شناسایی گونه‌های کاندیدا با روش‌های قارچ‌شناسی و مولکولی در زنان باردار مبتلا به کاندیدیازیس واژینال

ناهید عارفی لیسار[۱]، پریوش کردبچه[۱*]
ساسان رضایی[۱]، مهین صف آرا[۱]
روشنک داعی قزوینی[۱]
حیدر بخشی[۱]، زهرا امیدوار جلالی[۲]

۱- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲- گروه زنان و زایمان، بیمارستان شهید نورانی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، تالش، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی.
تلفن: ۴۲۹۳۳۱۴۱ -۰۲۱
E-mail: pkordbacheh@tums.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۰۶ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۳ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۵ آنلاین: ۱۳۹۶/۱۱/۲۵

زمینه و هدف: ولوواژینیت کاندیدایی دوران بارداری می‌تواند با عوارضی همچون سقط جنین، پارگی زودرس کیسه آب، تولد نوزاد کم وزن، کوریوآمنیونیتیس و کاندیدیازیس سیستمیک مادرزادی مرتبط باشد. هدف از انجام این مطالعه شناسایی گونه‌های کاندیدا با روش‌های قارچ‌شناسی و مولکولی در زنان باردار مبتلا به کاندیدیازیس واژینال بود.

روش بررسی: این مطالعه مقطعی بر روی ۸۰ زن باردار مراجعه‌کننده به بیمارستان شهید نورانی طالش از فروردین تا آذر ۱۳۹۵ (هشت ماه) انجام پذیرفت. کشت روی کروم آگار کاندیدا به منظور جداسازی و افتراق گونه‌های مهم بالینی به عمل آمد. کشت‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در $35^{\circ}C$ انکوبه و کلنی‌های رشد یافته بر اساس رنگ و تعداد، شناسایی گردیدند. تایید نهایی گونه‌ها توسط روش Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) انجام پذیرفت.

یافته‌ها: ۲۰ مورد (۲۵٪) از بیماران مبتلا به واژینیت کاندیدایی بودند. از ۲۲ ایزوله شناسایی شده توسط کشت، گونه‌های آلبیکنس به‌عنوان شایعترین گونه (۷۲/۸٪)۱۶، *گلابراتا* (۲۲/۷٪)۵ و *کروزه‌ای* (۴/۵٪)۱ شناسایی گردیدند. دو بیمار دارای عفونت توام (گونه‌های آلبیکنس و *گلابراتا*) بودند درحالی‌که با روش PCR-RFLP، گونه‌های شناسایی شده به‌ترتیب شامل: آلبیکنس (۵۹/۱٪)۱۳، *گلابراتا* (۲۲/۷٪)۵، *تروپیکالیس* (۱۳/۶٪)۳ و *کروزه‌ای* (۴/۵٪)۱ مورد گزارش گردیدند. در این پژوهش از نظر آماری ارتباط معنادار بین کاندیدیازیس واژینال با علایم بالینی (P<۰/۰۰۰۱)، دیابت (P<۰/۰۱۴) و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها (P<۰/۰۰۳) وجود داشت.

نتیجه‌گیری: روش PCR-RFLP به‌عنوان یک روش تکمیلی توانست گونه‌های کاندیدا را به‌درستی تعیین هویت نماید.

کلمات کلیدی: *کاندیدا آلبیکنس*، پژوهش‌های مورد-شاهدی، حاملگی، روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، کاندیدیازیس واژینال.

مقدمه

ولوواژینیت کاندیدایی یک عفونت واژینال شایع است. ۷۵٪ از زنان حداقل یک‌بار در طی سال‌های زندگیشان دچار این عفونت می‌شوند و ۵۰٪ از این بیماران حداقل یک‌بار از عود بیماری رنج می‌برند.[۱-۳] ریسک فاکتورهای مختلفی مانند حاملگی، استفاده طولانی‌مدت از آنتی‌بیوتیک‌ها و دیابت از زمینه‌های مستعد کننده جهت ابتلا به ولوواژینیت کاندیدایی می‌باشند.[۴-۶] مطالعات متعدد نشان داده‌اند که زنان حامله بیشتر از زنان غیرحامله این عفونت را تجربه می‌کنند و در بعضی مطالعات شیوع بالای عفونت کاندیدایی بدون علامت نیز در طول حاملگی مشاهده شده است. افزایش واژینیت‌های کاندیدیایی در حاملگی کمابیش به فاکتورهای مرتبط با حاملگی مانند تغییرات ایمونولوژیک، افزایش میزان استروژن و افزایش تولید گلیکوژن واژن مربوط می‌شود. به‌تازگی دلایلی وجود

