

Pediatric Catheters Infectivity and Identification of Candida Species Isolated from Hospitalized Patients in Mashhad Pediatric Hospital

Bahar Nejati¹,
Seyed Javad Sayedi²,
Tahereh Shokohi^{3,4},
Mohammad Taghi Hedayati^{3,4},
Mojtaba Nabili⁵,
Seyed Jaber Mousavi⁶,
Mohammad Esmaeeli⁷,
Maryam Moazeni^{3,8}

¹ MSc Student in Medical Mycology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Neonatal Research Center, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³ Invasive Fungi Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Professor, Department of Medical Mycology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Medical Sciences, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

⁶ Associate Professor, Department of Community Medicine, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ Professor, Department of Pediatric Nephrology, Dr. Sheikh Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁸ Assistant Professor, Department of Medical Mycology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 15, 2020 ; Accepted May 29, 2021)

Abstract

Background and purpose: Invasive candidiasis in infants has high mortality rate and is often associated with colonization on medical devices such as catheters. *Candida* colonization is considered as a predisposing factor for *Candida* related infection. The aim of this study was to evaluate the rate of catheters infectivity by *Candida* species.

Materials and methods: In this descriptive cross-sectional study, sampling was done from catheters of hospitalized children (0-18 years old) in pediatric intensive care unit (PICU) in Mashhad Dr. Sheikh Hospital, June-November 2018. All catheters were evaluated to determine the extent of contamination and early identification of isolates was done by morphological and molecular methods.

Results: The types of catheter infectivity for 114 samples included colonization or infective (n=25 isolates, 21.92%), contamination (n=4, 3.5%), and no growth (n=85 isolates, 56.74%). The most isolated species was *C. albicans* (n=18, 13.39%), followed by *C. glabrata* (n=9, 19.56%), *C. krusei* and *C. parapsilosis* (n=7, 15.21%, each isolate), *C. tropicalis* (n=3, 6.25%), and *C. lusitaniae* and *C. kefyr* (n=1, 2.17% each isolate).

Conclusion: Isolation of *Candida* species in 25% of catheters raised the possibility of colonization, considering the catheters as an exogenous potential source of candidiasis which is very important in PICU.

Keywords: catheters, pediatrics, neonates, *Candida*

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31(198): 48-59 (Persian).

* **Corresponding Author:** Maryam Moazeni - Invasive Fungi Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: Moazeni.maryam@gmail.com)

ارزیابی میزان آلودگی کاتترها و تعیین گونه ایزوله های کاندیدا/ جدا شده از کاتترهای بیماران بستری در بیمارستان کودکان مشهد

بهار نجاتی¹
سید جواد سیدی²
طاهره شکوهی^{3,4}
محمد تقی هدایتی^{3,4}
مجتبی نبیلی⁵
سید جابر موسوی⁶
محمد اسماعیلی⁷
مریم موذنی^{3,8}

چکیده

سابقه و هدف: کاندیدیازیس مهاجم در کودکان با میزان مرگ و میر بالایی همراه بوده و اغلب اوقات با کلونیزاسیون بر روی دستگاه های پزشکی مانند کاتتر مرتبط است. به نظر می رسد کلونیزاسیون کاندیدا به عنوان یک پیش نیاز برای عفونت کاندیدیایی مطرح است. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی میزان آلودگی کاتترها توسط گونه های کاندیدا می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی نمونه گیری در بازه زمانی خرداد لغایت آبان ماه 1397 از کاتترهای کودکان بستری (0-18 سال) در بخش مراقبت ویژه کودکان (PICU) بیمارستان دکتر شیخ شهر مشهد صورت پذیرفت. هر یک از کاتترها جهت تعیین میزان آلودگی ارزیابی شدند و شناسایی ایزوله ها توسط روش های مورفولوژیک و مولکولار انجام شد.

یافته ها: بر اساس نتایج حاصل از شمارش کلنی، نوع آلودگی کاتترها برای 114 نمونه به صورت زیر به دست آمد: 25 نمونه با قابلیت ایجاد کلونیزاسیون و یا عفونت (21/92 درصد)، 4 نمونه آلوده (3/5 درصد) و 85 نمونه غیر آلوده (56/74 درصد). در بین استرین های رشد کرده، کاندیدا آلبیکنس با 18 ایزوله و بیشترین فراوانی (13/39 درصد) و پس از آن به ترتیب 9 ایزوله کاندیدا گلابراتا (19/56 درصد)، کاندیدا کروزه ای و کاندیدا پاراپسیلوزیس هر کدام با 7 ایزوله شناسایی شده (15/21 درصد)، 3 ایزوله کاندیدا تروپیکالیس (6/25 درصد) و نهایتاً کاندیدا لوزیتانیا و کاندیدا کفیر هر کدام با 1 ایزوله شناسایی شده (2/17 درصد)، بیشترین فراوانی را داشتند.

استنتاج: مجموعاً میزان آلودگی مخمری در 25 درصد کاتترها، احتمال ایجاد کلونیزاسیون را مطرح نمود، بنابراین کاتترها می توانند به عنوان یک منبع بالقوه آگروژن در ایجاد کاندیدیازیس نقش داشته باشند. که این امر در بخش PICU بسیار حائز اهمیت است.

واژه های کلیدی: کاتتر، کودکان و نوزادان، کاندیدا

مقدمه

اصطلاح کاندیدیازیس مهاجم، شامل طیف وسیعی از بیماری های حاد و مهاجم بوده که شامل کاندیدمی، کاندیدیازیس منتشره، درگیری ارگان های عمقی، اندوکاردیت و مننژیت می شود (1،2).

