

کلونیزاسیون کاندیدایی در نوزادان بخش مراقبت‌های ویژه و شناسایی گونه‌ها با روش‌های قارچ‌شناسی و مولکولی

چکیده

دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۱۴ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۹/۲۴ آنلاین: ۱۳۹۴/۱۱/۲۸

زمینه و هدف: در دو دهه گذشته افزایش موارد کاندیدایزیس مهاجم در بخش مراقبت‌های ویژه نوزادان، قابل توجه بوده است. کلونیزاسیون با کاندیدا، اولین مرحله در پاتوژنز بیماری بوده و تعدد کانون‌های کلونیزه با افزایش احتمال عفونت مهاجم همراه است. این مطالعه با هدف تعیین کلونیزاسیون کاندیدایی نوزادان بستری در بخش مراقبت‌های ویژه به عمل آمد.

روش بررسی: در یک پژوهش مقطعی در طی ۹ ماه (مرداد ۱۳۹۲ تا اردیبهشت ۱۳۹۳)، ۹۳ نوزاد در بخش مراقبت‌های ویژه در بیمارستان‌های امام خمینی (ره) و مرکز طبی کودکان تهران مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌برداری از پوست و مخاط در روزهای اول، سوم و هفتم بستری به عمل آمد. جهت جداسازی و تشخیص مورفولوژیک قارچ از محیط‌های کشت کروم آگار کاندیدا و کورن میل آگار+ توپین ۸۰ استفاده گردید و شناسایی نهایی ایزوله‌ها توسط تکنیک PCR-RFLP انجام شد.

یافته‌ها: کلونیزاسیون کاندیدایی در ۲۰/۴۳٪ بیماران مشاهده گردید. ۱۵ نوزاد با یک گونه و چهار نوزاد با دو گونه کاندیدا کلنیزه شدند. ایزوله‌ها به ترتیب فراوانی شامل، کاندیدا پاراپسیلوزیس (۱۰ ایزوله)، کاندیدا آلیبکنس (هفت ایزوله) کاندیدا تروپیکالیس (سه ایزوله)، کاندیدا گیلرموندی (دو ایزوله) و کاندیدا کروزه‌ای (یک ایزوله) بودند. به این ترتیب گونه‌های کاندیدای غیر آلیبکنس (۶۹/۵۶٪) غالب بوده و کاندیدا پاراپسیلوزیس بیشترین فراوانی را در بین ایزوله‌های کاندیدایی داشت. در این پژوهش بین کلونیزاسیون کاندیدایی با وزن تولد پایین، نارس بودن نوزاد و طول مدت اقامت در بیمارستان، از نظر آماری ارتباط معناداری ($P=0/003$) وجود داشت.

نتیجه‌گیری: در این بررسی کلونیزاسیون کاندیدایی نوزادان با غالب بودن گونه کاندیدا پاراپسیلوزیس (۴۳/۱۴۷٪) مشاهده شد. بنابراین خطر عفونت مهاجم با این گونه در نوزادان قابل توجه می‌باشد.

کلمات کلیدی: کلونیزاسیون، کاندیدا، NICU، PCR-RFLP، کاندیدا پاراپسیلوزیس.

نرگس سادات طاهرزاده^۱، فریده زینی^۱
روشنک داعی قزوینی^۱، ساسان رضایی^۱
محمود محمودی^۲، ملیحه کدیور^۳
فاطمه سادات نیری^۴، مهین صف‌آرا^۱
پریوش کردبچه^{۱*}

۱- گروه آنکالشناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۲- گروه ایمنی‌میکروبیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳- گروه کودکان، دانشکده پزشکی، بیمارستان مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۴- گروه کودکان، دانشکده پزشکی، بیمارستان امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، خیابان انقلاب، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
تلفن: ۰۲۱-۸۹۵۱۳۹۲
E-mail: pkordbacheh@tums.ac.ir

مقدمه

گونه‌های کاندیدا از مهم‌ترین عوامل مسبب این عفونت‌ها محسوب می‌شوند.^{۱-۴} در طول دو دهه گذشته کاندیدایزیس مهاجم در نوزادان بستری در بخش مراقبت‌های ویژه (Neonatal Intensive Care Unit) به‌خصوص در نوزادان نارس افزایش یافته و با مرگ‌ومیر قابل توجه (۳۰-۷۵٪) بیماران همراه بوده است.^{۵-۷} کاندیدایزیس مهاجم در نوزادان با وزن تولد بسیار کم ($<1000\text{ g}$) شایع و خطرناک است و مرگ‌ومیر بیماری با وجود درمان‌های ضد قارچی به ۲۰٪ می‌رسد. عوارض شدید عصبی شایع بوده و مننژیت یکی از خطرناک‌ترین

