مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۱، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۵
صفحات: ۳۲۵ - ۳۳۰

تعیین هویت گونه‌های کاندیدا جدا شده از ۱۵۰ نمونه بیماران مبتلا به کاندیدیازیس با استفاده ازمحیط کشت Candida ID agar و محیط کشت Candida CHROM agar

عباسعلی جعفری‌ندوشن*[?] Ph.D. ، محمدحسین انوری* Ph.D. ،
مهین غفورزاده** M.S.

چکیـده

هـــدف: هـدف از انجـام ایـن مطالعـه ارزیـابی و مقایـسه دو محـیط Candida ID agar و Candida CHROM agar برای تعیین گونه‌های کاندیدا جداشده از نمونه‌های بالینی می‌باشد.

روش بررسی: تعداد ۱۵۰ نمونه بیماران مبتلا به کاندیدیازیس بر روی دو محیط مورد مطالعه کشت داده و همچنین مخمرهای جداشده با استفاده از کیت Api به عنوان روش استاندارد تعیین گونه شدند تا کارآیی این دو محیط با هم مقایسه شود. از آزمون ارزیابی تستهای آزمایشگاهی (حساسیت وویژگی) برای مقایـسه نتـایج استفاده شد.

یافته‌ها: با استفاده از محیط کـشت‌هـای جدیـد ماننـد Candida ID agar وCandida CHROM agar امکان تشخیص سریع غالب گونه‌های کاندیدا و خصوصا کاندیدا آلبیکنس در ظرف ۲۴ ساعت پس از کـشت نمونه فراهم شد.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر، محیط Candida ID agar حساسیت ۹۶/۴٪ داشـت کـه خیلـی بیـشتر از محیط کشت Candida CHROM agar با حساسیت ۵۱٪ در تشخیص افتراقـی مخمرهـا خـصوصا گونـه کاندیدا آلبیکنس بود.

واژه‌های کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، Candida ID agar، Candida CHROM agar ، گونه‌های کاندیدا، محیط کشت

مقـدمـه

تعیین هویت گونه‌های کاندیدا از ابتدا تا کنون همیشه از معضلات مهم آزمایشگاه قارچ‌شناسی پزشکی بوده است. امروزه بیماری کاندیدیازیس به عنوان یک مشکل مهم و به خصوص در بیماران بستری در بیمارستانها بوده است، به طوریکه به عنوان چهارمین عامل بیماریزای عفونتهای بیمارستانی شناخته می‌شود. هرچند در گذشته تا سال ۱۹۸۰ گونه کاندیداآلبیکنس به عنوان شایعترین گونه بیماریزا معرفی می‌شد ولی از دو دهه گذشته با شیوع روزافزون ایدز و همچنین شیوع بدخیمی‌ها و افزایش افراد ایمنوساپرس، روز به روز بر شیوع کاندیدیازیس سیستمیک و سپتی

دریافت مقاله: ۸۵/۴/۲۸، اصلاح مقاله: ۸۵/۱۰/۲۱، پذیرش مقاله: ۸۵/۱۱/۳۰

?* استادیار گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد ـایران
** کارشناس آزمایشگاه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
آدرس پست الکترونیکی: Jafariabbas@yahoo.com

سمی کاندیدایی خصوصاً با عوامل کاندیدا غیر آلبیکنس افزوده شده است (۱).

مهمترین چالش در مواجهه با بیماری کاندیدیازیس، ضایعات با عوامل اتیولوژیک گونه‌های کاندیدا به غیر از کاندیدا آلبیکنس (non-albicans Candida spp.) است که به علت مقاومت دارویی آنها به داروهای متداول ضد قارچی می‌باشد. به عنوان مثال گونه‌های C. krusei و C. glabrata مقاوم به فلوکونازول و گونه‌های C. lucitiana و C. tropicalis مقاوم به آمفوتریسینB می‌باشند. در زمانی که روز به روز بر میزان شیوع کاندیدیازیس مهاجم خطرناک و کشنده افزوده می‌شود، تعیین هویت سریع گونه‌های مخمری بیماریزا و تشخیص عوامل اتیولوژیک نمونه‌های با چندین عامل بیماریزای قارچی (Mix) الزامی است (۱،۲).

