مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت) دوره ۹ شماره ٤ مهر و آبان ۱۳۹٤، ۳۹۹-۳۸۸

مقاله پژوهشی

کاربرد PCR در تشخیص اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌های غیردرماتوفیتی

بهرام احمدی[۱]، دکتر ساسان رضایی[۲]، فرشاد هاشمی[۳]، مهدی زارعی[٤]، هدی دلی[٥]، دکتر سیدجمال هاشمی[٦]

چکیده

زمینه و هدف: اونیکومایکوزیس یا عفونت قارچی ناخن، شیوع افزاینده و تاثیرات فراوانی بر زندگی اجتماعی و بهداشت روانی بیماران دارد. درماتوفیت‌ها، مخمرها و کپک‌های غیردرماتوفیتی از شناخته شده‌ترین عوامل قارچی عفونت‌های ناخن هستند. هدف از این مطالعه تعیین شیوع کپک‌های غیردرماتوفیتی با استفاده از آزمایش مستقیم و کشت و روش مولکولی(PCR) در بیماران می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه از ۱۷۰ بیمار، نمونه‌برداری شد، و جهت آزمایش میکروسکوپی از پتاس ۱۵٪ و برای کشت نمونه‌ها از محیط‌های سابورو دکستروز آگار(S) به همراه کلرامفنیکل(SC) و کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید(SCC) استفاده گردید. همچنین اسلاید کالچر جهت شناسایی به روش قارچ شناسی، و جهت نمونه‌های مشکوک یا ناشناخته عمل تعیین توالی از ناحیهS-rDNA ۲۸ انجام گردید.

یافته‌ها: از ۱۷۰ بیمار مراجعه‌کننده، ۷٤(٤۳/٥٪) مورد دارای اونیکومایکوزیس بودند که از این تعداد ٥۳(۷۱/٦۲٪) نفر زن و ۲۱(۲۸/۳۸٪) نفر مرد بودند. از مجموع ۷٤ مورد اونیکومایکوزیس تشخیص داده شده ٤۰(٥٤/۰٥٪) مورد آن کاندیدیازیس، ۲۱(۲۸/۳۷٪) مورد مربوط به کپک‌های غیر درماتوفیتی، و ۱۲(۱٦/۲۱٪) مورد درماتوفیت گزارش گردیدند.

نتیجه‌گیری: میزان اونیکومایکوزیس در این مطالعه ٤۳/٥٪ بود و کاربرد تکنیک PCR در موارد مثبت کاذب و منفی کاذب و در موارد کشت طولانی مدت با ارزش گزارش شد. همچنین با توجه به اینکه تمامی نمونه‌هایی که آزمایش مستقیم مثبت و کشت منفی داشتند، با آزمایش مولکولی مثبت گردیدند، این مطالعه قدرت تکنیک‌های مولکولی را در مقایسه با کشت بیان می‌کند.

واژه‌های کلیدی: اونیکومایکوزیس، غیردرماتوفیت، درماتوفیت، تشخیص مولکولی، کپک‌ها

* نویسنده مسئول :
دکتر سیدجمال هاشمی ؛
مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
Email :
Sjhashemi@tums.ac.ir

- دریافت مقاله : مرداد ۱۳۹٤ پذیرش مقاله : آبان ۱۳۹٤

مقدمه

اونیکومایکوزیس یا عفونت قارچی ناخن یکی از مهمترین بیماری‌های ناخن است که حدود ۱۸ تا ٤۰٪ عفونت‌های ناخن و حدود ۳۰٪ از کل عفونت‌های قارچی جلدی بدن را تشکیل می‌دهد(۱). ناخن‌های گرفتار یک منبع عمده عفونت می‌باشند که باعث افزایش دیگر عفونت‌های قارچی پوست می‌شوند(۲). اگر چه اختلالات ناخن تهدیدکننده‌ی زندگی نیستند، اما ممکن است تاثیر فراوانی بر زندگی اجتماعی و بهداشت روان بیماران داشته باشند، و از طرفی موجب هزینه‌های درمانی زیادی شوند(۳). شیوع این عفونت

[۱] دانشجوی دکتری قارچ شناسی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۲] استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۳] دانشجوی دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[٤] دانشجوی دکتری قارچ شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران
[٥] دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[٦] استاد مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-13]

در سراسر جهان رو به افزایش است و عواملی چون دیابت، جریان ضعیف خون محیطی، نقص ایمنی، درمان دارویی، جراحت و نقص ژنتیکی باعث افزایش میزان شانس ابتلا به آن می‌شود(٤). درماتوفیت‌ها، مخمرها و کپک‌های غیردرماتوفیتی از شناخته شده‌ترین عوامل قارچی عفونت‌های ناخن هستند(٥). کپک‌ها، قارچ‌های ساپروفیتی هستند که در خاک زندگی کرده و در گیاهان بیماری ایجاد می‌کنند. این قارچ‌ها آلوده‌کننده‌های محیط و پاتوژن‌های ثانوی در پوست و ناخن هستند و تعدادی هم به صورت اولیه باعث عفونت می‌شوند(٦). قارچ‌های مزبور آلوده‌کننده‌های معمول آزمایشگاه نیز می‌باشند و هنوز کاملاً مشخص نشده است که آیا این قارچ‌ها به صورت اولیه در ناخن‌های سالم عفونت ایجاد می‌کنند، یا تنها به صورت مهاجم ثانویه به دنبال تروما، ایسکمی یا دیگر بیماری‌ها نظیر عفونت‌های درماتوفیتی ضایعه ایجاد می کنند(٨و٧). میزان شیوع اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌ها بین ١/٤٥٪ تا ١٧/٦٪ گزارش شده است(١٠و٩). تفاوت در میزان شیوع کپک‌ها می‌تواند ناشی از توزیع متفاوت کپک‌ها در مناطق آب و هوایی مختلف، تفاوت در معیارهای مورد استفاده برای تشخیص اونیکومایکوزیس کپکی و استفاده از روش‌های قارچ شناسی نامناسب جهت کشت کپک‌ها باشد(١١). عوامل ساپروفیتی که تاکنون جدا و شناسایی شده‌اند، شامل: انواع آسپرژیلوس‌ها، فوزاریوم، اکرومونیوم، پنیسیلیوم، اسکوپولاریوپسیس برویکالیس، نترزیا من جی فرا، کرایزوسپوریوم، کورووولاریا و آلترناریا و تعداد دیگری از قارچ‌های ساپروفیت که کم و بیش از ناخن جدا شده‌اند، مانند: آرترودرما توبرکولاتوم و کتومیوم گلوبوسوم می‌باشند(١٢و١). هدف از این مطالعه، تعیین شیوع کپک‌های غیردرماتوفیتی به عنوان یکی از عوامل ایجادکننده‌ی اونیکومایکوزیس با استفاده از آزمایش مستقیم و کشت و روش مولکولی(PCR) در بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران است.