عفونت بیمارستانی به عفونتی گفته می‌شود که ۷۲-۴۸ ساعت پس از بستری شدن بیمار در بیمارستان اتفاق افتاده و علائم بالینی آن در بیمارستان و یا پس از مرخص شدن تظاهر نماید. این عفونت‌ها منجر به بروز عوارض و مرگ‌ومیر بیماران شده و با طولانی کردن زمان بستری عامل افزایش هزینه‌های بیمارستانی می‌باشند.^۱ قارچ‌ها همانند باکتری‌ها می‌توانند عامل عفونت‌های بیمارستانی باشند و

دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل گردید. کشت اولیه بر روی محیط کروم آگار کانیدیا (CHROMagar, Paris, France) انجام شد. پلیت‌ها در حرارت 35°C به مدت ۵-۲ روز انکوبه گردیده و کلنی‌های کانیدایی رشد کرده بر اساس رنگ آن‌ها شناسایی شدند. جهت تایید تشخیص اولیه و شناسایی گونه کانیدیا آلیکنس از گونه‌های کانیدای غیر آلیکنس، از کلنی اولیه بر روی محیط سابورو دکستروز آگار (Sabouraud-4% dextrose-Agar, Merck, Germany) ساب کالچر تهیه شد. سپس قارچ از محیط اخیر به محیط کورن میل آگار+ توبین ۸۰ (Corn Meal Agar Tween 80, Micro media, Hungary) منتقل شده به صورت خطی کشت داده شد. پس از ۵-۲ روز انکوباسیون در دمای اتاق با مطالعه میکروسکوپی، مورفولوژی قارچ از نظر تولید کلامیدوکونیدی، بلاستوکونیدی و میسلیم کاذب بررسی شد.

در این مطالعه جهت شناسایی دقیق‌تر گونه‌های کانیدیا، از تکنیک مولکولی Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) استفاده شد. به این منظور ابتدا کشت تازه قارچ بر روی محیط سابورو دکستروز آگار تهیه گردید و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در 37°C انکوبه شد. سپس برای تهیه حجم زیادی از قارچ از کلنی‌های تک حاصل کشت دوباره به صورت انبوه داده شد و از روش فنل-کلروفرم جهت استخراج DNA مخمر استفاده گردید. برای انجام PCR پرایمرهای ITS1 با توالی 5'-TCC 3'-GTA GGT GAA CCT GCG G-3' به عنوان پرایمر ITS4 با توالی 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' به عنوان پرایمر برگشت استفاده شد (Sinaclone, Iran). محصول PCR به کمک ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید و وزن باندها با مقایسه آن‌ها با مارکر مولکولی محاسبه شد و از باندها توسط 300-nm ultraviolet transilluminator (Cybertech, Berlin, Germany) عکس برداری به عمل آمد. سپس بر روی تمامی محصولات PCR که دارای باند تک بودند RFLP انجام شد. در این مطالعه جهت انجام RFLP از آنزیم اندونوکلازای Msp1 (Fermentas, Germany) که قادر به شناسایی و برش توالی CCGG بوده و توانایی ایجاد الگوی برشی متفاوت در گونه‌های کانیدیا را دارد، استفاده شد. پس از الکتروفورز محصولات RFLP در ژل آگارز ۲٪ و مقایسه وزن باندهای ایجاد شده با مارکر مولکولی، گونه‌های کانیدیا شناسایی شده و عکس برداری از

اشکال بالینی کانیدیزایس با مرگومیر بالا در این نوزادان است.^۸ نارس بودن نوزاد، وزن تولد پایین (1500 g)، استفاده از کاتترهای داخل عروقی، درمان با آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف، تغذیه وریدی، استفاده از امولسیون‌های چربی، سوند ادراری و کلونیزاسیون کانیدیا بر روی پوست و مخاط از عوامل مهم ابتلای نوزادان به کانیدیزایس مهاجم می‌باشند.^{۹-۱۳} کلونیزه شدن کانیدیا در پوست و مخاط نوزاد اولین مرحله در اعمال بیماری‌زایی و تهاجم قارچ است و با افزایش تعداد کانون‌های کلونیزه، احتمال بروز کانیدیزایس مهاجم افزایش می‌یابد. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که ۲۰-۷٪ تمامی نوزادان نارس به دنبال کلونیزاسیون کانیدایی دچار عفونت منتشر با این قارچ می‌شوند.^{۱۴، ۱۵} بنابراین تعیین کلونیزاسیون کانیدایی می‌تواند نقش ارزشمندی در پیش‌بینی بروز کانیدیزایس مهاجم در نوزادان بستری در بخش مراقبت‌های ویژه داشته باشد.