مؤلف مسئول: مریم موذنی - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی
E-mail: Moazeni.maryam@gmail.com

1. دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. استادیار، مرکز تحقیقات نوزادان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
3. مرکز تحقیقات قارچ های مهاجم، پژوهشکده بیماری های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
4. استادیار، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
5. استادیار، دانشکده پزشکی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران
6. دانشیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
7. استادیار، گروه نفرولوژی کودکان، بیمارستان دکتر شیخ، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
8. استادیار، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1399/5/25 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/5/28 تاریخ تصویب: 1400/3/8

کاندیدازیس مهاجم دارای میزان مرگ و میر قابل توجه (40 تا 50 درصد) و درمان بسیار پرهزینه می‌باشد (7-3). شرایط مستعدکننده در بیماران بستری در بیمارستان‌ها شامل جراحی قلب باز و تعویض دریچه، اقدامات پزشکی از قبیل کاتترگذاری داخل عروقی و سوندگذاری درون مجاری، تضعیف سیستم‌های دفاعی متعاقب شرایط فیزیولوژیک از قبیل بارداری، بیماری‌های ناتوان‌کننده، بیماری‌های اتوایمیون و دیابت و سایر عوامل تضعیف‌کننده سیستم دفاعی بدن می‌باشد. تمامی موارد ذکر شده منجر به افزایش رشد مخمر و ایجاد کلونیزاسیون می‌شوند (8). هرچند انتقال بیمارستانی ممکن است از طریق منابع خارجی (exogenous) مانند دستگاه‌های پزشکی آلوده و دست پرسنل مراقبت سلامتی رخ دهد (9). اپیدمیولوژی کاندیدی می‌طی چند دهه اخیر تغییر کرده است (10). اگرچه کاندیدا آلبیکنس مسئول اکثر موارد کاندیدی می‌باشد، اما گونه‌های کاندیدا غیر آلبیکنس شامل: کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا کروزه ای و کاندیدا گیلرموندی منجر به قسمت عمده ای از عفونت‌های مرتبط با کاندیدا می‌شوند (11-13). کاندیدا اوریس (*Candida auris*) مقاوم به چندین دارو به‌طور فزاینده‌ای به‌عنوان یک نگرانی کلینیکی نوظهور و مهم برای سلامتی انسان‌ها، مخصوصاً در بیماران بستری که دارای بیماری‌های زمینه‌ای جدی می‌باشند، شناخته می‌شود (14). این جابه‌جایی در عامل مسبب عفونت از کاندیدا آلبیکنس به سمت گونه‌های کاندیدا غیر آلبیکنس، به‌طرز چشمگیری با افزایش مرگ و میر و کاهش حساسیت به داروهای ضدقارچی همراه می‌باشد. مواجهه قبلی با آژول‌ها جهت پروفیلاکسی و اکتینوکنندین‌ها جهت درمان ممکن است به‌عنوان یک فاکتور مهم که منجر به افزایش موارد کاندیدازیس توسط گونه‌های کاندیدا غیر آلبیکنس می‌شوند، محسوب گردد (14، 15). کودکان بستری در بخش مراقبت‌های ویژه (PICU) جمعیت ناهمگنی از کودکان هستند که دارای ریسک‌های قطعی

بالایی جهت ابتلا به بیماری قارچی مهاجم می‌باشند. این ریسک‌ها نتیجه ترکیب منحصر به فرد شرایط کلینیکی پیچیده و حیاتی می‌باشد که عبارت از نیاز به بستری طولانی‌مدت، مداخلات تهاجمی مکرر و حضور دستگاه‌های خارجی از قبیل کاتترها و لوله‌های تراشه هستند. عامل غالب در ایجاد بیماری قارچی مهاجم در PICU کاندیدازیس مهاجم می‌باشد (16). ارزیابی میزان مرگ و میر ایجاد بیماری قارچی مهاجم در PICU به دلیل تنوع بالا در شدت و پیچیدگی شرایط زمینه‌ای بیماران، بسیار مشکل می‌باشد. با این حال با توجه به منابع موجود، 72 تا 78 درصد از کاندیدمی، مرتبط با کاتتر در بیماران بخش مراقبت ویژه در نظر گرفته می‌شود (17، 18). کودکان مبتلا به بدخیمی‌های خونی (مخصوصاً لوکمی حاد)، گیرندگان پیوند سلول‌های بنیادی، گیرندگان پیوند اندام‌های سخت، افراد دارای نقص ایمنی اولیه یا اکتسابی و نوزادان نارس بیش‌تر در معرض خطر ابتلا می‌باشند (19، 20). اهمیت روزافزون عفونت‌های کاندیدایی مهاجم مرتبط با کاتتر در بیمارستان‌ها و مخصوصاً در بخش PICU و توجه به اهمیت کاتترها به‌عنوان یکی از منابع اصلی ابتلا به کاندیدازیس مهاجم، این ایده را مطرح نمود که به بررسی نوع عفونت‌زایی کاتترها و همچنین تعیین هویت ایزوله‌های احتمالی جدا شده از آن‌ها پردازیم. بنابراین مطالعه حاضر با هدف انجام موارد ذکر شده در جمعیت کودکان بستری در بخش PICU بیمارستان تخصصی کودکان دکتر شیخ در مشهد که به‌عنوان سانت‌شمال شرق کشور محسوب می‌شود، طراحی گردید. بر اساس دانسته‌های ما این روش تحقیق بر روی کاتترها و در جمعیت کودکان تاکنون در ایران انجام نگرفته بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع توصیفی - مقطعی است که به مدت 6 ماه در بازه زمانی خرداد لغایت آبان ماه در سال 1397 صورت پذیرفت. نمونه‌گیری به‌صورت سرشماری

با شرط استفاده از کاتترها به مدت حداقل 72 ساعت برای بیماران و همچنین عدم خروج کاتتر قبل از نمونه گیری انجام شد. مطالعه حاضر به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران با شناسه اخلاق IR.MAZUMS.REC 1397.1233 رسید.