هرچند روشهای سنتی مانند جذب و تخمیر قندها برای تعیین گونه‌های مخمری از جمله کاندیدا قابل استفاده است، ولی این روش بسیار وقت‌گیر بوده و برای بیمار و پزشک مفید نیست زیرا حداقل به یک تا دو هفته زمان برای خواندن نتایج نیاز است. این روشها همچنین غیرحساس و پرزحمت است (۳). استفاده از روشهای جدیدتر مانند روشهای مولکولار شامل PCR-RFLP, Real time PCR, PCR و غیره هرچند روشهای با دقت و با حساسیت بالا و به روز می‌باشند ولی متاسفانه بسیار پرهزینه و اغلب در مراحل تحقیقاتی بوده و هنوز به صورت روتین آزمایشگاهی در نیامده است و به خصوص در کشورهای جهان سوم از جمله کشور ما هنوز برای بیمار و پزشک معالج کاربرد آنچنانی ندارد. استفاده از محیط‌های رنگزا نتیجه بهتری در تشخیص گونه‌های مخمری خصوصاً در نمونه‌های مخلوط در مقایسه با محیط کشت‌ها و روشهای سنتی داشته است (۴). دو محیط کشت رنگزای تجاری جدید به نامهای Candida CHROM agar و Candida ID agar برای تشخیص افتراقی گونه‌های کاندیدا به بازار آمده‌اند که در کشور ما کمتر مورد استفاده قرار گرفته‌اند و یا اطلاعات زیادی در مورد آنها وجود ندارد. محیط کشتCandida ID agar یک محیط افتراقی جدیدی است که برای تشخیص سریع و مستقیم کاندیدا آلبیکنس، سایر گونه‌های رنگزای کاندیدا خصوصاً گونه‌های C.guilliermondi, C. tropicalis, C. lusitiane وC. kefyr که کلنی‌های رنگی ایجاد می‌کنند، بسیار مفید است (۵،۶).

هدف از انجام این مطالعه ارزیابی محیط کشت Candida ID agar برای تعیین هویت مستقیم گونه‌های کاندیدا جدا شده از نمونه‌های بالینی جدا شده از ضایعات کاندیدیازیس و مقایسه آن با محیط Candida CHROM agar بوده است.

روش بررسی

در این تحقیق مجموعاً ۱۵۰ نمونه بیماران شامل ۲۸ نمونه ریوی، ۷۵ سوآب واژینال، ۲۱ نمونه ادرار و ۲۶ نمونه دیگر نظیر سوآب‌های گرفته شده از چرک، ترشحات گوش و تراشه‌های ناخن و پوست بر روی سه محیط کشت Candida ID agar (BioMerieux , Marcy I, Etoile France) و CHROM agar (CHROM agar, Paris, France) و محیط روتین Sabouraud Dextrose Agar کشت داده شدند. تمامی کشت‌ها توسط یک کارشناس خبره و در شرایط مشابه انجام گردید.

تمامی نمونه‌های غیرمایع در یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی ۰/۸۵ درصد به صورت سوسپانسیون درآمده، سپس ۱۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون بر روی محیطهای Candida ID agar و CHROM agar و سابورو دکستروز آگار (Oxoid, UK) حاوی کلرامفنیکل (۵۰ mg/lit) کشت داده شد. در مورد نمونه‌های محلول، حجم مساوی از نمونه مستقیماً در سه محیط کشت داده شد و پس از نگهداری در انکوباتور ۳۵ درجه سانتیگراد، پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی و مطالعه قرارگرفت. تمام مخمرهای جداشده بر روی محیط کشت‌های رنگزا مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده از نظر مورفولوژی کلنی و رنگ و پیگمان تولید شده بررسی و تعین هویت شدند. همچنین کلنی‌های هر محیط کشت با استفاده از کیت تجاری Api (Diagnostics Pasteur)، محیط کورن میل آگار و انجام تست لوله زایا بررسی و تعیین گونه شدند. کارایی هر دو محیط رنگزای Candida ID agar و Candid CHROM agar خصوصاً در تشخیص گونه‌های کاندیدا بررسی و با استفاده از آزمون ارزیابی تستهای آزمایشگاهی، میزان

حساسیت (موارد مثبت حقیقی تقسیم بر جمع مثبتهای حقیقی و منفی کاذب ضرب در ۱۰۰) و همچنین میزان اختصاصی بودن (منفی‌های حقیقی تقسیم بر جمع منفی حقیقی و مثبت کاذب ضرب در۱۰۰) محاسبه شدند. کلیه آزمایشات با استفاده از روشهای استاندارد تحقیقاتی کتب مرجع قارچشناسی پزشکی (۳،۱۳) انجام شده و با توجه به اینکه در کنار آزمایشات روتین، از آزمایشگاه تشخیص طبی نمونه‌ای هم با نظر موافق بیمار استفاده شد، انجام این تحقیق هماهنگ با معیارهای اخلاق پزشکی بوده است.

