بررسی پلی‌مورفیسم ژنومی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از واژینیت به روش RAPD-PCR

فاطمه مفیدیان (MSc)[1]- *دکترکیومرث امینی (PhD)[2]- دکترمحمد جواد کاظمی (PhD)[1]

*نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

پست الکترونیک: dr_kumarss_amini@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله:۹۷/۰٤/۱۱ تاریخ ارسال جهت اصلاح:۹۷/۰٦/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۹/۰٦

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 11:02 IRDT on Tuesday June 18th 2019

چکیده

مقدمه: کاندیداآلبیکنس همزیست اختیاری انسان بوده که بیشتر در دستگاه گوارش زندگی می‌کند. این گروه قارچ‌ها در جائی که پایداری میزبان در برابر عفونت به طور موضعی یا سیستمی کاهش یابد بیماریزا می‌شود. باکتری‌ها شایع‌ترین عامل ایجاد کننده واژینیت‌ها هستند ولی کاندیداآلبیکنس به عنوان دومین عامل مسبب این عفونت به شمار می‌آید. گونه کاندیداآلبیکنس مسئول ۹۰-۷۰ درصد عفونت‌های قارچی واژینال است.

هدف: پژوهش مطالعه پلی‌مورفیسم ژنومی کاندیداآلبیکنس جداشده از زنان دچار واژینیت با استفاده از روش RAPD-PCR

مواد و روش‌ها: این تحقیق مطالعه‌ای دوره‌ای بود که به روش توصیفی_تحلیلی نمودارسازی و اجرا شد. در این تحقیق ٦۰ نمونه دربرگیرنده ۳۰ نمونه واژینال از بیمارستان شریعتی تهران و ۳۰ نمونه از بیمارستان زنان کرمان توسط پزشک متخصص زنان و زایمان گردآوری شد. با استفاده از لوپ استریل از مخمرهای گونه‌های مختلف بر محیط کشت افتراقی کروم آگار کاندیدا کشت داده شد. افتراق زیرگونه‌ها و مطالعه‌ی ارتباط گونه‌های ویژه با اشکال بالینی و تایپینگ جدایه‌های آلبیکنس به روش RAPD-PCR انجام شد.

نتایج: افزایش گونه‌های غیرآلبیکنس و مقاوم به داروها نه تنها در نقاط مختلف ایران بلکه در جهان نیز به طور محسوسی دیده می‌شود. در این مطالعه برپایه نتایج کشت و آزمایش مستقیم ٦۰ نفر آلوده به ولوواژینیت کاندیدایی از دو استان کرمان و تهران بودند که از نظر ژنتیکی شباهت‌ها و تفاوت‌هایی داشتند و در ١٤ کلاستر قرار گرفتند. در برخی کلاسترها سویه‌های تکراری وجود داشت که نشان از شباهت ژنومی سویه‌ها دارد.

نتیجه‌گیری: چندین روش انگشت‌نگاری ژنومی برای انواع جدایه‌های بالینی کاندیدا البیکنس وجود دارد که بکارگیری روش ژل الکتروفورز میدان ضربه‌ای Pulsed field gel electrophoresis، روش‌های انگشت نگاری بر اساس ریبوتایپینگ و روش‌های انگشت نگاری بر اساس PCR برای ارزیابی شیوع و مطالعات اپیدمیولوژی سودمند است.

کلید واژه‌ها: پلی‌مورفیسم/ چند شکلی قطعات دی ان ای حاصل از تکثیر تصادفی (PCR– RAPD)/ کاندیداآلبیکانس/ واژینیت

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست و هفت، شماره ۱۰۸، صفحات: ۱۰-۱

مقدمه

کاندیدا، مخمر شایع در بیماری‌های قارچی فرصت طلب در سراسر دنیا ست و همچنین، به فراوانی بر سطح پوست و غشاهای مخاطی کلونیزه می‌شود. کاندیدا از اعضای فلور نرمال پوست، دهان، واژن و مدفوع است و به همان میزان که پاتوژن است فرصت طلب هم هست و در طبیعت به ویژه بر روی برگ گیاهان، آب و خاک وجود دارد. تجویز استروئیدها سبب افزایش جمعیت کاندیدا می‌شود. بهم خوردن وضعیت فیزیولوژی و پاتولوژی مانند پیری، حاملگی، اختلال اندوکرین چون دیابت، تروما، جراحی، چاقی، تزریق وریدی، اعتیاد به مواد مخدر، آویتامینوز، عوامل ایمونوساپرسیو، اختلال ژنتیکی، کاستی‌های ایمنی وسیتوکاین‌ها از عوامل مستعدکننده بیماری بشمار می‌روند(۱).

قارچ کاندیداگلابراتا دومین عامل شایع بوده و ۱۵-۵ درصد موارد بیماری را در برمی‌گیرد، گونه‌های دیگر کاندیدا شامل: کاندیداگلابراتا، کاندیداکروزه‌ای، کاندیداتروپیکالیس و کاندیداپاراپسیلوزیس هستند که گونه‌های غیرآلبیکنس را تشکیل می‌دهند. از دلایل عود و مزمن شدن ولوواژینیت کاندیدایی درمان نادرست و مقاوم شدن به داروی‌های آزولی‌است. فعالیت ضدکاندیدایی گیاهان در درمان واژینیت توسط گیرون و همکاران در سال ۱۹۸۸ بر گیاه تاجریزی نشان داد که این گیاه در سنجش با نیستاتین در درمان واژینیت کاندیدایی موثرتر بوده‌است(۲).

ولوواژینیت یکی از شایع‌ترین عفونت‌های زنان به شمار می‌رود که بیماری آزار دهنده‌ای با تراوش غیرطبیعی، احساس ناراحتی در ناحیه ولو، واژن یا هر دو است. فرم شایع واژینیت‌ها در زنان شامل واژینیت باکتریایی، واژینیت تریکومونایی و واژینیت کاندیدایی می‌باشد(۳و٤).

