ORIGINAL ARTICLE

Identification of Different Species of Candida in Diabetic Patients using PCR-RFLP

Fatemeh Zakavi[1],
Tahereh Shokohi[2],
Ramin Mofarrah[3],
Mojtaba Taghizadeh[1],
Mohammad Taghi Hedayati[2]

[1] MSc Student in Medical Mycology, Student Research Committee, Invasive Fungi Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Professor, Department of Medical Mycology, Invasive Fungi Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Islamic Azad University, Sari Branch, Sari, Iran

(Received May 30, 2015 ; Accepted August 5, 2015)

Abstract

Background and purpose: Diabetes affects the function of many organs in the body. It predisposes an environment for colonization of different microorganisms including *Candida* species which are normal floral of the skin, vagina and digestive system and increases their susceptibility to fungal infections. This study aimed at isolating different species of *candida* in diabetic patients attending Valiasr Hospital in Qaemshahr, Iran.

Materials and methods: In this cross sectional study, during one year, sampling was performed in the skin, mouth and vagina in 300 diabetic patients. Based on the measurement of HbA1c (Glycated heamoglobin) the participants were divided into two groups; controlled (HbA1c <7) and uncontrolled (HbA1c >7) diabetes mellitus. The identification of *Candida* isolates was done by direct microscopy and culture on chrome agar and confirmed by PCR-RLF method.

Results: A total of 111 (37%) cases were positive for *candida* species and *C. albicans* was the most common isolated species (104 cases, 93.7 %). HbA1c level was lower than 7 in 52 (17.3%) patients and in 248 (82.7%) patients it was higher than 7. The majority of *Candida* species (88.3%) were isolated from patients whose HbA1c level was higher than 7.

Conclusion: The results showed that diabetes is a favorable condition for growth of *Candida albicans* and none *albicans* species. Patients with uncontrolled diabetes are more susceptible to *Candida* colonization.

Keywords: *Candida*, diabetes, PCR-RLFP

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(128): 1-9 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۸ شهریور سال ۱۳۹۴ (۹-۱)

شناسایی گونه های کاندیدا از افراد دیابتی با استفاده از روش PCR-RFLP

فاطمه ذکوی[۱]
طاهره شکوهی[۲]
رامین مفرح[۳]
مجتبی تقی زاده[۱]
محمدتقی هدایتی[۲]

چکیده

سابقه و هدف: دیابت با تحت تاثیر قرار دادن عملکرد بسیاری از ارگان‌های بدن زمینه را برای کلونیزاسیون انواع اجرام میکروبی به ویژه گونه‌های کاندیدا به عنوان یکی از اعضای فلور نرمال بدن مهیا می‌کند که می‌تواند زمینه ساز عفونت‌های کاندیدایی باشند. از این رو در بررسی حاضر شناسایی گونه‌های کاندیدا در افراد دیابتی مراجعه‌کننده به بیمارستان ولی عصر قائم شهر مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه مقطعی طی یک سال از ۳۰۰ فرد مبتلا به دیابت، از پوست دهان و واژن نمونه‌برداری انجام گرفت. HbA1c برای همه این افراد مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس آن افراد به دو دسته دیابت کنترل شده و کنترل نشده تقسیم شدند. شناسایی ایزوله‌های جدا شده از طریق آزمایشات میکروسکوپی مستقیم و کشت بر روی محیط کروم آگار انجام گرفت و گونه‌های کاندیدای جدا شده از طریق روش مولکولی PCR-RLFP تایید شدند.

یافته‌ها: از مجموع ۳۰۰ نمونه بررسی شده، ۱۱۱ (۳۷ درصد) مورد کاندیدا جدا گردید. کاندیدا آلبیکنس ۱۰۴ (۹۳/۷ درصد) مورد شایع‌ترین گونه جدا شده بود. میزان HbA1C ۵۲ نفر (۱۷/۳ درصد) پایین‌تر از ۷ و ۲۴۸ نفر (۸۲/۷ درصد) بالاتر از ۷ بود. ۸۸/۳ درصد گونه‌های کاندیدا از افراد با HbA1C بالاتر از ۷ جدا گردید.

استنتاج: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیماران دیابتی شرایط مساعد برای رشد و تکثیر گونه‌های کاندیدا آلبیکنس و غیرآلبیکنس را دارند. هم‌چنین افراد مبتلا به دیابت با قند کنترل نشده بیش تر در معرض کلونیزاسیون کاندیدایی قرار دارند.

