

شناسایی مولکولی گونه‌های کاندیدای جدا شده از زنان مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی: گزارش کوتاه

چکیده

دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۲۶ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۷/۲۷ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۲۹ آنلاین: ۱۳۹۶/۰۷/۳۰

زمینه و هدف: ولوواژینیت کاندیدایی عفونت شایعی است که حدود ۷۵٪ زنان دست‌کم یک‌بار به آن مبتلا می‌شوند. این مطالعه با هدف شناسایی گونه‌های کاندیدای جدا شده از زنان مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی توسط روش مولکولی در شهر اراک انجام گرفت.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی-مقطعی از خرداد ماه ۱۳۹۴ تا فروردین ۱۳۹۵ بروی ۲۱۰ بیمار مبتلا به ولوواژینیت مراجعه‌کننده به کلینیک‌های شهر اراک به‌روش نمونه‌برداری واژن توسط سواب‌های مرطوب استریل انجام شد. سواب‌ها بروی محیط کشت ساپروکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل کشت داده شدند. ایزوله‌های مخمری توسط روش Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) شناسایی شدند.

یافته‌ها: از ۲۱۰ بیمار مبتلا به ولوواژینیت، ۹۵ بیمار (۴۵/۲٪) مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی بودند. شایعترین گونه‌های جدا شده کاندیدای آلبیکنس (۷۰/۵٪)، کاندیدای گلابراتا (۲۰٪)، کاندیدای تروپیکالیس (۷/۴٪) و کاندیدای پاراپسیلوزیس (۲/۱٪) بودند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، کاندیدای آلبیکنس شایعترین گونه جدا شده از بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی بود و تقریباً ۳۰٪ از این عفونت توسط گونه‌های غیر آلبیکنس ایجاد شده بود.

کلمات کلیدی: کاندیدای، پژوهش‌های مقطعی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ولوواژینیت کاندیدایی.

مریم خانمحمدی^۱، امیر سید علی مهبد^۲، مجتبی نورایی‌پور^۳ مجتبی دیده‌دار^{۴*}

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران.

۲- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران.

۳- گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۴- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

* نویسنده مسئول: اراک، سردشت، میدان بسیج، مجتمع پیامبر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی، گروه قارچ‌شناسی و انگل‌شناسی پزشکی.

تلفن: ۰۸۶-۳۴۱۳۵۰۲

E-mail: didehdar_m@yahoo.com

مقدمه

شناسایی گونه‌های کاندیدای با کمک روش‌های سنتی شامل کشت، آزمایشات بیوشیمیایی افزون بر اینکه وقت‌گیر و هزینه‌بر هستند، حساسیت کمی دارند. روش‌های مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک، سرعت، حساسیت و دقت بالاتری نسبت به روش‌های متداول و سنتی دارند، به‌طوری‌که در چند ساعت توانایی شناسایی جنس و گونه را دارند.^۱ اگرچه ایراد این روش‌ها هزینه بالای آن‌ها نسبت به دیگر روش‌های شناسایی می‌باشد.^۲ روش PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) یکی از روش‌های دقیق مولکولی می‌باشد که برای شناسایی گونه‌های کاندیدای در مطالعات مختلف استفاده شده است.^۳ هدف از مطالعه حاضر،

ولوواژینیت کاندیدایی عفونت شایع دستگاه واژینال است و ۷۵٪ زنان حداقل یک‌بار به این عفونت مبتلا می‌شوند.^۱ فاکتورهای مستعد کننده این بیماری شامل بارداری، دیابت کنترل نشده، مصرف آنتی‌بیوتیک و مصرف داروهای ضد بارداری خوراکی می‌باشند.^۲ شایعترین گونه ایجاد کننده بیماری کاندیدای آلبیکنس می‌باشد، اما گونه‌های غیر آلبیکنس شامل کاندیدای گلابراتا، کاندیدای تروپیکالیس، کاندیدای کروزه‌ای که در ایجاد ولوواژینیت عودکننده نقش دارند، شیوع آن‌ها در حال افزایش است.^۳

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Bio-Rad, USA) انجام شد.

