Arshive of SID

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ٤٤٥/هفته‌ی اول آبان ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۱۰

بررسی میزان تطابق فراوانی گونه‌های Candida با دو روش مورفولوژی و مولکولی در ایزوله‌های جدا شده از بیماران مبتلا به واژینیت

بهزاد زاهد[۱]، جواهر چعباوی‌زاده[۲]، صدیقه صابری[۳]، پروین دهقان[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: واژینیت کاندیدایی، یکی از شایع‌ترین عفونت‌های قارچی فرصت‌طلب است که ۷۵ درصد بانوان حداقل یک بار در طول زندگی آن را تجربه کرده‌اند. جهت تشخیص این بیماری، از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود. هدف از انجام این مطالعه، مقایسه‌ی نتایج دو روش مورفولوژی و مولکولی در تشخیص این بیماری بود.

روش‌ها: نمونه‌گیری با استفاده از دو سواپ استریل از ترشحات واژن ۱۲۵ بیمار مشکوک به واژینیت کاندیدایی انجام شد. آزمایش مستقیم با تهیه‌ی یک لام رنگ‌آمیزی شده با گیمسا و هیدروکسید پتاسیم ۱۰ درصد و برای کشت از محیط‌های Saburo dextrose agar حاوی کلرامفنیکل (SC)، Corn meal agar و محیط Chromagar candida استفاده گردید. انواع Candida جدا شده درمرحله‌ی اول با مشاهدات میکروسکوپی لام‌ها و ایجاد رنگ اختصاصی بر روی محیط Chromagar candida و تولید Chlamydoconidia در محیط Corn meal agar شناسایی شدند. همچنین، از روش مولکولی Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) با استفاده از آنزیم MspI استفاده شد.

یافته‌ها: از بین ۱۲۵نمونه‌ی مورد بررسی، ۵۳ نفر (۴۲ درصد) از نظر واژینیت کاندیدایی در هر دو روش مثبت تشخیص داده شدند. گونه‌های جدا شده به ترتیب فراوانی شامل Candida albicans ۴۶ ایزوله (۸۷ درصد)، Candida glabrata ۵ ایزوله (۹ درصد) و Candida krusei ۲ ایزوله (۴ درصد) بود.

نتیجه‌گیری: مانند بیشتر مطالعات انجام شده، Candida albicans به عنوان گونه‌ی غالب، بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد. این مطالعه، شیوع بالای ولوواژینیت کاندیدایی در زنان مبتلا را نشان می‌دهد. با توجه به یکسان بودن نتایج در هر دو روش، همچنین نظر به نبود امکانات کافی و پیشرفته‌ی مولکولی در مناطق محروم، استفاده از آزمون‌های فنوتایپی پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: واژینیت کاندیدایی، مورفولوژی، Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

ارجاع: زاهد بهزاد، چعباوی‌زاده جواهر، صابری صدیقه، دهقان پروین. **بررسی میزان تطابق فراوانی گونه‌های Candida با دو روش مورفولوژی و مولکولی در ایزوله‌های جدا شده از بیماران مبتلا به واژینیت.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۴۵): ۱۱۳۲-۱۱۲۶

مقدمه

عفونت دستگاه تناسلی، از شایع‌ترین علل مراجعه‌ی زنان به مراکز درمانی است که علت آن به طور عمده باکتری‌ها، ویروس‌ها، انگل‌ها و یا قارچ‌ها می‌باشد. واژینیت‌ها، ۲۸ درصد مراجعات زنان به درمانگاه‌های بیماری‌های مقاربتی را شامل می‌شوند (۵-۱) و حدود یک سوم موارد ابتلا را واژینیت‌های کاندیدایی تشکیل می‌دهند (۶). حدود ۷۵ درصد زنان در طول زندگی خود حداقل یک بار دچار واژینیت کاندیدایی می‌شوند.

