شناسایی گونه‌های کاندیدای جدا شده از موارد ولوواژینیت کاندیدایی به روش Multiplex PCR

مهناز محمودی‌راد[1*]
آمنه شیرین ظفرقندی[2]
مریم عامل ذبیحی[2]، یاسمن میردامادی[3]
نورینا رهبریان[1]، بهنوش عباس آبادی[2]
مهتاب شیوایی[2]، زهره امیری[4]

۱- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- گروه بیماری‌های زنان و زایمان و نازایی، بیمارستان مهدیه، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه خاتم
۴- گروه علوم پایه، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

*نویسنده مسئول: تهران، اوین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، طبقهٔ ششم، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی
تلفن: ۲۲۷۴۴۳۹۴
email: mahnazrad@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۰۶/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۰۸/۰۲

چکیده

زمینه و هدف: ولوواژینیت کاندیدایی یک بیماری قارچی خارش‌دار همراه با ترشحات سفید رنگ می‌باشد. تشخیص گونه‌های کاندیدا برای به‌کارگیری درمان مناسب، امری مهم می‌باشد. در این تحقیق برای تعیین گونهٔ ۱۹۱ کاندیدای جدا شده از نمونه‌های واژینال ۱۷۵ بیمار مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی از روش multiplex PCR استفاده شد. ***روش بررسی:*** ۱۷۵ نمونهٔ سواب واژینال روی محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شد. در این بررسی، ناحیهٔ ITS1 و قسمت‌هایی از نواحی 5.8S و 18S ریبوزومال RNA به‌همراه قطعه‌ای از ناحیهٔ ITS2 که اختصاصی گونهٔ *C.albicans* است تکثیر شد و محصولات multiplex PCR با الکتروفورز روی آگاروز ۲٪ جدا گردیدند. ***یافته‌ها:*** ۱۹۱ ایزولهٔ کاندیدا در نمونه‌های واژینال تشخیص داده شد. در ۸۹/۷٪ نمونه‌ها یک گونهٔ کاندیدا و در ۱۰/۳٪ آنها چند گونهٔ کاندیدا جدا گردید. از نظر شیوع انواع گونه‌های کاندیدا، در ۱۱۴ مورد *C. albicans*، ۲۳ مورد *C. glabrata*، ۱۱ مورد *C. tropicalis*، هفت مورد *C. krusei*، یک مورد *C. guilliermondii*، یک مورد *C. parapsilosis* به‌تنهایی عامل بروز ولوواژنیت کاندیدایی بودند و در ۱۰ مورد *C. glabrata* و *C. albicans*، دو مورد *C. parapsilosis* و *C. albicans*، یک مورد *C. krusei* و *C. albicans*، یک مورد *C. tropicalis* و *C. albicans*، یک مورد *C. glabrata* و *C. tropicalis*، یک مورد *C. krusei* و *C. tropicalis*، یک مورد *C. glabrata* و *C. krusei* و یک مورد ترکیب *C. glabrata* و *C. krusei* و *C. albicans* عامل بیماری بودند. ***نتیجه‌گیری:*** شایع‌ترین عامل بیماری ولوواژنیت کاندیدایی *C. albicans* و سپس *C. glabrata* و شایع‌ترین ترکیب عامل بیماری نیز این دو گونه بودند.

کلمات کلیدی: کاندیدا، ولوواژینیت کاندیدایی، PCR.