روش بررسی

این مطالعه به صورت مقطعی، در بازه‌ی زمانی هفده ماهه انجام شد. طی این مدت ١٧٠ نمونه بالینی از ضایعات ناخن مراجعه کنندگان به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده بهداشت که مشکوک به عفونت قارچی ناخن بودند، به دست آمد. قبل از اقدام به نمونه‌برداری، کلیه ناخن‌های بیماران مشکوک به اونیکومایکوزیس با دقت معاینه و بررسی شد. تاریخچه بیمار مانند: شغل، نحوه‌ی ابتلا، سابقه‌ی تماس با خاک یا حیوان یا ابتلا به عفونت قارچی یا غیرقارچی و استفاده یا عدم استفاده از داروهای ضد قارچی حداقل سه هفته قبل از آزمایش، اخذ گردید و سپس، نمونه‌برداری از ناخن‌های مشکوک به طریق زیر انجام گرفت:

ابتدا کلیه سطوح ناخن و اطراف آن با پنبه‌ی آغشته به الکل ٧٠٪ از اجرام خارجی پاک شد و از اسکالپل استریل برای تراشیدن ناخن و بستر آن استفاده گردید. جهت شفاف‌شدن پوسته‌ها و مشاهده‌ی میکروسکوپی از محلول پتاس ١٥٪ استفاده گردید. قسمتی از نمونه‌های مربوط به ضایعات در پلیت‌های S، SC و SCC(Merck, Germany) در چندین نقطه تلقیح شد و در حرارت ٢٧-٢٥ درجه سانتی‌گراد حداقل به مدت سه هفته نگهداری گردید. جهت مشاهده‌ی دقیق‌تر ساختمان‌های میکروسکوپی از کلنی خالصِ جداشده، کشت مجدد روی لام، و متعاقباً رنگ‌آمیزی با محلول لاکتوفنل کاتن بلو به عمل آمد(اسلاید کالچر).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-13]

تعدادی از نمونه‌های بیماران که در آزمایش مستقیم، نوع میسلیوم‌های قارچ موجود در آنها از نظر مخمری، ساپروفیتی و درماتوفیتی به طور قطعی قابل تشخیص نبودند و در کشت نیز منفی بودند، و همچنین مواردی که در آزمایش مستقیم میسلیوم درماتوفیت، ساپروفیت یا مخمر گزارش شد، امّا کشت منفی داشتند، با داشتن نمونه ناخن کافی، برای تشخیص قارچ عامل بیماری، تحت آزمایش مولکولی(PCR) قرار گرفتند. به طور کلی، نظر به اینکه احتمال داده می‌شد تعدادی از عوامل ایجادکننده‌ی عفونت ناخن با روش‌های متداول قارچ شناسی شناسایی و تشخیص داده نشوند، تصمیم بر این شد که نمونه‌های مشکوک یا ناشناخته تحت عمل تعیین توالی از ناحیه ۲۸S-rDNA قرار گیرند. بدین منظور استخراج DNA از نمونه‌های مذکور با استفاده از کیت مخصوص و طبق دستور شرکت سازنده، شرکت کیاژن به نام(QIAgene, USA) QIAamp DNA Investigator انجام شد.

پس از استخراج و تخلیص DNA از نمونه‌های گرفته‌شده از ناخن، عمل تقویت و تکثیر مولکولهای DNA در واکنش PCR با پرایمرهای Universal (QIAgene, USA) انجام شد. این پرایمرها که توالی آن ذیلاً آورده شده است، باعث تکثیر قطعه‌ای از DNA به اندازه حدود ۷۰۰-۶۰۰ جفت باز(bp) می‌شدند.

28S-F (5'- AAGCATATCAATAAGCGGAGG-3')
28S-R (5' - GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3)

واکنش PCR با پروتکل زیر انجام شد. ترکیب و مقادیر مواد به کار رفته عبارت بودند از: بافر10x =۵µl، دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات یا dNTP =۱µl، یا کلراید منیزیم $MgCl_2$ =۱µl، پرایمر مستقیم و معکوس هرکدام =۲/۵µl، DNA =۳µl، آنزیم Taq polymerase =۱µl، آب مقطر =۳۴µl، حجم کل واکنش =۵۰µl، و برنامه حرارتی PCR توسط دستگاه حرارتی سایکلر(PeQLab,Germany) به صورت یک سیکل ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل ۹۴ درجه به مدت ۳۵ ثانیه، ۵۳ درجه به مدت ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۱۲۰ ثانیه و یک سیکل ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم شد.

