Applied Biology, Volume 11, Issue 41, 2021

Research Article

The investigation of Candidial onychomycosis and determination of Candida species Isolated from patients by using conventional and molecular methods[1]

Mojgan Saghazadeh Assistant Professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
(Corresponding Author). saghazadeh_99@yahoo.com
Elham Najafi Masters student, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
eli937@yahoo.com

Abstract

Background: Onychomycosis consider as the most common nail diseases and yeasts are the important causative agents in onychomycosis. The aim of current study is the investigation of candidial onychomycosis and investigation of isolated species using direct examination.culturing and PCR-RFLP techniques.

Methods: In this cross- sectional study nail sampling has been examined in 280 patients with dystrophic nail problem who were the applicant of Medical mycology laboratory in Tehran. Direct examination test, Culturing on SDA, candida Chrome agar, Corn meal agar and germ tube test were used for identification of isolated yeasts from onychomycosis and finally PCR-RFLP techniques using MSP1 enzyme were performed for definitive diagnosis of Candida species which had not been identified by conventional methods.

Results: Out of 280 patients with onychomycosis 54 cases (candida albicanse), 16 cases (candida parapsilosis), 7 cases (candida tropicalis), 6 cases (candida glabrata), 3 cases (candida krusei) and 1 case (candida guilliermondii) have been identified respectively. In order to identification of unknown species and also confirmation of the results of conventional methods PCR-RFLP genotyping methods have been performed on 20 samples. The results obtained from Culturing and direct examination and the identification of unknown species have been confirmed using PCR-RFLP methods.

Conclusion: As conventional diagnostic laboratory methods such as culturing, are time-consuming, it is better to use fast and safe genotyping techniques (PCR-RFLP) due to the possibility of better identification in species level. Therefore using modern molecular methods for diagnosis and identification in species level would be useful.

Keywords: Onychomycosis, Candida, Direct examination, Culture, PCR-RFLP.

1. **Received:** 2020/08/24 ; **Accepted:** 2021/03/12

**Copyright © the authors

http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

بیولوژی کاربردی، دوره ۱۱، شماره ۴۱، بهار ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

بررسی ضایعات کاندیدایی ناخن و تعیین هویت گونه‌های جدا شده با روش‌های قارچ‌شناسی و مولکولی[۱]

مژگان سقازاده | استادیار،گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران (**نویسنده مسئول**). saghazadeh_99@yahoo.com
الهام نجفی | دانشجوی کارشناسی ارشد، میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. eli937@yahoo.com

چکیده

هدف: اونیکومایکوزیس شایع‌ترین بیماری ناخن محسوب می‌شود که مخمرها از عوامل مهم بروز آن می‌باشند. هدف مطالعه حاضر بررسی ضایعات کاندیدیایی ناخن و تعیین هویت گونه‌های جدا شده PCR-RFLP می‌باشد.

روش‌شناسی: در این مطالعه مقطعی از ۲۸۰ بیمار دچار دیستروفی ناخن مراجعه‌کننده به آزمایشگاه تخصصی قارچ‌شناسی در تهران نمونه تهیه شد. آزمایش مستقیم و کشت در محیط‌های سابورودکستروز آگار، کروم آگار کاندیدا، کورن میل آگار و تست لوله زایا بر روی مخمرهای جدا شده از ضایعات ناخن انجام گرفت و در نهایت برای تشخیص نهایی گونه‌های کاندیدایی که تعیین هویت نشده، روش مولکولی PCR-RFLP با استفاده از آنزیم Msp1 انجام شد.

یافته‌ها: از ۲۸۰ بیمار، ۸۷ نفر انیکومایکوزیس کاندیدایی داشتند که ۵۴ مورد کاندیدا آلبیکنس و پس از آن به ترتیب کاندیدا پاراپسیلوزیس ۱۶ مورد، کاندیدا تروپیکالیس۷ مورد، کاندیدا گلابراتا ۶ مورد و کاندیدا کروزئی ۳ مورد و یک مورد کاندیدا گیلرموندی بود. به منظور تعیین هویت گونه‌های مجهول و همچنین تائید نتایج حاصل از روش‌های تشخیصی، تست ژنوتیپی بر روی ۲۰ نمونه انجام گردید و نتایج حاصل از کشت و آزمایش مستقیم و همچنین تعیین هویت گونه‌های مجهول را تایید کرد.

نتیجه‌گیری: به دلیل زمان‌بر بودن مراحل تشخیصی معمول در آزمایشگاه‌ها از جمله کشت، استفاده از روش‌های ژنوتیپی سریع و مطمئن مانند PCR-RFLP که شناسایی را در حد گونه انجام می‌دهد، بسیار کارآمد خواهد بود و روش‌های نوین مولکولی می‌تواند در تشخیص و شناسایی گونه‌ها بسیار کمک‌کننده باشد.

کلیدواژه‌ها: اونیکومایکوزیس، کاندیدا، آزمایش مستقیم، کشت، PCR-RFLP.

---

۱. **تاریخ دریافت:** ۱۳۹۹/۰۶/۳۰ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۱۲/۲۲