یافته‌ها

از مجموع ۱۵۰ نمونه بالینی کشت داده شده، تعداد ۱۱۸ نمونه دارای کشت مثبت بودند که تعداد یک تا چند گونه مخمری از آنها جدا شد. مجموعاً ۱۰۶ نمونه بر روی هر سه محیط مورد استفاده (Sc, CHROM agar, Candida ID agar) رشد داشتند در حالی که تعداد ۴ نمونه بر روی Candida ID agar و ۳ SC نمونه بر روی SC و CHROM agar و ۲ نمونه بر روی Candida ID agar و CHROM agar رشد داشتند. تعداد ۵ نمونه هم تنها بر روی یکی از محیطها رشد داشتند (۲ نمونه بر روی سابورو، یک نمونه روی کروم آگار و ۲ نمونه روی Candida ID). از این رو در مجموع، حساسیت ۹۴/۹ ٪ برای محیط Candida ID و ۹۲٪ برای CHROM agar از نظر کارآیی برای جداسازی مخمرها از نمونه‌های بالینی به دست آمد. در مجموع از تعداد کل نمونه‌های دارای کشت مثبت، تعداد ۱۰۱ کشت تنها یک گونه ۱۴ کشت دو گونه و ۳ کشت ۳ گونه مخمری جدا شدند.

جدول ۱. وضعیت رنگ تولید شده توسط کلنی قارچهای جدا شده در دو محیط مورد مطالعه.

	تعداد کلنی‌های جدا شده پس از ٤٨ ساعت/تعداد کلنی‌های جدا شده پس از ٢٤ ساعت									
	Candida ID agar					Candida CHROM agar				
سوشهای مخمری جدا شده	تعداد	آبی	صورتی	سفید	بدون رشد	سبز	صورتی	بنفش	سفید	بدون رشد
کاندیدا آلبیکنس	۷۹	۵۹/۶۱	۰/۰	۵/۱	۱۵/۱۷	۳۲/۴۷	۰/۰	۰/۰	۲۲/۱۸	۲۵/۱۴
کاندیدا پارپسیلوزیس	۱۲	۰	۴/۳	۴/۶	۴/۳	۰/۰	۰/۱	۰/۰	۸/۹	۴/۲
تورولوپسیس گلابراتا	۹	۰/۰	۲/۱	۵/۷	۲/۱	۰/۰	۴/۷	۰/۰	۲/۱	۳/۱
کاندیدا کروزه ای	۶	۰/۰	۰/۰	۳/۴	۳/۲	۰/۰	۱/۲	۰/۰	۲/۳	۲/۱
کاندیدا تروپیکالیس	۳	۰/۰	۲/۱	۱/۲	۰/۰	۰/۰	۱/۱	۰/۰	۲/۲	۱/۱
کاندیدا دابلینسیس	۱	۱/۱	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۱	۰/۰	۰/۰	۱/۰	۰/۰
کاندیدا کفیر	۴	۰/۰	۰/۰	۳/۳	۱/۱	۰/۰	۴/۴	۰/۰	۰/۰	۰/۰
ساکارومیسس سرویسیه	۳	۰/۰	۰/۰	۲/۲	۱/۱	۰/۰	۰/۳	۰/۰	۳/۰	۰/۰
ردوترولا	۱	۰/۰	۱/۰	۰/۰	۰/۱	۰/۰	۰/۱	۰/۰	۰/۰	۱/۰

توزیع فراوانی رنگ کلنی‌ها بر روی محیط Candida CHROM agar و Candida ID agar پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت در جدول ۱ نشان داده شده است. پس از ۷۲ ساعت تنها تغییرات بسیار ناچیزی بر روی رنگ کلنی‌های مخمری جدا شده بر روی محیط Candida CHROM agar و Candida ID agar مشاهده شد. حساسیت و ویژگی هر دو محیط کشت CHROM agar وCandida ID agar برای کاندیداآلبیکنس خیلی بالا و به خصوص ویژگی حدود ۱۰۰٪ بود.

جدول ۲. توزیع نمونه‌های دارای بیش از یک مخمر بر روی محیطهای مورد مطالعه.