از انواع مهم آن، ولوواژینیت کاندیدایی است که در برخی کشورها نخستین سبب واژینیت عفونی به شمار می‌آید. ولوواژینیت کاندیدایی معضلی جهانی است ومیلیون‌ها نفر

۱. مرکز تحقیقات زیست فناوری پزشکی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی، اشکذر، یزد، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 11:02 IRDT on Tuesday June 18th 2019

دچار این آلودگی قارچی هستند. این بیماری توسط رشد غیرطبیعی مخمرها در موکوس دستگاه تناسلی زنان ایجاد می‌شود و به طور چشمگیر در سال‌های اخیر افزایش پیدا کرده‌است(۷-۵). بیماری با ترشحات غیرطبیعی واژن، به صورت دلمه سفت یا آبکی، غشاء کاذب سفید خاکستری در سطح مخاط واژن و خارش و سوزش همراه است. ضایعه ممکن است به صورت واکنش اگزمایی، با اریتم خفیف یا شدید، ادم ولوواژن، ضایعات ماهواره‌ای، دیزوری و دیسپارونی دیده‌شود(۸و۹). بنیادپور و همکاران در سال ۱۳۸۷ در شیراز از محصول گیاه گلپوره در درمان واژینیت کاندیدایی استفاده کردند و نشان دادند که عصاره آن خواص ضد قارچی دارد(۱۰).

موتان‌های اخیر in vivo توان پیوستن تضعیف شده با پاتوژنیسیته کمتر دارند. که نشان‌دهنده آن است قدرت اتصال به بافت به شرایط محیطی مؤثر بر قارچ و فاکتورهای مختلف میزبان مانند هیدروفوبیت سطح قارچ، محیط کشت وشرایط رشد، سطح ایمنی وهورمونی میزبان بستگی دارد. با اتصال قارچ به بافت‌های میزبان و کلونیزاسیون آن، پروسه عفونت آغاز می‌شود. اساس بسیاری از تلاش‌ها برای پیشگیری از گسترش عفونت، جلوگیری از اتصال قارچ به بافت‌های میزبان است. از ملکول‌های سطحی قارچ که در پروسه اتصال درگیر هستند می‌توان به مانان، مانوپروتئین‌ها (به ویژه نیمه‌پروتئینی آن) و کیتین اشاره کرد. فرم هایفی آلبیکنس توانایی شدیدی برای اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال انسانی دارد. میانجی این اتصال ممکن است پروتئین سطحی دیواره هایفا (HWP1) باشد که تنها بر سطح جرم تیوب و هایفا دیده می‌شود(۱٤-۱۱).

از بخش‌هایی که بوسیله پرایمرهای RAPD تکثیر و بر پایه مندل تفرق می‌یابند می‌توان به عنوان نشانگرهای ژنتیکی استفاده کرد. پرایمرهای RAPD به دلیل طول کوتاه، دمای اتصال پایینی دارند برای این پرایمرها معمولا دمای ۳٦ درجه در دمای اتصال به کار می‌رود، دماهای بالاتر سبب کاهش میزان بخش‌های تکثیر شده می‌شود. برخی موارد باندهای تکثیر شده در روش RAPD روشنی متفاوتی دارند. این امر می‌تواند به دلیل تفاوت در تعداد الگوی باندها یا ناشی از هموزیگوت یا هتروزیگوت بودن در لوکوس مورد نظر باشد. در تکنیک RAPD فرض بر آن است که باندهایی که بر روی ژل در کنار یکدیگر قرار دارند همولوژی داشته و از یک لوکوس خاص باشند. این مشکل را می‌توان توسط سیستم‌های دقیق‌تر تفکیک قطعات و پی‌بردن به ویژگی‌های هر محصول از راه آنالیز ژنتیکی و ترکیبی از لکه‌گذاری سادرن و مطالعات هضم آنزیمی برطرف کرد(۱۵). دلیل پلی‌مورفیسمی که در تکنیک RAPD دیده می‌شود را می‌توان به تفاوت در محل اتصال پرایمرها (جهش‌های نقطه‌ای) یا بازآرایی در داخل قطعات تکثیر یافته نسبت داد(۱٦). هدف تحقیق ما مطالعه پلی‌مورفیسم ژنومی کاندیداآلبیکنس جداشده از زنان دچار واژینیت به روش RAPD-PCR بود.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه و گردآوری نمونه‌های بالینی: این تحقیق مطالعه‌ای مقطعی بود که به روش توصیفی تحلیلی طراحی و اجرا شد. در این تحقیق از ۱۰۰ زن متاهل با ترشح سفید پنیری واژینال و از نظر بالینی مشکوک به واژینیت کاندیدائی که توسط پزشک متخصص معاینه شده‌بودند، با سوآپ استریل نمونه‌برداری شد و در لوله استریل محتوی سرم فیزیولوژی حاوی کلرامفنیکل قرار داده شد و برای تشخیص گونه‌ها از روش تولید جرم تیوب در محیط سرم، ایجاد کلامیدوکنیدی بر محیط کشت کورن میل آگار و ایجاد کلنی‌های رنگی بر محیط کشت کروم آگار کاندیدا استفاده شد. همچنین، از سویه استاندارد کاندیداآلبیکنس ATCC14053 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. مخمرها در محیط کشت سابورو دکستروز آگار کشت داده شد و در یخچال در دمای ٤ درجه سانتیگراد تا زمان آزمایش نگهداری شدند.

در این پژوهش، ٦۰ ایزوله شامل ۳۰ جدایه واژینال از افراد مراجعه کننده به درمانگاه بیمارستان شریعتی(تهران) و ۳۰ جدایه از بیمارستان زنان کرمان توسط پزشک متخصص زنان و زایمان جمع‌آوری شد. با بررسی متون و مطالعات انجام شده در گذشته و همچنین تعیین میانگین شیوع و قرار دادن آن در فرمول کوکران حجم نمونه محاسبه شد.

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 11:02 IRDT on Tuesday June 18th 2019

با استفاده از لوپ استریل، مقدار کمی از مخمرهای گونه‌های مختلف بر محیط کشت افتراقی کروم آگار کاندید/ CHROMagar Company, France کشت داده شد. محیط‌های کشت تلقیح شده درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و بعد از گذشت ٤٨ ساعت، کلنی‌های ظاهر شده از نظر مورفولوژی و رنگ پیگمان تولید شده مورد بررسی قرار گرفتند. این آزمون بر ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های واژنیت نیز انجام شد. از این رو در این مطالعه به میزان شیوع VVC (ولوو واژنیت کاندیدایی) و گونه‌های کاندیدای درگیر در افراد مشکوک به بیماری پرداخته شد.

