جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۰ ، شماره ۴ ، زمستان ۱۳۸۴
صفحات: ۲۴۷- ۲۵۴

ارزیابی روشهای تشخیصی فنوتیپی جهت افتراق کاندیدا دابلی‌نینسیس از کاندیدا آلبیکنس

فرزاد کتیرائی*.M.Sc، محمدحسین یادگاری**✍ .Ph.D،
معصومه شمس قهفرخی** .Ph.D، حسین زرین‌کفش* .M.Sc

چکیــده

هدف: بررسی وجود کاندیدا دابلی‌نینسیس در بین جدایه‌های بالینی و بررسی روشهای تشخیص افتراقی آن با کاندیدا آلبیکنس می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه ۵۲۰ جدایه بالینی با استفاده از ۵ روش فنوتیپی تشخیص افتراقی کاندیدا دابلی نینسیس از کاندیدا آلبیکنس در دو مرحله شامل مرحله تشخیص احتمالی و تشخیص قطعی (تکمیلی) مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مرحله اول از بررسی رنگ کلنی در محیط کروم آگار کاندیدا، بررسی ایجاد کلامیدوکونیدی در محیط کازئین آگار و بررسی رشد در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد مورد استفاده قرار گرفت. جدایه‌هایی که در این مرحله خصوصیات کاندیدا دابلی نینسیس را بروز دادند در مرحله دوم از نظر جذب قندهای ترهالوز و گزیلوز و فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز درون سلولی مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: از ۵۲۰ جدایه مورد بررسی در مرحله اول ۱۳ جدایه مشکوک به کاندیدا دابلی نینسیس شناسائی شدند. در مرحله دوم و با انجام آزمایشات تکمیلی در نهایت ۵ جدایه به عنوان کاندیدا دابلی نینسیس شامل ۴ جدایه واژن و یک جدایه ادرار شناخته شدند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه شیوع کاندیدا دابلی نینسیس در واژن ۱/۳۳٪ و در ادرار ۰/۷۴٪ و در مجموع جدایه‌های بالینی ۰/۹۶٪ تعیین می‌گردد و باید گفت این‌گونه در عفونتهای انسانی از شیوع نادری برخوردار است. همچنین در بین روشهای فنوتیپی جهت تشخیص افتراقی این دو گونه کاندیدا استفاده توام از محیط کروم آگار و بررسی آنزیم بتاگلوکوزیداز درون سلولی جهت جدایه‌های اولیه و تازه بدست آمده از نمونه‌های بالینی توصیه می‌گردد. در مورد جدایه‌هایی که از کشت‌های مجدد بدست می‌آیند روشهای فنوتیپی توصیه نمی‌گردد.

واژه‌های کلیدی: کاندیدا دابلی نینسیس، کاندیدا آلبیکنس، تشخیص افتراقی، خصوصیات فنوتیپی

مقــدمــه

عوامل کاندیدائی در انسان عفونت‌های متنوعی ایجاد می‌کنند. از جمله این عفونت‌ها می‌توان به بیماری‌های جلدی و مخاطی، و لوواژنیت، عفونت‌های سیستمیک و بیماری‌های اوروفارنژیال

دریافت مقاله: ۸۴/۱/۲۴ پذیرش مقاله: ۸۴/۶/۱

✍ نویسنده مسئول: استادیار گروه قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران ـایران
*مرکز تحقیقات قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
** گروه قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت‌مدرس
آدرس پست الکترونیکی: Email: yadegarm2000@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

اشاره کرد. عفونتهای سیستمیک و دهانی – حلقی معمولاً در افرادی ایجاد می‌شود که بیماریهای مستعد کننده و زمینه‌ای دارند. کاندیدیازیس دهانی و مری در افراد مبتلا به ایدز شیوع بیشتری دارد. شایع‌ترین عامل بیماری کاندیدا آلبیکنس است و سایر گونه‌ها از قبیل کاندیدا گلابراتا، کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا تروپیکالیس در مرحله بعد قرار دارند. با این وجود گزارشهایی وجود دارد که بیانگر افزایش شیوع عفونتهای کاندیدائی در اثر گونه‌های غیرآلبیکنس است. (۱)

در اوایل دهه ۹۰ میلادی دانشمندان در حین بررسی بیماران ایدزی که به کاندیدیازیس دهانی مبتلا بودند به گونه غیر معمولی (آتیپیک) از کاندیدا آلبیکنس برخورد کردند. (۲) این گونه غیر معمول در بیمارانی که از فلوکونازول برای درمان کاندیدیازیس دهانی استفاده کرده بودند مشاهده شد. این گروه از کاندیداها از بسیاری جهات به کاندیدا آلبیکنس شباهت داشتند. بطوریکه در بررسی ایجاد لوله زایا و ایجاد کلامیدوکونیدی در محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰ همانند کاندیدا آلبیکنس مثبت بودند. اما با توجه به تفاوتهایی که در برخی از خصوصیات ظاهری، الگوی جذب قندها و مقاومت داروئی با کاندیدا آلبیکنس داشتند به عنوان کاندیدا آلبیکنس آتیپیک معرفی گردیدند.

