بررسی مولکولی عوامل کاندیدایی اونیکومایکوزیس

دکتر انسیه لطفعلی[1]
دکتر اکرم میرامین‌محمدی[2]
مهشید شهرزاد[3]
دکتر علی خامسی‌پور[2]
دکتر علیرضا فیروز[2]
دکتر اعظم فتاحی[2]

۱. گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

نویسنده‌ی مسئول:
دکتر اعظم فتاحی

تهران، خیابان طالقانی، شماره‌ی ۴۱۵، مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام
پست الکترونیک:
afattahi@sina.tums.ac.ir

تعارض منافع: اعلام نشده است.

زمینه و هدف: هدف از این مطالعه، شناسایی گونه‌های مخمری جداشده از ناخن بیماران با علائم کلینیکی اونیکومایکوزیس با استفاده از روش PCR-RFLP است.

روش اجرا: نمونه‌های ناخن از ۵۰ بیمار با درگیری۲۹ ناخن دست و ۲۱ ناخن پا در سال ۱۳۹۸ جمع‌آوری شد. نمونه‌ها با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی بررسی شدند. جهت بررسی مخمرهای جدا شده از روش PCR-RFLP نیز استفاده شد.

یافته‌ها: بیشترین گونه‌ی کاندیدای جدا شده، ک. آلبیکنس است که از ۱۲ مورد (۲۴٪) جدا شد و سپس به‌ترتیب ک. پاراپسیلوزیس ۳ مورد (۶٪) و ک. گلابراتا ۲ مورد (۴٪) بودند.

نتیجه‌گیری: روش PCR-RFLP به یاری آغازگرهای ITS1-ITS4 و آنزیم‌های برش‌دهنده‌ی MspI یک روش دقیق، سریع و مقرون به صرفه برای تشخیص افتراقی گونه‌های کاندیدا می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: اونیکومایکوزیس، مخمر، کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، تشخیص مولکولی، PCR-RFLP

دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۱/۲۶ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۳/۲۱

پوست و زیبایی؛ بهار ۱۳۹۹، دوره‌ی ۱۱ (۱): ۳۴-۲۸

مقدمه

واژه‌ی اونیکومایکوزیس (Onychomycosis) از واژه‌ی یونانی Onyx به معنای ناخن و Mykes به معنای قارچ گرفته شده است[1]. اونیکومایکوزیس به‌وسیله‌ی درماتوفیت‌ها، کپک‌های غیردرماتوفیتی و مخمرها ایجاد می‌شود[2-4] و رایج‌ترین بیماری ناخن است[5]. این بیماری یک عفونت قارچی صفحه‌ی ناخن یا قسمت انتهایی ناخن است که منجر به تخریب تدریجی صفحه‌ی ناخن می‌شود[2]؛ عفونتی که باعث ضخیم‌شدن، شکافته‌شدن، بی‌رنگ‌شدن و زبر و خشن‌شدن ناخن می‌شود. انسیدانس اونیکومایکوزیس و شیوع بالای و ناخوشی ناشی از آن، این بیماری را یک مشکل مهم سلامت عمومی کرده است و اثرات متفاوتی بر روی فعالیت‌های اجتماعی، شغلی و احساسات بیماران دارد[2و3]. اونیکومایکوزیس شایع‌ترین شکل جلدی کاندیدیازیس است که طی آن، ارگانیسم در شیار اطراف ناخن‌ها کلنیزه می‌شود.

عوامل موضعی، صدمات وارده به کوتیکول طی مانیکور و جداشدن صفحه‌ی ناخن از بستر به دلیل عوامل مکانیکی و شیمیایی، تشکیل این ضایعات را تسریع می‌کند[6]. اونیکومایکوزیس بیش از ۵۰٪

[Downloaded from jdc.tums.ac.ir on 2025-03-13]

بیماری‌های ناخن و ۳۰٪ همه‌ی عفونت‌های قارچی پوست را شامل می‌شود[۳و۱].