مقدمه

ولوواژینیت کاندیدایی vulvovaginal candidiasis یک بیماری قارچی است که با علائمی نظیر خارش و ترشحات غلیظ سفید رنگ مشخص می‌شود. این بیماری توسط گونه‌های مختلف کاندیدا ایجاد می‌گردد. ۷۵-۷۰٪ زنان بالغ سالم حداقل یک‌بار در طول دوران باروری زندگی خود به ولوواژینیت کاندیدایی دچار می‌شوند.[1] کاندیدیازیس ژنیتال در اکثر موارد ناشی از افزایش تعداد کاندیدا آلبیکنس است که به‌صورت فلور طبیعی در واژن وجود دارد. تقریباً ۵٪ این بیماران در سال چهار بار و یا بیشتر به این بیماری مبتلا می‌شوند که به آن ولوواژینیت کاندیدایی عود کننده می‌گویند.[2] عامل اکثر موارد، گونهٔ *Candida albicans* است ولی در بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی عود کننده ۴۷-۱۵٪ موارد توسط گونه‌های non-*albicans* ایجاد می‌شوند.[3و4] برخی معتقدند استفادهٔ گسترده از داروهای ضد قارچی در افزایش فراوانی گونه‌های غیر آلبیکنس نقش داشته است زیرا رژیم‌های درمانی یک تا سه روزهٔ ایمیدازول‌ها ممکن است رشد کاندیدا آلبیکنس را متوقف کند اما باعث عدم تعادلی در فلور واژن می‌شود، که رشد بیش از حد گونه‌های دیگر کاندیدا را تسهیل خواهد کرد. اغلب گونه‌های کاندیدای غیر آلبیکنس نسبت به داروهای ضد قارچی مقاومت نشان می‌دهند و از این میان *Candida glabrata* و *Candida krusei* به فلوکونازول مقاومت بیشتری نسبت به سایر گونه‌ها از خود نشان می‌دهند.[5] از این رو شناسایی دقیق گونهٔ کاندیدا اهمیت بسزایی در درمان و مقابله با بیماری خواهد داشت. در سال‌های گذشته تشخیص و حتی رده‌بندی گونه‌ها بر اساس تظاهرات بالینی، ریخت‌شناسی ارگانیسم در محیط کشت و نیز انجام برخی

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی صورت می‌گرفت. این روش‌های کلاسیک، بسیار پر زحمت و وقت‌گیر هستند و چندین روز طول می‌کشد تا ایزوله‌های یک کشت شناسایی گردند.[۶] در ضمن گاهی سیستم‌های بیوشیمیایی اتوماتیک، گونه را اشتباه تشخیص می‌دهند.[۷] در مقابل، روش‌های مولکولی که در سال‌های اخیر جایگزین روش‌های قبلی شده‌اند از سرعت و دقت بالاتری برخوردار می‌باشند. روش‌های PCR گوناگونی برای افتراق برخی از گونه‌های کاندیدا گزارش شده است.[۸-۱۴] برخی از این روش‌ها بر اساس اهداف مولکولی تک‌نسخه‌ای یا چندنسخه‌ای برای شناسایی گونه‌های کاندیدا در محیط کشت یا نمونه‌های بالینی می‌باشند. روش Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis (RAPD) نیز به‌عنوان روشی آسان و مطمئن برای شناسایی چند گونهٔ ایزوله شده از مواد غذایی و نمونه‌های بالینی نظیر گونه‌های *Saccharomyces*،[۱۵] *Penicillium*[۱۶] و *Candida*[۱۷-۲۳] به‌کار رفته است، ولی تعداد روش‌هایی که برای شناسایی گونه‌های کاندیدا از single and direct PCR یا multiplex PCR استفاده شده است بسیار کم می‌باشد.[۱۰و۲۳-۲۵] در این تحقیق از یک روش بسیار ساده، سریع و تکرارپذیر multiplex PCR برای شناسایی گونه‌های کاندیدا و مقایسهٔ آنها در موارد ولوواژنیت‌های کاندیدایی راجعه (ابتلا چهار بار یا بیشتر در یک‌سال) و غیرراجعه (ابتلا کمتر از چهار بار در یک‌سال) استفاده گردید. در این روش برای افتراق گونه‌های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا تروپیکالیس که توسط پرایمرهای ITS1 و ITS2 باندهای مشابهی ایجاد می‌کنند، از پرایمرهای CA3 و CA4 به‌طور هم‌زمان با پرایمرهای ITS1 و ITS2 استفاده می‌شود که در این حالت دو باند برای نمونه‌های کاندیدا آلبیکنس و تنها یک باند برای کاندیدا تروپیکالیس به‌دست می‌آید. طول باندهای به‌دست آمده برای هر گونهٔ کاندیدا عبارتند از: C. glabrata ۴۸۲ یا ۴۸۳ جفت باز، C. guilliermondii ۲۴۸ جفت باز، C. parapsilosis ۲۲۹ جفت باز، C. albicans ۲۱۸ یا ۲۱۹ و ۱۱۰ جفت باز، C. tropicalis ۲۱۸ جفت باز و C. krusei ۱۸۲ جفت باز.[۲۴]

روش بررسی

ارگانیسم‌ها: این مطالعه مقطعی بر روی نمونه‌های کاندیدای جدا شده از ترشحات واژینال ۱۷۵ بیمار مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی (۸۳ نمونه ولوواژنیت راجعهٔ کاندیدایی و ۹۲ نمونه ولوواژنیت غیر راجعهٔ کاندیدایی) که بین سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۷ به بیمارستان مهدیه مراجعه کرده بودند انجام شد. از همهٔ بیماران قبل از نمونه‌گیری رضایت‌نامهٔ کتبی اخذ گردید. یک استرین از هر گونهٔ کاندیدا نیز به‌عنوان شاهد از یک مجموعهٔ کشت شامل: *C. parapsilosis* CBS2195، *C. tropicalis* CBS94، *C. glabrata* CBS2175، *C. krusei* CBS573 و *C. albicans* ATCC14053 در این تحقیق بررسی شدند.

