شناسایی گونه های بیماریزای جنس کاندیدا در بیماران مبتلا به کاندیدمی به روش Seminested PCR

دکتر محمد حسن شاه حسینی*و**، دکتر محمد قهری***، محمد نعمتیان سوته****، دکتر سارا سعادتمند*****، دکتر سید احمد حسینی******دکتر عباسعلی ایمانی فولادی*******

*دکترای بیوتکنولوژی، دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیستشناسی

** دکترای بیوتکنولوژی، دانشیار دانشگاه آزاد اسلامي واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژي

***دکترای قارچ شناسی پزشکی، استادیاردانشگاه امام حسین، گروه علوم زیستی

****دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

*****دکترای فیزیولوژی گیاهی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی

******دکترای علوم آزمایشگاهی، آزمایشگاه رسالت، تهران.

*******دکترای باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله

چکیده

زمینه و هدف: افزایش شیوع عفونت های قارچی و از جمله عفونت های ناشی از کاندیدا در طی دو دهه اخیر وهمچنین شیوع بیشتر بیماری ایدز و نیز بدخیمی ها و افزایش افراد مبتلا به اختلالات سیستم ایمنی زمینه را برای افزایش شیوع کاندیدیازیس سیستمیک و سپتی سمی کاندیدایی خصوصا با گونه های کاندیدا غیر آلبیکنس فراهم کرده است. هدف از انجام این مطالعه تعیین هویت گونه های کاندیدا جدا شده از نمونه های کشت خون با استفاده از روش مولکولی Seminested PCR است.

روش بررسی: نمونه های کشت خون که از نظر رشد عوامل مخمری دارای نتایج مثبت بوده اند از جهت حضور کاندیدا با آزمون های شناسایی مبتنی بر مرفولوژی، بررسی رنگ کلنی روی محیط کروم آگار کاندیدا، آزمون لوله زایا و تولید کلامیدوسپور روی محیط کورن میل آگار دارای۱ درصد توئین۸۰ و با استفاده از روش ژنوتیپی به نام Seminested PCR ، مورد بررسی قرار گرفتند. DNAی همه نمونه ها به طور مستقیم از خون و با استفاده از کیت DNG-plus استخراج شد و برای PCR مرحله اول از پرایمرهای CTSF و CTSR که قطعه ITS2 (Internal Transcribed Spacer2) را تکثیر می کند استفاده شد. محصول مرحله اول به عنوان DNAی الگو برای انجام PCR مرحله دوم با استفاده از پرایمر عقبی مرحله اول(CTSR) و در حضور پرایمرهای اختصاصی گونه به نام های CADET ، CPDET، CTDET، CGDET و CDDET که به ترتیب برای شناسایی گونه های کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا دابلینیزسیس استفاده شد. گونه مخمر با توجه به الگوی باندهای ایجاد شده روی ژل و اندازه آن تشخیص داده شد.

یافته ها: ۱۶گونه کاندیدا از۱۴ نمونه خونی جدا و شناسایی شد، که از این تعداد، ۶ مورد کاندیدا آلبیکنس، ۴مورد کاندیدا پاراپسیلوزیس، ۴ مورد کاندیدا گلابراتا، ۲مورد کاندیدا تروپیکالیس است. در دو نمونه خون، به طور همزمان دو گونه کاندیدا مشاهده و تعیین هویت شد(عفونت Mix) . کاندیدا دابلینینسیس در هیچ نمونه ای مشاهده نشد.

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

واژه های کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، Seminested PCR ، ITS2 .

مقدمه

گونه های کاندیدا مخمرهای کوچکی با دیواره نازک و به ابعاد 4 تا 6 میکرون هستند که از طریق جوانه زدن تکثیر می یابند. جنس کاندیدا، متعلق به رده ساکارومایستال و خانواده ساکارومایستاسه می باشد. هفت گونه در جنس کاندیدا، از شایع ترین گونه های عامل عفونتهای فرصت طلب شناخته شده می باشند در حالی که بیماری زایی سایر گونه ها به صورت موردی گزارش شده است (۲و۱). کاندیدیازیس، عفونتی است که توسط گونه های مختلف کاندیدایی، به خصوص کاندیدا آلبیکنس، ایجاد می شود. در طی دو دهه اخیر فراوانی و شدت این عفونت ها به دنبال استفاده وسیع از آنتی بیوتیک ها، استروئیدها و سایر داروهای سرکوبگر ایمنی، افزایش چشمگیری یافته است. گونه های کاندیدا به صورت همزیست انسانی و حیوانی، در همه جا یافت می شوند. گونه های متعددی باعث کاندیدیازیس پوست، کاندیدیازیس دهان، واژینیت کاندیدایی، اونیکومایکوزیس کاندیدایی (عفونت ناخن) و سایر عفونت های سطحی می شوند که این موارد در افراد سالم نیز دیده می شود. عفونت های عمقی کاندیدایی که خون و یا سایر احشاء داخلی را درگیر می سازد (کاندیدیازیس سیستمیک) در افرادی که دچار ضعف یا نقص سیستم ایمنی هستند، دیده می شود(۵-۳). امروزه بیماری کاندیدیازیس به عنوان یک مشکل مهم و به خصوص در بیماران بستری در بیمارستان ها قلمداد می شود. هر چند در گذشته تا سال۱۹۸۰ گونه کاندیدا آلبیکنس به عنوان شایع ترین گونه بیماریزا معرفی می شد ولی از دو دهه گذشته با شیوع روزافزون ایدز و همچنین شیوع بدخیمی ها و افراد ایمنوساپرس، روز به روز بر شیوع کاندیدیازیس سیستمیک و سپتی سمی کاندیدایی خصوصا با عوامل غیر آلبیکنس افزوده شده است.(٦) مهمترین چالش در مواجهه با بیماری کاندیدیازیس، ضایعات با عوامل اتیولوژیک گونه های کاندیدا به غیر از کاندیدا آلبیکنس است که به علت مقاومت دارویی آنها به داروهای متداول ضد قارچی می باشد. این گونه ها که تحت عنوان پاتوژن های نوپدید مطرح اند، عامل عفونت های غیرقابل کنترل در بیمارستان ها می باشند. به عنوان مثال گونه های کاندیدا کروزئی و کاندیدا گلابراتا به فلوکونازول و گونه های کاندیدا لوزیتانیا و کاندیدا تروپیکالیس به آمفوتریسین B مقاوم می باشند. بنابراین تعیین هویت سریع گونه های بیماری زا و تشخیص عوامل اتیولوژیک نمونه ها با چندین عامل بیماری زای کاندیدایی (عفونت Mix) الزامی است(۷و٦). خوشبختانه تکنیک های مولکولی شناسایی بر پایه DNA ، افتراق صحیح و سریع گونه های مختلف کاندیدا را ممکن می سازد. روش های متعددی از

