پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره هفدهم شماره ۶۱ آذر و دی سال ۱۳۸۶ (۱۱-۱)

شناسایی مولکولی کاندیدا آلبیکنس های جدا شده از بیماران انکولوژی در چهار مرکز آموزشی- درمانی استان مازندران[۸۵-۸۴]

معصومه فتاحی (M.Sc.) * **طاهره شکوهی** (Ph.D.)**+ **محمدباقر هاشمی** (Ph.D.)***
محمدتقی هدایتی (Ph.D.) **** **علی اخوتیان** (M.D.)***** **احمد تمدنی**(M.D.)******
حسین کرمی (M.D.)******* **داریوش مسلمی**(M.D.) ******** **مسعود ایاز** (M.D.)********

چکیده

سابقه و هدف : تشخیص به موقع گونه‌های کاندیدایی، دربقای بیماران مبتلا به مهار سیستم ایمنی، بسیار کمک‌کننده است. به لحاظ این‌که می‌توان درمان ضد قارچی موثر را در شرایطی که هنوز میزان قارچ پایین است، آغاز نمود. هدف از این مطالعه، شناسایی کاندیدا آلبیکنس‌های (Candida Albicans) جدا شده از بیماران بخش تومور شناسی (Oncology) با روش‌های مولکولی بود.

مواد و روش‌ها : ۶۲ کاندیدا آلبیکنس مجزا با آزمون‌های فنوتیپی(رنگ کلونی روی محیط کروم آگار، تشکیل جرم تیوب و تولید کلامیدوسپور روی محیط کورن میل آگار دارای ۱ درصد توئین ۸۰) شناسایی شدند، DNA ژنومی آنها با استفاده از روش گلس بید/ فنل- کلروفرم جدا گردید. منطقه متغیر D1/D2 در ناحیه ژنی 26S)rDNA) در همه نمونه‌ها به روش PCR و با استفاده از بتونه‌های (Primers) NL1/NL4 ، به اندازه (bp) ۶۲۰ تقویت شد. الکتروفورز محصولات روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد. تعیین توالی برای ۱۸ محصول انجام شد و نتایج با کمک نرم‌افزار BLAST در سایت NCBI ارزیابی شد. تطبیق توالی‌ها با استفاده از برنامه CLUSTAL-W(version 1.83) صورت گرفت.

یافته‌ها : کلیه محصولات در جست و جوی Blast به عنوان کاندیدا آلبیکنس شناسایی شدند. همه توالی‌های بررسی شده بیش از ۹۹ درصد با توالی مرجع خود در بانک ژنی شباهت داشتند. ۴ نژاد (Strain) مختلف برای گونه آلبیکنس شناسایی گردید، شامل: نژاد AA 1622b(۱۳ نمونه)، 24698(۳ نمونه)، TA 62(۱ نمونه)و 551 FC(۱ نمونه). به علاوه ۱۳۱ مکان متغیر نوکلئوتیدی نیز شناسایی شد.

استنتاج : کاندیدا آلبیکنس گونه غالب تعیین شده با روش های فنوتیپی (Phentotypic) بود. به علاوه، شناسایی کاندیدا آلبیکنس‌ها با تعیین توالی ناحیه ژنی rDNA (26S)، ۱۰۰ درصد با نتایج حاصل از روش‌های فنوتیپی مطابق بود.

واژه های کلیدی : بتا تالاسمی ماژور، بتا تالاسمی اینتر مدیا، سنگ صفراوی، هیدروکسی اوره

این تحقیق طی شماره ۶۶- ۸۴ در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است.

* کارشناسی ارشد قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
** دکترای قارچ شناسی پزشکی، عضو هیات علمی (استاد) دانشگاه علوم پزشکی مازندران
+ ✉ **مولف مسئول :** ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی
*** دکترای ژنتیک، عضو هیات علمی (استادیار) مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
**** دکترای قارچ شناسی پزشکی، عضو هیات علمی (دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران
***** فوق تخصص خون و انکولوژی، عضو هیات علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران
****** فوق تخصص خون و انکولوژی اطفال، عضو هیات علمی (دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی بابل
******* فوق تخصص خون و انکولوژی اطفال، عضو هیات علمی (استادیار) مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
******** متخصص رادیوتراپی انکولوژی، عضو هیات علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی بابل

تاریخ دریافت : ۸۶/۶/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۶/۹/۴ تاریخ تصویب: ۸۶/۱۰/۹

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-22]