شناسایی گونه‌ها: از ترشحات واژن ۱۷۵ بیمار مبتلا به ولوواژنیت کاندیدایی توسط سواپ استریل نمونهٔ واژینال تهیه، و روی محیط سابورو دکستروز آگار (SDA) کشت داده شد. گونه‌ها به‌روش تولید جرم تیوب، ایجاد کلامیدوسپور روی محیط کورن میل آگار، ایجاد کلنی‌های رنگی روی محیط کروم آگار کاندیدا (CHROMagar Company, Paris, France) و جذب کربوهیدرات‌ها شناسایی شدند. سپس کلنی‌های کاندیداهای رشد یافته جمع‌آوری، و تا زمان انجام multiplex PCR در آب مقطر استریل در دمای اتاق ذخیره شدند. در پایان مقایسه‌ای میان گونه‌های عامل ولوواژنیت راجعه و غیر راجعهٔ کاندیدایی انجام شد و برای توصیف داده‌ها از آمار توصیفی و در تحلیل داده‌ها از آزمون‌های اختلاف نسبت‌ها و میانگین‌ها، (Student T-test و χ^2 و ANOVA) استفاده گردید.

استخراج DNA از سویه‌ها: از کیت استخراج DNA ژنومی (AccuPrp®، Bioneer Corporation) طبق دستورالعمل استفاده شد. تشخیص گونه‌ها به‌روش multiplex PCR: PCR با استفاده از کیت PCR Premix (AccuPower® Bioneer Compony) انجام شد. هر میکروتیوب این کیت شامل یک واحد Taq DNA polymerase، ۲۵۰ میکرومولار dNTP، ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl (pH 9.0)، ۴۰ میلی‌مولار KCl، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، تثبیت‌کننده و tracking dye است. به‌هر میکروتیوب ۵-۱ نانوگرم از DNA استخراج‌شده و چهار میکرولیتر مخلوط آماده شده از چهار پرایمر با سکانس‌های زیر افزوده شد:

universal primers:

ITS1 (5́-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3́)
ITS2 (5́-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3́)

C. albicans-specific primers:

CA3 (5́-GGT TTG CTT GAA AGA CGG TAG-3́)
CA4 (5́-AGT TTG AAG ATA TAC GTG GTA G-3́)

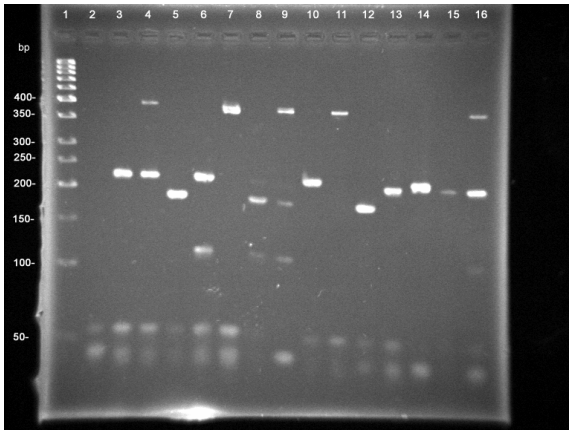
این پرایمرها قسمتی از ناحیهٔ 18S rDNA، ITS1 و قسمتی از 28S rDNA را تکثیر می‌کنند.[۲۴] پرایمرها از TAGC توسط شرکت ژن فن‌آوران تهیه و پس از حل کردن آنها در آب دیونیزه، مخلوطی از دو