۱. مقدمه

اونیکومایکوزیس عفونت قارچی ناخن دست و پا است که توسط برخی از گونه‌های درماتوفیت‌ها، مخمرها و برخی قارچ‌های ساپروب ایجاد شده و حدود ۵۰ درصد بیماری‌های ناخن را به خود اختصاص می‌دهد (۲،۱). مهم‌ترین عوامل عفونت‌های قارچی ناخن در انگشتان دست، عوامل کاندیدایی هستند، در حالی که درماتوفیت‌ها از عوامل اصلی اونیکومایکوزیس ناخن پا محسوب می‌شوند (۳). گونه‌های کاندیدا، اغلب از اونیکومایکوزیس ناخن‌های دست جدا می‌گردند، چون شرایط رشدشان به دلیل تماس دست با مواد قندی، دترجنت‌ها، مانیکور و خیس خوردگی مناسب‌تر است (٥،٦ ،٤). میزان بروز اونیکومایکوزیس با سن، جنس، شغل، وضعیت بهداشت و عوامل محیطی و آب و هوایی ارتباط دارد (۸ ،۷). اونیکومایکوزیس کاندیدایی در افراد بالغ بیشتر دیده شده و در زنان رایج‌تر است. اونیکومایکوزیس یکی از نخستین تظاهرات بیماری ویروسی نقص سیستم ایمنی اکتسابی یعنی ایدز می‌باشد. با شیوع ۱۵ تا ۴۰ درصد، این عارضه در تمام سنین دیده شده، اما با افزایش سن بر بروز و شیوع آن افزوده می‌شود (۹،۱۰،۱۱، ۶). شیوع عوامل مختلف درماتوفیتی، مخمری یا ساپروفیتی عامل اونیکومایکوزیس در مناطق مختلف جغرافیایی و جمعیت‌های انسانی متفاوت است. در اکثر نقاط دنیا، شایع‌ترین عامل درماتوفیتی اونیکومایکوزیس، ترایکوفایتون روبروم (۱۴، ۱۳، ۱۲، ۶) و شایع‌ترین عامل مخمری اونیکومایکوزیس کاندیدا آلبیکنس است (۱،۶،۱۳،۱۵،۱۶،۱۷). مخمر کاندیدا جزو ارگانیسم‌های قارچی تك سلولی می‌باشد که روش تکثیر آن از طریق جوانه زدن است. این مخمرها در همه جا وجود داشته و به صورت فرصت‌طلب در بدن افراد سالم نیز حضور دارند. افزایش شیوع عفونت‌های قارچی با گونه‌های مختلف کاندیدا در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی قابل توجه بوده و در چند دهه اخیر اهمیت زیادی پیدا کرده است، گرچه کاندیدا آلبیکنس به عنوان شایع‌ترین عامل کاندیدیازیس حائز اهمیت می‌باشد (۶،۱۸،۱۹). هفت گونه در جنس کاندیدا از عوامل فرصت‌طلب شناخته شده می‌باشند، در حالی که بیماری‌زایی سایر گونه‌های کاندیدا به صورت موردی گزارش شده است (۸، ۷).

علی‌رغم وجود داروهای ضد قارچی مؤثر، درمان بیماری اونیکومایکوزیس همچنان یکی از معضلات بهداشتی محسوب می شود. با توجه به افزایش جمعیت افراد دارای نقص سیستم ایمنی و نیز تغییرات مربوط به قدرت بیماری‌زایی قارچ‌ها و همچنین بروز مقاومت‌های دارویی، گونه‌های مختلف کاندیدا، به عنوان پاتوژن‌های با اهمیتی تلقی می‌شوند (۲۰). تشخیص دقیق

عوامل ایجادکننده بیماری اونیکومایکوزیس از طریق آزمایش مستقیم، کشت و آزمایش‌های بافت‌شناسی (هیستوپاتولوژی) صورت می‌گیرد. از گذشته تا به امروز، روش‌های متعددی جهت تعیین هویت گونه‌های بیماری‌زای کاندیدا به کار گرفته شده است. این روش‌ها را به طور کلی می‌توان به دو گروه فنوتیپیک و ژنوتیپیک تقسیم کرد. روش‌های فنوتیپیک به طور مثال شامل بررسی مرفولوژی مخمرها در محیط عصاره مالت آگار، بررسی روش‌های جذب و تخمیر قندها، روش‌های سرولوژی، استفاده از محیط‌های رنگ‌زای تجاری مانند محیط کشت کروم آگار کاندیدا و روش‌های دیگر را می‌توان نام برد (۲۲، ۲۱). روش‌های تشخیصی ژنوتیپی نیز متنوع می‌باشند. از آن جمله می‌توان به استفاده از پرایمرهای اختصاصی در PCR، تعیین توالی نواحی ژنی خاص و PCR-RFLP اشاره نمود (۲۴، ۲۳). تمام روش‌های اشاره شده مفید بوده و هر کدام مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند. اگرچه روش‌های سنّتی مانند جذب و تخمیر قندها برای تعیین گونه‌های مخمری، از جمله کاندیدا قابل استفاده است، ولی این روش بسیار وقت‌گیر بوده و برای بیمار و پزشک مفید نیست، زیرا حداقل به یک تا دو هفته زمان برای خواندن نتایج نیاز است. این روش‌ها همچنین غیر حساس و پرزحمت هستند (۲۵). روش‌های دیگر تشخیص، شامل ردیابی آنتی بادی، عمدتاً در افرادی که سیستم ایمنی سرکوب شده‌ای دارند، غیرقابل استفاده است، زیرا این افراد پاسخ ایمنی فعالی ندارند. در نتیجه برای یافتن آنتی بادی در این افراد دچار مشکل هستیم. به عبارت دیگر، مقدار آن برای ردیابی کافی نیست (۲۶). ولی استفاده از روش‌های تشخیصی بر پایه DNA همانند PCR دارای حساسیت و ویژگی بالا است.

در مطالعه حاضر، ضمن انجام آزمایشات متداول جهت شناسایی گونه‌های بیماری‌زا و شایع کاندیداهای جدا شده از مبتلایان به انیکومایکوزیس، در نهایت برای تشخیص نهایی گونه‌های پاتوژن کاندیدا که تعیین هویت نشده‌اند، از روش مولکولی PCR-RFLP استفاده گردید.

۲. روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع مقطعی توصیفی بوده و در خرداد ماه سال ۱۳۹۴ الی خرداد ماه ۱۳۹۵ انجام شد. از ۲۸۰ بیمار دچار دیستروفی ناخن مراجعه‌کننده به آزمایشگاه تخصصی قارچ‌شناسی در تهران، نمونه تهیه گردید. اطلاعات اولیه مربوط به بیماران، همراه با پرسشنامه شامل سن، جنس، شغل لحاظ شد. همچنین برای رعایت قوانین اخلاق زیستی، رضایت‌نامه‌ای آگاهانه توسط هر بیمار یا قیم قانونی او پر و امضاء شد. کد اخلاق أخذ شده برای این پروژه، IR.IRU.QOM.REC.1394.018 است. طبق