تعدادی از گونه‌های کاندیدا، در ۵۰-۲۰ درصد موارد جزء فلور طبیعی دستگاه تناسلی تحتانی خانم‌های بدون علامت و سالم می‌باشند (۷). برجسته‌ترین علامت واژینیت کاندیدایی، خارش شدید و ترشح در ناحیه‌ی ولو و واژن است (۴).

در موارد حاد بیماری، Candida albicans عامل بیش از ۸۰ درصد موارد عفونت است و نقش گونه‌های غیر

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه قارچ وانگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دکتری تخصصی انگل‌شناسی، گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- دانشیار، گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: جواهر چعباوی‌زاده
Email: javaher_chabavi@yahoo.com

www.SID.ir

Arshive of SID

Candida albicans در ایجاد بیماری کمتر است (۹-۸). گزارش‌های آماری اخیر از کشورهای آمریکا و انگلیس، افزایش چشم گیری را در میزان ولوواژینیت کاندیدایی در طی دهه‌های گذشته نشان می‌دهد و قارچ Candida اکنون به عنوان دومین عامل شایع عفونت‌های واژینال شناخته می‌شود.

از آن جایی که شکل کلی مخمرها در مقاطع بافتی یکسان است، تشخیص قطعی این عوامل از یکدیگر بستگی به جداسازی و تعیین هویت ارگانیسم در محیط کشت و استفاده از روش‌های دقیق و آزمون‌های افتراق دهنده‌ی گونه‌ها از یکدیگر می‌باشد (۱۰).

توزیع سنی و جنسی و نیز روند بالینی Candidiasis به شدت تحت تأثیر عوامل مستعد کننده و بیماری زمینه‌ای قرار دارند. به طور کلی، عواملی که تعادل طبیعی بین Candida و میزبان را مختل می‌نماید و میزبان را مستعد کسب بیماری Candidiasis می‌کند، شامل حاملگی، دیابت، سن، تغییرات فیزیولوژیک، استفاده‌ی طولانی مدت از آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای سرکوبگر ایمنی، مصرف کنتراسپتیوها، بیماری‌های ناتوان کننده، آویتامینوز و ... می‌باشد (۱۱).

بر اساس برخی مطالعات انجام شده، بعضی از گونه های Candida، به خصوص Candida glabrata نسبت به بعضی داروهای ضد قارچی رایج مقاومت نشان می‌دهند (۱۴-۱۲). بنابراین، با توجه به این نکته و از آن جایی که در ایران علاوه بر Candida albicans، سایر عوامل کاندیدایی مانند Candida glabrata، Candida krusei و Candida tropicalis نیز به فراوانی از واژینیت‌های کاندیدایی جدا شده‌اند و چون شکل ظاهری کلنی، ریزبینی و علایم بالینی این عوامل در میزبان اختصاصی نیست، تعیین گونه‌های عامل بیماری با روش‌های دقیق و قابل اعتماد بسیار ضروری می‌باشد. روش‌های فنوتایپی مثل کشت در محیط‌های معمول آزمایشگاهی مانند Subaru dextrose agar، محیط Corn meal agar و محیط Chromagar candida به نسبت در دسترس‌تر می‌باشند و برای کار با آن‌ها، نیاز به تخصص خاصی نیست؛ در حالی که روش‌های مولکولی علاوه بر نیاز به فرد متخصص در امر مولکولی، تجهیزات و مواد اختصاصی لازم دارند که گران‌تر هستند و ممکن است در مناطق و آزمایشگاه‌های مناطق محروم و کوچک به راحتی قابل دسترسی نباشند. مطالعه‌ی حاضر، با هدف بررسی و مقایسه‌ی دو روش در تشخیص عوامل شایع کاندیدایی انجام شد.