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

میکرولیتر از هر پرایمر با آب مقطر به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده شد که در هر PCR میزان چهار میکرولیتر از این ترکیب به مخلوط واکنشی اضافه گردید. حجم مخلوط واکنشی بعد از افزودن پرایمرها و DNA نمونه‌ها با آب دیونیزه به ۲۰ میکرولیتر رسانده و میکروتیوب‌ها برای تکثیر DNA در داخل دستگاه Eppendorf Mastercycler Gradient قرار داده شدند. تنظیم دستگاه برای انجام یک سیکل سه دقیقه‌ای با دمای 94^{oC} به‌منظور دناتوراسیون اولیه، ۳۵ سیکل شامل: یک دقیقه با دمای 94^{oC} برای دناتوراسیون، یک دقیقه در دمای 60^{oC} برای اتصال پرایمرها و یک دقیقه در دمای 72^{oC} برای پلیمریزاسیون توسط Taq پلیمراز و در نهایت یک سیکل پنج دقیقه‌ای با دمای 72^{oC} برای پلیمریزاسیون نهایی صورت گرفت. محصولات PCR روی ژل آگاروز ۲٪ (Roche) الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید (Sigma) رنگ‌آمیزی شدند. سپس باندهای روی ژل، تحت اشعه UV با دستگاه (UVdoc, GAS9000, England) Gel Documentation عکس‌برداری شد. باندها با نرم‌افزار UVIsoft اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

نمونه‌های استخراج شدهٔ DNA با استفاده از multiplex PCR تکثیر شدند و پس از الکتروفورز محصولات PCR (شکل ۱) نتایج زیر به‌دست آمد: در این مطالعه ۱۷۵ خانم مبتلا به ولوواژنیت کاندیدایی



شکل-۱: multiplex PCR توسط پرایمرهای ITS1، ITS2، CA3 و CA4. ردیف ۱ مارکر ۵۰bp DNA، ردیف ۲ کنترل منفی، ردیف‌های ۳ تا ۸ و ردیف‌های ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۵ و ۱۶ مربوط به نمونه‌های ۱۱ بیمار، ردیف ۹ ترکیب *C. krusei* CBS573، *C. albicans* ATCC14053 و *C. glabrata* CBS2175، ردیف ۱۰ *C. tropicalis* CBS94 و ردیف ۱۴ *C. parapsilosis* CBS2195 می‌باشد.

جدول-۱: مقایسهٔ گونه‌های کاندیدا در انواع ولوواژینیت کاندیدایی

نوع ولوواژینیت / نوع کاندیدا	راجعه	غیر راجعه	در مجموع (درصد از کل)
Candida albicans	۵۶(٪۶۷/۶)	۵۸(٪۶۳)	۱۱۴(٪۶۵/۱)
Candida glabrata	۷(٪۸/۴)	۱۶(٪۱۷/۴)	۲۳(٪۱۳/۱)
Candida tropicalis	۶(٪۷/۲)	۵(٪۵/۴)	۱۱(٪۶/۲)
C.albicans & C.glabrata	۶(٪۷/۲)	۴(٪۴/۳)	۱۰(٪۵/۷)
Candida krusei	۴(٪۴/۸)	۳(٪۳/۳)	۷(٪۴)
C. albicans & C.parapsilosis	۱(٪۱/۲)	۱(٪۱/۱)	۲(٪۱/۱)
Candida parapsilosis	۱(٪۱/۲)	۰(٪۰)	۱(٪۰/۶)
Candida guilliermondii	۰(٪۰)	۱(٪۱/۱)	۱(٪۰/۶)
C.glabrata & C.tropicalis	۱(٪۱/۲)	۰(٪۰)	۱(٪۰/۶)
C.krusei & C.tropicalis	۱(٪۱/۲)	۰(٪۰)	۱(٪۰/۶)
C.albicans & C.tropicalis	۰(٪۰)	۱(٪۱/۱)	۱(٪۰/۶)
C.albicans & C.krusei	۰(٪۰)	۱(٪۱/۱)	۱(٪۰/۶)
C.krusei & C.glabrata	۰(٪۰)	۱(٪۱/۱)	۱(٪۰/۶)
C.albicans & C.krusei & C.glabrata	۰(٪۰)	۱(٪۱/۱)	۱(٪۰/۶)
مجموع	۸۳(٪۴۷/۴)	۹۲(٪۵۲/۶)	۱۷۵(٪۱۰۰)