واژه های کلیدی: کاندیدا، دیابت ، PCR-RLFP

مقدمه

دیابت ملیتوس یک بیماری مزمن متابولیک است که بسیاری از ارگان‌های بدن را تحت تاثیر قرار می‌دهد. باتوجه به تغییرات به‌وجود آمده در روش زندگی افراد در سطح جهانی به نظر می‌رسد در عصر حاضر بیماری‌هایی نظیر دیابت از اهمیت ویژه‌ای در سیستم‌های بهداشتی برخوردار باشند. بر اساس گزارشات موجود انتظار می‌رود جمعیت دیابتی‌ها از ۱۷۱ میلیون در سال ۲۰۰۰ به ۳۶۶ میلیون تا سال ۲۰۳۰ برسد(۱). با توجه به تغییراتی که در ساختمان و عملکرد ارگان‌ها و بافت‌های مختلف بدن طی این بیماری ایجاد می‌شود، زمینه برای کلونیزاسیون

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۱۰۴۹ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مولف مسئول: محمدتقی هدایتی- ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی E-mail: hedayatimt@gmail.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی، کمیته تحقیقات دانشنجویی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشکده پزشک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استادیار، گروه پوست، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۳/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۳/۹ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۵/۱۴

اجرام مختلف به شکل مناسبی مهیا می‌شود. بیماران با دیابت ملیتوس به علت نقص در عملکرد بزاق دهان، کاهش PH بزاق و بالا بودن میزان قند در بزاق دهان در معرض افزایش رشد کاندیدا در حفره دهانی هستند که این موضوع زمینه را برای رشد قارچ و ابتلای به عفونت‌های کاندیدایی فراهم می‌نماید. گونه‌های کاندیدا به عنوان یکی از اعضای مهم میکروفلور نرمال در پوست، دستگاه گوارش و واژن اکثر افراد می‌تواند در این بیماران با توجه با نقص سیستم ایمنی زمینه ساز عفونت‌های جدی باشند. عفونت‌های قارچی به شکل متنوعی باعث آزار بیماران مبتلا به دیابت می‌شوند. عفونت بافت مخاطی دهان ناشی از گونه‌های مختلف کاندیدا به خصوص کاندیدا آلبیکنس از جمله شایع‌ترین عفونت‌ها در افراد مبتلا به دیابت می‌باشد. مطالعات نشان داده است این بیماران در مقایسه با افراد سالم بیش تر به عفونت‌های پوست و بافت نرم، انیکومایکوزیس و واژینیت کاندیدایی مبتلا می‌شوند(۴-۲). با توجه به اهمیت کلونیزاسیون گونه‌های مختلف کاندیدا در بیماران دیابتیک این موضوع در مطالعات متعددی مورد توجه بوده است. نتایج این مطالعات نشان داده است که میزان شیوع گونه‌های مختلف در این بیماران در مناطق و کشورهای مختلف متفاوت می‌باشد(۷-۵).

علی‌رغم شیوع بالای گونه آلبیکنس در این بیماران مطالعات نشان می‌دهد در سالیان اخیر با تغییراتی در میزان شیوع گونه های مختلف و به ویژه انسیدانس بالای گونه‌های غیرآلبیکنس مواجه باشیم. با در نظر گرفتن این موضوع که گونه‌های مختلف کاندیدا به خصوص گونه‌های غیرآلبیکنس سطح حساسیت متفاوتی در مواجهه با ترکیبات ضد قارچی مهم مانند آزول‌ها، پلی‌ان‌ها و اکینوکاندین‌ها نشان می‌دهند، لزوم بررسی دقیق‌تر در زمینه کلونیزاسیون گونه‌های مختلف کاندیدا در نقاط در معرض بیماری نظیر پوست، دهان و واژن در بیماران مستعد ابتلا به این دسته از قارچ‌ها بیش‌تر از پیش احساس می‌شود. از طرفی با توجه به واقعیت‌های اشاره شده و هم‌چنین عدم وجود مطالعه مشخصی در زمینه بیماری‌های قارچی با تمرکز ویژه بر بیماران مبتلا به دیابت در استان مازندران با اقلیم مناسب برای رشد انواع قارچ‌ها مطالعه حاضر با هدف آگاهی از فراوانی نسبی انواع گونه‌های کاندیدا در افراد با دیابت طراحی شده است.

مواد و روش ها

بیماران

در این مطالعه مقطعی طی یک سال از اسفند ۱۳۹۲ تا اسفند ۱۳۹۳، تعداد ۳۰۰ بیمار دیابتی مراجعه‌کننده به کلنیک دیابت مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس سنجش HbA1c (glycated haemoglobin) به دو دسته بیماران با دیابت کنترل شده و دیابت کنترل نشده تقسیم شدند. افراد با HbA1c بیش‌تر از ۷ به عنوان بیماران با قند کنترل نشده و HbA1c کم‌تر از ۷ بیماران با قند کنترل شده در نظر گرفته شدند. افراد دارای بیماری قارچی و یا در حال درمان با داروهای ضد قارچی از مطالعه خارج شدند. آزمایش HbA1c به روش آنزیماتیک با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر (هیتاچی ۷۱۷ ساخت ژاپن) انجام شد. کیت مورد نظر نیز از شرکت پیشتاز طب ایران تهیه شد.