جمع آوری نمونه ها و تعیین نوع آلودگی کاتترها (Types of Catheter Infectivity)

جهت جمع آوری ایزوله‌ها از هر کاتتر (کاتتر ورید مرکزی / کاتتر ادراری / کاتتر ناف / لوله تراشه / کاتتر دیالیز / chest tube)، دو نمونه گرفته شد که شامل: 1- قبل از خارج کردن کاتتر یک سوآب پنبه‌ای مرطوب شده با سرم فیزیولوژی استریل را به داخل لومن بخش hub کاتتر برده و از قسمت داخل آن نمونه گیری انجام گرفت (21)، 2- انتهای کاتتر (Tip) را با قیچی استریل قطع نمودیم. یک نمونه سوم هم از سطح پوست اطراف کاتتر با سوآب مرطوب شده با سرم فیزیولوژی استریل گرفته شد. هر کدام از نمونه‌ها را در یک لوله فالكون استریل جداگانه حاوی 2 میلی‌لیتر محیط ساپورو دکستروز برات (SDB) (QUELAB-LABORATORIES INC., Canada) همراه با پن استرپ (Thermo Fisher Scientific, USA)، قرار داده و لوله‌های حاوی نمونه در vortex mixer به مدت 1 دقیقه تکان داده شدند (22)، از سوسپانسیون به دست آمده جهت رقت‌سازی استفاده گردید. از رقت‌های 1، 0/1، 0/01 در محیط کشت ساپورو دکستروز آگار (SDA) (QUELAB-LABORATORIES INC., Canada) همراه با پن استرپ کشت داده شد. با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید: تعداد کلنی‌های شمارش شده ضربدر فاکتور رقت، تقسیم بر حجم سوسپانسیون کشت داده شده در پلیت. در نهایت تعیین نوع کاتتر (آلودگی و یا قابلیت ایجاد کلونیزاسیون)، با توجه به آستانه معنی‌دار بیش‌تر / مساوی 10^3 ($\geq 10^3$) براساس مطالعات مشابه قبلی (23، 24) انجام پذیرفت.

تعیین هویت ایزوله‌های به دست آمده
تست تولید جرم تیوب و کشت بر روی محیط کروم
آگار کانیدا

جهت شناسایی اولیه گونه‌های کانیدا آلیکنس و کانیدا دابلینسیس از تست تولید جرم تیوب استفاده شد (25، 26). جهت شناسایی اولیه ایزوله‌های احتمالی، هر یک از نمونه‌ها بر روی محیط CHROMAgar Candida (QUELAB-LABORATORIES INC., Canada) کشت داده شدند. افتراق براساس رنگ کلنی‌ها صورت گرفت. به این ترتیب که: کانیدا آلیکنس (سبز)، کانیدا گلابراتا (ارغوانی)، کانیدا کروزه‌ای (صورتی)، کانیدا تروپیکالیس (آبی متالیک) و کلنی‌های سفید یا شیری مربوط به سایر گونه‌ها، عنوان شدند (27).

روش‌های مولکولار مبتنی بر PCR

جهت شناسایی مولکولی ایزوله‌های جدا شده، DNA ایزوله‌های مخمری با استفاده از روش جوشاندن استخراج شد (28). ناحیه Internal Transcribed Spacer (ITS) توسط واکنش Polymerase Chain Reaction (PCR) و با استفاده از جفت پرایمرهای (5-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) ITS1 و (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) ITS4 تکثیر شدند (29). شرایط دمایی واکنش PCR به صورت زیر تعریف شد: دناتوراسیون اولیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه؛ 25 سیکل جهت دناتوراسیون در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، اتصال در 56 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه، گسترش در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه؛ در آخرین مرحله گسترش نهایی در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 7 دقیقه. سپس محصولات PCR تحت تأثیر هضم آنزیمی به وسیله آنزیم محدودالانتر *Msp I* (Thermo Fisher Scientific, USA)، قرار گرفتند. سپس در دستگاه Thermal Cycler (BioRAD, C1000-USA) به مدت 5 دقیقه و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه

نمودیم. در مرحله بعد جداسازی قطعات هضم شده توسط آنزیم از یکدیگر، به واسطه الکتروفورز محصولات (Restriction Fragment Length Polymorphism) PCR-RFLP بر روی ژل آگارز 2 درصد انجام گرفت (31,30). اجزای واکنش PCR-RFLP عبارت بودند از: آب عاری از نوکلئاز، 10X FastDigest or 10X FastDigest Green Buffer، DNA یا همان محصول PCR و FastDigest enzyme یا همان *Msp I* شناسایی نهایی ایزوله‌ها از طریق مقایسه باندهای حاصل از الکتروفورز با الگوهای استاندارد حاصل از نتایج مطالعات گذشته بر روی گونه‌های کاندیدا صورت گرفت (32). جهت افتراق گونه‌های درون کمپلکس آلیکینس (کاندیدا/آلیکینس، کاندیدا آفریکانا و کاندیدا دابلینینسیس) از جفت پرایمرهای Hyphal Wall Protein (HWP)، شامل: HWP-F(5-GCTACCACTTCAGAATCATCATC-3) و HWP-R(5-GCACCTTCAGTCGTAGAGACG-3) [سنتر شده توسط شرکت سیناکلون (ایران، تهران)] جهت تکثیر ناحیه ژنی *hwp 1* استفاده شد. شرایط دمایی واکنش PCR به صورت زیر تعریف شد: دناتوراسیون اولیه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه؛ 35 سیکل جهت دناتوراسیون در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، اتصال در 56 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه، گسترش در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه؛ در آخرین مرحله گسترش نهایی در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه. شناسایی از طریق مقایسه باندهای حاصل از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز 1/5 درصد با الگوی استاندارد حاصل از نتایج مطالعات قبلی انجام گرفت (33). به منظور افتراق گونه‌های درون کمپلکس پاراپسیلوزیس (کاندیدا/پاراپسیلوزیس، کاندیدا متاپسیلوزیس و کاندیدا اورتوپسیلوزیس) از جفت پرایمرهای orthopsilosis-metapsilosis (OM)، شامل: OM-F(5'-GAGAAAGCACGCCTCTTTGC-3') و OM-R (5'-TCAGCATTTTGGGCTCTTGC-3') [سنتر شده توسط شرکت سیناکلون (ایران، تهران)]،

