیماری سیستیک فیبروزیس و ۸ بچه سالم در ۷ لوکوس ژنی تعیین توالی کردند و ۳۲ DSTs را شناسایی نمودند. آن‌ها از ۴ ایزوله جدا شده از یکی از بیماران سرطانی (با نمونه‌برداری دو ایزوله در یک روز)، ۲ DSTs به دست آوردند و از ۴ ایزوله جدا شده از بیماری دیگر با سیستیک فیبروزیس (نمونه‌برداری ۲ ایزوله در یک مقطع زمانی و ۲ ایزوله دیگر در یک مقطع زمانی دیگر)، ۳ DSTs به دست آوردند که تفاوت این ژنوتیپ‌ها فقط در لوکوس VPS۱۳ دیده شد. در یک بیمار دیگر نیز از ۴ ایزوله، ۴ DSTs به دست آمد که ۲ به ۲ فقط در یک لوکوس تفاوت دیده شد و این نشان دهنده تغییرات و تکامل تدریجی این گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* می‌باشد (۶۸).

Afsarian و همکاران برای اولین بار در ایران ۴۴ ایزوله *کاندیدا آلبیکنس* را که از بیماران سوختگی (مرتبط)، سرطانی و عفونی (غیر مرتبط) در شهرهای مختلف استان مازندران جدا شده بود، در ۷ لوکوس ژنی تعیین توالی کردند. آن‌ها ۲۷ DSTs شناسایی کردند، که ۱۵ مورد آن به عنوان DSTs جدید بود. DSTs بعضی از بیماران سوختگی یکسان بود، که این امر می‌تواند مدرکی دال بر اثبات انتقال متقاطع آلودگی بین بیمارانی که همزمان در یک بخش قرار داشتند، باشد (۶۹).

Odds و همکاران (۷۰) و Odds (۷۱) از ۱۴۱۰ DSTs موجود در پایگاه داده‌ها تا ژولای ۲۰۰۹، ۱۷ Clade به دست آوردند، که ۵ Clade (شماره‌های ۱۱ و ۴-۱) بیشترین تعداد استرین‌های *کاندیدا آلبیکنس* را در خود جای داده‌اند. بزرگترین آن‌ها Clade شماره ۱ بود.

کارایی MLST در مطالعه ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از منابع مختلف اکولوژیکی

با توجه به این که مشخصات ژنتیکی گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از مخازن حیوانی و محیطی بررسی نشده بود و ارتباط بین گونه‌های انسانی و حیوانی و محیطی به طور کامل کاوش نشده بود، Bougnoux و همکاران پروفایل‌های MLST ایزوله‌های جدا شده از انسان‌ها و حیوانات وحشی را مقایسه کردند. پروفایل‌ها از پایگاه داده‌های MLST *کاندیدا آلبیکنس*، شامل ۴۱ ایزوله غیر مرتبط از موارد بیماری‌های مهاجم، ۳۱ ایزوله غیر مرتبط از افراد سالم و ۲۶ ایزوله از پرندگان و محیط (در مجموع ۹۸ ایزوله) انتخاب شدند. ایزوله‌های مربوط به پرندگان همه از پرنده‌هایی به نام سار که محبوس در قفس بودند، در یک منطقه از فرانسه و در طی یک روز جدا شده بودند. ایزوله‌های مربوط به محیط از ۳ اطاق که قفس این پرندگان در آن جا نگهداری می‌شد، در طول یک سال جدا شده بودند. آن‌ها ۹۵ DSTs از ۹۸ ایزوله به دست آوردند. فقط ۳ زوج ایزوله، دارای DSTs یکسان بودند: زوج اول شامل ایزوله انسانی با بیماری مهاجم و یک ایزوله از یک پرنده (DST شماره ۳۶)، زوج دوم شامل ایزوله انسان سالم و یک ایزوله از یک پرنده (DST شماره ۶۳) و زوج سوم شامل دو ایزوله غیر مرتبط انسان سالم (DST شماره ۵۸). ایزوله‌ها در ۳ گروه دسته‌بندی شدند. بیشتر ایزوله‌ها در دسته (Clade) ۳ قرار گرفتند که همه ایزوله‌های انسانی و تا حدودی اغلب

ایزوله‌های حیوانی و محیطی در این گروه کنار هم واقع شدند (۱۸).