گونه‌های جدا شده از کشتهای مخلوط (تعداد کشتهای مخلوط)	تعداد کشتهای مخلوط جدا شده از محیطهای مختلف		
	سابورو	فقط CHROM	فقط Candida ID
کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا (۴)	۲	۰	۲
کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا تروپیکالیس (۳)	۲	۰	۱
کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا پاراپسیلوزیس (۲)	۱	۰	۱
کاندیدا کروزه ای و کاندیدا کفیر (۲)	۱	۱	۰
کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا گلابراتا (۲)	۰	۰	۲
کاندیدا کفیر و ساکارو میسس (۱)	۱	۰	۰
کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا ردوتولا و کاندیدا کفیر (۱)	۰	۱	۰
کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا کروزه ای و کاندیدا پاراپسیلوزیس (۲)	۱	۱	۰

پس از ۲۴ ساعت حساسیت Candida ID agar ۹۶/۴٪ ، در حالی که برای CHROM agar به میزان ۵۱٪ محاسبه شد. پس از ۴۸ ساعت نگهداری کشتها این مقادیر به ترتیب ۹۷/۳ و ۹۴٪ و در نهایت پس از ۷۲ ساعت حساسیت هر دو محیط رنگزا به حدود ۹۹٪ رسید. به خصوص تشخیص کاندیدا آلبیکنس بر روی محیط Candida ID agar پس از ۲۴ ساعت نگهداری آسانتر از CHROM agar بود که در حقیقت به علت مشاهده سریعتر رنگ آبی ایجاد شده بر روی محیط Candida ID agar پس از ۲۴ ساعت در مقایسه با ظهور رنگ سبز این گونه بر روی محیط CHROM agar بود. در مجموع از کل کشتهای مثبت، تعداد ۱۰۱ کشت دارای یک گونه و ۱۴ کشت دارای ۲ مخمر و ۳ کشت واجد ۳ گونه مخمری بودند (جدول ۲).

بحث

امروزه به دلیل شیوع بیماری کاندیدیازیس و مقاومت دارویی بعضی از گونه‌های کاندیدا، تعیین گونه عوامل بیماریزای جدا شده از ضایعات ضروری به نظر می‌رسد. در محیط کشتهای روتین مانند سابورو، امکان تعیین گونه کاندیدا وجود نداشته نیاز به تستهای بیوشیمیایی تکمیلی وقت‌گیر و یا در بعضی موارد پرهزینه می‌باشد. در محیطهای رنگزا مستقیماً امکان تعیین گونه به کمک رنگ تولید شده توسط هر گونه وجود دارد. یکی از مهمترین مشکلات محیط کشتهای افتراقی برای گونه‌های مخمری کاندیدا، تشخیص افتراقی بین C. albicans و C. dubliniensis می‌باشد (۶،۸). برخلاف مطالعه Freeydiae و همکاران (۶،۷) و همچنین مطالعه Fricker-Hidalogo (۸) تنها مورد ایزوله‌های C. dubliniensis دارای کلنی با رنگ آبی متمایل به سبز تیره بر روی هر دو محیط کروموژنیک و قابل تشخیص از C. albicans بودند. با این حال قابل ذکر است که خصوصیت تیرگی رنگ کلنی C .dubliniensis در محیط کشت Candida ID پس از ۴۸ ساعت مشخص گردید ولی در محیط Candida CHROM agar پس از ۷۲ ساعت که در نتیجه به نظر می‌رسد هر دوی این محیطها برای تشخیص افتراقی این قارچ از کاندیدا آلبیکنس در عرض ۲۴ ساعت احتمالاً مناسب نباشند ولی Candida ID agar قادر است پس از ۴۸ ساعت این قارچ را تشخیص دهد که یک روز زودتر از Candida CHROM agar است. مطالعات دیگر هم محیط Candida ID agar را مناسبتر از محیط دیگر گزارش کرده‌اند (۹،۱۰). Pfaller و همکاران در مطالعه‌ای Candida CHROM agar را برای تشخیص گونه‌های کاندیدا به کار بردند که با این محیط تنها توانستند گونه‌های C. albicans, C. glabrata , C. tropicalis و C. krusei را

تشخیص دهند ولی سایر گونه‌ها با این محیط غیر قابل تشخیص گزارش شدند (۱۱).

