مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
بهار ۱۳۹۳؛۶(۱):۵۸-۵۱

Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
Spring2014;6(1): 51-58

مقاله پژوهشی

بررسی قارچهای فرصت طلب بیماریزا در نمونه های بالینی و محیطی به دست آمده از بیمارستانهای آموزشی ارومیه

کامبیز دیبا[1]، خدیجه مخدومی[2]، محمد حسین رحیمی راد[3]، داود جباری[4]*

[1]دانشیار مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی آذربایجان غربی، ارومیه، ایران
[2]استاد گروه پیوند، دانشگاه علوم پزشکی آذربایجان غربی، ارومیه، ایران
[3]استاد گروه داخلی ریه، دانشگاه علوم پزشکی آذربایجان غربی، ارومیه، ایران
[4]محقق گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی آذربایجان غربی، ارومیه، ایران
[*]**نویسنده مسئول:** ارومیه، پردیس نازلو، دانشکده پزشکی ارومیه، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی
پست الکترونیک: kambiz37diba@gmail.com

وصول: ۹۱/۱۰/۱۱ اصلاح: ۹۱/۱۲/۲۶ پذیرش:۹۲/۶/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: *در این مطالعه تلاش گردید منابع مهم آلودگی به عناصر قارچی کاندیدا و اسپورهای آسپرژیلوس در فضاهای داخلی بیمارستان ها را با کاربرد دو روش شناسایی مورفولوژی و مولکولی جستجو نمائیم.*

مواد و روش کار: *در فاصله زمانی بهمن ۱۳۸۷ تا شهریور ۱۳۸۸، بطورکلی ۱۹۸ نمونه بالینی و محیطی از دو بیمارستان آموزشی در شهر ارومیه جمع آوری گردید. ۸۷ نمونه بالینی شامل: مایع برونشیال BAL، خلط، ترشحات سینوسی و ادرار بودند. همچنین ۱۱۱ نمونه محیطی شامل: نمونه های هوا و سواب های سطحی از اتاق های بیماران بستری به دست آمد. تمامی نمونه ها از نظر قارچ ها به خصوص جنس های آسپرژیلوس و کاندیدا بررسی گردید.*

یافته ها: *از کل ۵۴ مورد قارچی که از نمونه های بالینی جداسازی شدند، ۳۶ (۶۶/۶ درصد) جدایه کاندیدا و ۱۷ (۳۱/۴ درصد) جدایه آسپرژیلوس تشخیص داده شدند. در بررسی نمونه های محیطی، ۳۵ (۳۱/۵ درصد) مورد از کاندیدا ها، ۴۸ (۴۳/۲ درصد) مورد از آسپرژیلوس ها و ۲۸ (۲۵/۳ درصد) مورد از سایر قارچ های ساپروفیت بدست آمدند. نتایج مطالعات مولکولی با روش PCR-RFLP بر روی ناحیه ژنی DNA ریبوزومی، یک تشابه گونه ای میان جدایه های قارچی جداسازی شده از دو منبع اصلی بالینی و محیطی نشان می داد.*

نتیجه گیری: *آلودگی قارچی محیط های داخلی بیمارستان ها، می تواند به عنوان یک فاکتور مهم در اکتساب عفونت های قارچی بیمارستانی در نظر گرفته شوند.*

واژه های کلیدی: *عفونت بیمارستانی، قارچ، کاندیدا، آسپرژیلوس*

مقدمه

طیف وسیعی از پاتوژن های قارچی به عنوان عوامل عفونت های بیمارستانی پذیرفته شده اند و در میان عوامل قارچی، مخمرها چهارمین عوامل عمده عفونت های بیمارستانی، چهارمین عامل شایع عفونت های گردش خون و دومین عامل عمده عفونت های ناحیه ادراری UTI محسوب می گردند. اکثر این عفونت ها ناشی از گونه های کاندیدا هستند هر چند که تعداد موارد حاصل از این قارچ ها در مقایسه با کل عوامل عفونت های بیمارستانی فقط ۸٪ را شامل می شود. گذشته از عوامل مخمری *کاندیدا*، گونه های *آسپرژیلوس* نیز نقش مهمی در عفونت های سیستمیک بیمارستانی دارا هستند. با وجود درصد ناچیز (حدود ۱ درصد) از عوامل عفونت های بیمارستانی قارچی، این قارچها به عنوان عامل نگرانی اصلی در عفونت های بیمارستانی هستند و عفونت های *آسپرژیلوزیس* مهاجم تا ۹۰ درصد موجب مرگ و میر می شوند. گونه های دیگر

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-05-09]

که به عنوان پاتوژن های بیمارستانی جدید مطرح شده اند شامل گونه های *مالاسزیا*، *ترایکوسپورون*، *ساکارومایسس*، *سودوسپوریوم*، *فوزاریوم* و قارچهای سیاه می گردد. قارچها در ایجاد عفونت های بیمارستانی با زمینه های نقص سیستم ایمنی یا آسیب به سیستم دفاعی مانند جراحت و سوختگی، بدخیمی ها، لوسمی و پیوند اعضا مثل مغز استخوان مرتبط هستند.