نتیجه‌گیری

تشخیص مولکولی ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس* جهت درک بهتر اپیدمیولوژی این عفونت‌ها و تدوین استراتژی‌های پیشگیری مناسب ضروری است. چندین روش تایپینگ مولکولی در یکی دو دهه اخیر برای تعیین تنوع ژنتیکی *کاندیدا آلبیکنس* شرح داده شده است. روش‌های تایپینگ برای تعیین مشخصات مولکولی *کاندیدا آلبیکنس* در ۳ کلاس مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند. یکی از این روش‌ها که در سال‌های اخیر جهت تایپینگ *کاندیدا آلبیکنس* توسعه یافته است، روش تایپینگ تعیین توالی در چند لوکوس ژنی (MLST) است. پس از معرفی رسمی MLST *کاندیدا آلبیکنس* توسط Bougnoux و همکاران (۴۵)، پیشرفت قابل توجهی در زمینه توسعه و کارایی این تکنولوژی انجام گرفت که به صورت یک پایگاه داده‌ها برای مقایسه‌های درون آزمایشگاهی قابل دسترس است و برای مطالعات اپیدمیولوژیکی و جمعیتی بسیار کاربرد دارد.

طرحی با قدرت تمایز بسیار بالا هم اکنون در وب سایت http://calbicans.mlst.net بر مبنای مشخصات ۷ لوکوس ژنی به عنوان یک مرجع برای مطالعات آتی سرویس‌دهی انجام می‌دهد. با استفاده از این پایگاه داده‌ها، با قابلیت دسترس همگانی، می‌توان خیلی سریع تبادل و آنالیز داده MLST *کاندیدا آلبیکنس* را انجام داد. آنالیز تعداد زیادی از ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس* از میزبان‌های مختلف و مواضع بالینی متفاوت انجام گرفته است که حکایت از این دارد که با روش MLST می‌توان ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس* را مشابه روش استفاده شده با پروب Ca۳ گروه‌بندی کرد که این امر، افزایش بینش محققان در اپیدمیولوژی عفونت‌های کاندیدایی کسب شده از بیمارستان و همچنین ساختار جمعیتی *کاندیدا آلبیکنس* را در پی دارد. با افزایش استفاده از این تکنیک، مطالعات اپیدمیولوژیکی در سرتاسر جهان به آسانی صورت می‌گیرد و الگوهای انتقال و تکامل *کاندیدا آلبیکنس* آشکار می‌گردد که در ارزیابی تنوع ژنتیکی و پویا شناسی جمعیت *کاندیدا آلبیکنس* کمک کننده می‌باشد (۴۵، ۳۵، ۱۸، ۵-۲). استفاده از روش MLST توسط محققین که در بالا به آن‌ها اشاره شد، باعث شده است که آلل‌های جدید در هر ۷ ناحیه ژنی و پیامد آن استرین‌های جدید (STs) از *کاندیدا آلبیکنس* معرفی شوند. همچنین نتایج تحقیقات مختلف در اپیدمیولوژی عفونت‌های کاندیدا آلبیکنس با استفاده از این روش، اثبات کننده ریز تکامل این مخمر و همچنین انتقال آلودگی آن از فردی به فرد دیگر می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک روش قابل قبول در کنترل عفونت‌های بیمارستانی کاندیدا آلبیکنس مورد استفاده قرار گیرد.

References

1. Calderone R. Taxonomy and biology of Candida. In: Calderone RA, Editor. Candida and Candidiasis. Washington DC: ASM Press; 2002. p. 15-29.
2. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande BJ, Hu J, Messer S, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. Clin Infect Dis 2003; 37(9): 1172-7.
3. Komshian SV, Uwaydah AK, Sobel JD, Crane LR. Fungemia caused by Candida species and Torulopsis glabrata in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. Rev Infect Dis 1989; 11(3): 379-90.
4. MacDonald L, Baker C, Chenoweth C. Risk factors for candidemia in a children's hospital. Clin Infect Dis 1998; 26(3): 642-5.
5. Pittet D, Li N, Woolson RF, Wenzel RP. Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial bloodstream infections: a 6-year validated, population-based model. Clin Infect Dis 1997; 24(6): 1068-78.
6. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev 2007; 20(1): 133-63.
7. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. A

