شناسایی ملکولی و بررسی حساسیت دارویی گونه های کاندیدا جدا شده از پوست بیماران با تظاهرات کلینیکی

آیت الله نصرالهی عمران[1*]

۱) گروه قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵

چکیده

مقدمه: آکنه یک اختلال پاتولوژیک و یک التهاب مزمن در فولیکول پیلوسبابه و یکی از رایج ترین آسیب های درماتولوژی بوده که میلیون ها نفر در جهان را تحت تاثیر قرار داده است. هدف از این مطالعه شناسایی گونه های کاندیدا از بیماران اکنه و تعیین حساسیت دارویی آن ها بوده است.

مواد و روش ها: در این مطالعـــه تحلیلی-مقطـعی ۷۰ نمونه کلینیکی از پوست افراد با تظاهرات مشکوک به آکنه توسط سواپ استریل جمع آوری و بر روی محـــیط SDA حاوی کلرامفنیکل کشت خطی داده شدند. سپس پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه می شدند. کلنی های مشکوک از طریق آزمایش میکروسکوپی و پاساژهای متوالی مطابق با روش های استاندارد قارچ شناسی و تعیین نوع رنگ کلنی در محیط کروم آگار جهت جداسازی مخمر مورد بررسی قرار می گرفتند. برای تایید نهایی گونه های کاندیدا روش توالی یابی(نواحی ITS1 وITS2) و برای بررسی مقاومت دارویی کاندیدهای جدا شده تست حساسیت مطابق با روش استاندارد CLSI انجام گرفت.

یافته های پژوهش: در نهایت ۱۱ گونه کاندیدا و به ترتیب شامل کاندیدا پاراپسیلوزیس ۸ مورد(۷۲/۷۳ درصد)، کاندیدا کروزئی ۱ مورد(۱۲/۵ درصد)، کاندیدا لوزیتانیا ۱ مورد(۱۲/۵ درصد)،کاندیدا کفیر ۱ مورد(۱۲/۵ درصد)، و یک مورد ترایکوسپورون اساهی شناسایی و جداسازی شدند. بررسی میزان حساسیت ایزوله های کاندیدا پاراپسیلوزیس نسبت به غلظت های مختلف داروهای ضد قارچی مورد مطالعه برای ایزوله های Cp1 تا Cp8 نشان داده که ایزوله Cp5 با MIC50 برابر با ۳۲، ۰/۵، ۰/۲۵ و MIC90 برابر با ۶۴<، ۱<، ۰/۵< میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب به فلوکونازول، ایتراکونازول و کتوکونازول مقاوم بودند. غیر از ایزوله های Cp1 و Cp8 که تقریباً مقاومت نسبی داشتند بقیه گونه های کاندیدا و ایزوله های دیگر پاراپسیلوزیس به داروهای فوق حساس بودند.

بحث و نتیجه گیری: همان طور که مطالعات مختلف ثابت کرده اند که در اکثر موارد عوامل باکتری در ایجاد آکنه دخیـل هسـتند، بـر اسـاس نتایج این مطالعه می توان گفت که گونه های مخمر کاندیدا می تواند به عنوان یک عامل در علت این بیماری معرفی شود. جدایـه هـای گونـه کاندیـدا می توانند به داروهای ضد قارچی مقاوم باشند و این می تواند یکی از دلایلی باشد که درمان مداوم این بیماری با همیشه شکست همراه است.

واژه های کلیدی: حساسیت دارویی، گونه های کاندیدا، آکنه، پوست

* نویسنده مسئول: گروه قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، ایران

Email: Ayat 51@ yahoo.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

آکنه یک بیماری التهابی مزمن از واحد پیلوسباسه است که روی پوست صورت، گردن، پشت و قفسه سینه ظاهر می شود و با زخم هایی سیاه، پاپول ها و پاسچول های اریتماتوز و در حالت های درمان نشده با ندول واسکار مشخص می شود. آکنه یک اختلال انسدادی و مزمن التهابی موثر بر فولیکول سباسه به طور عمده در نوجوانان می باشد. اطلاعات درباره پاتوژنز آکنه به تدریج در حال شکل گرفتن است این بیماری در همه گروه های سنی اثرگذار است و میزان شیوع آن در جهان ۸۷-۷۰ درصد است. مطالعات مختلف نشان داده اند که ۹۱ درصد مردان و ۷۹ درصد زنان در نوجوانی و ۳ درصد مردان و ۱۲ درصد زنان در بزرگسالی درگیر این بیماری هستند. فاکتورهای موثری که در پاتوژنز بیماری دخالت دارند شامل افزایش تولید سبوم، غیر طبیعی شدن فلور میکروبی درون واحد پیلوسباسه و افـــزایش کراتینـــه شدن مجرا و با واسطه های التهابی می باشـــند. عـــوامل مختلف باکتریایی عموماً و عوامل قارچی در مواردی کمتر در ایجاد آکنه دخالت دارند که از آن جمله می توان به پروپیونی باکتریوم آکنه، پروپیونی باکتریوم گرانولوزوم، پروپیـــونی باکتـــریوم اویـــدوم، استافیلوکوکوس اپیدرمایس و گونه های مالاســـزیا اشاره کرد. این میکروارگانیسم ها فلور میکروبی واحد پیلوسباسه و از میکروفلورکومدون ها از فولیکول سباسه نرمال قابل تشخیص اند(۱،۲).

وضعیت ایمونولوژیک میزبان، فاکتورهای هورمونی ژنتیکی و بسیاری از عوامل دیگر از جمله اضطراب، سرکوب ایمنی، بارداری، قاعدگی، آب و هوای گرم و مرطوب، آلـــودگی پوســـت، استفاده از لوازم آرایشی نامناسب، رژیم غذایی بد وسیگاری بودن در ظهور بالینی و شیوع آکنه تاثیرگذارند. بیماری های مرتبط با آکنه شامل آکنه ولگاریس، آکنه استروئیدی، فولیکولیت باکتریای، آکنه نکروتیک، آکنه نودل کیستیک و آکنه کلوئیدال می باشند. آکنه یک شکل غیرعفونی از فولیکـــولیت را بروز داده و باعـــث التهاب فولیکول می گردد. پروپیونی باکتریوم با تولید آنزیم های هیالورونیداز، پروتئاز، لیـــپاز و تـــولید فـــاکتورهای شیمیوتاکتیک مسئول پاسخ التهابی در محل ضایعه به واسطه فعال شدن ماکـــروفاژ و تولید سایتوکاین ها می شود. مطالعات نشان داده اند که تنوع میکروبی مجرای پیلوسباسه بر تولید و فعالیت واسطه های التهابی مثل لیپازها، نورامیدازها و فسفاتازها و پروتئازها تاثیرگذارند. این بیماری علاوه بر تاثیر منفی بر زیبایی فرد، می تواند مشکلات روحی و روانی را به ویژه در جوانان ایجاد نماید و علاوه بر آزار بیماران، به دلیل مصرف طولانی مدت انواع آنتی بیوتیک ها، موجب افزایش گونه های مقاوم میکروبی در جامعه و تبعات اقتصادی آن نیز شوندکه در سال های اخیر یک مشکل جهانی را ایجاد کرده است(۲،۳).