هدف مطالعه، بیمارانی در این آزمایش تا مرحله نهایی مورد بررسی قرار می‌گیرند که مبتلاء به دیستروفی ناخن از نوع کاندیدا باشند. بنابراین، از بین ۲۸۰ بیمار مراجعه‌کننده به آزمایشگاه تخصصی قارچ‌شناسی، پس از انجام آزمایش مستقیم و کشت، تنها بیمارانی جزو شرکت‌کنندگان برای ادامه مطالعه انتخاب شدند که مبتلاء به دیستروفی ناخن از نوع کاندیدا بودند و سایر بیماران از لیست مطالعه خارج شدند. ابتدا بر روی یک قسمت از هر یك از نمونه‌ها آزمایش مستقیم انجام گرفت، سپس بقیه نمونه‌ها بر روی محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شدند. آزمایش مستقیم با پتاس ۱۰% صورت گرفته و با مشاهده سلول‌های مخمری جوانه‌دار، هایف کاذب و هایف حقیقی وجود عفونت مخمری تأیید می‌شد. تمام نمونه‌ها جهت جداسازی مخمرها بر روی محیط‌های سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل کشت داده شده و به دلیل حساسیت برخی از گونه‌های مخمر کاندیدا مانند کروزیی، پاراپسیلوزیس و تروپیکالیس به سیکلوهگزامید از این آنتی بیوتیك استفاده نشد. پلیت‌ها به مدت دو هفته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و روزانه از نظر رشد گونه‌های مخمری بررسی گردیدند، زیرا کاندیدا گلابراتا و کاندیدا گیلرموندی ممکن است جهت رشدشان نیازمند انکوباسیون طولانی‌تری باشند (۲۷، ۶). پلیت‌های کشت، روزانه از نظر رشد کلنی‌های قارچی مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت مشاهده کلنی مخمری، آنها را ایزوله نموده و سپس با استفاده از روش‌های زیر تعیین هویت گردید.

۲-۱. آزمون ایجاد لوله زایا

مقداری از کلنی‌های مخمری رشد کرده در محیط سابورو دکستروز آگار را به لوله حاوی نیم میلی لیتر سرم تازه انسان اضافه و به خوبی مخلوط شد و بعد از ۲ ساعت انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به صورت میکروسکوپی از نظر وجود یا فقدان لوله زایا بررسی گردید.

۲-۲. کشت خطی در محیط کورن میل آگار به همراه توییین ۸۰

با کمك یک آنس نوك تیز ،کمی از کلنی روی محیط کورن میل آگار حاوی توییین ۸۰ به صورت خطی و نشاکاری کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت سه روز در دمای اتاق نگهداری و سپس از لحاظ توانایی تولید کلامیدوسپور بررسی شدند (۲۸،۲۷، ۶).

۲-۳. کشت بر روی محیط کروموژنیک کروم آگار کاندیدا

از کلنی‌های مخمری ۴۸ ساعته روی محیط سابورو دکستروز آگار برداشته و روی محیط

کروم آگار کاندیدا کشت داده شدند. سپس محیط‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۴۸ ساعت رنگ و مورفولوژی کلنی‌ها و رنگ پیگمان تولید شده برای هر یك از ایزوله‌ها مشاهده و به طور جداگانه ثبت گردید (۲۹). همچنین جهت تعیین هویت برخی مخمرهای ناشناخته، تکنیك مولکولی PCR-RFLP با استفاده از آنزیم‌های اختصاصی مخمرها به کار گرفته شد. برای افتراق فنوتیپی کاندیدا آلبیکنس از کاندیدا دابلینسیس، علاوه بر رنگ کلنی بر روی محیط کروم آگار کاندیدا، از ویژگی عدم قابلیت رشد کاندیدا دابلینسیس در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و بررسی تولید کلامیدوسپور توسط کاندیدا دابلینینسیس بر روی محیط کازئین آگار نیز استفاده شد (۳۳، ۶).

۲-٤. استخراج DNA

استخراج DNA از کاندیداهای رشد یافته در محیط کشت با روش جوشاندن انجام شد. برای این منظور، یک لوپ باکتریولوژی (حدود ۱۰ میلی متر مکعب) از کلنی تازه را برداشته و به لوله ۱/۵ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده و پس از مخلوط کردن، به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده و سپس با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی که حاوی DNA مخمر می‌باشد را وارد لوله جدید کرده و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۳۰). کیفیّت و کمّیت DNA استخراج شده، به ترتیب توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱% و اسپکتروفتومتری بررسی شد. پس از استخراج DNA ژنومیك هر مخمر، ناحیه ITS موجود در DNA ریبوزومی به کمک واکنش پلیمراز (PCR) تقویت گردید. توالی پرایمرهای رفت و برگشت عبارت بود از:

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

و 'ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-3.

برای این واکنش، از مواد زیر و با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده شد: مستر میکس سیناژن (۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس)، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت ITS1 و برگشت ITS4 (با غلظت ۱۰ میکرومولار)، ۵ میکرولیتر DNA (با غلظت حدود ۱۰۰ نانوگرم)، و ۵/۵ میکرولیتر آب تزریقی استریل. سیکل‌های گرمایی دستگاه ترموسایکلر برای انجام PCR به شرح جدول شماره (۱) انجام شد. جهت بررسی نتیجه PCR، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱% الکتروفورز گردید.

جدول ۱- سیکل های گرمایی دستگاه ترموسایکلر برای انجام PCR

مرحله	هدف	حرارت (درجه سانتی‌گراد)	زمان	دور
۱	واسرشتگی اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
۲	واسرشتگی ثانویه	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
	اتصال اغازگر به الگو	۴/۵۵	۴۵ ثانیه	
	گسترش رشته جدید	۷۲	۷۵ ثانیه	
۳	بسط نهایی	۷۲	۸ دقیقه	۱

سپس قطعه تکثیر شده با کمک آنزیم محدودالاثر MSPI (شرکت Fermentas، لیتوانی) برش داده شد و محصولات RFLP بر روی ژل آگارز ۲% الکتروفورز گردید. آنزیم اندونوکلئازی MSP1 جهت شکستن رشته‌های DNA در نواحی 5'-CCGG و ایجاد رشته‌های اورهنگ استفاده شد و مقدار مواد موجود در واکنش مطابق جدول شماره ۲ بود. سپس انکوباسیون به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. جهت بررسی نتیجه آزمایشRFLP، محصولات حاصل از RFLP بر روی ژل آگارز ۲% الکتروفورز گردید. سپس نوع مخمر با توجه به اندازه قطعه باندهای حاصل پس از هضم توسط آنزیم برش‌دهنده بر روی ژل الکتروفورز ۲% و براساس رفرنس معتبر تشخیص داده شد (۳۲، ۳۱).