در سال ۱۹۹۵ سولیوان و همکارانش با بررسی خصوصیات ظاهری و ملکولی این جدایه‌های غیر معمولی و مقایسه آن با کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا استلاتوئیده، آنها را تحت عنوان گونه جدیدی بنام *کاندیدا دابلی* نینسیس(Candida dubliniensis) نام‌گذاری کردند و تفاوتهای فنوتیپی و ژنوتیپی (خصوصیات ظاهری و مولکولی) آنرا شرح دادند. (۲) این گونه معمولاً بر اساس ایجاد کلنی به رنگ سبز تیره در محیط کروم آگار کاندیدا، ایجاد کلامیدوکونیدی در محیط کازئین آگار، فقدان جذب گزیلوز، ترهالوز، آلفادی متیل گلوکوزید و لاکتات ، عدم رشد در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد ، ایجاد هایفای انگشتی در محیط پالز آگار (Pal's agar)، فقدان فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز درون سلولی (Intracellular β-D-glucosidase) و ایجاد هایف و هایف کاذب در محیط دانه نایجر (Niger seed agar) از کاندیدا آلبیکنس قابل افتراق است . (۳–۹) (جدول ۱) همچنین بر اساس روشهای مولکولی از جمله RFLP و انگشت نگاری DNA (DNA – fingerprinting) و با بررسی پروب های Ca3 در کاندیدا آلبیکنس وCd25 در کاندیدا دابلی نینسیس می توان این دو گونه را از هم تشخیص داد. (۲)

جدول۱. مقایسه خصوصیات فنوتیپی کاندیدا آلبیکنس وکاندیدا دابلی نینسیس

خصوصیت	کاندیدا آلبیکنس	کاندیدا دابلی نینسیس
ایجاد لوله زایا	+	+
ایجاد کلامیدوکونیدی	+	++
رشد در ۳۷ درجه سانتی گراد	+	+
رشد در۴۲ درجه سانتی گراد	++	+/–
رشد در ۴۵ درجه سانتی گراد	+	–
رشد در محیط حاوی ۶/۵ درصد نمک	+	–
جذب گزیلوز	+	–
جذب لاکتات	+	–
جذب ترهالوز	+	–
جذب MDG	+	–
رنگ کلنی بر روی کروم آگار	سبز	سبز تیره
ایجاد کلامیدونیدی روی کازئین آگار	+/–	++
ایجاد هایف بر روی محیط دانه نایجر	–	+
فعالیت بتا گلو کوزیداز درون سلول	+	–
فلورسانس در محیط متیل بلوآگار	+	–
فرم کلنی بر روی محیط پالز آگار	صاف	Rough + هایفای انگشتی

کاندیدا دابلی نینسیس علیرغم تشابهات زیادی که با کاندیدا آلبیکنس دارد، نسبت به آن از قدرت بیماری‌زائی کمتری برخوردار است و کاندیدا آلبیکنس در کلونیزاسیون و ایجاد عفونت در انسان موفق تر است. (۱۰) کاندیدا دابلی نینسیس از عوامل تشکیل دهنده فلور نرمال در انسان است و در ایجاد عفونت شیوع کمتری دارد، البته میزان شیوع آن در افراد مبتلا به ایدز و افراد آلوده به ویروس HIV که کاندیدیازیس دهانی دارند قابل توجه است. بدلیل اینکه کاندیدا دابلی نینسیس در ابتدا از حفرات دهانی بیماران ایدزی که کاندیدیازیس دهانی عود کننده داشتند جدا شده است و بسیاری از این بیماران داروهای ضدقارچی گروه آزول از جمله فلوکونازول جهت جلوگیری از عود بیماری و درمان آن استفاده می‌کرده‌اند اینطور بنظر می‌رسد که