استفاده شد (34). شرایط دمایی واکنش PCR به صورت زیر تعریف شد: دناتوراسیون اولیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه؛ 35 سیکل جهت دناتوراسیون در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، اتصال در 60 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، گسترش در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه؛ در آخرین مرحله گسترش نهایی در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 8 دقیقه. در نهایت شناسایی از طریق جداسازی قطعات هضم شده به واسطه الکتروفورز بر روی ژل آگارز 2 درصد و مقایسه با نتایج مطالعات قبلی میسر شد (30). تمامی واکنش‌های PCR در حجم نهایی 25 میکرولیتر انجام شد که اجزای آن شامل Ready-to-Use 2x Taq DNA Polymerase Master Mix RED (AMPLIQON, DENMARK)، پرایمرهای الگو، آب مقطر استریل و DNA الگو بود. همچنین جهت تأیید نتایج به دست آمده، 8 ایزوله بصورت تصادفی انتخاب شدند و جهت انجام سکانس ناحیه ITS ارسال شدند. نتایج به دست آمده توسط نرم‌افزار MEGA6 مورد بررسی قرار گرفتند. از پارامترهای آمار توصیفی جهت بررسی فراوانی، تعداد و درصد یافته‌ها توسط نرم‌افزار SPSS ver. 18 استفاده شد.

یافته‌ها

از 27 بیمار بستری منطبق بر معیارهای ورود و خروج، مجموعاً 29 کاتتر جمع‌آوری شده که از این تعداد کاتتر، 114 نمونه [پوست / Hub(s) / Tip] حاصل شد.

نتایج تعیین *CFU/ml* و نوع کاتتر از نظر قابلیت بیماری‌زایی

از مجموع 12 بیمار که کاتترهای جمع‌آوری شده از آن‌ها شمارش کلنی بیش‌تر از 10^3 کلنی در هر میلی‌لیتر را نشان دادند، اطلاعات 10 بیمار در دسترس بود که بیانگر نتایج زیر بودند: 8 بیمار بیش‌تر از 2 هفته در بیمارستان بستری بودند، که از این تعداد برای 7 بیمار، کاتتر به مدت بیش‌تر از 7 روز مورد استفاده قرار گرفته

جدول شماره 2: نتایج میزان و نوع عفونت‌زایی نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از محاسبه CFU/ml

شمارش کلنی	فرآیندی	مجموع (تعداد)	مجموع (درصد)
$10^3 \leq$	سر	9	21/92
	هاب	9	
	پوست	7	
$10^3 >$	سر	1	3/5
	هاب	1	
	پوست	2	
عدم رشد	-	85	74/56

نتایج جداسازی و شناسایی ایزوله‌های کاندیدا

نتایج جداسازی و شناسایی ایزوله‌های کاندیدا با استفاده از روش‌های مرسوم قارچ‌شناسی

پس از کشت نمونه‌ها بر روی محیط اختصاصی CHROMAgar Candida، کلنی‌هایی با رنگ‌های متفاوت رشد نمودند و بعضاً از یک نمونه کلنی‌هایی با رنگ‌های متفاوت، که احتمال چندگونه متفاوت (Multiple-Species)، را مطرح می‌کنند. نتایج حاصل در جدول شماره 3 قابل مشاهده می‌باشند. با توجه به نتایج به‌دست آمده برای کلنی‌های رشد کرده، 14 ایزوله کاندیدا آلیکینس (31/8 درصد)، 9 ایزوله کاندیدا گلابراتا (20/4 درصد)، 4 ایزوله کاندیدا کروزه‌ای (9/1 درصد)، 1 ایزوله کاندیدا تروپیکالیس (2/3 درصد) و 16 ایزوله به صورت گونه‌های دیگر کاندیدا (36/4 درصد) تعیین شدند. 2 ایزوله بر روی این محیط رشد نکردند.

نتایج مثبت این تست برای تمامی نمونه‌ها هم‌راستا با نتایج کشت بر روی محیط CHROMAgar Candida و روش‌های مولکولی تعیین هویت ایزوله‌ها بودند، به غیر از نمونه Tip حاصل از کاتتر شماره 18 که نتایج تست تولید لوله زایا فقط با جواب‌های حاصل از روش‌های مولکولی همخوانی داشت، زیرا کلنی‌های حاصل از کشت بر روی محیط کروم آگار کاندیدا نشانگر 3 گونه بود که بر اساس مورفولوژی عبارت بودند از: کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کروزه‌ای و یک کلنی هم به رنگ سفید و ناشناخته؛ اگرچه که هر 3 کلنی پس از تعیین هویت به روش مولکولار، کاندیدا آلیکینس شناسایی شدند.

بود؛ همچنین از آن 8 بیمار، 7 بیمار بیش‌تر از 1 کاتتر در بدنشان جایگذاری شده بود و فقط 1 بیمار با بیش از بود. سایر اطلاعات دموگرافیک در جدول شماره 1 نشان داده شده‌اند. طی اطلاعات دموگرافیک در جدول شماره 2 نشان داده شده‌اند. طی انجام مطالعه، در هیچ‌کدام از این بیماران کاندیدمی و یا عفونت‌های سیستمیک مربوط به کاندیدا دیده نشد. از مجموع 29 کاتتر جمع‌آوری شده از بیماران، در مجموع تعداد 114 نمونه از بخش‌های مختلف کاترها [، هاب(ها) و Tip] و همچنین پوست نزدیک محل ورود کاتتر حاصل شدند. 29 نمونه از نظر کشت مثبت از نظر کاندیدا گزارش شدند. از این تعداد نمونه مثبت، با در نظر گرفتن معیار ذکر شده در مطالعات قبلی (23، 22)، 25 نمونه قابلیت ایجاد کلونیزاسیون و عفونت‌زایی احتمالی را داشتند و تحت عنوان $10^3 \geq \text{CFU/ml}$ Colonization/Infective-CFU/ml شناسایی شدند، که از این تعداد 9 نمونه سر کاتتر (Tip)، 9 نمونه هاب (Hub) و 7 نمونه پوست بودند. 4 نمونه تحت عنوان $10^3 < \text{CFU/ml}$ Contamination-CFU/ml شناسایی شد (جدول شماره 2).