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08]

دارد که نشان می‌دهد کاندیدیازیس در دوران بارداری ممکن است با خطر افزایش عوارض بارداری شامل پارگی زودرس کیسه آب، کوریوآمنیونیتیس، زایمان زودرس و کاندیدیازیس جلدی مادرزادی نوزاد در ارتباط باشد.[۱۰-۷] بر اساس مطالعات به‌عمل آمده بعضی از گونه‌های غیرآلبیکنس نسبت به داروهای ضد قارچی مقاومت نشان می‌دهند. این امر لزوم تعیین گونه عامل بیماری را در درمان درست بیماری نشان می‌دهد.[۱۱و۱۲]

تکنیک مولکولی Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) به‌عنوان یک روش قابل اعتماد جهت شناسایی و تایید نهایی گونه‌های کاندیدا ارزشمند می‌باشد.[۷] این مطالعه با هدف تعیین و شناسایی گونه‌های کاندیدایی عامل بیماری ولوواژینیت کاندیدایی در زنان باردار صورت گرفت.

روش بررسی

در یک پژوهش مقطعی در طی هشت ماه (از فروردین تا آذر ۱۳۹۵)، ۸۰ نفر از زنان باردار مراجعه‌کننده به درمانگاه زنان بیمارستان شهید نورانی شهر تالش که در ترم‌های مختلف بارداری بودند مورد بررسی قرار گرفتند. پس از کسب رضایت بیمار و تکمیل پرسشنامه، نمونه‌برداری از ترشحات واژینال آن‌ها با یا بدون علایم بالینی با استفاده از سه سوآب استریل آغشته به سرم فیزیولوژی استریل (توسط پزشک متخصص زنان) انجام گردید. یک سوآب برای تهیه لام و انجام آزمایش مستقیم و رنگ‌آمیزی به روش گرم به کار رفت. دو سواب دیگر در لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل قرار داده شده و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردید.

کشت اولیه بر روی محیط کروم آگار کاندیدا (CHROMagar Candida, Paris, France) انجام شد. محیط‌های کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ °C انکوبه شدند. کلنی‌های رشد کرده بر روی این محیط بر اساس رنگ و تعداد آن‌ها شناسایی گردیدند. سپس از کلنی‌های اولیه بر روی محیط سابورو دکستروز آگار (Sabouraud-4% Dextrose-Agar, Merck, Germany) ساب کالچر تهیه شد. در این مطالعه برای تایید تشخیص و شناسایی گونه *کاندیدا آلبیکنس* از گونه‌های کاندیدای غیرآلبیکنس کشت بر روی محیط کورن میل آگار+ توین ۸۰ (Micromedia, Nebotrade Ltd., Hungary, Budapest) نیز صورت گرفت. محیط‌ها در دمای اتاق به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شده و از نظر تولید کلامیدوکونیدی، بلاستوکونیدی و میسلیوم کاذب بررسی شدند. جهت نگهداری ایزوله‌ها برای انجام مطالعات آتی از کشت تازه بر روی محیط سابورو دکستروز آگار استفاده شده و قارچ به وسیله لوپ به شیشه‌های استریل حاوی آب مقطر منتقل گردید.[۷]

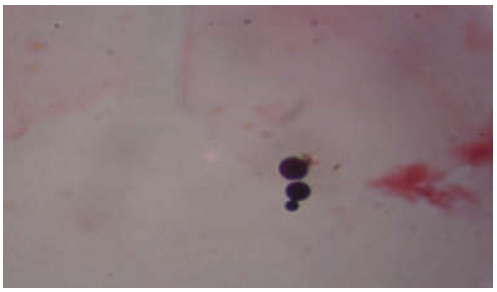
در این مطالعه از تکنیک مولکولی Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) استفاده شد. برای استخراج DNA، کشت تازه از سوش‌های ذخیره تهیه شد. جهت استخراج DNA از روش فنل کلروفرم استفاده گردید و برای انجام PCR از پرایمرهای یونیورسال ITS1 با توالی '۵– TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' به‌عنوان پرایمر رفت و پرایمر ITS4 با توالی '5 ‘TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3’ به‌عنوان پرایمر برگشت استفاده شد (Sinaclone, Iran). محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورزگردید و وزن باندها با استفاده از مارکر مولکولی محاسبه گردید.