با توجه به اهمیت موضوع، این مطالعه به منظور تعیین کلونیزاسیون کانیدایی در نوزادان بستری در بخش مراقبت‌های ویژه و شناسایی ایزوله‌های کانیدایی صورت گرفت. هدف این مطالعه پیش‌گیری از بروز کانیدیزایس مهاجم در نوزادان بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بود.

روش بررسی

در این مطالعه مقطعی، ۹۳ نوزاد بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های امام خمینی (ره) و مرکز طبی کودکان تهران به مدت ۹ ماه از مرداد ۱۳۹۲ تا اردیبهشت ۱۳۹۳ بررسی شدند. سایر مطالعات نشان دادند که به‌طور متوسط ۲۵٪ نوزادان بستری در بخش مراقبت‌های ویژه در هفته اول با گونه‌های کانیدیا کلونیزه می‌شوند.^{۱۶-۱۴} در پژوهش کنونی، نمونه‌گیری به صورت تصادفی و با مدل پواسون انجام شد. جهت نمونه‌برداری ابتدا توضیحات لازم در مورد این مطالعه و هدف آن به والدین هر بیمار داده شد و نمونه‌گیری پس از کسب رضایت آنان به عمل آمد و داده‌های مربوط به هر نوزاد در پرسشنامه ثبت گردید. نمونه‌برداری در روزهای اول، سوم و هفتم بستری و هر بار از سه ناحیه مخاط دهان، رکتال و پوست کشاله ران انجام گردید. جهت نمونه‌برداری از هر ناحیه یک سواب استریل آغشته به سرم فیزیولوژی استریل استفاده شد. سپس هر سواب در یک لوله در پیچ‌دار استریل قرار داده شده به آزمایشگاه قارچ‌شناسی پزشکی

جداسازی و شناسایی اولیه گونه‌های کاندیدا بر اساس رنگ کلنی بر روی محیط کروم آگار بود. به این ترتیب سه ایزوله با کلنی آبی متالیک به‌عنوان *کاندیدا تروپیکالیس* (شکل ۱)، هفت ایزوله با کلنی سبز به‌عنوان *کاندیدا آلبیکنس* (شکل ۲) و ۱۰ ایزوله با کلنی صورتی با هاله سفید به‌عنوان *کاندیدا پاراپسیلوزیس* (شکل ۳) شناسایی شدند ولی کلنی‌های سه ایزوله دیگر قابل تشخیص نبود.

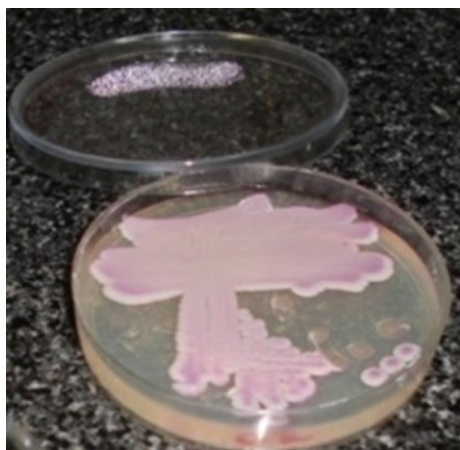


شکل ۲: کلنی سبز رنگ *کاندیدا آلبیکنس* بر روی محیط کروم آگار کاندیدا پس از انکوباسیون در دمای ۳۵ °C به مدت ۷۲ ساعت

باندها انجام شد. آنالیز داده‌ها در این مطالعه با استفاده از SPSS software, version 20 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) و تست آماری Fisher's exact test انجام شد و $P < 0/05$ با ضریب اطمینان ۹۵٪ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه به‌منظور بررسی کلونیزاسیون کاندیدیایی نوزادان، از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه نمونه‌برداری به عمل آمد. جمعیت نوزادان پیش‌بینی‌شده در این پژوهش ۷۵ نفر و دفعات نمونه‌برداری از هر نوزاد سه بار در نظر گرفته شده بود ولی با توجه به مشکلات و محدودیت‌های بسیار مانند اقامت کوتاه بعضی از نوزادان در بخش و مرخص شدن یا انتقال آن‌ها به سایر بخش‌ها، فوت بیمار و یا انصراف والدین در ادامه همکاری با طرح، نمونه‌گیری از تمامی بیماران در سه نوبت انجام نگردید، بنابراین مدت نمونه‌برداری را به ۹ ماه افزایش داده و در مجموع از ۹۳ بیمار با محدوده سنی ۴۰-۱ روز نمونه‌گیری به عمل آمد. در این مطالعه بیماران به دلایل نارس بودن، جراحی، بیماری‌های عفونی و سپتیسمی، ناهنجاری‌های مادرزادی و مشکلات تنفسی در بخش مراقبت‌های ویژه بستری بودند.