جهت مشاهده‌ی نتایج محصول PCR از ژل آگارز ۱/۵٪ درون تانک از بافر(TBE Tris) ۹۰mM با PH= ۸/۳، EDTA و اسید بوریک ۲ mM، استفاده گردید و به مدت ۱ ساعت با ولتاژ ۸۰ الکتروفورز شدند. تصویر باندها توسط دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده و از باندها عکسبرداری شد. جهت عملیات تعیین توالی نیز محل تشکیل باندهای اختصاصی را روی ژل بریده و با استفاده از کیت استخراج DNA (Fermentas Silica Bead DNA Gel Extraction Kit)، و طبق پروتوکل کیت، DNA از درون ژل استخراج و برای تعیین توالی به شرکت نسل امید ارسال و بعد از در اختیار گرفتن نتایج تعیین توالی و واردکردن سکانس به دست آمده در بانک ژنی و با استفاده از نرم‌افزار BLAST یا Basic Local Alignment Tools گونه‌های مختلف شناسایی گردید. جهت تحلیل آماری داده‌ها از آزمون کای دو استفاده شد.

یافته‌ها

از مجموع ۱۷۰ بیمار مراجعه کننده ۱۱۳(۶۶/۵٪) نفر زن و ۵۷(۳۳/۵٪) نفر مرد بودند. کمترین سن مراجعه‌کننده ۶ سال و بیشترین سن ۷۸ سال بود. میانگین سن مراجعه‌کنندگان ۴۴/۵ سال بود. در بین مبتلایان نیز کمترین سن ۶ و بیشترین سن ۷۷ سال بود. از ۱۷۰ بیمار مراجعه‌کننده ۷۴(۴۳/۵٪) مورد دارای اونیکومایکوزیس بودند که از این تعداد ۵۳(۷۱/۶۲٪) نفر زن و ۲۱(۲۸/۳۸٪) نفر مرد بودند. از

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-13]

کل مواردی که در آزمایش مستقیم مثبت بودند ۵۰(۷۳/۵٪) مورد دارای کشت مثبت نیز بودند، در حالی که ۱۸(۲۶/۵٪) مورد فقط آزمایش مستقیم مثبت داشتند. ٦(۵/۹٪) مورد هم، دارای آزمایش مستقیم منفی، امّا کشت مثبت داشتند.

فراوانی عامل اونیکومایکوزیس از مجموع ۷٤ مورد اونیکومایکوزیس تشخیص داده شده در مطالعه حاضر در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: فراوانی مطلق و نسبی موارد اونیکومایکوزیس بر حسب عامل ایجاد کننده

مجموع مراجعان	موارد اونیکومایکوزیس	کاندیدیازیس	کپک‌های غیردرماتوفیتی	درماتوفیت	میسلیوم با عامل ناشناخته
۱۷۰	۷٤	٤۰(٥٤/۰٥٪)	۲۱(۲۸/۳۷٪)	۱۲(۱٦/۲۱٪)	۱(۱/۳٥٪)

دیگر نتایج به دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان داد شایعترین ایزوله مخمری و درماتوفیتی جداشده از نمونه‌های بالینی، به ترتیب کاندیدا آلبیکنس و ترایکوفایتون روبروم بود. از سایر عوامل جداشده می‌توان به آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس اوریزا، آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس کاندیدوس، فوزاریوم و پنی سیلیوم اشاره نمود. از ۲۱ مورد اونیکومایکوزیس کپکی ۱۷(۸۰/۹٥٪) مورد دارای آزمایش مستقیم و کشت مثبت و ٤(۱۹/۰٤٪) مورد دارای آزمایش مستقیم مثبت، امّا کشت منفی بودند. ۹(٤۲/۹٪) نفر از مردان مبتلا به اونیکومایکوزیس کپکی بودند، در حالی که از زنان ۱۲(۲۲/٦٪) نفر به اونیکومایکوزیس کپکی مبتلا بودند. از ۹(٤۲/۹٪) مورد اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌های غیردرماتوفیتی در آقایان ۸(۸۸/۸٪) مورد در ناخن‌های پا و ۱(۱۱/۱٪) مورد در ناخن‌های دست وجود داشت، و از ۱۲ مورد اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌های غیردرماتوفیتی در خانم‌ها ۹(۷٥٪) مورد در ناخن‌های پا و ۳(۲٥٪) مورد در ناخن های دیده شد.

از ۲۱ مورد اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌های غیر درماتوفیتی ۹(٤۲/۸٪) مورد در گروه سنی ٦۰-٥۱ سال مشاهده گردید؛ ضمن اینکه در گروه سنی ۲۰-۱۱ سال، تعداد ۲(۹/٥۲٪) مورد اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌های غیر درماتوفیتی مشاهده گردید. از مجموع موارد اونیکومایکوزیس، بیشترین ابتلا در گروه سنی ٦۰-٥۱ سال با تعداد ۲۱(۲۸/۳۷٪) مورد گزارش شد، و پس از آن گروه سنی ۷۰-٦۱ سال با ۱۳(۱۷/٥٦٪) مورد بیشترین بود. از ۲۱ مورد اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌های غیردرماتوفیتی، ۱٥(۷۱/٤۲٪) مورد ضایعات در قسمت دیستال (Distal Subungual Onychomycosis) ناخن بود و ٦(۲۸/٥۷٪) مورد از ضایعات در قسمت دیستال جانبی(Distal Latral Subugual Onychomycosis) ناخن مشاهده شد. هویت کپک‌های غیردرماتوفیتی جداشده از نمونه‌های بالینی به ترتیب زیر گزارش گردید: تعداد ۷(۳۳/۳٪) مورد آسپرژیلوس فلاووس، ۳(۱٤/۲۸٪) آسپرژیلوس اوریزا، ۳(۱٤/۲۸٪) مورد آسپرژیلوس نایجر، ۱(٤/۷٦٪) آسپرژیلوس کاندیدوس، ۳(۱٤/۲۸٪) فوزاریوم Spp، ۳(۱٤/۲۸٪) پنیسیلیوم Spp و ۱(٤/۷٦٪) مورد میسلیوم ساپروفیت. در آقایان مبتلا به اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌های غیردرماتوفیتی شایع‌ترین قارچ‌ها به ترتیب شامل: آسپرژیلوس نایجر ۳(۳۳/۳٪) مورد، آسپرژیلوس اوریزا ۲(۲۲/۲٪)، پنیسیلیوم Spp ۲(۲۲/۲٪)،