جدول ۲- مقدار و مواد مورد نیاز جهت انجام آزمایش RFLP

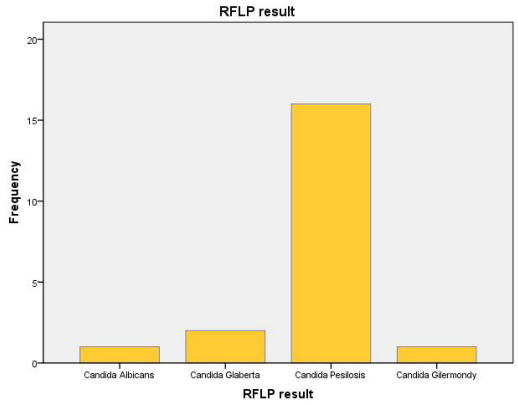
محصول PCR	۵ میکرولیتر
Nuclease free water	۸ میکرولیتر
بافر Tango	۱/۵ میکرولیتر
آنزیم MSP1	۰/۵ میکرولیتر

۳. یافته‌ها

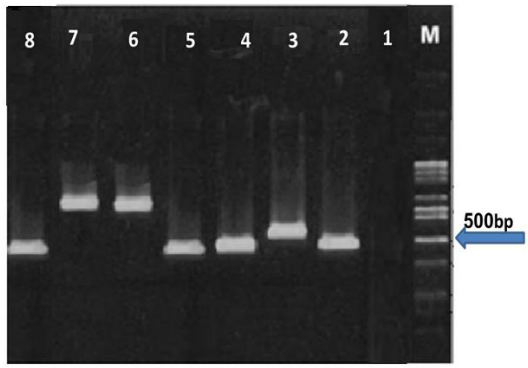
مطالعه مقطعی- توصیفی مورد نظر به مدت یکسال انجام شد. نمونه‌های مورد مطالعه از ۲۸۰ بیمار مشکوک به اونیکومایکوزیس تهیه گردید که از این تعداد، ۸۷ بیمار با تشخیص اونیکومایکوزیس کاندیدیایی مثبت شناسایی شده‌اند. از مجموع ۸۷ بیمار بررسی شده طی این مطالعه ۸۶/۲ درصد نمونه‌ها مربوط به انیکومایکوزیس ناخن دست، ۹/۲ درصد مربوط به ناخن‌های پا و ۴/۶ درصد مشترکاً مربوط به ناخن‌های دست و پا، هم‌زمان بوده‌اند. ۶۶/۷ درصد نمونه‌ها مربوط به زنان و ۳۳/۳ درصد مربوط به مردان و شایع‌ترین سن مبتلایان در فاصله سنی ۵۰ تا ۵۹ سالگی

بود. ۹۵/۴ درصد نمونه‌ها دارای نتایج مثبت در آزمایش مستقیم میکروسکوپی و ۴/۶ درصد آنها دارای نتایج منفی بود، ولی هر ۸۶ مورد دارای کشت مثبت بودند. نتایج بدست آمده از کشت ۸۷ مخمر جدا شده از بیماران بر روی محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰ نشان داد که ۶۲/۱ درصد کلنی مخمری جدا شده ایجاد میسلیوم‌های کاذب یا حقیقی، بلاستوسپور و کلامیدوسپور نموده که به عنوان کاندیدا آلبیکنس شناخته شدند. ۳۷/۹ درصد کلنی مخمری دیگر با ایجاد میسلیوم‌های کاذب یا حقیقی و بلاستوسپور به عنوان کاندیدا غیرآلبیکنس تشخیص داده شدند که جواب آزمون لوله زایا نیز در آنها منفی بود. نمونه‌های کاندیدایی جدا شده از ناخن بیماران به محیط کشت سابورو دکستروز آگار و سپس کروم آگار کاندیدا نیز تلقیح شدند. کاندیدا آلبیکنس‌ها روی محیط کشت کروم آگار کاندیدا طیفی از رنگ سبز تا سبز تیره داشتند و بر روی محیط کشت کازئین آگار همگی تولید کلامیدوسپور کردند. با توجه به اینکه محیط کشت کروم آگار کاندیدا فقط برای شناسایی مخمرهای کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا کروزه‌ای و کاندیدا گلابراتا اعتبار کافی دارد، سایر گونه‌های کاندیدا که به کمک سه روش فنوتیپی یعنی آزمایش تولید لوله زایا در سرم انسان، بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی در محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰ و ویژگی‌های ریخت‌شناسی و خاصیت کروموژنیک در محیط کروم آگار کاندیدا شناسایی قطعی نگردیدند. نهایتاً توسط روش مولکولی PCR-RFLP برای ژن ITS 1,4 تعیین گونه شدند. نتایج بدست آمده حاصل از بکارگیری روش تشخیصی PCR-RFLP بر روی نمونه‌های بالینی، شامل شناسایی و تعیین هویت ۱۶ مورد کاندیدا پاراپسیلوزیس و یک مورد کاندیدا گیلرموندی بود (نمودار ۱).

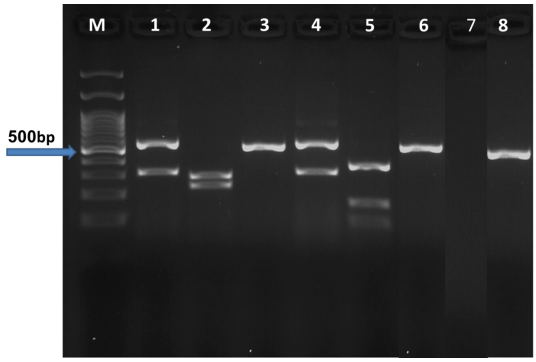
نمودار ۱- توزیع فراوانی گونه های کاندیدا تعیین هویت شده توسط تست PCR_RFLP



نتایج بدست آمده از روش مولکولی بدین صورت بود: کاندیدا آلبیکنس ۵۴ مورد (۶۲/۱%)، کاندیدا تروپیکالیس۷ مورد (۸%)، کاندیدا گلابراتا ۶ مورد (۶/۹%)، کاندیدا کروزه‌ای ۳ مورد (۳/۴%) و در نهایت ۱۷ نمونه (۱۹/۵%) با کمک روش‌های سه گانه فنوتیپی ذکر شده شناسایی نشد (تصاویر ۱و ۲).