یافتن روش های صحیح، دقیق و به موقع برای تشخیص و شناسایی گونه های قارچی شایع در عفونت های بیمارستانی و عفونت های فرصت طلب اهمیت ویژه می یابد و می تواند در پایش و غربالگری بیماری و اهداف اپیدمیولوژیک موثر باشد. بطور کلی روش های مولکولی متعددی بر پایه PCR برای شناسایی گونه های قارچی فرصت طلب بکار گرفته شده که عمدتا" تکثیر ژن DNA ریبوزومی را در نواحی ITS (Internal Transcript Spacer) را بکار می برند. این نواحی به عنوان قطعات ژنی غیر کد شونده تا حدود زیادی از واریاسیون و تنوع بین گونه ای و ثبات درون گونه ای برخوردارند [۲]. از این روش ها می توان به تکنیک های: PCR Sequencing [۳]، Nested PCR [۴]، PCR EIA [۵] و PCR Prob Hybridization [۶] اشاره نمود. همچنین روش RELP-PCR در جهان و ایران [۷،۸] برای شناسایی انواع *کاندیدا* و *آسپرژیلوس* های بیماریزا مورد استفاده قرار گرفته اند. با توجه به اینکه عفونت های قارچی بیمارستانی اخیرا در ایران نیز بسیار مشکل ساز شده اند و به خصوص در مورد آسپرژیلوزیس همگام با سایر نقاط جهان موارد وخیم منجر به مرگ نیز مشاهده می گردند ضرورت پرداختن به منابع این عفونت ها کاملا احساس می گردد، به طوری که بسیاری از محققین در ایران را به کار در این زمینه ترغیب نموده است [۹،۱۰]. هدف از این مطالعه تعیین منابع عفونت های قارچی بیمارستانی از طریق شناسایی گونه های *کاندیدا* و *آسپرژیلوس* جدا شده از بیمارستانهای آموزشی ارومیه با کاربرد روش های سنتی و مولکولی بوده و سعی شده است با اتخاذ روش مناسب ارگانیزم های مرتبط جداسازی شده از نمونه های بالینی و محیطی بیماران بستری در بیمارستان تعیین و شناسایی گردند.

روش کار

نمونه بالینی بیماران مشکوک به عفونت بیمارستانی (Hospital Acquired Infections) بستری در بیمارستان های آموزشی ارومیه به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده پزشکی ارسال شدند. در آزمایشگاه نمونه ها از لحاظ حضور عناصر قارچی و رشد قارچ در محیط کشت بررسی می گردید. ردیابی مستقیم در نمونه بالینی با روش مطالعه میکروسکوپی گسترش های تهیه شده با پتاس و گسترش های رنگ آمیزی شده بود. در مواردی که عفونت قارچی با روش مستقیم به اثبات می رسید، محیط بستری بیمار از لحاظ آلودگی به قارچ مورد مطالعه قرار می گرفت. در این صورت، نمونه هایی از هوای بخش های بیمارستان و از محیط اطراف بیمار نظیر سطوح دیوار ها، پرده ها، تخت، ترالی ها و سطوح دیگر، مجاری تهویه و کولر، ابزار و تجهیزات پزشکی و همچنین از دست و لباس خود بیمار، پرسنل و همراهان بیمار جمع آوری گردید. روش نمونه برداری هوا با پلیت گذاری در ارتفاع یکسان با محل قرار گیری بیمار و در مورد سایر نمونه ها با استفاده از سواب سر پنبه دار استریل و موکت استریل انجام شده و در محل، به محیط کشت پایه سابورود گلوکز آگار انتقال داده شدند.

کشت های محیطی به آزمایشگاه قارچ شناسی منتقل شده، به همراه کشت های پایه نمونه های بالینی مورد بررسی قرار گرفتند. از محیط های کشت ، چاپکس آگار (BBL, Maryland 2030,USA) و سابورود اگار (Merch 64271 Darmstadt Germany) برای شناسایی کپک ها [۱۱] و کورن میل آگار (DIFCO east Molsey U.K.) و کروم اگار کاندیدا (CHROMagar Paris France) برای مخمرها از جمله گونه های کاندیدا استفاده گردید [۱۲]. پس از شناسایی اولیه موارد اثبات شده مورفولوژیک با کاربرد روش مولکولی PCR-RFLP مورد تایید قرار می گرفت. مراحل کار مولکولی در آزمایشگاه تحقیقات مولکولی دانشکده پزشکی، تا ایجاد الگوهای شناسایی و تفکیکی گونه های قارچی انجام گرفت که. شامل موارد ذیل می باشد.