گزارش‌های بروز اونیکومایکوزیس ۱۳٪-۲٪ در آمریکای شمالی، ۶/۵٪ در کانادا و ۸٪-۳٪ در اسپانیا و فنلاند است. شیوع بیماری در کشورهای غربی ۵٪ است و در دهه‌های گذشته افزایش یافته است[۷].

گزارشات نگران‌کننده‌ای وجود دارد که افزایش اونیکومایکوزیس را در جمعیت غرب از ۳٪-۲٪ به ۱۳٪ نشان می‌دهد ولی شیوع اونیکومایکوزیس در آسیای جنوبی نسبتاً کم است[۱]. بیماری معمولاً خود به خود درمان نمی‌شود و حتی می‌تواند منجر به زخم‌های عفونی بیشتر در سایر قسمت‌های بدن شود[۸و۴و۲].

اونیکومایکوزیس ناشی از مخمرها در بالغین بیشتر و شیوع آن در زنان ۳-۲ برابر مردان است.

در اونیکومایکوزیس مخمری برعکس کچلی ناخن، ناخن حالت شکننده ندارد ولی در موارد مزمن و درمان‌نشده، نسج ناخن کاملاً تخریب می‌گردد[۹]. ناخن‌های آلوده‌شده با مخمرها معمولاً سخت، ضخیم، قهوه‌ای و شیاردار درحالی که ناخن‌های آلوده‌شده با درماتوفیت‌ها شکننده هستند. عفونت مزمن با مخمرها می‌تواند منجر به تخریب کامل بافت ناخن شود[۱۰].

بیشترین فراوانی گزارش‌شده‌ی مخمرها در کشورهایی نظیر ایران[۱۲و۱۱]، ایتالیا[۱۳]، عربستان[۱۴] و اسپانیا[۱۵] بوده است.

در بین مخمرها، ک. آلبیکنس شایع‌ترین عامل کاندیدای مسئول عفونت در اشکال بالینی مختلف کاندیدیازیس بوده و هست ولی گونه‌های دیگر مانند ک. تروپیکالیس، ک. کروزه‌ای، ک. گلابراتا، ک. پاراپسیلوزیس، ک. گیلرموندی و غیره نیز کم و بیش از بیماران جدا می‌شوند. مخمرهای اصلی عامل عفونت ناخن به‌ترتیب شامل ک. پاراپسیلوزیس، ک. گیلرموندی و ک. آلبیکنس است[۱۶].

اهمیت گونه‌های غیر آلبیکنس در سال‌های اخیر به‌واسطه‌ی بروز مقاومت در بعضی از این گونه‌ها نظیر ک. تروپیکالیس و ک. گلابراتا نسبت به برخی از داروهای ضدقارچی بیشتر شده است.

اونیکومایکوزیس ممکن است نیاز به درمان ضدقارچی طولانی مدت داشته باشد که می‌تواند منجر به اثرات جانبی شود، بنابراین تشخیص صحیح عامل بیماری قبل از درمان مهم است[۲]. استفاده از داروهای ضدقارچی ممکن است باعث تغییر عوامل از کاندیدا آلبیکنس به گونه‌های غیر آلبیکنس شود. هدف از این مطالعه شناسایی گونه‌های مخمری جداشده از ناخن بیماران با علائم کلینیکی اونیکومایکوزیس با استفاده از روش PCR -RFLP است.

روش اجرا

مطالعه‌ی حاضر بر روی ۵۰ بیمار مشکوک به اونیکومایکوزیس در فاصله‌ی زمانی بهمن ۱۳۹۷ تا بهمن ۱۳۹۸ در آزمایشگاه قارچ‌شناسی مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام انجام شد. اطلاعات بیماران در جدول ۱ بیان شده است.

۱) آزمایش مستقیم

مقداری از نمونه را بر روی لام تمیز گذاشته و یک قطره از KOH 10% به آن افزوده شد. سپس یک لامل تمیز بر روی آن قرار گرفته و نمونه زیر میکروسکوپ، ازنظر وجود مخمر، جوانه یا هایف قارچی بررسی شدند.