شکل ۱- تصویر گرفته شده از الکتروفورز محصولات PCR توسط پرایمرهای ITS1 و ITS4.
ستون‌های نتایج حاصل از محصول PCR که به ترتیب از راست به چپ شامل: چاهک M - سایز مارکر bp ۱۰۰ (ساخت شرکت سینا کلون ایران)، چاهک ۱- کنترل منفی، چاهک ۲- کاندیدا پاراپسیلوزیس (bp ۵۲۰)، چاهک ۳- کاندیدا گیلرموندی (۶۰۸bp)، چاهک ٤- کاندیدا آلبیکنس (bp ۵۳۵)، چاهک ٥- کاندیدا پاراپسیلوزیس (bp ۵۲۰)، چاهک ٦- کاندیدا گلابراتا (۸۷۱bp)، چاهک ۷- کاندیدا گلابراتا (۸۷۱bp)، چاهک ۸- کنترل مثبت کاندیدا آلبیکنس.



شکل ۲: تصویر گرفته شده از الکتروفورز محصولات PCR پس از هضم آنزیمی توسط MSPI.
به ترتیب از چپ به راست: چاهک M- سایز مارکر ۱۰۰bp، چاهک ۱- کاندیدا گلابراتا (قطعاتی با اندازه های bp ۵۵۷ و ۳۱٤)، چاهک۲- کاندیدا آلبیکنس (قطعاتی با اندازه های bp ۲۳۸ و ۲۹۷)، چاهک ۳- کاندیدا پاراپسیلوزیس (bp ۵۲۰)، چاهک ٤- کاندیدا گلابراتا (قطعاتی با اندازه های bp ۵۵۷ و ۳۱٤)، چاهک ٥ - کاندیداگیلرموندی (قطعاتی با اندازه‌های bp ۳۷۱ و ۱۵۵ و ۸۲)، چاهک ٦- کاندیدا پاراپسیلوزیس (bp ۵۲۰)، چاهک ۷- کنترل منفی، چاهک ۸- کنترل مثبت کاندیدا آلبیکنس

٤. بحث

انیکومایکوزیس یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی ناخن بوده که مسئول بیش از ۵۰% از مشکلات ناخن به شمار می‌رود. انیکومایکوزیس به عنوان یک بیماری وابسته به سن و جنس مطرح بوده که شیوع آن در مردان بیشتر است و با افزایش سن، میزان بروز آن در هر دو جنس یکسان می‌باشد (۳۵،۳۴). در بزرگسالان شیوع انیکومایکوزیس بیش از ۴۰% بوده (۳۶) و فاکتورهای مستعدکننده‌ای مانند دیابت ملیتوس، بیماری‌های عروق سطحی، نقص سیستم ایمنی مانند ایدز، استفاده از داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی از عوامل زمینه‌ساز بروز این بیماری به شمار می‌آیند (۳۷).

از میان قارچ‌ها، قارچ‌های رشته‌ای غیردرماتوفیتی حدود ۱۵-۱۰% عفونت‌های انیکومایکوزیس را به خود اختصاص می‌دهند (۳۸). مخمرها نیز در ایجاد عفونت‌های ناخن، نقش بسزایی دارند. مخمرها به خصوص کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا پاراپسیلوزیس به عنوان دومین عامل ایجادکننده انیکومایکوزیس به شمار می‌آیند. قابل ذکر است که انیکومایکوزیس کاندیدایی در افرادی که دارای فاکتورهای زمینه‌ای، بویژه دیابت و نقص سیستم ایمنی هستند، بیشتر مشاهده می‌شود (۳۹). عفونت ناخن به خصوص ناخن‌های دست، عفونت مزمنی است که بیشترین موارد عفونت‌های مخمری را شامل می‌شود و اثرات منفی مهمی بر کیفیت زندگی افراد می‌گذارد و ممکن است باعث محدود شدن فعالیت‌های فیزیکی شخص شود و از طرفی تغییرات ناخن به دلیل این عفونت‌ها می‌تواند سبب ایجاد بستری برای عفونت ثانویه باکتریایی ناخن شود. در پژوهش حاضر، شایع‌ترین عامل کاندیدایی جدا شده از ضایعات ناخن را کاندیدا آلبیکنس (۴۲/۷ درصد) سپس کاندیدا پاراپسیلوزیس و بعد کاندیدا تروپیکالیس تشکیل دادند که با مطالعات سایر محققین مطابقت دارد (۴۶،۴۵،۴۴،۴۲،۴۱) . البته در مطالعه شکوهی و همکاران (۱۳۸۸)، شایع‌ترین عوامل مخمری مسبب اونیکومایکوزیس کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا کروزه‌ای بودند (۴۳). همچنین در بررسی خسروی و همکاران (۲۰۰۸)، گونه‌های کاندیدای جدا شده از عفونت‌های ناخن به ترتیب فراوانی شامل کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا تروپیکالیس و بعد کاندیدا پاراپسیلوزیس بودند. در این مطالعه بیشترین تعداد مبتلایان را زنان تشکیل دادند که با بررسی بسیاری از محققین مطابقت داشت (۴۶،۴۳،۴۲،۴۱،۱۷،۱۵). البته در مواردی تعداد مردان بیشتر از زنان گزارش شده است (۴۷). این عارضه در زنان می‌تواند به دلیل عوامل زمینه‌ای