از باندها با دستگاه Transilluminator با طول موج ۳۰۰ نانومتر UV عکسبرداری به عمل آمد (Cybertech, Berlin, Germany). آنگاه محصول PCR با استفاده از آنزیم MSP1 (Msp1, Fermentas, Germany) که قدرت شناسایی و برش توالی CCGG را دارد و الگوی برشی متفاوت در گونه‌های کاندیدا را ایجاد می‌کند شکسته شد و محصول PCR-RFLP با ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز گردید. با مقایسه وزن باندهای ایجاد شده با مارکر مولکولی گونه‌های کاندیدا شناسایی شده، عکسبرداری از باندها صورت گرفت.[۲۷] آنالیز نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، با استفاده از SPSS software, version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) و Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) با سطح معنادار P<۰/۰۵ و آزمون‌های آماری Fisher exact test و Chi-square test انجام گرفت.

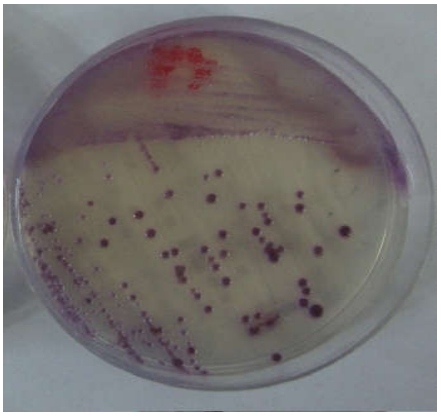
یافته‌ها

در این بررسی کشت ترشحات واژینال (۲۵٪)۲۰ نفر از زنان باردار مثبت بود ولی تنها در (۴۰٪)۸ نفر از افـرادی کـه کشـت مثبت

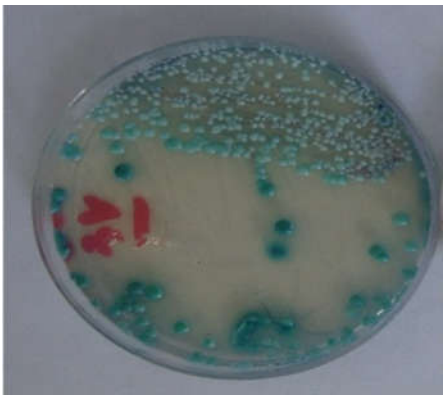
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08]



شکل ۱: سلول‌های مخمری جوانه‌دار در بررسی میکروسکوپی لام‌های رنگ‌آمیزی شده از ترشحات واژینال به روش گرم (درشت‌نمایی ۱۰۰۰).



شکل ۳: کلنی بنفش رنگ *کاندیدا گلابراتا* بر روی محیط کروم آگار کاندیدا



شکل ۲: کلنی سبز رنگ *کاندیدا آلبیکنس* بر روی محیط کروم آگار کاندیدا

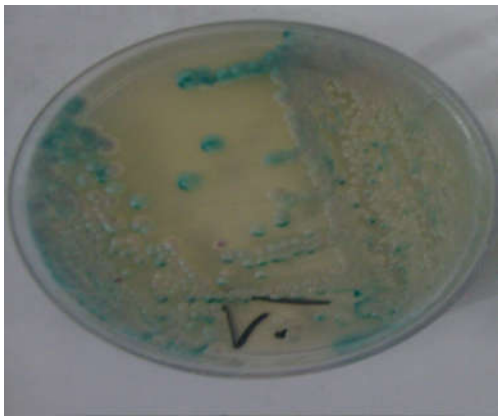
شکل ٤: کلنی *کاندیدا کروزه‌ای* بر روی محیط کروم آگار کاندیدا

داشتند آزمایش مستقیم مثبت بود و سلول‌های مخمری جوانه‌دار در لام تهیه شده از نمونه ترشحات واژینال آن‌ها مشاهده گردید (شکل ۱). بیشترین (۷۸/۹٪) علایم بالینی در زنان با کشت مثبت، خارش و ترشحات واژینال بود و از نظر آماری ارتباط معناداری بین وجود علایم بالینی با کاندیدیازیس واژینال مشاهده شد (P<۰/۰۰۰۱). در این مطالعه بیماران از نظر ابتلا به دیابت نیز مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص گردید بین دیابت در زنان باردار با ابتلا به کاندیدیازیس واژینال ارتباط معناداری وجود دارد (P<۰/۰۱٤). از نظر مصرف طولانی‌مدت آنتی‌بیوتیک نیز بررسی به‌عمل آمد و بین مصرف یا عدم مصرف آنتی‌بیوتیک با کاندیدیازیس واژینال در زنان باردار از نظر آماری اختلاف معنادار مشاهده گردید (P<۰/۰۰۳).