در خصوص موارد آسپرژیلوسی جداسازی شده، با تهیه کشت های مایع ۲۴-۱۲ ساعته از کشت های اولیه، توده

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-05-09]

های میسلیومی بارور نشده (Mycelial Mass) به مقدار لازم برای استخراج DNA فراهم آمد. در مرحله بعد جداسازی DNAی ژنومیک از هر کدام از ایزوله ها و خالص سازی DNA، الکتروفورز DNA جهت اطمینان از وجود مقدار کافی DNA و نگهداری در منفی ۲۰ درجه سانتیگراد تا زمان استفاده انجام گرفت. استخراج DNA برای مخمرها انجام نشد و در این مورد از روش Colony-PCR کمک گرفته شد [۱۳] که در این صورت کلنی مخمری مستقیما به عنوان تمپلیت در واکنش زنجیره پلی مراز قرار گرفت. تقویت یا تکثیر (Amplification) قطعات ITS2 , ITS1 در ناحیه ژنی rDNA توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR و با استفاده از پرایمرهای متناسب برای آن قطعه (Forward Primer: 5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3' Reverse Primer: 5'- TCC TCC GCT TAT TGAT TAT GC - 3') صورت گرفت. (پروتکل دمایی PCR شامل ۳۰ سیکل تکرار شونده از دناتوراسیون ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، آنیلینگ ۵۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه پس از یک مرحله اغازین ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود) [۸]. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل اگارز انجام شده تا باند های مربوط به ناحیه تکثیر یافته مربوط به هر سویه قارچی مشخص گردد. آنزیم محدود ساز Restriction enzyme جهت هضم محصولات PCR، برای *آسپرژیلوس* ها MwoI [۱۴] و برای *کاندیدا* ها MspI [۱۵] مورد استفاده قرار گرفتند (شکل های ۱و۲). برش DNAی ریبوزومی تکثیر یافته ایجاد الگوی افتراقی می نمود که در الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز و پس از رنگ آمیزی آنها با اتیدیوم بروماید بوسیله سیستم ترانس ایلومیناتورGel Doc System قابل رویت بود. در این پروسه برخی گونه های *کاندیدا* و *آسپرژیلوس* جداسازی شده از نمونه های بالینی و بیمارستانی قابل تفکیک و شناسایی شدند.

یافته ها

در طول ۱۸ ماه مطالعه، از زمستان ۱۳۸۷ تا پاییز ۱۳۸۹ تعداد ۱۹۸ نمونه از بیماران بستری و محیط اطراف آنها به دست آمد که در نتیجه بررسی های آزمایشگاهی بر روی نمونه های اخذ شده، ۹۳ مورد (۴۷٪) عفونت قارچی یا باکتریایی تایید گردید. از این تعداد ۵۴ مورد (۵۸٪) مربوط به عفونت های قارچی می گردید با توجه به اینکه نمونه ها از افراد بستری در بیمارستان که اخیرا دچار عفونت شده اند به دست آمدند، لذا فرض بر این است که ارگانیزم های جداسازی شده در ایجاد عفونت نوزوکومیال نقش داشته اند. از کل موارد قارچی، ۳۶ مورد (۶۶/۶ درصد) را گونه های مخمری جنس *کاندیدا*، ۱۷ مورد (۳۱/۴ درصد) را گونه های *آسپرژیلوس* و یک مورد قارچ ساپروفیت کم شیوع *آلترناریا* تشکیل دادند. گونه های کاندیدای شناسایی شده به تفکیک شامل: *کاندیدا آلبیکانس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کروزئی، کاندیدا تروپیکالیس، کانیدا گیلرموندیی و کاندیدا پاراپسیلوزیس* بودند که فراوانی و درصد نسبی هر یک در جدول ۱ مشخص گردیده است. تنها قارچ غیر کاندیدایی و آسپرژیلوسی در مطالعه میکروسکوپی و کشت، آلترناریا بود که یک مورد از ترشحات زخم بیمار مبتلا به سپتیک آرتریت جداسازی شد. نمونه برداری از محیط بیمار بستری در بیمارستان که در طول مدت زمان پذیرش نمونه های بالینی و اثبات عفونت قارچی انجام می شد شامل: ۲۵۶ نمونه از مواضع مختلف محیطی شامل: دست و بدن بیمار، دست پرسنل و همراهان بیمار، کف، تخت، دیوار اتاق بیمار، ترالی ها، سینک، سطوح و مجاری دستگاه ها، و هوای بخش ها می گردید. از میان کل نمونه های بدست آمده، ۱۱۱ جدایه قارچی مشتمل بر کاندیدا، آسپرژیلوس و ساپروفیت های آلوده کننده دیگر شامل *آلترناریا، ساکارومایسس، موکورال ها، پنی سیلیوم، کلادوسپوریوم* و فئوهایفومایست ها جداسازی و شناسایی شدند. از کل جدایه های قارچی، ۳۵ مورد (۳۱/۵٪) گونه های کاندیدا و ۴۸ مورد (۴۳/۲٪) گونه های آسپرژیلوس تعیین گردید. تعداد موارد جداسازی شده *آسپرژیلوس و کاندیدا* از هر یک از محل های نمونه برداری شده بیمارستان شامل هوا، سطوح مختلف و مواضع سطحی افراد در جدول ۱ مشخص گردیده است. در میان مخمرهای جداسازی شده از سطوح بدن بیمار، همراهان و پرسنل، گونه های *کاندیدا آلبیکانس، کاندیدا کروزئی، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا تروپیکالیس، و کاندیدا پاراپسیلوزیس* بیشترین موارد را به خود اختصاص داده اند