شکل ۳: کلنی صورتی رنگ *کاندیدا پاراپسیلوزیس* بر روی محیط کروم آگار کاندیدا پس از انکوباسیون در دمای ۳۵ °C به مدت ۷۲ ساعت



شکل ۱: کلنی آبی متالیک *کاندیدا تروپیکالیس* بر روی محیط کروم آگار کاندیدا پس از انکوباسیون در دمای ۳۵ °C به مدت ۷۲ ساعت

کاندیدا پاراپسیلوزیس و دو مورد کاندیدا گیلرموندی+ کاندیدا پاراپسیلوزیس) کلونیزه شدند. در پژوهش کنونی مشخص گردید که گونه‌های کاندیدای غیر آلبیکنس (۶۹/۵۶٪) غالب بوده و کاندیدا پاراپسیلوزیس با ۱۰ ایزوله (۴۳/۴۷٪) بیشترین فراوانی را در بین ایزوله‌های کاندیدایی داشت.

نوزادان مورد بررسی شامل ۴۹ (۵۲/۷٪) دختر و ۴۴ (۴۷/۳٪) پسر با وزن g ۱۱۴۵-۴۱۰۰ بود. پژوهش نشان داد که جنس نوزاد در کلونیزاسیون کاندیدایی نقشی نداشته و اختلاف معناداری بین نوزادان دختر و پسر از نظر کلونیزه شدن قارچ بر روی پوست و مخاط وجود نداشت، ولی نارس بودن و وزن کم نوزاد از فاکتورهای مهم در کلونیزاسیون کاندیدایی بوده و از این نظر بین نوزادان با وزن g ۲۰۰۰< و سایر نوزادان اختلاف معناداری وجود داشت (P=۰/۰۰۳). همچنین در این پژوهش مشخص شد با افزایش روزهای بستری احتمال کلونیزاسیون کاندیدایی افزایش یافته و بین طول اقامت بیمار در بخش با کلونیزاسیون قارچی ارتباط معناداری وجود داشت (P=۰/۰۰۳).

در این بررسی بیشترین محل کلونیزاسیون کاندیدایی به ترتیب در ناحیه رکتال، دهان و پوست بیماران بود ولی این اختلاف از نظر آماری معنادار نبود.

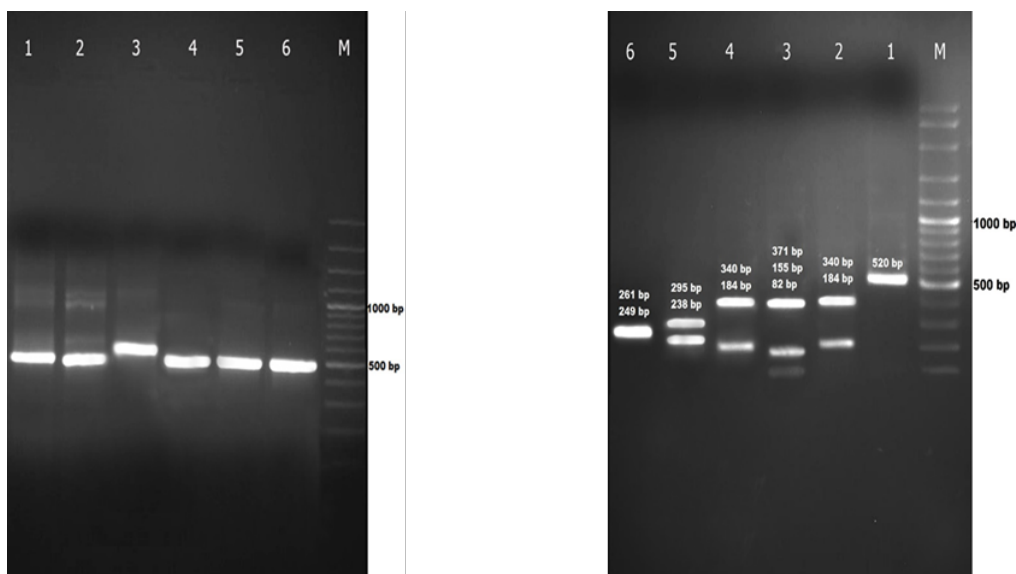
در محیط کورن میل آگار، هفت ایزوله کاندیدا آلبیکنس (شکل ۴) و ۱۶ ایزوله به‌عنوان گونه‌های کاندیدای غیر آلبیکنس تشخیص داده شدند. در نهایت با انجام PCR-RFLP، ایزوله‌های کاندیدایی به ترتیب فراوانی به‌عنوان کاندیدا پاراپسیلوزیس (۱۰ ایزوله)، کاندیدا آلبیکنس (هفت ایزوله)، کاندیدا تروپیکالیس (سه ایزوله)، کاندیدا گیلرموندی (دو ایزوله) و کاندیدا کروزه‌ای (یک ایزوله) شناسایی شدند. کاندیدا پاراپسیلوزیس جایگاه اثری برای آنزیم MSP1 نداشت در حالی که کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا کروزه‌ای هر کدام یک جایگاه اثر داشته و کاندیدا گیلرموندی دارای دو جایگاه اثر برای این آنزیم بود.