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

اساساً ظهور کاندیدا دابلی نینسیس در اثر روشهای درمانی بکار برده شده برای این بیماران است (مشابه کاندیدا گلابراتا). البته مطالعات نشان می‌دهد که کاندیدا دابلی نینسیس غالباً به داروهای گروه آزول، پلی ان ها و اکینوکاندین‌ها حساس است. (۱۱-۱۳) قابل توجه اینکه میزان حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد فلوکونازول (MIC) برای جدایه‌های کاندیدا دابلی نینسیس بطور قابل توجهی بیشتر از جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس است. (۱۱) مقاومت به فلوکونازول در جدایه‌های کاندیدا دابلی نینسیس توسط محققین متعددی گزارش شده است. (۱۲-۱۵) با توجه به اهمیتی که این‌گونه در بیماران نقص ایمنی و مبتلا به ایدز دارد و با توجه به مقاومت آن در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایجی که در این بیماران استفاده می‌شود بررسی اپیدمیولوژیک و ارزیابی روشهای تشخیص آن در نمونه‌های بالینی اهمیت زیادی دارد.

Sullivan و همکارانش (۱۹۹۷) توزیع وسیع جغرافیایی جدایه‌های کاندیدا دابلی نینسیس را در کشورهای سوئیس، ایرلند، انگلستان، استرالیا و آرژانتین نشان دادند.

در سال ۱۹۹۸ Kirkpatrick و همکارانش از آمریکای شمالی، در سال ۲۰۰۳ Fotedar و همکارانش از عربستان سعودی، Wang از سنگاپور، Blignaut از آفریقا کاندیدا دابلی نینسیس را گزارش نمودند. (۱۷-۱۹) مطالعه حاضر ارزیابی روشهای تشخیص فنوتیپی جهت افتراق کاندیدا دابلی نینسیس در نمونه‌های بالینی و میزان جداسازی آن را در نمونه‌های بالینی بدست آمده از واژن، ادرار، دهان، مدفوع، ناخن و پوست در ایران نشان می‌دهد.

روش بررسی

جهت انجام آزمایشات تشخیصی، جدایه استاندارد کاندیدا دابلی نینسیس تحت عنوان CD36 از دکتر سولیوان از کالج ترینیتی در ایرلند تهیه شد و تمام مراحل بر روی این جدایه انجام و با جدایه‌های مورد بررسی مقایسه شد. در این مطالعه از روش غربالی جهت جداسازی این دو گونه استفاده شده است. ۵۲۰ جدایه که از نظر ایجاد لوله زایا مثبت بودند شامل ۳۰۰ جدایه واژن ۱۳۵، جدایه ادرار، ۵۹ جدایه دهان، ۱۸ جدایه پوست و ناخن و ۸ جدایه مدفوع جمع‌آوری شد جدایه از مراکز درمانی مختلف از شهرستانهای اراک، تهران و کرج جمع‌آوری شده است. جدایه‌ها پس از جداسازی در آب مقطر و در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جدایه‌ها در دو مرحله مورد آزمایش قرار گرفتند. در مرحله اول (مرحله تشخیص احتمالی) سه آزمایش بررسی ایجاد کلامیدوکونیدی در محیط کازئین آگار، رنگ کلنی در محیط کروم آگار و بررسی رشد در ۴۵ درجه سانتی گراد انجام گرفت. بر روی هر یک از جدایه‌هایی که در این مرحله انتخاب شدند در مرحله دوم (مرحله تشخیص قطعی) آزمایش بتاگلوکوزیداز درون سلولی و بررسی جذب قندهای ترهالوز و گزیلوز انجام گرفت .

بررسی ایجاد کلامیدوکونیدی در محیط کازئین آگار . جدایه‌های مورد بررسی و نمونه استاندارد در ابتدا بر روی محیط سابوروگلوکز آگار کشت داده و بمدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰°C نگهداری شدند. جهت تهیه محیط کازئین آگار ۱۰گرم پودر محیط Skim milk در ۹۰ میلی لیتر آب مقطر و در ظرف دیگری ۳ گرم آگار در ۹۷ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. دو سوسپانسیون حاصل در دمای ۱۲۱°C بمدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شدند. پس از سرد شدن در دمای۵۰°C-۴۵ دو سوسپانسیون فوق با هم مخلوط گردید و در پلیت (پتری دیش) یک بار مصرف استریل پخش شد. جدایه‌های رشد یافته در محیط سابوروگلوکز آگار به صورت شیارهای کم‌عمق و موازی در محیط کازئین آگار تلقیح شدند. محیط تلقیح یافته پس از تلقیح ۴۸ ساعت در دمای°C ۲۴ انکوبه گردید. سپس از نظر ایجاد کلامیدوکونیدی با استفاده از لاکتوفنل کاتن بلو در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد.