از طرفی استفاده نا به جا از آنتی بیوتیک هایی که برای درمان آکنه باکتریایی به کار می روند ممکن است فلور نرمال باکتریایی پوست را از بین برده و اجازه رشد بیشتری به فلور مخمری پوست را دهند به همین دلیل، به سبب عدم درمان آکنه و برای بهبود آن بایستی درمان های آنتی بیوتک های خوراکی موثر در دستور کار قرار گیرد(۱). گونه های کاندیدا جزء فلور طبیعی پوست و مخاطات بدن انسان بوده و وقتی شرایط برای حضور آن ها در بیماری فراهم شوند، می توانند به عنوان یک عامل عفونت فرصت طلب عمل کنند. فاکتورهای بیماری زایی کاندیدا آلبیکـــنس به عنوان شایع ترین گونه درگیر شـــامل ژرم تیوب، تولید آنزیم های پروتئاز و فسفولیپاز می باشند. گونه های کاندیدا مثل بعضی از باکتری ها می توانند در شرایط کم هوازی و بیهوازی نیز به خوبی رشد می کنند. در ایجاد کاندیدیوزیس جلدی به عنوان شایع ترین عفونت قارچی پوست عوامل مستعدکننده ای نظیر گرما و رطوبت، درمان با کورتیـــکو استروئیدها و استـــفاده از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف، استرس و نقـــص سیستم ایمنی دخیل می باشند. هم چنین کاندیدا بر خلاف بسیاری از میکروارگانیسم ها، به دلیل تولید آنزیم کراتیناز می تواند در طبقه شاخی پوست رشد کند(۴). دلایل خـــوبی برای این باور وجود دارد که گونه های کاندیدا ممکن در تشدید بیماری های آکنه، اگزما، پسوریازیس و درماتیت آتوپیک تاثیرگذار باشند. کاندیدا می تواند آکنه و مشکلات پوستی شبیه آن را

سبب شود. برخی از مطالعات نشان می دهد که پوست بیماران مبتلا به آکنه پاسخ التهابی قوی تر در برابر مخمر ایجاد کرده و این التهاب اولیه می تواند روند شکل گیری یا تشدید این بیماری را سبب شوند. از این رو ادعاهای فوق العاده نیاز به اثبات فوق العاده ای دارد. کاندیدا در افراد مبتلا به آکنه و دیگر بیماری های پوستی شایع می تواند در نتیجه عواقب مشکلاتی روده ای باشد و در نتیجه در تشدید آکنه از طریق تحریک حرکات روده ای تاثیرگذار باشد. به طور مشابه نقص سیستم ایمنی بدن در پوست افراد دارای مشکل ممکن است سبب رشد بیش از حد کاندیدا و تهاجم آن شده که می تواند در نتیجه التهاب موضعی پوست و احتمالاً باعث روند شکل گیری آکنه پوستی ناشی از کاندیدا شود. در صورت شک به کاندیدا، آزمون ساده و قابل اعتماد برای حضور آن در این بیماری وجود داشته و می توان آن را به طور موثر با داروهای ضد قارچ درمان کرد. بنا بر این با توجه به مطالعات و بررسی های به عمل آمده از یافته های متخصصین پوست و قارچ شناسی این فرضیه به وجود می آید که مخمر کاندیدا نیز علاوه بر مخمر مالاسزیا می توانند به عنوان یکی از عوامل ایجادکننده آکنه باشد(۴،۵).

از آن جایی که محققان در غالب موارد عوامل باکتریال را در ایجاد آکنه دخیل می دانند کمتر به نقش عوامل قارچی در ایجاد این بیماری در کلینیک ها توجه شده است. با عنایت به این که داروی مورد استفاده در این دو حالت بر حسب عامل بیماری کاملاً متفاوت می باشد تشخیص و تفکیک عوامل ایجادکننده آکنه در تجویز داروی مناسب برای جلوگیری از شکست های درمانی و استفاده نا به جا و طولانی مدت از داروهای باکتریایی بسیار با اهمیت است. از این رو با توجه به اقلیم مازندران که شرایط بسیار مناسب برای ایجاد آکنه و رشد این مخمرها را دارا است و مطالعات کافی در این زمینه جود ندارد. این تحقیق برای تعیین فراوانی مخمرهای کاندیدا در بیماران آکنه مراجعه کننده به درمانگاه های پوست و دانش آموزان مشکوک مستقر در مدارس غرب مازندران و سپس شناسایی آن ها با استفاده از روش های آزمایشگاهی طراحی شد. نیل به این اهداف می تواند گامی موثر در راستای پاسخ به سوالات اپیدمیولوژیک، مشکلات درمانی، کمک به حل معضلات بهداشتی و روحی–روانی مرتبط با این بیماری باشد(۸–۶).

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی–مقطعی طی یک دوره ۶ ماهه در سال های ۹۵ و ۹۶ در حدود ۷۰ نمونه سواپ از بیماران آکنه مراجعه کننده به درمانگاه های پوست و دانش آموزان مستقر در مدارس غرب مازندران که دارای تظاهرات مشکوک به آکنه بودند جمع آوری گردیدند. نمونه گیری از بیماران در حالی انجام شد که آن ها ۴ هفته کلیه داروهای موضعی و سیستمیک جهت درمان آکنه را قطع کرده بودند و افراد بالای ۱۰ سال برای مطالعه گزینش و برای نمونه گیری انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند. برای هر بیمار پرسش نامه ای تهیه شد که اطلاعاتی در مورد مشخصات فردی، مشخصات تظاهرات کلینیکی بیماری و نتایج آزمایشات در آن ثبت می شد. به منظور نمونه گیری از هر فرد، دو عدد سوآپ پنبه ای را درون لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی قرار داده پس از آن لوله ها را در اتوکلاو استریل می گردید. جهت نمونه برداری ابتدا مکان های مورد نظر روی سطح پوست به وسیله الکل هفتاد درصد ضد عفونی می شدند. یکی از سوآپ های استریل را کاملاً روی سطح آکنه و حاشیه اطراف آن کشیده، سپس سوآپ را به درون محیط کشت وارد و به خوبی تکان داده، سپس سوآپ ها دور انداخته می شدند. هم چنین از دو عدد لوله آزمایش حاوی محیط کشت برین هارت انفوزیون براث(BHISigma-Aldrich-) به عنوان محیط انتقالی استفاده می گردید. در مرحله بعد به وسیله لانست یک خراش در سطح آکنه ایجاد کرده و توسط فشار دست محتویات داخل ضایعه تخلیه و به کمک سوآپ استریل دوم به محیط کشت دوم انتقال داده می شدند. بر روی هر دو لوله شماره نمونه هم چنین سطحی یا عمقی بودن آن مشخص می گردید(۶،۹،۱۸). سوآپ های استریل بعد از انتقال به آزمایشگاه بر روی محیط سابورو دکستروزآگار(Merck, Germany) حاوی کلرامفنیکل(Sigma-Aldrich) کشت خطی داده می شدند. پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷

درجه سانتی گراد انکوبه می گردیدند. در صورت وجود کلنی های مشکوک به مخمر برای تشخیص نوع آن از طریق آزمایش میکروسکوپی(Nikon, Tokyo, Japan) و جداسازی آن ها از کشت مجدد پاساژهای متوالی انجام می گرفت. بعد اثبات مخـــمری بودن کلنی های رشد یافته مطابق با روش های استاندارد قارچ شـــناسی شامل بررسی های ماکروسکوپیک کلنی های مخمری، امکان تشکیل لوله زایا، تعیین و افتـــراق گـــونه ها بر روی مـــحـــیط کـــروم آگـــــــار (BD)، (Biosciences Missisanga) (Ontario, Canada) و کشت بروی محیط کورن میل آگار(Merck, Germany) و ایجاد کلامیدیوسپور برای تعیین جنس مورد بررسی قرار می گرفتند. برای تایید مخمرهای مشکوک به کاندیدا روش شناسایی ملکولی برای تعیین نوع گونه انجام می شد(۹،۱۰).

اســتخراج DNA و تعیین گونه به روش تعیین توالی یابی: برای استخراج DNA از بافر لیز کننده بافر استات سدیم، پروتئیناز K، ایزوپروپیل الکل، اتانول ۷۰ درصد و دانه های شیشه ای ۰/۵ میلی لیتری استفاده گردید(۱۱،۱۲). مطابق با استفاده از روش کیت و پروتکل ارائه شده، استخراج DNA انجام گرفت. به منظور بررســـی کیفیـــت DNA اســـتخراج شده الکتروفورزیس بر روی ۱ درصد ژل آگاروز انجام شد. در شرایط کمی، مواد حاصل این مرحله در طول موج ۲۶۰ نانومتر با استفاده از روش اسپکتروفتومتری بررسی شدند(۱۱،۱۲).

روش PCR: تعیـــین تـــوالی DNA ریبـــوزومی قـــارچ هـــا، بیـــانگر یـــک روش کلاسیک در شناسایی ســـریع و تاکســـونومی قارچ ها از طریق روش هـای مولکـولی می باشد. ژنوم قارچ ها حاوی نـواحی خاصـی اسـت کـه بـه لحـاظ تنـوع سـکانس نوکلئوتیـدی در گونـه هـای مختلـف یـک جـنس، ارزش زیـادی در شـــناسـایی گونه های قـــارچی و پیگیری اپیدمیولوژی مولکولی آن ها دارنـد. در این روش شناسایی سریع قارچ ها با توالی بخش های ITSl و ITS4 انجام می شود در این روش ابتدا از یـک پرایمـر اختصـــاصی(Gen Fan Avaran, Iran) برای تکـثیر قطـــعه 5.8s rDNA استفاده می گردد که برای تکثـــیر تمام گـــونه های کاندیدا کاربرد دارد در این روش پرایمر رفت و برگشت روش توالی یابی نواحی یونیور سال ویژه مناطق ۱ و ۴ در نواحی ITS بر اساس منابع مختلف تهیه و تایید نهایی ایزوله های شناسایی شده با استفاده از منابع اطلاعاتی و نرم افزارهای رایج مولکولی صورت گرفت(۱۲،۱۳).

Primerforward: ITS1 (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´)
Primer reverse: ITS4 (5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´)

واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل 14µl از dH_2O، 25µl از (2x) master mix (سینا کلون)، 0.5µl از هر پرایمر(با غلظت 10 p/mol)، 10µl از DNA الگو واکنش PCR در دستگاه ترموسیکـــلر (bio Rad Co.USA) انجام شد. سیکل های گرمایی شامل دناتوره ابتدایی ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، که با ۳۵ سیکل به صورت زیر دنبال می گردید (دناتوره ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه)، (اتصال: ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه)، (تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه)، و یک مرحله تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. بعد از اتمام کار برای اطمینان از صحت آن، محصول در دستگاه الکتروفرز و بر روی ژل آگارز(Power supply, model, USA) مورد بررسی و بعد از صحت کار به شرکت ژن فناوران برای تعیین گونه ها فرستاده شد. سپس توالی های DNA به دست آمده با استفاده از نرم افزار رایج مولکولی آنلاین در سایت NCBI/blast آنالیز گردید(۱۲،۱۳).

بررسی حساسیت دارویـی گونـه هـای کاندیـدایی شناسـایی شـده نسـبت بـه عوامـل ضـد قـارچی بـه روش(CLSI-M27-A3): بـرای ایـن منظـور از روش تست میکرودیلوشـن بـراث مطـابق بـاروش اسـتاندارد جهانی(CLSI M27A3) سال ۲۰۱۶ اسـتفاده گردیـد. رقیق سازی غلظت های مختلـف از داروهـای انتخـاب شـــده(Sigma-Aldrich) در محـــیط RPMI1640 همراه L گلوتامین از طریـق غلظـت هـای دوتـایی در میکروپلیت ۹۶ خانه ای انجـام شـد. بـه منظـور تهیـه محلـــول اســـتوک ۲۵۶ میکروگـــرم در میلـــی لیتـــر فلوکونازول(FCZ) مقدار ۱/۳ میلی گـرم پـودر خـالص فلوکونازول در ۱۰/۱ میلی لیتـر DMSO حـل گردیـد.

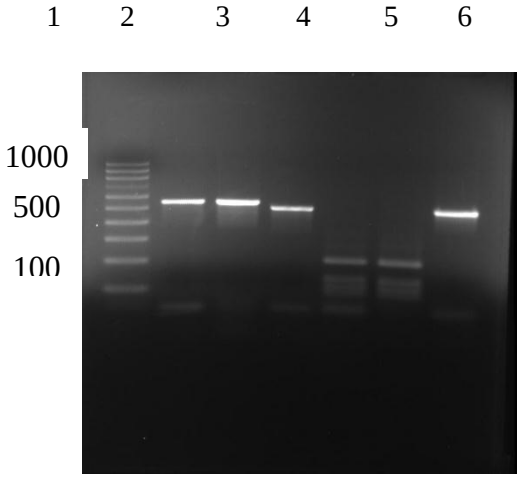
برای انجام تست مطابق با جداول استاندارد رقت های ۶۴ تا ۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از این دارو تهیه شد. به منظور تهیه محلول استوک ۱۶۰۰ µg/ml از داروهایی ایتراکونازول(ITZ) و کتوکونارزول(KTZ) مقدار ۰/۰۸ gr از داروهای فوق توزین و جداگانه در DMSO, 50 ml حل می گردید و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری می شد. محلول های استوک در دمای ۲۰- تا ۳ ماه قابل نگهداری بودند. جهت انجام تست میکرودایلوشن ایتراکونازول، ۱۰ رقت از ۰/۰۳۱۲۵ تا ۱۶ میکروگرم در میلی لیتر و برای کتوکونازول، ۸ رقت از ۰/۰۳۱۲۵ تا ۸ میکروگرم در میلی لیتر فراهم می شد. برای تهیه ماده تلقیحی ابتدا کاندیداهای مورد مطالعه را بر روی محیط سابورد دکستروز آگار کشت خطی داده و در دمای ۳۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت نگهداری می گردید سپس از مخمر رشد یافته سوسپانسیونی در لوله هایی در پیچدار حاوی سرم فیزیولوژی استریل تهیه و غلظت سوسپانسیون مخمرهای مورد مطالعه را با استفاده غلظت استاندارد نیم مک فارلند($۱/۵\times۱۰^{۸}$) سنجیده شد(۱۴،۱۵).