مانند خیس‌خوردگی مکرر ناخن‌ها ضمن شستشو، تماس مداوم با آب و مواد شوینده و پاک‌کننده‌ها و یا ابتلاء به بیماری مختص زنان مانند واژینال کاندیدازیس، شایع‌تر از مردان باشد. در این بررسی بیشترین موارد بیماری در محدوده سنی ۵۰ تا ۵۹ سال بود که با مطالعات سایر محققین مطابقت کامل دارد (۴۸،۴۳،۴۲،۱۷). در مطالعه گرامی و همکاران نیز بیشترین میزان ابتلاء در بیماران در محدوده سنی ۶۰ تا ۷۰ سال است (۱۷). در بررسی Reisberger و همکاران بیشتر مبتلایان بالاتر از ۵۰ سال سن داشتند (۴۷). در بررسی حاضر عوامل مخمری بیشتر از ناخن‌های دست جدا شدند که این یافته با بررسی‌های انجام شده توسط سایر محققین مطابقت داشت (۴۶،۴۳،۴۲،۴۱،۱۷). این عفونت اغلب در افرادی که دستشان تماس بیشتری با آب دارد، دیده می‌شود که این امر زمینه‌ساز آلودگی‌های قارچی، به خصوص در ناخن‌ها است. امروزه در آزمایشگاه‌ها، با استفاده از روش‌های تشخیصی مانند بکارگیری محیط‌های کشت معمولی مانند سابورو دکستروز آگار، امکان تعیین گونه‌های کاندیدا، وجود ندارد. بنابراین، در بسیاری از آزمایشگاه‌ها فقط به شناسایی گونه آلبیکنس اکتفاء شده است، یا اینکه گونه‌های غیر از آلبیکنس را تحت عنوان سایر گونه‌ها نام برده‌اند. با توجه به دخالت گونه‌های مختلف کاندیدا در ایجاد بیماری و سهم رو به افزایش انواع غیر آلبیکنس در عفونت‌های کاندیدایی و نیز حساسیت متفاوت و غیرمعمول آنها در مقابل داروهای ضد قارچی، شناسایی و تعیین هویت این مخمرها در سطح گونه به دلیل اهداف اپیدمیولوژیکی و نیز برای درمان موثر بیماری و کنترل عفونت ضروری به نظر می‌رسد (۴۰).

در میان روش‌های ساده تشخیص گونه‌های شایع و مهم مخمر کاندیدا، روش کشت روی محیط کروموژنیک کروم آگار کاندیدا بسیار ساده و در عین حال معتبر به نظر می‌رسد (۲۲). در این مطالعه استفاده از محیط کروم آگار کاندیدا به همراه تست توانایی تولید کلامیدوسپور و توانایی تولید لوله زایا برای تشخیص چهار گونه مهم کاندیدا، یعنی کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا کروزیی و کاندیدا گلابراتا مناسب و قابل اعتماد مشاهده شده که در مطالعات دیگر نیز بیان شده است (۴۶،۴۵،۴۲،۴۱،۱۵). در بررسی حاضر با استفاده از سه روش فنوتیپی ذکر شده، ۸۰/۵% ایزوله‌ها در سطح گونه شناسایی و ۱۹/۵% باقیمانده تحت عنوان سایر گونه‌ها در نظر گرفته شد. در مطالعه قهری و همکاران نیز با روش‌های فنوتیپی ۸۳/۷ درصد ایزوله‌های کاندیدا را در سطح گونه شناسایی و ۱۶/۳ درصد باقیمانده تحت عنوان سایر گونه‌ها در

نظر گرفته شد (۴۱). در مطالعه خسروی و همکاران با روش‌های فنوتیپی سه گانه ۸۲/۹ درصد ایزوله‌های کاندیدا تعیین گونه شدند و سپس ۱۷/۱ درصد سایر گونه‌های کاندیدا با روش آزمون بتاگلوکوزیداز و کیت Rapid Yeast Plus System شناسایی شده‌اند (۱۵). هرچند این محیط کشت برای شناسایی گونه‌های شایع و پاتوژن کاندیداها معتبر و مفید بوده، ولی شناسایی کلیه گونه‌ها با بکارگیری این محیط امکان‌پذیر نبوده و بایستی از سایر روش‌های فنوتیپیک یا ژنوتیپیک کمک گرفت. امروزه روش‌های مولکولی در شناسایی صحیح و سریع گونه‌ها کمک شایانی می‌کند. لذا، در این مطالعه استفاده از روش‌های مولکولی بر پایه PCR برای تعیین هویت گونه‌های شایع و بیماری‌زای کاندیدا که با روش‌های فنوتیپی شناسایی نشدند، مورد استفاده قرار گرفت. طی سال‌های اخیر، جهت تشخیصPCR کاندیدیازیس، ژن‌های هدف مختلفی، همانند منطقه متغیر D1 / D2 در ناحیه ژنیrDNA، hsp90، کیتین سنتتاز، آسپارتیل پروتئیناز ترشحی، DNA میتوکندریایی، اکتین، توبولین، تعدادی از قطعات ژنی rRNA مشتق از نواحی نسخه‌برداری شده درونی (ITS) بکار گرفته شده است. در این مطالعه، DNA هدف، قطعه rDNA بود. از این قطعه ژنی، کپی‌های متعددی (۵۰ تا ۱۰۰) در هر ژنوم کاندیدا وجود دارد. به طور معمول تست PCR در صورتی که DNA هدف دارای توالی‌های تکرارشونده باشد، نسبت به اهداف تک کپی، از حساسیت بیشتری برخوردار می‌باشد (۴۸، ۴۹).

از جمله زیرمجموعه‌های فوق‌العاده حفاظت شده rDNA، قطعات ITS می‌باشد که در میان گونه‌های مختلف کاندیدا دارای سکانس‌های منحصر به فرد است. بنابراین، با استفاده از پرایمرهای مرتبط به این نقاط، شناسایی گونه‌های مختلف کاندیدا، امکان‌پذیر شد. اگرچه اخیراً چندین آزمون PCR برای تکثیر rDNA گزارش شده، اما شناسایی گونه‌ها شامل انجام آزمون‌های بیشتر روی محصول تکثیر یافته است. از جمله این مراحل می‌توان به هضم آنزیمی محصول بوسیله آنزیم‌های محدودالاثر نام برد (۵۰، ۵۱). در مطالعه حاضر برای شناسایی تمام ایزوله‌های تعیین گونه نشده، از روش مولکولی PCR-RFLP با استفاده از یك آنزیم محدودالاثر که کارایی آن در مطالعات قبلی میرهندی و همکاران به اثبات رسیده بود، استفاده شد (۳۱). در بررسی تعدادی از محققین نیز، با استفاده از این روش مولکولی PCR-RFLP گونه‌های کاندیدای شناسایی نشده را تعیین هویت کردند (۳۱،۳۲،۴۱،۴۴،۴۵). با توجه به اینکه درمان ضایعات اونیکومایکوزیس همچنان به عنوان یك مشکل طبی و بهداشتی باقی‌مانده است، نمی‌توان علت