Lechster و همکاران نیز محیط کشتهای Candida ID و Candiselect medium را مقایسه و گزارش نمودند که محیط Candida ID مفیدتر و دارای حساسیت ۹۷/۷٪ است که با مطالعه حاضر هماهنگی دارد. آنها هم در مطالعه خود با این محیط توانستند گونه‌های C. tropicali, C. guillermondi, C. lucitiana, C. kefyr را تشخیص دهند (۱۲). در مطالعه حاضر نه تنها گونه‌هایی که بنا به اظهار نظر کارخانه سازنده محیط کشت Candida ID قابل تشخیص هستند (C. guilliermonyi, C.tropicalis C. lusitiane و C. kefyr), بلکه گونه‌های C. parapsilosis, C. glabrata و Rhodotorula هم بر روی این محیط قابل تشخیص بودند. جدول ۲ نشان می‌دهد که هر دو محیط کشت Candida CHROM agar و Candida ID agar توانایی تشخیص مخلوطی از مخمرها در ۱۸ نمونه (۷۹/۱٪ موارد) را داشتند در حالی که محیط سابورو دکستروز آگار تنها در ۶ مورد (۳۳٪ موارد) این توانایی را نشان داد. در این مطالعه از کشت ۶۹ نمونه دارای چندین عامل قارچی، ۴ مورد تنها بر روی محیط Candida ID agar و ۲ مورد بر روی محیط Candida CHROM agar تشخیص داده شدند. به نظر می‌رسد که این اشکال در تشخیص این نمونه‌ها در دو محیط می‌تواند به علت کم بودن حجم نمونه و میزان تلقیح به محیط کشت باشد. چون تنها تعداد کمی کلنی در این کشت‌ها جدا شده بودند که تنها در یک مورد ترکیب C.krusi و ساکارومیسس در محیط Candida ID agar غیر قابل تشخیص بود که به علت رنگ سفید تولید شده توسط هر دو مخمر بود.

نتیجه‌گیری. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که Candida ID agar به میزان کافی حساس است و تقریباً بیشتر مخمرهای مهم قادر به رشد بر روی این محیط هستند. در بیش از ۶۶٪ موارد تشخیص افتراقی کاندیدا آلبیکنس از سایر مخمرها در محیط Candida ID agar سریعتر از Candida CHROM agar بود. به عبارت دیگر، CHROM agar به خوبی Candida ID agar قادر به تشخیص تمامی نمونه‌های مخلوط را نداشت. با توجه به اهمیت تشخیص گونه‌های بیماریزا و سادگی و سرعت عمل استفاده از محیط کشت Candida ID agar، استفاده از این محیط برای این منظور توصیه می‌شود.

Refrences

1. Yun-Liang Y, Shu-Ying L, Hsiao-Hsu C, Hsiu-Jung L. The trend of susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of Candida species from 1999 to 2002 in Taiwan. BMC Infectious Diseases 2005; 5: 99.

2. Sandven P. Lassen G. Importance of Selective Media for Recovery of Yeasts from Clinical Specimens. J of Clin Microbiol 1999; 37(11): 3731-3733.

3. Ajello L, Hay RJ. Medical mycology. Ninth edition, Arnold Publication. Uncellular Ascomycetous. Candida species 1999; 423-450.

4. Lynn LH, Duane RH, Clinton KM, David P. Direct Isolation of Candida spp. from Blood Cultures on the Chromogenic Medium CHROMagar Candida. J Clin Microbio 2003; 41(6): 2629-2632.

5. Bernal S, Mazuelos EM, Garcia M, Aller AI, Martinez MA. Evaluation of CHROMagar Candida medium for the isolation and presumptive identification of species of Candida of clinical importance. Diagn Microbiol Infect Dis 1993; 24: 201–204.

6. Freydie`re AM, Parant F, Chaux C, Gille Y. Candida ID, a new chromogenic medium compared to Albicans ID2. Clin Microbiol Infect 2000; 6(Suppl.1): 181.

7. Freydie`re AM, Guinet R, Boiron P. Yeast

identification in the clinical microbiology laboratory phenotypical methods. Med Mycol 2001; 39: 9–33.

8. Fricker-Hidalgo H, Orenga S, Lebeau B, Pelloux H, Brenier-Pinchart MP. Evaluation of Candida ID, a new chromogenic medium for fungal isolation and preliminary identification of some yeast species. J Clin Microbiol 2005; 39: 1647–1649.

9. Willinger, B, and M. Manafi. Evaluation of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for Candida species. Mycoses 1999; 42: 61–65.

10. Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T et al. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of Candida dubliniensis. J Clin Microbiol 2000; 38: 1599–1608.

11. Pfaller M, Houston AA, Coffmann S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for Candida albicans, Candida tropicalis, Candida krusei, and Candida (Torulopsis) glabrata. J Clin Microbiol 1996; 34: 58–61.

12. Letscher-Bru V, Meyer MH, Galoisy AC, Waller J, Candolfi E. Prospective Evaluation of the New Chromogenic Medium Candida ID, in comparison with Candiselect, for Isolation of Molds and Isolation and Presumptive Identification of Yeast Species. J of Clin Microbiol Rev Apr 2002; 40(4): 1508–1510.

۱۳. شادزی ش. قارچ‌شناسی پزشکی و تشخیص آزمایشگاهی بیماریهای قارچی؛ ۱۳۸۴: جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان