

شناسایی مخمرهای جدا شده از مجاری ادراری در بیماران که کاتتر ادراری دارند به روش PCR-RFLP

محل انجام پژوهش: آزمایشگاه تشخیص طبی رسالت

• دکتر محمد قهری

دانشگاه امام حسین (ع)، دانشکده علوم پایه، گروه و مرکز

تحقیقات زیست شناسی

ghahri14@gmail.com

• علیرضا فراست

دانشگاه امام حسین (ع)، دانشکده علوم پایه، گروه و مرکز

تحقیقات زیست شناسی

• صدیقه بیرقی

آزمایشگاه تشخیص طبی درمانگاه شرکت ملی فولاد ایران

• دکتر سید احمد حسینی

آزمایشگاه تشخیص طبی رسالت

• رضا داورزنی

آزمایشگاه تشخیص طبی رسالت

هدف

هدف از این تحقیق بررسی میزان شیوع کاندیدوری در بیمارانی است که به دلایل مختلف از کاتتر فولی استفاده می‌کنند. همچنین در این بررسی علاوه بر روش‌های معمول آزمایشگاهی از روش‌های مولکولار بیولوژی (PCR) که به تعیین هویت دقیق و قطعی عوامل میکروارگانیسمی کمک می‌کند برای شناسایی عوامل مخمری جدا شده از نمونه‌های ادراری این دسته از بیماران استفاده گردیده است.

مقدمه

در طول دهه گذشته افزایش قابل توجهی در بروز پاتوژن‌های قارچی فرصت طلب درگیر کننده مجاری ادراری دیده شده است. گونه‌های کاندیدا پاتوژن ترین و شایع ترین قارچ‌های مجاری ادراری و تناسلی می‌باشند. افزایش بروز عفونت‌های قارچی مجاری ادراری بدوا در نتیجه افزایش جمعیت بیماران در معرض خطر به همراه افزایش استفاده از تکنولوژی‌هایی است که ته‌اجم قارچی مجاری ادراری را مستعد و تسهیل می‌نمایند. مجاری ادراری در نتیجه: ۱- فونژمی و انتشار خونی

(فونژمی می‌تواند تظاهراتی از بیماری سیستمیک قارچی باشد) و یا ۲- عفونت بالا رونده معمولا در حضور انسداد ادراری (فونژمی ثانوی به پیلونفریت بالا رونده) به عفونت قارچی مبتلا می‌گردند. (۱)

گونه‌های کاندیدا از عوامل شایع عفونت بالا رونده در مجاری ادراری انسداد یافته و کاتتریزه شده به ویژه در بیماران دیابتیک می‌باشند. بیمارانی که برای انجام پیوند کلیه داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی دریافت می‌کنند در معرض خطر برای عفونت‌های قارچی مهاجم توسط گونه‌های کاندیدا، آسپرژیلوس و کریپتوکوکوس می‌باشند.

اپیدمیولوژی

میکروارگانیسم‌های کاندیدا غالبا به عنوان ساپروفیت در سطوح خارجی زینتال یا اورترا وجود دارند، اگرچه به تعداد قابل اندازه گیری در کمتر از ۱٪ نمونه‌های ادراری تهیه شده در شرایط استریل (clean voided) یافت می‌شوند. به طور کلی فراوانی عفونت‌های کاندیدا در بیمارستان‌ها طی دهه گذشته ۲۰۰ تا ۳۰۰ درصد افزایش داشته است. در یک بیمارستان عمومی ۵٪ کشت‌های ادرار ممکن است گونه‌های کاندیدا را در بر داشته باشد و در

tertiary-care centers گونه‌های کاندیدا تقریباً ۱۰٪ ایزوله‌های ادراری را شامل می‌شوند.

Platt et al (۲) در تحقیق روی عفونت‌های مجاری ادراری بیمارستانی در بیمارانی که کاتتر مثانه داشتند به این نتیجه رسیدند که ۲۶/۵ درصد عفونت‌ها توسط قارچ‌ها ایجاد شده است. اکثر کشت‌های مثبت کم اهمیت بوده و مربوط به کلونیزاسیون هستند تا این که نشان دهنده عفونت حقیقی باشند و کمتر از ۱۰٪ کاندیدی‌ها پیامد کاندیدوری هستند، با این وجود عفونت‌های مجاری ادراری کاندیدا به عنوان عفونت‌های مهم بیمارستانی خود را نشان داده‌اند.