بنابراین در مورد کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا کروزه‌ای پس از اثر آنزیم MSP1، دو قطعه و برای کاندیدا گیلرموندی سه قطعه ایجاد گردید. با توجه به نزدیک بودن دو باند حاصل از کاندیدا کروزه‌ای، در تصویر الکتروفورز این دو باند به صورت یک باند واحد مشاهده شد (شکل ۵).

در این پژوهش، کلونیزاسیون کاندیدایی در ۱۹ (۴۳/۲۰٪) نوزاد مشاهده شد. ۱۵ (۱۶/۱۲٪) نوزاد توسط یک گونه کاندیدا و ۴ (۴/۳۰٪) نوزاد توسط دو گونه متفاوت کاندیدا (یک مورد کاندیدا آلبیکنس+ کاندیدا پاراپسیلوزیس، یک مورد کاندیدا تروپیکالیس+



شکل ۴: کلیمیدوکونیدی، میسلیم و بلاستوکونیدی‌های کاندیدا آلبیکنس روی محیط کورن میل آگار+ توین ۸۰ (با درشت‌نمایی ۴۰۰)



شکل ۵: الکتروفورز محصولات PCR ایزوله‌های جداشده از نمونه‌های بالینی

چپ: الکتروفورز محصولات PCR ایزوله‌های کاندیدا با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 (100 bp M)

راست: الکتروفورز محصول PCR-RFLP ایزوله‌های کاندیدا با پرایمرهای ITS1 و ITS4 پس از هضم اندونوکلازای با آنزیم MSP1

۱: کاندیدا پاراپسیلوزیس، ۲ و ۴: کاندیدا تروپیکالیس، ۳: کاندیدا گیلرموندی، ۵: کاندیدا آلبیکنس، ۶: کاندیدا کروزیای (M: 100 bp)

بحث

جمعیت نوزادان مورد مطالعه و شرایط بهداشتی بیمارستان می‌باشد.^{۲۶-۲۸} در بررسی اخیر گونه کاندیدا پاراپسیلوزیس مانند بسیاری از گزارش‌ها به‌عنوان گونه غالب شناسایی گردید.^{۲۳-۲۵} در مطالعه Montagna و همکاران که بر روی نوزادان بستری در بخش مراقبت‌های ویژه انجام شد، کاندیدا پاراپسیلوزیس به‌عنوان شایع‌ترین عامل کاندیدیازیس مهاجم در نوزادان گزارش گردید.^{۱۶} مطالعه Christopher و همکاران بر روی ۱۰۰۵ بیمار (۳۳ نوزاد و ۱۱۰ کودک و ۸۶۲ فرد بالغ) بستری در بیمارستان نشان داد فراوانی کاندیدا پاراپسیلوزیس در نوزادان و کودکان بیشتر از افراد بالغ می‌باشد.^{۲۰} کاندیدا پاراپسیلوزیس در دو دهه اخیر از عوامل مهم و رو به افزایش کاندیدیازیس مهاجم بوده و نوزادان بستری در بخش مراقبت‌های ویژه در خطر بالای ابتلا به عفونت ناشی از این قارچ قرار دارند.^{۲۴} کاندیدیومی ناشی از کاندیدا پاراپسیلوزیس به‌طور معمول وابسته به کاتتر بوده و انتقال این قارچ اغلب از طریق تزریقات وریدی و دست

گزارش‌های مختلف نشان می‌دهد که نوزادان بستری در بخش مراقبت‌های ویژه در خطر ابتلا به کاندیدیازیس مهاجم قرار دارند.^{۱۷} ویرولانسن کاندیدا و توانایی چسبندگی قارچ به سلول‌های میزبان، تولید هایف، تشکیل بیوفیلم و ترشح آنزیم‌های مختلف از یک سو و شرایط بالینی نوزادان از سوی دیگر در کلونیزاسیون و تهاجم قارچ نقش دارند.^{۱۷-۲۰} گر چه کاندیدا آلبیکنس گونه غالب در ایجاد کاندیدیازیس مهاجم در نوزادان بستری در بخش مراقبت‌های ویژه محسوب می‌شود،^{۲۱} ولی در سال‌های اخیر موارد عفونت و بیماری ناشی از گونه‌های کاندیدای غیر آلبیکنس افزایش قابل‌توجهی داشته است.^{۲۲-۲۵} در پژوهش کنونی نسبت (درصد) کلونیزاسیون کاندیدیایی نوزادان ۲۰/۴۳٪ و مشابه بسیاری از مطالعات انجام‌شده در این زمینه بود ولی این نسبت تحت تاثیر عوامل مختلف از جمله