روش‌ها

نمونه‌برداری: این مطالعه توصیفی بود و در فاصله‌ی زمانی بهمن ماه ۱۳۹۴ تا دی ماه ۱۳۹۵ بر روی ۱۲۵ بیمار مشکوک به واژینیت کاندیدایی به روش نمونه‌گیری ساده انجام شد. میانگین سن افراد تحت بررسی، ۳۴/۶۵ سال بود. نمونه‌های واژینال با استفاده از دو سواپ استریل از ترشحات واژینال زنان مشکوک به Candidiasis واژن مراجعه کننده به درمانگاه‌های زنان تهیه و پس از اخذ رضایت کتبی و پر کردن فرم اطلاعات شخصی و علایم بالینی و نیز مشخصات دموگرافیک، به آزمایشگاه قارچ‌شناسی ارسال شدند. ضمن این که زنان باردار یا دارای خونریزی واژینال، زنان تحت درمان با استروژن و یا تحت درمان با داروهای ضد قارچی (خوراکی، واژینال و ...) حد اقل تا یک هفته قبل از نمونه‌گیری، از مطالعه خارج شدند.

آزمایش مستقیم: یکی از سواپ‌ها جهت آزمایش مستقیم با استفاده از هیدروکسید پتاسیم (Potassium hydroxide یا KOH) ۱۰ درصد و رنگ‌آمیزی گیمسا از نظر وجود عوامل کاندیدایی (میسلیوم کاذب و سلول‌های مخمری واجد یا فاقد جوانه) با بزرگ‌نمایی ۴۰ و ۱۰۰ مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت.

آزمایش کشت: سواپ دوم جهت کشت بر روی ۲ سری محیط کشت Subaru dextrose agar حاوی کلرامفنیکل (Merck, Germany) انجام شد.

محیط‌های کشت در انکوباتور ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از آن، تک‌تک کلنی‌های رشد یافته، ابتدا خالص شدند و پس از ۲۴ ساعت، بر روی دو محیط Chrom agar candida (CHOROMagar, France) و Corn meal agar کشت داده شدند. نمونه‌های خالص‌سازی شده جهت آزمایش‌های مولکولی Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) در لوله‌های حاوی محیط کشت Subaru dextrose agar حاوی کلرامفنیکل (SC) قرار داده و در یخچال (۴-۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

الف- کشت بر روی محیط Corn meal agar. کشت بر روی این محیط که حاوی عصاره‌ی ذرت و ۱ درصد توئین ۸۰ بود، انجام شد. Candida albicans در این محیط توانایی تولید کلامیدوکونیدی را دارا می‌باشد. ابتدا، دو شیار موازی هم بر روی محیط کشت ایجاد و سپس، کلنی‌ها در این شیارها تلقیح و سطح محل تلقیح با لامل استریل پوشانده و در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ب- کشت بر روی محیط Chrom agar candida. جداسازی گونه‌های Candida albicans از غیر آن با استفاده از محیط Chrom agar candida انجام شد؛ بدین صورت که با استفاده از یک لوپ استریل مقداری از کلنی‌های مورد نظر برداشته و بر روی محیط پیش‌گفته کشت داده و در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. کلنی‌های ظاهر شده، از نظر مورفولوژی و رنگ پیگمان مورد بررسی قرار گرفتند و تغییر رنگ ایجاد شده برای

www.SID.ir

Arshive of SID

هر کلنی، ثبت گردید و بدین ترتیب، کلنی‌های Candida albicans، Candida glabrata و Candida krusei، به ترتیب به رنگ سبز، صورتی پررنگ و صورتی کم‌رنگ نمایان شدند. به منظور تشخیص دقیق‌تر گونه‌های جدا شده، از روش مولکولی PCR-RFLP استفاده گردید.

تعیین هویت مخمرهای جدا شده به روش PCR-RFLP: به منظور شناسایی گونه‌های Candida غیر Albicans، از روش مولکولی PCR-RFLP استفاده شد. این آزمون، با استفاده از منطقه‌ی ژنی ITS1، ITS2 و 5/8 s که دارای تنوع کافی برای افتراق گونه‌های مخمری است، انجام شد. از این رو، از پرایمرهای یونیورسال ITS1 و ITS4 (شرکت سیناژن، ایران) که قطعات فوق را تکثیر می‌نمایند، استفاده گردید. سپس، از آنزیم محدودالاثر MspI1 جهت برش محصولات PCR استفاده شد.