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-05-09]

جدول ۱: فراوانی قارچهای فرصت طلب جداشده از پوست و دست بیمار، دست پرسنل و همراهان، محیط بیمار بستری

	دست بیمار	پوست بیمار	کنده	دست ملاقات	دست پرسنل	کف اتاق بیمار	تخت	دیوار	دستشو	سینک	ها	ترالی	کولر	سطوح	سطوح افقی	مجاری ونتیلاتور	مجاری ساکشن	محوطه	کل
کاندیدا	۱۱	۲	۱		۵	۲	۴	۴	۳		۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۲	۳۵
آسپرژیلوس	۰	۰	۰		۱	۹	۷	۷	۲		۵	۵	۳	۰	۱	۰	۰	۸	۴۸
سایر	۰	۰	۰		۰	۳	۴	۵	۱		۴	۴	۱	۱	۱	۲	۲	۰	۲۸
کل	۱۱	۲	۱		۶	۱۴	۱۵	۱۶	۶		۹	۱۰	۴	۱	۲	۲	۲	۱۰	۱۱۱

جدول ۲: گونه های کاندیدای ردیابی شده در نمونه های سطحی و محیطی بیماران

گونه	پوست بیمار	دست بیمار	دست پرسنل	ملاقات کننده	کف	تخت	دیوار	سینک	ترولی	محیط	کل
کاندیداآلبیکانس	۲	۶	۳	۱	۲	۱	۰	۳	۱	۲	۲۱
ک.گلابرتا	۰	۰	۱	۰	۰	۲	۲	۰	۰	۰	۵
ک.گیلرموندی	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
ک.کروزئی	۰	۴	۱	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۶
ک.تروپیکالیس	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۲
ک.پاراپسیلوزیس	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۱
کل	۲	۱۱	۵	۱	۲	۴	۴	۳	۱	۲	۳۵

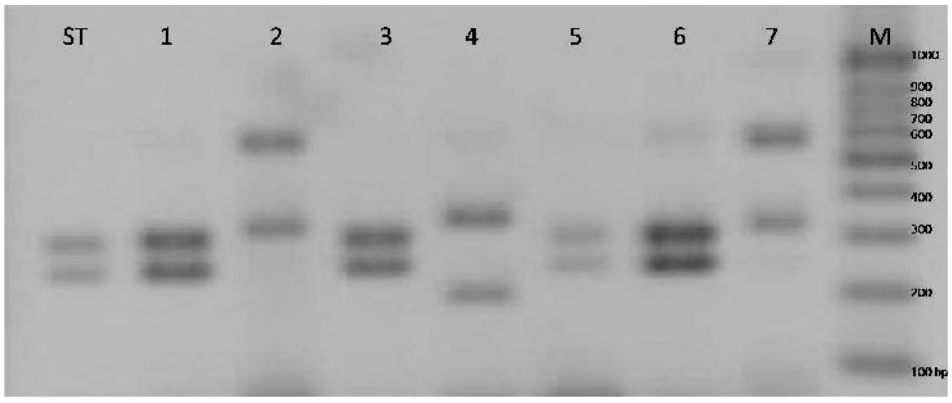
[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-05-09]