بررسی رشد در دمای °C ۴۵ . جدایه‌های مورد آزمایش ابتدا در محیط سابوروگلوکز آگار کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای °C ۳۷ انکوبه شدند. سپس بخش کوچکی از کلنی رشد یافته مجدداً در محیط سابوروگلوکز آگار دیگری بطور خطی کشت داده شد و در دمای °C ۴۵ انکوبه شد و در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت از نظر رشد و عدم رشد بررسی گردید.

بررسی رنگ کلنی در محیط کروم آگار کاندیدا . ۴۷/۷ گرم محیط کروم آگار کاندیدا (Company Paris France CA222) در یک لیتر آب مقطر استریل و در زیر هود

بیولوژیک با استفاده از حرارت حل شد. عمل حرارت دادن تا جوشاندن محیط و حل کامل دانه‌های آگار ادامه یافت. سپس محیط حاصل تا دمای درجه سانتی‌گراد سرد و در پتری دیش یا پلیت یک بار مصرف استریل پخش گردید و پس از منجمد شدن در یخچال و در تاریکی نگهداری شد. جدایه‌های مورد بررسی که شامل جدایه‌های کشت اول و تازه بودند به همراه نمونه استاندارد به روش کشت خطی به محیط منتقل شدند و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ °C و در تاریکی انکوبه شدند. پس از طی مدت انکوباسیون از نظر رنگ و فرم کلنی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی جذب قند های ترهالوز و گزیلوز (اگزانوگرافی) . جهت انجام آزمایش محیط پایه نیتروژن (Yeast Nitrogen Base) و سوسپانسیون نمکی از جدایه‌های مورد بررسی تهیه گردید. ۲ میلی لیتر از سوسپانسیون نمکی ارگانیسم به ۱/۵ میلی لیتر محیط پایه نیتروژن افزوده گردید و از طرف دیگر ۱۳,۵ میلی لیتر آگار ذوب شده و استریل که به دمای ۴۵ درجه رسیده بود به پلیت‌های حاوی محیط پایه نیتروژن و سوسپاسیون نمکی ارگانیسم افزوده شد و با حرکت چرخشی در یک سطح صاف مخلوط گردید. پس از سرد شدن و منجمد شدن محیط‌ها، دیسک‌های آماده قندی (Minitek Becton Dickinson Microbiology Lot system 2.251) به فواصل معین در سطح پلیت‌ها قرار داده شدند و بمدت ۴۸ ساعت در حرارت اطاق نگهداری و کنترل شدند. پس از گذشت زمان مورد نظر از نظر ایجاد هاله کدر در اطراف دیسکها که بیانگر جذب قندهای مورد نظر بود بررسی شدند.

بررسی فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز درون سلولی . ابتدا سلولهای مخمری در ۵ میلی لیتر محیط مایع عصاره قلب مغز (Brain Heart Infusion agar) (Difco) کشت داده شدند و به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۵ °C و در حالت چرخش دورانی (Shaking) با دور ۱۲۰ rpm انکوبه شد . در مرحله بعد در دمای اتاق یک میلی لیتر از محیط مایع که مخمر در آن رشد یافته بود به لوله‌های اپندورف با حجم ۱/۵ میلی لیترمنتقل شد و بمدت ۲ دقیقه در دور ۱۵۰۰۰ g سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل در ۱ میلی لیتر بافر استات سدیم ۰/۱ مولار با pH: 5.5 که حاوی یک میلی‌گرم سوبسترای آنزیم یعنی ۴- متیل آمبلی فریل بتا دی گلوکوزید (sigma) بود حل گردید. سلولهای مخمری حل شده در این بافر بوسیله ورتکس پس از افزودن ۰/۴ گرم دانه‌های شیشه‌ای (Glass beads) با قطر ۰/۵ میلی متر در چهار مرحله و هر مرحله ۳۰ ثانیه شکسته شدند. پس از سانتریفوژ درg ۱۵۰۰۰ بمدت ۲ دقیقه، ۰/۱ میلی لیتر از سوپرناتانت حاصل به به چاهک‌های میکروپلیت منتقل شد. ایجاد فلورسانس زرد رنگ که بیانگر فعالیت بتاگلوکوزیداز درون سلولی است پس از دقائق ۱۵، ۳۰ و ۶۰ با استفاده از دستگاه U.V ترانس لومیناتور در طول موج ۳۰۲ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