بر اساس روشی که پیش‌تر توسط Mirhendi و همکارانش توصیف شده، محصول PCR توسط آنزیم (Fermentas, Germany) MSP I بریده شد و با استفاده از الگوهای مختلف مربوط به گونه‌های کاندیدا تعیین گونه شدند.^۹

به‌طور خلاصه ۵ µl محصول PCR با ۰/۵ آنزیم MSP I، ۱/۵ بافر آنزیم و ۸ µl آب مقطر در میکروتیوب‌های µl ۲۰۰ مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۳۷ قرار داده شد. محصول PCR روی ژل ۱٪ و محصول RFLP روی ژل ۲٪ الکتروفورز شدند. ژل‌ها پس از رنگ‌آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید با Gel Doc device (Uvidoc, Gel Documentation System, Cambridge, UK) مشاهده شد. بر اساس الگوی ایجاد شده در روش RFLP و مقایسه آن با گونه استاندارد، گونه کاندیدیایی شناسایی شد.

یافته‌ها

در مجموع از ۲۱۰ زن مشکوک به ولوواژینیت، ۹۵ زن (۴۵/۲٪) آزمایش کشت مثبت داشته و در آزمایش مستقیم سلول‌های مخمری با جوانه یا بدون جوانه همراه با میسیلیوم‌های کاذب مشاهده گردید. در آزمایش Polymerase chain reaction (PCR)، طبق انتظار قطعاتی با اندازه متفاوت ۸۷۱-۵۱۰ bp بسته به گونه کاندیدیایی از DNA تمام ایزوله‌های بالینی تکثیر شد (شکل ۱).

همانگونه که در شکل ۲ مشخص شده، در آزمایش RFLP الگوی الکتروفورزی به‌دست آمده برای هر نمونه با الگوهای استاندارد مقایسه شده و در نهایت گونه‌های کاندیدا شناسایی شدند (شکل ۲).^۹ شیوع واژینیت کاندیدیایی در این مطالعه ۴۵/۲٪ بود و از مجموع ۹۵ ایزوله کاندیدیایی که RFLP شدند، ۶۷ ایزوله به‌عنوان کاندیدا آلبیکنس (۷۰/۵٪)، ۱۹ ایزوله به‌عنوان کاندیدا گلابراتا (۲۰٪)، هفت ایزوله به‌عنوان کاندیدا تروپیکالیس (۷/۴٪) و ۲ ایزوله به‌عنوان کاندیدا پاراپسیلوزیس (۲/۱٪) شناسایی شدند (جدول ۱).

سن زنان مبتلا به ولوواژینیت بین ۶۰-۱۴ سال بوده و گروه سنی ۲۱-۳۰ سال بیشترین و گروه سنی >۵۱ سال کمترین موارد ابتلا به عفونت را به خود اختصاص دادند (جدول ۲).

شناسایی و تعیین فراوانی گونه‌های کاندیدیایی در بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیایی بود.

روش بررسی

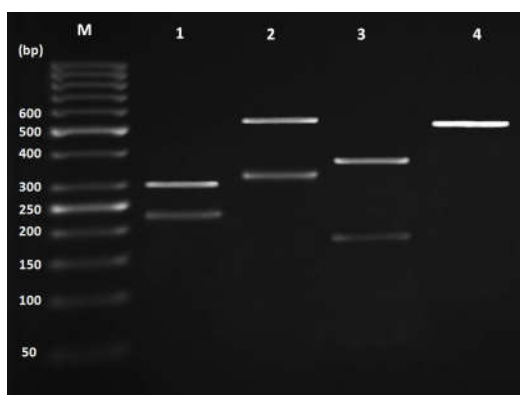
پژوهش حاضر یک مطالعه توصیفی مقطعی می‌باشد که از خرداد ماه ۱۳۹۴ تا فروردین ۱۳۹۵، بر روی ۲۱۰ بیمار مشکوک به ولوواژینیت کاندیدیایی مراجعه‌کننده به کلینیک‌ها و درمانگاه‌های تخصصی زنان شهر اراک انجام شد. معیار انتخاب بیماران، عدم استفاده از داروهای ضد قارچی به مدت سه روز و داشتن دو تا سه نشانه‌ی بالینی واژینیت کاندیدیایی بود و معیار خروج بیماران، عدم همکاری بیماران و ابتلا به عفونت‌های واژینال باکتریایی و انگلی بود. پس از کسب رضایت از بیماران، نمونه‌گیری توسط پزشکی متخصص زنان با کمک سوآپ استریل مرطوب انجام شد و سوآپ‌ها در داخل لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل منتقل و در کمترین زمان به آزمایشگاه قارچ شناسی منتقل گردید.

