مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره چهاردهم، شمارهٔ ۱، دی ۱۳۹۰، صفحه ۶۲-۵۳

مقاومت دارویی گونه های کاندیدایی جداشده از پریتونیتهای قارچی به روش PCR– RFLP

مریم علی نژاد(MSc) [۱]، آیت اله نصرالهی عمران(PhD) [۲*]، سیدجمال هاشمی(PhD) [۳]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن
۲- گروه قارچ شناسی دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن
۳- گروه قارچ شناسی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

دریافت:۹۰/۱/۱۹، اصلاح:۹۰/۴/۸، پذیرش: ۹۰/۶/۱۶

خلاصه

سابقه و هدف: پریتونیت های قارچی بیماری نسبتا نادری می باشند که با عوارض جدی اعم از ناخوشی و ضریب بالایی از مرگ و میر و حذف تصادفی بیماران از برنامه دیالیز صفاقی همراه می باشند. گونه های کاندیدایی مهمترین عامل مسبب پریتونیت های قارچی در این بیماران محسوب می شوند. هدف از این مطالعه جداسازی گونه های کاندیدا از بیماران مبتلا به عفونت صفاقی به روش ملکولی و سپس تعیین تست حساسیت گونه های ایزوله شده نسبت به داروهای ضد قارچی می باشد.

مواد و روشها: این مطالعه مقطعی طی یکسال نمونه برداری (نمونه های صفاق) از ۲۱۰ بیمار دیالیز صفاقی مشکوک به عفونت صفاق شهر تهران انجام گرفت. شناسایی ایزوله ها از طریق آزمایشات میکروسکوپی مستقیم و کشت بر روی محیط کروم آگار، کورن میل آگار و تست لوله زایا در سرم گاوی، تست اوره آز و شناسایی بیوشیمیایی از طریق کیت API 20 انجام گرفت. گونه های ایزوله شده از طریق روش مولکولی PCR -RFLP تایید گردیدند. تست حساسیت دارویی گونه های کاندیدایی جدا شده به روش میکرودیلوشن براث مطابق با راهنمای استاندارد NCCLS M27 انجام شد.

یافته ها: از مجموع۲۱۰ نمونه بررسی شده ۴۰مورد (۱۹/۰۵٪) براساس آزمایشات پریتونیت میکروبی تشخیص داده شدند که تنها ۹ مورد (۲۲/۵٪) پریتونیت کاندیدایی بود که مطابق با روش مولکولی PCR -RFLP جهت تایید روش های فنوتیپی اشاره شده، تعیین گونه شدند. از ۹ موردکاندیدای جداشده ۵ مورد (۵۵٪) کاندیدا آلبیکنس، ۱ مورد (۱۱٪) کاندیدا کفیر، ۲ مورد (۲۲٪) کاندیدا گیلرموندی و ۱مورد (۱۱٪) کاندیدا پاراپسیلوزیس بودند. MIC برای گونه های آلبیکنس (فلوسیتوزین۲ µg/ml فلوکونازول ۲ µg/ml آمفوتریسین B۰/۱۲۵ µg/ml) برای گونه های گیلرموندی (فلوسیتوزین۴ µg/ml فلوکونازول ۲ µg/ml آمفوتریسین B۱ µg/ml) برای کاندیدا کفیر (فلوسیتوزین۲-۴ µ g/ml فلوکونازول ۰/۵-۱ µg/ml آمفوتریسین B۰/۵-۱µg/ml) و برای گونه پاراپسیلوزیس (فلوسیتوزین0.5 µ g/ml فلوکونازول ۱ µg/ml آمفوتریسین B 0.5 µg/ml) بود.

نتیجه گیری: براساس نتایج این مطالعه شناسایی دقیق گونه های مختلف کاندیدا آلبیکنس و غیر کاندیدا آلبیکانس مسبب پریتونیت های کاندیدایی پس از دیالیز صفاقی ضروری می باشد.

واژه های کلیدی: کاندیدا، پریتونیت، مقاومت دارویی، حداقل غلظت مهارکنندگی، واکنش زنجیره ای پلیمراز- قطعات چندشکلی محدودشونده طولی.

مقدمه

دیالیز صفاقی از روش های درمانی گسترده ای است که تقریبا در ۱۰٪ از بیمارانی که از ناکفایتی کلیه رنج می برند استفاده می شود. مشکل اصلی این روش افزایش خطر ابتلا به عفونت صفاقی (پریتونیت) می باشد (۲و۱). پریتونیت یکی از مهمترین مشکلات اصلی در این بیماران می باشد که با عفونتهای شدید و مکرر می تواند منجر به از دست رفتن صفاق و قطع دیالیز شده و حتی ممکن است به سپتی سمی و احیانا مرگ بیانجامد. پریتونیتهای میکروبی باکتریهای گرم مثبت توسط استافیلوکوکهای کوآ گولاز مثبت، استافیلوکوک اپیدرمیدیس و استافیلوکوک اورئوس ایجاد شده که استافیلوکوس اورئوس بعنوان یک ارگانیسم مهاجم در این بیماران که به درمان مقاومت بیشتری نشان می دهد، مطرح می باشد (۳). باکتریهای گرم منفی نیز از طریق روده سبب ایجاد پریتونیت می گردند که از جمله آنها می توان به عفونت هایی با باکتریهای کمپیلوباکترها، اشرشیاکلی و پریتونیتی پلی میکروبیال، باکتریهای بی هوازی گرم منفی اشاره

▣ این مقاله حاصل پایان نامه مریم علی نژاد دانشجوی کارشناس ارشد میکروبشناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن می باشد.

* مسئول مقاله:
آدرس: تنکابن، صندوق پستی ۵۵۹-۴۶۸۱۵، تلفن: ۰۱۹۲-۴۲۷۱۱۰۵
e-mail: ayat51@yahoo.co.in

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.8.0]

نمود (۵و۴). در مقایسه با پریتونیت های باکتریایی، پریتونیت های قارچی نسبتا نادر هستند. علائم و نشانه های پریتونیت های قارچی با یک پریتونیت باکتریال تفاوتی ندارد این در حالیست که در این بیماران اغلب مصرف قبلی آنتی بیوتیک یا یک حمله اولیه پریتونیت باکتریال وجود داشته است. پریتونیت های قارچی نه تنها با عوارض جدی اعم از ناخوشی بوده، بلکه با ضریب بالایی از مرگ و میر و حذف تصادفی بیماران از برنامه دیالیز صفاقی همراه می باشد. گروهی از پزشکان درمان انتخابی ضد قارچی و سپس برداشت کاتترها را در این حالت توصیه می کنند (۷و۶). گونه های کاندیدا، رایج ترین پاتوژن های قارچی ایزوله شده از پریتونیتهای قارچی می باشند. فراوانی گونه های متفاوت کاندیدا در این مورد بسیار متنوع و بین ۱۰۰-۷۵٪ از موارد پریتونیت های قارچی می باشد (۸). پریتونیت های کاندیدایی یکی از رایج ترین اشکال کاندیدیازیس در بخش مراقبت های ویژه به دنبال جراحی های داخل شکمی می باشد. گونه های کاندیدا بخشی از فلور نرمال ناحیه شکم و روده در این اشخاص می باشند، لذا ایزوله شدن آنها از مایعات خروجی شکمی بیماران یا در نتیجه دستکاری دستگاه گوارش و یا به دنبال زخم هایی که پس از جراحی حاصل می شوند، تعجب آور نیست (۵و۲). البته علاوه بر نوع آلبیکنس گونه تروپیکالیس نیز می تواند عامل پریتونیت ناشی از کاتتر در این بیماران باشد (۱۰و۹).