جدول ۱: اطلاعات بیماران مشکوک به اونیکومایکوز

تعداد کل بیماران مشکوک به اونیکومایکوزیس	جنس		گروه سنی (سال)			تعداد ناخن مبتلا			دست / پا		سابقه‌ی مصرف دارو		بیماری‌زمینه‌ای	
	زن	مرد	۱-۳۰	۳۰-۷۰	۱	۲ یا بیشتر	دست	پا	ضدقارچ	کورتیکواستروئید	پسوریازیس	لیکن‌پلان
کل موارد ارجاعی	۳۵	۱۵	۱۰	۴۰	۴۴	۶	۲۹	۲۱	۴	۱۳	۲	۰
موارد قطعی مخمری	۱۴	۴	۴	۱۴	۱۴	۴	۸	۱۰	۲	۱	۰	۱

[Downloaded from jdc.tums.ac.ir on 2025-03-13]

۲) کشت در محیط کاندیدا کروم آگار

محیط کروم آگار، محیط اختصاصی جهت شناسایی بعضی از گونه‌های کاندیدا مانند کاندیدا آلبیکنس، ک. دابلینینسیس، ک. تروپیکالیس، ک. گلابراتا، ک. کروزه‌ای و ک. پاراپسیلوزیس است. نمونه‌ها توسط لوپ استریل و به روش خطی (برای ایجاد تک کلنی) روی محیط کروم آگار کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور و در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. بعد از ۴۸ ساعت، کلنی‌های مخمری رشد کرده بررسی ماکروسکوپی شدند و ازنظر مورفولوژی و رنگ کلنی تولیدشده بررسی شدند و با مقایسه‌ی رنگ کلنی استاندارد معرفی‌شده در کاتالوگ کارخانه‌ی سازنده، بعضی از مخمرها قابل شناسایی بودند، مانند ک. آلبیکنس و ک. دابلینینسیس به رنگ سبز و ک. تروپیکالیس به رنگ آبی ـ سرمه‌ای، ک. گلابراتا به رنگ صورتی پررنگ (ارغوانی)، ک. پاراپسیلوزیس به رنگ صورتی کم‌رنگ و ک. کروزه‌ای به رنگ بنفش ــ صورتی مشاهده می‌شوند.

۳) بررسی و شناسایی مولکولی

جهت انجام آزمایش‌های مولکولی از کلنی‌های کشت تازه‌ی ۲۴ ساعته گونه‌های کاندیدا استفاده شد. از تک کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط YEPD (yeast extract peptone dextrose) که به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شده بود و یک سوسپانسیون مخمری به میزان ۲۰۰ µl در میکروتیوب‌های ۱/۵ ml تهیه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت، سپس از آن به‌عنوان نمونه استفاده شد.

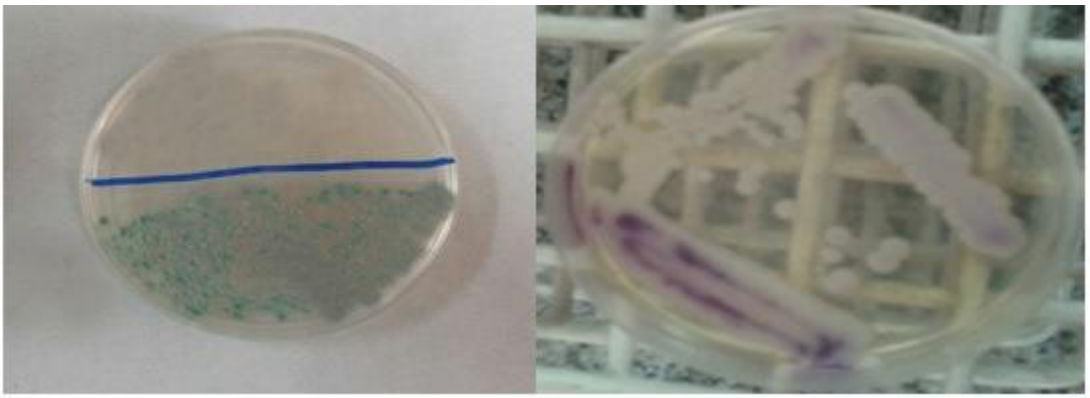
برای شناسایی مخمرهای جداشده از بیماران به روش ژنوتایپینگ (مولکولی)، از آغازگرهای ITS1 و ITS4 (آغازگرهای یونیورسال) و DNA پرگنه‌های رشد کرده بر روی کشتگاه YEPD به‌عنوان الگو استفاده شد. فراورده‌های واکنش PCR را در اثر آنزیم MspI برای شناسایی گونه‌های کاندیدا قرار دادیم[۱۴].