بررسی شدند که ۹۲ نفر (٪۵۲/۶) از آنها کمتر از چهار بار در سال (غیر راجعه) و ۸۳ نفر (٪۴۷/۴) از آنها چهار بار یا بیشتر از آن در سال (راجعه) مبتلا به ولوواژنیت کاندیدایی شده بودند. میانگین سنی افراد ۳۱/۳۸ سال با SD=۸/۲۲ به‌دست آمد. میانگین سنی گروه غیر راجعه ۳۱/۳۲ سال با SD=۹/۱۶ و میانگین سنی گروه راجعه ۳۱/۴۶ سال با SD=۷/۰۸ بود که اختلاف معنی‌داری بین آنها به‌دست نیامد (p=۰/۹۰۹). از ۱۵۷ بیمار (٪۸۹/۷) تنها یک گونهٔ کاندیدا و از ۱۸ بیمار (٪۱۰/۳) چند گونهٔ کاندیدا جدا گردید. در مبتلایان به کاندیدیاز ولوواژینال غیر راجعه، در ۸۳ بیمار (٪۹۰/۲) یک گونهٔ کاندیدا و در ۹ بیمار (٪۹/۸) بیشتر از یک گونهٔ کاندیدا عامل بیماری بودند. در نوع راجعه، در ۷۴ بیمار (٪۸۹/۲) یک گونهٔ کاندیدا و در ۹ بیمار (٪۱۰/۸) بیش از یک گونه عامل ایجاد بیماری بودند که اختلاف آماری معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت (p=۱). شیوع انواع گونه‌های کاندیدا در مبتلایان به ولوواژنیت کاندیدایی راجعه و غیر راجعه در جدول ۱ نشان داده شده است.

بحث

در این مطالعه از ۲۵۴ بیمار دارای علائم ولوواژنیت کاندیدایی نمونه‌گیری شد. عده‌ای از بیماران به علت آلودگی شدید نمونهٔ کشت

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

با قارچ‌هایی مثل آسپرژیلوس‌ها که خالص‌سازی کاندیدا را غیر ممکن می‌ساخت و یا وجود ولوواژنیت‌های غیرکاندیدایی از مطالعه حذف شدند. با توجه به ماهیت بیماری و اینکه بروز این بیماری در دوره باروری رخ می‌دهد میانگین سنی بیماران حدود ۳۱/۳۸ سال (SD=۸/۲۲) به‌دست آمد که در هر دو گروه ولوواژنیت کاندیدایی راجعه و غیر راجعه نیز حدود ۳۱ سال بود و اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند. ۸۹/۷٪ از بیماران توسط یک نوع از کاندیداها مبتلا به ولوواژنیت کاندیدایی شده بودند و در ۱۰/۳٪ موارد بیش از یک نوع کاندیدا عامل بیماری بود که بین دو گروه بیماران مبتلا به ولوواژنیت کاندیدایی راجعه و غیر راجعه اختلاف آماری معنی‌داری از این نظر وجود نداشت. در مطالعهٔ Fan، از ۱۰۷۰ بیمار مبتلا به ولوواژنیت کاندیدایی، تنها در ۰/۰۲٪ موارد بیش از یک گونه کاندیدا عامل بیماری بود.[۲۶] در مطالعهٔ Richter عامل بیماری در ۴/۸٪ موارد بیشتر از یک گونه کاندیدا بود که نسبت به مطالعه ما کمتر می‌باشد و از نظر شیوع گونه‌های مختلط در یک بیمار، مشابه نتایج ما بود.[۲۷] شایع‌ترین حالت، جداسازی گونه‌های *C. albicans* و *C. glabrata* از یک بیمار بود و سایر موارد مختلط نیز شیوعی کم و بیش مشابه داشتند.[۲۷] در مطالعات دیگر، شیوع موارد بیشتر از یک گونه کاندیدا در یک بیمار به‌ترتیب ۱۳٪، ۵٪، ۰/۱۲٪ بوده است.