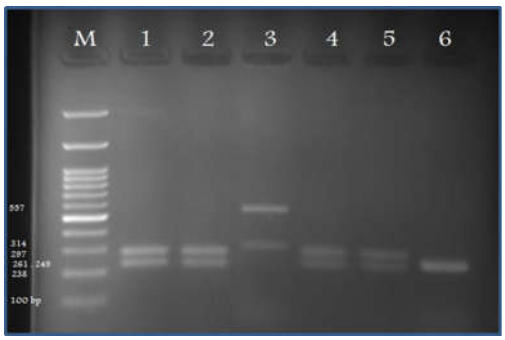
نتیجه کشت نمونه‌های واژینال بر روی محیط کروم آگار کاندیدا در ۲۰ مورد مثبت بود و ۲۲ ایزوله شناسایی شدند. در این مطالعه در ۱٦ مورد (۷۲/۸٪) کلنی سبز رنگ به‌عنوان *کاندیدا آلبیکنس* (شکل ۲)، پنج مورد (۲۲/۷٪) کلنی بنفش رنگ به‌عنوان *کاندیدا گلابراتا* (شکل ۳) و یک مورد (٤/۵٪) کلنی صورتی رنگ به‌عنوان *کاندیدا کروزه‌ای* (شکل ٤) شناسایی شد.

از نمونه ترشحات واژینال دو بیمار، دو گونه متفاوت به رنگ‌های

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08]



شکل ۵: کلنی میکس *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا گلابراتا* بر روی محیط کروم آگار



شکل ٦: نمونه‌ای از نتایج الکتروفورز PCR-RFLP پس از هضم آنزیمی توسط آنزیم MSP1.

M: DNA Ladder; 1, 2, 4, and 5: *Candida albicans*; 3: *Candida glabrata*; *Candida krusei6*

جدول ۱: درصد فراوانی گونه‌های کاندیدایی جدا شده با روش PCR-RFLP

گونه کاندیدا	تعداد	درصد فراوانی
کاندیدا آلبیکنس	۱۳	٪۵۹/۱
کاندیدا گلابراتا	۵	٪۲۲/۷
کاندیدا تروپیکالیس	۳	٪۱۳/٦
کاندیدا کروزه‌ای	۱	٪٤/۵
مجموع	۲۲	٪۱۰۰

سبز و بنفش در محیط کشت رشد کرد (شکل ۵). تشخیص قطعی گونه‌های جدا شده به روش PCR-RFLP صورت گرفت که با این روش گونه‌های کاندیدای شناسایی شده به‌ترتیب شامل ۱۳ مورد *کاندیدا آلبیکنس* (٪۵۹/۱)، پنج مورد *کاندیدا گلابراتا* (٪۲۲/۷)، سه مورد *کاندیدا تروپیکالیس* (٪۱۳/٦) و یک مورد *کاندیدا کروزه‌ای* (٪٤/۵) گزارش گردیدند (شکل ٦). این نتایج در ۳ مورد با نتایج قارچ‌شناسی متفاوت بود و بیش از ۸۰٪ با آن مطابقت داشت.

بحث

Aghamirian و همکاران فراوانی کاندیدیازیس واژینال در زنان باردار را ٤٦٪ گزارش کرد.[۱۲] Maleeha و همکاران نیز با بررسی ترشحات واژینال ۵۰ زن حامله، شیوع کاندیدیازیس واژینال را ٤٨٪ گزارش نمود.[۱۳] Leli با بررسی ۳٤٤ نفر از زنان باردار، فراوانی کلونیزاسیون کاندیدا را در زنان باردار بیشتر از غیرباردار و همچنین در مطالعات مشابه دیگر، فراوانی ولوواژینیت کاندیدایی با علایم بالینی را ۲۵٪ و بدون علایم ۲۲/۹٪ نشان داده شد.[۱۱و۱۳] Dabashetty نیز با بررسی ۱۰۰ سوآب واژینال زنان باردار، شیوع کاندیدیازیس واژینال را ۲۲٪ گزارش کردند.[۱٤] Masri و همکاران با بررسی نمونه سوآب واژینال ۲۰۰ زن باردار شیوع کاندیدیازیس واژینال را ۱۷/۲٪ گزارش نمودند. در این بررسی، تریمستر اول و دوم بارداری و دیابت از عوامل مرتبط با این بیماری نشان داده شد.[۱۵] فراوانی کاندیدیازیس واژینال در زنان باردار در مطالعه حاضر با بسیاری از مطالعات یاد شده فوق مشابهت دارد. در این بررسی کاندیدیازیس واژینال به‌طور کلی در ۱۰۰٪ افراد دیابتی و ۷۵٪ افرادی که مصرف آنتی‌بیوتیک به صورت طولانی‌مدت داشتند مشاهده شد.