به‌منظور جداسازی و شناسایی نمونه‌ها براساس طول قطعه، کلیه‌ی محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲٪، الکتروفورز انجام شد.

یافته‌ها

برای شناسایی اولیه‌ی گونه‌ها و خالص‌سازی آن‌ها کلنی‌های مخمری روی کشتگاه کروم آگار کاندیدا کشت داده شدند. در این کشتگاه کلنی‌های ک. آلبیکنس به رنگ سبز تا سبز آبی، گونه‌های ک. گلابراتا به بنفش، گونه‌های ک. پاراپسیلوزیس به رنگ بنفش صورتی دیده شدند (شکل ۱).

بیشترین گونه‌ی کاندیدای جدا شده از افراد مبتلا به اونیکومایکوزیس مخمری، ک. آلبیکنس است که از



شکل ۱: کشت کلنی مخمری جداشده از نمونه‌های مشکوک به عفونت قارچی مخمری برروی کشتگاه ویژه کروم آگار کاندیدا

[Downloaded from jdc.tums.ac.ir on 2025-03-13]

۱۲ مورد (۲۴٪) جدا شد و سپس به‌ترتیب ک. پاراپسیلوزیس ۳ مورد (۶٪) ک. گلابراتا ۲ مورد (۴٪) بودند (شکل ۲). ۵۶٪ مورد از مخمرهای جداشده از افراد مبتلا به اونیکومایکوزیس مخمری مربوط به نمونه‌های جدا شده از پای افراد بود. نمونه‌های جداشده از پا، ۱۰ مورد (۲۰/۴۱٪) بود.