جدول شماره 1: اطلاعات دموگرافیک بیماران متناظر با کاترها با $10^3 \geq \text{CFU/ml}$

اطلاعات دموگرافیک بیماران (n:12) متناظر با کاترها با $10^3 \geq \text{CFU/ml}$	تعداد (درصد)
سن*	
نوزاد (<1 سال)	1 (10)
کودک (1-18 سال)	9 (90)
جنس	
مذکر	5 (41/66)
مونث	7 (58/33)
مدت زمان استفاده از کاتتر*	
(3-7 روز)	3 (30)
(8-14 روز)	1 (10)
(15-28 روز)	4 (40)
(>28 روز)	2 (20)
نوع بیماری زمینه‌ای*	
Wilms Tumor	3 (30)
Necrotizing Pneumonia	1 (10)
Infection in the previous site of surgery	1 (10)
Drowning and CP(Cerebral Palsy)	1 (10)
ALL(Acute Lymphoblastic Leukemia)	1 (10)
Acute Renal Failure	1 (10)
Posterior Urethral Valve (PUV)	2 (20)
نوع کاتتر	
ورید مرکزی	5 (41/66)
ادراری	5 (41/66)
لوله تراشه	1 (8/3)
Chest tube	1 (8/3)

*: این اطلاعات برای 2 بیمار در دسترس نبودند.

نتایج جدا سازی و شناسایی به روش های مولکولی

از مجموع تعداد 114 نمونه جمع آوری شده، پس از شناسایی به روش های مرسوم و مولکولی، 46 ایزوله جدا گردیدند. از این تعداد به ترتیب فراوانی، 18 ایزوله کاندیدا آلیکنس (39/13 درصد)، 9 ایزوله کاندیدا گلابراتا (19/56 درصد)، کاندیدا کروزه ای و کاندیدا پاراپسیلوزیس هر کدام با 7 ایزوله شناسایی شده (15/21 درصد)، 3 ایزوله کاندیدا تروپیکالیس (6/52 درصد) و نهایتاً کاندیدا لوزیتانیا و کاندیدا کفیر هر کدام با 1 ایزوله شناسایی شده (2/17 درصد)، تعیین گونه شدند. پس از انجام PCR با پرایمرهای HWP و الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز 1/5 درصد، نتایج با الگوی استاندارد مقایسه شد (47) و تمامی ایزوله ها آلیکنس شناسایی شدند. پس از انجام PCR جهت 7 ایزوله کاندیدا پاراپسیلوزیس با پرایمرهای اختصاصی OM و الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز 2 درصد، نتایج با الگو استاندارد مقایسه شدند (48)، نتایج تمامی آنها کاندیدا پاراپسیلوزیس گزارش شد. نتایج مربوط به شناسایی ایزوله های رشد کرده، به تفکیک نوع نمونه گرفته شده از هر کاتتر، نوع کاتتر در جدول شماره 3 و نمودار شماره 1 نشان داده شده است.

بحث

در مطالعه حاضر درصد کاتترهایی که شمارش کلنی آنها بیش تر از 10^3 بوده و به صورت بالقوه می توانند ایجاد کلونیزاسیون یا عفونت احتمالی را نمایند برابر با 21/92 درصد است؛ این در حالی است که تنها در 3/5 درصد از نمونه های کاتتر شمارش کلنی کم تر از 10^3 گزارش شدند که بیانگر اهمیت و نقش احتمالی و مهم کاتترها به عنوان یک منبع عفونت زایی می باشند. در این مطالعه، گونه کاندیدا آلیکنس فقط از 3 گروه از کاتترها جدا سازی شد (کاتتر ورید مرکزی، کاتتر ادراری و لوله تراشه)؛ که در کاتترهای ورید مرکزی

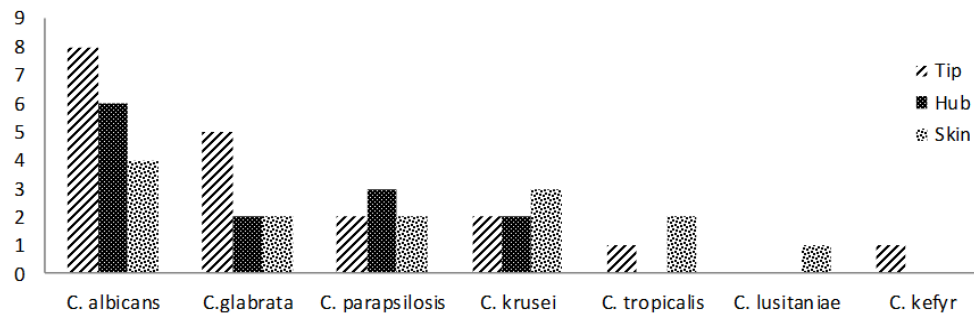
جدول شماره 1: نتایج تعیین هویت ایزوله های جدا شده با استفاده از روش های مرسوم و مولکولی به تفکیک نوع کاتتر