www.SID.ir

مقدمه

کاندیدا آلبیکنس یک قارچ طبیعی ساکن (flora) حیوان‌های خون‌گرم و انسان‌ها است(۱). این قارچ بسته به طبیعت میزبان، دو گروه عفونت را به وجود می‌آورد: عفونت‌های سطحی(مانند: دهانی، مهبلی وکاندیدیازیس جلدی) که در افراد سالم هم دیده می‌شود، عفونت‌های عمقی (مانند: ریوی، گوارشی، ادراری و کاندیدمی) که در افراد با اختلال شدید ایمنی رخ می‌دهد(۲). این مخمرها معمولا ارگانیسم های فرصت طلب هستند(۳). عوامل مهارکنندهٔ سیستم ایمنی مثل : شیمی درمانی در بیماران سرطانی،پرتودرمانی، استفاده ازآنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف، ایدز، دیابت شیرین و... موجب مهاجم شدن این قارچ‌ها می‌شوند(۴). کاندیدیازیس مهاجم یکی از عوارض شایع و بالقوه کشنده ناشی از سرطان و شیمی درمانی مرتبط با آن است(۵تا۱۰). اکثر عفونت‌های کاندیدایی توسط کاندیدا آلبیکنس به وجود می‌آیند (۴تا۶). تقریباً در نیمی از بیماران سرطانی که تحت پرتو درمانی سر و گردن قرار می‌گیرند، گونه‌های کاندیدایی تجمع می‌یابند و تولید عفونت می‌کنند که اگر این عفونت توسعه موضعی یا عمومی پیدا کند، به مرگ بیمار منتهی می‌شود(۱۱). در حالی‌که استفاده از داروهای ضد قارچی جدید روند کنترل عفونت‌های قارچی را بهبود بخشیده، مشکل اصلی در تشخیص به موقع عامل عفونت هنوز باقی است. لذا آغاز به موقع درمان در کاهش سرعت مرگ و میر بیماران دچار مهار سیستم ایمنی، معیار مهمی است(۱۲).

کاندیدا آلبیکنس به‌عنوان قوی‌ترین گونه‌کاندیدایی مهم پزشکی شناخته می‌شود(۱۳،۱۴). اخیرا کاندیدا دابلینسیس به عنوان یک گونه جدید معرفی شده که از نظر مرفولوژی و فیزیولوژی، بسیار شبیه کاندیدا آلبیکنس است و در آزمایشگاه‌ها اشتباها به عنوان کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول تشخیص داده می‌شود. خوشبختانه تکنیک‌های مولکولی، افتراق صحیح کاندیدا آلبیکنس را از این گونه، ممکن می‌سازند(۱۵). لذا شناسایی صحیح گونه‌ها به منظور درمان ضد قارچی مؤثر، با توجه به آگاهی از مقاومت به داروهای ضد قارچی، ضروری است(۱۶).

وسایل قدیمی شناسایی گونه‌های کاندیدایی شامل آزمون‌های زمان بر مرفولوژیکی وجذب، برای شناسایی ایزوله‌ها در یک کشت، چندین روز زمان لازم دارند. از طرفی هنگام استفاده از سیستم‌های بیوشیمیایی خودکار، ایزوله‌های مخمری بالینی گاهاً اشتباه شناسایی می‌شوند (۱۷).لذا روش‌های مولکولی توسعه‌یافته،شناسایی سریع‌تر و صحیح‌تری را نسبت به روشهای فنوتیپی قدیمی فراهم می‌کنند(۱۸). ازطرفی بررسی مولکولی یک عامل عفونی برای مطالعات اپیدمیولوژیک و همچنین برای کنترل عفونت مهم است(۲). روش‌های دیگر تشخیص شامل ردیابی آنتی‌بادی، عمدتاً در جمعیت ایمونوساپرس یک عیب عمده دارند، زیرا این افراد توانایی پاسخ به عفونت به وسیله تولید آنتی‌بادی را ندارند. روش‌های ردیابی آنتی ژن مفید بوده اما هنوز در حال ارزیابی هستند. تعدادی از محققین، ایزوله‌های بالینی مخمری جدا شده از بیماران مبتلا به ولووازنیت(۱۹)، کاندیدیازیس جلدی (۲۰)، و بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی، دیابت، سوختگی(۲) و مبتلایان به سرطان و بیماران مبتلا به اختلال ایمنی (۲۱) که با روش‌های متداول (مانند آزمون جرم تیوب، آزمون جذب کربوهیدرات، آزمون کلامیدوسپور، آزمون بررسی رنگ کلنی در روی کروم آگار کاندیدا و...) به عنوان کاندیدا آلبیکانس شناسایی شده بود را با روش‌های مختلف مورد بررسی مولکولی قرار داده و قدرت تشخیصی این روش‌های را مورد بررسی قرار داده‌اند. هم اکنون PCR به عنوان یک روش کامل، ساده، ویژه، حساس و قابل اطمینان به طور

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-22]

www.SID.ir

فزاینده‌ای برای تشخیص کاندیدا استفاده می‌شود. تقویت توالی اسیدهای نوکلئیک و تعیین توالی ژن‌های کد کننده rDNA هنوز به عنوان استاندارد طلایی شناسایی، اجرا می‌شود. آزمایش PCR برای تقویت منطقه متغیر ۶۰۰ نوکلئوتیدی D1/D2 به عنوان هدف در پایانه ′۵ ناحیه ژنی rDNA(26S) طراحی شده بود. این منطقه rDNA برای این‌که جداسازی مطمئن همه گونه‌های مهم مخمری بالینی را اجازه دهد، به طور مؤثری متغیر است(۲۲). دراین تحقیق ما ضمن جداسازی و شناسایی کاندیدا آلبیکنس از بیماران انکولوژی به روش کلاسیک، بررسی مولکولی به عمل آمد.

مواد و روش ها

جمعیت مورد مطالعه:

این مطالعه توصیفی، در ۴ مرکز آموزشی- درمانی استان مازندران طی سال‌های ۸۵-۸۴ انجام شده بود. نمونه‌ها به طور غیر تصادفی از ۱۱۶ بیمار (۷۶ مرد و ۴۰ زن) بخش انکولوژی (بستری و سرپایی) در مرکز آموزشی- درمانی امام خمینی و بوعلی ساری، امیرکلای بابل و مرکز رادیوتراپی و رادیولوژی مرکز آموزشی- درمانی شهید رجائی بابلسر جمع‌آوری شده بودند.