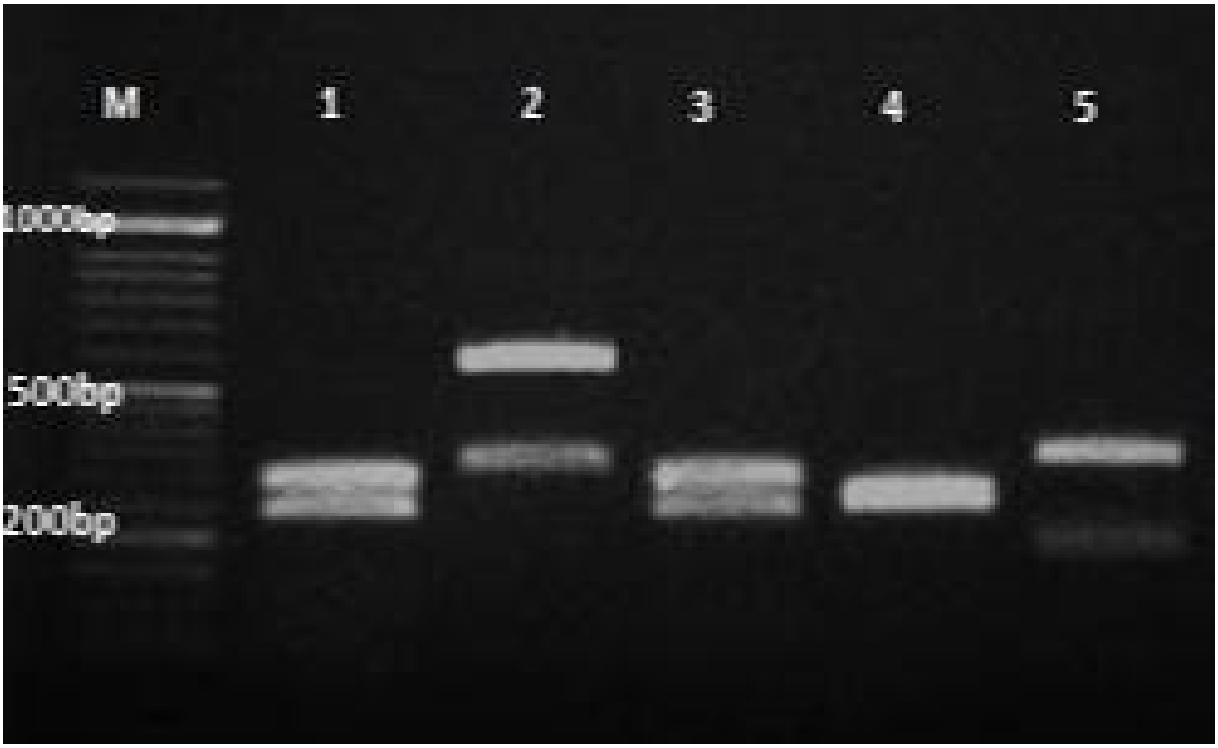
بحث

بیشترین گونه کاندیدای جدا شده از افراد مبتلا به اونیکومایکوزیس مخمری، ک. آلبیکنس است که از۱۲ مورد (۲۴٪)جدا شد و سپس به ترتیب ک. پاراپسیلوزیس ۳ مورد (۶٪) ک. گلابراتا ۲ مورد (۴٪) بودند. ۲۰٪ مورد از مخمرهای جدا شده از افراد مبتلا به اونیکومایکوزیس مخمری مربوط به نمونه‌های جدا شده از پای افراد بود.

در بررسی شکوهی و همکاران که در ساری انجام دادند، مخمرها، شایع‌ترین علت اونیکومایکوزیس بودند که با مطالعه‌ی ما مطابقت داشت ولی آن‌ها شایع‌ترین عوامل مخمری جداشده را کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا کروزه‌ای گزارش دادند[۸].

در مطالعه‌ی خسروی و همکاران که در مرکز مطالعات مایکولوژی ایران انجام دادند، بیشترین گونه‌های کاندیدیایی جدا شده، ک. آلبیکنس (۳۸/۵٪)، سپس ک. تروپیکالیس (۱۰/۸٪) و ک. کفایر (۶/۲٪) بودند[۱۵].

در مطالعه‌ی Fenq و همکاران که براساس متد PCR انجام شد، از ۲۱۰ گونه کاندیدای جداشده از اونیکومایکوزیس، ک. پاراپسیلوزیس بیشترین گونه‌ی جداشده (۵۴/۳٪)، سپس ک. آلبیکنس (۲۳/۳٪) و ک. متاپسیلوزیس (۹/۵٪) بودند، ولی گونه‌ی ک. متاپسیلوزیس دومین گونه‌ی جداشده از ناخن‌های پا بود[۱۶].



شکل ۲: الکتروفورز پس از هضم آنزیمی با آنزیم برش‌دهنده‌ی MspI، ستون M مارکرمولکولی ۵۰ جفت بازی، ستون‌های ۱ و ۳ ک. آلبیکنس، ستون ۲ ک. گلابراتا و ستون ۴ ک. پاراپسیلوزیس

[Downloaded from jdc.tums.ac.ir on 2025-03-13]

در این مطالعه ۱۱۸ نمونه‌ی ناخن با روش‌های رایج قارچ شناسی و روش Multiplex PCR بررسی شدند که نتایج هر دو روش همپوشانی داشتند اما تشخیص نمونه‌های ناخن که در مشاهده مستقیم مثبت ولی در کشت منفی بودند، از ۲۲/۹٪ به ۴۱/۵٪ افزایش یافت. آن‌ها نشان دادند که این تست ۵ ساعته، علاوه‌بر افزایش سرعت تشخیص، حساسیت تشخیص درماتوفیتوزیس ناخن را افزایش می‌دهد[۱۷].