مراحل انجام آزمایش مولکولی

استخراج DNA: جهت استخراج DNA از روش جوشاندن استفاده شد (۱۵)؛ بدین صورت که سوسپانسیونی از کلنی خالص شده و تازه‌ی مخمر مورد نظر در ۱۰۰ میکرولیتر آب‌مقطر استریل در یک میکروتیوب استریل ریخته شد. درب میکروتیوب‌ها با پارافیلم محکم بسته شد و به مدت ۱۵دقیقه در بن‌ماری ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. آن گاه، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول شفاف رویی که حاوی DNA مخمر است، با دقت جدا شد و به میکروتیوب‌های جدید انتقال یافت و تا زمان انجام PCRدر فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

انجام PCR: ابتدا از قطعه‌ی ITS1-5.8S-ITS2 که دارای تنوع کافی برای افتراق گونه‌های مخمری می‌باشد، استفاده گردید. برای این منظور از پرایمرهای یونیورسال ITS1 (5`TCCGTAGGTGAACCTGCGG3`) و ITS4 (5`TCCTCCGCTTATTGATATGC3`) که قطعات پیش‌گفته را تکثیر می‌کنند، استفاده شد (۱۶).

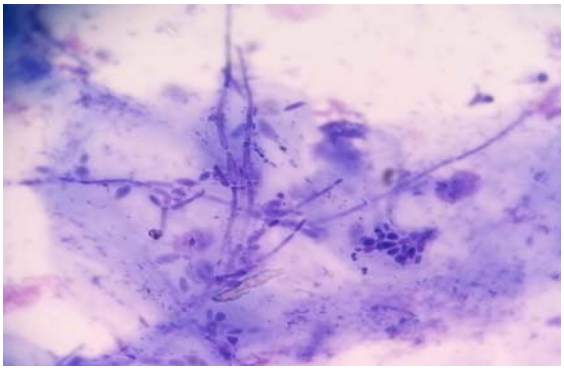
پرایمرها (شرکت سیناژن، ایران) با آب مقطر استریل به رقت مورد نظر رسیدند و تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای انجام PCR با حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر، از موادی شامل پرمیکس ۱۲/۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۵۰ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۱۰ میلی‌مول Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)، ۵۰ واحد/میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase، پرایمر رفت ITS1 و پرایمر برگشت ITS4 هر کدام ۱ میکرولیتر (۱۰ پیکومول)، ۳ میکرولیتر از DNA نمونه‌ی قارچی و ۷/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استفاده شد. طبق برنامه‌ی حرارتی شامل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه جهت Denaturation، ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۳۰ چرخه‌ی متوالی به ترتیب برای مراحل Denaturation، Annealing و Extension جهت تکثیر ژن مورد نظر و در مرحله‌ی پایانی، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه برای توسعه‌ی نهایی محصول PCR به کار رفت.

انجام RFLP: در این مرحله، ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR هر کدام از نمونه‌ها، با ۳ میکرولیتر آب مقطر، ۱/۵ میکرولیتر بافر و ۰/۵ واحد آنزیم MspI (Fermentas Lithuania) در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر تهیه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. با توجه به پلی‌مورفیسم ناشی از محل برش آنزیم در محصولات PCR شناسایی مخمرها انجام گردید (۱۷).

الکتروفورزمحصولات: ۵ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد و ۷ میکرولیتر از DNA هضم شده با آنزیم MspI در ژل آگارز ۲ درصد (برای محصولات RFLP) در تانک الکتروفورز بارگذاری شد. باندهای DNA با Safe stain رنگ‌آمیزی و با استفاده از اشعه‌ی ماورای بنفش (Ultraviolet یا UV) مشاهده و عکس‌برداری گردیدند.