از یکی از سوآب‌ها، گسترش مرطوب تهیه شد و زیر میکروسکوپ با عدسی ۴۰X از نظر بود یا نبود سلول‌های مخمری و میسیلیوم کاذب بررسی شد. سوآب دیگر در محیط کشت سابروکستروز آگار (Merck, Germany) حاوی کلرامفنیکل کشت داده شد و محیط کشت به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای °C ۳۰ انکوبه شد. محیط کشت روزانه از نظر رشد کلنی مخمری بررسی می‌شد. کلنی ایزوله‌های کاندیدیایی جدا شده در محلول آب-گلیسرول ۲۰٪ در دمای °C ۲۰- نگهداری شدند.

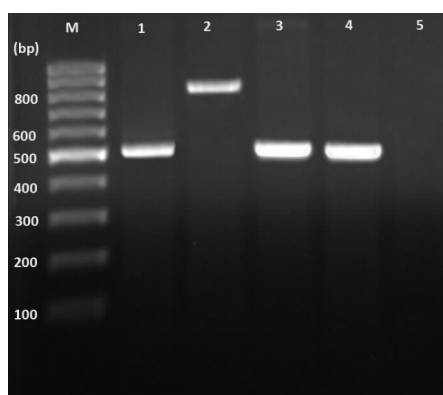
جهت استخراج DNA از ایزوله‌های نگهداری شده، در محلول آب-گلیسرول کشت دوباره داده شد و از کلنی‌های تازه با کمک روش Glass beads که پیش‌تر توسط Yamada و همکارانش توصیف شده، DNA ژنومی استخراج شد.^۸ به‌طور خلاصه جهت انجام واکنش، به مخلوط PCR که شامل ۱۰ میکرولیت بافر PCR، ۰/۵ µl پرایمر رفت ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') و ۰/۵ µl پرایمر برگشت ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')، DNTTP ۰/۵ µl و آنزیم Taq DNA Polymerase ۰/۲۵ µl همگی تهیه شده از (CinnaGen, Iran) بود، ۲ µl از DNA استخراج شده اضافه و حجم واکنش با آب مقطر استریل به ۲۵ µl رسانده شد.

جدول ۱: فراوانی گونه‌های کاندیدایی جدا شده در این مطالعه با توجه به گروه‌های سنی بیماران

گونه کاندیدایی	گروه‌های سنی (سال)	۱۱-۲۰	۲۱-۳۰	۳۱-۴۰	۴۱-۵۰	۵۱-۶۰	۶۱≥	جمع(درصد)
کاندیدا آلبیکنس		۶	۴۰	۱۷	۲	۱	۱	۶۷(۷۰/۵)
کاندیدا گلابراتا		۲	۸	۷	۲	-	-	۱۹(۲۰)
کاندیدا تروپیکاليس		-	۲	۳	۱	۱	-	۷(۷/۴)
کاندیدا پاراپسیلوزيس		-	۱	۱	-	-	-	۲(۲/۱)
مجموع		۸	۵۱	۲۸	۵	۲	۱	۹۵(۱۰۰)



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR برخی از ایزوله‌های بالینی درماتوفیتی پس از هضم آنزیمی با *MSP I* روی آگارز ۲٪. مشخصات نمونه‌ها به ترتیب عبارتند از: ۱- کاندیدا آلبیکنس، ۲- کاندیدا گلابراتا، ۳- کاندیدا تروپیکاليس، ۴- کاندیدا پاراپسیلوزيس، ۵- کنترل منفی، M- مارکر ۱۰۰ bp



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR برخی از ایزوله‌های بالینی کاندیدایی روی آگارز ۱٪. مشخصات نمونه‌ها به ترتیب عبارتند از: ۱- کاندیدا آلبیکنس، ۲- کاندیدا گلابراتا، ۳- کاندیدا تروپیکاليس، ۴- کاندیدا پاراپسیلوزيس، ۵- کنترل منفی، M- مارکر ۱۰۰ bp

بحث

با این گونه در این پژوهش و دیگر مطالعات مشابه می‌تواند ناشی از افزایش نادرست و کوتاه‌مدت از داروهای آزولی خوراکی یا موضعی باشد، که این امر منجر به افزایش کلینزاسیون *کاندیدا گلابراتا* در واژن و ایجاد مقاومت دارویی می‌شود.