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-13]

آسپرژیلوس فلاووس ۱(۱۱/۱٪) و ۱(۱۱/۱٪) مورد فوزاریوم Spp بود. در خانم‌های مبتلا به اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌های غیردرماتوفیتی شایع‌ترین قارچ‌ها به ترتیب شامل: آسپرژیلوس فلاووس ٦(٥٠٪) مورد، فوزاریوم Spp ۲(١٦/٦٪)، آسپرژیلوس اوریزا ۱(۸/۳٪)، آسپرژیلوس کاندیدوس ۱(۸/۳٪)، پنیسیلیوم Spp ۱(۸/۳٪) و ۱(۸/۳٪) مورد هم میسلیوم ساپروفیت گزارش گردید.

از مجموع ۹ مورد، ٦ مورد مربوط به ناخن‌های پا و ۳ مورد مربوط به ناخن دست بود و شایعترین جنس جداشده در این روش مربوط به آسپرژیلوس و شایع‌ترین گونه آسپرژیلوس اوریزه آ گزارش شد. درماتوفیت‌ها در درجه بعدی قرار داشتند و یک مورد نیز مربوط به مخمر کاندیدا بود.

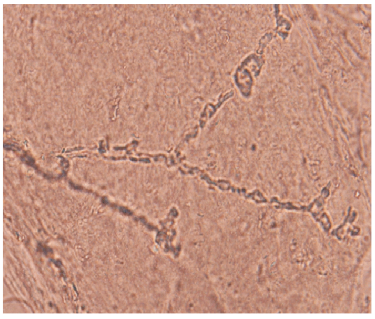
معیارهای تشخیصی جهت اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌های غیردرماتوفیتی شامل این موارد بودند:

۱) مشاهده‌ی عناصر قارچی در آزمایش مستقیم تراشه‌های ناخن با استفاده از پتاس ۱۵٪(شکل۱) که قارچ به صورت رشته‌های میسلیومی یا مخمری دیده می‌شود،

۲)رشد کپک‌های غیردرماتوفیتی یکسان حداقل در سه نقطه از محل‌های تلقیح(شکل۲)،

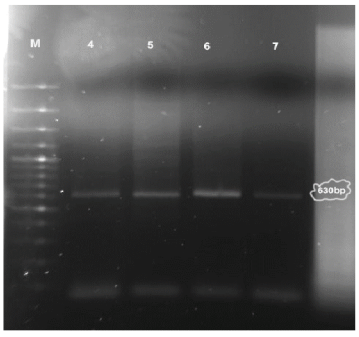
۳) عدم رشد قارچ های درماتوفیتی یا مخمری در محل های تلقیح در محیط کشت و

٤) تایید اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌های غیردرماتوفیتی در آزمایش مولکولی(PCR)(شکل۳) برای نمونه‌هایی که آزمایش مستقیم(KOH٪۱۵) مثبت داشته‌اند، امّا کشت منفی داشتند.



شکل ۱: میسلیوم های ساپروفیتی شفاف شده با پتاس ۱۵٪ در نمونه‌های ناخن

شکل ۲: کلنی‌های آسپرژیلوس فلاووس جدا شده از کشت نمونه‌های ناخن در قسمتهای تلقیح‌شده به محیط



شکل ۳: الکتروفورز محصولات PCR نمونه شماره ۴، ۵ ، ۶، ۷ و M مارکر ۱۰۰bp

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-13]

ارتباط بین نتایج آزمایش‌های قارچ شناسی معنی‌دار گزارش گردید؛ بدین صورت که آزمایش مستقیم از حساسیت بیشتری نسبت به کشت برخوردار بود($P<0/001$، $\chi^2= 0/52$)، در حالی که ارتباط بین جنس و اونیکومایکوزیس معنی‌دار نشان داده نشد($P>0/05$، $\chi^2= 1/56$).

بین جنس و اونیکومایکوزیس کپکی ارتباط معنی‌داری وجود نداشت($P>0/05$، $\chi^2=3/024$)، و از مجموع ۲۱ مورد اونیکومایکوزیس کپکی غیردرماتوفیتی ۱۷(۸۰/۹٪) مورد گرفتاری در ناخن‌های پا و در ٤(۱۹/۰٤٪) مورد نیز محل ضایعه در ناخن‌های دست بود. با توجه به تحلیل آماری، بین اونیکومایکوزیس کپکی و گرفتاری انگشتان پا ارتباط معنی‌داری مشاهده شد($P<0/001$)، که بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌ها در انگشتان پا نسبت به انگشتان دست بیشتر رخ می‌دهد.