نمونه برداری

نمونه‌گیری از زیربغل، واژن، سطوح صاف بدن (قسمت پشت) و سطح مخاطی حفره دهان که مناطق شایع حضور انواع کاندیدا در انسان می‌باشند، انجام گردید. نمونه‌برداری به وسیله سوآپ استریل مرطوب شده با فسفات بافر سالین Phosphate buffered saline (PBS) از سطح پوست با شعاع ۱۰ سانتی‌متر انجام شد. نمونه‌های برداشت شده در داخل لوله حاوی دو میلی‌لیتر PBS استریل قرار داده شد. بلافاصله پس از نمونه‌گیری لوله‌های حاوی PBS بعد از تکان دادن سوآپ داخل آن و خارج کردن سواپ سانتریفوژ (دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) گردید. پس از پس از خارج کردن مایع رویی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه رسوب یافته بر روی محیط

سابورودکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (۵۰ میکروگرم در ۱ لیتر) (SC) ریخته و با چرخش دورانی پلیت نمونه در سطح آن پخش گردید. تمامی پلیت‌ها در انکوباتور ۳۰ درجه قرار داده شد. محیط‌ها روزانه از نظر رشد قارچی مورد بازبینی قرار گرفتند. در صورت مشاهده رشد، کلنی‌های مخمری مجدداً بر روی محیط SC پاساژ داده شدند.

تشخیص گونه‌های کاندیدا

نمونه‌ها جهت شناسایی اولیه به محیط کروم آگار (CHROMagar Company, France) منتقل شدند، که بر اساس مورفولوژی و با استفاده از شکل ظاهری و رنگ کلنی تشخیص ابتدایی انجام گردید. تشخیص نهایی گونه‌های کاندیدا با روش مولکولی PCR-RFLP انجام شد که با روش ارائه شده به وسیله میرهندی و همکاران(۹،۸) با اصلاحاتی انجام گردید. از دو گونه کاندیدا آلبیکانس (CBS 562) و کاندیدا دابلینینسیس (CBS 7987) به عنوان سوش‌های استاندارد در روش مولکولی استفاده گردید.

استخراج DNA

همه نمونه‌ها به روش Glass bead و فنل کلروم استخراج شدند. در این مرحله جهت استخراج DNA یک لوپ باکتریولوژی حدود ۱۰ میلی‌متر مکعب از کلنی تازه برداشت و به تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری اپندورف منتقل و ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز مخمر (شامل ۱۰۰ میلی‌مولار تریس EDTA؛pH=۱۰/۸ و ۱۰۰میلی لیتر نمک طعام (NaCl) و ۱درصد SDS و Triton X-100 2%) و ۳۰۰ میکرولیتر مخلوط فنل کلروفرم ۱:۱ و حدود ۲۰۰ میلی‌گرم پرل شیشه‌ایی به قطر ۱ میلی‌متر اضافه گردید و مدت ۱۰ دقیقه ورتکس شد؛ آن گاه به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ انجام گردید که ۳ لایه در میکروتیوب تشکیل شد: لایه رویی که مایع شفاف و بی‌رنگ بوده و حاوی اسید نوکلئیک می‌باشد، را به تیوب جدید منتقل کرده و سپس مقدار حجم آن ایزوپروپانل سرد و ۱ درصد حجم استات سدیم ۳ مولار pH= ۸ اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه نگهداری در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد، به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ دوباره سانتریفوژ و بعد از مشاهده رسوب DNA در ته اپندورف مایع رویی را دور ریخته و نهایتا در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید و تا موقع استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تمام مراحل، زیر هود و به صورت کامل استریل انجام گرفت.