محیط رایج برای کشت و جداسازی کاندیدا در عفونت‌های جلدی_مخاطی سابرو دکستروزآگار SDA است. برای جلوگیری از آلودگی میکروبی یا قارچ‌های ساپروفیت، بهتر است به نمونه‌ها آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل، جنتامایسین یا تتراسایکلین و سیکلوهگزامید افزوده شود، چون برخی گونه‌های کاندیدا به سیکلوهگزامید حساس هستند، بهتر است نمونه‌ها در محیط بدون سیکلوهگزامید هم کشت شوند و محیط‌ها در دمای ۳۷-۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲-۳ روز نگهداری شدند(۱۷).

استخراج DNA و انجام PCR : استخراج DNA برپایه دستور کار کیت تجاری سیناژن انجام شد. مخلوط ترکیب مورد استفاده برای واکنشPCR شامل: آب مقطر ۱۲/۷ میکرولیتر، 10X. PCR buffer ۲ میکرولیتر، MgCl2 1.5mM ۰/۵ میکرولیتر، dNTP mix (5Mm) ۰/۵ میکرولیتر، پرایمرهای 0.5 µM مورد استفاده هر کدام ۰/۵ میکرولیتر، آنزیمTaq polymerase 2.5unit ۰/۳ میکرولیتر و نمونه DNA ۳ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه شد. پرایمر مورد نظر برای آزمایش در ایزوله کاندیدا آلبیکنس در جدول ۱ آورده شده است. ژنsap4 بعنوان مسئول انتقال قارچ و تولید لوله‌های هیف است که در پاتوژنز این قارچ بسیار اهمیت دارد.

جدول ۱. توالی‌های نوکلئوتیدی پرایمر جهت شناسایی در ایزوله‌های کاندیداآلبیکنس(۱۸)

Primer	Oligonucleotide Sequence (5´- 3´)
Sap4	F: CAATTTAACTGCAACAGGTCCTCTT R: AGATATTGAGCCCACAGAAATTCC Probe: TGCCCACATCATTTCTACCAGTATCGTCG

برای بررسی الگوی پلی‌مورفیسم DNA بین ٦٠ سویه جدا شده قارچ کاندیدا، سویه‌های ایزوله قارچ در محیط کشت CSDA به مدت۷ روز کشت شدند. برای استخراج DNA به روش دلاپورتا، کیفیت و کمیت DNA استخراجی تعیین شد. بررسی‌ها نشان داد که DNA استخراجی کمابیش خالص بوده و نیازی به پروتئیناز در جریان استخراج DNA نداشتند. برای بهینه‌سازی شرایط RAPD با توجه به آزمون‌های مختلف شرایط انجام واکنش در حجم‌های ۵۰ میکرولیتری بهینه‌سازی شد. این شرایط بهینه‌سازی شده موجب تکرارپذیری واکنش می‌شود. پس از آماده‌سازی واکنش‌گرهای RAPD، دما، زمان و برنامه لازم برای انجام PCR در دستگاه ترموسایکلر تنظیم شد. پس از پایان واکنش برای بررسی الگوی پلی‌مورفیسم DNA بین سویه‌ها همه فراورده‌های PCR بر ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و رنگ‌زدایی از ژل با آب مقطر، زیر نور ماورای بنفش با دوربین مخصوص عکس‌برداری شد.

محصولات PCR: الکتروفورز روشی است که بررسی محصولات PCR را به طور کیفی یا نیمه‌کمی و وجود یا مقدار تولید محصول را ارزیابی می‌کند. در این مطالعه از الکتروفورز بر ژل آگارز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید استفاده شد. پس از پایان گام الکتروفورز، تصویربرداری و قرائت در دستگاه UV Transilluminator انجام شد.

واکاوی آماری: پس از تهیه تصاویر ژل با استفاده از دستگاه Gel documentation و اسکن تصاویر آنها، الگوی باندی

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 11:02 IRDT on Tuesday June 18th 2019

تمام جمعیت‌ها، برای هر آغازگر به صورت جداگانه رسم و امتیازدهی بر اساس حضور باندهای DNA در محدوده‌ی باندی ٤٥٠ bp تا ١٧٠٠ bp انجام شد. بدین‌ترتیب که در هر جمعیت در صورت حضور باند، امتیاز یک و در صورت نبودن باند، امتیاز صفر داده شد و ماتریس صفر و یک تشکیل شد. پس از تشکیل ماتریس صفر و یک در نرم‌افزار Excel، داده به نرم‌افزار genAlex نسخه ٦/٤ و PoPGene نسخه ١/٣٢ منتقل شد و تجزیه خوشه‌ای به روش WARD بدست آمد. با تهیه جدول در برنامه (Notepad) وجود باند بایک سایز مشخص (از٥٠ تا ٣٠٠٠)کیلو باز باعدد ١ و عدم وجود باند با عدد صفر مشخص شد. این اعداد در جداول برنامه Notepad قرارگرفته وتوسط برنامه نرم‌افزاریNTSYS ورژن ١٢/٠ براساس شباهت دندوگرام تهیه شد. برای تجزیه و تحلیل آماری محصولات RAPD از میزان حرکت نسبی نوارها استفاده شد. میزان حرکت هر یک از نوارها با دقت ١/٢٠ میلی متر سنجیده شد. بر اساس وجود یا عدم وجود هر نوار از محصولات PCR به ترتیب عدد یک یا صفر به آن نسبت داده و به این ترتیب جدول ماتریس صفر و یک رسم شد

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA): تجزیه واریانس مولکولی(١٩) روشی است که بیشتر برای داده‌های مارکرهای غالب بکار می‌رود که با استفاده از فاصله افراد، واریانس بین و درون‌گروه‌های از پیش تعیین شده را محاسبه می‌کند. AMOVA، امکان یک آزمون برای اجزای مختلف را فراهم می‌کند(٢٠). اصولاً برای این کار، مجذور فاصله اقلیدوسی ترجیح داده می‌شود، ولی نتایج خیلی مشابهی با استفاده از ضرایب تشابه جاکارد بدست آمده‌است(٢١).