گذشته تا حال برای تعیین هویت گونه های بیماری زای کاندیدا به کار رفته است. این روش ها را به طور کلی می توان به دو گروه فنوتیپیک و ژنوتیپیک تقسیم نمود. روش های فنوتیپیک به طور مثال شامل بررسی خصوصیات مورفولوژی مخمرها در محیط عصاره مالت آگار، بررسی روش های جذب و تخمیر قندها، روش های سرولوژی، استفاده از محیط های رنگ زای تجاری همانند محیط کشت کروم آگار کاندیدا بوده و میتوان از روش های دیگر نیز نام برد(۹و۸). روش های تشخیصی ژنوتیپی نیز متنوع می باشند. از جمله می توان به استفاده از پرایمرهای اختصاصی در PCR ، تعیین توالی نواحی ژنی خاص، و real-time PCR اشاره نمود(۱۱و۱۰). تمام روش های اشاره شده مفید بوده و هر کدام مزایا و محدودیت های خاص خود را دارند. اگرچه روش های سنتی مانند جذب و تخمیر قندها برای تعیین گونه های مخمری از جمله کاندیدا قابل استفاده است، ولی این روش بسیار وقت گیر بوده و برای بیمار و پزشک مفید نیست زیرا حداقل به یک تا دو هفته زمان برای خواندن نتایج نیاز دارند. این روش ها همچنین غیر حساس، پرهزینه و پرزحمت است(۱۲). روش های دیگر تشخیص شامل ردیابی آنتی بادی، عمدتا در افراد ایمنوساپرس غیرقابل استفاده است زیرا این افراد توانایی پاسخ به عفونت به وسیله تولید آنتی بادی را ندارند و یا در صورت تولید آنتی بادی، مقدار آن برای ردیابی ناکافی می باشد(۲۰). ولی استفاده از روش های تشخیصی بر پایه DNA همانند PCRدارای حساسیت و ویژگی بالا می باشد. در این مطالعه، ضمن انجام آزمایش های متداول جهت شناسایی گونه های پاتوژن و شایع کاندیدا بر روی نمونه های خون بدست آمده از بیماران، از روش مولکولی به نام Seminested PCR برای شناسایی کاندیداهای مهم پاتوژن شامل کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا دابلینینسیس استفاده شد(۱۴و۱۳).

روش بررسی:

این پژوهش به صورت یک مطالعه توصیفی مقطعی برای شناسایی و تعیین هویت گونه های کاندیدا در نمونه های خون بیماران، با استفاده از روش مولکولی Seminested PCR (snPCR) انجام شده است. از مجموع ۲۵۱۶ نمونه خون افراد بیمار که از بخش های مختلف بیمارستان بقیه الله جهت بررسی حضور یا عدم حضور عوامل بیماریزا به آزمایشگاه میکروب شناسی آن بیمارستان بین اردیبهشت تا آذر ماه ۱۳۸۸ ارسال شده بود، ۱۴ مورد دارای نتایج کشت خالص از نظر وجود عوامل مخمری بودند. نمونه های خونی که از نظر حضور کاندیدا مثبت بودند جمع آوری شد تا با انجام آزمون های مختلف فنوتیپی و آزمون مولکولی، تعیین هویت شوند.

سوش ها: شامل دو گروه بودند: الف) سویه های کاندیدا که واجد هویت مشخص بودند.(این گونه ها درون تیوب های حاوی گلیسرول۲۰%، در فریزر با دمای ۲۰°C – نگهداری می شدند.) ب) ایزوله های مخمری جدا

شده از خون افراد بیمار. در این تحقیق مجموعا ۱۶ ایزوله کاندیدایی از۱۴ مورد نمونه خون بیمار جدا و شناسایی شد.

کشت بر روی محیط کروموژنیک کروم آگار کاندیدا: از نمونه های کاندیدا گروه اول که کاندیدا آلبیکنس،کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا دابلینینسیس را شامل می شد برای کنترل آزمایشات و همچنین بهینه نمودن PCR استفاده شد. برای این منظور، گونه های مختلف کاندیدا روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار(Merck) تلقیح شده و درون انکوباتور با دمای۳۷°C نگهداری شد . بعد از گذشت ۴۸ تا ۷۲ ساعت کلنی ها بر روی محیط کشت ظاهر شدند. با استفاده از لوپ استریل مقدار کمی از مخمر های گونه های مختلف بر روی محیط کشت افتراقی کروم آگار کاندیدا (CHROMagar Company, France) کشت داده شد. محیط های کشت تلقیح شده درون انکوباتور با دمای۳۷°C نگهداری شد و بعد از گذشت ۴۸ ساعت، کلنی های ظاهر شده از نظر مورفولوژی کلنی و رنگ پیگمان تولید شده مورد بررسی قرار گرفتند.این تست بر روی ایزوله های جدا شده از نمونه های خونی نیز انجام شد.

آزمون لوله زایا : برای انجام آزمون لوله زایا که یکی از ابتدایی ترین روش های تشخیصی کاندیدا آلبیکنس است، توسط یک آنس استریل از نمونه کشت تازه بیمار برداشت کرده و آن را درون نیم میلی لیتر از سرم انسان انتقال داده و بخوبی مخلوط گردید. سوسپانسیون فوق در دمای۳۷°C به مدت ۲ تا ۳ ساعت نگهداری شده سپس توسط یک آنس استریل یک قطره از سوسپانسیون فوق را روی لام گذاشته و پس از پوشاندن آن با لامل، وجود یا فقدان لوله زایا در زیر میکروسکوپ بررسی شد.