PCR

آزمایش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. در ابتدا پرمیکس PCR را شامل ۵/۲ میکرولیتر بافر ۱۰ X بدون منیزیوم، ۵/۱ میکرومول $MgCl_2$، پرایمرهای رفت (ITS1, 5, -TCC GTA GAA CCT GCG G-3,) (۲/۰ میکرومولار) و برگشت (ITS4, 5, - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3,) (۲/۰ میکرومولار)، ۴۰۰میکرومولار مخلوط دزوکسی نوکلوزید تری فسفات (dNTP) و ۲۵/۱ واحد آنزیم Tag DNA polymerase در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. آنگاه به هر میکروتیوب۲۳ میکرولیتر از پرمیکس مذکور و ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده از هر مخمر به آن اضافه گردید؛ پس از سانتریفوژ کوتاه با دور ۱۲۰۰۰، آن‌گاه تیوب‌ها در دستگاه thermal cycler (Techne-TC-312) قرار داده شد و مراحل PCR شامل ۵ دقیقه حرارت در ۹۵ درجه برای جدا شدن دو رشته DNA (دناتوراسیون اولیه)، ۳۰ سیکل شامل ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه و ۵۵ درجه سانتی‌گراد (Annealing)، ۱ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد (Extension)، و در نهایت ۷ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد (Final extension) برنامه‌ریزی انجام شد. هر کدام از محصولات PCR روی آگارز الکتروفورز شد. اندازه ITS1 ITS4 برای کاندیدا آلبیکانس ۵۳۵، کاندیدا گلابراتا، ۸۷۱ کاندیدا تروبیکالیس ۵۲۴، کاندیدا کروزه‌ایی ۵۱۰ و کاندیدا پاراپسیلوزیس ۵۲۰ بود.

RFLP

۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR ناحیه ژنی ITS rDNA را با ۲ میکرولیتر بافر و ۱ میکرولیتر آنزیم محدودالاثر *MSP1* و *Bln1* و ۱۷ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده به خوبی مخلوط کرده و به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

الکتروفورز

۵ میکرولیتر از محصولات PCR و RFLP به مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز شد. برای محصولات PCR از آگارز ۱/۵ درصد و برای محصولات RFLP از آگارز ۲ درصد استفاده شد. یکی از چاهک‌های ژل به مارکر اختصاص داده شد. سپس ژل‌ها در تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE شامل ۹۰ میکرولیتر EDTA قرار داده شد.

یافته ها

از ۳۰۰ بیمار مبتلا به دیابت مورد مطالعه، ۲۲۴ نفر (۷۴/۷ درصد) زن و ۷۶ نفر (۲۵/۳ درصد) مرد بودند و بیش‌ترین رنج سنی افراد ۶۰-۵۱ سال بود (جدول شماره۱).

جدول شماره ۱: فراوانی بیماران تحت مطالعه بر اساس سن و جنس

جنس / سن	زن تعداد(درصد)	مرد تعداد(درصد)
≥۴۰	(۶/۳)۱۴	(۶/۶) ۵
۴۱-۵۰	(۲۳/۲)۵۲	(۲۷/۶)۲۱
۵۱-۶۰	(۴۱/۵)۹۳	(۱۷/۱)۱۳
۶۱-۷۰	(۲۲/۳)۵۰	(۳۰/۳)۲۳
≤۷۱	(۶/۷)۱۵	(۱۸/۴)۱۴
جمع کل	(۷۴/۷)۲۲۴	(۲۵/۳)۷۶

جدول شماره ۲ میزان فراوانی انواع کاندیدای جدا شده از بیماران مورد بررسی بر اساس متغیرهای مختلف را نشان می‌دهد. از مجموع ۳۰۰ بیمار مورد مطالعه، ۱۱۱ (۳۷ درصد) مورد بر اساس آزمایشات مستقیم و کشت انواع کاندیدا مورد شناسایی قرار گرفت؛ که با روش مولکولی RLFP-PCR تعیین گونه شدند. از ۱۱۱ مورد کاندیدای جدا شده، ۱۰۴ مورد (۹۳/۷ درصد) کاندیدا آلبیکنس، ۲ مورد (۱/۸ درصد) کاندیدا گلابراتا، ۳ مورد (۲/۷ درصد) کاندیدا پاراپسیلوزیس و ۲ مورد (۱/۸ درصد) کاندیدا تروپیکالیس بودند. بیش‌ترین ایزوله از مخاط دهان جدا شد (۱۰۴ مورد). کاندیدا آلبیکنس بیش‌ترین گونه‌ی جدا شده بود. بیش‌ترین درصد جداسازی کاندیدا در زنان در سن ۶۰-۵۱ سالگی و در مردان در سن ۷۰-۶۱ سالگی مشاهده شد. در این مطالعه بیماران از نظر کنترل قند خون در سه ماهه گذشته مورد بررسی قرار گرفتند. میزان HbA1C در ۵۲ نفر (۱۷/۳ درصد) پایین‌تر از ۷ و در ۲۴۸ نفر (۸۲/۷ درصد) HbA1C بالاتر از ۷ بود. ۸۸/۳ درصد گونه‌های کاندیدا از افراد با HbA1C بالاتر از ۷ جدا گردید. گونه‌های غیرآلبیکنس تنها در افراد با HbA1C بالاتر از ۷ جدا گردید.