[۲۸-۳۰] به‌نظر می‌رسد شیوع موارد ولوواژنیت کاندیدایی که چند گونهٔ کاندیدا در آن دخیل هستند در بیماران مورد بررسی ما نسبت به مقالات مشابه افزایش نشان داده است که این موضوع می‌تواند از نظر بهداشتی مهم باشد اما نیازمند مطالعه‌ای گسترده در سطح کشور می‌باشد. شایع‌ترین عوامل بیماری ولوواژنیت کاندیدایی در این مطالعه به‌ترتیب *C. albicans*، *C. glabrata*، *C. tropicalis*، *C. krusei*، *C. parapsilosis* و *C. guilliermondii* بودند و بین دو گروه بیماران ولوواژنیت کاندیدایی راجعه و غیر راجعه نیز از نظر شیوع انواع کاندیدا اختلاف آماری معنی‌دار به‌دست نیامد. در تمامی گزارشات مشابه[۲۷و۳۱-۳۶] نیز بیشترین عامل ولوواژنیت کاندیدایی *C. albicans* با شیوع ۴۳٪ تا ۹۱٪ بوده است. در مطالعهٔ ما *C. glabrata* از نظر شیوع در ردهٔ دوم قرار داشت که در سایر مطالعات مشابه،[۲۷و۳۱-۳۶] نیز همین نتیجه به‌دست آمده است و طیف شیوع آن از ۴/۹٪ تا ۳۴/۷٪ بوده است. به‌همین ترتیب شیوع گونه‌های دیگر نیز در مطالعه ما مشابه گزارشات دیگر می‌باشد.[۲۹-۳۴و۳۷-۳۹] در تحقیقات مشابهی که پیش از این در ایران، در شهرهای ساری، یاسوج و قزوین انجام شده است نیز شایع‌ترین گونه‌ها کاندیدا آلبیکنس و سپس کاندیدا گلابراتا بوده است.[۴۰-۴۲] بنابراین در مجموعهٔ این مطالعات، همچون نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، افزایش شیوع گونه‌های غیرآلبیکانس به‌خصوص افزایش گونهٔ کاندیدا گلابراتا قابل توجه می‌باشد، که خود شاهدی بر افزایش شیوع گونه‌های مقاوم به داروی ضد قارچی در ایجاد ولوواژنیت کاندیدایی است. در این تحقیق از روش multiplex PCR به‌منظور شناسایی گونه‌های کاندیدا در موارد ولوواژینیت کاندیدایی استفاده شد. این روش از پرایمرهای قارچی یونیورسال ITS1 و ITS2 برای تکثیر قسمتی از ناحیهٔ 18S rDNA، ناحیهٔ ITS1 مجاور آن و بخش کوچکی از ناحیهٔ 5.8S rDNA بهره می‌گیرد. جفت پرایمر دیگر (CA3 و CA4) نیز برای تکثیر قسمتی از ناحیهٔ ITS2 در کاندیدا آلبیکنس به‌کار رفت. این روش حداکثر در طی شش ساعت قابل انجام است و از مزایای دیگر این روش شناسایی موارد عفونت هم‌زمان با چند کاندیدا در یک آزمایش بود. کیت تجارتی استخراج DNA ژنومی (AccuPrp® Genomic DNA Extraction Kit, Bioneer Corporation) استفاده شده در این تحقیق نیز بسیار کارآمد و روشی ساده برای استخراج DNA از نمونه‌ها داشت و زمان لازم برای انجام استخراج DNA با این کیت ۳۵ دقیقه بود. با این کیت دیگر نیازی به فنل- کلروفرم برای تخلیص DNA نبود. از آنجا که rDNA قارچ‌ها تعداد کپی دارد (۴۰ تا ۸۰ کپی در ژنوم هاپلوئید)، استفاده از این قطعات برای شناسایی گونه‌های کاندیدا نتایج خوبی به‌دست می‌دهد.