بررسی ایجاد کلامیدوکونیدی روی محیط کورن میل آگار دارای ۱ درصد توئین ۸۰ (CMA-T80): تمام مخمرهای مورد بررسی ابتدا بر روی محیط سابورو کشت داده شدند. سپس ایزوله های کشت داده شده با استفاده از آنس به صورت شیارهای کم عمق و موازی بر روی محیط کورن میل آگار حاوی توئین۸۰ (Himedia) تلقیح شده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰°C نگهداری شدند. پس از طی مدت انکوباسیون، با استفاده از درشت نمایی ضعیف میکروسکوپ وجود یا عدم وجود کلامیدوکونیدی مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج DNA کاندیدا از محیط کشت و خون: جهت استخراج DNA از کاندیداهای رشد یافته در محیط کشت از روش جوشاندن استفاده گردید. برای این منظور یک لوپ از کلنی تازه را برداشته و به تیوب ۱/۵میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر منتقل گردید. سپس تیوب در درون آب در حال جوش قرار گرفت. پس از گذشت ۲۰ دقیقه تیوب را خارج و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع رویی که حاوی DNA مخمر می باشد را وارد تیوب جدید کرده و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰ – درجه سانتیگراد نگهداری شد. جهت استخراج DNA از نمونه

های خون بیماران از کیت DNG-plus شرکت سیناژن و مطابق با دستورالعمل آن استفاده گردید.

واکنش PCR مرحله اول: برای انجام مرحله اول PCR از مواد زیر با غلظت های ذکر شده برای یک واکنش ۲۵ میکرولیتری استفاده شد: ۲/۵میکرولیتر از بافر 10X ، ۰/۷۵میکرولیتر (50mM) MgCl2 ، ۱ میکرولیتر(10mM) dNTPs،۱میکرولیتر از پرایمر جلویی CTSF ، ۱میکرولیتر از پرایمر عقبی CTSR ، ۰/۲۵میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (5u/µl) ، ۳ میکرولیتر DNA الگو و ۱۵/۵میکرولیتر آب مقطر دیونیزه شده. سیکل های گرمایی دستگاه ترموسایکلر برای انجام PCR مرحله اول بدین شرح بود: دناتوراسیون ابتدایی ۹۴°C به مدت ۲ دقیقه که با ۳۰ سیکل به صورت زیر دنبال می شود: دناتوراسیون ۹۴°Cبه مدت ۱ دقیقه، اتصال ۶۰°C به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و یک مرحله تکثیر انتهایی ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه.

واکنش PCR مرحله دوم: ۲/۵میکرولیتر از بافر 10X ، ۰/۷۵میکرولیتر (50mM) MgCl2 ، 1 میکرولیتر(10 mM) dNTPs، ۱ میکرولیتر پرایمر عقبی CTSR ، ۱ میکرولیتر پرایمر اختصاصی گونه، ۰/۲۵میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase(5u/µl) ، ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۱۶/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه شده تا حجم کل را به ۲۵ میکرولیتر برسانند. . پروتکل دمایی برای انجام PCR مرحله دوم همانند مرحله اول است، ولی تعداد سیکل ها از ۳۰ سیکل به ۲۵ سیکل کاهش یافت.

مشاهده محصول PCR : محصول PCR مرحله اول (بین۳۰۹ bp تا ۴۱۳ bp متناسب با نوع کاندیدا) در ژل آگارز ۱/۸% و محصول PCR مرحله دوم در ژل آگارز ۲/۵% حاوی اتیدیوم بروماید (سیناژن 10 mg/ml) در بافر TBE 1X الکتروفورز گردید.

تعیین اختصاصیت و حساسیت تست PCR بهینه شده : برای تعیین اختصاصیت تست PCR بهینه شده، DNA گونه های کاندیدا و DNA جنس های باکتریایی مختلف و همچنین نمونه DNA انسان را استخراج کرده و با انجام PCR روی این نمونه ها، ویژگی تست مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین حساسیت تست PCR بهینه شده، رقتهای سریال از گونه کاندیدا آلبیکنس تهیه شد و تعداد مخمرها با استفاده از لام نئوبار و زیر میکروسکوپ نوری شمارش شد. سپس از هر رقتی که به این ترتیب آماده گردید مقدار ی از آن را برداشته و DNA با روش جوشاندن استخراج شد. سپس با استفاده از DNA های استخراج شده و نمونه کنترل مثبت و منفی، حساسیت تست PCR تعیین گردید.

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

یافته ها:

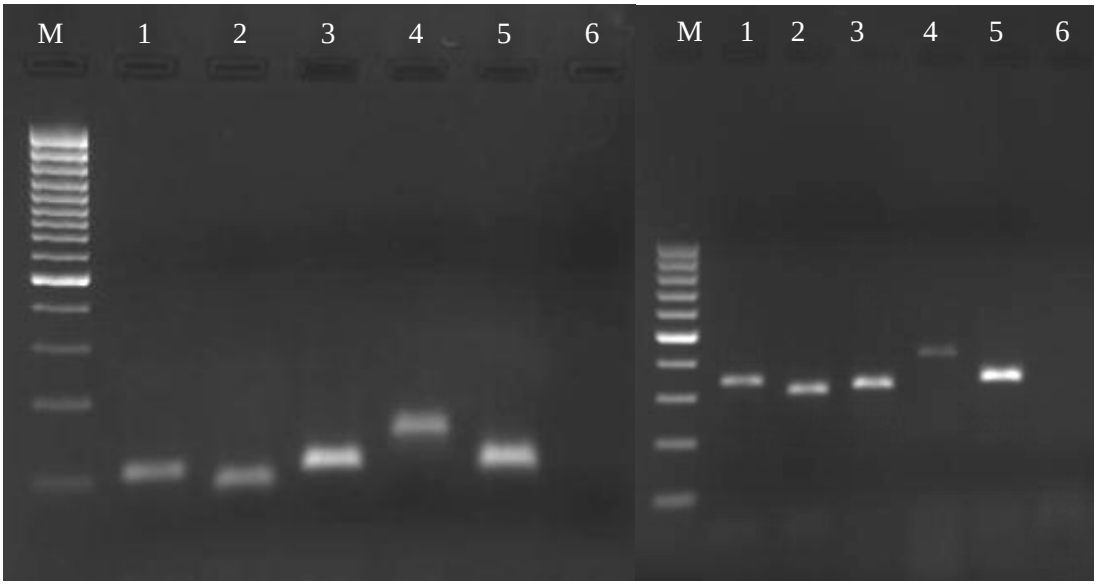
نمونه های خونی از نظر حضور کاندیدا با روش های فنوتیپیک و ژنوتیپیک مورد بررسی قرار گرفتند. در۱۴ نمونه خونی، ایزوله های کاندیدایی شناسایی و تعیین هویت شدند. ۱۶گونه کاندیدا به ترتیب شامل۶ مورد کاندیدا آلبیکنس، ٤ مورد کاندیدا پاراپسیلوزیس، ٤ مورد کاندیدا گلابراتا و ۲ مورد کاندیدا تروپیکالیس شناسایی شد. در دو نمونه خون به طور همزمان، دو گونه مختلف کاندیدا مشاهده شد (کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا تروپیکالیس در نمونه خون مربوط به بیمار اول، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس در بیمار دوم). در هیچ یک از نمونه های بالینی کاندیدا دابلینینسیس مشاهده نشد.

شناسایی فنوتیپی: گونه های کاندیدا که از قبل هویت آن برای ما مشخص بود، در محیط کشت کروم آگار کاندیدا ، کلنی های کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا دابلینینسیس به ترتیب به رنگ سبز، صورتی پر رنگ، کرم- صورتی کم رنگ، آبی و سبز نمایان شدند. البته شناسایی از روی رنگ (با توجه به رنگ های معرفی شده در کاتالوگ شرکت سازنده) بین گونه های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس دشوار می باشد و در ضمن رنگ کلنی حاصل از مخمر کاندیدا پاراپسیلوزیس غیر اختصاصی می باشد. آزمون لوله زایا در گونه های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس مثبت بود. بر روی این پنج گونه کاندیدا، تست کورن میل آگار توئین ۸۰ انجام شد. .نتایج به دست آمده شامل مشاهده بلاستوسپور، هایف های کاذب و حقیقی به همراه کلامیدوکونیدی در کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس، و در مورد کاندیدا گلابراتا فقط بلاستوسپور و در کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا تروپیکالیس علاوه بر بلاستوسپور، هایف های کاذب نیز مشاهده گردید.

نمونه های خون مورد مطالعه (با استفاده از ظروف کشت حاوی محیط BHI- شرکت کوشافرآور گیتی) به محیط کشت سابورو و سپس کروم آگار کاندیدا تلقیح شدند. در این آزمون، کلنی های رشد یافته مربوط به دو بیمار که مبتلا به عفونت مخلوط شده بودند به صورت تک رنگ نبود، از اینرو با دقت کلنی های متفاوت جدا و به محیط کشت جدید برای بررسی بیشتر انتقال داده شد. آزمون لوله زایا ٦ ایزوله از ١٦ ایزوله جدا شده از نمونه خون که بر روی کروم آگار کاندیدا کلنی های سبز روشن تولید کرده بودند، مثبت بود و روی محیط CMA T80 کلامیدوکونیدی تولید کردند. ٤ایزوله، کلنی های صورتی کم رنگ ایجاد کرده بودند و روی محیط CMA T80 ، بلاستوسپور به همراه هایف های کاذب تولید کردند و جواب آزمون لوله زایا در آن ها منفی بود. ٤مورد نیز در محیط رنگ زای کروم آگار کاندیدا کلنی های صورتی براق و گنبدی شکل تولید کردند و تست لوله زایا آن ها، منفی بود و روی محیط CMA T80 فقط بلاستوسپور تولید کردند. ۲ایزوله نیز کلنی

هایی به رنگ آبی ایجاد کرده و آزمون لوله زایا آنها منفی بود، در ضمن روی محیط CMA T80 بلاستوسپور به همراه هایف های کاذب تولید کردند.

شناسایی ژنوتیپی: شکل ۱ الکتروفورز محصولات PCR مرحله اول و دوم بعد از بهینه سازی است. در این مورد DNAی الگو به طریق جوشاندن از گونه های کاندیدا که هویت آن ها مشخص بود استفاده شد.



شکل1a

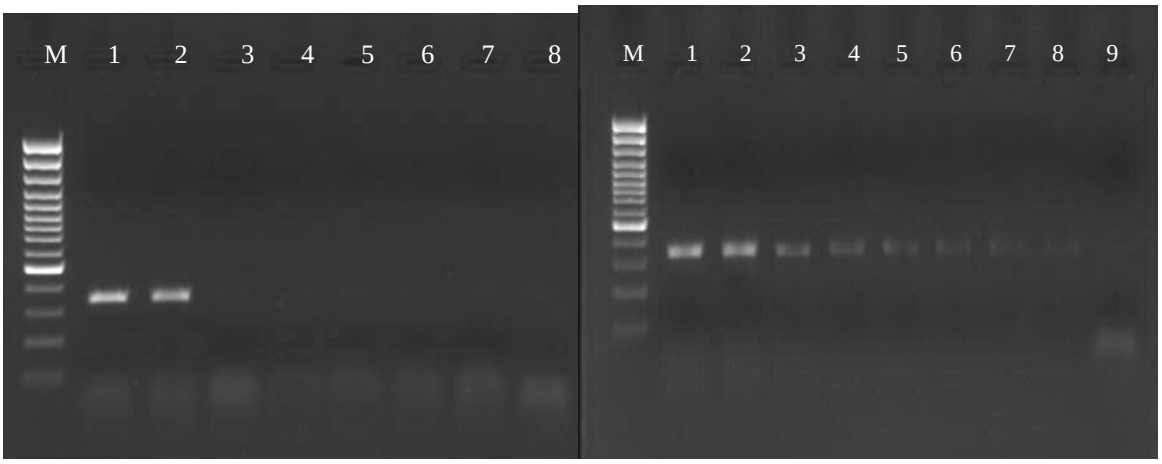
شکل 1b

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

شکل 1a – لاین M : سایز مارکر شرکت فرمنتاس 100bp DNA ladder **، 1: محصول** PCR **مرحله اول حاصل از** DNA**ی ژنومی کاندیدا آلبیکنس، 2: کاندیدا پاراپسیلوزیس، 3: کاندیدا تروپیکالیس، 4: کاندیدا گلابراتا، 5: کاندیدا دابلینینسیس، 6: کنترل منفی.**