موارد شیوع کاندیدا آلبیکنس در پریتونیت قارچی غالب بوده ولی در بعضی از گزارشات موارد شیوع کاندیدیازیس مهاجم در این بیماران در تغییر شیفت به سوی کاندیداهای غیرآلبیکنس از جمله کاندیدا پاراپسیلوزیس را می توان اشاره نمود. وجود هر نوع فاکتور زمینه کلاسیک مثل دیابت، سبب تضعیف سیستم ایمنی و توسعه عفونت کاندیدایی در پریتونیت های ناشی از کاندیدا می شود (۱۲و۱۱). در هر صورت ارگانیسم های اخیر به داروهای ضد قارچی متداول به ویژه ترکیبات آزول مانند فلوکونازول حساسیت متفاوتی نشان می دهند. ممکن است، در آینده ای نه چندان دور بتوان کاندیدا را به عنوان پاتوژنهای قابل توجه به لحاظ فوریت های تشخیصی، به شمار آورد (۱۴و۱۳). با اینحال در اکثریت موارد بروز پریتونیت به علت حضور باکتری های پاتوژن و تعداد کم گونه های کاندیدا، شناسایی زود هنگام ایزوله های کاندیدا در سطح گونه جهت شروع درمان های ضد قارچی و تسهیل کنترل عفونت های بیمارستانی ضروری است. جهت درمان این بیماران انجام تستهای حساسیت برای شناسایی ایزوله های مقاوم و حساس به آزولها و آمفوتریسین B با استفاده از روشهای استاندارد جهت قضاوت روشهای درمانی الزامی است (۱۵و۶). روش های متعددی تاکنون برای تعیین هویت مخمرها بخصوص کاندیدا به کار رفته است. روشهای فنوتیپی با استفاده از دیسک های قندی و کیتهای تجارتی مثل API و بالاخره روش های جدید خودکار مثل سیستم vitek، روش های سرولوژی سیستم تجارتی Candida chek و روش های ژنوتیپی نیز متنوع بوده از جمله آن می توان به استفاده از پرایمرهای اختصاصی در Multiplex PCR, PCR، استفاده از پروبهای اختصاصی هرگونه (Poly Chain Reaction, PCR) (Restriction Frgment Length Polymorphism, RFLP) جهت تعیین توالی ژنی ناحیه خاص و Real – time PCR اشاره نمود .تمام روشهای فوق الذکر مفید بوده و هرکدام مزایا و معایب خاص خود را دارند. بعضی قادر به شناسایی تعداد محدودی از گونه های کاندیدایی مثل کروم اگار و کاندیدا چک بوده و بعضی علی رغم قابلیت شناسایی دامنه وسیعی از مخمرها، وقت گیر و کاربر مثل روش های جذب و تخمیر قندها می باشند. بعضی از روشها با وجود کارایی، اعتبار کافی و قابلیت شناسایی وسیع مخمرها، بسیار گرانقیمت و غیر قابل کاربرد روزمره در آزمایشگاههای قارچ شناسی مثل سیستم Sequencing,vitek هستند. برخی نیز با حساسیت بالا مثل استفاده از پروبهای طراحی شده برای شناسایی هرکدام از گونه ها ویژگی کمتری دارند. در مطالعه حاضر رویکرد مبتنی بر تقویت اسیدهای نوکلئیک ناحیه rDNA، از (Polymerse Chain Reaction, PCR) و پلی مرفیسم حاصل از تاثیر آنزیم ها ی محدودالاثر (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) برای شناسایی کاندیداهای مهم پاتوژن ایزوله شده از بیماران استفاده گردیده است (۱۶). امروزه به علت کشف داروها و ترکیبات ضد قارچی جدید از یک سو و مشاهده مقاومت پاره ای از عوامل قارچی نسبت به برخی از داروها مانند فلوسیتوزین و امفوتریسینB و همچنین افزایش میزان بروز عفونتهای قارچی و استفاده از داروهای ضد قارچی مختلف از طرف دیگر بیش از پیش نیاز به آزمایش تعیین حساسیت داروئی جهت قارچها احساس می شود و انجام آزمایشات برای تعیین حساسیت عامل بیماری نسبت به داروهای ضد قارچی در کلیه این بیماران ضروری به نظر می رسد (۱۷و۱۶).

از آنجائیکه در ارتباط با حساسیت های کاندیدای جدا شده از بیماران دیالیز صفاقی در ایران اطلاعاتی در دست نمی باشد و تاکنون هیچ بررسی در این خصوص صورت نگرفته، لذا اولین بار در این مطالعه با سنجش حساسیت دارویی کاندیداهای جدا شده از این بیماران با استفاده از روش کشت و تایید ملکولی گونه ها، اقدام شد تا قدمی در شناسایی و چگونگی حساسیت ایزوله های ایرانی کاندیدایی پریتونیتهای قارچی برداشته و بدین وسیله سهم کوچکی در ارتقای سلامت جامعه داشته باشیم.

مواد و روشها

این مطالعه مقطعی که طی یک دوره زمانی دوازده ماهه از اردیبهشت ۸۸ الی اردیبهشت ۸۹ انجام گرفت، تعداد۲۱۰ نمونه مایع دیالیز صفاقی از بیمارانی که از طریق صفاق دیالیز می شدند و مشکوک به پریتونیت قارچی بودند انتخاب گردیدند که ۱۰۰ نمونه آنها از بیمارستان های امام خمینی، شریعتی، مدرس و کلینیک شفای تهران و ۱۱۰مورد دیگر نیز از طریق نمونه گیری منزل به منزل در حضور پرستار حاضر بر بالین بیماران و در نهایت رعایت شرایط استریل داخل سرنگ ها جمع آوری گردیدند. برای هر بیمار پرسشنامه ای تکمیل گردید. نمونه ها به آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشکده بهداشت دانشگاه تهران منتقل و مورد بررسی قرار گرفتند. سپس بر روی یک بخش از نمونه ها آزمایش میکروسکوپی مستقیم انجام شد و بقیه نمونه ها بر روی محیط های سابورد دکستروز آگار فاقد سیکلوهگزیمید و حاوی کلرامفنیکل Sodium (Dodecyl Sulfate, SDA)، کورن میل آگار، کروم آگار کشت داده و در نهایت جهت انجام آزمایش جذب قندها (اگزانوگرافیک) با استفاده از کیت API20CAUX در محیط Beaf Extrac Agar تحت بررسی قرار گرفتند. شناسایی و افتراق گونه های مخمری ایزوله شده در محیط کشت سابورد براساس PCR-RFLP انجام گرفت (۱۸). این روش بسیار ساده و سریع و مطمئن و موثر جهت افتراق ایزوله های کلینیکی کاندیدای جدا شده از بیماران