فاکتورهای خطر

Gulers و همکارانش (۳) در سال ۲۰۰۶ فاکتورهای خطر و گونه‌های کاندیدای مسبب کاندیدوری در بیماران بستری در بیمارستان را به صورت یک مطالعه مورد-شاهدی تحت بررسی قرار دادند. فاکتورهای خطر برای کاندیدوری در جراحی شکم ۴ برابر، درمان با کورتیکواستروئید و داروهای سرکوبگر سیستم ایمنی ۱/۴ برابر، در کاتتریزاسیون ادراری ۱۲ برابر و در استفاده از آنتی بیوتیک ۶ برابر بوده است. ریسک کاندیدوری در بیماران دیابتیک ۲ برابر بیشتر از بیماران گروه کنترل بوده است. کاندیدا آلبیکانس با ۶۸/۶۲ درصد فراوانی شایع‌ترین قارچ جدا شده در بیماران مبتلا به کاندیدوری بوده است.

میکروبیولوژی

تمام قارچ‌هایی که از ادرار بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه، مراقبت‌های ویژه نوزادان، سوختگی، جدا شده باشد و نیز از هر بیماری که پیوند عضو دریافت کرده باشد بایستی در حد گونه شناسایی و گزارش شود. گونه‌های کاندیدا از ۱ تا ۹ درصد نمونه‌های ادرار بیماران بستری در بیمارستان جدا می‌شوند. این اتفاق در کشت‌های ادرار نوزادان بستری در بخش‌های مراقبت ویژه غالباً نمایش دهنده وجود یک عفونت تهاجمی است و می‌تواند گواه اولیه‌ای برای بروز کاندیدی باشد. ایزوله ادراری عموماً با همان ایزوله‌ای که از خون و یا سایر

نواحی بدن بیمار جدا می‌شود یکی است. در دستجات دیگر بیماران، ادرار محل مهمی برای کلونیزاسیون قارچی است که می‌تواند ضرورت اتخاذ راهبردهای پروفیلاکسی و یا اقدامات اولیه درمانی را گوشزد نماید (۴).

اگر چه کاندیدا آلبیکانس شایع‌ترین گونه جدا شده از ادرار است، برعکس کاندیدیازیس دهانی، ازوفاگال و واژینال، گونه‌های غیرآلبیکانس از جنس کاندیدا مسئول تقریباً نیمی از ایزوله‌های ادراری هستند. گونه‌های غیر معمول که به خصوص در بیماران بستری در بیمارستان، اغلب در بیماران دیابتیک با کاتترهای ادراری طولانی مدت جدا می‌شوند عبارتند از: کاندیدا گلابراتا که در ۲۵ تا ۳۵ درصد عفونت‌ها دیده می‌شود و گونه‌های دیگر کاندیدا شامل کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا کروزو و کاندیدا گیلرموندی که در ۸ تا ۲۸ درصد عفونت‌ها جدا می‌شوند. عفونت‌های مخلوط و توام (mix) مربوط به حضور بیش از یک گونه کاندیدا نادر نیست همچنین باکتریوری همزمان نیز ممکن است وجود داشته باشد.

جنبه‌های کلینیکی

تا ۵۰ درصد موارد کاندیدیازیس تهاجمی اثبات شده در مطالعات بر روی نمونه‌های اتوپسی، در زمان حیات علی‌رغم انجام مکرر کشت خون، نتایج منفی نشان داده‌اند، اما اکثر آن‌ها در نمونه‌های دیگر که شامل نمونه‌های ادرار هم بوده است کشت‌های مثبت داشته‌اند (۴). اکثر بیماران مبتلا به کاندیدوری بدون علامت هستند. بیمارانی که کاتتر مثانه دارند اغلب اوقات به عوض ابتلاء به عفونت، در حقیقت توسط گونه‌های کاندیدا کلونیزه هستند. بیماران کاندیدوریک بستری با علائم سیستمیک یا اساسی معمولاً به صورت همزمان یک عامل جانشین برای علائم دارند. تظاهرات کلینیکی مربوط به عفونت کاندیدا به محل عفونت بستگی دارد. بیماران مبتلا به سیستیت کاندیدایی علائم و نشانه‌های تحریک مثانه را دارند که شامل تکرر ادرار، سوزش ادرار، احساس فوریت دفع ادرار، هماچوری و پیوری است. معاینات سیستمیک patch‌های کمی برآمده، سفید مروارید وار (یا صدفی) و نرم را نشان می‌دهد که شبیه رسوب شیر منعقد شده است و



نیز پرخونی (hyperemia) و التهاب مخاط مثانه به طور آشکار دیده می‌شود. اکثر بیماران علامت‌دار با سیستمیت کاندیدیایی کاتتریزه نشده‌اند. عفونت بالا رونده اگر چه نادر است ممکن است موجب پیلوفریت کاندیدا شود که با تب، لکوسیتوز، لرز و احساس کشش در زاویه دنده‌ای مهره‌ای (costovertebral angle tenderness) همراه است. اولتراسونوگرافی و CT Scan در تشخیص آبسه ایتترانال (داخل کلیوی) و پری نفریک (پیرامون کلیوی) مفید و کمک کننده است. اوروگرافی ترشحي ممکن است توپ‌های قارچی موجود در اورتروپلوک (لگنچه- میزنای) را نشان دهد که همراه یا بدون نکروز پاپیلری می‌باشد.