جدول شماره ۳ توزیع فراوانی نوع داروی مصرفی ضد دیابت در میان بیماران مورد مطالعه را نشان می‌دهد. از ۳۰۰ بیمار، تعداد ۲۶۰ نفر (۸۶/۷ درصد) از قرص گلی بنکلامید یا متفورمین استفاده می‌کردند؛ که از این تعداد ۸۹ نفر (۳۴/۲ درصد) از نظر رشد کلنی مخمری و سپس تایید گونه کاندیدا با روش مولکولی به عنوان کشت مثبت محسوب شدند. از ۳۱ نفری که مصرف‌کننده انسولین بودند، ۱۸ نفر (۵۸ درصد) کشت مثبت داشتند.

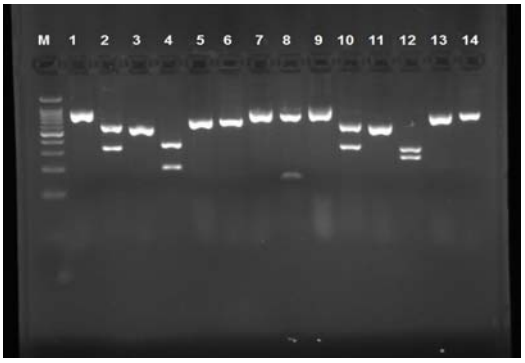
جدول شماره ۲: فراوانی گونه کاندیدای جدا شده بر اساس HbA1C، محل ضایعه، جنس و سن افراد مورد مطالعه

گونه کاندیدا	HbA1C		محل ضایعه				جنس		سن			
	≤۷ تعداد(درصد)	≥۷ تعداد(درصد)	مخاط تعداد(درصد)	چین تعداد(درصد)	صاف تعداد(درصد)	واژن تعداد(درصد)	زن تعداد(درصد)	مرد تعداد(درصد)	≤۴۰ تعداد(درصد)	۴۱-۵۰ تعداد(درصد)	۵۱-۶۰ تعداد(درصد)	۶۱-۷۰ تعداد(درصد)	≥۷۱ تعداد(درصد)
آلبیکنس	(۱۲/۵)۱۳	(۸۷/۵)۹۱	(۹۶/۲)۱۰۰	(۱/۹)۲	(۱)۱	(۱)۱	(۷۵)۷۸	(۲۵)۲۶	(۳/۸)۴	(۱۷/۳)۱۸	(۳۶/۵)۳۸	(۲۵)۲۶	(۱۷/۳)۱۸
گلابراتا	(۰)۰	(۱۰۰)۲	(۵۰)۱	(۰)۰	(۰)۰	(۵۰)۱	(۱۰۰)۲	(۰)۰	(۰)۰	(۰)۰	(۱۰۰)۲	(۰)۰	(۰)۰
پاراپسیلوزیس	(۰)۰	(۱۰۰)۳	(۶۶/۷)۲	(۰)۰	(۳۳/۳)۱	(۰)۰	(۱۰۰)۳	(۰)۰	(۰)۰	(۳۳/۳)۱	(۶۶/۷)۲	(۰)۰	(۰)۰
تروپیکالیس	(۰)۰	(۱۰۰)۲	(۵۰)۱	(۰)۰	(۵۰)۱	(۰)۰	(۱۰۰)۲	(۰)۰	(۵۰)۱	(۰)۰	(۵۰)۱	(۰)۰	(۰)۰

جدول شماره ۳: فراوانی نوع داروی مصرفی ضد دیابت در میان بیماران مورد مطالعه

نوع داروی مصرفی	فراوانی مصرف دارو تعداد(درصد)	کشت مثبت تعداد(درصد)	کشت منفی تعداد(درصد)
قرص	(۸۶/۷)۲۶۰	(۳۴/۲)۸۹	(۶۵/۸)۱۷۱
انسولین	(۱۰/۳)۳۱	(۵۸)۱۸	(۴۲)۱۳
انسولین و قرص	(۳)۹	(۴۴/۴)۴	(۵۵/۶)۵
مجموع	۳۰۰	۱۱۱	۱۸۹

