



Comparison of Conventional and Molecular Methods in Identification of Candida Species Isolated from Oropharyngeal Candidiasis

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Jahanshiri Z.*¹ PhD,
Razzaghi-Abyaneh M.¹ PhD

How to cite this article

Jahanshiri Z, Razzaghi-Abyaneh M. Comparison of Conventional and Molecular Methods in Identification of Candida Species Isolated from Oropharyngeal Candidiasis. Pathobiology Research. 2020;23(1):1-9.

ABSTRACT

Aims Candida species are normal flora in the human body and are the main cause of hospital infections in people with underlying disease. The purpose of the present study was comparison of the conventional and molecular laboratory methods in identifying different species of Candida to find the optimal method.

Materials & Methods 60 Candida isolates were obtained from oropharyngeal candidiasis patients and recognized using laboratory routine methods including germ tube production, culture on CHROMagar medium, API 20 C AUX kit and molecular ITS sequencing method. The concordances between the methods compared to the molecular method were measured by the kappa coefficient using SPSS 16.0 software.

Findings Out of 60 Candida isolates, 10 isolates (16.6%) in germ tube formation test, 8 isolates (13.33%) in the API test, and 9 isolates (15%) in the culture on CHROMagar medium have different results in comparison to the ITS sequencing method. Germ tube ($k=0.90$) and culture on CHROMagar medium methods ($k=0.66$) showed the highest and the lowest agreement with the molecular method in the identification of Candida albicans species respectively.

Conclusion The results showed that conventional methods alone cannot diagnose all Candida species and molecular methods such as ITS sequencing can be used to confirm the identification.

Keywords Candida; Molecular Technique; Conventional Methods; Identification

¹Department of Mycology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Department of Mycology,
Pasteur Institute of Iran, Enghlab
Street, Tehran, Iran. Postal Code:
1316943551.
Phone: +98 (21) 64112125
Fax: +98 (21) 64112804
z_jahanshiri@pasteur.ac.ir

Article History

Received: September 03, 2019

Accepted: May 14, 2020

ePublished: June 22, 2020

CITATION LINKS

[1] Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients ... [2] Oropharyngeal candidiasis caused by non-albicans yeast in ... [3] Oropharyngeal candidosis relative frequency in ... [4] Epidemiology of oropharyngeal Candida colonization and infection in ... [5] Comparison between four usual methods of identification ... [6] Molecular techniques for pathogen identification and fungus ... [7] Performance comparison of phenotypic and molecular methods ... [8] Identification, typing, antifungal resistance profile ... [9] Molecular typing of Candida albicans isolates ... [10] Molecular analysis of fungal populations in patients with ... [11] Morphological and molecular identification of filamentous ... [12] Oropharyngeal candidiasis: A review of its ... [13] Rapid identification of Candida albicans by filamentation ... [14] Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification ... [15] Characterization of a cDNA clone, encoding a 70 kDa heat shock ... [16] The identification and differentiation of the Candida ... [17] Multilocus sequence typing of Candida tropicalis shows ... [18] The neighbor-joining method: A new method ... [19] Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients ... [20] Isolation and molecular identification of Candida ... [21] Evaluation of the Albicans IDR plate method ... [22] Comparison of Albicans ID2 agar plate with ... [23] Susceptibility of clinical Candida species ... [24] Oropharyngeal candidiasis in HIV/AIDS patients ... [25] Epidemiology of Candida kefyr in patients ... [26] Epidemiology of Candida kefyr in patients ... [27] Evaluation of the new chromogenic medium ... [28] Evaluation of a reformulated ... [29] Application of CHROMagar Candida for rapid screening ... [30] Molecular identification of veterinary yeast ... [31] Epidemiology, antifungal susceptibility, and pathogenicity ...

مقایسه روش‌های متداول و روش مولکولی در تشخیص گونه‌های کاندیدای جدا شده از نمونه‌های اوروفارنژیال کاندیدیازیس

زهرا جهانشیری* PhD

گروه قارچ شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

مهدی رزاقی ابیانه PhD

گروه قارچ شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

اهداف: گونه‌های کاندیدا فلور نرمال بدن انسان و عامل بیشترین عفونت‌های بیمارستانی در افراد دارای زمینه هستند. با توجه به اهمیت تشخیص صحیح آنها، مطالعه حاضر با هدف مقایسه روش‌های رایج با روش مولکولی در تشخیص گونه‌های مختلف کاندیدا به منظور یافتن روش بهینه انجام شد.

مواد و روش‌ها: ۶۰ ایزوله کاندیدای جدا شده از بیماران مبتلا به اوروفارنژیال کاندیدیازیس با استفاده از روش‌های رایج شامل تولید جرم تیوب، کشت روی محیط کروم آگار، استفاده از کیت API 20 C AUX و روش مولکولی ITS sequencing شناسایی شدند. میزان توافق (ضریب k) بین روش‌های رایج در مقایسه با روش مولکولی با استفاده از نرم افزار SPSS 16.0 محاسبه شد.

یافته‌ها: از ۶۰ ایزوله کاندیدای مورد مطالعه، ۱۰ ایزوله (۱۶/۶٪) در تست جرم تیوب، ۸ ایزوله (۱۳/۳۳٪) در تست API و ۹ ایزوله (۱۵٪) در تست کشت روی محیط کروم آگار دارای تشخیص متفاوت در مقایسه با روش مولکولی ITS sequencing بودند. روش جرم تیوب بیشترین ($k = 0.90$) و کشت روی کروم آگار کمترین ($k = 0.66$) توافق را در مقایسه با روش مولکولی در شناسایی گونه کاندیدا/آلیکنس نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که روش‌های معمولی به تنهایی قادر به تشخیص همه گونه‌های کاندیدا نیستند و روش‌های مولکولی مانند ITS sequencing، می‌توانند برای تشخیص قطعی به کار برده شوند.