در مجموع ۹ نمونه در آزمایش مولکولی تعیین جنس و گونه شدند که نتایج و اطلاعات مربوط در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲: تعیین جنس و گونه ۹ نمونه ناخن به روش ملکولی

شماره نمونه	محل ضایعه	آزمایش مستقیم	کشت	سکانسینگ
۱	ناخن پا	میسلیوم ساپروفیت	منفی	آسپرژیلوس کاندیدوس
۲	ناخن دست	میسلیوم درماتوفیت	کلنی مخمری	کاندیدا آلبیکنس
۳	ناخن پا	میسلیوم ساپروفیت	منفی	آسپرژیلوس اوریزا
٤	ناخن دست	میسلیوم ساپروفیت	منفی	آسپرژیلوس اوریزا
٥	ناخن پا	میسلیوم درماتوفیت	منفی	آسپرژیلوس اوریزا
٦	ناخن دست	میسلیوم	کلنی مخمری	کاندیدا آلبیکنس
۷	ناخن پا	میسلیوم	منفی	تریکوفایتون روبروم
۸	ناخن پا	میسلیوم درماتوفیت	منفی	تریکوفایتون روبروم
۹	ناخن پا	میسلیوم درماتوفیت	منفی	تریکوفایتون وروکوزوم

بحث

۱۸ تا ٤۰ درصد بیماری‌های ناخن و تقریباً حدود ۳۰٪ تمام عفونت‌های قارچی پوست را اونیکومایکوزیس تشکیل می‌دهد که از شایعترین عفونت‌های ناخن می‌باشد(۱). میزان شیوع این عفونت طی دهه‌های اخیر، به طور چشمگیری در حال افزایش است و عواملی چون دیابت، نارسایی در گردش خون، جراحت‌های مکرر ناخن، مواجهه‌ی طولانی مدت با قارچ‌های بیماری زا، ضعف سیستم ایمنی، توجه کمتر به نگهداری خوب و تمیزی ناخن‌ها و غیرفعال بودن را از عوامل افزایش شیوع این بیماری ذکر کرده‌اند(٤). با توجه به درمان طولانی مدت با داروهای ضد قارچی خوراکی تشخیص دقیق و صحیح اونیکومایکوزیس لازم و ضروری است. تشخیص به اشتباه منفی ضایعات ناخن منجر به

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-13]

بدشکلی طولانی و ناراحتی برای بیماران می‌شود و همچنین تشخیص به اشتباه مثبت ضایعات ناخن درمان طولانی مدت و بی‌فایده را برای بیماران به همراه دارد. پزشکان و کارکنان آزمایشگاه اغلب تصور غلطی از تشخیص ساده اونیکومایکوزیس دارند، در حالی که در عمل کار دشواری است(۱۳). روش‌های مختلفی جهت نمونه‌گیری و تشخیص اونیکومایکوزیس وجود دارد. در روشی که در مطالعه حاضر انجام شد، گرفتن ناخن و نمونه‌گیری از صفحه و بستر ناخن جهت مشاهده‌ی عناصر قارچی و کشت نمونه‌ها در چندین نقطه از پلیت بود. از دلایلی که جواب کشت می‌تواند منفی باشد، مرده‌بودن عناصر قارچی در قسمت لبه ناخن است؛ اگرچه تعداد کم میسلیوم در نمونه‌های تهیه‌شده از علل دیگر است، لذا جهت کاهش موارد منفی در این موارد، نمونه‌گیری از ناخن از قسمت‌های عمقی‌تر صورت گرفت و برای کاهش موارد کشت منفی ناشی از میسلیوم‌های مرده در بعضی از موارد از روش مولکولی(PCR) استفاده گردید. اونیکومایکوزیس انتشار جهانی دارد و میزان آن با توجه به شرایط آب و هوایی، شغل و شرایط اقتصادی و اجتماعی و نحوه‌ی تشخیص آن می‌تواند در نقاط مختلف متفاوت باشد؛ بدین صورت که در این مطالعه بر اساس تحلیل داده‌ها میزان اونیکومایکوزیس ۴۳/۵٪ بود که بیشتر از مطالعات دیگری بود که توسط هاشمی و همکاران(۱۴) و مقدمی و شیدفر(۱۵) انجام شده بود. اگرچه این میزان عفونت، کمتر از مطالعاتی بود که توسط زینی و همکاران(۴۷/۹٪)، زمردیان و همکاران(۵۰/۴٪)، Pontes و همکاران(۶۶/۵٪)، و Lopes و همکاران(۵۶/۶٪) گزارش شده بود (۱۹-۱۶). فراوانی اونیکومایکوزیس کپکی در این مطالعه ۲۸/۳۷٪ بود که نشان‌دهنده‌ی افزایش این موارد در سال های اخیر است. در مطالعه هاشمی و همکاران، زینی و همکاران، زمردیان و همکاران، و شکوهی و همکاران این فراوانی به ترتیب: ۱۵/۵٪، ۱۹٪، ۵/۶٪ و ۲۴٪ بود(۲۰و۱۷و۱۶و۱۴) و در مطالعات خارجی در ترکیه ۹٪، سنگاپور ۱۲٪، هند ۲۲٪، استرالیا، ایتالیا و اسپانیا ۵٪، کانادا ۴/۳٪ و در آمریکا ۲۰٪ گزارش شده است(۲۸-۲۱). اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌ها در مطالعه‌ی حاضر، بیشتر در گروه سنی ۶۰-۵۱ سال دیده شد. این محدوده سنی با مطالعات دیگری که اونیکومایکوزیس کپکی بیشتر در افراد بالای ۵۰ سال دیده می شود(۳۰و۲۹و۲۵و۲۴و۱۲) مطابقت دارد. در مطالعه‌ی زینی و همکاران بیشترین شیوع اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌ها در محدوده سنی ۵۰-۴۱ سال بود(۱۶). ضمن اینکه در مطالعه‌ی حاضر ۲ مورد هم در گروه سنی ۲۰-۱۱ سال مشاهده گردید که با سایر مطالعات که توسط Andre & Achten (۳۱)، و مقدمی و شیدفر و زینی و همکاران(۱۶و۱۵) که در آنها این فرم عفونت در افراد زیر ۲۰ سال مشاهده نشده بود، مطابقت ندارد. میزان زیاد اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌ها در محدوده سنی ۶۰-۵۱ می‌تواند به علت جراحت بیشتر، کفش نامناسب و نارسایی‌های عروق خونی ایجاد شود. از مجموع(۲۱ مورد) اونیکومایکوزیس کپکی، میزان این عفونت در زنان(۱۲مورد) بیشتر از مردان(۹ مورد) دیده می‌شود که شبیه مطالعات زینی و همکاران(۱۶)، هاشمی و همکاران(۱۴) و زمردیان و همکاران(۱۷) بود که میزان ابتلا به اونیکومایکوزیس کپکی در زنان بیشتر از مردان دیده می‌شود؛ امّا در مطالعه حاضر با توجه به تحلیل آماری ارتباط بین اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌های غیردرماتوفیتی و جنس از نظر آماری معنی‌دار نبود($P>0/05$) که شبیه نتایج آماری به دست

