شناسایی مخمرهای جدا شده از مجاری ادراری در بیمارانی 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
• دکتر سید احمد حسینی
آزمایشگاه تشخیص طبی رسالت
• رضا داورزنی
آزمایشگاه تشخیص طبی رسالت
• 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

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 (فونگوری می‌تواند تظاهری 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، آسپرجیلوس و کریپتوکوکوس می‌باشند.

اپیدمیولوژی

میکروارگانیسم‌های کاندیدا غالبا به عنوان ساپروفیت در سطوح خارجی ژنیتال 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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

tertiary-care centers گونه‌های کاندیدا تقریبا 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٪ کاندیدمی‌ها 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 ٤ برابر، درمان با کورتیکوستروئید و داروهای سرکوبگر سیستم ایمنی ۱/٤ برابر، در کاتتریزاسیون ادراری ۱۲ برابر و در استفاده از آنتی بیوتیک ٦ برابر بوده است. ریسک کاندیدوری در بیماران دیابتیک ۲ برابر بیشتر از بیماران گروه کنترل بوده است. کاندیدا آلبیکانس با ٦۸/٦۲ 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 غالبا نمایش دهنده وجود یک عفونت تهاجمی است و می‌تواند گواه اولیه‌ای برای بروز کاندیدمی باشد. ایزوله ادراری عموما 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 (٤).

اگر چه کاندیدا آلبیکانس شایع ترین گونه جدا شده از ادرار است، برعکس کاندیدیازیس دهانی، ازوفاگال و واژینال، گونه‌های غیرآلبیکانس از جنس کاندیدا مسئول تقریبا 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 کروزی 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 داشته اند (٤).

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 علایم سیستمیک یا اساسی معمولا به صورت همزمان یک عامل جانشین برای علایم دارند. تظاهرات کلینیکی مربوط به عفونت کاندیدا به محل عفونت بستگی دارد. بیماران مبتلا به سیستیت کاندیدایی علایم و نشانه‌های تحریک مثانه را دارند که شامل تکرر ادرار، سوزش ادرار، احساس فوریت دفع ادرار، هماچوری و پیوری است. معاینات سیستوسکوپی patchهای کمی برآمده، سفید مروارید وار (یا صدفی) و نرم را نشان می‌دهد که شبیه رسوب شیر منعقد شده است و

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

نیز پرخونی (hyperemia) و التهاب مخاط مثانه به طور آشکار دیده می‌شود. اکثر بیماران علامت‌دار با سیستیت کاندیدایی کاتتریزه نشده‌اند. عفونت بالا رونده اگر چه نادر است ممکن است موجب پیلونفریت 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 اینترارنال (داخل کلیوی) و پری نفریک (پیرامون کلیوی) مفید و کمک کننده است. اوروگرافی ترشحی ممکن است توپ‌های قارچی موجود در اورتروپلویک (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. معمولا 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. متاسفانه 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 کاتتر 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 $CFU/ml\ 10^4$ 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 هیالن یا گرانولار گیر افتاده و در رسوب ادرار(میکروسکوپی) دیده می‌شود. متاسفانه 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 کامپیوتری 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 آمفوتریسین

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

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

سابقه پژوهش در ایران

ســابقه انجام این مطالعه در ایران بسیار محدود و با توجه به روش‌های آزمایشگاهی به کار گرفته شده (علی الخصوص PCR) منحصر به فرد است.

فکــور و همــکاران (٦) در بررســی کاندیــدوری در بین بیماران دیابتی در شــهر زنجان که در سال ۱۳۸۰ انجام شده است شیوع کاندیدوری در بیماران دیابتی را ۱۳/٦٥ درصد و در بین افراد غیردیابتی ٤/۹ درصد گزارش کرده‌اند.