بیمارستان‌های مورد مطالعه بود، ولی به نظر می‌رسد تعیین کلونیزاسیون کاندیدایی نوزادان به‌عنوان بخشی از برنامه کنترل عفونت بیمارستانی، اقدامی لازم جهت پیش‌گیری و کنترل کاندیدایزیس مهاجم در بخش مراقبت‌های ویژه نوزادان باشد. گزارش‌های موجود در مورد مقاومت دارویی بعضی از گونه‌های کاندیدا نسبت به داروهای ضد قارچی به‌ویژه فلوکونازول و آمفوتریسین B نیز تأکیدی بر اهمیت این بررسی است.^۹ بنابراین به‌منظور پیش‌گیری، تشخیص و درمان سریع کاندیدایزیس مهاجم در نوزادان بستری در بخش مراقبت‌های ویژه و کاهش عوارض و مرگ‌ومیر بیماری، انجام مطالعات مشابه در سایر مراکز درمانی کشور لازم به‌نظر می‌رسد. به‌علاوه استفاده از تست‌های حساسیت دارویی جهت انتخاب داروی مناسب و موثر نیز ضروری می‌باشد.

نتایج حاصل از این پژوهش کلونیزه شدن گونه‌های کاندیدا در پوست و مخاط نوزادان بستری در بخش مراقبت‌های ویژه را نشان داد. نوزادان نارس و بیماران با وزن < 2000 g بیشتر مستعد کلونیزاسیون کاندیدایی بودند و اقامت طولانی‌تر بیماران در بخش با افزایش احتمال کلونیزاسیون قارچی همراه بود. یافته مهم دیگر غالب بودن گونه کاندیدا پاراپسیلوزیس بود.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی نسبت (درصد) کلونیزاسیون کاندیدایی نوزادان بستری در بخش NICU و شناسایی گونه‌های کاندیدایی جداسده با روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی (PCR-RFLP) در مراکز بهداشتی درمانی (مرکز طبی کودکان- بیمارستان امام خمینی (ره))" مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران در سال ۱۳۹۳ به‌کد ۲۳۸۵۴ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است.

کارکنان بهداشتی و یا به‌کارگیری وسایل و تجهیزات مختلف بیمارستانی صورت می‌گیرد.^{۳۰،۳۱} غالب بودن این گونه کاندیدایی (۴۳٪/۴۷) در پژوهش کنونی، نشان‌دهنده ضرورت توجه بیشتر به عفونت با گونه‌های کاندیدای غیر آلیکنس و رعایت اصول بهداشتی توسط کارکنان بیمارستان و والدین بیماران می‌باشد.

در پژوهش‌های انجام‌شده وزن تولد پایین، نارس بودن نوزاد و طول مدت بستری در بخش مراقبت‌های ویژه از عوامل موثر در کلونیزاسیون کاندیدایی و عفونت مهاجم بوده است.^{۳۱،۳۲} در پژوهش اخیر نیز نارس بودن و وزن کم نوزاد از عوامل مهم در کلونیزاسیون کاندیدایی بیماران تشخیص داده شد و مانند سایر پژوهش‌ها، مشخص گردید که این نوزادان بیشتر در ریسک ابتلا به عفونت‌های منتشر کاندیدایی هستند.

در مطالعه‌ای که توسط Mendiratta DK و همکاران انجام شد، نمونه سواب مخاط دهان و رکتال، پوست کشاله ران و زخم بند ناف ۱۰۳ نوزاد نارس در طی ۲۴ ساعت اول تولد و روزهای سوم، پنجم و هفتم گرفته شد. در این بررسی با افزایش روزهای بستری کلونیزاسیون کاندیدایی در تعداد بیشتری از بیماران مشاهده شد و پس از روز هفتم ۱/۷۷٪ نوزادان با گونه‌های کاندیدا کلونیزه شدند. به این ترتیب نشان داده شد با افزایش زمان بستری احتمال کلونیزاسیون قارچی نوزادان افزایش می‌یابد.^{۱۵}

در پژوهش کنونی نیز طول مدت بستری در کلونیزه شدن با گونه‌های کاندیدا نقش داشت ولی تفاوت در نسبت (درصد) کلونیزاسیون کاندیدایی در این دو مطالعه، ممکن است به تفاوت در شرایط بهداشتی مراکز درمانی، جمعیت مورد بررسی و محل و دفعات نمونه‌برداری مربوط باشد. در بررسی اخیر نسبت درصد کلونیزاسیون کاندیدایی نوزادان نشان‌دهنده شرایط مناسب