جمع آوری نمونه:

نمونه ها بر اساس وجود ضایعات جلدی و جلدی- مخاطی ، علائمی چون تب و همچنین علائمی که دال بر عفونت ادراری و عفونت ریوی در بیمار پس از تائید انکولوژیست مبنی بر احتمال حضور عفونت قارچی در محل تهیه می‌گردید. نمونه‌های جلدی با روش‌خراشیدن (Scraping) به وسیله سوزن اسکالپل و نمونه از ضایعات مخاطی با ابزار پاک کننده پنبه‌ای (Swab) جمع‌آوری شده، نمونه‌های خلط صبحگاهی با سرفه عمیق و قسمت میانی ادرار صبحگاهی در ظروف مناسب استریل جمع آوری و در اسرع وقت به آزمایشگاه حمل شده بودند. نمونه‌های خون زمانی که بیماران علی رغم درمان آنتی بیوتیکی همچنان تبشان ادامه داشت، گرفته شده بودند. معیار خروج از مطالعه، استفاده از درمان ضد قارچی طی دو هفته قبل بود. برای هر بیمار اطلاعات: سن، جنس، نوع بدخیمی، مکان نمونه‌گیری و استفاده از ضد قارچ‌ها ثبت گردید.

شناسایی ایزوله های کاندیدایی:

آزمایش مستقیم با ۱۰ درصد KOH انجام شده بود. خون به بطری‌های BHI بی‌فازیک (کوشافرآور گیتی- ایران) تلقیح شده بود و در شرایط هوازی و ۳۰°C انکوبه شده بودند. نمونه‌های دیگر به دو محیط منتقل شده بودند: ۱) سابورودکستروز آگار (LAB M, Bury, UK) با کلرآمفنیکل (50 µg/ml) به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در ۳۰°C-۲۰ ؛ ۲) استفاده از کروم آگار کاندیدا (CHROMagar Company, Paris, France) و نتایج بر اساس رنگ و مرفولوژی کلونی رشد یافته در مدت ۴۸ساعت در۳۷°C قرائت گردید. ایزوله‌های کاندیدایی به وسیله آزمون تشکیل جرم تیوب در سرم اسب و آزمون تشکیل کلامیدوسپور روی محیط کورن‌میل‌آگار (DIFCO Laboratories, Detroit, Mich., USA) دارای ۱ درصد توئین ۸۰ ($CMA-T_{80}$) شناسایی شدند.

جداسازی DNA:

ابتدا کشت خالص از هر ایزوله کاندیدا آلبیکنس تهیه و در ۳۰°C به مدت ۲ روز انکوبه شد. DNA با استفاده از روش فروپاشی گلس بید، جدا شده بود(۱۶). به طور مختصر بدین شرح بود: یک لوپ کامل از کاندیدا آلبیکنس تازه در 300 µl از بافر لیز کننده (10 mM Tris، 1 mM EDTA pH:8، 1% SDS، 100 mM NaCL، 2% Triton X-100) معلق شده بود. بعد

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-22]

www.SID.ir

از افزودن 300 µl فنل- کلروفرم به نسبت (۱:۱) و 300 mg گلس بید (با قطر 0.5 mm)، نمونه ها با شدت به مدت ۵ دقیقه تا فروپاشی کامل دیواره سلولی مخلوط شدند. بقایای سلولی به وسیله سانتریفوژ با دور 10000 rpm به مدت ۵ دقیقه مجزا شدند و لایه فوقانی ی‌کبار دیگر با یک حجم معادل از کلروفرم جدا شده بود. DNA با اتانول ۱۰۰ درصد در سوپرناتانت رسوب کرده بود، با اتانول ۷۰ درصد شسته شده بود؛ در هوا خشک گردیده و در بافر TE (10 mM Tris-HCL ، 1mM EDTA pH:8) معلق شده بود. غلظت DNA و نسبت جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر (A_{260}/A_{280}) به روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. ژنومیک DNA جداسازی شده در ۲۰°C- تا زمان استفاده نگهداری می‌شد.

روش PCR:

جفت پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی :

(NL_1 (forward)؛ 5′-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3′)

و (NL_4 (reverse)؛ 5′-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3′)

به منظور تقویت یک قطعه (bp) ۶۲۰ از منطقه D_1/D_2 در ناحیه ژنی rDNA (26S)، استفاده شد.

PCR در یک حجم نهایی 50µl انجام گردید، شامل: 2µl از DNA الگو، 5µl از 10×PCR buffer، 5µl از گلیسرول ۵۰٪، 1µl داکسی نوکلئوزید تری فسفات (5mM، محصول شرکت BIRON)، 0.5 µl از هر پرایمر(با غلظت 25 µM، محصول شرکت فزابیوتک ایران)، 3 µl از $mgcl_2$ (1.5 mM)، 0.4 µl از Taq DNA polymerase(250 U، محصول Roche). واکنش PCR در دستگاه ترموسیکلر مدل (Thermal cycler techne- TC- 312) انجام گردید. سیکل‌های گرمایی بدین شرح بود: دناتوره ابتدایی ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه، که با ۳۶ سیکل به صورت زیر دنبال می‌شد: (دناتوره: ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه) (اتصال: ۵۲ °C به مدت ۲ دقیقه) (تکثیر: ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه)؛ و یک مرحله تکثیر انتهایی ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه.