از۳۰۰ جدایه بدست آمده از واژن ۵ جدایه (D35, D37, D167, D217, D283) ، از ۱۳۵جدایه ادرار یک جدایه (D150) و از ۵۹ جدایه دهانی ۴ جدایه (D111, D120, D124, D127) در محیط کازئین آگار ایجاد کلامیدوکونیدی نمودند. هیچ یک از جدایه‌های مدفوع، پوست و ناخن در این محیط قادر به ایجاد کلامیدوکونیدی نبودند. در میان ۱۰جدایه‌ای که ایجاد کلامیدوکونیدی نمودند در ۳ جدایه ایجاد کلامیدوکونیدی به صورت چندتائی و خوشه‌ای بود (D37 D283, D150,) . از نظر بررسی رشد در دمای ۴۵ °C ، سه جدایه واژن (D33, D37, D283) یک جدایه ادرار (D150) و ۳ جدایه دهانی (D120, D125, D129) فادر به رشد نبودند و آزمایش تکمیلی بر روی آنها انجام گرفت. از نظر بررسی رنگ کلنی در محیط کروم آگار ۴ جدایه بدست آمده از واژن (D167 , D33, D37, D283) و یک جدایه ادرار (D150) ایجادکلنی سبز تیره نمودند. هیچیک از جدایه‌های مدفوع، پوست و ناخن در این محیط ایجاد کلنی سبز تیره ننمودند (جدول ۲). در مجموع با استفاده از این سه آزمایش در مرحله جداسازی اولیه ۱۳ جدایه مشکوک به کاندیدا دابلی نینسیس بدست آمد که حداقل در یکی از سه خصوصیت مورد بررسی مشابه کاندیدا دابلی نینسیس بودند . در مرحله دوم بر روی این ۱۳ جدایه آزمایش جذب بتا گلوکوزیداز درون سلولی انجام گرفت. از ۱۳ جدایه مورد بررسی در آزمایش جذب قند

جدول ۲ . نتایج حاصل از آزمایشات مرحله اول

شماره	منبع نمونه	رنگ کلنی در کروم آگار	رشد در ۴۵ درجه	کلامیدوکونیدی در کازئین آگار
D33	واژن	سبزتیره	-	-
D35	واژن	سبز	+	+
D37	واژن	سبزتیره	-	+
D111	دهان	سبز	+	+
D120	دهان	سبز	-	+
D124	دهان	سبز	+	+
D125	دهان	سبز	-	-
D127	دهان	سبز	+	+
D129	دهان	سبز	-	-
D150	ادرار	سبزتیره	-	+
D167	واژن	سبزتیره	+/-	+
D217	واژن	سبز	+	+
D283	واژن	سبزتیره	-	+

جدول ۳. نتایج حاصل از آزمایشات مرحله دوم

شماره	منبع نمونه	بتا گلوکوزیداز	گزیلوز	ترهالوز	تشخیص نهایی
D33	واژن	-	+	-	C.dubliniensis
D35	واژن	+	+	-	C.albicans
D37	واژن	-	-	-	C.dubliniensis
D111	دهان	+	+	+	C.albicans
D120	دهان	+	+	+	C.albicans
D124	دهان	+	+	+	C.albicans
D125	دهان	+	+	+	C.albicans
D127	دهان	+	+	+	C.albicans
D129	دهان	+	+	+	C.albicans
D150	ادرار	-	-	+	C.dubliniensis
D167	واژن	-	-	-	C.dubliniensis
D217	واژن	+	+	+	C.albicans
D283	واژن	-	-	-	C.dubliniensis

ترهالوز ۴ نیز جدایه (D33, D37, D167, D283) و در بررسی جذب گزیلوز (D37, D150, D167, D283) منفی بودند. از ۱۳ جدایه منتخب مورد بررسی ۵ جدایه از نظر فعالیت آنزیم منفی بودند و به عنوان کاندیدا دابلی نینسیس شناسایی گردیدند. این جدایه‌ها

جدول۴. درصد شیوع کاندیدا دابلی‌نینسیس در نمونه‌های بالینی

نمونه بالینی	مجموع	کاندیدا آلبیکنس	کاندیدا دابلی نینسیس
واژن	۳۰۰	۲۹۶(٪۹۸,۶۷)	۴(٪۱,۳۳)
ادرار	۱۳۵	۱۳۴(٪۹۹,۲۶)	۱(٪۰,۷۴)
دهان	۵۹	۵۹(۱۰۰)	۰
پوست و ناخن	۱۸	۱۸(۱۰۰)	۰
مدفوع	۸	۸(۱۰۰)	۰
مجموع	۵۲۰	۵۱۵(٪۹۹,۰۴)	۵(٪۰,۹۶)

شامل ۴ جدایه واژن (D33, D37, D283, D167) و یک جدایه ادرار (D150) بودند.