References

- Norouzi J. Review on nosocomial infections. *J Health Admin* 2002;5(13):63-70.
- Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 2012;4(165):165rv13.
- Polin RA, Saimon L. Nosocomial infections in the neonatal intensive care unit. *NeoRev* 2003;4(3):81-9.
- Hudome SM, Fisher MC. Nosocomial infections in the neonatal intensive care unit. *Curr Opin Infect Dis* 2001;14(3):303-7.
- Issa SY, Badran EF, Aqel KF, Shehabi AA. Epidemiological characteristics of *Candida* species colonizing oral and rectal sites of Jordanian infants. *BMC Pediatr* 2011;11:79.
- Asmundsdóttir LR, Erlendsdóttir H, Haraldsson G, Guo H, Xu J, Gottfredsson M. Molecular epidemiology of candidemia: evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. *Clin Infect Dis* 2008;47(2):e17-24.
- Abdallah Y, Kaddu-Mulindwa D, Nankunda J, Musoke PM. Prevalence and immediate outcome of candida colonized preterm

- neonates admitted to Special Care Unit of Mulago Hospital, Kampala Uganda. *Afr Health Sci* 2015;15(1):197-205.
8. Benjamin DK Jr, Stoll BJ, Gantz MG, Walsh MC, Sánchez PJ, Das A, et al; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Neonatal candidiasis: epidemiology, risk factors, and clinical judgment. *Pediatrics* 2010;126(4):e865-73.
 9. Richardson MD, Warnock DW. *Fungal Infection: Diagnosis and Management*. 4th ed. Chichester, UK: Wiley-Blackwell; 2012.
 10. Faix RG, Chapman RL. Central nervous system candidiasis in the high-risk neonate. *Semin Perinatol* 2003;27(5):384-92.
 11. Lee BE, Cheung PY, Robinson JL, Evanochko C, Robertson CM. Comparative study of mortality and morbidity in premature infants (birth weight, < 1,250 g) with candidemia or candidal meningitis. *Clin Infect Dis* 1998;27(3):559-65.
 12. Xia B, Tang J, Xiong Y, Li XH, Mu DZ. Peripherally inserted central catheters and the incidence of candidal sepsis in VLBW and ELBW infants: is sepsis increased? *World J Pediatr* 2010;6(2):154-7.
 13. Bendel CM. Colonization and epithelial adhesion in the pathogenesis of neonatal candidiasis. *Semin Perinatol* 2003;27(5):357-64.
 14. Manzoni P, Farina D, Leonessa M, d'Oulx EA, Galletto P, Mostert M, et al. Risk factors for progression to invasive fungal infection in preterm neonates with fungal colonization. *Pediatrics* 2006;118(6):2359-64.
 15. Mendiratta DK, Rawat V, Thamke D, Chaturvedi P, Chhabra S, Narang P. Candida colonization in preterm babies admitted to neonatal intensive care unit in the rural setting. *Indian J Med Microbiol* 2006;24(4):263-7.
 16. Montagna MT, Lovero G, De Giglio O, Iatta R, Caggiano G, Montagna O, et al. Invasive fungal infections in neonatal intensive care units of Southern Italy: a multicentre regional active surveillance (AURORA project). *J Prev Med Hyg* 2010;51(3):125-30.
 17. Al-Sweih N, Khan Z, Khan S, Devarajan LV. Neonatal candidemia in Kuwait: a 12-year study of risk factors, species spectrum and antifungal susceptibility. *Mycoses* 2009;52(6):518-23.
 18. Thein ZM, Seneviratne CJ, Samaranyake YH, Samaranyake LP. Community lifestyle of Candida in mixed biofilms: a mini review. *Mycoses* 2009;52(6):467-75.
 19. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of Candida albicans. *Mycoses* 2005;48(6):365-77.
 20. Blyth CC, Chen SC, Slavin MA, Serena C, Nguyen Q, Marriott D, et al. Not just little adults: candidemia epidemiology, molecular characterization, and antifungal susceptibility in neonatal and pediatric patients. *Pediatrics* 2009;123(5):1360-8.
 21. Fernandes ACS, Junior FC, Oliveira SM, Calich L, Milan EP. Prevalence of Candida species in umbilical catheters implanted in newborns in Natal, Brazil. *Braz J Microbiol* 2007;38(1):104-7.
 22. Roilides E, Farmaki E, Evdoridou J, Dotis J, Hatzioannidis E, Tsivitanidou M, et al. Neonatal candidiasis: analysis of epidemiology, drug susceptibility, and molecular typing of causative isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23(10):745-50.
 23. Celebi S, Hacimustafaoglu M, Koksall N, Ozkan H, Cetinkaya M, Ener B. Neonatal candidiasis: results of an 8 year study. *Pediatr Int* 2012;54(3):341-9.
 24. Pammi M, Holland L, Butler G, Gacser A, Bliss JM. Candida parapsilosis is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32(5):e206-16.
 25. Giusiano GE, Mangiaterra M, Rojas F, Gómez V. Yeasts species distribution in Neonatal Intensive Care Units in northeast Argentina. *Mycoses* 2004;47(7):300-3.
 26. Caballero-Trejo A, Aguirre-Morales CE, González-González GM, Cortés-Palma D, Miranda-Novales MG. Colonization by Candida in a neonatal intensive care unit. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2014;52 Suppl 2:S16-23.
 27. Singhi S, Rao DS, Chakrabarti A. Candida colonization and candidemia in a pediatric intensive care unit.
 28. Rao S, Ali U. Systemic fungal infection in neonates. *J Postgrad Med* 2005;51(5):27-9.
 29. Orozco PA, Cortes JA, Parra CM. Colonization by yeasts in newborns and health care personnel in a neonatal intensive care unit at a university hospital in Bogota Colombia. *Rev Iberoam Micol* 2008;26(2):108-11.
 30. Hernández-Castro R, Arroyo-Escalante S, Carrillo-Casas EM, Moncada-Barrón D, Alvarez-Verona E, Hernández-Delgado L, et al. Outbreak of Candida parapsilosis in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. *Eur J Pediatr* 2010;169(7):783-7.
 31. Lee JH, Hornik CP, Benjamin DK Jr, Herring AH, Clark RH, Cohen-Wolkowicz M, et al. Risk factors for invasive candidiasis in infants >1500 g birth weight. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32(3):222-6.