کلیدواژه‌ها: کاندیدا، روش مولکولی، روش‌های معمولی، شناسایی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۵

*نویسنده مسئول: z.jahanshiri@pasteur.ac.ir

مقدمه

گونه‌های کاندیدا مهم‌ترین عامل ایجاد عفونت‌های قارچی بیمارستانی هستند. آنها به طور شایع در فلور دهانی وجود دارند و تحت شرایط خاص فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی ممکن است از حالت کامنسال به حالت پاتوژن تغییر وضعیت بدهند. امروزه به علت افزایش تعداد بیماران ایمنوساپرس، دیابت، تشدید عفونت‌هایی مثل ایدز، استفاده گسترده از ابزارهای پزشکی در داخل بدن بیمار مانند حضور کاتترهای ثابت مغزی و قلبی، نقص ایمنی یا از بین رفتن سد مخاطی حاصل از جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی، تکنیک‌های جراحی مهاجم و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف طولانی مدت، شیوع کاندیدیازیس به عنوان یک عفونت فرصت طلب رو به افزایش است [1, 2]. اوروفارنژیال کاندیدیازیس، یک اختلال شایع در بیماران با سرطان

سر و گردن است که در طول رادیوتراپی ایجاد و با یک مرحله کلونیزاسیون مخاط دهانی شروع می‌شود. این عارضه معمولاً پس از رادیوگرافی سر و گردن ایجاد می‌شود و ممکن است باعث ایجاد بیماری سیستمیک در افراد دارای بدخیمی شود. این اختلال در بیماران به صورت عفونت دردناکی ظاهر می‌شود و ممکن است به ازوفագوس انتشار یابد و ایجاد بیماری سیستمیک کند. فراوانی آن تقریباً به میزان ۵۰٪ در گروه‌های مختلف تخمین زده شده است [3, 4].

شناسایی مخمرهای عامل این عارضه در سطح گونه در انتخاب داروی ضدقارچ مناسب و جلوگیری از ایجاد عفونت شدید لازم و ضروری است. روش‌های مختلفی برای تشخیص جنس کاندیدا در سطح گونه معرفی شده‌اند که از جمله آنها می‌توان به تست تولید جرم تیوب، تست تولید کلامیدوکونیدیا، تست‌های جذب قند و نیتروژن که به صورت دستی یا با استفاده از کیت انجام می‌شوند، محیط‌های کشت بر پایه رنگ‌سنجی و روش‌های مولکولی اشاره کرد [5].

روش‌های بررسی معمولی همواره دارای چالش‌هایی بوده‌اند، چراکه قارچ‌های بیماری‌زا می‌توانند به صورت کمپلکس وجود داشته باشند و یا اینکه در نمونه کلینیکی خیلی کم باشند و جداسازی آنها با روش‌های معمولی مشکل باشد. به علاوه قارچ‌های غیر قابل کشت و قارچ‌هایی که اجزای خاص برای شناسایی روی محیط کشت تولید نمی‌کنند هم به عنوان چالش دیگر در روش‌های شناسایی معمولی باقی مانده‌اند [6].

تست‌های فنوتیپی از جمله ID32C و Vitek 2ID، برای تشخیص گونه‌های کاندیدا به صورت تجاری وجود دارند. ولی این تست‌ها هم هزینه بالایی دارند و هم حداقل ۱ تا ۲ روز زمان برای به دست آمدن نتیجه آنها مورد نیاز است [7].

روش‌های مولکولی امکان تجزیه و تحلیل ساختار جمعیت ایزوله‌های بالینی کاندیدا، دریافت ارتباط پیچیده بین ایزوله‌های بالینی و محیطی و ارتباط ژنتیکی ایزوله‌های قارچی را فراهم می‌کنند [8]. در سال‌های اخیر روش‌های مولکولی زیادی برای تشخیص گونه‌های کاندیدا معرفی شده‌اند که از آن جمله می‌توان به تعیین توالی ژن ITS (ITS sequencing)، تعیین توالی در چند ناحیه ژنی (MLST)، الکتروفورز ژلی میدان ضربه‌ای (PFGE)، DNA چند ریخت تکثیر یافته تصادفی (RAPD)، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ناهمگون (LH-PCR) و توالی تکراری به خصوص خارج ژنی (Microsatellites) اشاره کرد [9, 10].

گونه‌های مخمری با استفاده از روش‌های معمولی و براساس مورفولوژی و مشخصات فیزیولوژیک شناسایی می‌شوند. با این وجود، روش‌های مولکولی برای تعیین هویت گونه‌های کاندیدا خصوصاً زمانی که روش‌های مورفولوژیک قادر به شناسایی گونه نباشند کاربرد دارند [11]. شناسایی بر پایه آنالیزهای معمولی ماکروسکوپی و میکروسکوپی و خصوصیات قارچ‌ها ممکن است تحت تاثیر محیط و شرایطی که قارچ قرار دارد تغییر کند، در صورتی که این تغییرات در روش‌های مولکولی مشاهده نمی‌شود.

انجام شد و با استفاده از نرم‌افزار آنالیز موجود در وبسایت bioMerieux گونه‌های کاندیدا شناسایی شدند [14].

تعیین هویت ایزوله‌ها با استفاده از روش مولکولی ITS sequencing جداسازی DNA

ایزوله‌ها روی محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰°C درجه انکوبه شدند. DNA ژنومیک با استفاده از روش فنل- کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل از هر کدام از ایزوله‌ها جدا شد [15]. DNAهای جدا شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰°C نگهداری شدند.

انجام واکنش PCR

واکنش PCR با استفاده از مسترمیکس شرکت سیناکلون و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن ITS (Internal Transcribed Space region) در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد. توالی پرایمرهای رفت و برگشت به ترتیب به صورت 5'-F- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' (ITS1) و 5'-R- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (ITS4) است.

برنامه زمانی و دمایی واکنش PCR به این ترتیب است: ۹۵°C برای ۱۰ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۱۰۰ ثانیه و دمای نهایی ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه [16]. پس از مشاهده محصول PCR بر روی ژل، محصولات PCR هر نمونه برای تعیین توالی ارسال و نمونه‌ها با استفاده از بیوسستم‌های کاربردی آنالیز توالی DNA (Bioneer؛ کره جنوبی) تعیین توالی شدند. توالی‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 بررسی و با نرم‌افزار آنالیز BLASTn با ژن‌های موجود در سایت NCBI مقایسه شدند [17, 18].

آنالیز آماری

وجود توافق بین روش‌های مختلف در تشخیص کاندیدا/آلبیکس و کاندیدای غیر آلبیکس، توسط تعیین ضریب کاپا (K) مورد بررسی قرار گرفت و در این آنالیز روش‌های دیگر با روش مولکولی مقایسه شدند. آزمون توافق کاپا به شرح زیر تفسیر شد [5]:

k برابر با صفر: ضعیف؛ k برابر با صفر تا ۰/۲۱: کم؛ k = ۰/۲۱-۰/۴۱: قابل قبول؛ k = ۰/۴۱-۰/۶۰: متوسط؛ k = ۰/۶۱-۰/۸۰: قابل توجه؛ k = ۰/۸۱: عالی

از نرم‌افزار آماری SPSS 16.0 برای این آنالیز استفاده شد.