در مطالعه Hasanvand و همکارانش که در شهرهای شمالی استان خوزستان انجام شد، گونه‌های کاندیدایی ایجاد کننده ولوواژینیت کاندیدایی در ۱۷۳ بیمار مشکوک به ولوواژینیت شناسایی شدند. در این بررسی، مشابه مطالعه حاضر شیوع ولوواژینیت کاندیدایی بالا (۵۴/۹٪) بود و از نظر شیوع گونه‌های کاندیدایی ایجاد کننده ولوواژینیت با این مطالعه مشابهت داشتند به طوری که گونه‌های

در مطالعه حاضر میزان شیوع ولوواژینیت کاندیدایی ۴۵/۲٪ و بیشترین میزان شیوع این عفونت در گروه سنی ۲۰-۴۰ سال می‌باشد، که با بیشتر مطالعات انجام شده در داخل کشور همخوانی دارد.^{۱۱-۱۲} کمترین میزان شیوع این عفونت در گروه سنی >۵۱ سال بود که با نتایج دیگر مطالعات انجام شده همخوانی داشت.^{۱۱}

با دیگر مطالعات انجام شده در داخل کشورمان و دیگر نقاط جهان، در این مطالعه نیز شایعترین گونه کاندیدایی جدا شده از ولوواژینیت، *کاندیدا آلبیکنس* بود.^{۱۱-۱۴} دومین گونه شایع کاندیدایی در این بررسی *کاندیدا گلابراتا* بود که با یافته‌های برخی از مطالعات داخل و خارج کشور همسو بود.^{۱۵} افزایش واژینیت کاندیدایی

کاندیدیای شایع جدا شده به ترتیب شامل *کاندیدا آلبيکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا تروپیکالیس* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* بودند.^۹

در مطالعه Mohammadi و همکاران در شهر کاشان، عوامل ایجاد کننده واژینیت کاندیدیای را در ۷۱ بیمار بررسی نمودند.^{۱۰} مشابه مطالعه حاضر گونه‌های *کاندیدا آلبيکنس* و *گلابراتا* به‌عنوان شایعترین گونه‌های کاندیدیای جدا شده در شهر کاشان بودند. در این مطالعه محدوده سنی بیماران ۶۰-۱۱ سال بود.

همچنین در مطالعه دیگر که توسط Roudbari و همکاران در شهر تهران انجام شد، مشابه این تحقیق، گونه‌های جدا شده به ترتیب شیوع شامل *کاندیدا آلبيکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا تروپیکالیس* بودند.^{۱۱} در مطالعه مولکولی دیگر که توسط Mahmoudi Rad و همکاران در تهران انجام گردید، مشابه این مطالعه شایعترین گونه‌های جدا شده شامل *کاندیدا آلبيکنس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* بودند، اما بر خلاف بررسی حاضر گونه‌های *کاندیدا کروزه‌ای* و *کاندیدا گیلرموندی* نیز در این مطالعه جدا شدند.^{۱۲}

در مطالعه Nyirjesy و همکاران در هند فراوانی گونه‌های با وجودی که هنوز *کاندیدا آلبيکنس* گونه‌ی غالب در بیماران ولوواژینیت کاندیدیای است، افزایش گونه‌های غیرآلبیکنس و مقاومت احتمالی بیشتر این گونه‌ها به ترکیبات ضد قارچی واقعی است که مطالعات بیشتر پژوهشگران در این زمینه را می‌طلبد. از این رو پیشنهاد می‌شود جهت تعیین موشکافانه‌ی گونه‌های کاندیدیای جدا شده از ولوواژینیت و بررسی‌های اپیدمیولوژیک، از روش‌های مولکولی مانند PCR-RFLP استفاده شود.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل از پایان‌نامه تحت عنوان "شناسایی گونه‌های کاندیدیای جدا شده از زنان مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیای توسط روش PCR-RFLP در شهر اراک" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۵ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک انجام شده است.