مقدار 8 µl از هر محصول PCR در یک ژل آگارز ۱/۵ درصد و بافر 1×TBE (Tris base، Boric acid، EDTA PH:8) الکتروفورز شده بود. یک (100 bp) DNA Marker (محصول شرکت BIRON) همراه با نمونه‌ها برای تعیین اندازه باندها همراه شده بود. سپس ژل با اتیدیوم برماید (0.5 µg/ml) رنگ‌آمیزی و تصویر با دستگاه UV doc (Gel Documentation and Analysis Systems user manual; Model: GAS 9000/9010: version 12; Cambridge, UK) تهیه شد.

تعیین توالی محصولات PCR :

تخلیص محصولات با روش (Column based purification Kit (Millipore) using vacuum for filtering) انجام شد. منطقه D_1/D_2 در ناحیه ژنی (26S)rDNA با پرایمر NL_1 تعیین توالی گردید. تعیین توالی DNA به کمک دستگاه DNA Sequencing (ABI 3730.XL) و با روش استاندارد سنگر(Dideoxy nucleotide chain termination) صورت پذیرفت، سپس توالی های DNA به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Online به نام Blast 2.0 آنالیز گردید. گونه‌ها و استرین‌ها به وسیله جستجوی اطلاعات در سایت http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST و ارزیابی بیشترین hit تعیین شده بودند. تطبیق توالی‌ها با استفاده از برنامه CLUSTAL-W (version 1.83) صورت گرفت.

یافته ها

۱۱۶ بیمار مبتلا به بدخیمی (۷۶ مرد و ۴۰ زن) در ۴ مرکز آموزشی- درمانی بررسی شدند. رنج سنی بیماران ۸۳-۲ سال و متوسط سنی آنها ۲۵/۲۰ ± ۴۳/۵۲ بود. بیش‌ترین موارد مثبت کاندیدایی در رنج سنی۷۴-۶۳

Archive of SID
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-22]

www.SID.ir

سال بود. از نمونه مشکوک ۷۰ بیمار (۶۰/۳۴ درصد)، کاندیدا جدا گردید. نوع غالب بدخیمی، تومور مغزی (۱۸/۵۷ درصد) بود. اکثر بیماران (۵۷/۹۸ درصد) مبتلا به کاندیدیازیس حلقی- دهانی بودند.تعداد ۱۰۲ ایزوله کاندیدایی شناسایی گردید. در ۲۴ بیمار (۲۹/۳۴ درصد) بیش از یک گونه کاندیدایی جدا گردید. که در ۱۷ بیمار (۲۹/۲۴ درصد) دو گونه متفاوت و در ۷ بیمار (۱۰ درصد) سه گونه مختلف تجمع یافته بود.

شناسایی فنوتیپی:

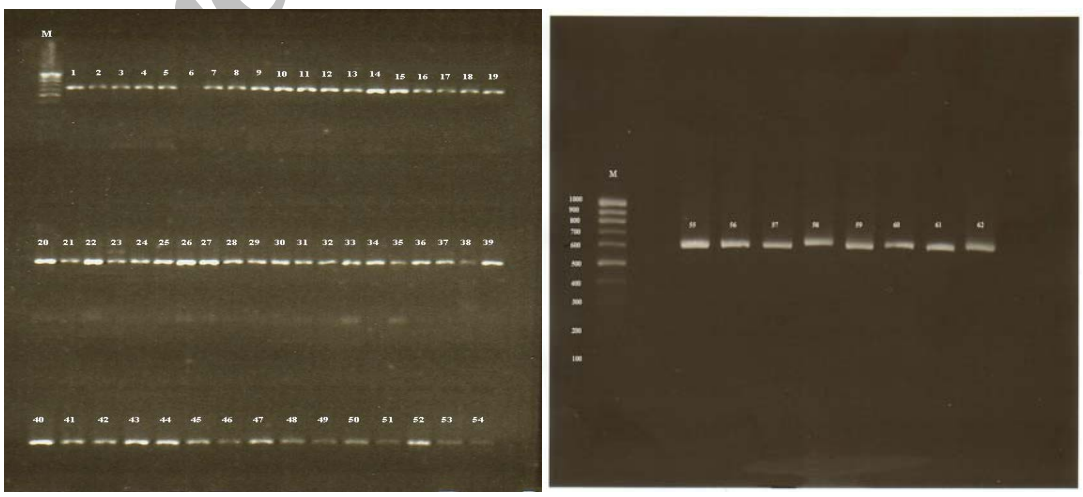
۶۲ ایزوله از ۱۰۲ ایزوله کاندیدایی (۷۸/۶۰ درصد) که بر روی کروم آگار کلونی‌های سبز روشن تولید کرده بودند، جرم تیوب مثبت بودند و روی محیط $CMA\text{-}T_{80}$ کلامیدوسپورهای تکی و گاهاً دوتایی تولید کرده بودند، به عنوان کاندیدا آلبیکنس شناسایی شده بودند.۳۱ ایزوله مخمری به عنوان کاندیدای غیر آلبیکنس (به ترتیب ک. گلابراتا، ک. تروپیکالیس، ک. کروزئی و ک.کفایر) و ۸ ایزوله مخمری ناشناخته و یک ایزوله رودوترولا شناسایی گردید. تمامی موارد جداسازی ک.آلبیکنس از ضایعات مخاطی و جلدی در محل دهان بوده است. در ۳۴/۲۹ درصد موارد کلنیزاسیون بیش از یک گونه کاندیدایی از یک مکان مشاهده گردید.