پاک شیر و همکاران در مقاله‌ای که در سال ۱۳۸۳ در مجله تحقیقات پزشــکی چاپ کردند (۷) روی ۱۰۱ بیمار بستری دارای کاتتــر فولــی که در بیمارســتان دکتر شــریعتی تهران بســتری بودند در ۱۲ مورد (۱۱/۹ درصد) فونگوری به علت کاندیدا را نشــان دادند. در این مطالعه ادرار همه بیمارانی که دست کم ســه روز متوالی از کاتتر فولی استفاده کرده بودند مورد آزمایش قرار گرفتند. کاندیدا آلبیکانس ۸۲/۷٥ درصد و کاندیــدا گلابراتا ۱۳/۸ درصد و کریپتوکوکوس لارنتی ۳/٤٥ درصد ایزوله‌ها را تشکیل داده‌اند.

جــزء پناهــی و همــکاران (۸) در ســال ۱۳۹۰ فراوانــی کاندیدوری را در بین بخش‌های مراقبت ویژه بیمارستان‌های کرمان مورد بررســی قرار دادنــد و در مجموع در ۲۹ نفر از ۱۱۰ بیمار تحت بررســی خود یعنــی در ۲٦/٤ درصد موارد کاندیدوری را نشان دادند. بیشترین گونه جدا شده در تحقیق آنان کاندیدا آلبیکانس با فراوانی ۳٤/۳ درصد بوده است.

در مطالعه حاضر، برای شناســایی مخمرها از تســت‌های معمول آزمایشگاهی مانند آزمون ایجاد لوله زایا در سرم تازه انســان، آزمون اوره آز، آزمون ایجاد کلامیدوسپور درمحیط کورن میل آگار و بررســی خصوصیات کلنی در محیط کروم آگار کاندیدا اســتفاده شــد و به منظــور تعیین هویت قطعی ایزوله‌هــا در ســطح گونــه‌ای از بین روش‌هــای مولکولار بیولوژی از آزمون PCR و PCR-RFLP استفاده گردید.

مواد و روش ها

جامعه مورد بررســی: شامل بیماران بستری در بخش‌های مختلف مرکز پزشــکی شهداء تجریش بوده است که به علل مختلــف دارای ســوند ادراری بــوده و حداقــل ۱۰ روز از سوندگذاری آن‌ها گذشته بوده است.

آزمایش مستقیم میکروسکوپی و کشت ادرار از نظر مخمرها

بــرای ایــن منظور نمونــه ادرار یک تا دو ســاعت پس از جمع آوری آزمایش شده و در غیر اینصورت تا زمان انجام آزمایش در یخچال ٤ درجه ســانتیگراد نگهداری می‌شــده است.

حجم مشــخصی از ادرار (۱۰ میلی لیتر) با دور ۱٥۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه ســانتریفوژ گردیده، ته نشــین در حجم ۰/۱ الی ۰/۲٥ میلی لیتر ســرم فیزیولوژی اســتریل سوسپانسیون شــده سپس لام مستقیم میکروســکوپی تهیه و کشت نیز از رســوب انجام می‌گردید. کشــت به کمک لــوپ در محیط سابورودکستروزآگار حاوی کلرامفنیکل انجام گردیده است. (۵۰ یــا ۱۰۰ میکرولیتر از رســوب ادرار را می‌توان کشــت داد تــا کلنی کانت دقیق تری به عمــل آید). بیش از ۳۰۰۰۰ ســلول مخمری در هر میلی لیتر نشان دهنده عفونت ادراری اســت (البته در مورد نمونه‌هایی که توسط سوند گرفته نشده باشند).

دمای انکوباسیون: کشت‌ها در دو سری ۲٥ الی ۳۰ درجه و ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

آزمایش کشــت ها: آزمایش و بررســی کشــت‌ها روزانه انجام شــده و عدم رشــد بعد از ۳ هفته به عنوان نتایج منفی گزارش شــدند. کشت مثبت ممکن اســت نشان دهنده یک عفونت مجاری تناسلی ادراری موضعی و یا در بعضی موارد نشان دهنده انتشار گسترده عفونت باشد.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

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 گلیسیرین 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 هایفی یا سودوهایفی و کلامیدوسپور در محیط CMA+TW80 (تقریبا ٦٠ درصد ایزوله‌های کلینیکی کاندیدا آلبیکانس در این محیط، کلامیدوسپور تولید می‌کنند) و ۳- توانایی تولید لوله زایا در سرم تازه انسان (۹۷-۹۵ درصد ایزوله‌های کلینیکی کاندیدا آلبیکانس و کاندیدا دابلینیسیس در این شرایط لوله زایا ایجاد می‌کنند).

