

بررسی پلی مورفیسم ژنومی کاندیدای آلبیکنس جدا شده از واژینیت به روش RAPD-PCR

فاطمه مفیدیان (MSc)^۱ - دکتر کیومرث امینی (PhD)^۲ - دکتر محمد جواد کاظمی (PhD)^۳

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

پست الکترونیک: dr_kumarss_amini@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۰۴/۱۱ تاریخ ارسال جهت اصلاح: ۹۷/۰۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۹/۰۶

چکیده

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

هدف: پژوهش مطالعه پلی مورفیسم ژنومی کاندیدای آلبیکنس جدا شده 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 ۶۰ نمونه دربرگیرنده ۳۰ نمونه واژینال از بیمارستان شریعی 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 کاندیدای کشت داده شد. افتراق زیرگونه‌ها و مطالعه‌ی ارتباط گونه‌های ویژه با اشکال بالینی و تایپینگ جدا به‌های آلبیکنس به روش RAPD-PCR انجام شد.

نتایج: افزایش گونه‌های غیر آلبیکنس و مقاوم به داروها نه تنها در نقاط مختلف ایران بلکه در جهان نیز به طور محسوسی دیده می‌شود. در این مطالعه بر پایه نتایج کشت و آزمایش مستقیم ۶۰ نفر آلوده به ولوواژینیت کاندیدایی از دو استان کرمان و تهران بودند که از نظر ژنتیکی شباهت‌ها و تفاوت‌هایی داشتند و در ۱۴ کلاستر قرار گرفتند. در برخی کلاسترها سوبه‌های تکراری وجود داشت که نشان از شباهت ژنومی سوبه‌ها دارد.

نتیجه‌گیری: چندین روش انگشت‌نگاری ژنومی برای انواع جدا به‌های بالینی کاندیدای آلبیکنس وجود دارد که بکارگیری روش ژل الکتروفورز میدان ضربه‌ای Pulsed field gel electrophoresis، روش‌های انگشت‌نگاری بر اساس ریبوتا پینگ و روش‌های انگشت‌نگاری بر اساس PCR برای ارزیابی شیوع و مطالعات اپیدمیولوژی سودمند است.

کلید واژه‌ها: پلی مورفیسم/ چند شکلی قطعات دی ان ای حاصل از تکثیر تصادفی (PCR-RAPD)/ کاندیدای آلبیکنس/ واژینیت

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

مقدمه

کاندیدای پاراسیتولوژیست هستند که گونه‌های غیر آلبیکنس را تشکیل می‌دهند. از دلایل عود و مزمن شدن ولوواژینیت کاندیدایی درمان نادرست و مقاوم شدن به داروی‌های آزولی است. 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 بوده است (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 (۳ و ۴).

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

کاندیدایا، مخمر شایع در بیماری‌های قارچی فرصت طلب در سراسر دنیا است و همچنین، به فراوانی بر سطح پوست و غشاهای مخاطی کلونیزه می‌شود. کاندیدایا 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 کاندیدایا می‌شود. بهم خوردن وضعیت فیزیولوژی و پاتولوژی مانند پیری، حاملگی، اختلال اندوکراین چون دیابت، تروما، جراحی، چاقی، تزریق وریدی، اعتیاد به مواد مخدر، آویتامینوز، عوامل ایمنوساپرسیو، اختلال ژنتیکی، کاستی‌های ایمنی و سیتوکاین‌ها از عوامل مستعدکننده بیماری بشمار می‌روند (۱).

قارچ کاندیدایا گلابراتا دومین عامل شایع بوده و ۱۵-۵ درصد موارد بیماری را در برمی‌گیرد، گونه‌های دیگر کاندیدایا شامل: کاندیدایا گلابراتا، کاندیداکروزه‌ای، کاندیداتروپیکالیس و

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

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 (۱۶). هدف تحقیق ما مطالعه پلی‌مورفیسم ژنومی کاندیدا آلبیکنس جدا شده 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 شده بودند، 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 کلآمیدوکنیدی بر محیط کشت کورن میل آگار و ایجاد کلنی‌های رنگی بر محیط کشت کروم آگار کاندیدا استفاده شد. همچنین، از سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس ATCC14053 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. مخمرها در محیط کشت سابورو دکستروز آگار کشت داده شد و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا زمان آزمایش نگهداری شدند.

در این پژوهش، ۶۰ 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.