روش‌های مولکولی برای تشخیص ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس:

آزمایش PCR: با پرایمرهای NL_1 و NL_4 برای ۶۲ DNA کاندیدا آلبیکنس جدا شده انجام گردید، و قطعه هدف ۶۲۰ نوکلئوتیدی از منطقه D_1/D_2 ژن rDNA (26S) برای کلیه ایزوله‌ها با موفقیت تقویت شد(شکل شماره ۱).

تعیین توالی محصولات PCR:

۱۸ تا از محصولات PCR با پرایمر NL_1 تعیین توالی شدند. نتایج تعیین توالی بعد از تطبیق با DNAهای موجود در بانک ژنی (Gene Bank) از طریق سایت Online (NCBI) با کمک نرم افزار BLAST برای ۱۸ محصول به وضوح گونه آلبیکنس را تأیید نمود و با



شکل شماره ۱: محصولات PCR از ۶۲ DNA کاندیدا آلبیکنس ایزوله شده از بیماران انکولوژی که بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد رانده شده و در قطعه (bp) ۶۲۰ تولید باند نموده اند .Lane M: DNA Marker 100 (bp)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-22]

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج آزمون‌های فنوتیپی ۱۰۰درصدمطابقت داشت. یکی از محصول‌ها که در شناسایی فنوتیپی (کلونی سبز تیره، جرم تیوب منفی و بلاستوسپور همراه با هیف کاذب روی $CMA\text{-}T_{80}$) ناشناخته بود، به عنوان کنترل تعیین توالی‌شد و به‌عنوان‌کاندیدا تروپیکالیس شناسایی‌گردید. ۴ استرین مختلف برای گونه آلبیکنس شناسایی گردید، شامل: استرین AA 1622b (۱۳نمونه)، 24698 (۳ نمونه)، TA 62 (۱ نمونه) و 551 FC (۱ نمونه). از نمونه‌های متوالی ۳ بیمار، دو استرین متفاوت24698 و AA 1622b جدا گردید. همه توالی‌های بررسی شده بیش از ۹۹ درصد با توالی مرجع خود شباهت داشتند: ۹ نمونه ۱۰۰ درصد با توالی مرجع خود در بانک ژنی شباهت داشتند و ۹ نمونه دیگر شامل نمونه‌کنترل (کاندیدا تروپیکالیس) ۹۹ درصد با توالی مرجع خود مشابه بود (جدول شماره ۲). برای ۱۸ محصول ذکر شده، ۱۳۱ مکان متغیر نوکلئوتیدی شناسایی شد، شامل: ۱۲۳ (۹۳/۸۹ درصد) منطقه هتروزیگوت که هر دو حالت آللی ظاهر شده بودند و ۸ (۶/۱۱ درصد) منطقه که جانشینی نوکلئوتیدی صورت گرفته بود.

جدول شماره ۱ : تعیین گونه و تعیین استرین های کاندیدا آلبیکنس با استفاده از تعیین توالی ژن 26S .

شماره بیمار	شماره نمونه	Strain no.	Accession no.	% Similariy	Identity[1]	Bit Score[2]
P_I	CAF_1	24698	AY 601154	99	566/567	1018
	CAF_2	AA 1622b	AF 156536	100	560/560	1011
P_{II}	CAF_3	24698	AY 601154	99	564/566	1012
	CAF_4	AA 1622b	AF 156536	99	562/563	1011
P_{III}	CAF_5	24698	AY 601154	99	566/568	1018
	CAF_6	AA 1622b	AF 156536	100	560/560	1011
P_{IV}	CAF_7	AA 1622b	AF 156536	100	562/562	1014
	CAF_8	AA 1622b	AF 156536	99	558/560	1002
P_V	CAF_9	AA 1622b	AF 156536	100	568/568	1025
P_{VI}	CAF_{10}	AA 1622b	AF 156536	100	570/570	1029
P_{VII}	CAF_{11}	AA 1622b	AF 156536	99	572/573	1029
P_{VIII}	CAF_{12}	AA 1622b	AF 156536	100	557/557	1005
P_{IX}	CAF_{13}	AA 1622b	AF 156536	99	558/559	1003
P_X	CAF_{14}	AA 1622b	AF 156536	100	567/567	1023
P_{XI}	CAF_{15}	AA 1622b	AF 156536	100	567/567	1023
P_{XII}	CAF_{16}	TA 62	AF 156537	100	555/555	1002
P_{XIII}	CAF_{17}	551 FC	DQ 318814	99	526/527	946
P_{XIV}	CAF_{18}	AA 1622b	AF 156536	99	555/557	989
P_{III}	CAF_{19}	C. tropicalis (XJURML)	EF 151501	99	557/558	1002

۱. NCBI BLAST terminology: طول توالی مورد آزمایش (Query) در مقایسه با توالی گزارش شده در Gene Bank (Subject)

۲. NCBI BLAST terminology: ارزش معمول تطبیق، که از امتیاز خام تطبیق مشتق شده (برای مقایسه امتیاز تطبیقی در جستجوهای مختلف استفاده می شود).

نتایج ارزیابی ارتباط فیلوژنتیکی استرین‌ها به دنبال آنالیز تطبیق توالی‌ها با برنامه Clustal-W، در اشکال (۵-۲) نشان داده شده است.