را تنها در حضور عوامل زمینه‌ای بیمار جستجو کرد و شاید عدم آشنایی و شناخت هویت دقیق عوامل مخمری و یافتن گونه‌های نادر و غیرعادی که دارای رفتارهای متفاوتی در مقابل مواد ضد قارچی نیز هستند و نیز مشکل مقاومت دارویی از علل دیگری باشند که مورد غفلت قرار می‌گیرند. بنابراین، شناسایی عوامل قارچی به ویژه عوامل مخمری به صورت دقیق و در حد گونه برای PCR-RFLP با استفاده از روش‌های ساده مولکولی نظیر آزمایشگاه‌های مرجع قارچ‌شناسی در سطح کشور توصیه می‌شود. از این جهت که طول دوره درمان اونیکومایکوزیس طولانی بوده، لزوم تسریع تشخیص در بیماران با سیستم ایمنی ناکارآمد به دلیل احتمال مهاجم شدن قارچ در این افراد بسیار حیاتی بوده و از این جهت روش PCR-RFLP روشی بسیار دقیق بوده که قابل توجه است. همچنین پیشنهاد می‌شود که حداقل در مواردی که آزمایشگاه‌ها به نتایج مجهول برمی‌خورند، از روش‌های مولکولی به خصوص روش PCR-RFLP استفاده کنند تا از هزینه‌های اضافی درمان ناکارآمد و طولانی در برخی بیماران جلوگیری شود.

References

1. Agarwalla A, Agrawal S, Khanal B. Onychomycosis in eastern Nepal. *Nepal Med Coll J*. 2006; 8(4): 215-9.
2. Midgley G, Moore MK. Nail infections. *Dermatol Clin*.1996; 14(1): 41-49.
3. Anaisse E, Mecinnis MR, Pfaller MA. *Clinical Mycology*. Churchill Livingstone. 2003:95-239.
4. Lange M, Roszkiewicz J, Sczerknowska-Dobosz A, Jasiel-Walikowska E, Bykowska B. Onychomycosis is no longer a rare finding in children. *Mycoses*. 2006; 49:55-59.
5. Foster KW, Ghannoum MA, Elewski BE. Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United states from 1999 to 2002. *J Am Acad Dermatol* .2004; 50: 748-752.
6. Zaini F, Mehbod ASA, Emami M. *Comprehensive Medical mycology*. Tehran: Tehran University Press. 2009: 133. [In Persian].
7. Dalle F, Franco N, Lopez J. Comparative genotyping of Candida albicans bloodstream and non-bloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. *J Clin Microbial*. 2000; 38: 4554-4559.
8. Karahan ZC, Guriz H, Agirbasli H, Balaban N, Gocmen JS, Aysev D & et al. Genotype distribution of Candida albicans isolates by 25S intron analysis with regard to invasiveness. *Mycoses.* 2004; 47: 465-469.
9. Elewski BE. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11(3): 415-29.
10. Borkowski P, Williams M, Holewinski J, Bakotic B. Onychomycosis: an analysis of 50 cases and a comparison of diagnostic techniques. *J Am Podiatr Med Assoc*. 2001; 91(7): 351-5.
11. Surjushe A, Kamath R, Oberai C, Saple D, Thakre M, Dharmshale S, Gohil A. A clinical and mycological study of onychomycosis in HIV infection. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2007; 73(6): 397- 401.
12. Midgley G, Moore MK, Cook JC, Phan QG. Mycology of nail disorders. *J Am Acad Dermatol*. 1994; 31(3 pt 2): S68-74.
13. Alvarez MI, González LA, Castro LA. Onychomycosis in Cali, Colombia. *Mycopathologia.* 2004; 158(2): 181-6.
14. Vélez A, Linares MJ, Fenández-Roldán JC, Casal M. Study of onychomycosis in Córdoba, Spain: prevailing fungi and pattern of infection. *Mycopathologia*. 1997; 137(1): 1-8.
15. Khosravi AR, Shokri H, Mansouri P, Katiraee F, Ziglari T. Candida species isolated from nails and their in vitro susceptibility to antifungal drugs in the department of Dermatology (University of Tehran, Iran). *J Myc Med*. 2008; 18(4): 210-5.
16. Anane S, Chtourou O, Chedi A, Triki S, Belhaj S, Kaouech E, Kallel K, Chaker E. Onychomycosis in the elderly. *Ann Dermatol Venereol.* 2007; 134 (10 Pt 1): 743-7.