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-13]

آمده توسط زینی و همکاران(۱۶) است که در آن ارتباط بین اونیکومایکوزیس کپکی و جنس معنی‌دار نبود و میزان ابتلا در زنان و مردان یکسان گزارش شد. در مطالعه‌ی حاضر اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌های غیردرماتوفیتی بیشتر(۶۸٪) در انگشتان پا گزارش گردید که این یافته شبیه مطالعات زمردیان و همکاران(۱۷)، هاشمی و همکاران(۱۴)، زینی و همکاران(۱۶)، شکوهی و همکاران(۲۰)، Himioglu و همکاران(۲۱)، Velez & Diaz(۱۲) و Gianni و همکاران(۲۵) بود. درگیری ناخن پا توسط عوامل ساپروفیتی احتمالاً می‌تواند به این دلیل باشد که ناخن‌های پا بیشتر در معرض جراحت قرار دارند و جراحت به عنوان یک عامل مستعدکننده، زمینه را برای نفوذ قارچ‌های ساپروفیت که محل اصلی زندگی آن‌ها خاک است، فراهم می‌سازد. با توجه به تحلیل آماری، ارتباط بین اونیکومایکوزیس کپکی و گرفتاری انگشتان پا معنی‌دار است($P<۰/۰۰۱$)؛ بدین صورت که اونیکومایکوزیس ناشی از کپک‌ها در انگشتان پا نسبت به انگشتان دست بیشتر رخ می‌دهد. در مطالعه‌ی حاضر در اونیکومایکوزیس کپکی، فرم Distal Subungual Onychomycosis با ۷۱/۴۲٪ بیشترین فرم درگیرکننده‌ی ناخن بود. شیوع بالای این فرم تهاجمی می‌تواند به علت تراکم و انباشته‌شدن آلودگی‌های قارچی در زیر ناخن و در قسمت انتهایی و یا جانبی آن بوده باشد که بدین علت می‌تواند از مواد شوینده در امان بماند و سپس به مرور به بافت ناخن حمله نماید. در مطالعه‌ی Bonifaz و همکاران (۳۲) ۶۹٪ درگیری ناخن در اونیکومایکوزیس کپکی، به فرم Distal Subungual Onychomycosis بود. مشابه دیگر مطالعات قبلی انجام شده در ایران(۲۰و۱۶-۱۴)، نپال(۳۳) و مصر(۳۴)، شایعترین قارچ رشته‌ای غیردرماتوفیت جداشده از ناخن، جنس آسپرژیلوس(آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس اوریزا، آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس کاندیدوس) با ۶۶/۶٪ بود. این یافته برخلاف مطالعه خسروی و منصوری است که شایعترین عامل اتیولوژیک اونیکومایکوزیس کپکی را اسکوپولاریوپسیس برویکالیس گزارش کرده است(۳۵). علت فراوانی آسپرژیلوس‌ها را می‌توان حضور بیشتر گونه‌های آسپرژیلوس در خاک، آب و هوا، محل زندگی و تفاوت قدرت سیستم ایمنی میزبان دانست. از گونه‌های آسپرژیلوس، آسپرژیلوس فلاووس با ۳۳/۳٪ شایعترین عامل اتیولوژیک جدا شده در مطالعه حاضر بود که شبیه دیگر نتایج به دست آمده در کشور ایران بود(۱۷و۱۶و۱۴). این یافته، برخلاف مطالعه‌ی شکوهی و همکاران است که شایعترین گونه‌ی آسپرژیلوس درگیرکننده‌ی ناخن را آسپرژیلوس ترئوس گزارش کرده است(۲۰). در مطالعه ی حاضر، سه مورد اونیکومایکوزیس ناشی از آسپرژیلوس اوریزا گزارش شد که هر سه نمونه دارای آزمایش مستقیم مثبت بودند؛ در حالی که هیچ یک در محیط کشت رشدی نداشتند که می‌تواند مطرح‌کننده‌ی مرده بودن عناصر قارچی و نبود شرایط خاص برای رشد این عامل در محیط کشت باشد. شناسایی هر سه مورد به وسیله‌ی آزمایش مولکولی از نمونه مستقیم ناخن صورت گرفت که در یکی از این نمونه‌ها در آزمایش مستقیم، این قارچ درماتوفیت تشخیص داده شد؛ در حالی که در آزمایش مولکولی، آسپرژیلوس اوریزا شناسایی شد که می‌تواند مطرح‌کننده‌ی شباهت میسلیوم این قارچ با درماتوفیت‌ها باشد که باعث تشخیص نادرست این قارچ از درماتوفیت‌ها شده است. روش مولکولی در نمونه‌های بالینی قادر به تشخیص ۱ پیکوگرم یا بیشتر DNA قارچی است؛ به دلیل اینکه ناحیه ۲۸S-rDNA در گونه‌های مختلف