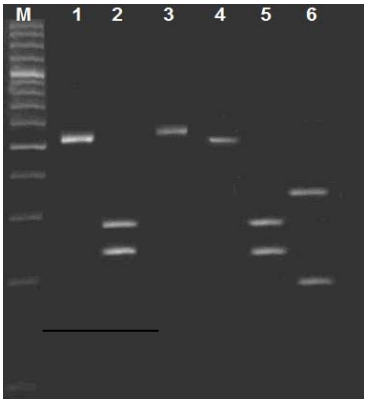
برای تایید تشخیص گونه‌ها از روش مولکولی PCR_RLFP استفاده شد. در مرحله اول انجامRLFP از آنزیم محدودالاثر *Msp1* جهت شناسایی چهار گونه استفاده شد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: الگوی باندی محصولات PCR و هضم استرین های استاندارد کاندیدا با آنزیم *Msp1*

۱- محصول PCR کاندیدا گلابراتا، ۲) هضم محصول PCR گلابراتا با *Msp1*، ۳) محصول PCR کاندیدا ترویپیکالیس، ۴) هضم محصول PCR ترویپیکالیس با *Msp1*، ۵) محصول PCR کاندیدا پاراپسیلوزیس، ۶) هضم محصول PCR پاراپسیلوزیس با *Msp1*، ۷) محصول PCR کاندیدا پاراپسیلوزیس، ۸) هضم محصول PCR پاراپسیلوزیس با *Msp1*، ۹) محصول PCR کاندیدا گلابراتا، ۱۰) هضم محصول PCR گلابراتا با *Msp1*، ۱۱) محصول PCR کاندیدا آلبیکنس، ۱۲) هضم محصول PCR آلبیکنس با *Msp1*، ۱۳) محصول PCR کاندیدا پاراپسیلوزیس، ۱۴) هضم محصول PCR پاراپسیلوزیس با *Msp1* و مارکر ۱۰۰ جفت بازی (bp). به ترتیب شماره ۱، ۲ نمونه بیمار ۲۸۴ ؛۳، ۴ نمونه ۲۶۱؛ ۵، ۶ نمونه ۱۴۹؛ ۷، ۸ نمونه ۹۷؛ ۹، ۱۰ نمونه ۲۳۵؛ ۱۱، ۱۲ نمونه ۲۸۰؛ ۱۳، ۱۴ نمونه ۲۳۲ جدایه‌های ما بود.

پس از هضم ناحیه ITS در گونه‌های کاندیدا توسط آنزیم *Msp1* در کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس هر کدام دو باند تشکیل شد. برای جداسازی آلبیکنس از دابلینینسیس از آنزیم *Bln1* استفاده شد که برای آلبیکنس یک باند و برای دابلینینسیس دو باند تشکیل شد (تصویر شماره ۲). در مطالعه حاضر با توجه به انجام این روش گونه دابلینینسیس مشاهده نگردید.



تصویر شماره ۲- پروفایل PCR-RFLP

۱) محصول PCR کاندیدا آلبیکنس، ۲) هضم محصول PCR آلبیکنس با *Msp1*، ۳) هضم محصول PCR آلبیکنس با Bln1، ۴) محصول PCR کاندیدا دابلینسیس، ۵) هضم محصول PCR دابلینینسیس با Msp1، ۶) هضم محصول PCR دابلینینسیس با *Bln1* و مارکر ۱۰۰ جفت بازی (bp) به ترتیب شماره ۲،۱،۳ نمونه بیمار شماره ۲ : آلبیکنس و ۴،۵،۶ استاندارد دابلینینسیس

بحث

دیابت ملیتوس یک بیماری مزمن متابولیک است و تغییرات متابولیکی شامل افزایش گلوکز خون همراه با تغییرات متابولیسم لیپید و پروتئین است. کاندیدا آلبیکنس که به عنوان فلور نرمال در پوست، دستگاه گوارش و واژن می‌باشد، در این بیماران با نقص سیستم ایمنی زمینه برای ایجاد عفونت‌های کاندیدایی مهیا می‌شود(۱۰).

در مطالعه حاضر از ۳۰۰ بیمار مورد بررسی بیش‌ترین ایزوله (۳۴/۷ درصد) از مخاطات دهانی و کم‌ترین ایزوله (۰/۷ درصد) از پوست ناحیه چین بدن جدا شده است. در بررسی انجام شده به وسیله de la Rosa-Garcia و همکاران(۱۲) در مکزیک، اظهار داشتند در بیماران دیابتی به علت جریان کند بزاق در دهان و خشکی دهان و نیز آتروفی در مخاط دهان و