report from the NNIS System. Am J Infect Control 1999; 27(6): 520-32.
8. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. Crit Care Med 1999; 27(5): 887-92.
9. Marco F, Lockhart SR, Pfaller MA, Pujol C, Rangel-Frausto MS, Wiblin T, et al. Elucidating the origins of nosocomial infections with *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the complex probe Ca3. J Clin Microbiol 1999; 37(9): 2817-28.
10. Reagan DR, Pfaller MA, Hollis RJ, Wenzel RP. Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe. J Clin Microbiol 1990; 28(12): 2733-8.
11. Voss A, Hollis RJ, Pfaller MA, Wenzel RP, Doebbeling BN. Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients. J Clin Microbiol 1994; 32(4): 975-80.
12. Reagan DR, Pfaller MA, Hollis RJ, Wenzel RP. Evidence of nosocomial spread of *Candida albicans* causing bloodstream infection in a neonatal intensive care unit. Diagn Microbiol Infect Dis 1995; 21(4): 191-4.
13. Robert F, Lebreton F, Bougnoux ME, Paugam A, Wassermann D, Schlotterer M, et al. Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for *Candida albicans* in epidemiological surveillance of a burn unit. J Clin Microbiol 1995; 33(9): 2366-71.
14. Schmid J, Tay YP, Wan L, Carr M, Parr D, McKinney W. Evidence for nosocomial transmission of *Candida albicans* obtained by Ca3 fingerprinting. J Clin Microbiol 1995; 33(5): 1223-30.
15. Vazquez JA, Sanchez V, Dmuchowski C, Dembry LM, Sobel JD, Zervos MJ. Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiologic study. J Infect Dis 1993; 168(1): 195-201.
16. Huang YC, Lin TY, Leu HS, Wu JL, Wu JH. Yeast carriage on hands of hospital personnel working in intensive care units. J Hosp Infect 1998; 39(1): 47-51.
17. Huang YC, Lin TY, Peng HL, Wu JH, Chang HY, Leu HS. Outbreak of *Candida albicans* fungaemia in a neonatal intensive care unit. Scand J Infect Dis 1998; 30(2): 137-42.
18. Bougnoux ME, Aanensen DM, Morand S, Theraud M, Spratt BG, d'Enfert C. Multilocus sequence typing of *Candida albicans*: strategies, data exchange and applications. Infect Genet Evol 2004; 4(3): 243-52.
19. Pujol C, Reynes J, Renaud F, Raymond M, Tibayrenc M, Ayala FJ, et al. The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90(20): 9456-9.
20. Boerlin P, Boerlin-Petzold F, Goudet J, Durussel C, Pagani JL, Chave JP, et al. Typing *Candida albicans* oral isolates from human immunodeficiency virus-infected patients by multilocus enzyme electrophoresis and DNA fingerprinting. J Clin Microbiol 1996; 34(5): 1235-48.
21. Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Int J Syst Bacteriol 1999; 49 (Pt 1): 329-37.
22. Sabate J, Cano J, Esteve-Zarzoso B, Guillamon JM. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. Microbiol Res 2002; 157(4): 267-74.
23. Pinto PM, Resende MA, Koga-Ito CY, Ferreira JA, Tendler M. rDNA-RFLP identification of Candida species in immunocompromised and seriously diseased patients. Can J Microbiol 2004; 50(7): 514-20.
24. Shokohi T, Hajheidari Z, Barzgar A, Hashemi Sooteh M, Hedayati M, Aghili S, et al. Identification of Malassezia Species isolated from patients with pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis by PCR-RFLP. J Mazandaran Univ Med Sci 2008; 18(66): 51-62. (Persian).
25. Shokohi T, Bandalizadeh Z, Taghi Hedayati M, Mayahi S. In vitro antifungal susceptibility of Candida species isolated from oropharyngeal lesions of patients with cancer to some antifungal agents. Jundishapur J Microbiol 2011; 4(5): S19-S26. (Persian).
26. Saltanat Pouri Z, Shokohi T, Hashemi Soteh MB, Hedayati MT. PCR-RFLP Is a Useful Tool to Distinguish between C. *dubliniensis* and C. *albicans* in cancer patients in Iran. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res 2010; 4(2): 14-8.
27. Lopez-Ribot JL, McAtee RK, Kirkpatrick WR, Perea S, Patterson TF. Comparison of DNA-based typing methods to assess genetic diversity and relatedness among *Candida albicans* clinical isolates. Rev Iberoam Micol 2000; 17(2): 49-54.
28. Shin JH, Park MR, Song JW, Shin DH, Jung SI, Cho D, et al. Microevolution of *Candida albicans* strains during catheter-related candidemia. J Clin Microbiol 2004; 42(9): 4025-31.
29. Chen KW, Lo HJ, Lin YH, Li SY. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. J Med Microbiol 2005; 54(Pt 3): 249-58.
30. Quindos G, Alonso-Vargas R, Garaizar J, Ponton J. [Utility of random amplified polymorphic DNA in the discrimination between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*]. Rev Iberoam Micol 2000; 17(1): 10-3.