یافته‌ها

اطلاعات مربوط به ۵۴ بیمار نمونه‌گیری شده در جدول ۱ نشان داده شده است. سن بیماران از ۱۵ تا ۹۳ سال و به‌طور متوسط ۶۳ سال است و بیشتر آنها مرد هستند. جدول ۲ توزیع گونه‌های کاندیدا را در بیماران در ارتباط با جنس نشان می‌دهد.

روش مولکولی ITS sequencing

برای حصول اطمینان و تایید نتایج شناسایی گونه‌های کاندیدا از تست مولکولی ITS sequencing استفاده شد. شکل ۱ نتیجه

DNA ریبوزومال (rDNA) یک هدف مناسب در مطالعات فیلوژنیک قارچ‌ها است که در شناسایی بیشتر قارچ‌ها و مخمرها از این روش استفاده می‌شود [11].

تشخیص سریع و صحیح عوامل قارچی در سطح جنس برای نظارت و کنترل بیماری و انتخاب استراتژی‌های مناسب مدیریت درمان و جلوگیری از تشدید بیماری لازم و ضروری است [12].

با توجه به نیاز موجود به شناسایی سریع و صحیح گونه‌های کاندیدا نه تنها برای مطالعات اپیدمیولوژیکی، بلکه برای انتخاب درمان با داروهای ضدقارچی مناسب و کاهش میزان مرگ‌ومیر ناشی از این مخمرها، انتخاب روش تشخیصی مناسب از بین روش‌های موجود بسیار مهم است. به دلیل اهمیت تشخیص گونه‌های کاندیدایی این مطالعه به‌منظور مقایسه روش مولکولی با روش‌های رایج موجود برای تشخیص گونه‌های این مخمر انجام شده است.

مواد و روش‌ها

ایزوله‌های کلینیکی

تعداد ۶۰ ایزوله کاندیدا از نمونه‌های اوروفارنژیال کاندیدیازیس در ۵۴ بیمار مبتلا به سرطان سر و گردن از انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی گرفته شد. نمونه‌ها روی محیط سابورو دکستروز آگار به مدت ۴۸ ساعت در ۲۸°C کشت داده شدند. برای شناسایی ایزوله‌ها تکنیک‌های استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

تست تولید جرم تیوب

به‌منظور انجام تست جرم تیوب، در یک لوله ۵/۵ میلی‌لیتری حاوی سرم انسانی سوسپانسیون سلولی با استفاده از یک کلنی از هر ایزوله تهیه شد. سپس ایزوله‌ها در دمای ۳۷°C به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند [13]. پس از گذشت زمان انکوباسیون، از محتویات هر کدام از لوله‌ها لام تهیه شد و از نظر تولید جرم تیوب زیر میکروسکوپ بررسی شدند.

کشت روی محیط کروم آگار

برای تشخیص گونه‌های مختلف کاندیدا از این تست استفاده می‌شود. هر کدام از ایزوله‌ها روی محیط کروم آگار (CHROMagar Company؛ فرانسه) کشت داده شدند و برای ۴۸ ساعت در دمای ۳۵°C انکوبه شدند. نتیجه با توجه به رنگ تولید شده توسط هر ایزوله بررسی می‌شود.

تست جذب قندی با استفاده از کیت API 20 C AUX

برای تشخیص گونه‌های مختلف کاندیدا از روش جذب قندی استفاده شد. با استفاده از دستورالعمل شرکت سازنده، سوسپانسیون سلولی استاندارد با غلظت ۲ استاندارد مک‌فارلند تهیه شد و ۵ قطره از این سوسپانسیون داخل هر کدام از آمپول‌های محیط C موجود در کیت ریخته و پس از یک‌نواخت شدن محتویات آمپول، سوسپانسیون حاضر به هر کدام از چاهک‌ها تلقیح و پس از گذاشتن پوشش چاهک‌ها، در دمای ۳۰°C انکوبه شد. خوانش چاهک‌ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون

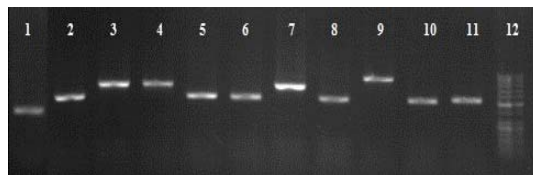
جدول ۱ اطلاعات مربوط به سن، جنس و نوع سرطان در بیماران مطالعه شده (۵۴ نفر)

نوع سرطان	اطلاعات بیماران	فراوانی (درصد)
SCC صورت	۸ (۱۴/۸۲)	
SCC سینوس	۳ (۵/۵۶)	
BCC صورت	۱ (۱/۸۵)	
SCC زبان	۱۴ (۲۵/۹۲)	
SCC لب	۶ (۱۱/۱۱)	
SCC کام	۳ (۵/۵۵)	
سرطان مسیر تنفسی	۵ (۹/۲۶)	
SCC گلو	۴ (۷/۴۱)	
لنفوم سر	۱ (۱/۸۵)	
سرطان پاراتیروئید	۱ (۱/۸۵)	
سرطان تیروئید	۲ (۳/۷۱)	
سرطان لارنژ	۵ (۹/۲۶)	
ملانوما چشم	۱ (۱/۸۵)	
سن		
۱۵-۳۰	۵ (۹/۲۶)	
۳۰-۴۵	۵ (۹/۲۶)	
۴۵-۶۰	۱۸ (۳۳/۳۳)	
۶۰-۷۵	۱۹ (۳۵/۱۹)	
۷۵-۹۰	۶ (۱۱/۱۱)	
بیشتر از ۹۰	۱ (۱/۸۵)	
جنس		
مرد	۳۹ (۷۲/۲۲)	
زن	۱۵ (۲۷/۷۸)	

BCC: کارسینوما سلول بازال؛ SCC: کارسینوما سلول اسکوئاموس

جدول ۲ توزیع گونه‌های مخمری در ارتباط با جنس (اعداد داخل پرانتز، درصد هستند.)