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 کرده است (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 آگزمایی، با اریتم خفیف یا شدید، ادم ولوواژن، ضایعات ماهواره‌ای، دیزوری و دیسپارونی دیده شود (۹، ۸). 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 پاتوژنیسته 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 و شرایط رشد، سطح ایمنی و هورمونی 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 (۱۴-۱۱).

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 معمولاً دمای ۳۶ 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

نمونه‌ها در محیط بدون سیکلوهاگزامید 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 واکنش PCR 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، آنزیم Taq 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. ژن sap4 بعنوان مسئول انتقال قارچ و تولید لوله‌های هیف است که در پاتوژنز این قارچ بسیار اهمیت دارد.

با استفاده از لوپ استریل، مقدار کمی از مخمرهای گونه‌های مختلف بر محیط کشت افتراقی کروم آگار کاندیدا/CHROMagar Company, France کشت داده شد. محیط‌های کشت تلقیح شده درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و بعد از گذشت ۴۸ ساعت، کلنی‌های ظاهر شده از نظر مورفولوژی و رنگ پیگمان تولید شده مورد بررسی قرار گرفتند. این آزمون بر ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های واژینیت نیز انجام شد. از این رو در این مطالعه به میزان شیوع VVC (ولوو واژینیت کاندیدایی) و گونه‌های کاندیدای درگیر در افراد مشکوک به بیماری پرداخته شد.

محیط رایج برای کشت و جداسازی کاندیدا در عفونت‌های جلدی-مخاطی سابرو دکستروز آگار SDA است. برای جلوگیری از آلودگی میکروبی یا قارچ‌های ساپروفیت، بهتر است به نمونه‌ها آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل، جنتامایسین یا تتراسایکلین و سیکلوهاگزامید افزوده شود، چون برخی گونه‌های کاندیدا به سیکلوهاگزامید حساس هستند، بهتر است

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

Primer	Oligonucleotide Sequence (5'-3')
Sap4	F: CAATTTAACTGCAACAGGTCCCTCTT R: AGATATTGAGCCCACAGAAATTCC Probe: TGCCACATCATTCTACCAGTATCGTCG

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 بانندی

برای بررسی الگوی پلی‌مورفیسم DNA بین ۶۰ سویه جدا شده قارچ کاندیدا، سویه‌های ایزوله قارچ در محیط کشت CSDA به مدت ۷ 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

نتایج

کاندیداء، 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 کاندیدیایی سن 29 ± 35 بود. از ۱۰۰ نمونه، ۶۰ نمونه (۳۰) نمونه از تهران و ۳۰ نمونه از کرمان) از نظر کاندیدا آلیکنس مثبت شناسایی شدند. این ۶۰ ایزوله از نظر وجود جرم تیوب و تولید کلامیدوسپور مثبت بودند و در محیط کروم آگار کاندیدا/کلنی‌ها به رنگ سبز روشن دیده شدند.

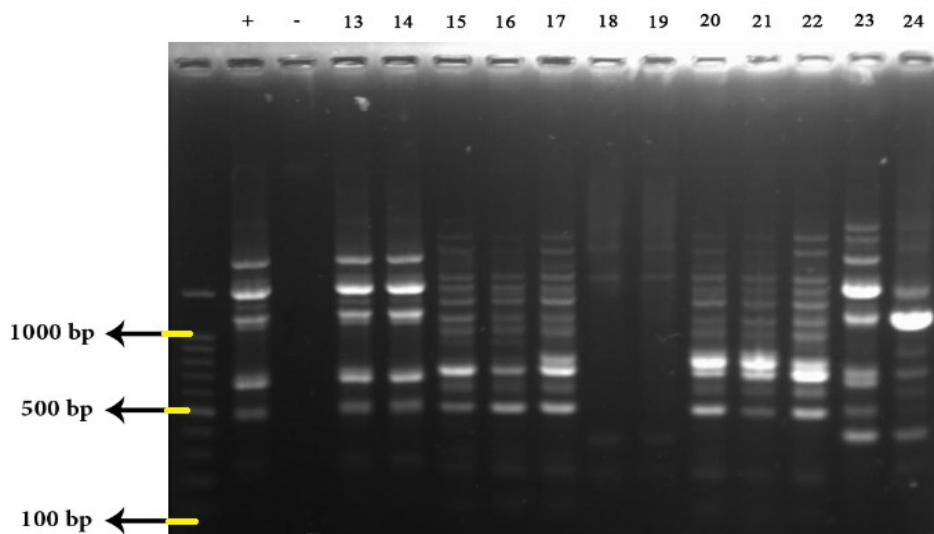
نتایج داده‌های باینری از ژل الکتروفورز: باندها والگوهای بدست آمده از انگشت‌نگاری مولکولی واکنش‌های-RAPD PCR نخست چشمی واکاوی شد. با تهیه جدول در برنامه (Notepad) وجود باند بایک سایز مشخص (از ۵۰ تا ۳۰۰۰) کیلو باز با عدد ۱ و نبود باند با عدد صفر مشخص شد. این اعداد در جدول‌های برنامه Notepad قرار داده‌شد با برنامه نرم افزاری NTSYS ورژن ۱۲/۰ 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 ۱/۲۰ 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 (شکل ۱ و ۲).