شکل 1b- لاین M : سایز مارکر شرکت فرمنتاس 100bp DNA Ladder plus **، 1 : محصول** snPCR **حاصل از** DNA**ی کاندیدا آلبیکنس، 2: کاندیدا پاراپسیلوزیس، 3: کاندیدا تروپیکالیس، 4: کاندیدا گلابراتا، 5: کاندیدا دابلینینسیس، 6: کنترل منفی.**

حساسیت تست Seminested PCR در این مطالعه ۷ سلول مخمر کاندیدا آلبیکنس تعیین شد. همچنین این تست دارای ویژگی بسیار بالا بوده به طوری که بجز با DNA کاندیدا آلبیکنس با هیچ کدام از DNA های بکار رفته در این آزمایش واکنش نشان نداد. (شکل۲).



شکلa 2

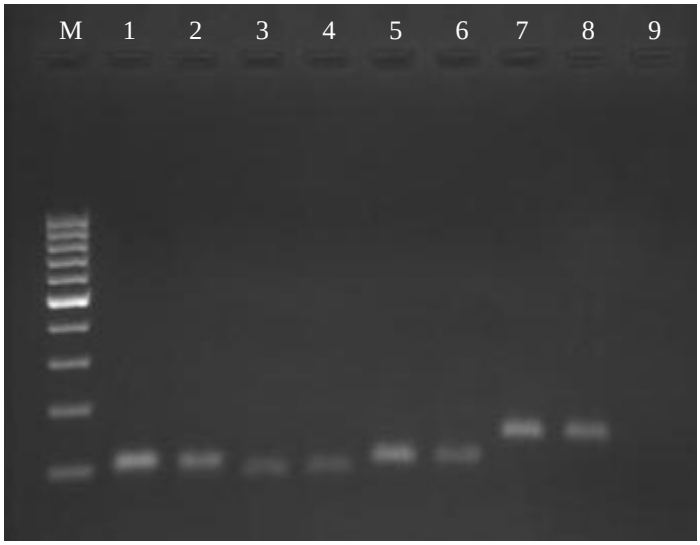
شکل 2b

شکل ۲- حساسیت و ویژگی تست PCR .

شکل 2a- لاین M: سایز مارکر شرکت فرمنتاس 100bp DNA Ladder plus ، 1: نمونه کنترل مثبت، 9-2 : نمونه های مشخص و به ترتیب شامل2: 42250 CFU ، 3: 7605 CFU ، 4: 1690 CFU ، 5: 338 CFU ، 6: 64 CFU ، 7: 18 CFU ، 8: 7 CFU ، 9: کنترل منفی.

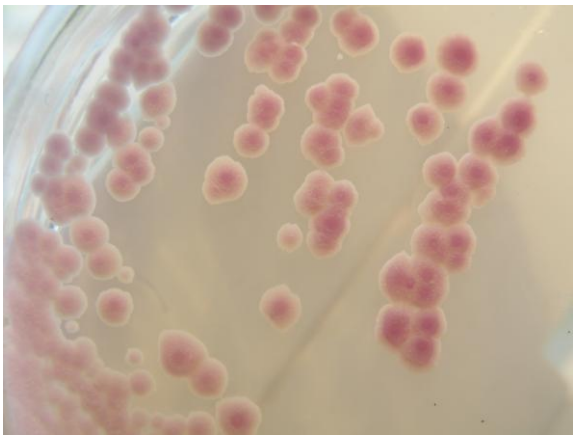
شکل b 2 – لاین M : سایز مارکر شرکت فرمنتاس 100bp DNA Ladder plus ، 1: نمونه کنترل مثبت(کاندیدا آلبیکنس) ، 2: کاندیدا آلبیکنس، 3: DNAی انسان، 4: DNAی استافیلوکوکوس اورئوس، 5: DNAی سودوموناس آئرژنوزا، 6: DNAی اشریشیا کلی ، 7: DNAی باسیلوس سرئوس، 8: کنترل منفی.

نتایج به دست آمده حاصل از بکارگیری روش تشخیصی Seminested PCR بر روی نمونه های بالینی شامل شناسایی و تعیین هویت ٦ مورد کاندیدا آلبیکنس،٤ مورد کاندیدا پاراپسیلوزیس، ٤ مورد کاندیدا گلابراتا و ٢ مورد کاندیدا تروپیکالیس بود. (شکل۳). نتیجه آزمون ژنوتیپی با آزمون های فنوتیپی کاملا مطابقت داشت. جهت بررسی و نایید محصولات PCR مرحله دوم مربوط به گونه های مختلف کاندیدا، قطعات DNA توسط تکنیک sequencing تعیین توالی شدند. مقایسه توالی های حاصل با سکانس های موجود از طریق برنامه BLAST ، مطابقت حدود ۱۰۰درصد را نشان داد.