با توجه به Fisher exact test ارتباط معناداری میان ابتلا به کاندیدیازیس واژینال با دیابت و مصرف آنتی‌بیوتیک به‌صورت طولانی‌مدت وجود داشت. در مطالعه Esmaeilzadeh و همکاران هم که بر روی نمونه ۲۰۰۰ زن با علایم کاندیدیازیس واژینال انجام شد، ٤۳/۳٪ نمونه‌های بیماران با کشت مثبت از نظر میکروسکوپی هم مثبت بود.[۱٦] برخی از پژوهشگران این اختلاف حساسیت در نتایج مشاهده لام مستقیم را به دلیل اختلاف تراکم مخمرها در ترشحات واژن بیان نموده‌اند.[۱۷و۱۸] در مطالعه اخیر با توجه به Chi-square test

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08]

ارتباط معناداری بین کاندیدیازیس واژینال و علایم بالینی وجود داشت. بیشترین علایم بالینی و شکایت بیماران در این بررسی، خارش و ترشحات واژینال بود. در مطالعه Hafeez و همکاران نیز بیشترین علایم بالینی بیماران ترشحات واژینال و خارش بود.[۱۳]

در این مطالعه (۴۰٪)۸ نفر از افرادی که کشت مثبت داشتند از نظر میکروسکوپی و آزمایش مستقیم نیز مثبت بوده و عناصر قارچی در لام تهیه شده از نمونه ترشحات واژینال آن‌ها مشاهده گردید. این یافته مشابه بعضی از مطالعات انجام شده در این زمینه بود. در مطالعه Esmaeelzadeh و همکاران که بر روی نمونه ۲۰۰۰ زن با علایم کاندیدیازیس واژینال انجام شد، ۴۳/۳٪ نمونه‌های بیماران با کشت مثبت از نظر میکروسکوپی هم مثبت بود.[۱۷] برخی از پژوهشگران این اختلاف حساسیت در نتایج مشاهده لام مستقیم را به دلیل اختلاف تراکم مخمرها در ترشحات واژن بیان نموده‌اند.[۱۸و۱۹]

هر چند نقش عواملی همچون مشاهده آسان‌تر شکل سودوهایف نسبت به فرم مخمری که در *کاندیدا گلابراتا* تنها شکل قابل مشاهده است را نمی‌توان نادیده گرفت، همچنین نحوه نمونه‌برداری، نوع رنگ‌آمیزی به‌کار رفته را نیز باید در نظر داشت. تشخیص مبتنی بر بررسی لام مستقیم تنها در مواردی که بیماری شدید باشد قابل قبول بوده و برای تشخیص واژینیت کاندیدایی کشت از ترشحات واژن حساس‌ترین و دقیق‌ترین روش می‌باشد.[۲۰] در میان روش‌های تشخیص گونه‌های شایع و مهم کاندیدا، کشت روی محیط کروم آگار کاندیدا بسیار ساده و در عین حال معتبر به نظر می‌رسد. از زمان معرفی این محیط، مطالعات متعددی برای ارزیابی کارآمدی آن در بررسی‌های اپیدمیولوژیک انجام شده است.[۲۱و۲۲]

در مطالعه Mirhendi و همکاران بیش از ۸۵٪ ایزوله‌های کاندیدایی فقط با روش کروم آگار کاندیدا شناسایی شدند.[۲۳] در مطالعه Mahmoudi rad و همکاران روش کروم آگار کاندیدا جهت شناسایی گونه‌های کاندیدایی، یک روش ساده و قابل انجام در هر آزمایشگاه معرفی شد.[۲۴] Baykushev و همکارانش نشان دادند که این محیط قادر است سه گونه *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا کروزه‌ای* را با درصد بالایی شناسایی نماید.[۲۵] در مطالعه حاضر از نمونه دو بیمار دو گونه کاندیدایی مختلف جدا گردید. این امر به اهمیت و توانایی محیط کروم آگار کاندیدا در شناسایی عفونت با بیش از یک گونه اشاره دارد. بیشترین فراوانی مربوط به گونه *کاندیدا آلبیکنس* و سپس *کاندیدا گلابراتا* بود. اما همه ایزوله‌ها را نمی‌توان با این روش شناخت از این‌رو روش‌های دیگر برای افتراق آن‌ها ضروری است.[۲۳] در مطالعه Panahi و همکاران PCR-RFLP به‌عنوان یک روش جهت شناسایی قطعی گونه‌های کاندیدا پیشنهاد گردید. در این مطالعه نتایج حاصل از روش مولکولی در چند مورد با نتایج به‌دست آمده از کشت برروی محیط کروم آگار کاندیدا متفاوت بود.[۷] در مطالعه Mirhendi، Mohammadi و روش PCR-RFLP به‌عنوان یک روش قابل اعتماد، مطمئن و سریع معرفی شده است.[۲۳و۲۶و۲۷] در مطالعه اخیر نیز برای شناسایی ایزوله‌های کاندیدایی از روش مولکولی PCR-RFLP استفاده شد و به کمک این روش ۱۳ ایزوله به‌عنوان *کاندیدا آلبیکنس*، ۵ ایزوله *کاندیدا گلابراتا*، سه ایزوله *کاندیدا تروپیکالیس* و یک ایزوله *کاندیدا کروزه‌ای* شناسایی گردید (جدول ۱) که در سه مورد با نتایج قارچ‌شناسی متفاوت بود. نتایج حاصل بیش از ۸۰٪ با نتایج قارچ‌شناسی همخوانی داشت. *کاندیدا آلبیکنس* و پس از آن *کاندیدا گلابراتا* به‌عنوان گونه‌های غالب مطرح بودند. *کاندیدا آلبیکنس* ۵۹/۱٪ و گونه‌های غیرآلبیکنس ۴۰/۹٪ ایزوله‌ها را تشکیل دادند.