براساس ماتریس صفر و یک تعداد کل الگوهای چند شکلی DNA محصولات RAPD حاصل از آغازگر برای ۶۰ سویه کاندیدا روی هم رفته ۶۰ 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 DNA 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.

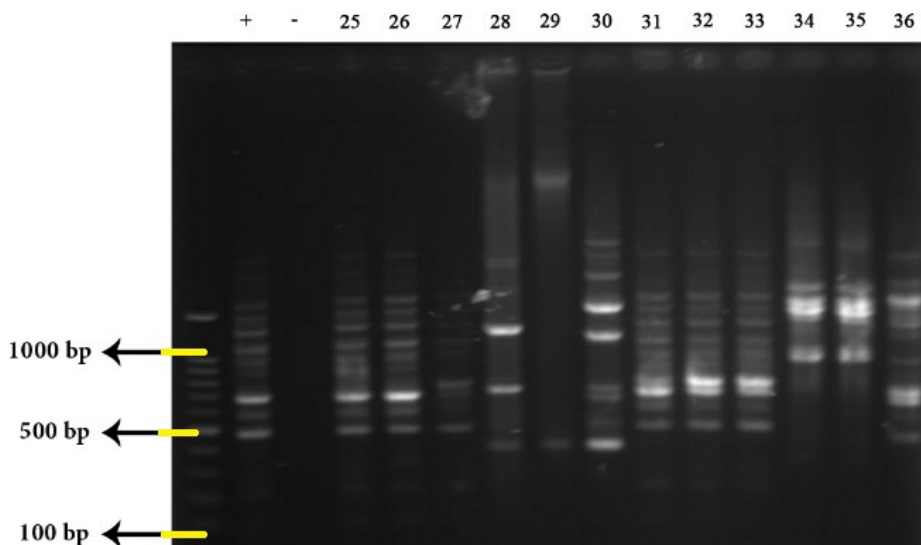
تمام جمعیت‌ها، برای هر آغازگر به صورت جداگانه رسم و امتیازدهی بر اساس حضور باندهای DNA در محدوده‌ی باندی bp ۴۵۰ تا bp ۱۷۰۰ انجام شد. بدین ترتیب که در هر جمعیت در صورت حضور باند، امتیاز یک و در صورت نبودن باند، امتیاز صفر داده شد و ماتریس صفر و یک تشکیل شد. پس از تشکیل ماتریس صفر و یک در نرم‌افزار Excel، داده به نرم‌افزار genAlex نسخه ۶/۴ و PopGene نسخه ۱/۳۲ منتقل شد و تجزیه خوشه‌ای به روش WARD بدست آمد. با تهیه جدول در برنامه (Notepad) وجود باند بایک سایز مشخص (از ۵۰ تا ۳۰۰۰) کیلو باز با عدد ۱ و عدم وجود باند با عدد صفر مشخص شد. این اعداد در جداول برنامه Notepad قرار گرفته و توسط برنامه نرم‌افزاری NTSYS ورژن ۱۲/۰ 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 ۱/۲۰ میلی‌متر 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 (۱۹) 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 (۲۰). اصولاً برای این کار، مجذور فاصله اقلیدوسی ترجیح داده می‌شود، ولی نتایج خیلی مشابهی با استفاده از ضرایب تشابه جاکارد بدست آمده‌است (۲۱).

ملاحظات اخلاقی: پروپوزال این تحقیق مورد تایید دانشگاه آزاد اسلامی واحد اشکذر استان یزد با کد پایان‌نامه ۳۸۶۳۰۵۰۷۹۵۱۰۰۴ قرار گرفت. لازم به یادآوری است که در این پژوهش استفاده از بیماران بر اساس دستورالعمل‌های استاندارد فرامرسی توسط متخصص زنان بود. همچنین، در تمام مراحل تحقیق قوانین و مقررات اخلاقی رعایت شد.