انجام تست Microdilution Broth: برای انجام تست میکرودالیشون برای هر مخمر، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های تهیه شده از داروهای مورد نظر در فوق را درون گودی های ۲ تا ۱۱ میکروپلیت های ۹۶ خانه ای اضافه می گردید به طوری که حفره اول (کنترل مثبت و حفره فاقد دارو و ارگانیسم و فقط حاوی محیط کشت RPMI1640) حفره دوم مشتمل بر بیشترین غلظت دارو(بیشترین غلظت رقت داروی ساخته شده برحسب سه داروی فوق) و حفره ۱۱ کمترین غلظت دارویی مورد نظر و حفره ۱۲ کنترل منفی(حاوی محیط کشت RPMI1640 بدون دارو و حاوی میکروارگانیسم) بود. سپس به هر یک از حفره ها ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی مخمری با غلظت نهایی معادل نیم مک فارلند و ۵۰ میکرولیتر محیط RPMI1640 (Sigma-Aldrich) اضافه می شد. میکروپلیت ها در دمای ۳۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت انکوبه می گردیدند. پایین ترین غلظت دارویی که قارچ بعد از این مدت در آن حفره هیچ رشدی نداشت، MIC90 بود یعنی در آن رقت حساسیت دارویی وجود دارد MIC90 برابر است با غلظتی از آنتی بیوتیک که مانع رشد ۹۰ درصد مخمر مورد مطالعه در میکروپلیت ها می شود میزان رشد در مقایسه با حفره کنترل مثبت که فاقد هر گونه دارو بوده و هم چنین با حفره کنترل منفی که فاقد ارگانیسم است سنجیده می شد. MIC50 برابر است با غلظتی از آنتی بیوتیک که مانع رشد ۵۰ درصد از مخمرهای مورد مطالعه در میکروپلیت ها گردیده که دقیق ترین و با ارزش ترین غلظت است خواندن نتایج MIC در کنار ارزیابی چشمی و با استفاده از آینه انجام می گرفت. مقدار رشد در لوله های حاوی مخمر به صورت چشمی با میزان رشد در لوله های کنترل منفی(بدون عامل ضد قارچی) مقایسه می شد که برای هر گونه مخمر و داروهای مورد مطالعه فرق می کرد. این مقادیر نشان دهنده غلظت دارو است که مانع رشد ۵۰ درصد و ۹۰ درصد از جدایه ها می شد(۱۵). برای اطمینان از خواندن درست نتایج از دستگاه اسپکتوفتومتر با طول موج ۶۲۰ نانومتر(sigma, Germany) استفاده می گردید(۱۰،۱۴،۱۵) نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ اطلاعات به دست آمده مورد تجزیه و تحلیل($P<0.05$ به عنوان سطح معنی دار) قرار می گرفت.

یافته های پژوهش

در این تحقیق با توجه به بررسی های به عمل آمده از ۷۰ نمونه مورد مطالعه مشخص گردید که ۷۰ درصد بیماران زن(۴۹ نفر) و ۳۰ درصد آن ها مرد(۲۱ نفر) بودند. ۹۱/۴۳ درصد(۶۴ نفر) بیماران مورد بررسی مجرد و ۷/۵۷ درصد(۷ نفر) متاهل بودند. اکثر بیماران مورد مطالعه(۴۷/۵۱ درصد) برابر ۳۲ نفر در گروه سنی ۱۵ تا ۲۰ سال و بعد آن گروه سنی ۲۵-۲۰ ساله به تعداد ۱۸ نفر و گروه سنی ۳۰-۲۵ برابر ۱۲ نفر،گروه سنی ۱۵-۱۰ ساله برابر ۶ نفر و کم ترین آن ها مربوط به گروه سنی ۳۵-۳۰ ساله برابر ۲ نفر به ترتیب قرار داشتند. ۷۷/۱۴ درصد بیماران مورد بررسی(۵۴ نفر) ساکن مناطق شهری و ۲۲/۸۶ درصد افراد مورد مطالعه برابر ۱۶ نفر ساکن روستاها بودند. ۸۶ درصد بیماران مورد بررسی برابر ۳۰ نفر دارای تحصیلات زیر دیپلم، ۱۴ نفر لیسانس، ۱۳ نفر فوق لیسانس، ۱۰ نفر دیپلم و کمترین

آن ها برابر ۳ نفر دارای تحصیلات دکتری بودند. ۴۳/۸۶ درصد بیماران(۳۷ نفر) دارای سابقه خانوادگی و ۳۵ نفربرابر ۴۷/۱۴ درصد فاقد سابقه بیماری بودند. ۴۱ نفر(۵۸/۵۷ درصد) بیماران سابقه درمان و ۲۹ نفر(۴۱/۴۳ درصد) سابقه درمان بیماری نداشتند. مطابق با کشت نمونه ها در محیط های تشخیصی از ۷۰ نمونه مورد بررسی ۱۲ مورد رشد مثبت کاندیدا داشته که با انجام روش های تکمیلی ذکر شده در روش کار، در نهایت ۱۱ گونه کاندیدا(۱۷/۱۵ درصد) را مورد شناسایی ملکولی قرار گرفت(شکل شماره ۱). گونه های جدا شده به ترتیب شامل کاندیدا پاراپسیلوزیس ۸ مورد(۷۲/۷۳ درصد)، کاندیدا کروزئی ۱ مورد(۱۲/۵ درصد)، کاندیدا لوزیتانیا ۱ مورد(۱۲/۵ درصد)، کاندیدا کفیر ۱ مورد(۱۲/۵ درصد)، و یک مخمر مشکوک به کاندیدا به عنوان ترایکوسپورون اساهی تایید شدند(شکل شماره ۱). بررسی میزان حساسیت ایزوله های کاندیدا پاراپسیلوزیس نسبت به غلظت های مختلف داروهای ضد قارچی مورد مطالعه برای جدایه های گونه های ۱ الی ۸ کاندیدا پاراپسیلوزیس(Cp1 الی Cp8) نشان داد که MIC50 ایزوله Cp5 برابر با ۳۲، ۰/۵ و ۰/۲ میکروگرم بر میلی لیتر و MIC90 برابر با ۶۴<، ۱> و ۰/۵> میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب به نسبت به داروهای فلوکونازول، ایتراکونازول و کتوکونازول مقاوم بودند. بقیه ایزوله ها غیر از ایزوله های Cp1 و Cp8 تقریباً مقاومت نسبی را نسبت به این داروهای ضد قارچی نشان دادند. بقیه گونه های کاندایی غیر از ایزوله های پاراپسیلوزیس به داروهای مورد مطالعه حساس بودند(جدول شماره ۱).