بحث

این اولین مطالعه‌ای است که در ایران جداسازی کاندیدا دابلی نینسیس را نشان می‌دهد. بطور معمول تشخیص کاندیدا آلبیکنس بر اساس خصوصیات فنوتیپی شامل ایجاد لوله زایا در محیط سرم و ایجاد کلامیدوکونیدی انتهایی در محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰ می‌باشد از طرفی جدایه‌های کاندیدا دابلی نینسیس نیز در بسیاری از خصوصیات از جمله دو خصوصیت مذکور با آن مشابهت دارند و لذا در گذشته و حال امکان تشخیص اشتباه این دو گونه وجود داشته است. در این مطالعه روشهای تشخیص فنوتیپی بر اساس مطالعات و گزارشات سایر محققین، در دو مرحله شامل مرحله تشخیص احتمالی و مرحله تکمیلی، جهت تشخیص و جداسازی کاندیدا دابلی نینسیس بکار برده شده است. (۳-۷) در مرحله اول، از رشد در دمای ۴۵ °C ، بررسی رنگ کلنی در محیط کروم آگار کاندیدا و ایجاد کلامیدو کونیدی در محیط کازئین آگار جهت جداسازی جدایه‌های مشکوک به کاندیدا دابلی نینسیس استفاده شده است. مطالعات مختلف نشان داده است که استفاده از رشد

در دمـای ۴۵ °C روش مناسبی برای تفکیک کاندیدا دابلی نینسیس از کاندیدا آلبیکنس است. (۷، ۲۰-۲۲)

در ایـن مطالعـه از جدایه های مورد بررسی ۸ جدایه قادر به رشد در دمـای۴۵ °C نـبودند کـه تـنها ۴ جدایـه در نهایت به عنوان کاندیدا دابلـی نینسـیس شنلسـایی شـدند و ۴ جدایـه دیگر کاندیدا آلبیکنس بودنـد. بنابرایـن اسـتفاده از ایـن روش بـه تنهایـی بـرای تشخیص اطمیـنان بخـش نیسـت، این یافته مطابق با برخی دیگر از مطالعات سـایر محققیـن اسـت. (۲۰، ۲۲، ۲۳) با استفاده از محیط کازئین آگار ۱۰ جدایه ایجاد کلامیدوکونیدی نمودند که ۴ جدایه با انجام آزمایش تکمیلـی به عنوان کاندیدا دابلی نینسیس شناسایی شدند . قابل توجه ایـنکه ۳ جدایـه ایجـاد کلامیدوکونیدی در آنها بصورت خوشه ای و چـند تایـی و در ۷ جدایه دیگر کلامیدوکونیدی انتهایی و منفرد یا دو تایی بود. این یافته نشان می‌دهد که این روش هنگامی قابل اعتماد اسـت کـه ایجـاد کلامیدوکونـیدی بـه صـورت دستجات چندتایی و خوشـه‌ای باشد. پنج جدایه بر روی محیط کروم آگار ایجاد کلنی سبز تـیره نمودنـد و بـه عـنوان جدایـه‌های احتمالی بر روی آنها آزمایش تکمیلـی انجـام شـد که هر ۵ جدایه به عنوان کاندیدا دابلی نینسیس شناسـائی شـدند. با توجه به این نتایج و نظر برخی دیگر از محققین ایـن روش، یعنی استفاده از محیط کروم آگار و انکوباسیون آن در ۳۷ درجـه سـانتی گـراد بمـدت ۷۲ ساعت روش مناسب برای تشخیص اولـیه کـاندیدا دابلـی نینسـیس است. (۲، ۳، ۲۲) البته لازم به تذکر است که این روش محدود به کشتهای اولیه و جدایه‌های تازه بدست آمـده ازنمونـه‌های بالینی است (نه جدایه‌هایی که از کشتهای مجدد بدست می‌آیند). با استفاده از سه روشی که در بالا ذکر شد (در مرحله اول مطالعـه) ۱۳ ایزولـه مشکوک به کاندیدا دابلی نینسیس شناسایی شـدند و آزمـایش تکمیلـی تحـت عـنوان بررسـی فعالیـت آنـزیم بـتاگلوکوزیداز درون سـلولی بر روی این جدایه‌ها انجام گرفت. از ۱۳ جدایـه مـورد بررسی در آزمایش بتاگلوکوزیداز درون سلولی ۵ جدایه منفـی بودنـد و بـه عنوان کاندیدا دابلی نینسیس شناسایی شدند که شـامل ۴ جدایه بدست آمده از واژن و یک جدایه بدست آمده از ادرار بـوده اسـت. اسـتفاده از آنـزیم بـتاگلوکوزیداز درون سلولی مطابق با مطالعـات سایر محققین روش مناسبی جهت تشخیص این‌گونه است هـر چـند ایـن روش نـیز محدود به جدایه‌های تازه و کشتهای اولیه است. (۲۴)