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.8.0]

می باشد بنابراین دارای حساسیت بالاست. DNA همه نمونه ها به روش Glass bead و فنل کلروفرم استخراج شدند. در این مرحله جهت استخراج DNA یک لوپ باکتریولوژی حدود ۱۰میلی متر مکعب از کلنی تازه برداشت و به تیوپ ۱/۵ میلی متری اپندرف منتقل و۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز شامل ۱۰۰ میلی مولار تریس EDTA pH=۱۰/۸ و ۱۰۰ میلی لیتر نمک طعام و ۱٪ SDS و تریتون X-۱۰ و۳۰۰ میکرولیتر مخلوط فنل کلروفرم ۱:۱ و حدود ۲۰۰ میکرولیتر پرل های شیشه ای bead glass به قطر ۱میلی لیتر اضافه گردید و مدت ۳ دقیقه با دست به شدت تکان داده شد. آنگاه ۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفوژ و مایع رویی به تیوب جدید منتقل شد و ۴۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و پس از سانتریفوژ مجدد و انتقال مایع رویی به تیوب جدید مقدار یک حجم ایزوپروپانول سرد و ۱٪ حجم استات سدیم ۳ مولار PH=۸ اضافه و پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در ۲۰- درجه سانتیگراد، به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شده و پس از شستشوی رسوب حاصله با الکل ۷۰ درجه نهایتا در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردیده تا موقع استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شود. برای انجام موفق PCR پس از انجام آزمایش های متعدد سرانجام مواد زیر با غلظت های ذکر شده برای انجام یک واکنش ۲۵ میکرولیتری استفاده گردید. بافر PCR (۲/۵میکرولیتر) و پرایمرهای رفت (Intra Transcribed Spacer, ITS) ۳و۱ و پرایمرهای برگشت ۴و۲ ITS, ۲۵ پیکومول و ۲۰۰ میکرومولار dNTP و آنزیم polymerase DNA tag ۱/۲۵ واحد و DNA الگو ۱ میکرولیتر (حدود ۱۰نانوگرم) آب مقطر دیونیزه به حجم لازم تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر بود. برنامه اجرا شده برای PCR عبارت از حرارت ۹۵ درجه به مدت ۶ دقیقه یک سیکل برای دناتوراسیون اولیه و ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۵۶ درجه بمدت یک دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و جمعا ۳۰ سیکل برای تکثیر DNA و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه و یک سیکل به منظور تفکیک قطعات DNA. با آگاهی از اندازه محصول PCR و نیز قابل رنگ آمیزی و قابل رویت کردن آنها هر کدام از محصولات PCR روی ژل آگارز الکتروفورز شدند.

RFLP: ۵ میکرولیتر از محصولات PCR را با ۱/۵میکرولیتر Restriction enzyme buffer و ۰/۵ میکرولیتر Restriction enzyme cfoI و ۸ میکرولیتر HPLC grade water به خوبی مخلوط کرده و به مدت ۲ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد.

الکتروفورز: ۵ میکرولیتر از محصولات PCR یا RFLP به مدت ۴۵ دقیقه الی یک ساعت با ولتاژ ۸۰ الی ۱۰۰ ولت الکتروفورز شد. برای محصولات PCR از آگارز ۱/۵٪ و برای محصولات RFLP از آگارز ۲٪ استفاده گردید. یکی از چاهک های ژل به مارکر اختصاص داده شد. برای الکتروفورز نیازی به Loading Buffer نیست و محصولات PCR مستقیما به چاهک ها اضافه شدند. گونه های مخمری با توجه به الگوی الکتروفورتیک حاصله و با در نظر گرفتن اندازه های بدست آمده از آنالیز سکانس ها تشخیص داده می شدند. این روش برای شناسایی گونه های مهم شناخته شده مخمرها جنس کاندیدا و مبتنی بر تقویت اسیدهای نوکلئیک ناحیه rDNA با استفاده از PCR وآن گاه پلی مرفیسم حاصل از تاثیر آنزیم های محدودالاثر (RFLP) طراحی شده بود. اعتبار این سیستم قبلا مورد آزمون قرار گرفته و با استفاده از این مجموعه، تست ها به صورت ساده دقیق و سریع قابل اجرا شد (۱۶و۱۵). تست حساسیت دارویی با استفاده از روش Broth Microdilution و مطابق با روش استاندارد NCCL M27 A انجام گرفت. جهت بررسی MIC از داروهای فلوکونازول، آمفوتریسین B و ۵-فلوروسیتوزین استفاده گردید. رقت های سریالی از داروهای ذکر شده طبق دستورالعمل استاندارد تهیه گردید. سپس۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۲ برابر دارویی مورد نظر را بدرون حفرات ۱ تا۱۰ میکروپلیت های مسطح توزین کرده به طوریکه حفره اول مشتمل بر بیشترین غلظت دارو وحفره ۱۰حاوی کمترین غلظت دارو باشد (۱۹). سپس به هریک از حفره ها ۱۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی مخمری با غلظت ۲ برابر اضافه شد و بدین ترتیب اینها ۱:۱رقیق شده و به غلظت نهایی لازم رسیدند، حفره کنترل رشد بعد از حفره ای که کمترین غلظت دارویی را داشت در نظر گرفته شد. این حفره حاوی ۱۰۰میکرولیتر از محیط کشت بدون دارو و۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری بود و به عنوان ملاکی جهت مقایسه رشد با سایر حفرات از آن استفاده شد. همچنین یکی از حفرات به عنوان شاهد یعنی حاوی محیط ولی فاقد دارو و ارگانیسم در نظر گرفته شد. میکروپلیت ها در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. مشابه مراحل ذکر شده فوق از تهیه سوسپانسیون مخمری تا انجام تست برای هر یک از ایزوله های رفرانس حساس و مقاوم به آزول و حساس به سایر داروهای ضد قارچی نیز انجام گرفت و نتایج به دست آمده به عنوان استاندارد جهت قضاوت در مورد تعیین MIC (Minimum inhibitory concentration) کاندیداهای جدا شده از بیماران اعم از آلبیکنس و غیر آلبیکنس به داروهای مورد آزمایش استفاده گردید. پایینترین غلظت دارویی مربوط به حفره ای است که قارچ بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در آن رشد قابل مشاهده ای ندارد. میزان رشد در مقایسه با حفره کنترل رشد که فاقد هرگونه دارو بوده و همچنین با حفره شاهد بدون دارو و ارگانیسم سنجیده شد، خواندن نتایجMIC با استفاده از آینه به راحتی ممکن بود (۲۰-۱۸). داده های با استفاده از تست مجذورکای X^2 تجزیه و تحلیل و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