Candida colonization and species identification by two methods in NICU newborn

Narges Sadat Taherzadeh
M.Sc.¹

Farideh Zaini Ph.D.¹

Roshanak Daie Ghazvini Ph.D.¹

Sasan Rezaie Ph.D.¹

Mahmoud Mahmoudi Ph.D.²

Maliheh Kadivar M.D.³

Fatemeh Sadat Nayeri M.D.⁴

Mahin Safara Ph.D.¹

Parivash Kordbacheh M.D.^{1*}

1- Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Children's Medical Center Hospital, Neonatal Intensive Care Unit (NICU), School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4- Department of Pediatrics, Imam Khomeini Hospital, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Poursina St., Ghods St., Enghelab Ave., School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +98 21 88951392
E-mail: pkordbacheh@tums.ac.ir

Abstract

Received: 05 Sep. 2015 Accepted: 15 Dec. 2015 Available online: 17 Feb. 2016

Background: Over the last two decades invasive candidiasis has become an increasing problem in neonatal intensive care units (NICUs). Colonization of skin and mucous membranes with *Candida spp.* is important factor in the pathogenesis of neonatal infection and several colonized sites are major risk factors evoking higher frequencies of progression to invasive candidiasis. The aim of this study was to detect *Candida* colonization in NICU patients.

Methods: This cross-sectional study was conducted on 93 neonates in NICUs at Imam Khomeini and Children Medical Center Hospitals in Tehran. Cutaneous and mucous membrane samples obtained at first, third, and seventh days of patients' stay in NICUs during nine months from August 2013 to May 2014. The samples were primarily cultured on CHROMagar *Candida* medium. The cultured media were incubated at 35°C for 48h and evaluated based on colony color produced on CHROMagar *Candida*. In addition, isolated colonies were cultured on Corn Meal Agar medium supplemented with tween 80 for identification of *Candida spp.* based on their morphology. Finally, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was performed for definite identification of isolated species.

Results: Colonization by *Candida spp.* was occurred in 20.43% of neonates. Fifteen and four patients colonized with one and two different *Candida spp.*, respectively. Isolated *Candida spp.* identified as; *C. parapsilosis* (n: 10), *C. albicans* (n: 7), *C. tropicalis* (n: 3), *C. guilliermondii* (n: 2), and *C. krusei* (n: 1). In present study non-albicans *Candida* species were dominant (69.56%) and *C. parapsilosis* was the most frequent isolate (43.47%). Using Fisher's exact test, the correlation between fungal colonization with low birth weight, low gestational age, and duration of hospital stay was found to be statistically significant (P=0.003).

Conclusion: The results of this study imply to the candida species colonization of neonates. Neonates in NICU are at the highest risk for severe infection with *Candida parapsilosis*. Therefore, isolation of *C. parapsilosis* as the most common species (43.47%) in present study was noteworthy.

Keywords: candida, candida parapsilosis, colonization, neonatal intensive care units, polymerase chain reaction.