به دلیل مشکل‌بودن درمان اونیکومایکوزیس تشخیص ارگانیسم‌های مسبب این بیماری، برای انتخاب مناسب‌ترین درمان ضروری است. مشاهده‌ی مستقیم با پتاس ۲۰٪ یک ابزار تشخیصی اونیکومایکوزیس است ولی می‌تواند نتایج منفی کاذب داشته باشد[۲]. کشت، استاندارد جهانی برای تشخیص اونیکومایکوزیس است اما کشت می‌تواند ۷-۵ روز یا حتی بیشتر زمان ببرد و همچنین پاسخ منفی کاذب بالایی دارد. روش‌های رایج قارچ‌شناسی زمان‌بر است و ممکن است تشخیص قارچ‌های غیرتیپیک مشکل باشد[۱۸]. نمونه‌های ناخن ضخیم هستند درنتیجه امکان جواب منفی کاذب وجود دارد. همچنین الیاف نخی و مصنوعی ممکن است باعث پاسخ مثبت کاذب شود[۱].

تشخیص مولکولی عوامل عفونت‌زا ممکن است دو روز زمان بخواهد، درحالی که نتایج محیط کشت ۳-۱ هفته زمان می‌برد. تشخیص مولکولی سریع و قابل اعتماد قارچ‌های عفونت‌زا، درمان ضدقارچی مناسب را تسریع می‌کند[۱۹].

روش PCR-RFLP یک روش سریع، ساده و قابل اطمینان نسبت به روش‌های رایج برای شناسایی ایزوله‌های قارچی رایج در پزشکی را فراهم می‌کند. نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر نشان داد که عوامل مخمری اونیکومایکوزیس با روش PCR-RFLP به‌طور کامل شناسایی شده و این نتیجه می‌تواند به اتخاذ درمان مناسب کمک نماید.

References

1. Kaur R, Kashyap B, Bhalla P. Onychomycosis-epidemiology, diagnosis and management. Indian J Med Microbiol. 2008; 26(2): 108-16.
2. Han HW, Hsu MM, Choi JS, et al. Rapid detection of dermatophytes and Candida albicans in onychomycosis specimens by an oligonucleotide array. BMC Infect Dis. 2014; 14: 581.
3. Shahzad M, Alzolibani AA, Robaee AA, et al. Onychomycosis in Qassim region of Saudi Arabia: a clinicoaetiologic correlation. JCDR. 2014; 8(8): YC01-4.
4. Ghasemi Z, Falahati M, Farahyar Sh, et al. Investigation of prevalence of onychomycosis due to yeast fungi in dystrophic nails of patients who referred to Razi hospital: RJMS: 2012; 19: 96 (Persian).
5. McAuley WJ, Jones SA, Traynor MJ, et al. An investigation of how fungal infection influences drug penetration through onychomycosis patient's nail plates. Eur J Pharm Biopharm: 2016; 102: 178-84.
6. Shokouhi T, Hajheydari Z, Haghani I, et al. The study of 101 cases of onychomycosis and associate factors in patients referred to Boali Sina Hospital and Toba dermatology outpatient clinics in Sari. JMUMS. 2009; 19: (71): 33-43 (Persian).
7. Emami d. Comprehensive medical mycology. 2 ed. Tehran: Tehran University of Medical Sciences. 1393. 910: 115-25 (Persian).
8. Aghamirian MR, Ghiasian SA. Onychomycosis in Iran: epidemiology, causative agents and clinical features. Japanese Journal of Medical Mycology 2010; 51(1): 23-9.
9. Ogawa H, Summerbell RC, Clemons KV, et al. Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. Medical Mycology. 1998;36 Suppl 1: 166-73.

[Downloaded from jdc.tums.ac.ir on 2025-03-13]

10. Gupta AK, Konnikov N, MacDonald P, et al. Prevalence and epidemiology of toenail onychomycosis in diabetic subjects: a multicentre survey. Br J Dermatol 1998; 139(4): 665-71.