در نهایـت در ایـن مطالعـه شـیوع کاندیدا دابلی نینسیس در بین جدایـه‌هـای جـرم تیوب مثبت واژن ۱/۳۳٪ و در بین جدایه‌های ادرار ۰/۷۴٪تعییـن گـردید هـر چـند در بیـن جدایـه‌های دهان، مدفـوع، پوسـت و ناخـن کـاندیدا دابلی نینسیس بدست نیامداما تعییـن شـیوع آن نیاز به بررسی بیشتری دارد. در مجموع در بین جدایـه‌هـای بالینـی مورد بررسی ۵ جدایه (کمتر از یک درصد) کـاندیدا دابلی نینسیس جدا شد. بطور کلی باید گفت خصوصیات فنوتیپـی کـاندیدا دابلی نینسیس قابل بحث است. در بسیاری از خصوصـیات کاندیدا دابلی نینسیس با کاندیدا آلبیکنس مشابهت دارد و حتـی از نظـر ژنتیکـی ایـن دو گونه وابستگی زیادی بهم دارنـد. امـا از سـوی دیگر باید گفت محققین با روشهای مختلف براسـاس خصوصـیات فنوتیپـی ایـن دو گونـه را از هـم تفکیک کرده‌اند. نکته قابل توجه اینکه روشهای فنوتیپی در مواردی فاقد ثبات‌اند و با تکرار آزمایش نتایج متفاوتی بدست می‌آید. همچنین همانطور که ذکر شد برخی از این روشها تنها در مورد جدایه‌های تـازه و کشـتهای اولـیه کاربرد دارد و در مورد جدایه‌هایی که از قـبل نگهداری شده‌اند و یا از کشتهای مجدد بدست آمده‌اند غیر قـابل اطمیـنان اسـت. بنابرایـن بـاید گفت استفاده از یک روش فنوتیپـی جهت تشخیص افتراقی این دو گونه کافی نیست و باید روشـهای تـوام انجـام شـود. ما جهت تشخیص افتراقی کاندیدا دابلـی نینسـیس از کـاندیدا آلبیکـنس، در صـورت اسـتفاده از جدایـه‌هـای اولـیه، استفاده از کروم آگار و بتاگلوکوزیداز تست را بطـور همـزمان پیشـنهاد می‌کنیم. در بسیاری از آزمایشگاههای بالینـی ایـن روشـها قـابل انجـام‌انـد. در مورد جدایه‌هایی که از کشـتهای مجـدد بدسـت مـی‌آیـند اسـتفاده از روشهای فنوتیپی توصـیه نمـی‌شـود با این وجود استفاده از روشهایی مثل کازئین آگـار و رشـد در دمـای ۴۵ درجـه سـانتی گراد در کنار روشهای مذکـور مفـید اسـت. ناگفـته نماند که در تمام موارد بدون شک بهتریـن و مطمئـن‌ترین راه تشخیص کاربرد روشهای مولکولی اسـت، بـه این دلیل استفاده از روشهای فنوتیپی جهت تشخیص اولـیه و تائـید آن بـا روشـهای مولکولـی در آزمایشگاههایی که امکانات انجام آنرا دارند توصیه می‌شود.

در مجمـوع بـاید گفت کاندیدا دابلی نینسیس در بین جدایه‌های بدسـت آمده از نمونه‌های بالینی از شیوع نادری برخوردار است. اینکه ایـن گونـه در افـراد نـرمال از چه مکانهایی جدا می‌شود مورد سوال بـوده اسـت ؟ در افـراد مبتلا به بیماری ایدز بیشتر در حفرات دهانی وجود دارد اما در افراد نرمال و غیر مبتلا به ایدز این نکته بطور کامل روشن نشده است ؟

نتیجـه‌گیری: در این مطالعه نشان داده شد که دراین افراد این گونـه غـیر آلبیکنسـی بـا توجه به شیوع نادری که دارد از نمونه‌های بدسـت آمـده از واژن بیشـتر جـدا می‌شود . با این وجود روشن شدن نقـش ایـن گونـه مخمـری در عفونـتهای انسـانی نـیاز بررسی‌های بیشتری دارد .

References

1. Kremery V, Barnes AJ. Non albicans candida sp. causing fungaemia pathogenicity and antifungal resistance. J Hos Infec 2002; 50: 243- 260.

2. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett D E, Coleman DC. Candida dubliniensis sp. nov: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV infected individuals. Microbiol 1995; 141: 1507 – 21.

3. Odds FC, Davidson A. Room temperature use of CHRO Magar canidida. Diag Microbiol and infect Dis. 58; 2000: P. 147 –150.