شکل شماره ۱. نتایج تکثیر DNA ژن ITS(ITS1 and ITS4primers) گونه های کاندیدا(۳۵۰ تا ۸۸۰ باز) بر روی الکتروفورز ژل: ۱-ستون اول مارکر(لدر)، ۲-ستون دوم کاندیدا پاراپسیلوزیس(شماره ۱) bp ۵۲۱، ۳-ستون سوم کاندیدا پاراپسیلوزیس(شماره ۲) bp ۵۲۱، ٤-ستون چهارم کاندیداکروزئی pb۵۰۳، ٦-ستون هفتم کاندیدا لوزیتانیاpb ۳۷۸ (۱۲)

جدول شماره ۱. نتایج بررسی حساسیت گو نه های کاندیدایی ایزوله شده از بیماران آکنه نسبت به داروهای ضد قارچی

ایزوله کلینیکی	داروی ضد قارچی		
	FCZ	ITZ	KTZ
C. parapsilosis(n=5) MIC range(µg/ml)	0.063-64	0.016-16	0.016 - 16
MIC50(µg/ml)	0.25-4	0.06-0.125	0.06-0.25
MIC90(µg/ml)	1-8	0.125-0.25	0.125-0.5
C. parapsilosis(Cp5) MIC range (µg/ml	0.063-64	0.016-16	0.016-16
MIC50(µg/ml)	32	0.5	0.25
MIC90(µg/ml)	<64	<1	<0.5
C.parapsilosis(Cp1,Cp8) MIC range(µg/ml)	0.063-64	0.016-16	0.016-16
MIC50(µg/ml)	8-16	0125-0.25	0.25
MIC90(µg/ml)	8-32	0.25-0.5	0.5
C. Lusitania MIC range(µg/ml)	0.063-64	0.016-16	0.016-16
MIC50(µg/ml)	0.25	-	-
MIC90(µg/ml)	1	0.125	0.0625
C. kefyr MICrange(µg/ml)	0.063-64	0.016-16	0.016-16
MIC50(µg/ml)	0.25	-	0.0625
MIC90(µg/ml)	0.5	0.125	0.125
C. krusei MIC range(µg/ml)	0.063-64	0.016-16	0.016-16
MIC50(µg/ml)	16	0.25	0.25
MIC90(µg/ml)	32	0.5	0.5

بحث و نتیجه گیری

اساس ایجاد آکنه، اختلال در ترکیب و شدت چربی ترشح شده از غدد چربی و هم چنین اختلال در روند و شدت شاخی شدن است. علت دقیق این بیماری شناخته نشده است ولی پزشکان عوامل مختلفی را در آن دخیل می دانند(۷). تشخیص آکنه، یک تشخیص کلینیکی است. یعنی پزشک با معاینه بیمار شاکی از این عارضه پوستی و با مشاهده نوع ضایعات، ضمن تشخیص بیماری، شدت آن را نیز تشخیص می دهد تا پروتوکل درمانی لازم را برای آن برنامه ریزی کند. تاکنون کمتر به نقش مخمرها در ایجاد آکنه پرداخته شده است. در این مطالعه شناسایی گونه های کاندیدا در افراد با تظاهرات کلینیکی آکنه با روش های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و در نهایت ملکولی انجام گرفت. در این تحقیق با توجه به بررسی های به عمل آمده حاصل از ۷۰ نمونه افراد مورد بررسی مشخص گردید که ۷۰ درصد بیماران مورد بررسی زن و ۳۰ درصد آن ها مرد بودند. ۹۱/۴۳ درصد بیماران مجرد و ۷/۵۷ درصد متاهل بودند. اکثر بیماران مورد مطالعه(۴۷/۵۱ درصد) برابر ۳۲ نفر در گروه سنی ۱۵ تا ۲۰ سال قرار داشتند. ۵۲/۸۶ درصد بیماران(۳۷ نفر) دارای سابقه خانوادگی و ۳۵ نفر برابر ۴۷/۱۴ درصد فاقد سابقه این بیماری بودند. ۴۱ نفر(۵۸/۵۷ درصد) بیماران سابقه درمان و ۲۹ نفر(۴۱/۴۳ درصد) سابقه درمان نداشتند. در مطالعه اعتضادی و همکاران از میان ۱۲۵ بیمار مورد مطالعه ۷۰ مورد(۵۶ درصد) زن و ۵۵ مورد(۴۴ درصد) مرد بودند و دارای رنج سنی ۴۰-۱۲ سال بودند هم چنین از میان بیماران ۵۸ نفر(۴۶/۴ درصد) دارای سابقه فامیلی آکنه و ۶۷ نفر(۵۳/۶ درصد) فاقد سابقه فامیلی این بیماری بودند. ۲۳ نفر(۱۸/۴ درصد) از بیماران دارای سابقه مصرف دارو ۱۰۲ نفر(۸۱/۶ درصد) هیچ دارویی برای درمان آکنه مصرف ننمودند(۱۸).

بر اساس نتایج کـــشت و سایر آزمایش های تشخیصی از ۷۰ نمونه مورد بررسی ۱۲ کلنی مشکوک به کاندیدا شناسایی گردیدند و با تایید روش ملکولی در تعیین گونه(شرکت ژن فناوران) در نهایت ۱۱ گونه کاندیدا(۱۷/۱۵ درصد) به ترتیب جداسازی و شناسایی شدند. کاندیدا پاراپسیلوزیس ۸ مورد(۷۲/۷۳ درصد)، کاندیدا کروزئی ۱ مورد(۱۲/۵ درصد)، کاندیدا لوزیتانیا ۱

مورد(۱۲,۵٪)،کاندیدا کفیر ۱ مورد(۱۲/۵ درصد)، و یک مخمر مشکوک به کاندیدا که به عنوان ترایکوسپورون اساهی گزارش گردید. در مطالعه اعتضادی و همکاران از ۱۲۵ نمونه مورد مطالعه ۴۵/۶ درصد کاندیدای جدا شده از بیماران در میکروسکوپی مستقیم، تنها ۱۱ مورد(۲۴/۴ درصد) در کشت نمونه ها از نظر رشد کلنی گونه های کاندیدا مثبت گردیدند که شامل کاندیدا پاراپسیلوزیس(۲۷/۲ درصد)، کاندیدا کروزئی(۲۹/۴ درصد)، کاندیدا دابلینینسیس(۱۸/۲ درصد)، کاندیدا کفیر(۱۸/۲ درصد) و کاندیدا گلابراتا(۱۸/۲ درصد) بودند. ۳۴ مورد(۷۵/۶ درصد) و کاندیدا جدا شده از سطح آکنه شامل کاندیدا کروزئی، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گیلرموندی، کاندیدا دابلینینسیس، کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کفیر و کاندیدا زیلانوئید بودند(۱۸).