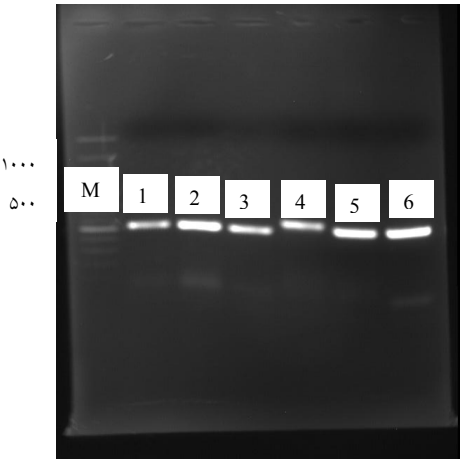
در این مطالعه از ۲۱۰ فرد مورد مطالعه ۱۱۳ نفر (۵۳/۸٪) را مردان و ۹۷ نفر (۴۶/۲٪) را زنان تشکیل دادند. تمام بیماران دارای بیماریهای زمینه ای از جمله فشار خون، نارسایی کلیه، پیوند کلیه، دیابت، سندرم نفروتیک و غیره بودند که در بین آنها دیابت با ۱۲۵ مورد (۵۹/۵٪) بیشترین درصد را شامل شدند. بیماری در تمام گروههای سنی با دامنه ۱ الی ۹۰ ساله مشاهده گردید که گروه سنی ۷۰-۶۰ ساله با ۵۸ مورد (۲۷/۶۲٪) بیشترین گروه سنی درگیر بیماری بودند. از ۲۱۰ نمونه مایع صفاق بررسی شده تنها ۴۰ مورد (۱۹/۰۵٪) از آنها براساس علائم بالینی، آزمایشات مستقیم و کشت به لحاظ پریتونیت میکروبی (اعم از موارد باکتریال و قارچی) مثبت و بقیه یعنی ۱۷۰ مورد (۸۰/۹۵٪) دیگر منفی بودند. از موارد پریتونیت میکروبی مثبت فوق ۲۷ مورد (۶۷/۵٪) را مردان و۱۳ مورد (۲۲/۵٪) را زنان تشکیل دادند. ارتباط معنی داری میان بروز انواع پریتونیت های میکروبی و جنسیت بیماران وجود نداشت. با توجه به آزمایشات مستقیم، کشت و ملکولی از بین ۴۰ مورد پریتونیت میکروبی، ۹ مورد (۲۲/۵٪) پریتونیت کاندیدایی، ۳۱ مورد (۷۷/۵٪) پریتونیت باکتریایی تشخیص داده شدند

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.8.0]

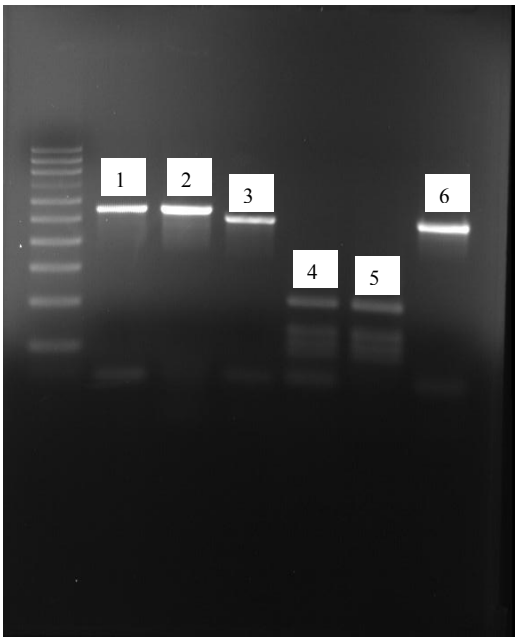
که از ۹ مورد مثبت پریتونیت کاندیدایی ۶ نفر را مردان و ۳ نفر دیگر را زنان تشکیل دادند (جدول ۱). هر ۹ مورد مخمر کاندیدایی مشاهده شده در آزمایشات مستقیم، تماما با موفقیت PCR شدند اما فقط ۷ مورد آنها با تکنیک RFLP تعیین گونه شدند و ۲ مورد از آنها به دلیل تشکیل باندهای بسیار ضعیف محصولات PCR با تکنیک RFLP شناسایی نشدند (شکل ۱ تا ۳) اما سایز باندی مشابهی با کاندیدا آلبیکنس داشتند به منظور شناسایی دقیقتر و تعیین هویت گونه های کاندیدای غیر آلبیکنس از روش API استفاده شد. کاندیدا آلبیکانس با ۵ مورد (۵۵/۵٪) بیشترین درصد و کاندیدا موندی با ۲ مورد (۲۲/۵٪)، کاندیدا کفیر و کاندیدا پاراپسیلوزیس نیز هر کدام با یک مورد (۱۱٪) کمترین درصد ایزوله های کاندیدایی جدا شده را به خود اختصاص داده بودند (شکل ۱ تا ۳). نتایج بررسی حساسیت دارویی با MIC۵۰ و MIC ۹۰ گونه های کاندیدایی جدا شده فوق از پریتونیت قارچی با روش میکرودیلوشن براث (NCCLS M-27) در این بیماران بیانگر این مطلب بود که دامنه MIC۵۰ و MIC ۹۰ بدست آمده برای فلوکونازول و آمفوتریسین B و ۵- فلوروسیتوزین آنها در دامنه MIC گونه های رفرنس قرار داشتند (جدول۲). برای تعیین MIC کلیه آزمایش ها به صورت داپلیکیت (سری۲ تایی) برای هر ارگانیسم و هر دارو انجام پذیرفت.

جدول ۱. مقایسه نتایج آزمایشات مستقیم، کشت و روشهای مولکولی حاصله از نمونه های مثبت پریتونیت ایزوله شده از بیماران دیالیز صفاقی مورد بررسی (۸۹-۸۸)

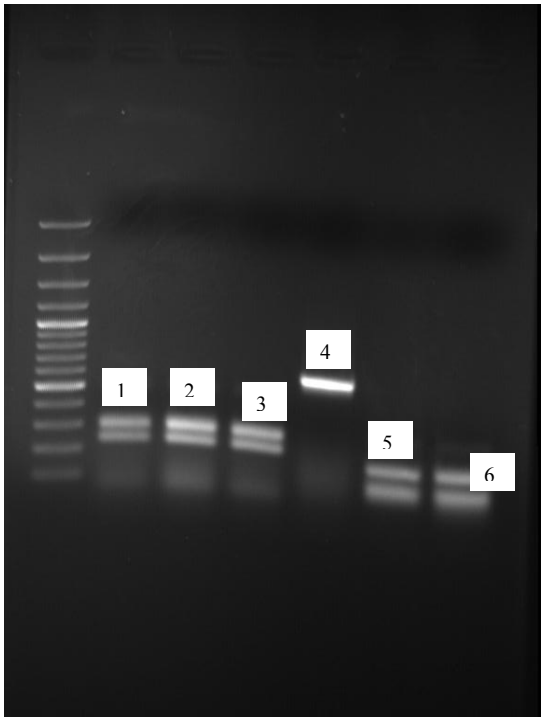
نوع آزمایش / نوع پریتونیت	آزمایش مستقیم	کشت مثبت	PCR	RFLP
پریتونیت قارچی	۹	۷	۹	۷
پریتونیت باکتریایی	۳۱	۳۳	۳۱	۳۳
جمع	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰



شکل ۱. الکتروفورزمحصولات PCR ۳ گونه کاندیدا. شماره های ۱- ۶ بترتیب برایکاندیداآلبیکنس، کاندیداآلبیکنس، کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گیلرموندی، کاندیدا گیلرموندی، ردیف M مارکر مولکولی پذیرفت



شکل ۲. PCR- RFLP، ۳ گونه کاندیدا. خط ۱-۳PCR Product، کاندیدا گیلر موندی، کاندیدا گیلر موندی، کاندیدا کفیر، خط ۴ -۶ بترتیب RFLP گونه های کاندیدا، کاندیدا گیلر موندی، کاندیدا گیلر موندی، کاندیدا کفیر را نشان می دهد، ردیف M مارکر مولکولی



شکل۳. برش آنزیمی محصولات PCR گونه های کاندیدا با آنزیم MSP I، خط ۱-۶ به ترتیب: کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گیلرموندی، کاندیدا گیلرموندی، ردیف M مارکر مولکولی

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.8.0]

جدول ۲. نتایج تست حساسیت داروهای ضد قارچی (MIC) از ۹ مورد کاندیدای ایزوله شده درپریتونیت کاندیدایی بیماران دیالیز صفاقی مورد با روش استاندارد (NCCLS M-27)

گونه های کاندیدایی ایزوله شده	داروهای ضد قارچی	دامنهMIC برحسب µg/ml	MIC۵۰ µg/ml	MIC90 µg/ml
کاندیدا آلبیکنس	فلوکونازول	۰/۱۲۵-۰/۶۴	۰/۵	۲-۴
(۵ مورد)	آمفوتریسین B	۰/۳۱۳-۱۶	۰/۰۳۱۳	۰/۰۱۲۵-۱
	۵-فلوروسیتوزین	۰/۱۲۵-۶۴	۰/۵	۲-۸
کاندیدا گیلرموندی	فلوکونازول	۰/۱۲۵-۰/۶۴	۰/۵	۰/۵-۲
(۲ مورد)	آمفوتریسین B	۰/۰۳۱۳-۱۶	۰/۲۵	۰/۵-۱
	۵-فلوروسیتوزین	۰/۱۲۵-۶۴	۱	۰/۵-۴
کاندیدا پاراپسیلوزیس	فلوکونازول	۰/۱۲۵-۰/۶۴	۰/۲۵	۰/۵-۱
(۱ مورد)	آمفوتریسین B	۰/۰۳۱۳-۱۶	۰/۲۵	۰/۵-۱
	۵-فلوروسیتوزین	۰/۱۲۵-۶۴	۱	۰.۵ -۴
کاندیدا کفیر	فلوکونازول	۰/۱۲۵-۰/۶۴	۰/۲۵	۰/۵-۱
(۱ مورد)	آمفوتریسین B	۰/۰۳۱۳-۱۶	۰/۲۵	۰/۵-۱
	۵-فلوروسیتوزین	۰/۱۲۵-۶۴	۱	۰/۵-۴

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق از ۲۱۰ نمونه مایع صفاق بیمارانی که دیالیز صفاقی شدند تنها ۴۰ مورد از آنها براساس علائم بالینی و انجام آزمایشات کشت و مستقیم پریتونیت بودند که فقط ۹ مورد از آنها در آزمایشات مستقیم از نظر وجود عناصر قارچی مثبت بودند. از این ۹ نمونه، تنها ۷ مورد کاندیدا از کشت جداگردید، پس از انجام PCR نیز هر ۹ نمونه هم از کشت مثبت نمونه ها و هم به طور مستقیم از طریق استخراج DNA کاندیدا از خود مایع صفاقی که در آزمایشات مستقیم به لحاظ حضور عناصر قارچی مثبت بودند، جداسازی انجام گرفت. طی مطالعاتی که از طرف انجمن بین المللی بیماران دیالیزی بر روی بیمارانی که دیالیز صفاقی انجام می دادند صورت گرفت، مشاهده شد که ۰/۰۵٪ از این بیماران به دنبال بروز پریتونیت شیفت به همودیالیز داشتند. شیوع پریتونیت در سال اول در این افراد که از مشکلات مربوط به کاتتر می باشد ۴/۲٪ پریتونیت های مربوط به نشتی مایع دیالیز ۳/۹٪ و میزان شیوع پریتونیت به علت مشکلات روحی در این افراد ۲/۶٪ بود (۲۱و۱۳). در حدود ۰/۰۲- ۰/۰۱ از موارد پریتونیتیس به دنبال دیالیز داخل صفاقی در ماه گزارش شده که ۱۰-۲٪ از این موارد پریتونیتیس مربوط به گونه های کاندیدا می باشد.

مطالعات نشان می دهد که عفونت های ناشی از کاندیدا و به ویژه آلبیکنس، تروپیکالیس، پاراپسیلوزیس، گلابراتا و غیره گزارش شده است (۱۷و۱۶). در این مطالعات ابتدا استرین های کاندیدای جدا شده از مایعات صفاقی بیماران با روش های آزمایشات مستقیم و کشت تعیین هویت شدند. از طرفی به علت مشخصات فنوتیپی یکسان برخی از گونه های کاندیدا از جمله کاندیدا دابلینسیس با آلبیکنس از روشهای تشخیصی دیگر از جمله روش های مولکولی نیز بهره گرفته شد، لذا جهت اطمینان از شناسایی صحیح نوع کاندیدای ایزوله شده در این مطالعه از تکنیک PCR-RFLP کمک گرفته و در نهایت به انجام تست حساسیت دارویی در آنها پرداخته شد (۲۳و۲۲). جهت شروع درمان انواع پریتونیتها (اعم از باکتریایی و قارچی)، شناسایی عامل ایجاد کننده پریتونیت اولین قدم برای شروع درمان و اقدامات درمانی صحیح می باشد. لذا حتما باید آزمایشات مستقیم و کشت و روش های شناسایی مولکولی در کنار یکدیگر انجام گیرند تا به انجام تست حساسیت های دارویی در آنها پرداخت. شناسایی گونه های مختلف کاندیدا از یکدیگر از روی مشخصات ظاهری کلنی در محیط کشت به هیچ عنوان امکان پذیر نبوده و نیاز به آزمایشات تکمیلی دارد. به همین جهت کلنی های جدا شده بر روی محیط کورن میل آگار توئین ۸۰ کشت داده شد. برخی استرین های کاندیدا آلبیکنس بیشتر از ۲ روز بر روی محیط کورن میل آگار توئین ۸۰ (CMA-T80) باید بمانند تا تولید کلامیدوسپور کنند، لذا پلیت ها را بیشتر از ۴۸ ساعت باید نگهداری کرد. با توجه به رعایت شرایط فوق در مطالعه اخیر از ۷ نمونه ای که به لحاظ کشت کاندیدا مثبت شدند، ۳ مورد از آنها کاندیدا آلبیکنس و ۴ مورد دیگر نیز گونه های دیگری از کاندیدا (گیلرموندی، پاراپسیلوزیس، کفیر) بودند. لذا جهت تمایز گونه های ارگانیسم از یکدیگر استفاده از تستهای تکمیلی دیگری نیز ضروری می باشد در روش کشت اخیرا گزارش هایی مبتنی بر استفاده از محیط کروم آگار کاندیدا به عنوان یک محیط افتراقی در تشخیص گونه های مختلف کاندیدا مشاهده می شود، رنگ کلنی ها براساس واکنش آنزیم – سوبسترا که برای هرگونه اختصاصی می باشد، متنوع است (۲۲).