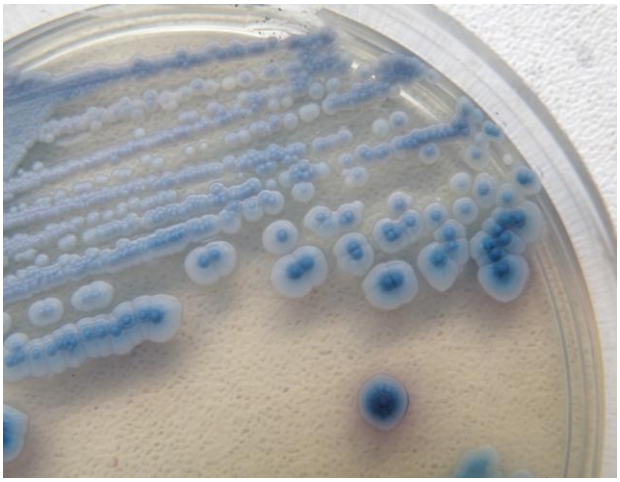
شکل ۳- محصول PCR مرحله دوم چهار گونه کاندیدا شناسایی شده در نمونه های خون در کنار کنترل مثبت را نشان می دهد.

لاین M: سایز مارکر شرکت فرمنتاس 1oobp DNA Ladder ، 1: کنترل مثبت کاندیدا آلبیکنس، 2: کاندیدا آلبیکنس جدا شده، 3: کنترل مثبت کاندیدا پاراپسیلوزیس، 4: کاندیدا پاراپسیلوزیس جدا شده ، 5: کنترل مثبت کاندیدا تروپیکالیس، 6: کاندیدا تروپیکالیس جدا شده ، 7: کنترل مثبت کاندیدا گلابراتا، 8: کاندیدا گلابراتا جدا شده ، 9: کنترل منفی.



کاندیدا کروزئی – کشت درمحیط کروم آگار کاندیدا

کاندیدا آلبیکنس (سمت راست) و کاندیدا پاراپسیلوزیس (سمت چپ): کشت درمحیط کروم آگار کاندیدا



کاندیدا تروپیکالیس:کشت درمحیط کروم آگار کاندیدا

کاندیدا گلابراتا: کشت در محیط کروم آگار کاندیدا

بحث: امروزه به دلیل شیوع بیماری کاندیدیازیس و همچنین مقاومت دارویی بعضی از گونه های کاندیدا، تعیین هویت عوامل بیماریزا در سطح گونه بسیار ضروری به نظر می رسد. کاندیدیازیس خونی با مرگ و میر چشمگیری همراه می باشد بنابراین این دسته از بیماران باید هر چه سریع تر تحت درمان ضد قارچی قرار بگیرند. اغلب موارد کاندیدیازیس عمقی در میزبان های ضعیف شده دیده می شوند. اشکال احشایی و کشنده کاندیدایی بیشتر در افراد نوتروپنیک مبتلا به بدخیمی تحت درمان و یا بیماران بخش جراحی یا سوختگی دیده می شود. سرکوب ایمنی میزبان منجر به عفونت خونی کاندیدیازیس می شود. (۱۶ و۵و٤) مهمترین عامل های مستعد کننده شامل بدخیمی خونی، پیوند مغز استخوان یا پیوند عضو و درمان سرکوب کننده ایمنی شامل شیمی درمانی سرطان، درمان با کورتیکواستروییدها و غیره می باشد. (۱۸و۱۷) با استفاده از روش های تشخیص آزمایشگاهی مرسوم همانند به کارگیری محیط های کشت معمولی مانند سابورو دکستروز آگار، امکان تعیین گونه های کاندیدا وجود ندارد. بکارگیری محیط کشت افتراقی کروم آگار کاندیدا که کروموژنیک می باشد، محدود به شناسایی چند گونه از کاندیداهای پاتوژن می باشد، بعلاوه نسبت به روش های مولکولی نوین، به زمان بیشتری برای دستیابی به جواب نیازمند است. (۱۹ و۹) تست های بیوشیمیایی وقت گیر و یا در بعضی موارد پرهزینه می باشد. به طور کلی آزمایشهای سرولوژی که در حال حاضر در دسترس هستند، حساسیت یا جنبه اختصاصی محدودی دارند. آنتی بادی سرمی و ایمنی با واسطه سلولی در اکثر افراد قابل مشاهده هستند که ناشی از تماس دائمی با کاندیدا می باشد. متاسفانه شناسایی آنتی بادی های کاندیدا در مدت زمان کوتاهی به سرعت، حساسیت و ویژگی خود را از دست می دهد. در ضمن آنتی بادی در افراد با ایمنی سرکوب شده به علت عدم توانایی پاسخ به عفونت به وسیله تولید آنتی بادی، دشوار می باشد. در مورد آشکار سازی آنتی ژن ها، ردیابی مانان دیواره سلولی در گردش خون، با استفاده از آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس یا الایزا، بسیار اختصاصی تر است. ولی این آزمایش فاقد حساسیت می باشد، چون بسیاری از بیماران فقط بطور گذرا مثبت می شوند، بنابراین عیارهای قابل توجه و قابل ردیابی از آنتی ژن پیدا نمی کنند. (۲۰) آزمون بررسی تولید لوله زایا یکی از ابتدایی ترین روش های تشخیص کاندیدا آلبیکنس است. ۹۵تا ۹۷ درصد ایزوله های کلینیکی کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس توانایی تولید لوله زایا را دارند. بنابراین با مثبت بودن جواب آزمایش، نمی توان آن را به طور یقین به کاندیدا آلبیکنس نسبت داد و نیاز به آزمایشهای تکمیلی دیگر برای متمایز نمودن این دو گونه کاندیدا ضروری به نظر می رسد. جهت جدا نمودن کاندیداهای غیر آلبیکنس از کاندیدا آلبیکنس از محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰ استفاده می شود. در این محیط، علاوه بر کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا دابلینینسیس نیز قادر به ایجاد کلامیدوکونیدی(کلامیدوسپور) می باشد، بعلاوه این آزمایش نیز وقت گیر می باشد. امروزه روش های مولکولی در شناسایی