در مطالعه ای که کلارستاقی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در ساری به منظور بررسی شیوع مالاسزیا در بیماران آکنه و ارزیابی حساسیت دارویی گونه های جدا شده از کشت ۱۲۳ بیمار مبتلا به آکنه در حدود ۲۳ مورد(۱۸/۸ درصد) از نظر رشد قارچی، مثبت بودند که در مجموع ۳ مورد مالاسزیا فورفور تشخیص داده شدند بقیه موارد مثبت مربوط به جنس کاندیدا بود که ۲ مورد کاندیدا گلابراتا و یک مورد کاندیدا آلبیکنس و ۱۷ مورد، دیگر گونه های دیگر کاندیدا تشخیص داده شدند(۱۹). در بررسی که هی جون و همکاران با هدف ارتباط بین مالاسزیا و آکنه استروئیدی در ۱۲۵ فرد مبتلا به آکنه استروئیدی انجام گردید مخمر مالاسزیا در فولیکول های زخمی ۸۰ درصد بیماران دیده شد. هم چنین قطع آنتی بیوتیک های باکتریایی و استعمال داروهای ضد قارچی موضعی و خوراکی کاهش معنی داری در حذف پاسچول ها و گاهی ناپدید شدن زخم ها را نشان دادند که این مطلب می تواند بیانگر نقش بیماری زایی مالاسزیا در ایجاد آکنه باشد. در بین داروهای ضد قارچی خوراکی در درمان این بیماران ایتراکونازول بهتر از سایر داروها از نظر بالینی برروی این مخمرها تاثیر داشت(۲۰). در بررسی چان و همکاران در سال ۲۰۱۱ در بیماران آکنه، پروپیونی باکتر از مالاسزیا و استافیلوکوک بیشتر جداسازی شد و هیچ تفاوت معنی داری بین میکروبیولوژی پوست در بیماران با آکنه نوجوانی و آکنه مداوم و آکنه در سنین بالا وجود نداشت. رشد مالاسزیا در کشت ۵۰ درصد بیماران مبتلا به آکنه در این بررسی گزارش گردید(۲۱). در یک مطالعه که توسط Nguyen و همکاران در سال ۲۰۰۹ به منظور بررسی ارتباط مابین آنزیم لیپاز و بیماریزایی کاندیدا پاراپسیلوزیس انجام شد و بررسی بیان این ژن با کلون سازی در باکتری ساکارومایسس سرویزیه و در نتیجه نقش این ژن در بیماریزای کاندیدا اثبات گردید(۲۲). با توجه به این مطالعه و اکثر مطالعات دیگر(۶،۲۳،۲۴) کاندیدا پاراپسیلوزیس بیشترین شیوع این بیماری در ایجاد کاندیدیوزیس جلدی را داشته است. البته در برخی از همین مطالعات گزارشاتی از افزایش شیوع گونه های غیر آلبیکنسی را نسبت به کاندیدا آلبیکنس و مالاسزیا وجود دارد که به نظر می رسد علت این امر آن مصرف زیاد آزول های معمولی و پدیدار شدن گونه های مقاوم به این آزول ها باشد. سال های زیادی کاندیدا آلبیکنس به عنوان عامل اصلی کاندیوزیس جلدی در نظر گرفته می شده است اما در دهه های اخیر شیوع گونه های دیگر از قبیل کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کفیر، کاندیدا تروپیکالیس و دیگر گونه های غیرآلبیکنسی رو به افزایش است. آنزیم های خارج سلولی این گونه های کاندیدایی در چسبندگی به سلول میزبان و هضم دیواره های سلولی میزبان به عنوان منبع تغذیه و هجوم بیشتر کمک می کنند(۴،۱۷). برخی بررسی های انجام شده قبلی نیز نشان می دهد که الزاماً بین گونه میکروفلور جداشده از پوست دارای ضایعه و پوست سالم اطراف ضایعات همسانی وجود ندارد. هر چند نمی توان نقش مهم فلور قارچی پوست در ایجاد فولیکولیت یا آکنه توسط مخمرها را نادیده گرفت. لذا با توجه به میزان حضور بسیار بالاتر مالاسزیا در مقایسه با کاندیدا در پوست تحت عنوان میکروفلور پوستی، ارزیابی نتایج چنین مطالعات ذکر شده ای می تواند این استنتاج را به وجود آورد که فلورنرمال کاندیدایی پوست هم می تواند به عنوان عامل مسبب آکنه، مد نظر قرار گیرد.

از طرف دیگر با توجه به ماهیت مخمری این دو قارچ اکتفا نمودن به نتایج اسمیر مستقیم از ضایعه می تواند نتیجه گیری اشتباه را در نظر داشت لذا کشت از نمونه های برداشت شده از ضایعات مورد تاکید قرار می گیرد. در این بررسی میزان حساسیت دارویی ایزوله های کاندیدا پاراپسیلوزیس Cp1 تا Cp8 نسبت به غلظت های مختلف داروهای ضد قارچی مورد مطالعه مشخص کرد که MIC50 ایزوله Cp5 برابر با ۰/۲، ۰/۵، ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر و MIC90 برابر با ۰/۵> ،۱> و ۶۴> میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب به نسبت به داروهای فلوکونازول، ایتراکونازول و کتوکونازول مقاوم بودند. بقیه ایزوله های کاندیدا پاراپسیلوزیس غیر از ایزوله های Cp1 و Cp8 تقریباً مقاومت نسبی را نسبت به این داروها نشان می دادند و بقیه ایزوله های پاراپسیلوزیس به داروهای مورد مطالعه، حساس بودند. در واقع با توجه به MIC گونه های مختلف کاندید این بررسی نشان داده شد که کاندیدا پاراپسیلوزیس افزایش معنی داری مقاومت دارویی نسبت به سایر گونه ها از خود نشان داده است و استفاده از داروهای ازول جدید نسبت به آزول های قدیمی تر در مقابل گونه غیر البیکنس که شیوع آن ها در حال افزایش است حساسیت بیشتری نشان می دهند و بایستی ارتباط بالینی این مخمرها با مقاومت به این داروها در چنین بیماری هایی در حین درمان بررسی شود. بنا بر این نیازمند تحقیقات بیشتر بر روی میکروب ها و روش انتقال این گونه ها است.