ملاحظات اخلاقی: پروپوزال این تحقیق مورد تایید دانشگاه آزاد اسلامی واحد اشکذر استان یزد با کد پایان‌نامه ٣٨٦٣٠٥٠٧٩٥١٠٠٤ قرار گرفت. لازم به یادآوری است که در این پژوهش استفاده از بیماران بر اساس دستورالعمل‌های استاندارد فرامرزی توسط متخصص زنان بود. همچنین، در تمام مراحل تحقیق قوانین و مقررات اخلاقی رعایت شد.

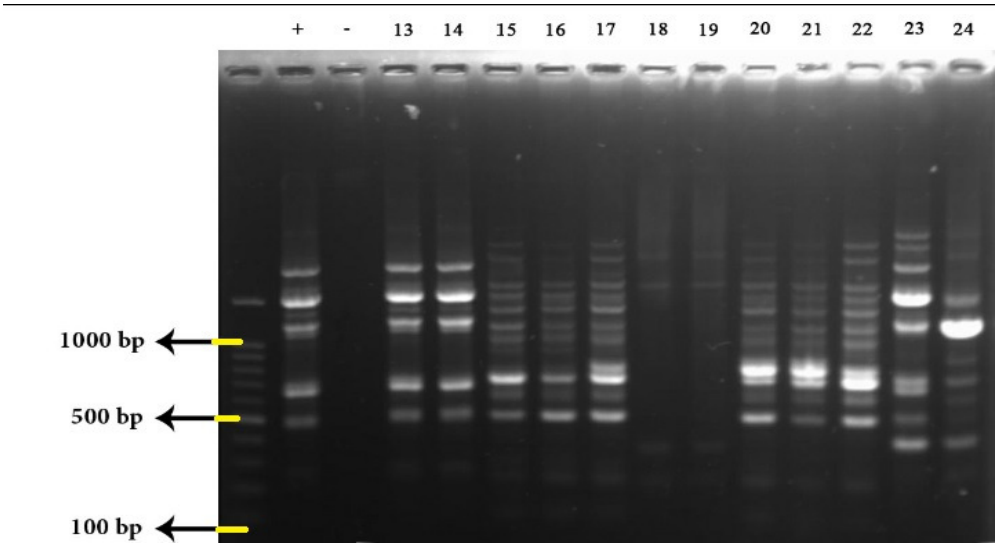
نتایج

کاندیدا، مخمر شایع در بیماری‌های قارچی فرصت طلب در سراسر دنیا ست و به فراوانی روی سطح پوست و غشاهای مخاطی کلونیزه می‌شود. میانگین سنی افراد دچار واژینیت کاندیدایی سن ٣٥ ± ٢٩ بود. از ١٠٠ نمونه، ٦٠ نمونه (٣٠ نمونه از تهران و ٣٠ نمونه از کرمان) از نظر کاندیدا آلبیکنس مثبت شناسایی شدند. این ٦٠ ایزوله از نظر وجود جرم تیوب و تولید کلامیدیوسپور مثبت بودند و در محیط کروم آگار کاندید/ کلنی‌ها به رنگ سبز روشن دیده شدند.

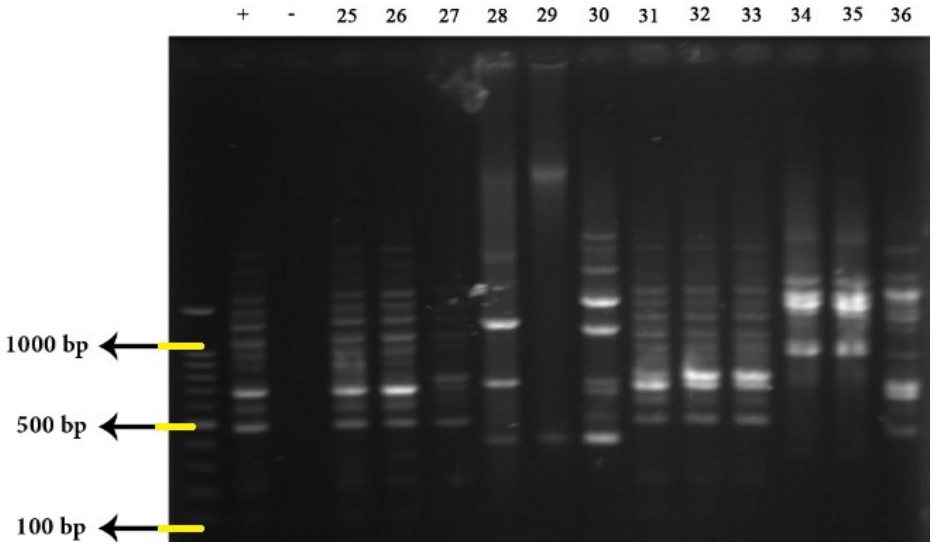
نتایج داده‌های باینری از ژل الکتروفورز: باندها والگوهای بدست آمده از انگشت‌نگاری مولکولی واکنش‌های-RAPD PCR نخست چشمی واکاوی شد. با تهیه جدول در برنامه (Notepad) وجود باند بایک سایز مشخص (از٥٠ تا ٣٠٠٠) کیلو باز با عدد ١ و نبود باند با عدد صفر مشخص شد. این اعداد در جدول‌های برنامه Notepad قرار داده‌شد با برنامه نرم افزاری NTSYS ورژن ١٢/٠ براساس شباهت دندوگرام تهیه شد. برای تجزیه و تحلیل آماری محصولات RAPD، از میزان حرکت نسبی نوارها استفاده شد. میزان حرکت هر یک از نوارها با دقت ١/٢٠ میلی‌متر سنجیده شد. براساس وجود یا عدم وجود هر نوار از محصولات PCR به ترتیب عدد یک یا صفر به آن نسبت داده و به این ترتیب جدول ماتریس صفر و یک رسم شد(شکل١و٢).

براساس ماتریس صفر و یک تعداد کل الگوهای چند شکلی DNA محصولات RAPD حاصل از آغازگر برای ٦٠ سویه کاندیدا روی هم رفته ٦٠ نوار بدست آمد. با استفاده از جدول ماتریس صفر و یک، تجزیه خوشه‌ای با برنامه SPSS به روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوی چند شکلی DNAی محصولات RAPD، به‌طور جداگانه برای هر آغازگر و نیز حالت ترکیبی آنها انجام گرفت. بررسی‌ها نشان داد روش UPGMA نتایج منطقی و مطمئن‌تری به دست می‌دهد و بنابراین، بر این پایه دوری و نزدیکی ژنتیکی سویه‌ها بررسی شد.