جدول ۳: گونه های آسپرژیلوس ردیابی شده در نمونه های محیط ی و هوای بیمارستان

گونه	دست پرسنل	کف	تخت	دیوار	سینک	هوا	تروللی	کولر	سطوح دستگاهها	سطوح محیطی	کل
آسپرژیلوس فلاووس	۱	۴	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۱	۲	۲۰
آسپرژیلوس فومیگاتوس	۰	۰	۰	۱	۰	۱	۲	۰	۰	۳	۷
آسپرژیلوس نایجر	۰	۵	۵	۴	۰	۲	۱	۱	۰	۳	۲۱
کل	۱	۹	۷	۷	۲	۵	۵	۳	۱	۸	۴۸

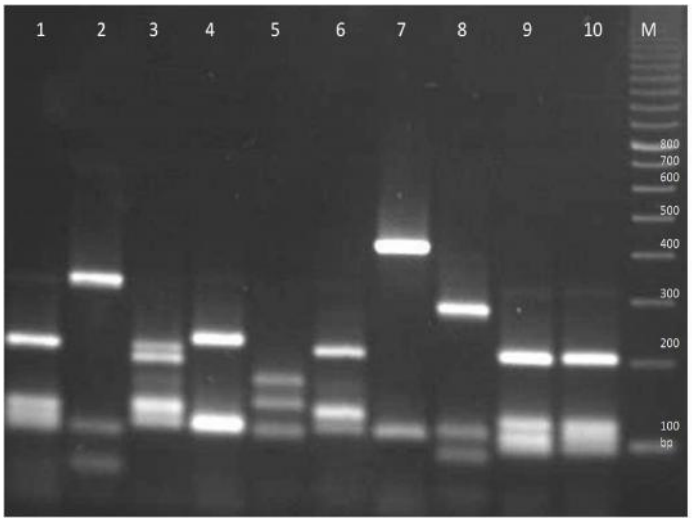
جدول ۴: مقایسه دو روش و مولکولی در شناسایی مخمر ها جداسازی شده از نمونه های بالینی

گونه	روش کلاسیک		روش مولکولی	
کاندیدا آلبیکانس	۲۳	٪۶۴	۲۰	٪۷۷
ک.گلبرتا	۶	۶/۱۶	۳	۱۱/۵۳
ک.گیلرموندی	۱	۲/۷۷	۱	۳/۸۴
ک.کروسی	۵	۱۳/۸۸	۱	۳/۸۴
ک.تروپیکالیس	۱	۲/۷۷	۱	۳.۸۴
کل	۳۶	٪۱۰۰	۲۶	٪۱۰۰



شکل ۱: تصویر الکتروفورز محصولات PCR ناحیه ITS1-ITS2 ژن DNA ریبوزومی گونه های کاندیدا پس از هضم با آنزیم محدودساز MspI در روش RFLP. ستون ST کنترل مثبت مربوط به سویه استاندارد کاندیدا آلبیکانس (ATCC 10231)، ستون های ۶و۵و۳و۱ مربوط به سویه های بالینی کاندیدا آلبیکانس، ۷ و ۲ ستونهای مربوط سویه های بالینی کاندیدا گلابراتا و ستون شماره ۴ مربوط به سویه بالینی کاندیدا تروپیکالیس و ستون M مارکر 100bpDNA می باشد.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-05-09]



شکل ۲: تصویر الکتروفورز از محصولات PCR-RFLP گونه های استاندارد آسپرژیلوسی که به عنوان الگوی تشخیصی گونه های بالینی آسپرژیلوس در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. ستون های ۹-۱: آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس، آسپرژیلوس نیدولانس، آسپرژیلوس کلاواتوس، آسپرژیلوس اوکراسئوس، آسپرژیلوس آمستلوئیدامی و آسپرژیلوس فیشری، ستون ۱۰: نئوسارتوریا کوادریسینکتا که الگویی مشابه آسپرژیلوس فومیگاتوس دارد. ستون M مربوط به مارکر نردبانی 100bp می باشد.

که در جدول ۲ درصد موارد هریک از گونه ها به تفکیک منابع جداسازی مشاهده می گردد. به همین ترتیب منابع جداسازی گونه های آسپرژیلوس محیطی در جدول ۳ به تعداد مشخص شده اند. برخی دیگر از قارچ هایی که با درصد کمتری از محیط های بیمارستانی جداسازی شدند شامل: *آلترناریا، ساکارومایسس، موکورال ها، پنی سیلیوم* ، *کلادوسپوریوم* و فئوهایفومایست ها بوده و بطور کلی ۲۸ مورد (۲۵/۳٪) از تمام جدایه ها را تشکیل می دادند. یافته های بالا با روش مولکولی PCR-RFLP نیز مورد بررسی قرار گرفتند که با اختلاف جزئی (بدون اختلاف معنی دار) تائید گردیدند. در جدول ۴ مقایسه دو روش برای شناسایی گونه های آسپرژیلوسی نشان داده شده است.