شکل ۱. الگوی بانندی حاصل از RAPD-PCR سویه‌های کاندیدآلبیکنس با استفاده از پرایمر RAPD بر روی ژل آگارز و رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم برآید. به ترتیب از سمت چپ: M: مارکر (100bp), +: کنترل مثبت (کاندیدآلبیکنس حاوی ژن *sap4*)، -: کنترل منفی (آب مقطر) / ستون‌های ۱۳ تا ۲۴ محصولات RAPD-PCR سویه‌های کاندیدآلبیکنس



شکل ۲. الگوی بانندی حاصل از RAPD-PCR سویه‌های کاندیدآلبیکنس با استفاده از پرایمر RAPD بر روی ژل آگارز و رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم برآید. به ترتیب از سمت چپ: M: مارکر (100bp), +: کنترل مثبت (کاندیدآلبیکنس حاوی ژن *sap4*)، -: کنترل منفی (آب مقطر) / ستون‌های ۲۵ تا ۳۶ محصولات RAPD-PCR سویه‌های کاندیدآلبیکنس

بازهای DNA کاندیدآلبیکنس داده‌های زیادی در دست نیست، این روش برای بررسی پلی مورفیسم DNA می‌تواند سودمند باشد. هر چند مطالعات مختلف روش RAPD را روشی مناسب برای تشخیص گونه‌های قارچی معرفی

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

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 ۱۴ کلاستر به صورت زیر قابل مشاهده و بررسی است. (جدول ۱)

کلاستر ۱: شامل نمونه (۱۸، ۱۹ و ۶۰)

کلاستر ۲: شامل نمونه‌های (۵۷، ۵۲ و ۵۹)

کلاستر ۳: شامل نمونه (۱۰، ۲۶، ۲۸ و ۵۶)

کلاستر ۴: شامل نمونه‌های (۱۶، ۳۹، ۴۰، ۴۸ و ۵۳)

کلاستر ۵: شامل نمونه (۱۵، ۲۰، ۲۶، ۳۴ و ۳۷)

کلاستر ۶: شامل نمونه (۱۴، ۱۷، ۳۵، ۴۳، ۴۲ و ۴۴)

کلاستر ۷: شامل نمونه‌های (۳۰، ۴۵ و ۴۶)

کلاستر ۸: شامل نمونه‌های (۱۱، ۸ و ۴۱)

کلاستر ۹: شامل نمونه‌های (۳۶، ۳۲، ۳۳، ۳۱، ۲۷ و ۳۸)

کلاستر ۱۰: شامل نمونه (۳ و ۷)

کلاستر ۱۱: شامل نمونه‌های (۵، ۶، ۵ و ۲۴)

کلاستر ۱۲: شامل نمونه‌های (۵۵، ۵۴ و ۵۸)

کلاستر ۱۳: شامل نمونه‌های (۱۳ و ۲۳)

کلاستر ۱۴: شامل نمونه‌های (۹، ۲۱، ۴۹، ۵۰ و ۵۱) بود.

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 جمع 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

جدول ۱. مشخصات ایزوله‌های کاندیدا آلیکس و گروه‌بندی آنها بر اساس روش RAPD_PCR

گروه شماره سویه	گروه کلاستر	شماره سویه	گروه کلاستر	شماره سویه	گروه کلاستر	شماره سویه	گروه کلاستر	شماره سویه
۱	۱۴	۱۳	۱۳	۲۵	۱۱	۳۷	۵	۴۹
۲	۱۲	۱۴	۶	۲۶	۵	۳۸	۹	۵۰
۳	۱۰	۱۵	۵	۲۷	۹	۳۹	۴	۵۱
۴	۱۰	۱۶	۴	۲۸	۳	۴۰	۴	۵۲
۵	۱۱	۱۷	۶	۲۹	۳	۴۱	۸	۵۳
۶	۱۱	۱۸	۱	۳۰	۷	۴۲	۶	۵۴
۷	۱۰	۱۹	۱	۳۱	۹	۴۳	۶	۵۵
۸	۸	۲۰	۵	۳۲	۹	۴۴	۶	۵۶
۹	۱۴	۲۱	۱۴	۳۳	۹	۴۵	۷	۵۷
۱۰	۳	۲۲	۱۱	۳۴	۵	۴۶	۷	۵۸
۱۱	۸	۲۳	۱۳	۳۵	۶	۴۷	۱۱	۵۹
۱۲	۱۱	۲۴	۱۱	۳۶	۹	۴۸	۴	۶۰

بحث و نتیجه گیری

ولوواژینیت کاندیدایی که از دو استان کرمان و تهران بودند و از نظر ژنتیکی شباهت‌ها و تفاوت‌هایی داشتند و در ۱۴ 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، ۴۳ درصد 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 ۲۰۱۴ مشابهت دارد.