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 11:02 IRDT on Tuesday June 18th 2019



شکل ۱. الگوی باندی حاصل از RAPD_PCR سویه‌های کاندیدا آلبیکنس با استفاده از پرایمر RAPD بر روی ژل آگارز و رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم برماید. به ترتیب از سمت چپ: M: مارکر (؛100bp) , +: کنترل مثبت (کاندیدا آلبیکنس حاوی ژن*sap4*) - :کنترل منفی (آب مقطر) /, ستون‌های ۱۳ تا ۲٤ محصولات RAPD_ PCR سویه‌های کاندیداآلبیکنس



شکل ۲. الگوی باندی حاصل از RAPD_PCR سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس* با استفاده از پرایمر RAPD بر روی ژل آگارز و رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم برماید. به ترتیب از سمت چپ: M: مارکر(100bp), +: کنترل مثبت(کاندیدا آلبیکنس حاوی ژن*sap4*). -: کنترل منفی (آب مقطر), ستون‌های ۲۵ تا ۳٦ محصولات RAPD_ PCR سویه‌های کاندیداآلبیکنس

آنالیز دندوگرام در روش RAPD-PCR : یکی از انواع PCR روش RAPD است و در مواردی که اطلاعات محدودی در مورد توالی بازهای DNA یک میکروارگانیسم در اختیار است، کاربرد ویژه‌ای دارد. چون در مورد توالی بازهای DNA کاندیدا آلبیکنس داده‌های زیادی در دست نیست، این روش برای بررسی پلی‌مورفیسم DNA می‌تواند سودمند باشد. هر چند مطالعات مختلف روش RAPD را روشی مناسب برای تشخیص گونه‌های قارچی معرفی

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 11:02 IRDT on Tuesday June 18th 2019

نموده‌اند، اما امروزه این روش کمتر بکار رفته و تشخیص گونه با سایر روش‌های مولکولی و بیشتر با روش‌های مبتنی بر تعیین توالی نوکلئوتیدی یک یا چند ژن انجام می‌شود.

در داده کاوی و آمار، خوشه‌بندی سلسله مراتبی و تحلیل آن یک روش خوشه‌بندی است که هدف آن ساخت یک سلسله مراتب از خوشه‌ها می‌باشد. روش‌های خوشه‌بندی سلسله مراتبی به دو دسته تقسیم می‌شوند:

تجمعی: رویکرد این دسته «پایین به بالا» می‌باشد: با شروع از پایین، در هر مرحله دو خوشه با یکدیگر تجمیع شده و یک خوشه جدید تشکیل می‌دهند. خوشه‌های جدید در سطح‌های بالاتر قرار گرفته و این روند تکرار می‌شود.

تجزیه‌ای: رویکرد این دسته «بالا به پایین» می‌باشد: با شروع از بالا، در هر مرحله یک خوشه به خوشه‌های کوچکتری تجزیه می‌شود که در سطح پایین‌تر قرار می‌گیرند.

هر سطح از سلسله مراتب یک دسته‌بندی از داده‌ها را نمایش می‌دهد که می‌توان به شکل یک درخت نگاه کرد. هر کدام از برگ‌های درخت نشان دهنده یک مشاهده اولیه می‌باشند و ریشه درخت مجموعه‌ی تمام مشاهدات است. نتایج یک خوشه‌بندی سلسله مراتبی عموماً به شکل یک دندروگرام نمایش داده می‌شوند. کلاستر یا رایانش خوشه‌ای از پردازش موازی و توزیع داده‌ها در کامپیوترهای مستقل دیده می‌شود. کلاسترها دو دسته اصلی دارند که گروه اول با کارایی بالا و گروه دوم با دسترسی بالا هستند. نتایج آزمایش در ١٤ کلاستر به صورت زیر قابل مشاهده و بررسی است.(جدول١)

کلاستر١: شامل نمونه (١٨،١٩و٦٠)

کلاستر ٢: شامل نمونه‌های (٥٢،٥٧و٥٩)

کلاستر ٣: شامل نمونه (١٠،٢٦،٢٨و٥٦)

کلاستر ٤: شامل نمونه‌ی(١٦،٣٩،٤٠،٤٨و٥٣)

کلاستر٥: شامل نمونه(١٥،٢٠،٢٦،٣٤و٣٧)

کلاستر٦: شامل نمونه(١٤،١٧،٣٥،٤٣،٤٢و٤٤)

کلاستر٧: شامل نمونه‌های(٣٠،٤٥و٤٦)

کلاستر ٨: شامل نمونه‌های(١١،٨و٤١)

کلاستر ٩: شامل نمونه‌های(٣٦،٣٢،٣٣،٣١،٢٧و٣٨)

کلاستر ١٠: شامل نمونه(٣،٤و٧)

کلاستر ١١: شامل نمونه‌های(٥،٦،١٢و٢٤)

کلاستر ١٢: شامل نمونه‌های(٥٥،٥٤،٢و٥٨)

کلاستر ١٣: شامل نمونه‌های(١٣و٢٣)

کلاستر١٤: شامل نمونه‌های(٩،١،٢١،٤٩،٥٠و٥١) بود.

جدول ١. مشخصات ایزوله‌های کاندیداآلبیکنس و گروه‌بندی آنها بر اساس روش RAPD_PCR

شماره سویه	گروه کلاستر	شماره سویه	گروه کلاستر	شماره سویه	گروه کلاستر	شماره سویه	گروه کلاستر	شماره سویه	گروه کلاستر
١	١٤	١٣	١٣	٢٥	١١	٣٧	٥	٤٩	١٤
٢	١٢	١٤	٦	٢٦	٥	٣٨	٩	٥٠	١٤
٣	١٠	١٥	٥	٢٧	٩	٣٩	٤	٥١	١٤
٤	١٠	١٦	٤	٢٨	٣	٤٠	٤	٥٢	٢
٥	١١	١٧	٦	٢٩	٣	٤١	٨	٥٣	٤
٦	١١	١٨	١	٣٠	٧	٤٢	٦	٥٤	١٢
٧	١٠	١٩	١	٣١	٩	٤٣	٦	٥٥	١٢
٨	٨	٢٠	٥	٣٢	٩	٤٤	٦	٥٦	٣
٩	١٤	٢١	١٤	٣٣	٩	٤٥	٧	٥٧	٢
١٠	٣	٢٢	١١	٣٤	٥	٤٦	٧	٥٨	١٢
١١	٨	٢٣	١٣	٣٥	٦	٤٧	١١	٥٩	٢
١٢	١١	٢٤	١١	٣٦	٩	٤٨	٤	٦٠	١