References

- Buchta V, Jilek P, Förstl M. Clinical aspects and luteal phase assessment in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007;131(2):198-202.
- Sobel JD. Genital candidiasis. *Medicine* 2005;33(10):62-5.
- Moreira D, Paula CR. Vulvovaginal candidiasis. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;92(3):266-7.
- Corsello S, Spinillo A, Osnengo G, Penna C, Guaschino S, Beltrame A, et al. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110(1):66-72.
- Hasanvand S, Azadegan Qomi H, Kord M, Didehdar M. Molecular epidemiology and in vitro antifungal susceptibility of candida isolates from women with vulvovaginal candidiasis in northern cities of Khuzestan province, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2017;10(8):e12804.
- Didehdar M, Khansarinejad B, Amirrajab N, Shokohi T. Development of a high-resolution melting analysis assay for rapid and high-throughput identification of clinically important dermatophyte species. *Mycoses* 2016;59(7):442-9.
- Fallahi AA, Korbacheh P, Zaini F, Mirhendi H, Zeraati H, Noorbakhsh F, et al. Candida species in cutaneous candidiasis patients in the Guilan province in Iran; identified by PCR-RFLP method. *Acta Med Iran* 2013;51(11):799-804.
- Yamada Y, Makimura K, Merhendi H, Ueda K, Nishiyama Y, Yamaguchi H, et al. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. *Jpn J Infect Dis* 2002;55(4):122-5.
- Mirhendi H, Makimura K, Khoramzadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important Candida species. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2006;47(3):225-9.
- Mohammadi R, Nazeri M, Mesdaghinia E, Mirhendi H. Identification of candida species among patients with vulvovaginal candidiasis in Kashan by PCR-RFLP method. *J Isfahan Med Sch* 2012;29(165):2230-6.
- Hedayati MT, Taheri Z, Galinimoghadam T, Aghili SR, Yazdani Cherati J, Mosayebi E. Isolation of different species of Candida in patients with vulvovaginal candidiasis from Sari, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2015;8(4):e15992.
- Mahmoudi Rad M, Zafarhandi S, Abbasabadi B, Tavallaei M. The epidemiology of Candida species associated with vulvovaginal candidiasis in an Iranian patient population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;155(2):199-203.
- Roudbari M, Roudbarmohammadi Sh, Bakhshi M, Farhadi Z, Nikomanesh F. Identification of Candida species isolated from Iranian women with vaginal candidiasis by PCR-RFLP method. *Eur J Exp Biol* 2013;3(6):365-9.
- Fan SR, Bai FY, Liao QP, Liu ZH, Li J, Liu XP. Genotype distribution of Candida albicans strains associated with different conditions of vulvovaginal candidiasis, as revealed by microsatellite typing. *Sex Transm Infect* 2008;84(2):103-6.
- Nyirjesy P, Seeney SM, Grody MH, Jordan CA, Buckley HR. Chronic fungal vaginitis: the value of cultures. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173(3 Pt 1):820-3.

Molecular identification of candida species isolated from women with vulvovaginal candidiasis: *brief report*

Maryam Khanmohamadi
M.Sc.¹
Amir Seyed Ali Mehbod Ph.D.²
Mojtaba Noracepour Ph.D.
Candidate³
Mojtaba Didehdar Ph.D.^{4*}

1- Department of Microbiology,
Islamic Azad University, Arak
Branch, Arak, Iran.

2- Department of Medical
Parasitology and Mycology, AJA
University of Medical Sciences,
Tehran, Iran.

3- Department of Biology, Islamic
Azad University, North Tehran
Branch, Tehran, Iran.

4- Department of Medical
Parasitology and Mycology, Arak
University of Medical Sciences,
Arak, Iran.

*Corresponding author: Department of
Medical Parasitology and Mycology,
Faculty of Medicine, Payambar Azam
Complex, Basij Sq., Sardasht, Arak,
Iran.
Tel: +98- 86- 34173503
E-mail: didehdar_m@yahoo.com

Abstract

Received: 15 Apr. 2017 Revised: 19 Oct. 2017 Accepted: 21 Oct. 2017 Available online: 22 Oct. 2017

Background: Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a common infection, affecting up to 75% of women during their lifetimes. Approximately 5% of patients may experience recurrent VVC. *Candida albicans* is the most common causative agent of VVC. The objectives of this study were identification of candida species isolated of women with vulvovaginal candidiasis by molecular method in Arak city.

Methods: In this descriptive cross-sectional study, between Jun 2015 to March 2016 from 210 patients with vulvovaginal candidiasis referred to gynecology and obstetrics clinics in Arak city, Iran. Vaginal sampling was performed by wet sterile swabs. Samples were collected from vaginal discharge, vaginal posterior fornix, and sides of the vaginal wall. The swabs were investigated for direct exam and cultured on Sabouraud's dextrose agar medium contain chloramphenicol. Yeast isolates DNA were identified by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. Fungal genomic DNA was extracted from each isolate colony, glass bead method and after amplification of ITS1-ITS4 region with PCR assay, digested by MSP I restriction enzyme.

Results: From 210 patients with vulvovaginitis, 95 (45.2%) patients showed VVC. These patients were positive for Candida growth in culture and were infected with one Candida species. The age range of women with vulvovaginitis was between 14-60 years and the most VVC cases were in age group of 21-30 years. The most common Candida species isolated were *Candida albicans* (70.5%), *C. glabrata* (20%), *C. tropicalis* (7.4%) and *C. parapsilosis* (2.1%).

Conclusion: Regarding to the results of this study, *C. albicans* was the most common Candida species, isolated from patients with vulvovaginal candidiasis and approximately 30% of this infection causing by non-albicans species of Candida.

Keywords: candida, cross-sectional studies, polymerase chain reaction, vulvovaginal candidiasis.