Sampaio و همکاران در پژوهش خود در سال ۲۰۰۳ با مطالعه پلی مورفیسم به روش میکروساتلایت در مبتلایان به ولوواژینیت کاندیدا آلبیکنس با لوکوس CAI ۲۶ آلل و ۴۴ ژنوتیپ شناسایی کردند. همچنین، این لوکوس با موتاسیون در گونه‌ها ارتباط دارد (۲۶ و ۲۷). در این مطالعه عفونت ولوواژینیت کاندیدایی که از دو استان کرمان و تهران بودند و از نظر ژنتیکی شباهت‌ها و تفاوت‌هایی داشتند در ۱۴ 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 پلی مورفیسم نمونه‌های کاندیدا آلبیکنس از روش میکروساتلایت استفاده کرده و که این روش توان شناسایی و تفریق گونه‌های کاندیدا آلبیکنس از پاراپسیلوزیس را دارد. نتایج از ۲۰ تا ۴۲ آلل بروز داده شده 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 در ۱۴ گروه کلاستر قرار گرفتند. بعضی از

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، کاندیدی می‌باشد که در رده چهارم عفونتهای خون کسب شده از بیمارستان در امریکا و با همین گرایش در تمام دنیا می‌باشد و تأثیرات 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).

کاندیداز 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 کرده است. امروزه یکی از معضلات پزشکی، حضور مخمرهایی است که با تشکیل ساختارهای بیوفیلومی منجر به ایجاد عفونت‌های بیمارستانی می‌شوند (۲۳). عفونت‌های ایجاد شده توسط انواع گونه‌های کاندیدایی، شایع‌ترین عفونت‌های قارچی در افراد دریافت‌کننده 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 در برمی‌گیرد که با یافته‌های Biernasiuk در سال ۲۰۱۴ 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 کاندیدایی در مراجعان به درمانگاه‌های زنان و مراکز بهداشتی درمانی شهر یزد که شیوع واژینیت کاندیدایی را به ۲۶/۶ درصد رسیده گزارش کردند (۲۴). در مطالعه ما براساس نتایج کشت و آزمایش مستقیم از ۶۰ نفر آلوده به عفونت

آلوده به عفونت ولوواژینیت کاندیدیایی که از دو استان کرمان و تهران بودند و از نظر ژنتیکی شباهت‌ها و تفاوت‌هایی داشتند و در ۱۴ 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. ۶۰ سویه کاندیدا آلبیکنس در ۱۴ 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 ۳۸۶۳۰۵۰۷۹۵۱۰۰۴ است. از تمام عزیزانی که در این تحقیق راهنمایی و مشاوره ارزنده داشتند سپاسداری و سپاسگزاری می‌شود. نویسندگان اعلام دارند که در این مورد هیچگونه تعارض منافی وجود ندارد.

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.

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 کاندیدیایی به ترتیب در کاندیدا آلبیکنس و پاراپسیلوزیس وجود دارد. همچنین، استفاده از دو مارکر CDC3 و HIS3 به روش میکروساتلایت، 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 ۲۰۱۴ با بررسی تنوع ژنتیکی کاندیدا آلبیکنس به روش RAPD-PCR بر بیماران دچار سرطان که دچار عفونت‌هایی با مخمر کاندیدا آلبیکنس شده بودند، از ۵۲ گونه، ۳۴ ژنوتیپ شناسایی کردند. از ۱۰ کلاستر مورد مقایسه ۵۳/۸۵ درصد نمونه‌ها دارای بیش از ۸۰ درصد 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 ۲۰۱۴ 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 کاملاً برابری داشت که با نتایج دیگر مطالعات مشابهت دارد. در این مطالعه براساس نتایج کشت و آزمایش مستقیم ۶۰ نفر

منابع

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.

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 hydroalcoholic 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, Mühlischlegel 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 to *C. 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, Gusmao 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-Główniak I, Grzegorzczak 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

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 ribotyping, 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.