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 11:02 IRDT on Tuesday June 18th 2019

بحث و نتیجه‌گیری

مخمرها و شبه مخمرها بر روی پوست، مخاط دهان، لوله گوارشی و مجاری ادراری_تناسلی ۸۰-۴۰ درصد انسانها بصورت همزیست حضور داشته و انسان همواره در معرض این قارچ‌های زنده قرار دارد. بدنبال برهم خوردن تعادل فلور نرمال بدن توسط عوامل مختلف شاهد بیماریزایی قارچ‌ها بوده که اثرات منفی مهمی بر کیفیت زندگی افراد می‌گذارد. بیشترین عفونت سیستمیک ایجاد شده با عامل مخمری، کاندیدمی می‌باشد که در رده چهارم عفونتهای خون کسب شده از بیمارستان در امریکا و با همین گرایش در تمام دنیا می‌باشد و تاثیرات اجتماعی بالایی دارد و برخلاف پیشرفتهایی که در درمان صورت گرفته و توسعه داروهای ضدقارچی و دسترسی بیشتر به داروها، مرگ و میر آن به بیش از ۳۰ درصد می‌رسد(۲۲).

کاندیدیاز واژینال شایع‌ترین عفونت دستگاه تناسلی زنان، گزارش می‌شود. ولوواژینیت کاندیدایی با رشد غیرطبیعی کاندیدا آلبیکنس در موکوس دستگاه تناسلی زنان ایجاد شده و به طور چشمگیر در سال‌های اخیر افزایش پیدا کرده‌است. امروزه یکی از معضلات پزشکی، حضور مخمرهایی است که با تشکیل ساختارهای بیوفیلمی منجر به ایجاد عفونت‌های بیمارستانی می‌شوند(۲۳). عفونت‌های ایجاد شده توسط انواع گونه‌های کاندیدیایی، شایع‌ترین عفونت‌های قارچی در افراد دریافت‌کنندهٔ پیوند اعضا هستند. این بیماری در بخش‌های مختلف بدن مانند، پوست، ناخن، دهان، دستگاه تناسلی و ارگان‌های دیگر ایجاد می‌شود. در بررسی ما گونه‌های غالب شناسایی شده به روش فنوتیپی و ژنوتیپی در کاندیدا آلبیکنس بود که ایزوله‌های کاندیدا را دربرمی‌گیرد که با یافته‌های Biernasiuk در سال ۲۰۱٤ مشابهت دارد. بایستگی شناسایی درست و سریع گونه‌های پاتوژن در درمان با ضدقارچ‌ها بسیار مهم و موثر است.

Etminan و همکاران در سال ۱۳۸۷ با بررسی فراوانی واژینیت کاندیدیایی در مراجعان به درمانگاه‌های زنان و مراکز بهداشتی درمانی شهر یزد که شیوع واژینیت کاندیدیایی را به ۲٦/٦درصد رسیده گزارش کردند(۲٤). در مطالعه ما براساس نتایج کشت و آزمایش مستقیم از ٦۰ نفر آلوده به عفونت ولوواژینیت کاندیدایی که از دو استان کرمان و تهران بودند و از نظر ژنتیکی شباهت‌ها و تفاوت‌هایی داشتند و در۱٤ گروه کلاستر قرار گرفتند. بعضی از کلاسترها سویه‌های تکراری وجود دارد که نشان از شباهت ژنومی بین سویه‌ها است.

Fata و همکاران در سال ۱۳۸۵ با بررسی آثار درمانی کلوتریمازول، نیستاتین و پوویدون ایوداین در درمان واژینیت کاندیدائی، گزارش کردند که در افراد مراجعه‌کننده با نشانه‌های واژینیت، ٤۳درصد دچار واژینیت کاندیدائی بودند که بیشتر آنان در گروه سنی ۲۵ تا ۳۵ سالگی قرار داشتند (۲۵). در بررسی حاضر گونه‌های غالب شناسایی شده با روش فنوتیپی و ژنوتیپی در کاندیدا آلبیکنس بوده که گونه‌های مذکور ایزوله‌های کاندیدا را شامل می‌شود که این نتایج با Biernasiuk در سال ۲۰۱٤ مشابهت دارد.

Sampaio و همکاران در پژوهش خود در سال ۲۰۰۳ با مطالعه پلی‌مورفیسم به روش میکروساتلایت در مبتلایان به ولوواژینیت کاندیدا آلبیکنس با لوکوس CAI ۲٦ آلل و ٤٤ ژنوتیپ شناسایی کردند. همچنین، این لوکوس با موتاسیون در گونه‌ها ارتباط دارد(۲٦و۲۷). در این مطالعه عفونت ولوواژینیت کاندیدایی که از دو استان کرمان و تهران بودند و از نظر ژنتیکی شباهت‌ها و تفاوت‌هایی داشتند در ۱٤ گروه کلاستر قرار گرفتند. بعضی از کلاسترها سویه‌های تکراری وجود دارد که نشان از شباهت ژنومی بین سویه‌ها است.

Hattori در سال ۲۰۰۹ با بررسی توالی‌های تکرارشونده در کاندیداها به روش REP با استفاده از پرایمرهای اختصاصی alt در مطالعات ژنوتیپی، عنوان کردند که پرایمر و پتانسیل بالای و شتاب بیشتری در شناسایی کاندیدا آلبیکنس و ژنوتیپ آن دارند(۲۸).

Sabino و همکاران در سال ۲۰۱۰ برای بررسی پلی‌مورفیسم نمونه‌های کاندیداآلبیکنس از روش میکروساتلیت استفاده کرده و که این روش توان شناسایی و تفریق گونه‌های کاندیداالبیکنس از پاراپسیلوزیس را دارد. نتایج از ۲۰ تا ٤۲ آلل بروز داده‌شده با ۳۹ تا ۹۲ ژنوتیپ را شناسایی کرد(۲۹). در این مطالعه عفونت ولوواژینیت کاندیدایی که از دو استان کرمان و تهران بودند و از نظر ژنتیکی شباهت‌ها و تفاوت‌هایی داشتند در۱٤ گروه کلاستر قرار گرفتند. بعضی از

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 11:02 IRDT on Tuesday June 18th 2019

کلاسترها سویه‌های تکراری وجود دارد که نشان از شباهت ژنومی بین سویه‌ها است.