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-13]

قارچی اغلب محافظت شده است، و همچنین به دلیل متغیر بودن این ناحیه، امکان تمیز گونه‌های مختلف قارچی وجود دارد؛ لذا، از دو پرایمر مربوط به این ناحیه جهت تکثیر استفاده گردید. کاربرد روش PCR در موارد مثبت کاذب به علت آلودگی کشت و منفی کاذب به علت وجود هایف‌های مرده با ارزش است. همچنین در موارد تشخیص پاتوژن‌های قارچی که به مدت زمان زیادی جهت کشت نیاز دارند، تکنیک مولکولی روش سریع و با ارزش است.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که تعیین توالی ناحیه ۲۸S-rDNA قادر به تفکیک گونه‌ها در اکثر موارد مثبت می‌باشد. آزمایش مستقیم مثبت در مواردی که کشت منفی وجود دارد، جهت تفسیر آزمایش مولکولی کمک‌کننده است. با توجه به اینکه تمامی نمونه‌هایی که آزمایش مستقیم مثبت و کشت منفی داشتند با آزمایش مولکولی مثبت بودند، این مطالعه قدرت آشکار روش‌های مولکولی را در مقایسه با کشت ثابت می‌کند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با همکاری کارکنان آزمایشگاه قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گردید که بدین وسیله از زحمات بی دریغ ایشان به کمال، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Wadhwani K & Srivastava AK. Some cases of onychomycosis from North India in different working environments. Mycopathologia 1985; 92(3): 149-55.

2. Feedberg IM, Eisen AZ, Wollf K, Frank Austen K, Goldsmith LA & Katz S. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. Available at: http://www.medicalcity-iq.net/medlib/Dermatology%20In%20General %20Medicine.pdf. 2003.

3. Scher RK. Onychomycosis: A significant medical disorder. Journal of the American Academy of Dermatology 1996; 35(2-3): 2-5.

4. Williams HC. The epidemiology of onychomycosis in Britain. British Journal of Dermatology 1993; 129(2): 101-9.

5. Rippon JW. Medical mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. Philadelphia: WB Saunders; 1988: 681-713.

6. Ellis DH, Marley JE, Watson AB & Williams TG. Significance of non-dermatophyte moulds and yeasts in onychomycosis. Dermatology 1997; 194(1): 40-2.

7. Gupta AK, Horgan-Bell CB & Summerbell RC. Onychomycosis associated with onychocola canadensis: Ten case reports and a review of the literature. Journal of the American Academy of Dermatology 1998; 39(3): 410-7.

8. Elewski BE. Diagnostic techniques for confirming onychomycosis. Journal of the American Academy of Dermatology 1996; 35(2-3): 6-9.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-13]

9. Haneke E. Fungal infections of the nail. Seminars in Dermatology 1991; 10(1): 41-53.

10. Kemna ME & Elewski BE. A US epidemiologic survey of superficial fungal diseases. Journal of the American Academy of Dermatology 1996; 35(4): 539-42.

11. Tosti A, Piraccini BM & Lorenzi S. Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: Clinical features and response to treatment of 59 cases. Journal of the American Academy of Dermatology 2000; 42(1-2): 217-24.

12. Velez H & Diaz F. Onychomycosis due to saprophytic fungi. Mycopathologia 1985; 91(2): 87-92.

13. Suhonen RE, Dawber RPR & Ellis DH. Fungal infections of the skin, hair and nails. Availiable at: https://www.ntvg.nl/system/files/publications/2000111420003a.pdf. 1999.

14. Hashemi S, Gerami M, Zibafar E, Daei M, Moazeni M & Nasrollahi A. Onychomycosis in Tehran: Mycological study of 504 patients. Mycoses 2010; 53(3): 251-5.

15. Moghaddami M & Shidfar MR. A study of onychomycosis in Tehran. Medical Journal of Islamic Republic of Iran 1989; 3(3-4): 143-9.

16. Zaini F, Mahmoudi M, Mehbod ASA, Kordbacheh P & Safara M. Fungal nail infections in Tehran, Iran. Iranian Journal of Public Health 2009; 38(3): 46-53.

17. Zomorodian K, Gerami Shoar M, Emami M, Tarazoei B & Saadat F. Study and identification of the etiological agents of onychomycosis in Tehran, capital of Iran. Iranian Journal of Public Health 2002; 31(3-4): 100-4.

18. Pontes ZB, Lima Ede O, Oliveira NM, Dos Santos JP, Ramos AL & Carvalho MF. Onychomycosis in João Pessoa City, Brazil. Revista Argentina de Microbiología 2002; 34(2): 95-9.

19. Lopes JO, Alves SH, Mari CRD, Oliveira LTO, Brum LM, Westphalen JB, et al. A ten-year survey of onychomycosis in the central region of the Rio Grande do Sul, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 1999; 41(3): 147-9.

20. Shokohi T, Hajheidari Z, Haghani I, Khalilian AR, Aghili R & Miahi S. The study of 101 cases of onychomycosis and associate factors in patients referredto Boali Sina hospital and Toba dermatology outpatient clinics in Sari. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2009; 19(71): 33-43[Article in Persian].