صحیح و سریع گونه ها کمک شایانی می نماید لذا در این مطالعه استفاده از روش مولکولی بر پایه PCR برای تعیین هویت گونه های شایع و بیماریزای کاندیدا مورد بررسی قرار گرفت. در طی دهه اخیر، جهت PCR برای تشخیص کاندیدیازیس، از ژن های مختلفی چون منطقه متغییر D1/D2 در ناحیه ژنی rDNA ، hsp90 ، ERG11 ، کیتین سنتاز، آسپارتیل پروتئیناز ترشحی، DNA میتوکندریایی، اکتین، توبولین، تعدادی از قطعات ژنی rRNA مشتق از نواحی نسخه برداری شده درونی(ITS) و 5S rRNA ، 18S rRNA و 28S rRNA انجام شده است.در این مطالعه DNA هدف قطعه rDNA بود. از این قطعه ژنی چندین کپی در هر ژنوم کاندیدا وجود دارد (۱۰۰-۵۰کپی). بطور معمول تست PCR در صورتی که DNA هدف واجد توالی های تکرار شونده باشد نسبت به اهداف تک کپی ، از حساسیت بیشتری برخوردار می باشد.(۲۲ و۲۱) از جمله زیر مجموعه های فوق العاده حفاظت شده rDNA ، قطعات ITS می باشد که در میان گونه های مختلف کاندیدا دارای سکانس های منحصر بفرد است.بنابراین با استفاده از پرایمر های مرتبط به این نقاط، شناسایی گونه های مختلف کاندیدا امکان پذیر شد. اگرچه اخیرا چندین آزمون PCR برای تکثیر rDNA گزارش شده، اما شناسایی گونه ها شامل انجام آزمون های بیشتر روی محصول تکثیر یافته است. از جمله این مراحل می توان به هضم آنزیمی محصول PCR بوسیله آنزیم های محدودالاثر(۲۴و۲۳) ، استفاده از پروب های نشان دار با مواد رادیو اکتیو و آنزیم های نشان دار و تعیین توالی محصول تکثیر شده را نام برد. (۲۸-۲۵) بسیاری از این پروسه ها، زمان بر، پر هزینه و با توجه به بکارگیری مواد رادیو اکتیو خطرناک هستند. در مقابل روش Seminested PCR که در این مطالعه بکار گرفته شد به مدت زمان کمتری (به طور میانگین ۸ تا ۹ ساعت) نیاز دارد و به پروب های هیبریدیزاسیون و مواد رادیو اکتیو احتیاج ندارد. Fujita و همکاران از سیستم Multiplex PCR برای تکثیر قطعات ژنی ITS1وITS2 استفاده کردند. در آن روش به تعداد DNA الگو بیشتری احتیاج بود در نتیجه نسبت به روش Seminested PCR از حساسیت کمتری برخوردار است.(۲۶ و۱۳) میرهندی و همکاران روش PCR-FSP را برای تکثیر قطعه ITS1 و ITS2 و شناسایی گونه های کاندیدا استفاده نمود، اما افتراق کاندیدا آلبیکنس از کاندیدا دابلینینسیس با این روش میسر نبود.(۳۰) سهیل احمد و همکاران از روش Seminested PCR در کنار سیستم های تشخیصی Vitekو ID32C برای شناسایی کاندیداهای بیماریزا از نمونه های سرم بیماران استفاده کردند و با توجه به نتایج به دست آمده، ویژگی این تست ۹۹ درصد و حساسیت تست به اندازه تشخیص یک ژنوم کاندیدا در هر میلی لیتر سرم بیان شد.(۱۳)در مطالعه حاضر DNA ی گونه های مختلف کاندیدا بطور مستقیم از نمونه های خون با استفاده از کیت DNG plus استخراج شده و به عنوان DNA الگو مورد استفاده قرارگرفت. همچنین با استفاده از روش Seminested PCR ، می توان عفونت های مخلوط(Mix) را تشخیص و گونه های کاندیدا درگیر در این نوع عفونت را تعیین هویت نمود. کارایی این روش تشخیصی با توجه

به نتایج بدست آمده برای شناسایی گونه های مخمری که از قبل تعیین هویت شده بودند و همچنین برای شناسایی ایزوله های خونی مجهول بیماران، نشان داده شد. این روش به عنوان یک روش سریع، مطمئن و دارای حساسیت و ویژگی بالا در تشخیص گونه های بیماریزای کاندیدا در آزمایشگاه های بالینی توصیه می شود.

نتیجه گیری:

با توجه به نتایج به دست آمده می توان بیان کرد که روش Seminested PCR که در این تحقیق برای شناسایی کاندیداهای پاتوژن استفاده شد دارای حساسیت و ویژگی بالا بوده و نسبت به روش های متداول تشخیصی به مدت زمان کمتری نیاز دارد.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله نویسندگان مقاله از آقای رضا داورزنی سوپروایزر آزمایشگاه رسالت به خاطر در اختیار گذاشتن امکانات فنی آزمایشگاهی و خانم صدیقه بیرقی کارشناس آزمایشگاه به خاطر همکاری های صمیمانه و ارزنده ی ایشان و تشکر و قدردانی می نمایند. همچنین مراتب تشکر و سپاس خود را از آقای دکتر سلطان پور ریاست آزمایشگاه بیمارستان بقیه الله و خانم مجیدی، خانم جدی و آقای افشار از همکاران بخش میکروب شناسی این آزمایشگاه، و نیز خانم آقاپور همکار آزمایشگاهی بیمارستان دکتر شریعتی برای در اختیار گذاشتن نمونه های کشت خون ابراز می دارند.

منابع:

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

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

3.Reise E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D C, ebeaupuis J P, Hanazawa R, Latage J P, Lortholary J, Makimura K, Morrison C. J,. Murayama S Y, Naoe S, Paris S, Sarfati J, Shibuya K, Sullivan D J, Uchida K, and Yamaguchi H (1998) . Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. Med Mycol 36(Suppl.1):249-25

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

5. Bodey GP, Anaissie Ey, Edwards JE. (1993). Definition of Candida infection – In : Bedey GP, ed. Candidiasis : pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. New York, Raven Press, 407-408.

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

7. Sandven P. lassen G. Importance of Selective Media for Recovery of Yeasts from Clinical Speciments. J of clin Microbial 1990; 37(11): 3731- 3733.