17. Gerami Shoar M, Zomorodian K, Emami M, Tarazoei B, Saadat F. Study and identification of the etiological agents of onychomycosis in Tehran, Capital of Iran. *Iranian J Publ Health*.2002; 31(3-4): 100-4.
18. Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to C. *albicans. Clin Microbiol Rev*. 1999; 12: 80-96.
19. Gauzit R, Cohen Y, Dupont H, Hennequin C, Montravers P, Timsit JF & et al. Infections by Candida sp. in intensive care. Survey of French practices. *Press Med*. 2003; 32: 440-9.
20. Staats CC, Korstanje MJ. Fungi causing onychomycoses in The Netherlands. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 1994;138(47): 2340-3
21. Del Castillo L, Bikandi J, Nieto A, Quindos G, Sentandreu R, Ponton J. Comparison Of morphotypic and genotypic methods for strain delineation in Canada. Mycoses. 1997; 40: 445-450.
22. Freydie're AM, Parant F, Chaux C, Gille Y. Candida ID, a new chromagenic medium compared to Albicans ID2. *Clin Microbial Infect.* 2000; 6(supp1.1): 181.
23. Lott TJ, Burns BM, Zancope-Oliveira R, Elie DM, Reiss E. Sequence analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) from yeast species within genus Candida. *Current Microbiol*. 1998; 36: 63-69.
24. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulian- Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, Limaye P, Cookson BT. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J Clin Mirobiol*. 2000; 38: 2302-2310.
25. Ajello L, Hay RJ . *Medical mycology*. Ninth edition. Arnold Publication Unicelluar Ascomycetous Candida species. 1999: 423-450.
26. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: Comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 2483-2489.
27. Shadzi Sh. *Pathogenic yeasts*. In: Medical Mycology. Isfahan University: Jihad Press; 2007:43-59. [In Persian]
28. Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 4th ed. Amesterdam: Elsevier. 1998.
29. Odds FC, Bernaerts R. CHROM agar candida, a new differential isolation medium for presumptive identiation of clinically important Candida species. *J Clin Microbiol*. 1994; 32(8): 1923-9.
30. Rezaee Matekalaee A. *Quantitative assessment of Bead-beating, Boiling, and freez and thaw for Genomic DNA extraction from some medically important yeasts*. Presented for the M.Sc. Tehran: Tehran University of Medical Sciences, 2005. [In Persian]
31. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important Candida species. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2006; 47(3): 225-9.
32. Mirhendi SH, Kordbacheh P, Kazemi B, Samiei S, Pezeshki M, Khoramizadeh MR. A

PCR-RFLP Method to Identification of the Important Opportunistic Fungi: Candida Species, Cryptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus and Fusarium solani. *Iranian J Publ Health*. 2001; 30(3-4): 103-6.

33. Mosca CO, Moragues MD, Llovo J, Al Mosaid A, Coleman DC, Pontón J. Casein agar: a useful medium for differentiating Candida dubliniensis from Candida albicans. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(3):1259-62.
34. Heikkla H, Stubb S. The prevalence of onychomycosis in Finland. *Br. J. Dermatol*. 1995; 133: 699-703.
35. Piraccini BM & Alessandrini A. Onychomycosis: A Review. *J Fungi (Basel).* 2015; 1(1): 30-43. **Doi:** 10.3390/jof1010030.
36. Roseeuw D. Achilles foot screening project: Preliminary results of patients screened by dermatologists. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol*. 1999; 12: S6-S9.
37. Scher RK, Rich P, Pariser D, Elewski B. The epidemiology, etiology, and pathophysiology of onychomycosis. *Semin. Cutan. Med. Surg*. 2013; 32: S2-S4.
38. Gupta AK, Drummond-Main C, Cooper EA, Brintnell W, Piraccini BM, Tosti A. Systematic review of nondermatophyte mold onychomycosis: Diagnosis, clinical types, epidemiology, and treatment. *J. Am. Acad. Dermatol*. 2012; 66: 494-502.
39. Jayatilake JA, Tilakatatne WM, Panagoda GJ. Candidal onychomycosis: A mini-review. *Mycopathologia*. 2009; 168: 165-173.
40. Tulumoglu S, Kariptas`E, Erdem B. Identification and antifungal susceptibility of Candida isolates from various clinical specimens in Doctor Behcet Uz hospital. *Anatol J Clin Investig*. 2009; 3(3): 170-3.
41. Ghahri M, Mirhendi SH, Yadegari MH, Hajizadeh E, Shidfar MR. Identification of pathogenic yeasts isolated from onychomycosis in Tehran, using polymerase chain Reaction Modares. *Journal of Medical Sciences*. 2020; 13(1):79-91. [In Persian].
42. Ghasemi Z, Falahati M, Nami S, Nozari Sh, Ahmadi F, Ghaffarpour GhH. Investigation of prevalence of onychomycosis due to yeast fungi in dystrophic nails of patients who referred to Razi ospital (2010-2011). *Razi Journal of Medical Sciences*. 2012; 19(96): 27-33. [In Persian].
43. Shokohi T, Heidari Z, Haqhani I, Khalilian A, Aghili R, Miahi S. Study 101 Case onychomycosis in patients refers o Boo ali sina hospital and toba clinic in Sari. *J Mazandaran Uni Med Sci*. 2009; 33-4. [In Persian].
44. Mohammadi R, Mirhendi, H, Yadegari MH, Shadzi Sh, Jalalizand N. Identification and Frequency of Candida Species in Patients with Different Forms of Candidiasis in Isfahan, Using PCR-RFLP Method. *Journal of Isfahan Medical School*. 2011; 29(133): 1-8.
45. Hashemi SJ, Zaini F, Charsizadeh A & et al. Prevalence of candida and non-candida yeasts isolated from patients with yeast fungal infections in Tehran labs. *Tehran University Medical Journal*. 2011; 69(1): 55-62.
46. Zaini F, Mahmoudi M, Mehbod ASA, Kordbacheh P, Safara M. Fungal Nail Infections in Tehran. *Iran Iranian J Publ Health.* 2009; 38(3): 46-53.
47. Reisberger EM, Abels C, Landthaler M, Szeimies RM. Histopathologic diagnosis of

onychomycosis by periodic acid- Schiffstained nail clippings. *Br J Dermatol*. 2003; 148: 749-754.

48. Mitchel TG, Sandin RL, Bowman BH, Meyer W, Merz WG. Molecular mycology: DNA probes and application of PCR technology. *J. Med. Vet.Mycol*.1994; 32(1): 351-366.
49. Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeaupuis JP & et al. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med. Mycol*.1998; 36(1): 249- 257.
50. Morace G, Pagano L, Sanghinetti M, Posteraro B, Mele L, Equitani F & et al. PCR-restriction enzyme analysis for detection of Candida DNA in blood from febrible patiens with hematological malignancies. *J.Clin. Microbiol.* 1999; 37: 1871-1875.
51. Williams DW, Wilson MJ, Lewis MA, Potts AJ. Identification of Candida species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol*.1995; 33: 2476-2479.

استناد به این مقاله

سقازاده، مژگان؛ نجفی، الهام (۱۴۰۰). بررسی ضایعات کاندیدایی ناخن و تعیین هویت گونه‌های جدا شده با روش‌های قارچ‌شناسی و مولکولی. *بیولوژی کاربردی*، دوره ۱۱، شماره ۴۱، ص ۶۷-۸۴.