References

1. MacNeill C, Carey JC. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Curr Womens Health Rep* 2001;1(1):31-5.
2. Nyirjesy P. Chronic vulvovaginal candidiasis. *Am Fam Physician* 2001;63(4):697-702.
3. Kunzelmann V, Tietz HJ, Rossner D, Czaika V, Hopp M, Schmalreck A, et al. Prerequisites for effective therapy of chronic recurrent vaginal candidiasis. *Mycoses* 1996;39 Suppl 1:65-72.
4. Handa VL, Stice CW. Fungal culture findings in cyclic vulvitis. *Obstet Gynecol* 2000;96(2):301-3.
5. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Doern GV, Brandt ME, et al. Trends in species distribution and susceptibility to fluconazole among blood stream isolates of Candida species in the United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;33(4):217-22.
6. Warren NG, Hazen KC. Candida, Cryptococcus, and other yeasts of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover PC, Yolken RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology (ASM) Press; 1999. p. 1184-99.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

7. Dooley DP, Beckius ML, Jeffrey BS. Misidentification of clinical yeast isolates by using the updated Vitek Yeast Biochemical Card. *J Clin Microbiol* 1994;32(12):2889-92.
8. Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ. Rapid identification of Candida species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1454-9.
9. Shin JH, Nolte FS, Holloway BP, Morrison CJ. Rapid identification of up to three Candida species in a single reaction tube by a 5' exonuclease assay using fluorescent DNA probes. *J Clin Microbiol* 1999;37(1):165-70.
10. Jordan JA. PCR identification of four medically important Candida species by using a single primer pair. *J Clin Microbiol* 1994;32(12):2962-7.
11. Haynes KA, Westerneng TJ. Rapid identification of Candida albicans, C. glabrata, C. parapsilosis and C. krusei by species-specific PCR of large subunit ribosomal DNA. *J Med Microbiol* 1996;44(5):390-6.
12. Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. Rapid identification of Candida species with species-specific DNA probes. *J Clin Microbiol* 1998;36(11):3260-5.
13. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1353-60.
14. Burgener-Kairuz P, Zuber JP, Jaunin P, Buchman TG, Bille J, Rossier M. Rapid detection and identification of Candida albicans and Torulopsis (Candida) glabrata in clinical specimens by species-specific nested PCR amplification of a cytochrome P-450 lanosterol-alpha-demethylase (L1A1) gene fragment. *J Clin Microbiol* 1994;32(8):1902-7.
15. Molnar O, Messner R, Prillinger H, Stahl U, Slavikova E. Genotypic identification of Saccharomyces species using random amplified polymorphic DNA analysis. *Syst Appl Microbiol* 1995;18: 136-45.
16. Dupont J, Magnin S, Marti A, Brousse M. Molecular tools for identification of Penicillium starter cultures used in the food industry. *Int J Food Microbiol* 1999;49(3):109-18.
17. Andrighetto C, Psomas E, Tzanetakis N, Suzzi G, Lombardi A. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Lett Appl Microbiol* 2000;30(1):5-9.
18. Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus Candida by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol* 1992;30(12):3249-54.
19. Liu D, Coloe S, Jones SL, Baird R, Pedersen J. Genetic speciation of Candida isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* 1996;145(1):23-6.
20. Melo AS, de Almeida LP, Colombo AL, Briones MR. Evolutionary distances and identification of Candida species in clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Mycopathologia* 1998;142(2):57-66.
21. Steffan P, Vazquez JA, Boikov D, Xu C, Sobel JD, Akins RA. Identification of Candida species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. *J Clin Microbiol* 1997;35(8):2031-9.
22. Thanos M, Schonian G, Meyer W, Schweynoch C, Graser Y, Mitchell TG, et al. Rapid identification of Candida species by DNA fingerprinting with PCR. *J Clin Microbiol* 1996;34(3):615-21.
23. Tietz HJ, Küssner A, Thanos M, De Andrade MP, Presber W, Schönian G. Phenotypic and genotypic characterization of unusual vaginal isolates of Candida albicans from Africa. *J Clin Microbiol* 1995;33(9):2462-5.
24. Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J Clin Microbiol* 2001;39(10):3466-71.
25. 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 Microbiol* 2001;39(10):3617-22.
26. Fan SR, Liu XP, Li JW. Clinical characteristics of vulvovaginal candidiasis and antifungal susceptibilities of Candida species isolates among patients in southern China from 2003 to 2006. *J Obstet Gynaecol Res* 2008;34(4):561-6.
27. Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. Antifungal susceptibilities of Candida species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *J Clin Microbiol* 2005;43(5):2155-62.
28. Willinger B, Manafi M. Evaluation of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for Candida species. *Mycoses* 1999;42(1-2):61-5.
29. Kunzelmann V, Tietz HJ, Rossner D, Czaika V, Hopp M, Schmalreck A, et al. Prerequisites for effective therapy of chronic recurrent vaginal candidiasis. *Mycoses* 1996;39 Suppl 1:65-72.
30. Abu-Elteen KH. Increased incidence of vulvovaginal candidiasis caused by Candida glabrata in Jordan. *Jpn J Infect Dis* 2001;54(3):103-7.
31. Fleury FJ. Adult vaginitis. *Clin Obstet Gynecol* 1981;24(2):407-38.
32. Goldacre MJ, Watt B, Loudon N, Milne LJ, Loudon JD, Vessey MP. Vaginal microbial flora in normal young women. *Br Med J* 1979;1(6176):1450-3.
33. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. *J Clin Microbiol* 1994;32(8):1923-9.
34. Pádua RAF, Guilhermetti E, Svidzinski TIE. In vitro activity of antifungal agents on yeasts isolated from vaginal secretion. *Maringá* 2003;25(1):51-4.
35. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. In vitro susceptibilities of clinical isolates of Candida species, Cryptococcus neoformans, and Aspergillus species to itraconazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods. *J Clin Microbiol* 2005;43(8):3807-10.
36. Arzeni D, Del Poeta M, Simonetti O, Offidani AM, Lamura L, Balducci M, et al. Prevalence and antifungal susceptibility of vaginal yeasts in outpatients attending a gynecological center in Ancona, Italy. *Eur J Epidemiol* 1997;13(4):447-50.
37. Houang ET, Chu KC, Koehler AP, Cheng AF. Use of CHROMagar Candida for genital specimens in the diagnostic laboratory. *J Clin Pathol* 1997;50(7):563-5.
38. Ahmad A, Khan AU. Prevalence of Candida species and potential risk factors for vulvovaginal candidiasis in Aligarh, India. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;144(1):68-71.
39. Vermitsky JP, Self MJ, Chadwick SG, Trama JP, Adelson ME, Mordechai E, et al. Survey of vaginal-flora Candida species isolates from women of different age groups by use of species-specific PCR detection. *J Clin Microbiol* 2008;46(4):1501-3.