تشخیص

جدا سازی گونه‌های کاندیدا از یک نمونه ادرار ممکن است نشان دهنده آلودگی، کلونیزاسیون و عفونت سطحی یا عمقی مجاری تحتانی یا فوقانی ادراری باشد. آلودگی نمونه به ویژه در زنان با کلونیزاسیون ولوواژینال شایع است. معمولاً کلونیزاسیون را می‌توان به وسیله تکرار کشت ادرار با توجه ویژه به تکنیک‌های جمع آوری مناسب برطرف کرد. در حقیقت دو بار جداسازی مثبت و پشت سرهم کاندیدا قبل از شروع درمان ضد قارچی امری اساسی است. افتراق عفونت از کلونیزاسیون مجاری ادراری اگر در برخی بیماران غیر ممکن نباشد، ممکن است بی نهایت مشکل باشد. این مساله به ویژه در بیماران کاتتریزه شده صدق می‌کند و اغلب به تظاهرات کلینیکی همراه اتکا می‌شود. متأسفانه اشکال کلینیکی اختصاصی نیستند و در بیماران با وضعیت بحرانی در بخش‌های مراقبت ویژه، تب و لکوسیتوز ممکن است علل و منابع متعدد دیگری داشته باشند. افتراق دادن عفونت از کلونیزاسیون در حضور پیوری کار ساده‌ای نیست. اکثر بیماران با کاندیدوری قابل ملاحظه پیوری دارند اگر چه تفسیر پیوری در حضور یک کاتتر مشکل است زیرا ممکن است تحریک مکانیکی مخاط مثانه خود علت پیوری پدید آمده باشد. شمارش کلنی ادرار در جدا کردن عفونت از کلونیزاسیون ارزش محدودی دارد اما فقط در غیاب کاتر

فولی می‌تواند ارزشمند باشد. گاهی اوقات در بیمارانی که کاتتریزه نیستند، حضور صرف گونه‌های کاندیدا در ادرار بدون توجه به تعداد، به عنوان عفونت واقعی تلقی می‌شود. برعکس، Kozinn و همکاران (۵) نشان دادند که شمارش بیش از ۱۰۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰ کلنی در هر میلی لیتر با عفونت رابطه دارد، اگرچه تنها اقلیتی از بیماران با شمارش کلنی بالا عفونت حقیقی دارند، این برای یک بیمار با بیماری تهاجمی کلیه، لگنچه کلیه یا مثانه که شمارش کلنی پایین داشته باشد کمیاب و نادر است. کاندیدیازیس رنال بندرت با کلنی کانت کمتر یا مساوی ۱۰۰۰ عدد در هر میلی لیتر گزارش شده است. بنابراین همپوشانی قابل توجهی واقع می‌شود و کشت‌ها تعیین کننده نهایی در تصمیم گیری درمانی نمی‌باشند. به طور مشابه از کشت‌های ادرار منفی نمی‌توان برای رد کردن کاندیدیازیس رنال استفاده کرد. کاندیدوری یا کلنی کانت بیشتر یا برابر با 10^4 CFU/ml به همراهی فاکتورهای خطر زمینه را برای کاندیدیازیس تهاجمی در بیماران وخیم الحال مساعد می‌کنند.

بعد از آن که کاندیدوری به عنوان عفونت شناخته شد چالش پیش روی پزشک لوکالیزه کردن منبع عفونت یا محدود کردن سطح آناتومیک عفونت است. لوکالیزه کردن در مدیریت کاندیدوری بسیار مهم و حیاتی است. برای افتراق دادن تهاجم کاندیدا به کلیه‌ها از عفونت مجاری تحتانی که فراوانتر است تست مفیدی وجود ندارد، تنها یافته اختصاصی یا پاتوگنومونیک در کاندیدیازیس رنال نشان دادن هایفا یا سودوهایفی کاندیدا است که در یک سیلندر هیالین یا گرانولار گیر افتاده و در رسوب ادرار (میکروسکوپی) دیده می‌شود. متأسفانه این یک یافته نادر است و همانند کشت، مرفولوژی قارچی در میکروسکوپی و پیوری ارزش کمی در عفونت لوکالیزه دارند. شواهد و مدارک غیر اختصاصی و غیرمستقیم عفونت مجاری فوقانی به وسیله کاهش عملکرد کلیوی و یافته‌های رادیوگرافیک در اسکن‌های توموگرافی کامپوتری و اولتراسونوگرافی پیشنهاد می‌شود.