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

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

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

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

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

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

14. Suhail Ahmad Eiman Mokaddas Noura Al-Sweih Zia U. Khan Phenotypic and Molecular Characterization of Candida dubliniensis Isolates from Clinical

Specimens in Kuwait. Med Princ Pract 2005;14(suppl 1):77–83 DOI: 10.1159/000086188.

15.Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME 92002). Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. Med Mycol 40:87-109.

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

17. Dinubile M.J, Hille D, Sable C.A, Kartsonis N.A. Invasive candidiasis in cancer patients: observation from a randomized clinical trial. J Infect. 2005;50:443-449.

18. Body G.P, Mardani M, Hanna H.A. The epidemiology of Candida glabrata and Candida albicans fungemia in immunocompromised patients with cancer. Am J Med.2002;112:380-5.

19. Fricker-Hidalgo H, Orenga S, Lebeau B, Pelloux H, Brenier-Pinchart MP. Evaluation of Candida ID, a new chromogenic medium for fungal isolation and preliminary identification of some yeast species. J Clin Microbial 2005; 39:1647-1649.

20. Arjuna N.B. Ellepola and Christine J. Morrison. 2005. Laboratory diagnosis of invasive Candidiasis. The Journal of Microbiology. P.65- 84.

21.Mitchel, T. G., R. L. Sandin, B. H. Bowman, W. Meyer, and W, G. Merz, 1994. Molecular mycology: DNA probes and application of PCR technology . J. Med. Vet. Mycol. 32(Suppl. 1): 351- 366.

22.Reiss, E., K. Tanaka, G. Bruker, V. Chazalet, D. Coleman. J. P. Debeaupuis, R. Hanazawa, J. P. Latge, J. Lortholary, K. Makimura, C. J. Morrison, S.Y. Murayama, S. Naoe, S. Paris, J. Sarfati, K. Shibuya, D. Sullivan, K, Uchida, and H. Yamaguch. 1998. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. Med. Mycol.36(Suppl. 1) :249- 257.

23.Morace, G., L. Pagano, M. Sanghinetti, B. Posteraro, L. Mele, F. Equitani, G. D Amor, G.Leone, and G. Fadda. 1999. PCR-restriction enzyme analysis for detection of Candida DNA in blood from febrible patiens with hematological malignancies. J. Clin. Microbiol. 37:1871-1875.

24. Williams, D. W., M. J. Wilson, M. A. Lewis, and A. J. Potts. 1995. Identification of Candida species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. J. Clin. Microbiol. 33:2476-2479.

25.Botelho, A. R. , and R. J. Planta. 1994. Specific identification of Candida albicans by hybridization with oligonucleotides derived from ribosomal DNA internal spacers. Yeast 10:709-717.

26. Fugita, S., Y.Senda, S. Nakagughi, and T. Hashimoto. 2001. Multiplex PCR using internal transcribed spwcer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strain. J. Clin. Microbiol. 39:3617-3622.

27. Kan, V. L. 1993. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. J. Infect. Dis. 168:779-783.

28. Shin, J. H., F. S. Nolte, and C. J. Morrison. 1997. Rapid identification of Candida species in blood cultures by a clinically useful PCR method. J.Clin. Microbiol35: 1454-1459.

29. Chang, H. C., S. N. Leaw, A. H. Huang, T. L. Whu, and T. C. Chang. 2001. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. J. Clin. Microbiol. 39: 3466-3471.

30. Mirhendi and et al. Identification of pathogenic Candida species by PCR-Fragment Size Polymorphism (PCR-FSP) method. 2008. Med. Faculty J. Tehran medical school.

Identification of Pathogenic Candida Species by Seminested PCR in Candidemia

Shahhosseiny MH[1] , Ghahri M [2], Nematian Soteh M[3] , Saadatmand S[4], Hosseiny A[5], Imany Foulady A A[6]

1-Islamic Azad University, Qods Branch, Microbiology department, Iran.

2-Imam Hossein University, Biology department, Iran

3- Islamic Azad University, Science and Research branch, Biology department, Iran

4- Islamic Azad University, Science and Research branch, Biology department, Iran

5- Resalat medical laboratory, Iran

6- Baqyatollah University of Medical Sciences, Research Center for Applied Microbiology, Iran

Abstract

Background and Objective: In recent decades, the incidence of fungal infections has increased. Invasive Candida infection is an increasing cause of morbidity and mortality in the immunocompromised patients, for example, neuropenic patient with hematological malignancies, recipients of allogeneic transplants and HIV-infected individuals. There is an increasing incidence of bloodstream infections caused by Candida species. In this study, we applied Seminested PCR for detection of Candida species in blood specimens.

Materials and Methods: 14 blood samples in which were infected by Candida species from culture-proven were supplied. All yeasts were identified by germ tube test, chlamydospor production on corn meal agar and using CHROMagar Candida medium. DNA was extracted by DNG-plus kit from whole blood. The universal outer primers (CTSF & CTSR) amplified the Internal Transcribed Spacer2 (ITS2). The species-specific primers (CADET, CPDET, CTDET, CGDET and CDDET) , complementary to unique sequences within the ITS2 of each test species, amplified species-specific DNA in the reamplification step of snPCR. PCR products were identified by electrophoresis.

Results: Among 14 blood samples, 16 Candida species were detected and identified by using snPCR. The results of snPCR in Candida species identification were consisting of: 6 cases of C. albicans, 4 cases of C. parapsilosis, 4 cases of C. glabrata, and 2 cases of C. tropicalis. Two of the patients had dual infection with C. tropicalis and either C. albicans or C. glabrata. C. dubliniensis wasn't detected in blood samples.

Conclusion: The Seminested PCR that was applied and evaluated in this study is a specific and sensitive method for the diagnosis of Candidemia or hematogenous candidiasis caused by common pathogenic Candida species i.e., C. albicans, C. parapsilosis, C. tropicalis , and C. glabrata. Besides the snPCR has the added advantage of identifying Candida species in patients being rapid.

Key words: Candida albicans, Seminested PCR, ITS2.