11. Gulcan A, Gulcan E, Oksuz S, et al. Prevalence of toenail onychomycosis in patients with type 2 diabetes mellitus and evaluation of risk factors. J Am Pod Med Associat. 2011; 101(1): 49-54.

12. Al-Sogair SM, Moawad MK, Al-Humaidan YM. Fungal infection as a cause of skin disease in the eastern province of Saudi Arabia: prevailing fungi and pattern of infection. Mycoses. 1991; 34(7-8): 333-7.

13. Velez A, Linares MJ, Fenandez-Roldan JC, Casal M. Study of onychomycosis in Cordoba, Spain: prevailing fungi and pattern of infection. Mycopathologia. 1997; 137(1): 1-8.

14. Barati M, Mirkalantari S, Ansari S, et al. Determination of antimicotic susceptibility pattern of Candida species isolated from patients with symptomatic candiduria. Journal of Research in Medical Sciences. 2019; 24.

15. Khosravi AR, Shokri H, Nikaein D, et al. Yeasts as important agents of onychomycosis: in vitro activity of propolis against yeasts isolated from patients with nail infection. J Alt Compl Med 2013; 19(1): 57-62.

16. Feng X, Ling B, Yang X, et al. Molecular identification of candida species isolated from onychomycosis in Shanghai, China. Mycopathologia. 2015; 180 (5-6): 365-71.

17. Ebihara M, Makimura K, Sato K, et al. Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28S ribosomal RNA gene sequences. B J D. 2009; 161(5): 1038-44.

18. Monod M, Bontems O, Zuagg c, et al. Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycosis. J Med Microb. 2006: 55(pt 9):1211-6.

19. Ligouri G, Lucariello A, Colella G, et al. Rapid identification of Candida species in oral rinse solution by PCR. J Clin Path. 2007: 60(9): 1035-9.

[Downloaded from jdc.tums.ac.ir on 2025-03-13]

Molecular evaluation of candida species as etiologic agents of onychomycosis

Ensieh Lotfali, PhD[1]
Akram Miraminmohammadi, PhD[2]
Mahshid Shahrzad, MSc[3]
Ali Khamesipoor, PhD[2]
Alireza Firooz, MD[2]
Azam Fattahi, PhD[2]

1. Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Center for Research and Training in Skin Diseases and Leprosy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Damghan Branch, Iran

Background and Aim: The aim of the present study is rapid and precise identification of yeast species isolated from nail of patients with clinical features of onychomycosis using PCR-RFLP technique.

Methods: 50 patients with involvement of 29 fingernails and 21 toenails were enrolled in the study. Different yeast species were identified by conventional mycological. The PCR-RFLP was tested on yeast isolated and the PCR-RFLP products were separated by electrophoresis in 2% agarose gel, with DNA stain.

Results: The main causative agents were yeasts in 12 cases (24%). Candida albicans was the most commonly isolated yeast species followed by Candida parapsilosis (6%), and Candida glabrata (4 %).

Conclusion: PCR-RFLP method using ITS1-ITS4 primers and MspI restriction enzymes is a rapid, accurate and cost-effective method for specific diagnosis of the most prevalent candida spp. Its ability to detect low amounts of fungal DNA in patient samples in 6-8 hours could be useful for clinical laboratories for optimal management of these infections.

Keywords: onychomycosis, yeasts, candida albicans, candida parapsilosis, molecular diagnosis, PCR-RFLP

Received: Apr 14, 2020 Accepted: Jun 10, 2020

Dermatology and Cosmetic 2020; 11 (1): 28-34

Corresponding Author:
Azam Fattahi, PhD

No. 415, Taleqani Ave., Center for Research and Training in Skin Diseases and Leprosy, Tehran, Iran
Email: afattahi@sina.tums.ac.ir

Conflict of interest: None to declare

[Downloaded from jdc.tums.ac.ir on 2025-03-13]