در محیط کروم آگار کاندیدا گونه‌های آلبیکانس، تروپیکالیس و کروزی، قابل شناسایی بوده و گونه‌های گلابراتا، کفیر، پاراپسیلوزیس وگیلرموندی نیز تا حدودی قابل شناسایی هستند.

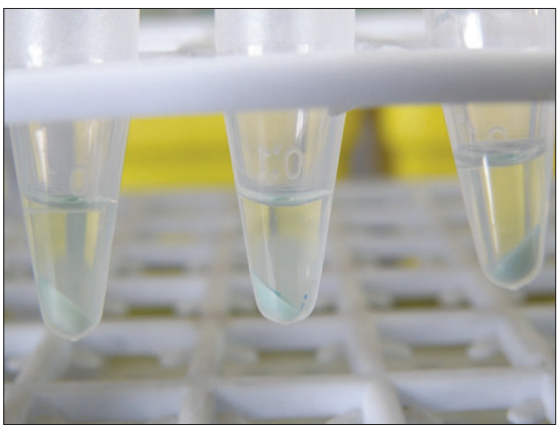
بعد از انجام تست‌های مرفولوژیکی فوق الذکر، ایزوله‌های مخمری را در شرایط مناسب (گلیسرین ۲۰ درصد) نگهداری کرده و پس از جمع آوری نهایی، با استفاده از روش PCR اقدام به شناسایی و تعیین هویت دقیق بر اساس DNA ژنومی گردید.

تعیین هویت مخمرهای جدا شده با روش PCR-RFLP

برای این منظور با تقویت ناحیه ITSI-5.8s rDNA-IT52 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 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 دابلینینسیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا کروزئی 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 ITSI به عنوان پرایمر رفت و از پرایمرITS4 به عنوان پرایمر برگشت استفاده گردید. توالی پرایمرهای فوق به شرح زیر می‌باشند:

ITSI: 5' - TCCGTAGGTGAACCTGCG G-3'

ITS4: 5' – TCCTCCGCTTATTGATAT GC-3'

استخراج DNA

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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

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 DNA الگو استفاده گردید.

آزمایش PCR: برای انجام آزمایش PCR مواد با غلظت‌های ذکر شده در زیر برای یک واکنش ۲۵ میکرو لیتری استفاده گردید: بافر PCR: ۲/۵ میکرولیتر، کلرور منیزیم: ۰/۷۵ میکرولیتر، پرایمرهای رفت (ITSI) و برگشت (ITS4): هرکدام با غلظت ۱۰ پیکومول، ٤ نوع نوکلئوتید (dNTPs) با غلظت ۲۰ میکرومولار، آنزیم Taq DNA polymerase: ۱/۲۵ واحد، DNA الگو: ۲ میکرولیتر، آب مقطر: حجم لازم تا رسیدن به حجم کلی ۲۵ میکرولیتر.

برنامه اجرا شده برای PCR عبارت بود از: برای دناتوراسیون اولیه: حرارت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه، یک سیکل، حرارت‌های ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ٥٦ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ٤٥ ثانیه جمعا 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 روئیت کردن آن ها، هرکدام از محصولات PCR روی ژل آگارز (اینویتروژن، 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 ایلومیناتور مشاهده و با کمک دستگاه Gel doc به طریقه دیجیتال عکس برداری انجام گرفت.