آزمایش‌های سرولوژیک به عنوان مثال آزمایش «انولاز کاندیدا» برای نشان دادن تهاجم پارانشیمال غیرحساس می‌باشند. یک شست‌وشوی پنج روزه با محلول آموتریسین

B ممکن است در ثابت کردن منبع کاندیدوری موثر باشد و کاندیدوری پایدار بعد از شست‌وشوی مthane نشان دهنده عفونت قارچی با منشاء قسمت فوقانی مthane است. این مساله نیاز به جستجوی بیشتر را تاکید می‌کند و ظن کاندیدیازیس رنال را تقویت می‌نماید. متاسفانه طبیعت طولانی و خسته کننده تست شست‌وشو با محلول آمفوتریسین B استفاده از آن را در یک بیمار تب دار و شدیداً ناخوش با کاندیدوری منتفی می‌سازد. یک تست سه ساعته سریع شست‌وشوی مthane با استفاده از محلول آمفوتریسین B در غلظت 200µg/ml بر اساس مطالعات *in vitro* توصیه شده است اما باید در بیماران نیز تاثیر آن نشان داده شود.

سابقه پژوهش در ایران

سابقه انجام این مطالعه در ایران بسیار محدود و با توجه به روش‌های آزمایشگاهی به کار گرفته شده (علی‌الخصوص PCR) منحصر به فرد است. فکور و همکاران (۶) در بررسی کاندیدوری در بین بیماران دیابتی در شهر زنجان که در سال ۱۳۸۰ انجام شده است شیوع کاندیدوری در بیماران دیابتی را ۱۳/۶۵ درصد و در بین افراد غیردیابتی ۴/۹ درصد گزارش کرده‌اند. پاک شیر و همکاران در مقاله‌ای که در سال ۱۳۸۳ در مجله تحقیقات پزشکی چاپ کردند (۷) روی ۱۰۱ بیمار بستری دارای کاتتر فولی که در بیمارستان دکتر شریعتی تهران بستری بودند در ۱۲ مورد (۱۱/۹ درصد) فونگوری به علت کاندیدا را نشان دادند. در این مطالعه ادرار همه بیمارانی که دست کم سه روز متوالی از کاتتر فولی استفاده کرده بودند مورد آزمایش قرار گرفتند. کاندیدا آلبیکانس ۸۲/۷۵ درصد و کاندیدا گلابراتا ۱۳/۸ درصد و کریپتوکوکوس لارنتی ۳/۴۵ درصد ایزوله‌ها را تشکیل داده‌اند.

جزء پناهی و همکاران (۸) در سال ۱۳۹۰ فراوانی کاندیدوری را در بین بخش‌های مراقبت ویژه بیمارستان‌های کرمان مورد بررسی قرار دادند و در مجموع در ۲۹ نفر از ۱۱۰ بیمار تحت بررسی خود یعنی در ۲۶/۴ درصد موارد کاندیدوری را نشان دادند. بیشترین گونه جدا شده در تحقیق آنان کاندیدا آلبیکانس با فراوانی ۳۴/۳ درصد بوده است. در مطالعه حاضر، برای شناسایی مخمرها از تست‌های

معمول آزمایشگاهی مانند آزمون ایجاد لوله زایا در سرم تازه انسان، آزمون اوره آز، آزمون ایجاد کلامیدوسپور در محیط کورن میل آگار و بررسی خصوصیات کلنی در محیط کروم آگار کاندیدا استفاده شد و به منظور تعیین هویت قطعی ایزوله‌ها در سطح گونه‌ای از بین روش‌های مولکولار بیولوژی از آزمون PCR و PCR-RFLP استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد بررسی: شامل بیماران بستری در بخش‌های مختلف مرکز پزشکی شهداء تجریش بوده است که به علل مختلف دارای سوند ادراری بوده و حداقل ۱۰ روز از سوندگذاری آن‌ها گذشته بوده است.

آزمایش مستقیم میکروسکوپی و کشت ادرار از نظر مخمرها

برای این منظور نمونه ادرار یک تا دو ساعت پس از جمع‌آوری آزمایش شده و در غیر اینصورت تا زمان انجام آزمایش در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شده است.