از آن‌جایی که برای انجام آزمایشات مولکولی بایستی تجهیزات یک آزمایشگاه تشخیص مولکولی مهیا باشد و کار با کیت، روش به‌نسبت تخصصی بوده و احتیاج به مهارت نسبی در انجام روش‌های مولکولی دارد، از این‌رو نمی‌توان به‌طور روتین در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی از این روش استفاده کرد. باتوجه به نتایج به‌دست آمده در این بررسی و مطالعات پیشین انجام شده به‌نظر می‌رسد آزمایشات قارچ‌شناسی همچنان قابل اطمینان بوده و توانایی شناسایی اغلب گونه‌های کاندیدایی را دارد.

باتوجه به مطالعه حاضر و مطالعات مشابه مشخص می‌شود که میزان کاندیدیازیس واژینال در زنان باردار قابل توجه است. از آن‌جایی که علایم بالینی به تنهایی برای تشخیص این عفونت کافی نیست، بنابراین لازم است در دوران بارداری آزمایشات قارچ‌شناسی از جمله آزمایش میکروسکوپی و کشت از ترشحات واژینال انجام شود تا نتایج قابل اعتمادی جهت تشخیص بیماری حاصل شود و از این طریق بتوان با درمان صحیح و به موقع از خطرات و عوارض احتمالی عفونت کاندیدایی در دوران حاملگی برای مادر و نوزاد پیشگیری به‌عمل آورد. با در نظر گرفتن نتایج حاصل از این بررسی،

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08]

می‌توان چنین نتیجه گرفت که با این که کشت بر روی محیط کروم آگار کاندیدا برای شناسایی برخی ایزوله‌های شایع بالینی معتبر و مفید می‌باشد، ولی به‌تنهایی قادر به تعیین هویت تمامی گونه‌های کاندیدا نیست و بهتر است در صورت امکان از سایر روش‌ها مانند روش‌های مولکولی نیز کمک گرفت. از این‌رو به لحاظ این که در این مطالعه استفاده از روش‌های معمول قارچ‌شناسی شامل بررسی میکروسکوپی مستقیم و کشت تنها توانست منجر به شناسایی سه گونه آلبیکنس، *گلابراتا* و *کروزه‌ای* گردد، درحالی‌که روش PCR-RFLP قادر به تفکیک دقیق‌تر گونه‌ها بوده و افزون‌بر تایید سه گونه فوق، گونه تروپیکالیس را نیز تعیین هویت نمود، بنابراین از روش مولکولی (PCR) می‌توان به‌عنوان یک روش تکمیلی مفید و مناسب در شناسایی گونه‌های کاندیدا در موارد ابتلا به کاندیدیازیس استفاده نمود.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان "بررسی فراوانی کاندیدیازیس واژینال در زنان باردار مراجعه‌کننده به بیمارستان شهید نورانی شهرستان تالش و شناسایی گونه‌های کاندیدایی جداشده با روش‌های قارچ‌شناسی و مولکولی" مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد ۲٤۰/۸۵۱۵ در تاریخ ۹٤/۹/۸ می‌باشد.