گونه	مرد	زن	تعداد
کاندیدا آلبیکنس	۲۴ (۷۵)	۸ (۲۵)	۳۲
کاندیدا تروپیکالیس	۷ (۵۳/۸)	۶ (۴۶/۲)	۱۳
کاندیدا گلابراتا	۷ (۷۷/۸)	۲ (۲۲/۲)	۹
کاندیدا کفیر	۳ (۱۰۰)	-	۳
کاندیدا دابلینینسیس	۱ (۱۰۰)	-	۱
پیکیا	۲ (۱۰۰)	-	۲
تعداد کل	۴۴ (۷۳/۳۳)	۱۶ (۲۶/۶۷)	۶۰ (۱۰۰)



شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR حاصل از پرایمرهای ITS1-4 تعدادی از ایزوله‌های جدا شده در کنار Ladder؛ ستون ۱ مربوط به پیکیا (۴۷۰ جفت باز)، ستون‌های ۲، ۵، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۱ کاندیدا آلبیکنس (۵۵۰ جفت باز)، ستون‌های ۳، ۴ و ۷ کاندیدا کفیر (۷۰۰ جفت باز) و ستون ۹ مربوط به کاندیدا گلابراتا (۹۰۰ جفت باز) است.

الکتروفورز محصول PCR چند گونه کاندیدا را برای نمونه، روی ژل آگارز نشان می‌دهد. در شکل ۲ نمونه‌ای از توالی قطعه ژنی ITS در کاندیدا آورده شده است.

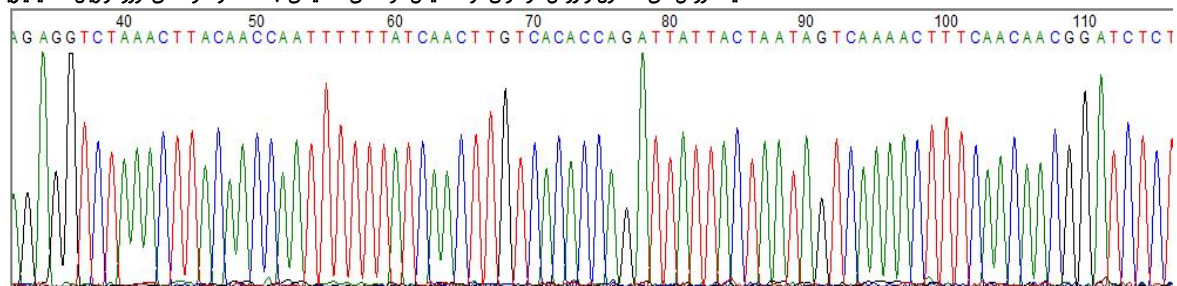
نتایج تست مولکولی با استفاده از پرایمرهای ITS1-4 نشان داد که ۳۲ ایزوله (۵۳/۳٪) در بین کل ایزوله‌ها کاندیدا آلبیکنس بودند. به دنبال آن ۱۳ ایزوله (۲۱/۶۶٪) کاندیدا تروپیکالیس، ۹ ایزوله (۱۵٪) کاندیدا گلابراتا، ۳ ایزوله (۵٪) کاندیدا کفیر و ۱ ایزوله (۱/۶۶٪) کاندیدا دابلینینسیس شناسایی شد. ایزوله کاندیدا دابلینینسیس در روش تولید جرم تیوب به‌عنوان کاندیدا آلبیکنس شناسایی شد. کاندیدا دابلینینسیس روی محیط کروم آگار پس از ۴۸ ساعت، کلنی سبزرنگ ایجاد کرد و تست جرم تیوب آن مثبت بود. این ایزوله پس از ۴۸ ساعت روی محیط کورن میل آگار در دمای ۳۵°C تولید بلاستوکونیدی فراوان، هایف کاذب منشعب و هایف حقیقی کرد، ولی تولید کلامیدوکونیدی مشاهده نشد. تشخیص مولکولی کاندیدا دابلینینسیس با استفاده از پرایمرهای ITS1-4 تایید شد^[19, 20]. در بین ایزوله‌های کلینیکی ۲ ایزوله (۳/۳۳٪) متعلق به جنس پیکیا بود (شکل ۳).

نتایج حاصل از روش تولید جرم تیوب، کشت روی محیط کروم آگار و کیت قندی API 20 C AUX با روش مولکولی مقایسه شدند. به‌منظور افتراق کاندیدا آلبیکنس از کاندیدای غیر آلبیکنس از تست جرم تیوب استفاده شد. براساس این روش ۳۳ ایزوله (۵۵٪) به‌عنوان کاندیدا آلبیکنس و ۲۷ ایزوله (۴۵٪) به‌عنوان کاندیدای غیر آلبیکنس شناسایی شدند. تعداد ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس در این روش، یک ایزوله بیشتر از روش مولکولی بود. در مقایسه جز به جزء ایزوله‌ها در دو روش تولید جرم تیوب و روش مولکولی براساس جدول ۳، ۷ ایزوله (۱۱/۶۶٪) در تست تولید جرم تیوب به‌عنوان کاندیدا آلبیکنس و ۴ ایزوله (۶/۶۶٪) به‌عنوان غیر آلبیکنس شناسایی شدند، در صورتی که روش مولکولی این ۷ ایزوله را غیر آلبیکنس شناسایی کرد.