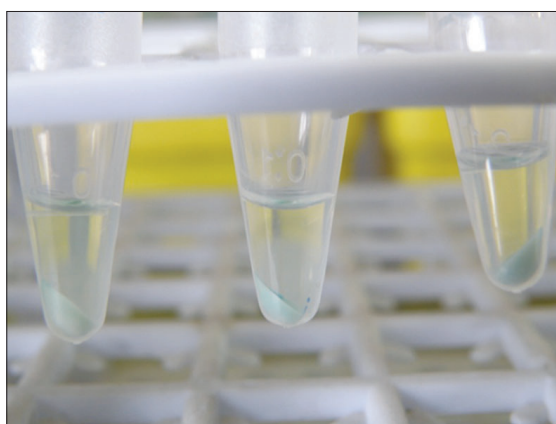
حجم مشخصی از ادرار (۱۰ میلی لیتر) با دور ۱۵۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیده، ته نشین در حجم ۰/۱ الی ۰/۲۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون شده سپس لام مستقیم میکروسکوپی تهیه و کشت نیز از رسوب انجام می‌گردید. کشت به کمک لوپ در محیط سابورد کستروز آگار حاوی کلرامفنیکل انجام گردیده است. (۵۰ یا ۱۰۰ میکرولیتر از رسوب ادرار را می‌توان کشت داد تا کلنی کانت دقیق تری به عمل آید). بیش از ۳۰۰۰۰ سلول مخمری در هر میلی لیتر نشان دهنده عفونت ادراری است (البته در مورد نمونه‌هایی که توسط سوند گرفته نشده باشند).

دمای انکوباسیون: کشت‌ها در دو سری ۲۵ الی ۳۰ درجه و ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

آزمایش کشت‌ها: آزمایش و بررسی کشت‌ها روزانه انجام شده و عدم رشد بعد از ۳ هفته به عنوان نتایج منفی گزارش شدند. کشت مثبت ممکن است نشان دهنده یک عفونت مجاری تناسلی ادراری موضعی و یا در بعضی موارد نشان دهنده انتشار گسترده عفونت باشد.



درصد الکتروفورز شده و بعد از مشاهده باندهای مربوط برای آنالیز بیشتر به وسیله آنزیم‌های محدود الاثر آزمایش PCR-RFLP انجام گردید و گونه‌های شایع کاندیدا از قبیل کاندیدا آلبیکانس، کاندیدا دابلینسیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا تروپیکاليس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا کروژی و کاندیدا گیلرموندی بدین وسیله مورد بررسی قرار گرفتند.



جوشانیدن مخمرها درون لوله‌های اپندورف

آزمایش‌های مولکولی

انتخاب پرایمرها و DNA هدف

بر اساس مطالعات قبلی انجام شده راجع به رشته‌های مختلف DNA در میکروارگانیسم‌های مختلف، ژن مسئول کد کردن RNA ریبوزومی (rDNA یا rRNA) قطعه مناسبی برای اهداف شناسایی و طبقه بندی قارچ‌ها و از جمله مخمرها می‌باشد. با توجه به تجربیات و آزمایش‌های انجام گرفته قبلی توسط میر هندی (۹) برای شناسایی شش گونه مهم کلینیکی با استفاده از روش PCR در این مطالعه نیز از پرایمرهای ITS1 به عنوان پرایمر رفت و از پرایمر ITS4 به عنوان پرایمر برگشت استفاده گردید. توالی پرایمرهای فوق به شرح زیر می‌باشند:

ITS1: 5' - TCCGTAGGTGAACCTGCG G-3'

ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATAT GC-3'

استخراج DNA

مطابق روش قبلاً توصیف شده، (۹) یک لوپ باکتریولوژی (حدود ۱۰ میلی متر مکعب) از کلنی‌های

ذخیره نمودن مخمرهای جدا شده: به منظور نگهداری سویه‌های مخمری برای انجام آزمایش‌های تکمیلی بعدی و نیز آزمون‌های مولکولار بیولوژی نمونه‌های مخمری جدا شده در گلیسرین ۲۰٪ در فریزر با برودت ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری شدند.

آزمایش‌های اولیه برای تعیین هویت مخمرها: ابتدا با استفاده از آزمایش‌های مرفولوژیکی گونه‌های کاندیدا مورد شناسایی اولیه قرار گرفتند. این آزمایش‌ها شامل: ۱- شکل ظاهری و رنگ کلنی در محیط کشت جداسازی اولیه (SDA) و همچنین محیط کروم آگار کاندیدا بوده است. ۲- تولید هائیفی یا سودوهایفی و کلامیدوسپور در محیط CMA+TW80 (تقریباً ۶۰ درصد ایزوله‌های کلینیکی کاندیدا آلبیکانس در این محیط، کلامیدوسپور تولید می‌کنند) و ۳- توانایی تولید لوله زایا در سرم تازه انسان (۹۵-۹۷ درصد ایزوله‌های کلینیکی کاندیدا آلبیکانس و کاندیدا دابلینسیس در این شرایط لوله زایا ایجاد می‌کنند).

در محیط کروم آگار کاندیدا گونه‌های آلبیکانس، تروپیکاليس و کروژی، قابل شناسایی بوده و گونه‌های گلابراتا، کفیر، پاراپسیلوزیس و گیلرموندی نیز تا حدودی قابل شناسایی هستند.

بعد از انجام تست‌های مرفولوژیکی فوق الذکر، ایزوله‌های مخمری را در شرایط مناسب (گلیسرین ۲۰ درصد) نگهداری کرده و پس از جمع‌آوری نهایی، با استفاده از روش PCR اقدام به شناسایی و تعیین هویت دقیق بر اساس DNA ژنومی گردید.