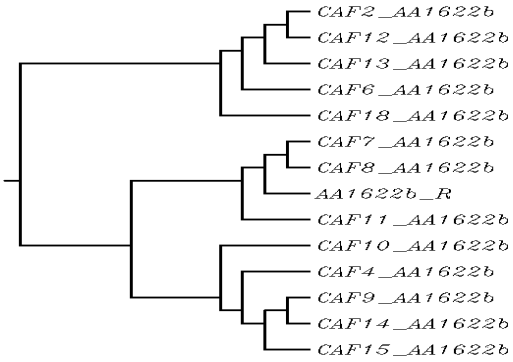
آنچه که موجب شده بعضی استرین های مشابه در یک شاخه نباشند، عدم تطبیق ابتدا و انتهای سکانس‌ها می‌باشد.

قابل ذکر است که استرین‌های تعیین شده در این مطالعه توسط نرم‌افزار BLAST و نتایج مرتبط با آن نیاز به تایید با روش‌های دقیق تری چون RFLP و RAPD دارد که هم اکنون در حال انجام است.

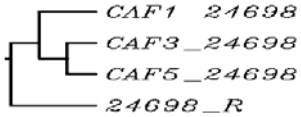
Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-22]

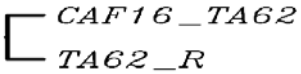
www.SID.ir



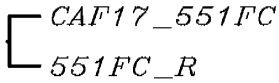
شکل شماره ۲: شاخه فیلوژنتیکی از استرین های AA 1622b



شکل شماره ۳: شاخه فیلوژنتیکی از استرین های 24698



شکل شماره ٤: شاخه فیلوژنتیکی از استرین TA 62



شکل شماره ٥: شاخه فیلوژنتیکی از استرین 551 FC

بحث

کاندیدیازیس مهاجم یکی از عوارض شایع و بالقوه کشنده ناشی از درمان بالاخص شیمی درمانی، در بیماران سرطانی است. در این بررسی و بررسی‌های مشابه، شیوع موارد مثبت کاندیدا، بیش از ۵۰ درصد ارزیابی شد(۵،۴)؛ وچنانچه برآوردگردید، کاندیدیازیس حلقی-دهانی یک عفونت معمول در بیماران سرطانی است(۲۳،۱۱،۴). کلنیزه شدن بیش ازیک گونه کاندیدایی دریک مکان ویژه واقعه غیرمعمولی نیست، و درمبتلایان سرطان نازوفارنکس حتی بیش از ۴۴ درصد هم می‌تواند باشد(۲۴). همچنان‌که در مطالعه حاضر میزان کلنیزاسیون ۳۴/۲۹ درصد و در بررسی Davies و همکاران(۲۰۰۲) ۲۳ درصد گزارش شده بود(۲۳). در هر دو مطالعه از محیط کروموژنیکی مثل کروم آگار جهت شناسایی استفاده شده بود، زیرا این محیط برای تخمین جمعیت مخلوط (mix)کاندیدایی محیطی حساس شناخته شده است(۲۵). در بررسی حاضر گونه‌های غالب شناسایی شده با روش‌های فنوتیپی: کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس بود؛ گونه های مذکور در کل بیش از ۸۰ درصد ایزوله‌های کاندیدایی را شامل می‌شدند، که با نتایج Safdar و همکاران (۲۰۰۱) مطابقت دارد(۲۶). از طرفی Davies و همکاران (۲۰۰۲)، گونه‌های رایج در مطالعه خود را، کاندیدا آلبیکنس (۴۶ درصد)، کاندیدا گلابراتا (۱۸ درصد) و کاندیدا دابلینسیس (۵ درصد) اعلام کردند(۲۳). لذا حضور گونه‌های دیگر جنس کاندیدا، مانند:کاندیدا دابلینسیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا کروزئی، کاندیدا لوسیتانیا، کاندیدا استلاتوئیده و کاندیدا گیلر موندی نیز رو به افزایش است(۲۷) و این افزایش با گستردگی استفاده از درمان‌های تری آزولی (۲۸) و پروفیلاکسی فلوکونازولی(۵) مرتبط است. لذا ضرورت شناسایی صحیح و سریع گونه‌ها به منظور درمان ضد قارچی موثر احساس می‌شود.

امروزه روش‌های مولکولی در شناسایی صحیح و سریع گونه‌هاکمک شایانی نموده‌اند. اهداف ریبوزومی، خصوصا حوضه D1/D2 از ژن DNA، انتظارات ویژه‌ای برای شناسایی مولکولی نشان داده‌اند. در حال حاضر،

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-22]