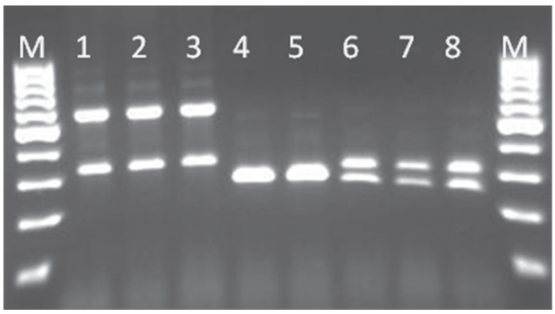
آزمایش PCR-RFLP

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 لیتوانی 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 ٤٥ 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 الکتروفورتیک 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 ٤۱ نمونه و شامل ٤۳ ایزوله مختلف مخمری بوده است.



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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

شـماره ٤ و ٥ کاندیدا کروزئی، نمونه‌های شـماره ٦ تا ٨ کاندیدا آلبیکانس می‌باشـند. اولین و آخرین ستون مربوط به خط کش ژنی 100bp plus می‌باشد.

جدول ١- فراوانی مطلق و فراوانی نسبی بیماران تحت مطالعه به تفکیک جنسی و میزان شیوع کاندیدوری در آن ها

گروه‌های مورد مطالعه	زنان	مردان
تعداد کل – (درصد)	٩٤ (٣٧/٩٪)	١٥٤ (٦٢/١٪)
شیوع کاندیدوری (تعداد/درصد)	٢٢ (٢٣/٤ درصد)	١٨ (١١/٦٩ درصد)

به طور کلی میزان شیوع کاندیدوری در این مطالعه برابر ١٦/٤٪ به دست آمد.

سـن و جنس دو نفـر از بیماران مشـخص نبوده لذا از مطالعـه حـذف گردیدنـد. بنابراین تعـداد باقیمانده که در محاسـبات آمـاری در نظر گرفته شـدند عبارت از ٢٤٨ بیمارمـی باشـند کـه شـامل ٩٤ زن و ١٥٤ مـرد بـوده اسـت. دو مـورد از نمونه‌هـا دارای نتیجه کشـت مخلـوط (mix) بوده‌انـد. هر دو ایـن موارد مربـوط به زنان بـوده و در هـردو کاندیـدا آلبیکانس بـه همـراه کاندیـدا گلابراتا رشـد کرده اسـت. میزان شـیوع کاندیـدوری در مـردان ١١/٦٩٪ و در زنـان ٢٣/٤٪ می‌باشد.

جدول ٢ – فراوانی مطلق و نسبی گونه‌های کاندیدای جدا شده از بیماران دارای کاتتر ادراری

گونه‌های مخمری	تعداد کل	درصدفراوانی
کاندیدا آلبیکانس	١٨	٤١/٩ ٪
کاندیدا گلابراتا	١٣	٣٠/٢ ٪
کاندیدا تروپیکالیس	٦	١٣/٩٪
کاندیدا پاراپسیلوزیس	٣	٦/٩ ٪
کاندیدا کروزئی	٢	٤/٧٪
جئوتریکوم	١	٢/٣ ٪
جمع	٤٣	٩٩/٩٪

جدول ٣- فراوانی کاندیدوری در مردان به تفکیک گونه‌های کاندیدا

گونه‌های مخمری	درصد فراوانی
کاندیدا آلبیکانس	٢٧/٨٪
کاندیدا تروپیکالیس	٢٧/٨٪
کاندیدا گلابراتا	٢٢/٢٪
کاندیدا پاراپسیلوزیس	١٦/٧٪
جئوتریکوم	٥/٦٪

جدول ٤- فراوانی کاندیدوری در زنان به تفکیک گونه‌های کاندیدا

گونه‌های مخمری	درصد فراوانی
کاندیدا آلبیکانس	٥٠ ٪
کاندیدا گلابراتا	٣٧/٥٪
کاندیدا کروزئی	٨/٣ ٪
کاندیدا تروپیکالیس	٤/٢٪

بحث

در یک مطالعه منتشـر نشده توسـط مولفین که روی ٤٧٢٩ نمونه رسـوب ادرار به منظور شـیوع کاندیـدوری در بیماران سـرپایی انجام شـده اسـت میزان شـیوع کاندیدوری در این جامعه ٣/٤٧٪ به دسـت آمد. در بررسی فکور و همکاران (٦) بـر روی ٢٢٦ نمونه که به عنوان گروه شـاهد در مطالعه خود در نظر گرفته بودند نیز وفـور کاندیدوری ٤/٩ درصد گزارش گردید. آنان شـیوع کاندیـدوری در بین بیمـاران دیابتی را در مطالعه خود ١٣/٦٥ درصد نشـان دادند. در تحقیق حاضر میزان شیوع کاندیدوری در بیماران بستری که سوند ادراری داشته‌اند برابر ١٦/٤ درصد به دسـت آمده است. همان طور که ذکر شد جداسـازی گونه‌های کاندیدا از یک نمونه ادرار ممکن اسـت نشـان 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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]

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

پاک شـیر و همکاران (۷) در 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 دسـت کم سه روز متوالی از کاتتر فولی استفاده کرده بودند مورد آزمایش قرار گرفتند. در مطالعه آن‌ها کاندیدا آلبیکانس ۸۲/۷۵ درصد و کاندیدا گلابراتا ۱۳/۸ درصـد و کریپتوکوکوس لارنتی ۳/٤٥ درصد ایزوله‌ها را تشـکیل داده‌اند. در بررسـی که توسـط ما انجام گردید میزان فونگوری ۱٦/٤ ٪ بوده اسـت که در بررسـی روی ۲۵۰ بیمار بسـتری در مرکز پزشکی شهدا به دسـت آمده است و حداقل روزهای بستری بیماران در بیمارستان ۱۰ روز بوده است.

در مطالعـه حاضر شـیوع کاندیدا آلبیکانس در این دسـته از بیماران ٤۱/۹٪ به دسـت آمده است و شیوع گونه‌های کاندیدای غیرآلبیکانسی بیشتر از مطالعه پاک شیر بوده است. همچنین در این مطالعه مشخص شد که پراکندگی گونه‌های کاندیدای غیرآلبیکانسی در مردان بیشتر از زنان می‌باشد در صورتی که در زنان شایع ترین گونه کاندیدای جدا شـده را کاندیدا آلبیکانس (۵۰٪) تشـکیل می‌دهد. در مردان ۷۲/۳٪ ایزوله‌های کاندیدایی را گونه‌های غیر آلبیکانس تشکیل داده‌اند. در مطالعه فکور و همکاران (٦) بر روی بیماران دیابتی شـایع ترین گونه کشت شـده از نمونه‌های ادرار را کاندیـدا گلابراتا با فراوانی ٦۲/۵ درصـد و بعد از آن کاندیدا آلبیکانس ۲۸/۱۲ درصد و کاندیدا کروزی ٦/۲۵ درصد تشـکیل داده و در بیماران گروه شاهد فراوان‌ترین گونه کشت شده مربوط به کاندیدا آلبیکانس (٥٤/٥٤٪)، کاندیدا گلابراتا (۲۷/۳٪) و کاندیدا کروزی و کفایر هرکدام ۹/۰۹ درصد بوده اسـت. در مطالعه جزء پناهی و همکاران (۸) شایع ترین گونه جدا شده از بیماران بخش مراقبت‌هـای ویژه مربوط به کاندیدا آلبیکانـس با فراوانی ۳٤/۳ 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: نویسـندگان مقالـه مراتب سپاسگزاری و تشـکر خود را از خانم شیوا سـادات شاه زیدی پرستار محترم واحد کنترل عفونت بیمارسـتانی مرکز پزشـکی شـهدا 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.

٦- فرزانه فکور، مهربان فلاحتی، فریده زینی، نورالدین موسـوی نسب: بررسی کاندیدوریا در بیماران دیابتی شهر زنجان در سال ۱۳۸۰. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایران (۱۳۸۳). سال ۱۱ شماره ٤۱ صفحات ٤٥۳ الی ٤٦۲.

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- منیـژه جـزء پناهی، احمد رضا مبین، افسـانه کرمی، سـامیه احدی. فراوانی کاندیدوری در بیماران بسـتری 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.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-04]