یافته‌ها

تعداد ۱۲۵ نمونه‌ی واژینال از مراجعین مشکوک به واژینیت کاندیدایی تهیه شد. از بین ۱۲۵ بیمار تحت مطالعه، ۵۳ نفر (۴۲ درصد) از نظر واژینیت کاندیدایی مثبت و ۷۲ نفر(۵۸ درصد) منفی تشخیص داده شدند. از بین ۵۳ نفر، ۵۱ نفر (۹۶/۲ درصد) در محدوده‌ی سنین باروری (۴۵-۲۳ سال) و تنها ۲ نفر (۳/۸ درصد) بالاتر از ۴۵ سال سن داشتند. شناسایی گونه‌های مخمری با دو روش مورفولوژی و مولکولی انجام پذیرفت. در روش مورفولوژی، با استفاده از آزمایش مستقیم تمام ۵۳ نمونه، Blastoconidia و یا Pseudohypha مشاهده شد (شکل‌های ۱ و ۲).



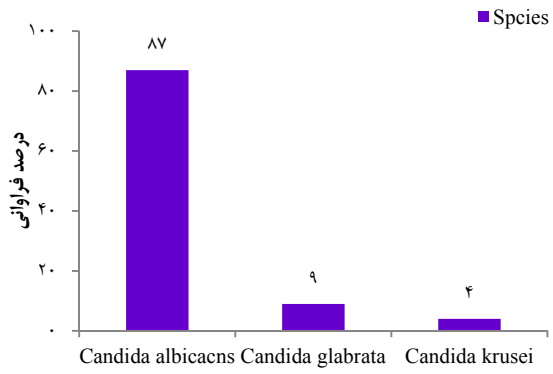
شکل ۱. Pseudohyphae و مخمر Candida در آزمایش مستقیم، بزرگ‌نمایی x۱۰۰

www.SID.ir

Arshive of SID

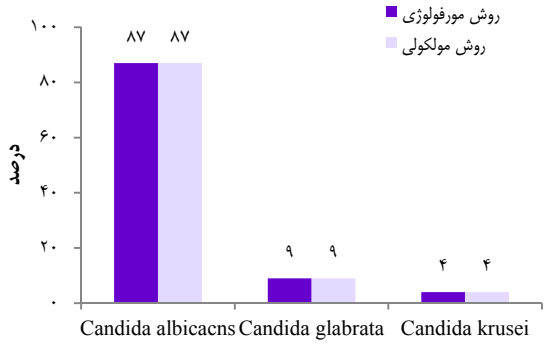
شکل ۲. **Candida albicans بر روی محیط Corn meal agar بزرگ‌نمایی x۴۰**

در کشت بر روی محیط Subaru dextrose agar، رشد کلنی‌های مخمری سفید مایل به کرم رنگ مشاهده شد. همچنین، کشت بر روی دو محیط Corn meal agar و Chrom agar candida انجام شد و بدین ترتیب، گونه‌های Candida albicacns ۸۷ درصد (۴۶ مورد)، Candida glabrata ۹ درصد (۵ مورد) و Candida krusei با ۴ درصد (۲ مورد) شناسایی شدند. نتایج شناسایی در روش مولکولی همانند روش مورفولوژی، عوامل واژینیت کاندیدایی به صورت Candida albicans ۸۷ درصد (۴۶ مورد)، Candida glabrata ۹ درصد (۵ مورد) و Candida krusei با ۴ درصد (۲ مورد) تشخیص داده شدند و همان‌طور که ملاحظه می‌شود، نتایج هر دو روش (آزمون‌های مورفولوژی و مولکولی PCR-RFLP) به طور کامل یکسان بودند (شکل‌های ۳ و ۴).