References

1. Nyirjesy P. Vulvovaginal Candidiasis and bacterial vaginosis. *Infect Dis Clin North Am* 2008;22(4):637-52.
2. Cassone A. Vulvovaginal Candida albicans infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG* 2015;122(6):785-94.
3. Sobel JD. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol* 2016;214(1):15-21.
4. Sobel JD. Vulvovaginal candidiasis. *Lancet* 2007;369(9577):1961-71.
5. Aguin TJ, Sobel JD. Vulvovaginal candidiasis in pregnancy. *Curr Infect Dis Rep* 2015;17(6):462.
6. Mendling W, Brasch J; German Society for Gynecology and Obstetrics. Guideline vulvovaginal candidosis (2010) of the German Society for Gynecology and Obstetrics, the Working Group for Infections and Infectimmunology in Gynecology and Obstetrics, the German Society of Dermatology, the Board of German Dermatologists and the German Speaking Mycological Society. *Mycoses* 2012;55 Suppl 3:1-13.
7. Panahi F, Kordbacheh P, Rezaie S, Zeini F, Zeraati H, Safara M. Determination of candida species in acute and recurrent candida vulvovaginitis. *J Microbiol Knowl* 2009;1(3):7-12. [Persian]
8. Hackley B, Kriebs JM, Rousseau ME, editors. Primary Care of Women: A Guide for Midwives and Women's Health Providers. Sudbury, MA: Jones and Bartlett; 2007. P. 249-312.
9. .Akerele J, Abhulimen P, Okonofua F. Prevalence of asymptomatic genital infection among pregnant women in Benin City, Nigeria. *Afr J Reprod Health* 2002;6(3):93-7.
10. de Oliveira JM, Cruz AS, Fonseca AF, Vaz CP, Rodrigues A, Aurea F, et al. Prevalence of Candida albicans in vaginal fluid of asymptomatic Portuguese women. *J Reprod Med* 1993;38(1):41-2.
11. Leli C, Mencacci A, Meucci M, Bietolini C, Vitali M, Farinelli S, et al. Association of pregnancy and Candida vaginal colonization in women with or without symptoms of vulvovaginitis. *Minerva Ginecol* 2013;65(3):303-9.
12. Aghamirian M, Keshavarz D, Jahani HH, Sadeghi GM. Agents associated with Candida Vulvovagini tis in women referred to health centersin Qazvin. *J Qazvin Univ Med Sci* 2007;11(3):35-9.
13. Hafeez M, Ijaz R, Tahir S. Vulvovaginal Candidiasis in pregnancy. *Biomedica* 2008;24:54-6.
14. Dabashetty SS. Vulvovaginal Candidiasis in pregnancy a comparative study. *Int J Basic Appl Med Sci* 2015;5(2):62-6.
15. Masri SN, Noor SM, Nor LAM, Osman M, Rahman M. Candida isolates from pregnant women and their antifungal susceptibility in a Malaysian tertiary-care hospital. *Pak J Med Sci* 2015;31(3):658-61.
16. Esmaeilzadeh S, Mahdavi Omran S, Rahmani Z. Frequency and etiology of vulvovaginal candidiasis in women referred to a gynecological center in Babol, Iran. *Int J Fertil Steril* 2009;3(2):74-7.
17. Esmaeilzadeh S, Mahdavi Omran S, Rahmani Z. Frequency and etiology of vulvovaginal candidiasis in women referred to a gynecological center in Babol, Iran. *Int J Fertil Steril* 2009;3(2):74-7.
18. Jindal N, Gill P, Aggarwal A. An epidemiological study of vulvovaginal candidiasis in women of childbearing age. *Indian J Med Microbiol* 2007;25(2):175-6.
19. Lopes Consolaro ME, Aline Albertoni T, Shizue Yoshida C, Mazucheli J, Peralta RM, Estivalet Svidzinski TI. Correlation of Candida species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. *Rev Iberoam Micol* 2004;21(4):202-5.
20. Okungbowa FI, Isikhuemhen OS, Dede AP. The distribution frequency of Candida species in the genitourinary tract among symptomatic individuals in Nigerian cities. *Rev Iberoam Micol* 2003;20(2):60-3.
21. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for Candida albicans, Candida tropicalis, Candida krusei, and Candida (Torulopsis) glabrata. *J Clin Microbiol* 1996;34(1):58-61.
22. Eraso E, Moragues MD, Villar-Vidal M, Sahand IH, González-Gómez N, Pontón J, et al. Evaluation of the new chromogenic medium candida ID 2 for isolation and identification of Candida albicans and other medically important Candida species. *J Clin Microbiol* 2006;44(9):3340-5.
23. Mirhendi SH, Makimura K, Shidfar MR, Hossienpour L. Identification and frequency of Candida patient isolates by CHROMagar Candida method. *Sci J Hamadan Univ Med Sci* 2007;13(4):11-5.
24. Mahmoudi Rad M, Zafarghandi AS, Abbasabadi B, Amiri Z, Shivayi M, Amel Zabihi M, et al. Identification and comparison of etiologic agents in vulvovaginal candidiasis and recurrent vulvovaginal candidiasis by a differential medium. *Res Med* 2010;33(3):189-94.
25. Baykushev R, Ouzounova-Raykova V, Stoykova V, Mitov I. Reliable microbiological diagnosis of vulvovaginal candidiasis. *Akush Ginekol (Sofiia)* 2014;53(4):17-20.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08]