www.SID.ir

توالی منطقه D1/D2 تقریبا در همه مخمرها تعیین شده است(۳۰،۲۴). در مطالعه حاضر و بررسی‌های دیگر (۳۱،۳۰،۱۸)؛ آنالیز توالی D1/D2 واقع در ناحیه 26S rDNA مورد استفاده قرار گرفت. نتایج تعیین توالی این ناحیه برای استرین‌های مورد آزمایش، بیش از ۹۹ درصد با استرین مرجع شباهت داشت که با مطالعه پرایس (Pryce) (۲۰۰۶) همخوانی دارد. در هر دو مطالعه، DNA از کلونی‌های حاصل از کشت مجدد جدا شده بود. در این تکنیک جداسازی، احتمال ترکیب ایزوله‌ها کاهش یافته و درصد شباهت با استرین مرجع افزایش می‌یابد. از چهار استرین شناسایی شده در مطالعه حاضر، دو استرین(AA 1622b و TA 62) با استرین‌های شناسایی شده در بررسی فورچ (Forche) و همکاران (۱۹۹۹) مشابه بود. مطالعه فورچ (Forche) و همکاران (۱۹۹۹) بیان کرده‌اند که جهت ترسیم دندروگرام‌ها از اطلاعات PCR fingerprinting و Multilocus Genotype (MLG) استفاده نموده‌اند(۳۰). لذا می‌توان گفت تعیین استرین با توالی (sequencing) نیاز به تایید با آزمایش‌های دقیق‌تری چون: MLG, PCR fingerprinting, RFLP, RAPD و ... دارد. در مطالعه حاضر نتایج آزمون‌های فنوتیپی و مولکولی کاملا انطباق داشت، که با نتایج سایر مطالعات مشابهت دارد(۳۲،۱۶تا۳۴). با توجه به شناسایی سریع‌تر و صحیح‌تر روش‌های مولکولی نسبت به آزمون‌های تشخیصی متکی بر فنوتیپ، سایر محققین (۳۷-۳۵) ارجحیت این روش را بر روش‌های متداول نشان داده‌اند و خاطر نشان ساخته‌اند که در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی جایگزین روش‌های متداول گردیده و به صورت روزمره مورد استفاده قرار گیرد، و این در حالی است که تکنیک‌های مولکولی تخمین گونه‌های کاندیدایی در حد یک ابزار تحقیقاتی باقی مانده است و تا زمانی که به صورت ارزان و کارا در نیاید، احتمال کمی است که جایگزین روش‌های شناسایی سنتی شود.

در این مطالعه، کاندیدا آلبیکنس گونه غالب تعیین شده با روش‌های فنوتیپی بود. به علاوه این‌که، شناسایی کاندیدا آلبیکنس‌ها با تعیین توالی ناحیه ژنی rDNA (26S)، ۱۰۰ درصد با نتایج حاصله از روش‌های فنوتیپی مطابق بود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاون محترم آموزشی و پژوهشی دانشکده پزشکی، جناب آقای دکتر علیرضا رفیعی به خاطر راهنمایی‌های ارزنده و همکاری صمیمانه، تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین مراتب تشکر خود را از مسؤولین بخش‌های انکولوژی بیمارستان‌های: امیر کلای بابل (خانم خبیری)، امام(ره) ساری (خانم مهدوی)، بوعلی ساری (خانم امین اسلامی) و کارکنان مرکز رادیوتراپی شهیدرجایی بابلسر(آقای دکتر صفیری، خانم دکترکریمی) وکارکنان محترم‌آزمایشگاه ابراز می‌دارد. در ضمن متذکر می‌گردد که این مقاله حاصل پایان‌نامه دوره کارشناسی‌ارشد قارچ شناسی خانم معصومه فتاحی از دانشگاه علوم پزشکی مازندران می‌باشد.

فهرست منابع

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

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

Archive of SID
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-22]
www.SID.ir

3. Mannarelli B.M, Kurtzman C.P. Rapid indentification of Candida albicans and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. ***J Clin Microbiol*** 1998; 36(6): 1634-1641.
4. AL-Abeid H.M,Abu-Elteen K.H,Elkarmi A.Z and Hamad M.A. Isolation and characterization of Candida Spp. in Jordanian cancer patients: prevalence, pathogenic determinants, and antifungal sensitivity. ***Jpn J Infect Dis*** 2004; 57: 279- 284.
5. Dinubile M.J, Hille D, Sable C.A, Kartsonis N.A. Invasive candidiasis in cancer patients: observation from a randomized clinical trial. ***J Infect*** 2005; 50: 443- 449.
6. Bodey G.P, Mardani M, Hanna H.A. The epidemiology of Candida glabrata and Candida albicans fungemia in immunocompromised patients with cancer. ***Am J Med*** 2002; 112: 380-5.
7. el Mahallawy H.A, Attia I, Ali- el- Din N.H, Salem AE and Abo-el-Naga S. A prospective study on fungal infection in children with cancer. ***J Med Microbiol*** 2002; 51: 601- 5.
8. Marr K.A. The changing spectrum of candidemia in oncology patients: therapeutic implications. ***Curr Opin Infect Dis*** 2000; 13: 615-20.
9. Uzun O,Anaissie E.J.Predictors of outcome in cancar patients with candidemia. ***Ann Oncol*** 2000; 11: 1517- 21.
10. Viscoli C, Girmenia C, Marinus A. Candidemia in cancer patients: a prospective,multicenter surveillance study by the invasive fungal infection group (IFIG) of the European organizatioin for research and treatment of cancer (EORTC). ***Clin Infect Dis*** 1999; 28: 1071- 9.
11. Koc M, Aktas E. Prophylactic treatment of mycotic mucositis in radiotherapy of patients with head and neck cancers. ***Jpn J Clin Oncol*** 2003; 33(2): 57- 60.
12. Martin C, Roberts D, Weide M, Rossau R,Jannes G, Smith T,et al. Development of a PCR- based line probe assay for identification of fungal pathogens. ***J Clin Microbiol*** 2000; 38(10): 3735- 3742.
13. Galan A, Veses V, Murgui A, Casanova M, Martinez J.P. Rapid PCR- based test for identifying Candida albicans by using primers derived from the PH-regulated KER1 gene. ***FEMS Yeast Res*** 2006; 6: 1094- 1100.
14. Calderone R.A. Candida and candidiasis, Ist edn. ASM press, Washington, DC. 2002.
15. Dignani M.C, Solomkin J.S, Anaissie E.J. Candida. In: Anaissia E.J, Mcginnis M.R, Pfaller M.A; editors. ***Clinical Mycology.*** New York: Churchill Livingstone; 2003, P: 196.
16. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one- enzyme PCR-RFLP assay for identification of six

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-22]

www.SID.ir

medically important Candida species. ***Jpn J Med Mycol*** 2006; 47: 225- 229.