21. Hilmioğlu-Polat S, Metin DY, Inci R, Dereli T, Kılınc I & Tümbay E. Non-dermatophytic molds as agents of onychomycosis in Izmir, Turkey–a prospective study. Mycopathologia 2005; 160(2): 125-8.

22. Lim JT, Chua HC & Goh CL. Dermatophyte and non-dermatophyte onychomycosis in Singapore. Australasian Journal of Dermatology 1992; 33(3): 159-63.

23. Ramani R, Srinivas CR, Ramani A, Kumari TG & Shivananda PG. Molds in onychomycosis. International Journal of Dermatology 1993; 32(12): 877-8.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-13]

24. Ginter G, Rieger E, Heigl K & Propst E. Increasing frequency of onychomycoses--is there a change in the spectrum of infectious agents? Mycoses 1996; 39(1): 118-22.

25. Gianni C, Cerri A & Crosti C. Non-dermatophytic onychomycosis. An understimated entity? A study of 51 cases. Mycoses 2000; 43(1-2): 29-33.

26. Vélez A, Linares MJ, Fenández-Roldán JC & Casal M. Study of onychomycosis in Cordoba, Spain: Prevailing fungi and pattern of infection. Mycopathologia 1997; 137(1): 1-8.

27. Gupta AK, Jain HC, Lynde CW, Watteel GN & Summerbell RC. Prevalence and epidemiology of unsuspected onychomycosis in patients visiting dermatologists' offices in Ontario, Canada-a multicenter survey of 2001 patients. International Journal of Dermatology 1997; 36(10): 783-7.

28. Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R, Konnikov N, Gupta AK, Summerbell R, et al. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: The frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. Journal of the American Academy of Dermatology 2000; 43(4): 641-8.

29. Gupta AK, Gregurek-Novak T, Konnikov N, Lynde CW, Hofstader S & Summerbell RC. Itraconazole and terbinafine treatment of some nondermatophyte molds causing onychomycosis of the toes and a review of the literature. Journal of Cutaneous Medicine and Surgery 2001; 5(3): 206-10.

30. Canteros GE, Davel GO & Vivot W. Causal agents of onychomycosis. Revista Argentina de Microbiología 1994; 26(2): 65-71.

31. André J & Achten G. Onychomycosis. International Journal of Dermatology 1987; 26(8): 481-90.

32. Bonifaz A, Cruz-Aguilar P & Ponce RM. Onychomycosis by molds. Report of 78 cases. European Journal of Dermatology 2007; 17(1): 70-2.

33. Agarwalla A, Agrawal S & Khanal B. Onychomycosis in eastern Nepal. Nepal Medical College Journal 2006; 8(4): 215-9.

34. El Batawi MM, Arnaot H, Shoeib S, Bosseila M, El Fangary M & Helmy AS. Prevalence of non-dermatophyte molds in patients with abnormal nails. Egypt Dermatology Online Journal 2006; 2(1): 12.

35. Khosravi AR & Mansouri P. Onychomycosis in Tehran, Iran: Prevailing fungi and reatment with itraconazole. Mycopathologia 2001; 150(1): 9-13.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-13]

The Use Of PCR To Diagnose Onychomycosis Caused By Non-Dermatophytic Molds

Ahmadi Bahram[1] (MSc.) - Rezaei Sasan[2] (Ph.D) - Hashemi Farshad[3] (Pharm.D. Student) - Zareei Mahdi[4] (MSc.) - Deli Hoda[5] (BSc.) - Hashemi Seyed Jamal[6] (Ph.D)

1 Ph.D Student in Medical Mycology, Parasitology & Medical Mycology Department, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2 Professor, Parasitology & Medical Mycology Department, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3 Pharmacy Student, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4 Ph.d Student in Medical Mycology, School of Medical Sciences, Tarbiat Moddares University, Tehran, Iran
5 Master of Science Student in Medical Mycology, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6 Professor, Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Received : Jul 2015
Accepted : Oct 2015

Background and Aim: Onychomycosis or nail fungus infection has an increasing prevalence with many effects on patients' social life and mental health; dermatophytes, yeasts and non-dermatophyte molds are among the best known agents of fungal infections of nails. The purpose of this study was to determine the prevalence of non-dermatophyte molds using morphological (direct examination and culture) and molecular (PCR) methods in patients referring to Medical Sciences Mycology Laboratory in Tehran, Iran.

Materials and Methods: In this study, samples were taken from 170 patients. For direct microscopic examination (DME), 15% KOH solution was used; for the culture of samples, Sabouraud dextrose agar media (S) was applied together with chloramphenicol (SC) and chloramphenicol and cycloheximide (SCC). Meanwhile, differential tests were done for mycological diagnosis (slide culture), and 28SrDNA amplification and sequencing were performed for suspect or unknown samples.

Results: Of the 170 patients, 74 cases (43.5%) had onychomycosis, of which 53 cases (71.62%) were female and 21 cases (28.38%) were male. Also, of the 74 cases of onychomycosis, 40 cases (54.05%) were reported candidiasis, 21 cases (28.37%) non-dermatophyte molds, and 12 cases (16.21 %) dermatophytes.

Conclusion: The prevalence of onychomycosis in this study was 43.5% and the application of polymerase chain reaction (PCR) technique in cases of false positive, false negative and long-term culture was valuable; meanwhile, given that all the samples that had positive results in DME with negative cultures were positive in molecular tests, this study reveals the power of molecular techniques compared with culture method.

Key words: Onychomycosis, Non-Dermatophyte, Dermatophyte, PCR, Mold

* **Corresponding Author:**
Hashemi SJ;
E -mail:
Sjhashemi@tums.ac.ir

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-13]