26. Mohamadi J, Havasian MR, Panahi J, Pakzad I. Antifungal drug resistance pattern of Candida. spp isolated from vaginitis in Ilam-Iran during 2013-2014. *Bioinformation* 2015;11(4):203-6.

27. Mohammadi R, Mirhendi H, Rezaei-Matehkolaei A, Ghahri M, Shidfar MR, Jalalizand N, et al. Molecular identification and distribution profile of Candida species isolated from Iranian patients. *Med Mycol* 2013;51(6):657-63.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08]

TUMJ Tehran University Medical Journal, March 2018; Vol. 75, No. 12: 894-901 Original Article

Identification of Candida species by molecular and mycological methods in pregnant women with vulvovaginal candidiasis

Nahid Arefi Lisar M.Sc.[1]
Parivash Kordbacheh M.D.[1*]
Sasan Rezaie Ph.D.[1]
Mahin Safara Ph.D.[1]
Roshanak Daie Ghazvini Ph.D.[1]
Heidar Bakhshi Ph.D.[1]
Zahra Omidvar Jalali M.D.[2]

1- Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Obstetrics and Gynecology, Shahid Noorani Hospital, Gilan University of Medical Sciences, Talesh, Iran.

[*]Corresponding author: Department of Medical Parasitology & Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Poursina St., Ghods St., Keshavarz Blvd., Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 42933141
E-mail: pkordbacheh@tums.ac.ir

Abstract

Received: 27 Jun. 2017 Revised: 04 Jul. 2017 Accepted: 04 Feb. 2018 Available online: 14 Feb. 2018

Background: Vaginal candidiasis is common in during pregnancy. It may lead to complications like abortions, premature birth, low birth weight, chorioamnionitis and fungal systemic neonatal infection. The aim of present study was identification of Candida species by mycological and molecular methods in pregnant women with vaginal candidiasis.

Methods: This cross-sectional study was performed on 80 pregnant women with or without clinical symptoms of vulvovaginal candidiasis referred to Shahid Noorani Talesh Hospital, Gilan University of Medical Sciences, Iran, from April to December 2015 (8 months). All specimens were examined by direct microscopy and culture on CHROMagar Candida medium for isolation and differentiation of major clinical-significant Candida species (spp.). Cultured media were incubated at 35 ˚C for 48 hours and evaluated based on color and number of grown colonies. If no growth was observed, the media were incubated for several additional days. Subcultures were done on Sabouraud dextrose agar (Merck, Germany) and Corn meal agar with Tween 80 media (Micromedia, Hungary) for further study. Identification of Candida spp. carried out by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method.

Results: In this study, vulvovaginal candidiasis was observed in 20 (25%) patients. Twenty-two isolates were obtained from culture of specimens on CHROMagar Candida medium (Paris, France). The most common isolated species was *Candida albicans* 16 (72.8%) and followed by *Candida glabrata* 5 (22.7%), *Candida tropicalis* 3 (13.6%) and *Candida krusei* 1 (4.5%) cases. Two patients had mixed infection with 2 different Candida species (*C. albicans and C. glabrata*) While using PCR-RFLP method, the Candida species were identified as 13 (59.1%) *Candida albicans*, 5 (22.7%) *Candida glabra*, 3 (13.6%) *Candida tropicalis* and 1 (4.5%) *Candida krusei* cases, respectively. In direct examination were seen yeast budding cells and pseudohyphae in 8 culture positive specimens. In the present study, results of conventional mycological method in differentiation of Candida spp. were consistent with molecular results in 80% of cases. There was also significant correlation between vulvovaginal candidiasis with clinical symptoms (P<0.0001), including diabetes mellitus (P<0.014), and taking antibacterial drugs (P<0.003) in pregnant women.

Conclusion: PCR-RFLP was able to identify correctly the Candida spp. as a complementary method.

Keywords: *Candida albicans*, cross-sectional studies, pregnancy, polymerase chain reaction method, vulvovaginal candidiasis.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08]