نتایج کشت ۴ گونه از کاندیدا بر روی این محیط نشان داد که کاندیدا آلبیکنس بر روی این محیط کلنی های سبز- آبی و کاندیدا کفیر کلنی های سفید – صورتی و کاندیدا پاراپسیلوزیس نیز بر روی این محیط کلنی های بنفش – صورتی و کلنی های مربوط به ۲ مورد از کاندیدا گیلرموندی جدا شده از محیط کشت سابرو دکستروز آگار بر روی این محیط کلنی های کرم – بنفش ایجاد

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.8.0]

کردند. روش های تکمیلی دیگری که در کنار روش های کشت فوق الذکر انجام گرفت استفاده از کیت API 20 AUX جهت تایید، تعیین هویت گونه های شناخته شده با روش های کشت ذکر شده در بالا می باشد. کیت API برای تشخیص سریع مخمرهای شایع و نادر روش با ارزشی است (۱۷). در این مطالعه تنها به روش های کشت جهت شناسایی ایزوله های مخمری از بیماران بسنده شد و رویکرد جدیدی از متدهای مبتنی بر DNA برای شناسایی کاندیداهای مهم پاتوژن ایزوله شده از بیماران به کار گرفته شد. این روش برای شناسایی گونه های مهم و شناخته شده مخمرهای جنس کاندیدا و مبتنی بر تقویت اسیدهای نوکلئیک ناحیه rDNA با استفاده از PCR و آنگاه پلی مرفیسم حاصل از تاثیر آنزیم های محدودالاثر (RFLP) می باشد. این روش بسیار ساده، سریع دقیق و قابل اجرا می باشد. الگوهای RFLP تولید شده برای هر گونه کاندیدا کاملا اختصاصی است. کاندیدا آلبیکنس به عنوان شایعترین گونه ها و به دنبال آن کاندیدا پاراپسیلوزیس، تروپیکالیس، گلابراتا، کروزوئی با کمک این روش شناسایی می شوند.

در مطالعه حاضر نتایج حاصل از PCR-RFLP جهت شناسایی ایزوله های کلینیکی از بیماران با نتایج حاصل از کشت نمونه ها بر روی محیط کروم اگار مقایسه و تایید می شوند. دانشمندان با استفاده از ۶ آنزیم، روشی را برای تمایز ۱۲مخمر شناخته شده کلینیکی در سطح گونه از طریق تکثیر زیر واحدهای کوچک 18SRNA ریبوزومی و شناسایی گونه های کاندیدا توسط PCR-RFLP به کار بردند در تمام این مطالعات گونه های کاندیدا توسط این روش متمایز می شوند (۱۸و۱۶). اما در مطالعه اخیر تنها با استفاده از یک آنزیم برشی MSPI محصولات تکثیری PCR هر ۴ گونه کاندیدا که دلیل اصلی بروز بالای ۹۵٪ از عفونت ها هستند، شناسایی می شوند. این آنزیم الگوهای برشی خاص هرگونه را ارائه می کند. علاوه براین نتایج حاصل از آنالیز PCR-RFLP ایزوله های کلینیکی مورد آزمایش قابل مقایسه با نتایج نمونه های کشت شده بر روی محیط کروم آگارکاندیدا می باشد. متاسفانه برش آنزیمی کاندیدا آلبیکنس وکاندیدا دابلینسیس با MSPI الگوهای الکتروفوریک مشابهی داشته و به آنزیم دیگری نیز جهت تمایز این ۲ گونه نیازمند بودیم. در مطالعه حاضر آنزیم برشی MSPI جهت دستیابی به بهترین الگوهای طولی مختص هرگونه انتخاب شد. برش در نواحی ITS گونه های متفاوت کاندیدا توسط MSPI باندهایی با سایز های مختلف تولید می کند. این باندها در مورد کاندیدا آلبیکنس، گلابراتا، تروپیکالیس، کروزوئی ۲ عدد و در مورد کاندیدا گیلرموندی سه عدد می باشد. اما هیچ جایگاه شناسایی جهت برش در ناحیه ITS توسط MSPI برای کاندیدا پاراپسیلوزیس گزارش نشده است. لذا محصول PCR و محصولات برشی حاصل برای آن سایز مشابهی خواهند داشت. بنابراین پس از تکثیر ناحیه rDNA قارچی توسط پرایمرهای همگانی ITS1,ITS4 و برش آنزیمی محصولات PCR توسط آنزیم برشی MSP I قطعاتی با سایزهای مختلف تولید می شوند که تعداد این قطعات در مورد آلبیکنس ۲ عدد و در مورد گیلرموندی ۳ عدد می باشد اما هیچ جایگاه شناسایی برای کاندیدا پاراپسیلوزیس وکفیر وجود نداشت محصولات PCR و برش آنزیمی آنها سایز مشابهی داشتند از آنجائیکه وزن مولکولی نمونه شماره ۴ تقریبا به کاندیدا پاراپسیلوزیس نزدیک بود و آزمایشات تاییدی کشت بر روی محیط سابرودکستروز آگار و ایجاد کلنی های چروکیده توسط پاراپسیلوزیس در این محیط و تولید رنگ صورتی و بنفش بر روی محیط کروم آگار در دمای ۳۷ درجه پس از ۴۸ ساعت موید این مطلب بود زیرا کلنی های کاندیدا کفیر در محیط های فوق به شکل موکوئیدی و سفید تا صورتی می باشد. نتایج به دست آمده در این بررسی نشان داد که کاندیدا آلبیکنس با فراوانی ۵۵/۵٪ و کاندیدا گیلر موندی با فراوانی ۲۲/۵٪ به ترتیب ارگانیسم های غالب جدا شده در ایجاد پریتونیت های قارچی بودند. کاندیدا کفیر و کاندیدا پاراپسیلوزیس نیز هر کدام با فراوانی ۱۱٪ در مرتبه سوم قرار گرفتند. برای بررسی حساسیت دارویی از روش استاندارد Broth Microdillution در این مطالعه مطابق روش NCCLS M27A از محیط RPMI 1640 استفاده گردید (۱۵). تهیه این محیط کشت نیازمند بافری می باشد که فاقد اثرات آنتا گونیستی با داروهای ضد قارچی باشد. یکی از بافرهایی که اثر رضایت بخشی بر روی داروهای ضد قارچی دارد بافر MOPS یا ۱۳ N-morpholin propansulfonic acid می باشد که برای PH=7 غلظت۱-mol l ۰/۱۶۵ باید داشته باشد. در انجام تست حساسیت دارویی سوسپانسیون مخمری مورد آزمایش را با استفاده از سه روش، شمارش با هموسیتومتر، اسپکتروفتومتر، کدورت سنجی چشمی می توان فراهم کرد. در بین سه روش فوق شمارش با لام هموسیتومر از دقت به مراتب بیشتری برخوردار می باشد. جهت بررسی فعالیت و پتانسیل تأثیر داروهای ضد قارچی روشهای مختلفی وجود دارد از آنجمله می توان به دیسک دیفیوژن آگار، میکرودیلوشن براث، رقت اگار اشاره کرد که هر کدام از این روش ها از معایب و مزایای خاص برخور دارند (۱۹و۱۵).