بحث

آنچه در مطالعه ما اهمیت می یابد یافتن منشاء آلودگی بیمارانی است که آزمایش نمونه بالینی آنها از نظر قارچ های فرصت طلب بیمارستانی اثبات گردیده است. در بررسی نمونه های بالینی افراد بستری مشکوک به عفونت قارچی، بالاترین فراوانی متعلق به قارچ *کاندیدا آلبیکانس* و پس از آن به ترتیب *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا کروزئی* می باشد. همچنین تعداد ۱۷ مورد آسپرژیلوس جداسازی شده شامل گونه های *آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب با درصد فراوانی: ۴۷ درصد، ۲۹/۴٪ و ۲۳/۶٪، بالاترین تا پایین ترین درصد فراوانی را شامل می شدند. بررسی نمونه های جمع آوری شده بیمارستانی نشان می دهد که بیش از ۵۰ درصد مواضع و مکان های نمونه برداری شده در این مطالعه آلوده به قارچ های فرصت طلب هستند. در میان موارد بررسی شده، کف و دیوارها و تخت های محل بستری بیماران آلودگی بیشتری دارند که البته با توجه به وسعت تماس با هوا و رفت و آمد بیماران، همراهان و پرسنل طبیعی به نظر می رسد. اما آنچه در این مقوله نظر را جلب می نماید این است که آلودگی کاندیدایی در بین چهار نمونه مربوط به پوست و دست بیمار بستری، دست همراهان و دست پرسنل، از دست خود بیمار و بعد پرسنل بیمارستان مرتبط با بیمار بیشتر جداشده است. با توجه به اینکه مخمرهای کاندیدا به عنوان شایع ترین عوامل ایجاد کننده عفونتهای قارچی بیمارستانی مطرح هستند [۱] و تقریبا اکثر آن عفونت ها منشاء درونی دارند، جدا شدن

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-05-09]

بیشتر مخمر از خود بیمار می تواند نظریه بالا را تقویت کند. اما پرسنل نیز می توانند سهمی در بار قارچی منتقله به بیمار داشته باشند. از طرفی سینک بیماران از جمله مواضعی می باشد که تعداد موارد آلودگی به کاندیدا در آن بالاست. البته آلودگی سینک می تواند به دلیل تماس بیمار با آن بوده و شرایط رطوبت برای حفظ حیات مخمر در آن محیط مناسب می باشد. آلودگی تخت ها، دیوار و سینک بیماران، مبین این موضوع است که منشاء عفونت های کاندیدایی می تواند غیر آندوژن هم باشد و احتیاط لازم در این مسئله هم بایستی لحاظ گردد. برخلاف کاندیداها که غالبا از سطوح بدن و محیطهای مرطوب در تماس با بدن افراد جدا می شوند، آسپرژیلوس ها که به عنوان دومین گروه قارچهای فرصت طلب بیمارستانی مطرح هستند [۱۶]، مرتبط با سطوح محیطی و اجسام هستند چنانکه در نتایج مشاهده می گردد، بیشترین آلودگی آسپرژیلوسی در کف اتاق ها، سطوح محیطی و دیوارها دیده می شود. در مطالعه نوریان [۱۷] بیشترین موارد جداسازی شده قارچها از کف بخش و ۲۷٪ آلودگی وسایل و تجهیزات پزشکی گزارش شده است. در مطالعه حاضر میزان آلودگی تجهیزات بیمارستانی ۵ مورد از ۱۱۱ مورد جداسازی شده بود، این نتیجه با وجود شامل نشدن اتاق های عمل و آی سی یو قابل ملاحظه است. هر چند در مطالعه ما تعداد موارد جداشده آسپرژیلوس ها از هوا قابل توجه نیست اما در بسیاری مقالات منشاء آلوگی آسپرژیلوسی محیطهای داخلی بیمارستان هوای آلوده خارج و احتمالا مرتبط با ساخت و سازها در محوطه های بیمارستانی مطرح شده است [۲۰-۱۸]. البته این نکته را هم نمی بایست از نظر دور داشت که اسپورهای قارچ رشته ای در صورتی که مدتی در هوا معلق بمانند به تدریج به دلیل داشتن شارژ الکتریکی به سطوح کف، دیوارها و دیگر سطوح چسبیده و انباشته می گردند. در کل آنچه از یافته های ما بر می آید این است که منشاء آلودگی کاندیدایی در بیمارستانها بیشتر سطوح پوست و مخاط خود بیمار و پرسنل مرتبط می باشد و آسپرژیلوس ها بطور عمده از سطوح محیطی نظیر کف، تخت، دیوار و هوای بخش جداسازی می شوند.