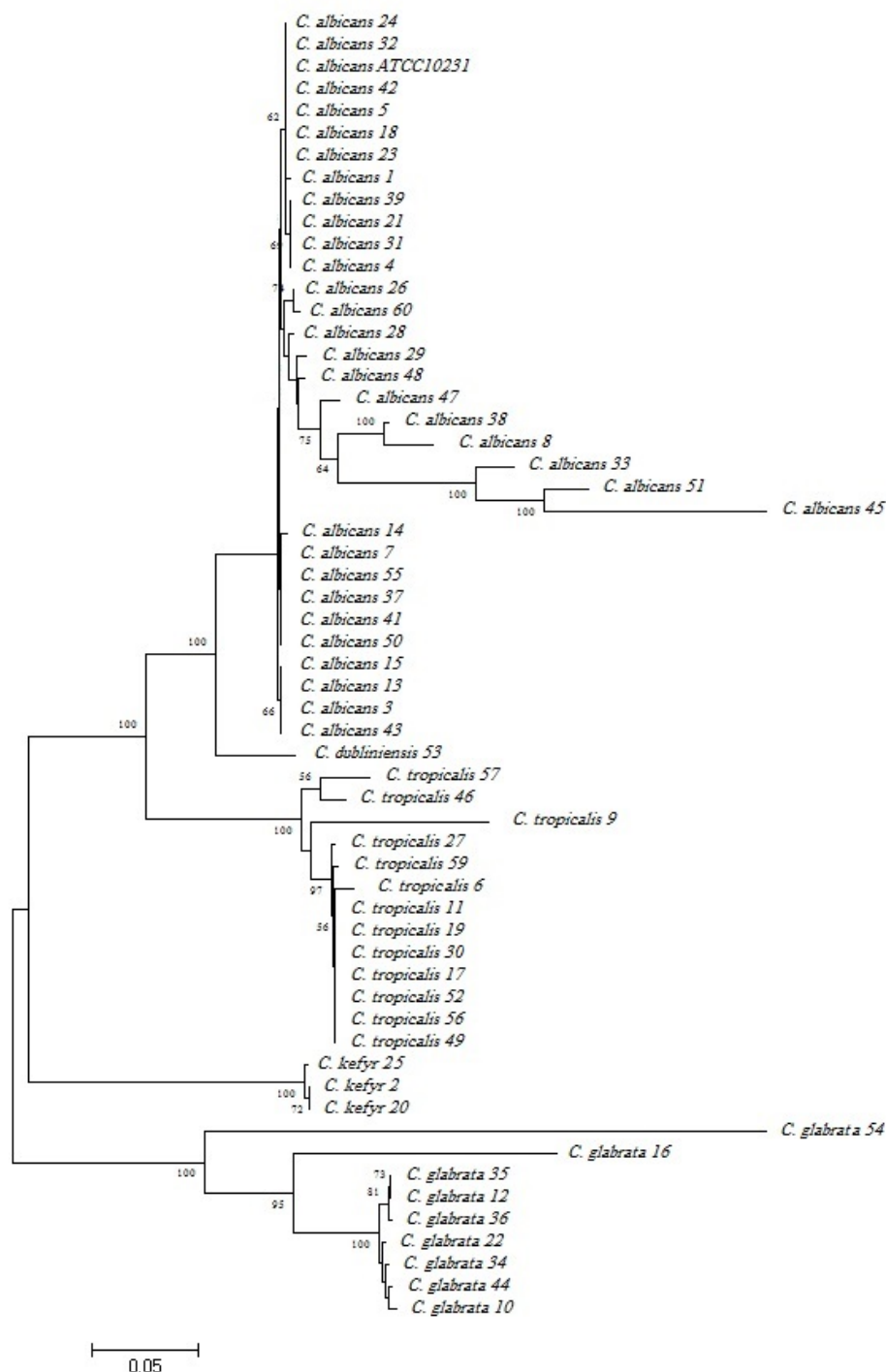
در روش کشت روی کروم آگار ۳۴ ایزوله (۵۶/۶۶٪) کاندیدا آلبیکنس، ۱۶ ایزوله (۲۶/۶۶٪) کاندیدا تروپیکالیس، ۵ ایزوله (۸/۵۵٪) کاندیدا گلابراتا و ۳ ایزوله (۵٪) غیر قابل تشخیص گزارش شد. در این روش ۹ ایزوله (۱۵٪) در مقایسه با روش مولکولی تشخیص متفاوت نشان دادند (جدول ۳) و ۳ (۵٪) ایزوله‌ای که تولید کلنی سفید کرده بودند، در روش مولکولی کاندیدا گلابراتا و جنس پیکیا تشخیص داده شدند.

با استفاده از کیت API 20 C AUX، ۳۰ ایزوله کاندیدا آلبیکنس شناسایی شدند. در مقایسه نتایج حاصل از این روش با روش مولکولی، ۸ ایزوله (۱۳/۳۳٪) دارای تشخیص متفاوت بودند.

آنالیز آماری ضریب کاپا را در مقایسه با روش مولکولی برای روش جرم تیوب ۹۰٪، روش کشت روی کروم آگار ۶۶٪ و روش کیت API 20 C AUX برابر با ۸۶٪ نشان داد (جدول ۴).



شکل ۲) نمونه‌ای از توالی قطعه ژنی ITS در کاندیدا



شکل ۳) درخت فیلوژنی حاصل از تعیین توالی ژن ITS در ایزوله‌های کاندیدای جدا شده از نمونه‌های اوروفارنژیال کاندیدیازیس در مقایسه با سوش استاندارد کاندیدا/آلبیکنس ATCC10231، که با روش neighbor-joining و با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 رسم شده است.

جدول ۳) جزئیات مربوط به شناسایی ۲۰ ایزوله کاندیدایی با ۴ روش ITS sequencing، تست جذب قندی با استفاده از کیت API 20 C AUX، کروم آگار و جرم تیوب

شماره ایزوله	روش مولکولی ITS sequencing	تست جذب قندی با استفاده از کیت API 20 C AUX	کروم آگار	جرم تیوب	تشخیص اولیه براساس تولید جرم تیوب
۲	ک. کفیر	ک. کفیر	ک. گلابراتا	-	غیر آلیکسنس
۳	ک. آلیکسنس	ک. لوزیتانیا	ک. آلیکسنس	+	ک. آلیکسنس
۱۳	ک. آلیکسنس	ک. آلیکسنس	ک. آلیکسنس	-	غیر آلیکسنس
۲۰	ک. کفیر	ک. کفیر	ک. تروپیکالیس	+	ک. آلیکسنس
۲۲	ک. گلابراتا	ک. گلابراتا	کلنی سفید	-	غیر آلیکسنس
۲۵	ک. کفیر	ک. کفیر	ک. گلابراتا	-	غیر آلیکسنس
۳۵	ک. گلابراتا	ک. نوروزینسیس	کلنی سفید	-	غیر آلیکسنس
۳۶	ک. گلابراتا	پ. ویکرهامی	ک. گلابراتا	-	غیر آلیکسنس
۳۷	ک. آلیکسنس	ک. تروپیکالیس	ک. تروپیکالیس	-	غیر آلیکسنس
۴۰	ج. پیکیا	ک. کفیر	کلنی سفید	-	غیر آلیکسنس
۴۴	ک. گلابراتا	ک. تروپیکالیس	ک. تروپیکالیس	+	ک. آلیکسنس
۴۶	ک. تروپیکالیس	ک. تروپیکالیس	ک. آلیکسنس	+	ک. آلیکسنس
۴۷	ک. آلیکسنس	ک. آلیکسنس	ک. آلیکسنس	-	غیر آلیکسنس
۴۹	ک. تروپیکالیس	ک. تروپیکالیس	ک. آلیکسنس	+	ک. آلیکسنس
۵۱	ک. آلیکسنس	ک. آلیکسنس	ک. آلیکسنس	-	غیر آلیکسنس
۵۳	ک. دابلینینسیس	ک. آلیکسنس	ک. آلیکسنس	+	ک. آلیکسنس
۵۴	ک. گلابراتا	ک. گلابراتا	ک. گلابراتا	-	غیر آلیکسنس
۵۷	ک. تروپیکالیس	ک. تروپیکالیس	ک. تروپیکالیس	+	ک. آلیکسنس
۵۸	ج. پیکیا	ک. گلابراتا	ک. گلابراتا	-	غیر آلیکسنس
۵۹	ک. تروپیکالیس	ک. تروپیکالیس	ک. تروپیکالیس	+	ک. آلیکسنس