شماره ایزوله	شماره کاتتر	نوع نمونه	نوع کاتتر	نتایج کشت بر روی محیط کرمه آگار کاندیدا	نتایج PCR-RFLP
1	1	هاب	CVC	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
2		سر		<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
3		پوست		<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
4	2	هاب	CVC	<i>Candida</i> spp.	<i>C. parapsilosis</i>
5		سر		<i>Candida</i> spp.	<i>C. parapsilosis</i>
6		پوست		<i>Candida</i> spp.	<i>C. parapsilosis</i>
7	1	هاب		<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
8	1	هاب		<i>Candida</i> spp.	<i>C. parapsilosis</i> **
9	5	هاب	CVC	<i>Candida</i> spp.	<i>C. parapsilosis</i>
10	2	هاب		<i>Candida</i> spp.	<i>C. parapsilosis</i>
11		سر		<i>Candida</i> spp.	<i>C. parapsilosis</i>
12		پوست		<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
13		سر		<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
14		سر		<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
15	7	سر	TT	<i>Candida</i> spp.	<i>C. kefyr</i>
16		سر		<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
17		سر		<i>Candida</i> spp.	<i>C. glabrata</i>
18		سر		<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
19	8	سر	CT	NG	<i>C. glabrata</i> **
20		پوست		<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> **
21		پوست		<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
22		هاب		<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
23	16	هاب	UC	<i>Candida</i> spp.	<i>C. glabrata</i> **
24		سر		<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
25		سر		<i>Candida</i> spp.	<i>C. tropicalis</i> **
26		پوست		<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
27		سر		<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
28	18	سر	CVC	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>
29		سر		<i>Candida</i> spp.	<i>C. albicans</i> **
30		هاب		<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
31	20	سر	UC	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
32		پوست		<i>Candida</i> spp.	<i>C. krusei</i> **
33		پوست		<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i> **
34		هاب		<i>Candida</i> spp.	<i>C. krusei</i>
35	9	هاب	UC	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
36		سر		<i>Candida</i> spp.	<i>C. krusei</i>
37		سر		<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
38	10	پوست	UC	NG	<i>C. krusei</i>
39		پوست		<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
40		پوست	UC	<i>C. glabrata</i>	<i>C. lusitanae</i>
41		پوست		<i>Candida</i> spp.	<i>C. tropicalis</i>
42		پوست		<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
43	1	هاب		<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
44	12	هاب	CVC	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
45		هاب		<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
46		سر		<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>

CVC: Central Venous Catheter,
TT: Tracheal Tube,
CT: Chest Tube,
UVC: Umbilical Vascular Catheter,
UC: Urinary Catheter, NG: No Growth

*: نمونه فقط بر روی محیط سابورو د کستروز آگار (SDA) رشد کرده بود و در محیط کرمه آگار رشد نداشت. تعیین هویت مولکولی با استفاده از کلنی برداشت شده از محیط SDA صورت گرفت.

** ایزوله هایی که جهت تأیید نتایج تست های تعیین هویت مولکولی انجام شده سکانس شدند؛ نتایج تعیین توالی مشابه با نتایج حاصل از روش های مولکولار مشخص شد.



نمودار شماره 1: فراوانی گونه های جدا شده از بخش های مختلف کاترها

کاندیدا تروپیکالیس (6/52 درصد)، در نهایت کاندیدا لوزیتانیا و کاندیدا کفیر با کمترین میزان و درصد مشابه یکدیگر (2/17 درصد). اگرچه در مطالعه ای که Bendjelloul در سال 2016 انجام داد (40)، درصد گونه های مخمری جدا شده از کاترهای ورید محیطی دارای اختلافاتی با مطالعه حاضر بود و بر اساس نتایج، کاندیدا پاراپسیلوزیس با بالاترین فراوانی (64 درصد) در صدر عوامل گزارش شده بود و پس از آن به ترتیب کاندیدا آلیکنس (12 درصد)، کاندید کروزه ای و کاندیدا گلابراتا (8 درصد)، کاندیدا فاماتا و کاندیدا لوزیتانیا (4 درصد) گزارش شدند. این یافته ها در مجموع نشانگر این موضوع می باشد که درصد گونه های غیر آلیکنس مخصوصاً کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا کروزه ای قابل توجه بوده و همان گونه که مطالعات متعدد در گذشته نیز عنوان نموده اند میزان گونه های غیر آلیکنس رو به فزونی می باشند (41-44، 38). در یک مطالعه مروری، کاندیدا پاراپسیلوزیس به عنوان یک پاتوژن قارچی نوظهور که بعد از کاندیدا آلیکنس به عنوان یک تهدید جدی برای آینده محسوب می شود و متأسفانه بروز عفونت های ناشی از آن به دلایلی از قبیل: میل ترکیبی بالا این پاتوژن با محلول های تغذیه مصنوعی، کلونیزاسیون بر روی دست های کارمندان سیستم مراقبت سلامتی در بیش تر اوقات و توانایی تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح پروتزها و کاترهای

دارای بالاترین فراوانی (55/5 درصد) بود. کاندیدا گلابراتا از تمامی کاترها به جز کاتر دیالیز و کاتر نافی جدا شد؛ لوله تراشه و کاتر ورید مرکزی با فراوانی مشابه یکدیگر، بالاترین مقدار را به خود اختصاص دادند (33/3 درصد). کاتر ورید مرکزی، به عنوان تنها منبع کاندیدا پاراپسیلوزیس مشخص شد. گونه های کاندیدا کروزه ای، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا لوزیتانیا فقط از کاتر ادراری جدا شدند. لوله تراشه، به عنوان تنها منبع جداسازی کاندیدا کفیر شناسایی گردید. نتایج کاترهای دیالیز و نافی منفی گزارش شد. کودکانی که نیازمند استفاده طولانی مدت از کاترهای عروق مرکزی می باشند در معرض ریسک ابتلا به عفونت های جریان خون مرتبط با سنترال لاین ها بوده که در افزایش میزان مرگ و میر و طولانی شدن مدت بستری شدن نقش دارند (35، 36).

در مطالعه حاضر بیش ترین گونه شناسایی شده کاندیدا آلیکنس است که هم راستا با بسیاری از مطالعات مختلف بود، که عنوان نموده اند کاندیدا آلیکنس به عنوان بیش ترین گونه در عفونت های قارچی مرتبط با کاتر بوده است (21، 22، 39-37). سایر گونه های کاندیدا غیر آلیکنس که در مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی شدند به ترتیب فراوانی عبارتند از: کاندیدا گلابراتا (19/56 درصد)، کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا کروزه ای با درصد مشابه یکدیگر (15/21 درصد)،

عنوان به وسیله مکانیکی ناقل برای انتقال مخمرهای فلور پوست بیمار به داخل خون شوند.