۴۰. شکوهی طاهره. ولووواژینیت کاندیدایی در مراجعه‌کنندگان به درمانگاه‌های زنان شهرستان ساری در سالهای ۱۳۷۳-۱۳۷۲. مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان ۱۳۷۵: شماره ۱۹ و ۱۸: صفحات ۲۲ تا ۲۷.

۴۱. صفری میترا، یزدان‌پناه بهروز، ملک‌زاده جان محمد. شیوع عفونت‌های علامت‌دار واژن و ارتباط آن با روش‌های پیشگیری از بارداری در زنان مراجعه کننده به درمانگاه زنان یاسوج. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج ۱۳۷۷: سال ۳، شماره ۹ و ۱۰: صفحات ۱۵ تا ۲۲.

۴۲. آقامیریان محمد رضا، کشاورز داوود، جهانی هاشمی حسن، صادقی قزوینی محبوبه. عوامل ولووواژنیت کاندیدایی در مراجعین به مراکز درمانی قزوین. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین۱۳۸۶: سال ۱۰، شماره ۳: صفحات ۳۵ تا ۴۰.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 9, Dec 2009: 623-628

Identification of Candida species associated with vulvovaginal candidiasis by Multiplex PCR method

Mahmoudi Rad M.[1*]
Zafarghandi AS.[2]
Amel Zabihi M.[2]
Mirdamadi Y.[3]
Rahbarian N.[1]
Abbasabadi B.[2]
Shivaei M.[2]
Amiri Z.[4]

1- Cellular and Molecular Biology Research Center, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences
2- Department of Gynecology, Obstetrics and Infertility, Mahdieh Hospital, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences
3- Department of Biology, Khatam University
4- Department of Basic Sciences, Nutrition School, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences

* Corresponding author: Cellular and Molecular Biology Research Center, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Evin, Tehran, Iran
Tel: +98-21-23872552
email: mahnazrad@gmail.com

Received: September 09, 2009 Accepted: October 24, 2009

Abstract

Background: Vulvovaginal candidiasis is a fungal disease with itching, and vaginal thick white discharge. Most of non-*albicans* species have less sensitivity to azoles. So, definition of *candida* species which lead to vulvovaginal candidiasis is very important to perfect usage of drugs. In the present study 191 *Candida* isolates from 175 patients who admitted in Gynecology department of Mahdieh Hospital during the period 1385-1387 were identified by multiplex PCR.

Methods: One hundred seventy five vaginal swab specimens from patients were cultured on Sabouraud Dextrose Agar (SDA). The internal transcribed spacer 1 (ITS1) region between the 18S and 5.8S rRNA genes and a specific DNA fragment within the ITS2 region of *Candida albicans* were amplified and the multiplex PCR products were separated by electrophoresis in 2% agarose gel (200 mA, 140V), visualized by staining with ethidium bromide, and photographed.

Results: One hundred ninety one *Candida* isolates were identified in vaginal swab specimens from 175 patients. In 89.7% of cases, single *candida* species and in 10.3% cases, multiple *candida* species were isolated. *C. albicans* (65.1%), *C. glabrata* (13.1%), *C. tropicalis* (6.2%), *C. krusei* (4%), *C. guilliermondii* (0.6%), *C. parapsilosis* (0.6%), *C. glabrata* and *C. albicans* (5.7%), *C. albicans* and *C. parapsilosis* (1.1%), *C. glabrata* and *C. tropicalis* (0.6%), *C. krusei* and *C. tropicalis* (0.6%), *C. albicans* and *C. tropicalis* (0.6%), *C. krusei* and *C. albicans* (0.6%), *C. glabrata* and *C. krusei* (0.6%), and *C. glabrata* and *C. krusei* and *C. albicans* (0.6%) were the cause of disease.

Conclusion: Our findings suggest that, the common cause of both recurrent and non-recurrent vulvovaginal candidiasis was *C. albicans*, and then *C. glabrata*. Also the most common mixtures of *Candida* species were combination of them.

Keywords: *Candida*, vulvovaginal candidiasis, polymerase chain reaction.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]