31. Ratón TO. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev Iberoam Micol 2004; 21(1): 15-9.
32. Ergon MC, Gulay Z. Molecular epidemiology of Candida species isolated from urine at an intensive care unit. Mycoses 2005; 48(2): 126-31.
33. Saltanatpour Z, Shokohi T, Hashemi Sooteh M, Hedayati MT, Badali H. Use of Random Amplified Polymorphic DNA to Identify Candida Species, Originated from Cancer Patients. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res 2011; 5(2): 23-8.
34. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. Clin Microbiol Rev 2000; 13(2): 332-70.
35. Pujol C, Pfaller M, Soll DR. Ca3 fingerprinting of *Candida albicans* bloodstream isolates from the United States, Canada, South America, and Europe reveals a European clade. J Clin Microbiol 2002; 40(8): 2729-40.
36. Lockhart SR, Fritch JJ, Meier AS, Schroppel K, Srikantha T, Galask R, et al. Colonizing populations of *Candida albicans* are clonal in origin but undergo microevolution through C1 fragment reorganization as demonstrated by DNA fingerprinting and C1 sequencing. J Clin Microbiol 1995; 33(6): 1501-9.
37. Pujol C, Joly S, Nolan B, Srikantha T, Soll DR. Microevolutionary changes in *Candida albicans* identified by the complex Ca3 fingerprinting probe involve insertions and deletions of the full-length repetitive sequence RPS at specific genomic sites. Microbiology 1999; 145 (Pt 10): 2635-46.
38. Soll DR, Galask R, Schmid J, Hanna C, Mac K, Morrow B. Genetic dissimilarity of commensal strains of *Candida spp*. carried in different anatomical locations of the same healthy women. J Clin Microbiol 1991; 29(8): 1702-10.
39. Xu J, Boyd CM, Livingston E, Meyer W, Madden JF, Mitchell TG. Species and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonizing women. J Clin Microbiol 1999; 37(12): 3835-43.
40. Lockhart SR, Reed BD, Pierson CL, Soll DR. Most frequent scenario for recurrent Candida vaginitis is strain maintenance with "substrain shuffling": demonstration by sequential DNA fingerprinting with probes Ca3, C1, and CARE2. J Clin Microbiol 1996; 34(4): 767-77.
41. Blignaut E, Pujol C, Lockhart S, Joly S, Soll DR. Ca3 fingerprinting of *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive and healthy individuals reveals a new clade in South Africa. J Clin Microbiol 2002; 40(3): 826-36.
42. Pujol C, Joly S, Lockhart SR, Noel S, Tibayrenc M, Soll DR. Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and Southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1997; 35(9): 2348-58.
43. Pujol C, Pfaller MA, Soll DR. Flucytosine resistance is restricted to a single genetic clade of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(1): 262-6.
44. Lott TJ, Fundyga RE, Brandt ME, Harrison LH, Sofair AN, Hajjeh RA, et al. Stability of allelic frequencies and distributions of *Candida albicans* microsatellite loci from U.S. population-based surveillance isolates. J Clin Microbiol 2003; 41(3): 1316-21.
45. Bougnoux ME, Morand S, d'Enfert C. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 2002; 40(4): 1290-7.
46. Cowen LE, Sirjusingh C, Summerbell RC, Walmsley S, Richardson S, Kohn LM, et al. Multilocus genotypes and DNA fingerprints Do not predict variation in azole resistance among clinical isolates of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(12): 2930-8.
47. Forche A, Schonian G, Graser Y, Vilgalys R, Mitchell TG. Genetic structure of typical and atypical populations of *Candida albicans* from Africa. Fungal Genet Biol 1999; 28(2): 107-25.
48. Botterel F, Desterke C, Costa C, Bretagne S. Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. J Clin Microbiol 2001; 39(11): 4076-81.
49. Bretagne S, Costa JM, Besmond C, Carsique R, Calderone R. Microsatellite polymorphism in the promoter sequence of the elongation factor 3 gene of *Candida albicans* as the basis for a typing system. J Clin Microbiol 1997; 35(7): 1777-80.
50. Costa JM, Eloy O, Botterel F, Janbon G, Bretagne S. Use of microsatellite markers and gene dosage to quantify gene copy numbers in *Candida albicans*. J Clin Microbiol 2005; 43(3): 1387-9.
51. Eloy O, Marque S, Botterel F, Stephan F, Costa JM, Lasserre V, et al. Uniform distribution of three *Candida albicans* microsatellite markers in two French ICU populations supports a lack of nosocomial cross-contamination. BMC Infect Dis 2006; 6: 162.
52. Field D, Eggert L, Metzgar D, Rose R, Wills C. Use of polymorphic short and clustered coding-region microsatellites to distinguish strains of *Candida albicans*. FEMS Immunol Med Microbiol 1996; 15(2-3): 73-9.
53. Sampaio P, Gusmao L, Correia A, Alves C, Rodrigues AG, Pina-Vaz C, et al. New microsatellite multiplex PCR for *Candida albicans* strain typing reveals microevolutionary changes. J Clin Microbiol 2005; 43(8): 3869-76.
54. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of

clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(6): 3140-5.
55. Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol 2003; 11(10): 479-87.
56. Bougnoux ME, Tavanti A, Bouchier C, Gow NA, Magnier A, Davidson AD, et al. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 2003; 41(11): 5265-6.
57. Tavanti A, Gow NA, Senesi S, Maiden MC, Odds FC. Optimization and validation of multilocus sequence typing for *Candida albicans*. J Clin Microbiol 2003; 41(8): 3765-76.
58. Clamp M, Cuff J, Searle SM, Barton GJ. The Jalview Java alignment editor. Bioinformatics 2004; 20(3): 426-7.
59. Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. Nucleic Acids Res 2005; 33(Web Server issue): W728-W733.
60. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99(11): 7687-92.
61. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J Bacteriol 2004; 186(5): 1518-30.
62. Robles JC, Koreen L, Park S, Perlin DS. Multilocus sequence typing is a reliable alternative method to DNA fingerprinting for discriminating among strains of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 2004; 42(6): 2480-8.
63. Bougnoux ME, Diogo D, Francois N, Sendid B, Veirmeire S, Colombel JF, et al. Multilocus sequence typing reveals intrafamilial transmission and microevolutions of *Candida albicans* isolates from the human digestive tract. J Clin Microbiol 2006; 44(5): 1810-20.
64. Chen KW, Chen YC, Lo HJ, Odds FC, Wang TH, Lin CY, et al. Multilocus sequence typing for analyses of clonality of *Candida albicans* strains in Taiwan. J Clin Microbiol 2006; 44(6): 2172-8.
65. Cliff PR, Sandoe JA, Heritage J, Barton RC. Use of multilocus sequence typing for the investigation of colonisation by *Candida albicans* in intensive care unit patients. J Hosp Infect 2008; 69(1): 24-32.
66. Da Matta DA, Melo AS, Guimaraes T, Frade JP, Lott TJ, Colombo AL. Multilocus sequence typing of sequential *Candida albicans* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. Med Mycol 2010; 48(5): 757-62.
67. Shin JH, Bougnoux ME, d'Enfert C, Kim SH, Moon CJ, Joo MY, et al. Genetic diversity among Korean *Candida albicans* bloodstream isolates: assessment by multilocus sequence typing and restriction endonuclease analysis of genomic DNA by use of BssHII. J Clin Microbiol 2011; 49(7): 2572-7.
68. Gammelsrud KW, Lindstad BL, Gaustad P, Ingebretsen A, Hoiby EA, Brandtzaeg P, et al. Multilocus sequence typing of serial *Candida albicans* isolates from children with cancer, children with cystic fibrosis and healthy controls. Med Mycol 2012; 50(6): 619-26.
69. Afsarian MH. The survey of genetic diversity *Candida albicans* isolated from patients by Multilocus Sequence Typing (MLST) and in vitro antifungal susceptibility to conventional drugs [PhD Thesis]. Sari, Iran: School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences; 2013. (Persian).
70. Odds FC, Bougnoux ME, Shaw DJ, Bain JM, Davidson AD, Diogo D, et al. Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. Eukaryot Cell 2007; 6(6): 1041-52.
71. Odds FC. Molecular phylogenetics and epidemiology of *Candida albicans*. Future Microbiol 2010; 5(1): 67-79.