تعیین هویت مخمرهای جدا شده با روش PCR-RFLP

برای این منظور با تقویت ناحیه ITS1-5.8s rDNA-ITS2 از مجموعه ژنی RNA ریبوزومی گونه‌های کاندیدا به تفکیک تعیین هویت گردیدند.

آزمایش PCR به شرح زیر انجام گردید:

ابتدا عمل استخراج DNA از سلول‌های مخمری با استفاده از روش جوشاندن (Boiling) انجام شده و سپس از اسید نوکلئیک استخراج شده به عنوان الگو (template) و به کمک پرایمرهای یونیورسال قارچی آزمایش PCR انجام گردید. محصول PCR در ژل آگارز یک و نیم

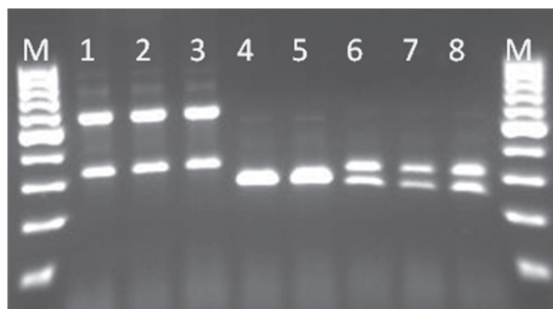
تازه برداشته و به لوله‌های اپندرف یک و نیم میلی لیتری محتوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده و بعد از مخلوط کردن به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده و سپس با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز رویی حاوی DNA محلول می‌باشد که از آن به عنوان الگو استفاده گردید.

آزمایش PCR-RFLP

محصولات PCR با استفاده از آنزیم محدود الاثر MspI مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. برای این منظور از آنزیم MspI ساخت کارخانه فرمنتاس محصول کشور لتوانی استفاده گردید. برای هر واکنش ۱۵ میکرولیتری مقدار یک و نیم میکرولیتر از بافر اختصاصی آنزیم، نیم میکرولیتر آنزیم، ۳ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR استفاده گردید. بعد از مخلوط کردن، آن‌ها را به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده و بعد از آن محصول RFLP را با استفاده از ژل آگارز ۱/۸٪ و با ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز کرده و بعد از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید (غلظت نیم میکروگرم در میلی لیتر) و به شرح گفته شده برای آزمایش PCR مشاهده و عکسبرداری انجام شد. گونه‌های مخمری با توجه به الگوی الکتروفوریتیک حاصله (۹) و با در نظر گرفتن اندازه‌های به دست آمده از آنالیز سکانس‌ها مورد شناسایی قرار گرفتند.

نتایج

تعداد کل نمونه‌ها شامل ۲۵۰ نمونه ادرار بوده است که در فاصله زمانی ۱۲ ماه فراهم شدند. تعداد کل موارد کشت مثبت از نظر عوامل مخمری ۴۱ نمونه و شامل ۴۳ ایزوله مختلف مخمری بوده است.



پروفایل PCR-RFLP، از سمت چپ به ترتیب نمونه‌های شماره ۱ الی ۳ کانیدا گلابراتا، نمونه‌های

برنامه اجرا شده برای PCR عبارت بود از: برای دناتوراسیون اولیه: حرارت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه، یک سیکل، حرارت‌های ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه جمعاً ۲۵ سیکل، و بالاخره برای تکثیر نهایی: دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه: یک سیکل. برای انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر Corbett ساخت کشور استرالیا استفاده گردید.

الکتروفورز: برای تفکیک قطعات DNA تکثیر شده، آگاهی از اندازه محصول PCR و رنگ آمیزی و قابل رویت کردن آن‌ها، هرکدام از محصولات PCR روی ژل آگارز (اینیترورژن، آمریکا) یک و نیم درصد الکتروفورز گردید. بافر TBE (تریس ۰/۰۹ مولار، اسید بوریک ۰/۰۹ مولار، EDTA ۲ میلی مولار، pH: 8.3) برای ساختن ژل و نیز پر کردن تانک الکتروفورز استفاده گردید. نمونه‌ها به کمک جریان الکتریسیته مستقیم با ولتاژ ۵ الی ۱۰ ولت به ازای هر سانتی متر طول ژل (بین ۸۰ الی ۱۰۰ ولت) الکتروفورز گردیده و سپس با رنگ اتیدیوم بروماید به غلظت ۰/۵ میکرو گرم در میلی لیتر رنگ آمیزی شدند. سپس با طول موج ۳۱۲ نانو متر با استفاده از دستگاه ترانس



جدول ۳- فراوانی کاندیدوری در مردان به تفکیک گونه‌های کاندیدا

گونه‌های مخمری	درصد فراوانی
کاندیدا آلبیکانس	۲۷/۸٪
کاندیدا تروپیکالیس	۲۷/۸٪
کاندیدا گلابراتا	۲۲/۲٪
کاندیدا پاراپسیلوزیس	۱۶/۷٪
جنوتریکوم	۵/۶٪

شماره ۴ و ۵ کاندیدا کروزئی، نمونه‌های شماره ۶ تا ۸ کاندیدا آلبیکانس می‌باشند. اولین و آخرین ستون مربوط به خط کش ژنی 100bp plus می‌باشد.