روش استفاده از Semisolid agar dilution به منظور بررسی حساسیت دارویی توصیف شده ولی روش Microdilution در مقایسه با این روش ارزانتر و بهتر می باشد زیرا انجام روش Semisolid agar هم مشکلتر می باشد و هم اینکه بیشتر برای بررسی حساسیت دارویی کپکها مورد استفاده می شود (۱۲). Barchiesif و همکاران نتایج مشابهی را میان دو روش Macro dilution و Micro dilution در مطالعه اثر فلوکونازول و آمفوتریسین ب و فلو سایتوزین بر روی تعداد زیادی از ایزوله های مخمری رؤیت کردند (۱۹). انجمن بین المللی تعیین حساسیت دارویی دریافتند که روش Microdilution با محیط کشت RPMI 1640 نتایج MIC قابل اطمینانی را نشان می دهد. این روش در مقایسه با Agar dilution از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه می باشد روش Micro dilution، روش استاندارد توصیه شده توسط NCCLS M27A می باشد (۱۵). بدلیل مزایای ذکر شده در مطالعات مختلف و نیز دسترسی به مواد مورد لزوم این روش در بررسی حاضر از آن استفاده شد. تشخیص نهایی و قطعی گونه های کاندیدا فقط بر اساس ویژگی های فنوتیپی مختلف ممکن می باشد اما استفاده از یک تست به تنهایی برای این منظور کافی نمی باشد، لذا شناسایی دقیق گونه های کاندیدای آلبیکنس و غیر آلبیکنس مسبب پریتونیت های کاندیدایی در افرادی که دیالیز صفاقی انجام می دهند، ضروری می باشد. لذا آزمایشگاههای تشخیص طبی نیازمند افزایش قابلیت های خود جهت تشخیص سریع این مخمرها با تکیه بر روش های مولکولی ساده و معتبر و ارزان با حساسیت بالا می باشند. علاوه بر اینکه حساسیت این میکروارگانیسم در مقابل داروهای ضد قارچی مختلف متغیر بوده ولی مشکلاتی را در درمان بیماران ایجاد می نماید، لذا ارزیابی حساسیت دارویی کلیه کاندیداهای ایزوله شده از این بیماران نسبت به سایر داروهای ضد قارچی موجود در ایران و سایر جوامع پیشنهاد می شود. Pfaller و همکاران

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.8.0]

الگوی زمینه ای توزیع ایزوله های حساس و مقاوم به داروی مخمرهای کاندیدا را ارائه کرده اند، در این مطالعه هدف، بررسی حداقل غلظت های مهار کنندگی ۳ داروی فلوکونازول وامفوتریسین B و ۵ فلوسیتوزین در گونه های کاندیدا اعم از آلبیکنس وغیر آلبیکنس در بیمارانی که دیالیز داخل صفاقی انجام می دادند، بود (۲۴). کمیته بین المللی استانداردهای آزمایشگاهی بالینی روش دیلوشن براث M-۲۷ را در آزمایشگاههای تشخیصی به عنوان روش منبع برای تست حساسیت ضد قارچی مخمرهای پاتوژن مطرح کرده اند ولی استفاده از آنها نیاز به زمان زیادی دارد، در این مطالعه با تکیه بر تکنیک MIC حساسیت به داروهایی مانند فلوکونازول و آمفوتریسین B ,۵ فلوسیتوزین بررسی شد (۲۵و۱۵). تمام گونه های ایزوله شده نسبت به داروهای ضد قارچی آمفوتریسین B، فلوکونازول، ۵- فلوسیتوزین حساس بوده و دامنه ۵۰ و MIC۹۰ بدست آمده برای گونه های ایزوله شده در مقایسه با MIC این داروها برای گونه رفرنس نشان می دهد که تمام موارد ایزوله شده (۱۰۰٪) در دامنه MIC رفرنس جای می گرفتند (۲۶). بنابراین میتوان از این تحقیق نتیجه گرفت از آنجائیکه تشخیص نهایی و قطعی گونه های کاندیدا فقط بر اساس ویژگی های فنوتیپی مختلف ممکن می باشد، اما استفاده از یک تست به تنهایی برای این منظور کافی نمی باشد، لذا شناسایی دقیق گونه های کاندیدای آلبیکنس و غیر آلبیکنس مسبب پریتونیت های کاندیدایی در افرادی که دیالیز صفاقی انجام می دهند، ضروری می باشد و آزمایشگاههای تشخیص طبی نیازمند افزایش قابلیت های خود جهت تشخیص سریع این مخمرها با تکیه بر روش های مولکولی ساده و معتبر و ارزان با حساسیت بالا می باشند. زیرا شناخت بهتر این عوامل پاتوژن برای درک روابط انگل - میزبان و برای درک پاتوژنز و سپس کنترل موارد کاندیدایی پریتونیت ضروری می باشد. علاوه بر اینکه حساسیت این میکروارگانیسم در مقابل داروهای ضد قارچی مختلف متغیر بوده و مشکلاتی را در درمان بیماران ایجاد می نماید، لذا ارزیابی حساسیت دارویی کلیه کاندیداهای ایزوله شده از این بیماران نسبت به سایر داروهای ضد قارچی موجود در ایران و سایر جوامع پیشنهاد می شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از زحمات کلیه کارشناسان و مسئولان آزمایشگاههای قارچ شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی ملکولی دانشکده بهداشت دانشگاه تهران که در انجام این تحقیق مارا یاری کردند، تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.8.0]

Drug Resistance of Candida Species Isolated from Fungal Peritonitis by PCR-RFLP Method

M. Alinejad (MSc) [1], A. Nasrollahi Omran (PhD) [2*], S. J. Hashemi (PhD) [3]

1. Islamic Azad University of Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran
2. Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Islamic Azad University of Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran
3. Department of Medical Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

J Babol Univ Med Sci; 14(1); Jan 2012

Received: Apr 8th 2011, Revised: Jun 29th 2011, Accepted: Sep 7th 2011.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Fungal peritonitis is a relatively rare disease with serious complications in peritoneal dialysis patients and is associated with significant morbidity and mortality. Candida species are the most common cause of fungal peritonitis. The objective of this study was to isolate the Candida species in the patients with peritoneal dialysis by molecular methods, and thus to determine their drug resistance.