(ک: کاندیدا؛ ج: جنس؛ پ: پروتوتکا)

جدول ۴) تعداد ایزوله‌ها در توافق بین سه روش رایج در مقایسه با روش تعیین توالی ژن ITS در شناسایی گونه‌های کاندیدا (تعداد کل: ۶۰)

گونه	کیت جذب قندی	کروم آگار	جرم تیوب
کاندیدا آلیکسنس	۳۰	۳۴	۳۳
کاندیدا تروپیکالیس	۱۲	۱۶	-
کاندیدا گلابراتا	۱۱	۵	-
کاندیدا کروزه‌ای	-	۲	-
کاندیدا کفیر	۴	-	-
کاندیدا دابلینینسیس	-	-	-
کاندیدا لوزیتانیا	۱	-	-
کاندیدا نوروزینسیس	۱	-	-
جنس پیکیا	-	-	-
پروتوتکا ویکرهامی	۱	-	-
گونه‌های دیگر	-	۳	۲۷

ضریب کاپا در مقایسه با روش مولکولی برای روش‌های جرم تیوب، کشت روی کروم آگار و کیت API 20 C AUX به ترتیب ۰/۹۰، ۰/۶۶ و ۰/۸۶ بود.

بحث

به روش مولکولی، ۶۹ ایزوله (۸۱/۱٪) کاندیدا/آلیکسنس، ۸ ایزوله (۹/۴٪) کاندیدا/گلابراتا، ۶ ایزوله (۷٪) کاندیدا/تروپیکالیس و ۱ ایزوله (۱٪) پیکیا گزارش شد^[۸]. در بین ایزوله‌های کاندیدا/آلیکسنس، ۱۸ نمونه (۲۱/۱٪) با تست جرم تیوب، ۱۳ نمونه (۱۵/۲٪) با تست کروم آگار و ۱۳ نمونه (۱۵/۲٪) با روش API تشخیص متفاوت نشان دادند. در مطالعه آنها در بررسی با تست کروم آگار و جرم تیوب، ۶۲ ایزوله (۷۲/۹٪) کاندیدا/آلیکسنس و ۲۲ ایزوله (۲۵٪) کاندیدای غیر آلیکسنس و یک ایزوله (۱/۱٪) به‌عنوان نامشخص شناسایی شد. ۸ ایزوله (۹/۴٪) روی کروم آگار نتایج متفاوت از جرم تیوب داشت. ۱۱ ایزوله (۱۲/۹٪) در روش

در میان ۶۰ ایزوله جدا شده از بیماران مبتلا به اوروفارنژیتال کاندیدیازیس در این مطالعه، براساس روش مولکولی، کاندیدا/آلیکسنس با ۵۳/۳۳٪ بیشترین شیوع را داشته است که به دنبال آن کاندیدا/تروپیکالیس با ۲۱/۶۶٪ در مقام دوم قرار دارد که این یافته‌ها منطبق بر مطالعات انجام شده در گذشته بود^[۵]. به دلیل اینکه مطالعه حاضر فقط روی بیماران مبتلا به سرطان سر و گردن انجام شد، ارتباطی بین گونه‌های کاندیدای جدا شده و نوع سرطان یافت نشد. بیتار و همکاران در مطالعه‌ای ۸۵ ایزوله کاندیدا را با روش‌های معمولی و مولکولی مورد بررسی قرار دادند. در شناسایی

به‌منظور تایید تشخیص ایزوله‌ها، ژن‌های ITS همه ایزوله‌ها تعیین توالی شدند. نتایج نشان داد که در مورد ۲۰ ایزوله اختلافاتی در تشخیص از ۴ روش انجام‌شده وجود داشت، به‌طوری که ۱۰ ایزوله (۱۶/۶٪) در تست جرم تیوب، ۸ ایزوله (۱۳/۳٪) در تست API و ۹ ایزوله (۱۵٪) در تست کشت روی محیط کروم آگار دارای تشخیص متفاوت در مقایسه با روش مولکولی ITS sequencing بودند و ۳ ایزوله (۵٪) با روش کروم آگار قابل شناسایی نبودند. جزییات مقایسه بین چهار روش تولید جرم تیوب، کشت روی کروم آگار، کیت API و روش مولکولی در جدول ۳ نشان داده شده است. در این مطالعه دو نمونه از جنس پیکیا شناسایی شدند که تست کروم آگار یکی را به‌عنوان کاندید/گلایراتا و دیگری را ناشناخته معرفی کرد. از طرفی گونه‌های کاندید/کفیر را هم به‌عنوان کاندید/گلایراتا و کاندید/تروپیکالایس شناخته بود (جدول ۳). در مطالعه حاضر میزان ضریب کاپا در تشخیص گونه‌های کاندید/آلبیکنس برای روش‌های تولید جرم تیوب، کشت روی کروم آگار و کیت API در مقایسه با روش مولکولی به ترتیب ۰/۹۰، ۰/۶۶ و ۰/۸۶ محاسبه شد. در مطالعه دیگر هم این ضریب برای روش جرم تیوب ۰/۹۰ اعلام شده است [5].

روش کشت روی محیط کروم آگار به‌عنوان یک روشی است که قادر به تشخیص کشت‌های مخلوط و شناسایی کاندید/آلبیکنس، کاندید/تروپیکالایس و گونه‌های کاندید/گلایراتا نیز است، ولی به‌دلیل حساسیت کمتر در مورد کاندید/تروپیکالایس کمتر با روش API انطباق دارد [27-29]. این روش در مطالعه حاضر کمترین توافق را با روش مولکولی نشان داد.

روش‌های بر پایه تعیین توالی برای تعیین هویت گونه‌های کاندیدا انجام شده و به‌عنوان روش صحیح و سریع مطرح است. به‌علاوه تعیین هویت براساس تعیین توالی دارای کارایی بیشتر و موثرتر از روش‌های فنوتیپی و قادر به تشخیص گونه‌های غیر قابل تشخیص با روش‌های رایج است و درصد بالای صحت را در تشخیص فراهم می‌کند [30, 31].

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که دقیق‌ترین روش برای شناسایی قطعی گونه‌های کاندیدا روش مولکولی است. با توجه به اینکه زمان مورد نیاز برای انجام روش مولکولی نسبت به روش کشت روی محیط کروم آگار و استفاده از کیت API 20 C AUX کمتر است، و نیز با درنظرگرفتن دقت بیشتر در روش مولکولی، این روش می‌تواند به‌عنوان روش اصلی تعیین هویت قارچی در آزمایشگاه مورد استفاده قرار بگیرد. همچنین می‌توان از روش مولکولی به‌عنوان یک روش تاییدی در جایی که نتایج روش‌های رایج مورد شک است استفاده کرد. با این حال، علی‌رغم خطاهای موجود در بین تکنیک‌های معمولی تشخیصی گونه‌های کاندیدا، باز هم این روش‌ها به‌صورت روتین در آزمایشگاه‌های تشخیصی استفاده

API با جرم تیوب هماهنگ نبود. نتایج ۲ ایزوله (۲/۳٪) بین تست‌های جرم تیوب با کروم آگار و API اختلاف داشت [8]. مطالعات نشان دادند که روش‌های تولید جرم تیوب و کشت روی محیط کروم آگار به ترتیب ۶۹/۶۶٪ و ۲۶/۹۷٪ قادر به شناسایی کاندیدا در سطح گونه نیستند [5]. در مطالعه حاضر مشخص شد که ۷ ایزوله (۱۱/۶۶٪) در روش کشت روی محیط کروم آگار و ۱۰ ایزوله (۱۶/۶۶٪) در تست جذب قندی با کیت API تشخیص متفاوتی در مقایسه با تست جرم تیوب داشته‌اند (جدول ۳). همچنین در بین نتایج تست‌های کروم آگار و تست جذب قندی کیت API، ۱۶/۶۶٪ ایزوله‌ها (۱۰ ایزوله) نتایج متفاوت را نشان دادند که در این میان ۳ ایزوله تولید کلنی سفید رنگ کردند (جدول ۳). یک ایزوله که در روش مولکولی به‌عنوان کاندید/دابلیننسیس شناسایی شد، دارای نتیجه مثبت در روش تولید جرم تیوب بود و روی محیط کروم آگار با کاندید/آلبیکنس شباهت داشت و تست جذب قندی API نیز آن را کاندید/آلبیکنس شناسایی کرد (جدول ۳).

در مطالعه حاضر بین نتایج تعیین کاندید/آلبیکنس شناسایی‌شده توسط روش‌های جرم تیوب (۵۵٪)، کشت روی کروم آگار (۵۶/۶۶٪) و تست جذب قندی با کیت API 20 C AUX شباهت وجود داشت. در مطالعه دیگری نیز سوزا و همکاران شباهت بین این سه روش برای کاندید/آلبیکنس را نشان دادند [5]. آنها گزارش کردند که برای شناسایی کاندید/آلبیکنس از غیر آلبیکنس، در بین روش‌های معمولی، روش جرم تیوب بیشترین حساسیت را دارد. تست تولید جرم تیوب به‌دلیل سرعت و سادگی در آزمایشگاه‌ها به‌عنوان استاندارد طلایی برای تشخیص گونه‌های کاندید/آلبیکنس از غیر آلبیکنس در نظر گرفته می‌شود [5]. ولی باید در نظر داشت که ۵ تا ۱۰٪ کاندید/آلبیکنس‌ها قادر به تولید جرم تیوب نیستند [21]. از طرفی گونه‌های دیگری مثل کاندید/تروپیکالایس و کاندید/دابلیننسیس هم قادر به تولید ساختارهای مشابهی هستند [22]. احمد و همکاران نشان دادند که در تشخیص ایزوله‌هایی که بین نتایج روش‌های جرم تیوب و جذب قندی آنها اختلاف وجود دارد، روش مولکولی در تایید تشخیص در اولویت است و با این روش به‌راحتی می‌توان گونه‌های کاندید/آلبیکنس و کاندید/دابلیننسیس را تشخیص داد [7].

کاندیدا/کفیر یکی از عوامل ایجاد عفونت در انسان است [23]. مطالعات نشان داده‌اند که کاندید/کفیر به تعداد کم از نمونه‌های کاندیدیازیس تنفسی جدا شده است [24]. همچنین آنها یکی از عوامل ایجاد بیماری تهاجمی در افراد دارای بدخیمی خونی هستند [25]. در این مطالعه ۲ ایزوله از جنس پیکیا شناسایی شدند که قبلاً از نمونه‌های کاندیدیازیس در انسان گزارش شده‌اند [8]. مطالعات نشان داده‌اند که جنس پیکیا قادر به ایجاد بیماری در انسان بدون حضور گونه‌های کاندیدا است [26]. در این مطالعه یک مورد کاندید/دابلیننسیس شناسایی شد که قبلاً از نمونه‌های کاندیدیازیس جدا شده بود [8].

fungal populations in patients with oral candidiasis using internal transcribed spacer region. PLoS One. 2014;9(6):e101156.

11- Pinto FC, Lima DB, Agustini BC, Dallagassa CB, Shimabukuro MF, Chimelli M, et al. Morphological and molecular identification of filamentous fungi isolated from cosmetic powders. Braz Arch Biol Technol. 2012;55(6):897-901.

12- Epstein JB, Polsky B. Oropharyngeal candidiasis: A review of its clinical spectrum and current therapies. Clin Ther. 1998;20(1):40-57.

13- Taschdjian CL, Burchall JJ, Kozinn PJ. Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. AMA J Dis Child. 1960;99(2):212-5.

14- Ramani R, Gromadzki S, Pincus DH, Salkin IF, Chaturvedi V. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. J Clin Microbiol. 1998;36(11):3396-8.

15- Rezaie S, Ban J, Mildner M, Poitschek Ch, Brna Ch, Tschachler E. Characterization of a cDNA clone, encoding a 70 kDa heat shock protein from the dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum*. Gene. 2000;241(1):27-33.

16- Barbedo LS, Figueiredo-Carvalho MH, Muniz MD, Zancopé-Oliveira RM. The identification and differentiation of the *Candida parapsilosis* complex species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer region of the rDNA. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2016;111(4):267-70.

17- Wang Y, Shi C, Liu JY, Li WJ, Zhao Y, Xiang MJ. Multilocus sequence typing of *Candida tropicalis* shows clonal cluster enrichment in azole-resistant isolates from patients in Shanghai, China. Infect Genet Evol. 2016;44:418-24.

18- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 1987;4(4):406-25.

19- Jahanshiri Z, Manifar S, Moosa H, Asghari-Paskiabi F, Mahmoodzadeh H, Shams-Ghahfarokhi M, et al. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients in Iran: Species identification, antifungal susceptibility and pathogenic characterization. Journal de Mycologie Medicale. 2018;28(2):361-6.

20- Ahmad S, Khan Z, Mokaddas E, Khan ZU. Isolation and molecular identification of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Kuwait. J Med Microbiol. 2004;53(7):633-7.

21- Lipperheide V, Andraka L, Pontón J, Quindós G. Evaluation of the *Albicans* IDR plate method for the rapid identification of *Candida albicans*: Die Bewertung des *Albicans* IDR-Systems zur Schnellidentifizierung von *Candida albicans*. Mycoses. 1993;36(11-12):417-20.

22- Cárdenes CD, Carrillo AJ, Arias A, Rodríguez-Álvarez C, Torres-Lana A, Sierra A, et al. Comparison of *Albicans* ID2 agar plate with the germ tube for presumptive identification of *Candida albicans*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002;42(3):181-5.

23- Badiie P, Alborzi A. Susceptibility of clinical *Candida* species isolates to antifungal agents by E-test, Southern Iran: A five year study. Iran J Microbiol. 2011;3(4):183-8.

24- Hosain Pour A, Salari S, Ghasemi Nejad Almani P. Oropharyngeal candidiasis in HIV/AIDS patients and non-HIV subjects in the Southeast of Iran. Curr Med Mycol. 2018;4(4):1-6.

می‌شوند. بنابراین آگاهی از مزایا و محدودیت‌های روش‌ها برای انتخاب بهترین روش ترکیبی به‌منظور تشخیص سریع و درست گونه‌های کاندیدا ضروری است.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از زحمات کلیه پرسنل بخش قارچ‌شناسی انستیتو پاستور تهران که در انجام این پروژه یاری کردند تشکر و قدردانی می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: این مطالعه با تأیید کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران با کد اخلاقی IR.PII.REC.1394.59 انجام شد.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زهرا جهانشیری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۸۰٪)؛ مهدی رزاقی ابیانه (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۲۰٪)

منابع مالی: منابع مالی از محل طرح شماره ۸۷۰ مصوب انستیتو پاستور ایران تأمین شد.

منابع

- 1- Bensadoun RJ, Patton LL, Lalla RV, Epstein JB. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients treated with radiation: Update 2011. Support Care Cancer. 2011;19(6):737-44.
- 2- Dahiya MC, Redding SW, Dahiya RS, Eng TY, Kirkpatrick WR, Coco BJ, et al. Oropharyngeal candidiasis caused by non-*albicans* yeast in patients receiving external beam radiotherapy for head-and-neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2003;57(1):79-83.
- 3- Suryawanshi H, Ganvir SM, Hazarey VK, Wanjare VS. Oropharyngeal candidosis relative frequency in radiotherapy patient for head and neck cancer. J Oral Maxillofac Pathol. 2012;16(1):31-7.
- 4- Redding SW, Zellars RC, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Caceres MA, Fothergill AW, et al. Epidemiology of oropharyngeal *Candida* colonization and infection in patients receiving radiation for head and neck cancer. J Clin Microbiol. 1999;37(12):3896-900.
- 5- Souza MN, Ortiz SO, Mello MM, Oliveira FD, Severo LC, Goebel CS. Comparison between four usual methods of identification of *Candida* species. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2015;57(4):281-7.
- 6- Tsui CK, Woodhall J, Chen W, Lévesque CA, Lau A, Schoen CD, et al. Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. IMA Fungus. 2011;2(2):177-89.
- 7- Ahmad S, Khan Z, Asadzadeh M, Theyyathel A, Chandy R. Performance comparison of phenotypic and molecular methods for detection and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. BMC Infect Dis. 2012;12(1):230.
- 8- Bitar I, Khalaf RA, Harastani H, Tokajian S. Identification, typing, antifungal resistance profile, and biofilm formation of *Candida albicans* isolates from Lebanese hospital patients. BioMed Res Int. 2014;2014:931372.
- 9- Bonfim-Mendonça PD, Fiorini A, Shinobu-Mesquita CS, Baeza LC, Fernandez MA, Svidzinski TI. Molecular typing of *Candida albicans* isolates from hospitalized patients. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2013;55(6):385-91.
- 10- Ieda S, Moriyama M, Takashita T, Maehara T, Imabayashi Y, Shinozaki S, et al. Molecular analysis of

CHROMagar Candida. J Clin Microbiol. 2001;39(5):2015-6.

29- Pfaller MA, 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(1):58-61.

30- Garner CD, Starr JK, McDonough PL, Altier C. Molecular identification of veterinary yeast isolates by use of sequence-based analysis of the D1/D2 region of the large ribosomal subunit. J Clin Microbiol. 2010;48(6):2140-6.

31- Borman AM, Szekely A, Linton CJ, Palmer MD, Brown P, Johnson EM. Epidemiology, antifungal susceptibility, and pathogenicity of *Candida africana* isolates from the United Kingdom. J Clin Microbiol. 2013;51(3):967-72.

25- Dufresne SF, Marr KA, Sydnor E, Staab JF, Karp JE, Lu K, et al. Epidemiology of *Candida kefyr* in patients with hematologic malignancies. J Clin Microbiol. 2014;52(6):1830-7.

26- Chakrabarti A, Singh K, Narang A, Singhi S, Batra R, Rao KL, et al. Outbreak of *Pichia anomala* infection in the pediatric service of a tertiary-care center in Northern India. J Clin Microbiol. 2001;39(5):1702-6.

27- Eraso E, Moragues MD, Villar-Vidal M, Sahand IH, González-Gómez N, Pontón J, et al. Evaluation of the new chromogenic medium Candida ID 2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. J Clin Microbiol. 2006;44(9):3340-5.

28- Jabra-Rizk MA, Brenner TM, Romagnoli M, Baqui AA, Merz WG, Falkler WA, et al. Evaluation of a reformulated