جدول ۱- فراوانی مطلق و فراوانی نسبی بیماران تحت مطالعه به تفکیک جنسی و میزان شیوع کاندیدوری در آن‌ها

گروه‌های مورد مطالعه	زنان	مردان
تعداد کل - (درصد)	۹۴ (۳۷/۹٪)	۱۵۴ (۶۲/۱٪)
شیوع کاندیدوری (تعداد/درصد)	۲۲ (۲۳/۴ درصد)	۱۸ (۱۱/۶۹ درصد)

جدول ۴- فراوانی کاندیدوری در زنان به تفکیک گونه‌های کاندیدا

گونه‌های مخمری	درصد فراوانی
کاندیدا آلبیکانس	۵۰٪
کاندیدا گلابراتا	۳۷/۵٪
کاندیدا کروزئی	۸/۳٪
کاندیدا تروپیکالیس	۴/۲٪

به طور کلی میزان شیوع کاندیدوری در این مطالعه برابر ۱۶/۴٪ به دست آمد.

سن و جنس دو نفر از بیماران مشخص نبوده لذا از مطالعه حذف گردیدند. بنابراین تعداد باقیمانده که در محاسبات آماری در نظر گرفته شدند عبارت از ۲۴۸ بیمار می‌باشند که شامل ۹۴ زن و ۱۵۴ مرد بوده است. دو مورد از نمونه‌ها دارای نتیجه کشت مخلوط (mix) بوده‌اند. هر دو این موارد مربوط به زنان بوده و در هر دو کاندیدا آلبیکانس به همراه کاندیدا گلابراتا رشد کرده است. میزان شیوع کاندیدوری در مردان ۱۱/۶۹٪ و در زنان ۲۳/۴٪ می‌باشد.

جدول ۲- فراوانی مطلق و نسبی گونه‌های کاندیدیای جدا شده از بیماران دارای کاتتر ادراری

گونه‌های مخمری	تعداد کل	درصد فراوانی
کاندیدا آلبیکانس	۱۸	۴۱/۹٪
کاندیدا گلابراتا	۱۳	۳۰/۲٪
کاندیدا تروپیکالیس	۶	۱۳/۹٪
کاندیدا پاراپسیلوزیس	۳	۶/۹٪
کاندیدا کروزئی	۲	۴/۷٪
جنوتریکوم	۱	۲/۳٪
جمع	۴۳	۹۹/۹٪

بحث

در یک مطالعه منتشر نشده توسط مولفین که روی ۴۷۲۹ نمونه رسوب ادرار به منظور شیوع کاندیدوری در بیماران سرپایی انجام شده است میزان شیوع کاندیدوری در این جامعه ۳/۴۷٪ به دست آمد. در بررسی فکور و همکاران (۶) بر روی ۲۲۶ نمونه که به عنوان گروه شاهد در مطالعه خود در نظر گرفته بودند نیز وفور کاندیدوری ۴/۹ درصد گزارش گردید. آنان شیوع کاندیدوری در بین بیماران دیابتی را در مطالعه خود ۱۳/۶۵ درصد نشان دادند. در تحقیق حاضر میزان شیوع کاندیدوری در بیماران بستری که سوند ادراری داشته‌اند برابر ۱۶/۴ درصد به دست آمده است. همان طور که ذکر شد جداسازی گونه‌های کاندیدا از یک نمونه ادرار ممکن است نشان دهنده آلودگی، کلونیزاسیون و عفونت سطحی یا عمقی مجاری تحتانی یا فوقانی ادراری باشد و آلودگی نمونه به ویژه در زنان با کلونیزاسیون ولوواژینال شایع است. اکثر بیماران مبتلا