شکل ۳. **درصد فراوانی عوامل واژینیت کاندیدایی در جمعیت تحت مطالعه**

Candida albicans با ۸۷ درصد (۴۶ مورد) بیشترین درصد را به خود اختصاص داد و بعد از آن، Candida glabrata با ۹ درصد (۵ مورد) در رده‌ی بعدی قرار گرفت.



شکل ۴. **تعیین گونه‌های کاندیدا به روش مرفولوژیک و مولکولی**

بحث

ولوواژینیت کاندیدایی، یک عفونت مخاطی فرصت‌طلب و شایع می‌باشد که یک سوم موارد واژینیت را شامل می‌شود. ۵۰-۲۰ درصد زنان، این ارگانیسم را به عنوان فلور طبیعی در واژن خود دارند و ۷۵ درصد زنان، حداقل یک بار به این عفونت مبتلا می‌شوند و ۴۵ درصد آنان، یک بار یا بیشتر درگیر پیامدهای بالینی آن می‌شوند (۱۱).

در دهه‌های اخیر، روش‌های تشخیص مولکولی با استقبال زیادی در تشخیص‌های آزمایشگاهی روبه‌رو شده‌اند. این روش‌ها، به سرعت به حیطه‌ی تشخیص عفونت‌ها و شناسایی عوامل ایجاد کننده‌ی بیماری راه یافته‌اند.

این مطالعه بر روی ۱۲۵بیمار مشکوک به Vaginal candidiasis که به طور عمده از سوزش، خارش و ترشح واژن شاکی بودند، انجام گرفت. با استفاده از آزمایش مستقیم و کشت، ۵۳ نفر مبتلا به این بیماری تشخیص داده شدند. در این مطالعه، علاوه بر آزمون‌های مورفولوژی، از روش مولکولی PCR-RFLP نیز برای تعیین دقیق‌تر هویت عوامل مخمری استفاده شد؛ چرا که این روش‌ها، بر خلاف روش‌های مورفولوژی، کمتر تحت تأثیر عوامل محیطی هستند و از طرفی، تکرار پذیری و قابلیت اعتماد بالاتری دارند. آزمون‌های مورفولوژی مورد استفاده در این مطالعه، شامل آزمایش مستقیم با استفاده از رنگ‌آمیزی گیمسا، کشت در محیط Saburo dextrose agar ، Chromagar candida و Corn meal agar حاوی ۱ درصد توئین ۸۰ بود.

در این مطالعه، میزان فراوانی ولوواژینیت کاندیدایی در جمعیت مورد مطالعه با هر دو روش ۴۲ درصد به دست آمد که این میزان با فراوانی که توسط دیبا و همکاران از ارومیه گزارش شده بود (۱۲)، هم‌خوانی دارد، اما گزارش‌های شبیری و نظری از همدان (۱۳) و Mohanty و همکاران از هند (۱۴) بالاتر است. علت این تفاوت، می‌تواند ناشی از عادات بهداشتی در مناطق مورد مطالعه و روش

www.SID.ir

Arshive of SID

تشخیصی به کار رفته باشد. فراوانی Candida albicans در بین مخمرهای جدا شده، ۸۷ درصد بود. این میزان با یافته‌های مطالعات Vermitsky و همکاران (۱۸) (۸۹/۰ درصد) و پاکشیر و همکاران (۱۹) (۸۷/۷ درصد) به طور تقریبی هماهنگ است؛ در حالی که با گزارش Rivera-Sanchez و همکاران (۳۹/۰ درصد) متفاوت است (۲۰). نتایج سایر مطالعات، مشابه نتایج تحقیق حاضر است (۲۱، ۱۹-۱۸، ۱۲).