17. Munoz C.B, Boldo X.M, Tanaca L.V, Rodriguez C.H. Identification of Candida spp.by Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis and differentiation between Candida albicans and Candida dubliniensis by direct PCR methods. ***J Clin Microbiol*** 2003; 41(1): 414- 420.
18. Leaw S.N, Chang H.C, Sun H.F, Barton R, Bouchara J.P, Chang T.C. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. ***J Clin Microbiol*** 2006; 44(3): 693- 699.
19. Tabrizi SN, Pirotta MV, Rudland E, Garland SM. Detection of Candida species by PCR in self- collected vaginal swabs of women after taking antibiotics. ***Mycoses*** 2006; 49: 523- 524.
20. Kamiya A,Kikuchi A, Tomita Y, Kanbe T. Epidemiological study of Candida mix specific for the DNA topoisomerase Π gene. ***J of Dermatol Science*** 2005; 37: 21- 28.
21. Bu R, Sathiapalan RK, Ibrahim MM, et al. Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of Candida and Aspergillus. ***J Med Microbiol*** 2005; 54: 243- 248.
22. Kurtzman C.P, Robnett C.J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts besed on nucleotide divergence in the 5' end of the Large- Subunite (26S) ribosomal DNA gene. ***J Clin Microbiol*** 1997; 35(5): 1216- 1223.
23. Davies A.N, Brailsford S, Broadley K, Beighton D. Oral yeast carriage in patients with advanced cancer. ***Oral Microbiol Immunol*** 2002; 17: 79- 84.
24. Leung W.K, Dassanayake R.S, Yau J.Y,et al. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of Candida species in irradiated,dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. ***J Clin. Microbiol*** 2000; 38: 2219.
25. Pfaller M.A, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for Candida albicans,Candida tropicalis, Candida krusei and Candida(Torulopsis) glabrata. ***J Clin Microbiol*** 1996; 34: 58- 61.
26. Safdar A, Chaturvedi V, Cross E.W, Park S, Bernard E.M, Armstrong D, et al. Prospective study of Candida species in patients at a comprehensive cancer center. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy*** 2001; 45(7): 2129-2133.
27. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis: a review. ***Postgrad Med J*** 2002; 78: 455- 459.
28. Pfaller M.A, Messer S.A, Hollis R.J, Jones R.N, Doern G.V, Brandt M.E, et al. Trend in species distribution and susceptibility to fluconazole among blood stream isolates of Candida

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-22]

www.SID.ir

species in the United States. ***Diagn Microbiol Infect Dis*** 1999; 33: 217- 222.

29. Fell J.W, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell- Tallman A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by Large- Subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. ***Int J Syst Evoi Microbiol*** 2000; 50: 1351- 1371.
30. Forche A, Schonian G, Graser Y, Vilgalys R, Mitchell T.M. Genetic structure of typical and atypical populations of Candida albicans from Africa. ***Fungal Genetics and Biology*** 1999; 28: 107-125.
31. Li J, Xu Y.C, Bai F.Y. Candida pseudorugosa sp. nov; a novel yeast species from sputum. ***J Clin Microbiol*** 2006; 44(12): 4486- 4490.
32. Pryce T.M, Palladino S, Price D.M, Gardam D.J, Campbell P.B, Christiansen K.J, et al. Rapid identification of fungal pathogens in BacT/ALERT, BACTEC, and BBL MGIT media using Polymeras Chain Reaction and DNA sequencing of the internal transcribed spacer regions. ***Diagn microbial Infect Dis*** 2006; 54: 289- 297.
33. Unzaga M.j, Gallego L, Berdonces P, Dones J.R, Cisterna R. Diagnosis of candidosis by amplification of small subunit of 18S rRNA gene. ***Rev Iberoam Micol*** 1997; 14: 23-25.
34. Bu R, Sathiapalan R.K, Ibrahim M.M, Al- Mohsen I, Almodavar E, Gutierrez M.I,et al. Monochrome lightcycler PCR assay for detection and quantification of five common species of Candida and Aspergillus. ***J Med Microbiol*** 2005; 54: 243- 248.
35. Chen Y.C, Eisner J.D, Kattar M.M, Rassoulian- Barrett S.L, Lafe K, Yarfitz S.L, et al. Identification of medically important yeasts using PCR- based detection of DNA sequence polymorphisms in the Internal Transcribed Spacer 2 region of the rRNA genes. ***J Clin Microbiol*** 2000; 38(6): 2302- 2310.
36. Millar B.C, Moore J.E, Xu J, Walker M.J, Hedderwick S, Mcmullan R. Genotypic subgrouping of clinical isolates of Candida albicans and Candida dubliniensis by 25S intron analysis. ***Letters in Applied Microbiology*** 2002; 35: 102- 106.
37. klingspor L,Jalal S. Molecular detection and identification of Candida and Aspergillus spp. from clinical samples using real- time PCR. ***Clin Microbiol Infect Dic, CMI*** 2006; 12: 745- 753.

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-22]

www.SID.ir