گونه کاندیدای جدا شده را کاندیدا آلیکانس (۵۰٪) تشکیل می‌دهد. در مردان ۷۲/۳٪ ایزوله‌های کاندیدایی را گونه‌های غیر آلیکانس تشکیل داده‌اند. در مطالعه فکور و همکاران (۶) بر روی بیماران دیابتی شایع‌ترین گونه کشت شده از نمونه‌های ادرار را کاندیدا گلابراتا با فراوانی ۶۲/۵ درصد و بعد از آن کاندیدا آلیکانس ۲۸/۱۲ درصد و کاندیدا کروز ۶/۲۵ درصد تشکیل داده و در بیماران گروه شاهد فراوان‌ترین گونه کشت شده مربوط به کاندیدا آلیکانس (۵۴/۵۴٪)، کاندیدا گلابراتا (۲۷/۳٪) و کاندیدا کروز و کفایر هر کدام ۹/۰۹ درصد بوده است. در مطالعه جزء پناهی و همکاران (۸) شایع‌ترین گونه جدا شده از بیماران بخش مراقبت‌های ویژه مربوط به کاندیدا آلیکانس با فراوانی ۳۴/۳ درصد بوده است. در تمامی این مطالعات از روش‌های مرسوم و معمول فنوتیپیک برای شناسایی و تعیین هویت گونه‌های مخمری استفاده شده است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله مراتب سپاسگزاری و تشکر خود را از خانم شیوا سادات شاه زیدی پرستار محترم واحد کنترل عفونت بیمارستانی مرکز پزشکی شهدا که در جمع آوری و ارسال نمونه‌ها به آزمایشگاه همکاری‌های موثری داشته‌اند ابراز می‌نمایند.

References

- 1- Anaissie E. J., McGinnis M. R., Pfaller M. A. CLINICAL MYCOLOGY, Churchill Livingstone, 2003, Chap 24.
- 2- Platt R, Polk BT, Murdock B, et al: Risk factors for nosocomial urinary tract infection. Am J Epidemiol 124: 977, 1986.
- 3- Guler et al. Risk factor for nosocomial candiduria., Saudi Med J., 2006 vol 27(11): 1706-1710.
- 4- Denning D. W, Kibbler C. C, Barnes R. A. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. THE LANCET infectious dis vol 3: 230-40, 2003.
- 5- Kozinn PJ, Taschdjian CL, Goldberg PK, et al: Advances in the diagnosis of renal candidiasis. J Urol 119:184, 1978.
- ۶- فرزانه فکور، مهربان فلاحتی، فریده زینی، نورالدین موسوی نسب: بررسی کاندیدوریا در بیماران دیابتی شهر زنجان در سال ۱۳۸۰. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایران (۱۳۸۳). سال ۱۱ شماره ۴۱ صفحات ۴۵۳ الی ۴۶۲.
- ۷- کیوان پاک شیر، مهین مقدمی، مسعود امامی، پریوش کردبچه: بررسی میزان شیوع نقطه‌ای فونگوری و شناسایی عوامل آن در استفاده کنندگان از کاتتر فولی، مجله تحقیقات پزشکی - دوره ی دوم - شماره ۳ - ۱۳۸۳.
- ۸- منیژه جزء پناهی، احمد رضا مبین، افسانه کرمی، سامیه احدی. فراوانی کاندیدوری در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان (۱۳۹۰). سال ۱۸ شماره ۳.
- 9- Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A One-Enzyme PCR-RFLP Assay for Identification of Six Medically Important Candida species. Jpn J Med Mycol 2006 47: 225-9.

به کاندیدوری بدون علامت هستند و بیمارانی که کاتتر مثانه دارند اغلب اوقات به عوض ابتلاء به عفونت، در حقیقت توسط گونه‌های کاندیدا کلونیزه شده‌اند.

پاک شیر و همکاران (۷) در ۱۰۱ بیمار بستری دارای کاتتر فولی که در بیمارستان دکتر شریعتی تهران بستری بودند در ۱۲ مورد (۱۱/۹٪ در صد) فونگوری به علت کاندیدا را نشان دادند. در این مطالعه ادرار همه بیمارانی که دست کم سه روز متوالی از کاتتر فولی استفاده کرده بودند مورد آزمایش قرار گرفتند. در مطالعه آن‌ها کاندیدا آلیکانس ۸۲/۷۵ درصد و کاندیدا گلابراتا ۱۳/۸ درصد و کریپتوکوکوس لارنتی ۳/۴۵ درصد ایزوله‌ها را تشکیل داده‌اند. در بررسی که توسط ما انجام گردید میزان فونگوری ۱۶/۴٪ بوده است که در بررسی روی ۲۵۰ بیمار بستری در مرکز پزشکی شهدا به دست آمده است و حداقل روزهای بستری بیماران در بیمارستان ۱۰ روز بوده است.

در مطالعه حاضر شیوع کاندیدا آلیکانس در این دسته از بیماران ۴۱/۹٪ به دست آمده است و شیوع گونه‌های کاندیدایی غیر آلیکانسی بیشتر از مطالعه پاک شیر بوده است. همچنین در این مطالعه مشخص شد که پراکندگی گونه‌های کاندیدای غیر آلیکانسی در مردان بیشتر از زنان می‌باشد در صورتی که در زنان شایع‌ترین