استفاده از پروتز دندانی، کاندیدیازیس دهانی پیشرفت می‌کند. آن‌ها پایین بودن میزان آلبومین خون در این بیماران را مزید بر علت دانستند که پیشرفت کلونیزاسیون و ایجاد عفونت را بیش‌تر می‌کند. از طرفی مطالعات نشان می‌دهد افراد دیابتی که قند خون آن‌ها کنترل نمی‌شود، زمینه ابتلا در آن‌ها بیش‌تر می‌شود(۷-۵). در واقع با کنترل قندخون یک مکانیزم دفاعی در بدن ایجاد و باعث مقاومت بیمار در مقابل عفونت و پاسخ به درمان می‌شود. به خصوص دهان این افراد مکان مناسبی برای کلونیزاسیون کاندیدا است و هیچ علائم کلنیکی نیز وجود ندارد. زیاد شدن میزان کاندیدا به علت چسبندگی قارچ به سلول‌های اپی‌تلیال دهانی است. Tapper-jones و همکاران(۱۱) نشان دادند که میزان چسبندگی کاندیدا آلبیکنس به سلول‌های اپی‌تلیال حفره دهانی افراد دیابتی بیش‌تر است.

در مطالعه حاضر شایع ترین گونه‌های کاندیدای جدا شده به ترتیب کاندیدا آلبیکنس (۹۳/۷ درصد)، ک. گلابراتا (۲/۷ درصد)، ک. پاراپسیلوزیس (۱/۸ درصد) و ک. تروپیکالیس (۱/۸ درصد) بودند. میرهندی و همکاران(۹) ۱۳۷ ایزوله کاندیدایی جدا شده از بیماران با سیستم ایمنی ضعیف بستری در بیمارستان را با روش مولکولی PCR-RLFP برای تشخیص شش گونه ی کاندیدایی مهم پزشکی انجام دادند. مزیت این روش را نسبت به سکانس DNA در ارزان‌تر بودن و سریع‌تر جواب گرفتن و راحت‌تر بودن انجام آن در آزمایشگاه‌ها دانستند. آن‌ها در این روش از آنزیم محدودالاثر *Msp1* جهت شناسایی شش گونه کاندیدایی استفاده کردند که کاندیدا آلبیکنس (۶۷/۹ درصد) و کاندیدا پاراپسیلوزیس (۸/۸ درصد)، گلابراتا (۶/۶ درصد)، گیلرموندی (۲/۹ درصد)، کروزه‌ای (۵/۱ درصد) و تروپیکالیس (۸/۸ درصد) به دست آوردند. همان‌گونه که مشخص می‌باشد، تفاوت‌هایی در ایزوله‌های جدا شده در دو مطالعه مشاهده می‌شود که می‌تواند ناشی از نوع بیماران مورد مطالعه باشد. در بررسی حاضر مشخص گردید که ۸۸/۳ درصد گونه‌های کاندیدا از افراد با HbA1C بالاتر از ۷ جدا گردید. گونه های غیرآلبیکنس تنها در افراد با HbA1C بالاتر از ۷ جدا گردید. در مطالعه مشابهی توسط Premkumar و همکاران(۴) در مرکز دیابت در سال ۲۰۱۴ با هدف بررسی کلونیزاسیون انجام شد، علت فراوانی کلونیزاسیون کاندیدا در دهان افراد دیابتی را HbA1c بالا دانستند. Bremenkamp و همکاران(۶) نیز به این نتیجه رسیدند که از دهان افراد دیابتی علاوه بر کاندیدا آلبیکنس که فلور نرمال بدن می‌باشد، گونه‌های کاندیدا غیرآلبیکنس نیز جدا می‌شود، زیرا بالا بودن قند، آن‌ها را مستعد گونه‌های دیگر کاندیدا می‌کند. هم‌چنین Daniluk و همکاران(۷) اظهار داشتند افراد دیابتی به‌طور عموم در دهانشان حامل کاندیدا آلبیکنس می‌باشند، بدون این که نشانه‌ای از بیماری در آن‌ها وجود داشته باشد.

Pallavan و همکاران(۱۳) در مقایسه افراد سالم با افراد دیابتی مشاهده نمودند که در افراد سالم کاندیداها بصورت کمونسال می‌باشد؛ درحالیکه در افراد دیابتی بشکل کلونیزاسیون شدید در می‌آیند و مدت زمان ابتلا به دیابت و میزان قندخون این افراد در کلونیزاسیون نقش دارد.