تفاوت در آمارهای ارایه شده، می‌تواند به علت اختلاف روش تشخیصی مورد استفاده باشد. شبیری و نظری (۱۳) و Mohanty و همکاران (۱۴) تنها از روش‌های مورفولوژی استفاده کرده‌اند؛ در حالی که دیبا و همکاران (۱۲) همانند مطالعه‌ی حاضر هر دو روش (مورفولوژی و مولکولی) را به کار برده‌اند که خود می‌تواند توجیهی برای تفاوت در نتایج باشد. از طرفی، تعداد نمونه‌ی مورد بررسی، عادات بهداشتی و جنسی زنان کشورهای اروپایی با زنان ایرانی و نیز در نقاط مختلف کشور با یکدیگر متفاوت است و این مورد نیز می‌تواند از دیگر دلایل تفاوت یافته‌ها باشد.

در این مطالعه، متوسط سن بیماران ۳۴ سال بود، اما بیشتر بیماران در گروه سنی ۲۵-۲۰ سال قرار داشتند. لازم به ذکر است که به طور عمومی، زنان در این سن (۲۵-۲۰ سال) سابقه و علایم بیماری را از خود نشان می‌دهند که به طور معمول ناشی از ازدواج است و می‌تواند به عنوان دلیل دیگری برای فراوانی بیشتر نسبت به سایر گروه‌های سنی مطرح باشد؛ در حالی که در مطالعات دیگر، هیچ اشاره‌ای به این مهم (سن بیماران) نشده است.

سایر عوامل زمینه‌ساز نظیر روش‌های پیش‌گیری از بارداری که به طرق مختلف و متنوعی به کار می‌روند، رعایت بهداشت و عادات فردی، می‌توانند دلایل دیگر این اختلافات باشند. همانند دیگر تحقیقات، در این مطالعه نیز وجود علایم بالینی مانند ترشح، سوزش و خارش با استفاده از آزمون χ^2 رابطه‌ی معنی‌داری با فراوانی واژینیت کاندیدایی نشان داد ($P < ۰/۰۵$).

به طور کلی، مهم‌ترین گونه‌ای که باعث ایجاد ولوواژینیت کاندیدایی می‌شود، Candida albicans است و گونه‌های دیگر، به تناسب در مناطق جغرافیایی مختلف باعث بیماری می‌شوند. در مطالعه‌ی حاضر نیز فراوان‌ترین عامل بیماری Candida albicans و در مرتبه‌های بعدی، Candida glabrata و Candida krusei بودند. در بررسی دیبا و همکاران مشخص شده است که شایع‌ترین عوامل ولوواژینیت کاندیدایی، Candida albican، Candida glabrata و سپس، Candida parapsilosis هستند (۱۲). مطالعه‌ی فولادی و همکاران نیز نشان داد که Candida albicans فراوان‌ترین گونه بود و بعد از آن، Candida glabrata و Candida krusei قرار گرفتند (۲۲) که با یافته‌های مطالعه‌ی پیش رو مطابقت دارد. در مطالعه‌ی انجام شده در کاشان، بیشترین عامل واژینیت کاندیدایی، Candida albicans و در گونه‌های غیر Albicans، Candida glabrata و سپس، Candida kefir است (۲۳).

بررسی‌های انجام شده در دنیا، بیانگر این است که Candida albicans، شایع‌ترین عامل در واژینیت کاندیدایی است. در یک تحقیق در برزیل، فراوان‌ترین عامل (۶۰/۰ درصد) Candida albicans گزارش شده است و در مرتبه‌های بعدی، Candida glabrata (۲۵/۷ درصد) و Candida parapsilosis (۵/۷ درصد) قرار دارند (۲۴). در ایتالیا نیز در یک بررسی عوامل واژینیت به ترتیب اولویت Candida albicans، Candida glabrata، Candida parapsilosis و Candida tropicalis گزارش شده‌اند (۲۵). این نتایج، با یافته‌های گزارش تحقیقات انجام شده در کرواسی نیز هم‌خوانی دارند (۲۶).