Bonfim-Mendonca و همکاران در سال ۲۰۱۳ با بررسی تایپینگ ملکولی به روش RAPD-PCR نشان دادند ۱۰ تا ۱۱ پروفایل مختلف از ۳۹ نمونه عوامل عفونت‌های کاندیدایی به ترتیب در کاندیداآلبیکنس و پاراپسیلوزیس وجود دارد. همچنین، استفاده از دو مارکر CDC3 وHIS3 به روش میکروساتلیت، ۷ آلل مختلف در هر دو مارکر نشان داد. استفاده همزمان از هر دو روش هم سرعت بالا و هم آنالیز خوب در بررسی میزان توزیع و تنوع ژنوتیپی در بین نمونه‌ها دارد(۳۰).

Biernasiuk و همکاران در سال ۲۰۱٤ با بررسی تنوع ژنتیکی کاندیداآلبیکنس به روش RAPD-PCR بر بیماران دچار سرطان که دچار عفونت‌هایی با مخمر کاندیداآلبیکنس شده‌بودند، از ۵۲ گونه، ۳٤ ژنوتیپ شناسایی کردند. از ۱۰ کلاستر مورد مقایسه ۵۳/۸۵درصد نمونه‌ها دارای بیش از ۸۰درصد قرابت ژنتیکی بودند(۳۱). در بررسی ما گونه‌های غالب شناسایی شده با روش فنوتیپی و ژنوتیپی در کاندیدا آلبیکنس بوده که گونه‌های مذکور ایزوله‌های کاندیدا را شامل می‌شود که این نتایج با Biernasiuk در سال ۲۰۱٤ مشابهت دارد.

Forch و همکاران برای ترسیم دندروگرام‌ها از اطلاعات PCR finger printing و Multilocus Genotype استفاده کردند. در مطالعه ما نتایج آزمون‌های فنوتیپی و مولکولی کاملا برابری داشت که با نتایج دیگر مطالعات مشابهت دارد. در این مطالعه براساس نتایج کشت و آزمایش مستقیم ٦۰ نفر آلوده به عفونت ولوواژینیت کاندیدایی که از دو استان کرمان و تهران بودند و از نظر ژنتیکی شباهت‌ها و تفاوت‌هایی داشتند و در ١٤ گروه کلاستر قرار گرفتند. برخی کلاسترها سویه‌های تکراری داشتند که نشان از شباهت ژنومی بین سویه‌ها دارد.

در این مطالعه با بررسی پلی‌مورفیسم ژنومی مخمر کاندیدا آلبیکنس جدا شده از واژینای زنان دچار واژینیت در دو منطقه جغرافیایی تهران و کرمان به روش RAPD-PCR با یک پرایمر پرداخته شد که بعد مسافت و متغیر گروه سنی در آن تاثیر بسزایی داشت. ٦۰ سویه کاندیدا آلبیکنس در ١٤ گروه ژنومی قرار گرفتند که برخی از آنها در چند گروه بودند که نشان از شباهت ژنوتیپی مخمرهای مناطق مختلف دارد. این تنوع ژنتیکی می‌تواند در انتقال و بیماری‌زایی این مخمر پاتوژن نقش ویژه‌ای داشته باشد بنابراین، بررسی پلی‌مورفیسم ژنوم، شاخص ژنتیکی ارزشمندی در ارزیابی ساختار سویه کاندیدا آلبیکنس است و مطالعات ژنومی بیشتر با توجه به سنجش متغیرهای اساسی بسیار بایسته است.

سپاسداری و سپاسگزاری: این مقاله بخشی از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد با کد پایان‌نامه ۳۸٦۳۰۵۰۷۹۵۱۰۰٤ است. از تمام عزیزانی که در این تحقیق راهنمایی و مشاوره ارزنده داشتند سپاسداری وسپاسگزاری می‌شود. نویسندگان اعلام دارند که در این مورد هیچگونه تعارض منافعی وجود ندارد.

منابع

1.Sobel JD, Wiesenfeld HC, Martens M, Danna P, Hooton TM, Rompalo A, et al. Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis. N Engl J Med 2004;351(9): 876-83.
2.Sobel JD, Faro S, Force RW, Foxman B, Ledger WJ, Nyirjesy PR, et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. Am J Obstet Gynecol 1998;178(2): 203-11.
3.Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. Antifungal susceptibilities of Candida species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. J Clin Microbiol 2005;43(5): 2155-62.
4.Eckert L, Hawes SE, Stevens C, Koutsky LA, Eschenbach DA, Holmes KK. Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm. Obstet Gynecol 1998;92(5): 757-65.
5.Sobel J. Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. Clin Infect Dis 1992;14(Supplement 1):S148-S53.
6.Sobel JD. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. Am J Obstet Gynecol 1985;152(7): 924-35.
7.Falagas ME, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. J Antimicrob Chemother 2006;58(2): 266-72.

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 11:02 IRDT on Tuesday June 18th 2019