روش مولکولی بکار رفته در این مطالعه ضمن تسهیل شناسایی و افتراق گونه های کاندیدا وآسپرژیلوس جداسازی شده، در یافتن منشاء آلودگی های قارچی بیمارستانی و ارتباط آن با سویه های بالینی کمکی موثر بود. در سیستم شناسایی تک آنزیمی بکار رفته به دنبال یک کشت کوتاه مدت ۳۶-۲۴، استفاده از پروفایلی شامل استخراج DNA، PCR و هضم آنزیمی برای تقریبا ۱۰-۶ نمونه، در زمانی حدود ۶-۸ ساعت انجام پذیر است و به مراتب سریعتر از روش های شناسایی سنتی و مورفولوژیک می باشد که چندین روز را می طلبد. روش مولکولی PCR-RFLP با کاربرد آنزیم های محدودساز Mwo I و MspI از حساسیت و ویژگی بالایی برای تشخیص اکثر گونه های آسپرژیلوس و کاندیدا برخوردار است.

نتیجه گیری

در بررسی مولکولی منابع الودگی های قارچی بیمارستانی این مطالعه مشخص گردید که آلودگی مخمری (گونه های کاندیدا) پوست بیمار، پرسنل و همراهان و آلودگی کپکی یا قارچ های رشته ای محیط داخلی بیمارستان مهمترین منشآ عفونتهای قارچی بیمارستانی تشخیص داده شده در بخش های مورد مطالعه بودند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه به عنوان بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب به شماره قرارداد ۶۰۵ مورخه ۸۷/۱۲/۴ در معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ارومیه انجام پذیرفته است، لذا از آن معاونت به دلیل پشتیبانی مالی- تجهیزاتی سپاسگزاری می گردد. نویسندگان از همکاری و مساعدت کارکنان بخش نفرولوژی و داخلی ریه بیمارستان امام خمینی ارومیه نهایت تشکر را دارند. همچنین از مرکز تحقیقات مولکولی دکتر میرهندی، انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران، اصفهان به دلیل حمایت های علمی قدردانی می شود.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-05-09]