از محدودیت‌های این طرح می‌توان به تعداد کم کاتترهای جمع‌آوری شده اشاره کرد که از دلایل آن می‌توان به مشکلات پذیرش و ترخیص در بیمارستان و همین‌طور اجرای طرح فقط در بیمارستان کودکان دکتر شیخ در مشهد و تنها بخش‌های مراقبت ویژه کودکان آن اشاره نمود. با توجه به اهمیت آلودگی کاتترها به مخمرهای کاندیدا و احتمال بالقوه ایجاد کاندیدی و کاندیدیازیس سیستمیک از طریق آگوزون، توجه به تعویض به موقع کاتترها، آلوده نبودن خود کاتترها به هنگام اتصال، بهداشت فردی پرسنل و پرستاران اهمیت ویژه‌ای پیدا می‌کند. لذا پیشنهاد می‌گردد در صورت طراحی مطالعات مشابه در آینده، نمونه‌گیری از بیمارستان‌های مختلف و حتی از شهرهای مختلف مد نظر قرار گیرد، به این ترتیب یک مطالعه مولتی سنترال صورت خواهد گرفت که نتایج آماری گسترده‌تر و قابل استنادتری را جهت مطالعات و تصمیم‌گیری‌های آتی فراهم خواهد نمود. همچنین پیشنهاد می‌شود جهت ایزوله‌های جدا شده، تست حساسیت دارویی انجام گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله مراتب قدردانی از دانشگاه علوم پزشکی مازندران به جهت حمایت مالی طرح (گرنه شماره 1233) و پرسنل بیمارستان دکتر شیخ مشهد جهت همکاری در نمونه‌گیری از بیماران اعلام می‌گردد.

References

1. Edwards Jr JE, Bodey GP, Bowden RA, Büchner T, de Pauw BE, Filler SG, et al. International conference for the development of a consensus on the management and prevention of severe candidal infections. Clin Infect Dis 1997; 25(1): 43-59.
2. Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Bennett J, Kullberg B-J. Deeply invasive candidiasis. Infect Dis Clin North Am 2002;16(4):821-835.
3. Rentz AM, Halpern MT, Bowden R. The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. Clin Infect Dis 1998; 27(4): 781-788.

عروق مرکزی رو به افزایش است، معرفی گردید(41)؛ در مطالعه حاضر نیز، کاندیدا پاراپسیلوزیس با 21/15 درصد در سومین جایگاه از لحاظ فراوانی گونه‌های شناسایی شده قرار گرفته است که نسبت قابل توجهی می‌باشد. همچنین در مطالعه‌ای دیگر بر روی کاندیدا پاراپسیلوزیس در نوزادان، این گونه به‌عنوان یک پاتوژن قابل توجه در موارد کاندیدیازیس نوزادان ظهور نموده و حتی در بعضی از مراکز به عنوان عامل مسبب بیماری مهاجم از کاندیدا آلیکنس پیشی گرفته و رتبه نخست را به‌دست آورده است(45)؛ در مطالعه ما، از میان نمونه‌های کاتترهای گرفته شده از نوزادان، 3 کاتتر گونه‌هایی از کاندیدا را داشتند که از مجموع 12 نمونه‌ای که از بخش‌های مختلف این 3 کاتتر به‌دست آمد درصد گونه‌های کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا آلیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا کروزه‌ای به ترتیب عبارت بودند از: 42، 8، 8 و 8 درصد که این نتایج هم راستا با نتایج مطالعه مذکور می‌باشند.

در مطالعه حاضر، بیش‌ترین موارد کشت مثبت از کاتترهای عروق مرکزی (CVCs) بوده که این نتیجه هم‌راستا با مطالعه آهنگرکانی و همکاران در سال 2020 می‌باشد(46). لازم به ذکر است مدت زمان باقی ماندن کاتترهای عروق مرکزی در عروق بسیار بیش‌تر از انواع کاتترهای دیگر در افراد بستری در بخش مراقبت ویژه می‌باشد که شاید یکی از دلایل فراوانی بالای آلودگی این کاتترها در میان انواع کاتترها است. به علاوه، این نوع کاتترها به دلیل تماس مستقیم با پوست می‌توانند به

4. Miller LG, Hajjeh RA, Edwards Jr JE. Estimating the cost of nosocomial candidemia in the United States. *Clin Infect Dis* 2001; 32(7): 1110.
5. Diekema D, Messer S, Brueggemann A, Coffman S, Doern G, Herwaldt L, et al. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol* 2002; 40(4): 1298-1302.
6. Leleu G, Aegerter P, Guidet B. Systemic candidiasis in intensive care units: a multicenter, matched-cohort study. *J Crit Care* 2002; 17(3): 168-175.
7. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Berg JV, Hu J, Messer S, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 2003; 37(9): 1172-1177.
8. Diba K. Essential medical mycology, 1th ed. Tehran: Shahed; 2011 (Persian).
9. Ha JF, Italiano CM, Heath CH, Shih S, Rea S, Wood FM. Candidemia and invasive candidiasis: a review of the literature for the burns surgeon. *Burns* 2011; 37(2): 181-195.
10. Warris A, Pana Z-D, Oletto A, Lundin R, Castagnola E, Lehrnbecher T, et al. Etiology and outcome of candidemia in neonates and children in Europe: an 11-year multinational retrospective study. *Pediatr Infect Dis J* 2020; 39(2): 114-120.
11. Goemaere B, Becker P, Van Wijngaerden E, Maertens J, Spriet I, Hendrickx M, et al. Increasing candidaemia incidence from 2004 to 2015 with a shift in epidemiology in patients preexposed to antifungals. *Mycoses* 2018; 61(2): 127-133.
12. Bergamasco M, Garnica M, Colombo A, Nucci M. Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in Brazil. *Mycoses* 2013; 56(3): 256-263.
13. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68(3): 278-283.
14. Kenters N, Kiernan M, Chowdhary A, Denning DW, Pemán J, Saris K, et al. Control of *Candida auris* in healthcare institutions: Outcome of an International Society for Antimicrobial Chemotherapy expert meeting. *Int J Antimicrob Agents* 2019; 54(4): 400-406.
15. Patterson L, McMullan R, Harrison DA. Individual risk factors and critical care unit effects on Invasive *Candida* Infection occurring in critical care units in the UK: A multilevel model. *Mycoses* 2019; 62(9): 790-795.
16. Brissaud O, Guichoux J, Harambat J, Tandonnet O, Zaoutis T. Invasive fungal disease in PICU: epidemiology and risk factors. *Ann Intensive Care* 2012; 2(1): 1-8.
17. Rex J, Bennett J, Sugar A, Pappas P, van der Horst C, Edwards J, et al. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. *N Engl J Med* 1994; 331(20): 1325-1330.
18. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP, System NNIS. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21(8): 510-515.
19. Hale KA, Shaw PJ, Dalla Pozza L, MacIntyre CR, Isaacs D, Sorrell TC. Epidemiology of paediatric invasive fungal infections and a