METHODS: In this cross-sectional study, sampling (peritoneal samples) was carried out on 210 suspicious patients with peritonitis after peritoneal dialysis in Tehran, Iran in 2010. Species identification was done by direct microscopic tests, culture on Chromagar and Corn meal agar, Germ tube test in bovine serum, Urease test, and biochemical identification with the API 20 kit. Identification of isolated yeasts was confirmed by PCR-RELF method. Antifungal susceptibility testing of isolated Candida species was conducted by the broth dilution method in accordance with the National Committee on Clinical Laboratory Standards guidelines [NCCLS-M27].

FINDINGS: Totally 210 samples were surveyed that 40 cases (19.05%) with microbial peritonitis were identified based on experiments, which only 9 cases (22.5%) had Candida peritonitis which determined as specific species in accordance with PCR-RFLP molecular technique for confirming phenotyping methods. Among these 9 cases of isolated candida species, 5 cases of them (55%) were C. albicans, 1 case (11%) was C. Kefyr and 2 cases (22%) were C. guilliermondii and also 1 case (11%) was C. parapsilosis. The MIC determined by antifungal susceptibility testing were: C. albicans (Amphotericin B=0.125 µg/ml, Fluconazole=2 µg/ml, 5- Flucytosine=2 µg/ml), C. guilliermondii (Amph B=1 µg/ml; Flu=2 µg/ml, 5- Fluc=4 µg/ml), C. Kefyr (Amph B=0.5-1 µg/ml, Flu=0.5- 1 µg/ml, 5- Fluc=2-4 µg/ml) and C. parapsilosis (Amph B =0.5µ g/ml, Flu =1 µg/ml, 5- Fluc=0.5g/ml).

CONCLUSION: Accurate identification of Candida albicans and non-Candida albicans species cases of Candida peritonitis in patients with peritoneal dialysis is necessary.

KEY WORDS: *Candida, Fungal peritonitis, Drug resistance, Minimum inhibitory concentration, Polymerase chain reaction, Restriction fragment length polymorphism.*

*Corresponding Author;
Address: Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Islamic Azad University of Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran, Postal Code: 4684161167
Tel: +98 192 4271105
E-mail: Ayat51@yahoo.co.in

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.8.0]

References

1.Hennings E. Severe case of Candida peritonitis in patient on CAPD- successful treatment. Mycoses 2005;48(Suppl 1):78-83.

2.Kleinpeter MA. Shifts in dialysis patients from natural disasters in 2005. Hemodial Int 2007;11(Suppl 3):S33-7.

3.Siva B, Hawley CM, Mcdonald SP, et al. Pseudomonas peritonitis in Australia: predictors, treatment, and outcomes in 91 cases. Clin J AM Soc Nephrol 2009;4(5):957-64.

4.Arfania D, Everett ED, Nolph KD, Rubin J. Uncommon causes of peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis. Arch Intern Med 1981;141(1):61-4.

5.Kim DK, Yoo TH, Ryu DR, et al. Changes in causative organisms and their antimicrobial susceptibilities in CAPD peritonitis: a single centers experience over one decade. Perit Dial Int 2004;24(5):424-32.

6.Bren A. Fungal peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988;17(12):839-43.

7.Goldie SJ, Kiernan-Tridle L, Torres C, et al. Fungal peritonitis in a large chronic peritoneal dialysis population: a report of 55 episodes. Am J Kidney Dis 1996;28(1):86-91.

8.Shokohi T, Hashemi Soteh MB, Pouri ZS, Hedayati MT, Mayahi S. Identification of Candida species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran. Indian J Med Microbiol 2010;28(2):147-51.

9.Cox SD, Walsh SB, Yaqoob MM, Fan SL. Predictors of survival and technique success after reinsertion of peritoneal dialysis catheter following severe peritonitis. Perit Dial Int 2007;27(1):67-73.

10.Kavanagh D, Prescott GJ, Mactier RA. Peritoneal dialysis–associated peritonitis in Scotland (1999-2002). Nephrol Dial Transplant 2004;19(10):2584-92.

11.Szeto CC, Chow VC, Chow KM. Entrobacteriaceae peritonitis complicating peritoneal dialysis: a review of 210 consecutive cases. Kidney Int 2006;69(7):1245-54.

12.Espinel Ingroff A, Kish CW, Kerkering TM, et al. Collaborative comparison of broth macrodillution and microdillution antifungal susceptibility tests. J Clin Microbial 1992;30(12):3138-45.

13.Levine J, Bernard DB, Idelson BA, Farnham H, Saunders C, Sugar AM. Fungal peritonitis complicating continuous ambulatory peritoneal dialysis: Successful treatment with fluconazole, a new orally active antifungal agent. Am J Med 1989;86(6 Pt 2):825-9.

14.Montenegro J, Aguirre R, Gonzalez O, Martinze I, Saracho R. Fluconazole treatment of candida peritonitis with delayed removal of the peritoneal dialysis catheter. Clin Nephrol 1995; 44:60-63.

15.National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts. Tentative standard. M27-T. Villanova, 1995.

16.Mirhendi H, Makimoura K, Khorimizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important Candida species. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi 2006;47(3):225-9.

17.Afsarian MH, Zaini F, Kordbacheh P, Mahmoudi M, Rezaii S, Safara M. Identification and study of non-Albicans Candida species isolated from clinical materials of patients with Candidiasis. Tehran Univ Med J 2007;64(12):38-47.[in Persian]

18.Dendis M, Horvath R, Michalek J, et al. PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients febrile neutropenia. Clin Microbiol Infect 2003;9(12):1191-202.

19.Barchiesi F, Colombo AL, McGough DA, Rinald MG. Comparative study of broth macrodillution and microdillution techniques for in vitro antifungal susceptibility testing of yeasts by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed standard. J Clin Microbiol 1994;32(10):2494-500.

20.Piraino B, Bailie GR, Bernardini J, et al. Peritoneal dialysis–related infections recommendations. Perit Dial Int 2005;25(2):107-31.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.8.0]

21.Eisenberg ES, Leviton I, Soeiro R. Fungal peritonitis in patients receiving peritoneal dialysis: experience with 11 patients and review of literature. Rev Infect Dis 1986;8(3):309-21.

22.Isogai H, Mulu A, Diro E, Tekleselassie H, Isogai E. Identification of Candida species from HIV infected patients in ethiopia by combination of CHROMagar, Tobacco agar and PCR of amplified internally transcribed rRNASpacer region. J Appl Res 2010;10(1):2-8.

23.Sullivan DJ, Henman MC, Moran GP. Molecular genetic approaches to identification epidemiology and taxonomy of non albicans candida species. J Med Microbial 1996;44(6):399-408.

24.Pfaller MA, Grant C, Mortland V, Rhine Challberg J. Comparative evaluation of alternative methods for broth dilution susceptibility testing of fluconazole against candida albicans. J Clin Microbial 1994;32(2):506-9.

25.Weems JJ Jr. Candida parapsilosis: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. Clin Infect Dis1992;14(3):756-66.

26.Cirak MY, Kalkanci A, Kustimur S. Use of molecular methods in identification of Candida species and evaluation of Fluconazole resistance. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003;98(8):1027-32.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.8.0]