در بررسی Arevalo حساسیت گونه های کاندیدایی ایزوله شده در برابر فلوکونازول، ایتراکونازول و کتوکونازول مربوط به ۶۲۵ سویه مخمری که شامل کاندیدا آلبیکنس(۳۸۸)، تروپیکالیس کاندیدا(۸۴)، کاندیدا گلابراتا(۸۴)، پاراپسیلوزیس کاندیدا(۶۹) نشان داده شد که ۱۰/۰ درصد و ۸/۸ درصد از کاندیدا آلبیکانس به ترتیب به ایتراکونازول و فلوکونازول مقاوم و ۱/۸ درصد به کتوکونازول مقاوم بودند. ۳۹/۵ درصد از کاندیدا تروپیکالیس به ایتراکونازول، ۳۴/۵ درصد به فلوکونازول و ۲/۴ درصد به کتوکونازول مقاوم بودند. ۱۹/۱ درصد از کاندیدا گلابراتا به فلوکونازول و ۱۳/۱ درصد به ایتراکونازول مقاوم بودند. ۴/۴ درصد از کاندیدا پاراپسیلوزیس به داروی فلوکونازول و ۱/۵ درصد به ایتراکونازول مقاوم بودند. در این مطالعه کاندیدا تروپیکالیس مقاوم ترین و کاندیدا پاراپسیلوزیس به عنوان حساس ترین گونه ها مورد بررسی گزارش شدند(۲۵). این مطالعه تقریباً با مطالعه حاضر ما هم خوانی داشت. مطالعه Grossman و همکاران(۲۰۱۵) در بررسی مقاومت به فلوکونازول که ۱۲۲ مورد کاندیدا پاراپسیلوزیس ایزوله شده مشخص کردند و ۵۷ درصد نمونه های مقاوم به دارو این مطالعه تغییر در یک آمینواسید در زیر واحد ۱۴ ژن erg11 وجود داشته داشت و در سویه های حساس، این تغییر زیر واحد دیده نشد(۲۶).

همان طور که مطالعات مختلف ثابت کرده اند اکثر موارد عوامل باکتریایی در ایجاد آکنه دخیل اند در خیلی از این موارد ما در درمان این بیماران دچار مقاومت آنتی بیوتیکی هستیم. با توجه به نتایج چندین مطالعه تغییرات در وضعیت فلورمیکروبی پوست(۲۸) و وجود ژن های لیپاژ مخمرهای کاندیدا و مالاسزیا(۲۹،۳۰) با مکانیسم ایجاد ضایعات پوستی می توان این آنزیم را یکی از عوامل حدت این مخمرها در ایجاد بیماری آکنه در نظر گرفت و در مرحله بعد به عنوان هدف مناسب تحقیقات در روش های درمانی این بیماری در مواردی که ممکن اصلاً باکتری ها عامل بیماری نباشند مورد توجه میکروبیولوژیست ها و پزشکان قرار گیرد. در مورد بیماران مبتلا به آکنه و تحت درمان با آنتی بیوتیک ها و داروهای ضد قارچ که به طور نسبی به آن پاسخ می دهند یا اصلاً پاسخ نمی دهند و به خصوص در مورد بیماران آکنه ای با سابقه درمان طولانی باید تست حساسیت دارویی برای این افراد انجام شود تا در صورت مشاهده مقاومت دارویی از ادامه معالجه با آن دارو خودداری شود. از این رو در چنین مواردی پیشنهاد می شود ابتدا تشخیص صحیح عامل ایجادکننده آکنه بررسی و سپس درمان های موضعی و دارویی خوراکی مناسب انجام شود و با توجه به این که مطالعه بر روی تعداد معدودی از بیماران انجام شده است جهت کنکاش بیشتر در این زمینه تحقیقات وسیع تر با جمعیت بیشتر و اهداف اختصاصی تری به عمل آید.

این بررسی بیانگر این مطلب است که با توجه به این که اکثر موارد عـــوامل باکتری در ایجاد آکنه دخیل اند بر اساس نتایج این مطالعه و مطالعات مشابه برخی از گونه های کاندیدا نیز به عنوان عامل اتیولوژیک طیف گسترده ای از آسیب های پوستی نیز در کنار سایر عوامل اتیولوژیک میکروبی در ایجاد آکنه می توانند مطرح باشند. جدایه های گـــونه کاندیدا می توانند به داروهای ضد قارچی مقاوم باشند و این می تواند یکی از دلایلی باشد که در درمان مداوم این بیماری شکست درمانی وجود دارد. دستیابی به هدف فوق می تواند یک گام بـزرگ در پاســخ به ســوالات اپیدمیولوژیک، درمـــان بیمـــاری و از بین بردن مشـــکلات بهداشـــتی مرتبـــط با ایـــن بیـــماری باشد.

سپاسگزاری

با سپاس فراوان از همـــکاری معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگـــاه آزاد اسلامی واحد تنکابن که در تصویب و تامـــین هـــزینه های این طرح تحقیقاتی از محـــل بـــودجه پژوهشی کمال همکاری را داشته و هم چنـــین کارشـــناسان آزمایـــشـــگاه گروه مـــیکروبیولوژی که امـــکان انجـــام این تحقیق را میسر نمـــودند تشکر و قدردانی می گردد.

References

1.Kurokawa I, Danby FW, Ju Q, Wang X, Xiang LF, et al. New developments in our understanding of acne pathogenesis and treatment. Exp Dermatol 2009; 18:821-32. doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.00890.

2. Tanghetti EA. The role of inflammation in the pathology of acne. Clin Aesthet 2013; 6:27-35.

3. Burkhart CG, Burkhart CN, Lehmann PF. Acne: are view of immunologic and microbiologic Factors. Postgrad Med J 1999; 75:328-31. doi:10.1136/pgmj.75.884.328

4. Alver O, Gurcan S, Ozkaya G, Ener B. The effects of virulence factors on invasion in various species of Candida. Af J Microbiol Res2013; 7: 719-23. doi: 10.5897/AJMR11.1410.

5. Asbeck E CV, Clemons KV, Stevens DV. Candida parapsilosis a review of its epidemiology pathogenesis clinical aspects typing and antimicrobial susceptibility. Crit Rev Microbiol 2009; 35: 283-309. doi: 10.3109/10408410903213393.

6. Kang SH, Kim HU. The isolation of malassezia yeasts in the comedones of Acnevulgaris. Korean J Med Mycol 1999;4:33-9. doi: 10.5021/ad.2009.21.1.18.

7.Kurokawa I, Danby F, WJu Q,Wang X , Xiang LF, Xia L, et al. New developments in ourunderstanding of acne pathogenesis and treatment. Exp Dermatol 2009;18, 821-32. doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.00890

8.Song Y CH , Hahn H J, Kim JY, Ko J H ,Lee YW, et al .Epidemiologic study of Malassezia Yeasts in acne patients by analysis of 26s rDNA PCR RFLP. Ann Dermatol 2011; 23:321-8. doi:10.5021/ad.2011.23.3.321.

9. Vigneshkanna B, Amarkumar G, Swapna M, Joshy M. Easow isolation and identification of candida species from various clinical samples in a tertiary care hospital. International J Res Med Sciences2017; 5:3520-2. doi: http://dx.doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20173554

10.Ataides FS, Costa CR, Hasimot Lk, Souza LK, Fernandes ODL, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of Candida parapsilosis complex species isolatedfrom culture collection of clinical samples. Rev Soc Brasileira Med Trop2015; 48:454-9. doi:10.1590/0037-8682-0120-2015.