8.Girón LM, Aguilar GA, Cáceres A, Arroyo GL. Anticandidal activity of plants used for the treatment of vaginitis in Guatemala and clinical trial of a Solanum nigrescens preparation. J Ethnopharmacol 1988;22(3): 307-13.
9.Avijgan M, Mirzadeh F, Nia EA. The comparative study of anti-fungal effect of pharmaceutical products containing hydroalcohol-ic extract of Echinophora platyloba DC and fluconazole in women with chronic recurrent vaginitis caused by candida albicans. Journal of Research in Medical Sciences. 2012;17.
10.Odds FC. Pathogenesis of Candida infections. J Am Acad Dermatol 1994;31(3): S2-S5.
11.Weig M, Groß U, Mühlschlegel F. Clinical aspects and pathogenesis of Candida infection. Trends Microbiol 1998;6(12): 468-70.
12.Stone HH. Studies in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of Candida sepsis in children. J Pediatr Surg 1974;9(1): 127-33.
13.Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD. Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison toC. albicans. Clin Microbiol Rev 1999;12(1): 80-96.
14.Calderone RA, Cihlar RL, Lee DD-S, Hoberg K, ScheId WM. Yeast adhesion in the pathogenesis of endocarditis due to Candida albicans: studies with adherence-negative mutants. J Infect Dis 1985;152(4): 710-5.
15.Harris ST, Watts NB, Genant HK, McKeever CD, Hangartner T, Keller M, et al. Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. Jama 1999;282(14): 1344-52.
16.Williams JME. Applied sport psychology: Personal growth to peak performance: Mayfield Publishing Co; 1993.
17.Yera H, Sendid B, Francois N, Camus D, Poulain D. Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001;20(12): 864-70.
18.Bandara H, K Cheung B, Watt R, Jin L, Samaranayake L. Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide inhibits Candida albicans hyphae formation and alters gene expression during biofilm development. Mol Oral Microbiol 2013;28(1): 54-69.
19.Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 1992;131(2): 479-91.
20.Li W-H. Distribution of nucleotide differences between two randomly chosen cistrons in a subdivided population: the finite island model. Theor Popul Biol 1976;10(3): 303-8.
21.Vermitsky J-P, Self MJ, Chadwick SG, Trama JP, Adelson ME, Mordechai E, et al. Survey of vaginal-flora Candida species isolates from women of different age groups by use of species-specific PCR detection. J Clin Microbiol 2008;46(4): 1501-3.
22. SJ H. Prevalence of candida and non-candida yeasts isolated from patients with yeast fungal infections in Tehran labs. Tehran University Med J TUMS Publications 2011;69(1):55-62.

23.Nobile CJ, Mitchell AP. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the C. albicans transcription factor Bcr1p. Curr Biol 2005;15(12): 1150-5.
24.Etminan S, Zarinkatsh H, Lotfee M. The Prevalence of Candida Vaginitis among Women aged 15-49 Years in Yazd, Iran. Med Lab J 2008;2(1): 0-11.
25.Fata A, Tavasoli F, Mousavi H, Ebrahim baas. Efficacy of clotrimazole, nystatin and povidone iodine in treatment of patients with vaginal candidiasis 2007;49(94): 373 - 378.
26. Sampaio P, Gusmao L, Alves C, Pina-Vaz C, Amorim A, Pais C. Highly polymorphic microsatellite for identification of Candida albicans strains. J Clin Microbiol 2003;41(2):552-7.
27. Sampaio P, Gusmão L, Correia A, Alves C, Rodrigues AG, Pina-Vaz C, et al. New microsatellite multiplex PCR for Candida albicans strain typing reveals microevolutionary changes. J Clin Microbiol 2005;43(8):3869-76.
28.Hattori H, Tanaka R, Chibana H, Kawamoto F , Adachi H, Shimizu K, et al. Improvement of the repetitive sequence-based identification and genotyping of Candida albicans using ALT-specific primers. Jpn J Infect Dis 2009;62(3): 215-9.
29.Sabino R, Sampaio P, Rosado L, Stevens DA, Clemons KV, Pais C. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among Candida parapsilosis sensu stricto isolates. J Clin Microbiol 2010;48(5): 1677-82.
30.Bonfim-Mendonça PdS, Fiorini A, Shinobu-Mesquita CS ,Baeza LC, Fernandez MA, Svidzinski TIE. Molecular typing of Candida albicans isolates from hospitalized patients. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 2013;55(6): 385-91.
31.Biernasiuk A, Korona-Głowniak I, Grzegorczyk A, Malm A. Differentiation by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) of Candida albicans isolated from upper respiratory tract in patients with non-small cell lung cancer. Acta Biochimica Polonica 2014;61:4.

Evaluation of Genomic Polymorphism of *Candida Albicans*, Isolated from the Patients with Vaginitis by RAPD-PCR Method

Mofidian F (**MSc**)[1]- *Amini K (PhD)[2]- Kazemy M J (PhD)[1]

***Corresponding Address:** Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

Email: dr_kumarss_amini@yahoo.com

Received: 02/Jul/2018 Revised: 03/Sep/2018 Accepted: 27/Nov/2018

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 11:02 IRDT on Tuesday June 18th 2019

Abstract

Introduction: *Candida albicans* are human selective symbiosis, mainly located in the gastrointestinal tract. This group of fungi is pathogenic where host resistance reduces to local or systemic infection. Bacteria are the most common cause of vaginitis, but *candida albicans* are the second leading cause of such infections. *Candida albicans* are responsible for 70-90% of the fungal infections in the vaginal area.

objective: To study the genomic polymorphism of *Candida albicans* isolated from women with vaginitis using RAPD-PCR method.

Materials and Methods: This cross-sectional study was designed and implemented by descriptive-analytic method. In this research, 60 samples of 30 vaginal samples from Shariati Hospital (Tehran) and 30 samples from Kerman Women's Hospital were collected by gynecologist and obstetrician. Using a sterile loop, various species yeasts were cultured on a differential chromatographed medium of Candida agar. Differentiation of subspecies and study of the possible relationship between specific strains and clinical forms was done. Typing of Albicans isolates was also done using RAPD-PCR method with random primers.

Results: Increased non-albicans and resistance to drugs not only in different parts of Iran but also in the world have been reported. In this study, based on the results of culture and direct experiment, 60 people were found to be infected with candida volvaginitis infection in two provinces of Kerman and Tehran, which were genetically similar and different in 14 clusters. Some clusters have repeated strains indicating similarity to genomic strains.

Conclusion: There are several methods for genomic fingerprinting of different types of clinical isolates of *candida albicans*, using Pulsed Field Gel Electrophoresis (Pulsed Field Gel Electrophoresis) technique, fingerprinting methods based on ribotaiping, and fingerprinting methods based on PCR for epidemiological outbreaks are useful.

Conflict of interest: non declared

Key words: Candida Albicans\ polymorphism\ Random Amplified Polymorphic DNA Technique\ Vaginitis

_____Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 108, Pages: 1-10

Please cite this article as: Mofidian F, Amini K, Kazemy M J. Evaluation of Genomic Polymorphism of Candida Albicans, Isolated from the Patients with Vaginitis by RAPD-PCR Method. J of Guilan University of Med Sci 2019; 27(108):1-10. [Text in Persian]

1. Medical biotechnology research center, Ashkezar Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran
2. Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.