- case control study of risk factors in acute leukaemia or post stem cell transplant. *Br J Haematol* 2010; 149(2): 263-272.
20. Wattier RL, Dvorak CC, Hoffman JA, Brozovich AA, Bin-Hussain I, Groll AH, et al. A prospective, international cohort study of invasive mold infections in children. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2014; 4(4): 313-322.
 21. Phan QT, Myers CL, Fu Y, Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, et al. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol* 2007; 5(3): e64.
 22. Boucherit-Atmani Z, Seddiki S, Boucherit K, Sari-Belkharoubi L, Kunkel D. *Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B. *J Mycol Med* 2011; 21(3): 182-187.
 23. Gowardman JR, Jeffries P, Lassig-Smith M, Stuart J, Jarrett P, Deans R, et al. A comparative 7 Care Med 2013; 39(1): 109-116.
 24. Brun-Buisson C, Abrouk F, Legrand P, Huet Y, Larabi S, Rapin M. Diagnosis of central venous catheter-related sepsis: critical level of quantitative tip cultures. *Arch Intern Med* 1987; 147(5): 873-877.
 25. Carriere C, Marchandin H. Infection linked to central venous catheters: diagnosis and definitions. *Nephrologie* 2001; 22(8): 433-437.
 26. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 1995; 141(7): 1507-1521.
 27. Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. Direct isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *J Clin Microbiol* 2003; 41(6): 2629-2632.
 28. Yamada Y, Makimura K, Merhendi H, Ueda K, Nishiyama Y, Yamaguchi H, et al. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. *Jpn J Infect Dis* 2002; 55(4): 122-125.
 29. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR-protocols and applications. Cambridge, Academic Press, Inc; 1990. p.315-322.
 30. Mirhendi H, Makimura K, Khoramzadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2006; 47(3): 225-229.
 31. Mirhendi H, Bruun B, Schønheyder 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(4): 414-420.
 32. Mohammadi R, Mirhendi H, Rezaei-Matehkolaei A, Ghahri M, Shidfar MR, Jalalizand N, et al. Molecular identification and distribution profile of *Candida* species isolated from Iranian patients. *Med Mycol* 2013; 51(6): 657-663.
 33. Romeo O, Criseo G. First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using *hwp1* gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 62(2): 230-233.
 34. Arastehfar A, Fang W, Pan W, Liao W, Yan L, Boekhout T. Identification of nine cryptic species of *Candida albicans*, *C. glabrata*, and

- C. parapsilosis complexes using one-step multiplex PCR. *BMC Infectious Diseases* 2018; 18(1): 480.
35. Biwersi C, Hepping N, Bode U, Fleischhack G, von Renesse A, Exner M, et al. Bloodstream infections in a German paediatric oncology unit: prolongation of inpatient treatment and additional costs. *Int J Hyg Environ Health* 2009; 212(5): 541-546.
 36. Huerta LE, Nelson GE, Stewart TG, Rice TW. Factors associated with recurrence and mortality in central line-associated bloodstream infections: a retrospective cohort study. *Crit Care* 2018; 22(1): 1-8.
 37. Beck-Sagué CM, Jarvis WR, System NNIS. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J Infect Dis* 1993; 167: 1247-1251.
 38. Dekeyser S, Desmettre T, Scala L, Dufosse M-C, Belletante D. Candidémie a candida utilis chez un patient de réanimation, résistant au traitement par fluconazole. *Med Mal Infect* 2003; 33(4): 221-223.
 39. Pereira Gonzales F, Maisch T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal Biol* 2012; 116(1): 1-10.
 40. Bendjelloul M, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K. Study of strains of *Candida* spp. Isolated from catheters in UHC of Oran (Algeria): Identification and antifungal susceptibility. *J Mycol Med* 2016; 26(3): 212-216.
 41. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(4): 606-625.
 42. Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* 2011; 11(2): 142-151.
 43. Taieb F, Méchaï F, Lefort A, Lanternier F, Bougnoux M-E, Lortholary O. Prise en charge des infections systémiques à *Candida* spp. *Rev Med Interne* 2011; 32(3): 173-180.
 44. Seddiki S, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, Kunkel D. Fungal infectivities of implanted catheters due to *Candida* sp. Biofilms formation and resistance. *J Mycol Med* 2015; 25(2): 130-135.
 45. Pammi M, Holland L, Butler G, Gacsér A, Bliss JM. *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J* 2013; 32(5): e206-e216.
 46. Ahangarkani F, Shokohi T, Rezai MS, Ilkit M, Mahmoodi Nesheli H, Karami H, et al. Epidemiological features of nosocomial candidaemia in neonates, infants and children: a multicentre study in Iran. *Mycoses* 2020; 63(4): 382-394.