11. Looke M, Kristjuhan K, Kristjuhan. Extraction of genomic DNA from Yeast for PCR-based application. Biotechniques 2011; 50: 325-8. .doi: 10.2144/000113672.

12. Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. J Clin Mic 2001; 39:3617-22. doi:10.1128/JCM.39.10.3617-3622.2001.

13.Pryce TM, Palladino S, Kay ID, Coombs GW. Rapid identification of fungi by sequencing the ITS l and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system. Med Mycol 2003;

41: 369-81 doi:10.1080/13693780310001600435.
14.Chen YC, Lin YH , Chen KW, Lii J, Teng HJ, Li SY. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of Candida parapsilosis sensu stricto Candida orthopsilosis and andida metapsilosis in Taiwan. Diagn Microbiol Infect Dis 2010; 68: 284-92. doi:10.1016/j.diagmicrobio.
15.CLS I. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts 3th ed. Clin Lab Standards Ins Wayne Publication. 2008; P.209-11.
16.Zouboulis C, Eady A, Philpott M L, Goldsmith A, Orfanos C, Cunliffe W, Rosenfield R. What is the pathogenesis of acne? Exp Dermatol 2005; 14: 143-52. doi:10.1111/j.0906-6705.2005.0285a.x
17. Singaravelua K, Gacserb A, Nosanchuka DJ. Forum genetic determinants of virulence Candida parapsilosis. Rev Iberoam Micol 2014; 31:16-21. doi: 10.1016/j.riam.2013.09.018
18. Etezadi T, Hajheydari Z, Kalarestaghi AR, Nasrollahiomran A, Shokohi T, Hedayati MT. [The prevalence of candida in skin and acne lesions of patients Candida parapsilosis and Candida krusei were the most frequent isolated]. J Isfahan Med Sch2012;30:1-7. (Persian)
19. Kalarestaghi AR, Hajheydari Z, Hedayati MT, Shokohi T. [The presence of Malassezia in acne lesions in patients referred to dermatology clinic of Booali hospital from Sari and susceptibility of isolated species to Ketoconazole and Miconazole and Clotrimazole]. J Mazandaran Uni Med Sci 2011; 24:10-20. (Persian)
20. Hu G, Wei YP, Feng J. Malassezia infection is there any chance or necessity in refractory acne? Chin Med J Engl 2010;123:628-32. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.05.022
21. Chansong Y, Jinhahn H, Youngkim J, Hyunko J. Epidemiologic study of Malassezia yeasts in acne patients by analysis of 26S rDNA PCR-RFLP. Ann Dermatol 2011; 2:321-8.doi.10/5021/ad.2011.23.3.321
22. Nguyen LN, Trofa D, Nosanchuk JD. Fatty acid synthase impacts the pathobiology of Candida parapsilosis in vitro and during mammalian infection. PLos One 2009; 4: 8421-30. doi.org/10.1371/journal.pone.0008421.
23.Gacser A, Trofa D, Schafer W, Nosanchu JD. Targeted gene deletion in Candida parapsilosis demonstrates the role of secreted lipase in virulence. J Clin Inv2007; 117 : 3049-58. doi: 10.1172/JCI32294.
24. Prohic A, Jovovicsadikovic T, Krupalijafazlic M, Kuskunovic S. Malassezia species in healthy skin and in dermatological conditions. Int J Dermatol 2016; 55:494-504. doi:10.1111/ijd.13116.
25 . Arevalo MP, Arias A, Andreu A, Rodriguez C, Sierra A. Fluconazolei itraconazole and ketoconazole in vitro activity against Candida spp. J Chemother 1994; 6:226-9.
26.Grossman NT, Pham CD, Cleveland AA, Lockhart SR. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in Candida parapsilosis isolates from a US. surveillance system. Antimicrob Age Chemother 2015; 59:1030-7. doi: 10.1128/AAC.04613-14.
27. Zandi S, Vares B, Abdollahi H. [Determination of microbial agents of acne vulgaris and Propionibacterium acnes antibiotic resistance in patients referred to dermatology clinics in Kerman Iran]. JJM2011; 4:17-22. (Persian)
28. Kong H. Skin microbiome genomics-based insights into the diversity and role of skin microbes.Trends Mol Med 2011;17:320. doi:10.1016/j.molmed.2011.01.013
29. Gacser A, Trofa D, Schafer W, Nosanchu JD. Targeted gene deletion in Candida parapsilosis demonstrates the role of secreted lipase in virulence. J Clin Inv2007;117: 3049-58. doi: 10.1172/JCI32294
30.Brunel L, Neugnot V, Landucci L, Boze H, Moulin G, Bigey F, Dubreucq E. High level expression of Candida parapsilosis lipase/acytransferase in Pichia pastoris. J Biotechnol2004; 111:41-50. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.03.007

Molecular Identification and Drug Susceptibility of Candida Species Isolated from the Skin of Patients with Acne Clinical Sings

Nasrollahiomran A[1]*

(Received: August 26, 2018 Accepted: March 16, 2019)

Abstract

Introduction: Acne is a pathological disorder and a chronic inflammation in the sebaceous follicles, and one of the most popular dermatology damages that has affected millions of people worldwide. The aim of this study was to identify Candida species in patients with acne as well as determine the drug susceptibility of these species.

Materials & Methods: In this cross-sectional study, 70 clinical specimens were taken from the skin of patients suspected of acne by the sterile swab. Subsequently, the specimens were cultured on Sabouraud Dextrose Agar containing chloramphenicol. The plates were incubated for 48 h at 37˚C. The suspected colonies were investigated through microscopic examination and subsequent passages were evaluated according to standard operating procedures and specification of the type of colony color on CHROMagar for the isolation of the yeast. The sequencing method was utilized (ITS2, ITS4) to approve C.species. In addition, the susceptibility testing was performed to assess drug-resistant isolates C. species based on the clinical and laboratory standards institute method.

Findings: In total, 11 C. species were identified and isolated that include 8 C.parapsilosis (72.73%), 1 C.krusei (12.5%), 1 C.lusitaniae (12.5%), 1 C.kefir (12.5%), and a Trichosporon asahi. According to the investigation of C. parapsilosis isolates susceptibility to various concentrations of the anti-fungal agents to isolates Cp1and Cp8, the isolated Cp5 with MIC 50 was equal to 32,0.5,0.25 and with MIC 90 of <64, <1, <0.5 μg/ml were resistant to fluconazole, itraconazole, and ketoconazole, respectively. Apart from the isolation of Cp1 and Cp8, which had relative resistance, almost all other species of C. parapsilosis isolates were susceptible to these drugs.

Discussion & Conclusions: Several studies showed that bacterial agents are involved in causing acne in most cases. According to the results of this study, it can be suggested that the yeast C. species can be introduced as an agent in the etiology of this disease. C. species isolates can also be resistant to antifungal drugs and this could be one of the causes of the treatment failures.

Keywords: Acne, Candida species, Drug susceptibility, Skin

1. Dept of Mycology, Faculty of Medicine, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran
** Corresponding author Email: AYAT 51@ yahoo.*