در مطالعه حاضر از ۳۰۰ بیمار تعداد ۲۶۰ نفر از قرص استفاده می‌کردند؛ که از این تعداد ۳۴/۲ درصد دارای کشت مثبت از نظر انواع کاندیدا بودند. درحالی‌که از ۳۱ نفری که مصرف‌کننده انسولین بودند، ۵۸ درصد کشت مثبت داشتند. این نتیجه می‌تواند اهمیت بیش‌تر انسولین را در مقایسه با قرص در جهت کلونیزه شدن به وسیله انواع کاندیدا را نشان دهد. همسو با نتیجه به دست آمده در مطالعه حاضر، Bai و همکاران(۱۴) و Dorocka و همکاران(۱۵)، با بررسی بر روی کلونیزاسیون کاندیدا در افراد دیابتی به این نتیجه رسیدند که افرادی‌که از انسولین استفاده می‌کنند، میزان کلونیزاسیون کاندیدایی در آن‌ها بیش‌تر است.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیماران دیابتی شرایط مساعد برای رشد و تکثیر گونه‌های کاندیدا آلبیکنس و غیرآلبیکنس را دارند. هم‌چنین افراد مبتلا به دیابت با قند کنترل نشده بیش‌تر در معرض کلونیزاسیون کاندیدایی قرار دارند. از این رو پی‌گیری مداوم این دسته از بیماران از نظر کلونیزاسیون انواع کاندیدا می‌تواند راهکاری برای پیشگیری در ابتلای به بیماری ناشی از آن‌ها باشد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران و مرکز تحقیقات قارچ‌های تهاجمی (طرح مصوب شماره ۶۰۶) استفاده نموده است که بدین وسیله مراتب قدردانی خود را از این موضوع اعلام می‌داریم. هم چنین از کلیه بیمارانی که با صبوری اجازه دادند تا این تحقیق انجام شود، نهایت قدرشناسی و سپاس را داریم. مطالعه حاضر در قالب پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی پزشکی، خانم فاطمه ذکوی به انجام رسیده است.

References

1. Wild S, Roglic G, Green, A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 2004; 27(5): 1047-1053.
2. Buxton PK, Milne LJ, Prescott RJ, Proudfoot MC, Stuart FM. The prevalence of dermatophyte infection in well-controlled diabetics and the response to Trichophyton antigen. Br J Dermatol 1996; 134(5): 900-903.
3. Gupta AK, Konnikov N, MacDonald P, Rich P, Rodger NW, Edmonds MW, et al. Prevalence and epidemiology of toenail onychomycosis in diabetic subjects: a multicentre survey. Br J Dermatol 1998; 139(4): 665-671.
4. Premkumar J, Ramani P, Chandrasekar T, Natesan A, Premkumar P. Detection of species diversity in oral candida colonization and anti-fungal susceptibility among non-oral habit adult diabetic patients. J Nat Sci Biol Med 2014; 5(1): 148-154.
5. Faraji R, Rahimi MA, Assarehzadegan M. Prevalence of Vaginal Candidiasis infection in women referred to Kermanshah hygienic centers, Iran in 2010. Life Science Journal 2012; 9(4): 1280-1283.
6. Bremenkamp RM, Caris AR, Jorge AO, Back-Brito GN, Mota AJ, Balducci I, et al. Prevalence and antifungal resistance profile of Candida spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. Arch Oral Biol 2011; 56(6): 549-555.
7. Daniluk T, Tokajuk G, Stokowska W, Fiedoruk K, Sciepuk M, Zaremba ML, et al. Occurrence rate of oral Candida albicans in denture wearer patients. Adv Med Sci 2006; 51(Suppl 1): 77-80.
8. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important Candida species. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi 2006; 47(3): 225-229.
9. Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Maeda N, Ohshima T, Yamaguchi H. Differentiation of Candida albicans and Candida dubliniensis using a single-enzyme PCR-RFLP method. Jpn J Infect Dis 2005; 58(4): 235-237.
10. Dreizen S. Oral candidiasis. Am J Med 1984; 77(4D): 28-33.

11. Tapper-Jones LM, Aldred MJ, Walker DM, Hayes TM. Candidal infections and populations of Candida albicans in mouths of diabetics. J Clin Pathol 1981; 34(7): 706-711.
12. de la Rosa-Garcia E, Miramontes-Zapata M, Sanchez-Vargas LO, Mondragon-Padilla A. Oral colonisation and infection by Candida sp. in diabetic and non-diabetic patients with chronic kidney disease on dialysis. Nefrologia 2013; 33(6): 764-770.
13. Pallavan B, Ramesh V, Dhanasekaran BP, Oza N, Indu S, Govindarajan V. Comparison and correlation of candidal colonization in diabetic patients and normal individuals. J Diabetes Metab Disord 2014; 13: 66.
14. Bai KY, Reddy CD, Abu-Talib SH. Oral candidal carriage in young insulin dependent diabetics. J Indian Soc Pedod Prev Dent 1995; 13(1): 20-23.
15. Dorocka-Bobkowska B, Budtz-Jörgensen E, WłSoch S. Non-insulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. J Oral Pathol Med 1996; 25(8): 411-415.