References

1. Diba K, Human Mycoses, Andisheh Rafi ed, Tehran, Iran, 2012[Persian]
2. De Aguirre L, Hurst SF, Choi JS, Rapid differentiation of Aspergillus species from other medically important opportunistic molds and yeasts by PCR-Enzyme Immunoassay, J Clin Microbiol 2004; 42(8): 3495-3504.
3. Healy M, Reece K, Walton D, Kontoianis DP, Identification to the species level and differentiation between strains of Aspergillus clinical isolates by Automated Repetitive-Sequence-Based PCR, J Clin Microbiol 2004 ; 42(9): 4016-4024.
4. Canbe T, Yamaki K, Kikuchi A, Identification of pathogenic Aspergillus species by Nested PCR using a mixture of species primers to DNA topoisomerase Π gene, J Microbiol Immunol 2002; 46: 846-848.
5. Badiee P, Kordbacheh P, Alborzi A, Prospective screening in liver transplant recipients by panfungal PCR-ELISA for early diagnosis of invasive fungal infections, Liver Transpl Surg 2007; 13(7): 1011-6[Persian]
6. Fletcher D, Detection of Aspergillus fumigatus PCR products by a micro titer plate base DNA hybridization assay, J Clin Pathol 1998; 51(8): 617–620.
7. Moody SF, Tyler BM, Use of nuclear DNA Restriction Fragment Length Polymorphism to analyze the diversity of the Aspergillus flavus group; A. flavus, A. parasiticus and A. nomius , J Appl Environ Microbiol 1990; P: 2453- 2461.
8. Mirhendi SH, Diba K, Kordbacheh P, Identification of pathogenic Aspergillus species by a PCR-restriction enzyme method, J Med Microbiol 2007; 56(11): 1568-70[Persian]
9. Basiri-Jahromi S, Hosseinkhan Z, Nosocomial fungal Infections. Khane-ketab, Tehran, 2012[Persian]
10. Ayatollahi Mousavi S A, Karami Robati A, Madani M, Hadizadeh S, Prevalence of Systemic fungal Infections in Kerman Teaching Hospitals, J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(97): 105-112[Persian]
11. Diba K, Kordbacheh P, Mirhendi SH and Rezai S, Identification of Aspergillus species using Morphological Methods, Pak J Med Sci 2007 (Part-II); 23(6): 867-872[Persian]
12. Diba K, Rahimirad M, Makhdoomi K and Khorshidvand Z, Identification of Candida species isolated from hospital acquired infections cases and hospital indoor environments, Afr J Microbiol Res 2012; 6(19): 4164-4168[Persian]
13. Mirhendi H, Diba K, Rezaie A, Jalalizand N, Hosseinpur L, Khodadadi H, Colony-PCR Is a Rapid and Sensitive Method for DNA Amplification in Yeasts, J Publ Health 2007; 36(1): 40-44[Persian]
14. Diba K, Identification of medically important Aspergillus species using PCR-RFLP based on the rDNA gene, PhD thesis, Tehran University of Medical sciences, available from, URL:. http//: www.tums.ac.ir/ (accessed: 1 April 2007) [Persian].
15. Moody SF, Tyler BM, Use of nuclear DNA Restriction Fragment Length Polymorphism to analyze the diversity of the Aspergillus flavus group; A. flavus, A. parasiticus and A. nomius. Appl Environ Microbiol 1990; 56(8): 2453-61.
16. Mirhendi SH, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H, A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important Candida species, Med Mycol J, 2006; 47(3): 225-9.
17. Noorian A, Badali H, Evaluation of fungal contamination of Air and surfaces of operating rooms and ICUs in Zanjan hospitals. Zanjan Med J 2001; 36: 10-15[Persian]
18. Anaissi EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, Chinical Mycology, Churchill Livingston, USA, 2003.
19. Cooper EE, O'Reilly MA, Guest DI, Dharmage SC, Influence of building construction work on Aspergillus infection in a hospital setting, Infect Control Hosp Epidemiol. 2003 Jul; 24(7): 472-6.
20. Emily R, Sydnor M, Trish M, Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings, Clin Microbiol Rev 2011 January; 24(1): 141–173.
21. Brock D, Lutz, Jiankang Jin, Michael G, Rinaldi, Outbreak of Invasive *Aspergillus* Infection in Surgical Patients, Associated with a Contaminated Air-Handling System, Clin Infect Dis 2003; 37(6): 786-793.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-05-09]

Original Article

Survey of opportunistic fungi in the clinical and environmental specimens obtained from Urmia educational hospitals

Diba K[1], Makhdoomi kh[2], Rahimirad M[3], Jabari D[4]*

[1]Associate Professor of Medical Mycology, Cellular and Molecular Research Center, Urmia university of Medical Sciences, Urmia, Iran
[2]Professor of Nephrology, Imam educational hospital, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
[3]Professor of Lung Diseases, Imam educational hospital, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
[4]Researcher, Department of Parasitology and Mycology, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

***Corresponding Author:** Cellular and Molecular Research Center, Urmia university of Medical Sciences, Urmia, Iran
Email: kambiz37diba@gmail.com

Abstract

Background & Objectives: *In this study we attempted to search important sources of Aspergillus spores and Candida elements in hospitals indoor spaces using two identification methods of morphology and molecular.*

Material & Methods: *From February 2008 to September 2009, total of 198 clinical and environmental specimens were collected from two Iranian training educational hospitals of Urmia. Clinical specimens included bronchoalveolar lavage, sputum, sinus discharge and urine. Also 111 environmental specimens including air samples and surface swabs were obtained from the rooms where our cases were hospitalized. All specimens were tested for Aspergillus and Candida species. The Identification of isolated fungi was confirmed using PCR-RFLP method.*

Results: *Totally 93 (47%) clinical specimens were positive for fungal or bacterial infections. 54 (58%) fungi isolated from clinical specimens included 36 (66.6%) Candida spp., 17(31.4%) Aspergillus spp and also only other one fungal saprophytic agent. Environmental isolates were included Candida spp., 35 (31.5%), Aspergillus spp., 48 (43.2%) and other saprophytic fungi, 28 (25.3%).*

Conclusions: *Our findings of PCR-RFLP on rDNA gene of Candida and Aspergillus isolates showed a similarity between some environmental isolates and the relevant clinical isolates but use of method RAPD–PCR confirmed only 20-40% similarity with two of 5 random primers for some clinical isolates and related environments. We conclude that fungal contamination of the hospital indoor environments maybe important factor for the hospital acquired fungal infections.*

Keyword: *Nosocomial infection, Fungi, Aspergillus, Candida*

Submitted:31 Dec 2012
Revised:16 Aug 2013
Accepted:7 Sep 2013

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-05-09]