4. Mosca CO, Moragves MD, Liovo J, AlMosaid A, Coleman DC, Ponton J. Casein agar: a useful medium for differentiation candida dubliniensis from candida albicans, J clinical Microbiol 2003; 41: 1259-62.

5. Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al–Mosid Coleman DC. Comparison of epidemiology, drug resistance and virulence of candida dubliniensis and candida albicans. FEMS Yeast Research 2004; 4(4-5): 369-376.

6. Schoofs A FC, Odds R, Colebunders M, leven H Goossens. Use of specialized isolation media for recognition and identification of Candida dubliniensis isolates from HIV infected patients. Eur J Clin Microbiol infect 1997; 16: 296-300.

7. Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of Candida dubliniensis from Candida albicans. J clinical Microbiol 1998; 36: 2093-5.

8. Al Mosaid A, sulivan DJ, Coleman DC. Differentiation of candida dubliniensis from candida albicans on pal's agar. J clinical microbiol 2003; 41: 4787-9.

9. Lees E, Barton R. The use of Niger seed agar to screen for candida dubliniensis in the clinical microbiology laboratory. Diagnostic Microb and infect 2003; 4: 13–7.

10. Donnelly SM, Sullivan DJ, Shanley DB, Coleman DC. Phylogenetic analysis and rapid identification of candida dubliniensis based on analysis of ACTI intron and sequences. Microbiol 1999; 145: 1871–82.

11. Odds FC, Van Nuffel L, Dams G. Prevalence Of Candida dubliniensis in a yeast stook collection. J clinical Microbiol 1998; 36: 2869-73.

12. Martinez M, Lopez Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Backmann SP, Patterson TF. Replacement of Candida albicans with C. Dubliniensis in human immunodeficiency virus infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with flocunazole. J clinical Microbiol 2002; 40: 3135-9.

13. Pera S, Lopez Ribot JL, Kirk patrick WR,

Keller SM, martinez M, paterson TF. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in candida dubliniensis isolates from HIV infected patient with chemotherapy 2002 ; 46: 1697-703.

14. Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, McCreary CE, Harrington BJ, Coleman DC. Antifungal drug Susceptibilities of oral Candida dubliniensis isolates from HIV infected and non HIV infected subjects and generation of stable flocunazole resistant derivatives in vitro. Antimicrob. Agents Chemotherapy 1997; 41: 617–23.

15. Ruhnke M, Schmidt Westhausen A, Morschhauser J. Development of simultaneous resistance to flocunazole in candida albicans and candida dubliniensis in a patient whit AIDS. J Antimicrob chemoter 2002; 46: 291-5.

16. Sullivan D, Haynes K, Bille J, Henman M, Coleman D. Widespread geographic distribution of oral candida dubliniensis strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. J clinical Microbiol 1997; 3: 960–4.

17. Fotedar R, Al-Hedaithy SS. Candida dubliniensis at a university Hospital in Saudi Arabia. J clinical Microbiol 2003; 1907–11.

18. Yang CW, Barkham TM, Wang Y. Prevalence of candida dublininiesis in Singapore. J Microbiol 2003; 41: 472–4.

19. Blignaut E, Pujol C, Joly S, Soll D. Racial Distribution at candida dubliniensis colonization among South Africans J clinical Microbiol 2003; 41(5): 1838-42.

20. Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, oropharyngeal candidiasis. Antimicrob Agent Sullivan DJ, Coleman DC, et al. Identification of candida dubliniensis based on temperature and utilization of xylose and α methyl D glucoside as determined with the API 20C AUX and Vitek YBC systems. J Clinical Microbiol 1999; 7(12): 3804–8.

21. Meiller TF, Jabra-Rizk MA, Baqui AAMA, Kelley JI, Meeks VI, Merz WG, Falkler W A Jr. Oral candida dubliniensis as a clinically important species in HIV-seropositive patients in the United States. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1999; 88: 573–80.

22. Jabra Rizk MA, Falkler WA jr, Merz WG, Baqui AA, Kelley JI, Meiller TF. Retrospective identification and characterization of candida dubliniensis isolates among candida albicans clinical laboratory isolates from human immunodeficiency virus HIV–infected and non-HIV–infected individuals. J clinical Microbiol 2000; 38: 2423-6.

23. Kirkpatrick WR, Revankar SG, McAtee RK, Looez Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DL, et al. Detection of Candida dubliniensis in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus infected patients in North America by primary CHROMagar candida screening and susceptibility testing of isolates. J clinical Microbiol 1998; 36: 3007-12.

24. Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, Naumann D. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of candida dubliniensis. J clinical Microbiol 2000; 38: 1599–1608.