با وجود این که روش‌های مولکولی (نظیر PCR-RFLP و RAPD یا Random Amplification of Polymorphic DNA) برای شناسایی گونه‌های مختلف کاندیدایی از سرعت و دقت بالایی برخوردار هستند (۲۹-۲۷)، اما به علت بالا بودن هزینه و نیاز به فرد متخصص برای انجام، قرائت و تفسیر نتایج آن‌ها، در همه‌ی آزمایشگاه‌ها به خصوص مناطق محروم، قابل اجرا و در دسترس نیستند. از طرفی، نتایج به دست آمده از هر دو روش پیش‌گفته در این مطالعه یکسان بوده است. از این رو، به دلیل سادگی و مقرون به صرفه بودن روش‌های مورفولوژی و قابلیت انجام آن در هر آزمایشگاهی، اعمال این روش‌ها پیشنهاد می‌شوند.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر، حاصل از طرح تحقیقاتی به شماره‌ی ۳۹۴۶۳۵ مصوب در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. ازکلیه‌ی پرسنل محترم درمانگاه‌های زنان و گروه قارچ و انگل‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی این دانشگاه که صمیمانه ما را در به ثمر رسیدن این پژوهش یاری رساندند، سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Garcia HM, Garcia SD, Copolillo EF, Cora EM, Barata AD, Vay CA, et al. Prevalence of vaginal candidiasis in pregnant women. Identification of yeasts and susceptibility to antifungal agents. Rev

www.SID.ir

Arshive of SID

Argent Microbiol 2006; 38(1): 9-12. [In Spanish].
2. Sobel JD, Kapernick PS, Zervos M, Reed BD, Hooton T, Soper D, et al. Treatment of complicated Candida vaginitis: Comparison of single and sequential doses of fluconazole. Am J Obstet Gynecol 2001; 185(2): 363-9.
3. Daniels D, Forster G. National Guideline on the Management of Vulvovaginal Candidiasis. Clinical Effectiveness Group [Online]. [cited 2017]; Available from: URL: https://www.bashh.org/documents/50/50.pdf
4. Buscemi L, Arechavala A, Negroni R. Study of acute vulvovaginitis in sexually active adult women, with special reference to candidosis, in patients of the Francisco J. Muniz Infectious Diseases Hospital. Rev Iberoam Micol 2004; 21(4): 177-81. [In Spanish].
5. White DJ, Vanthuyne A. Vulvovaginal candidiasis. Sex Transm Infect 2006; 82(Suppl 4): iv28-iv30.
6. Fleury FJ. Adult vaginitis. Clin Obstet Gynecol 1981; 24(2): 407-38.
7. 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.
8. Nyirjesy P. Chronic vulvovaginal candidiasis. Am Fam Physician 2001; 63(4): 697-702.
9. Ringdahl EN. Recurrent vulvovaginal candidiasis. Mo Med 2006; 103(2): 165-8.
10. Burke D, Dawson D, Stearns T, Cold Spring HL. Methods in yeast genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory course manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000.
11. Zaini F, Emami M, Mahbod A. Comprehensive medical mycology. Tehran, Iran: University of Tehran Publications; 2004. [In Persian].
12. Diba K, Namaki A, Ayatolahi H, Hanifian H. Comparison of biochemical and molecular methods for the identification of candida species causing vulvovaginal candidiasis and Recurring vulvovaginal candidiasis. Iran J Med Microbiol 2014; 8 (3): 45-50. [In Persian].
13. Shobeiri F, Nazari M. A prospective study of genital infections in Hamedan, Iran. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2006; 37(Suppl 3): 174-7.
14. Mohanty S, Xess I, Hasan F, Kapil A, Mittal S, Tolosa JE. Prevalence and susceptibility to fluconazole of Candida species causing vulvovaginitis. Indian J Med Res 2007; 126(3): 216-9.
15. Silva GA, Bernardi TL, Schaker PDC, Menegotto M, Valente P. Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. Braz Arch Biol Technol 2012; 55(2): 319-27.
16. Mohammadi R, Abastabar M, Mirhendi H, Badali H, Shadzi S, Chadeganipour M, et al. Use of restriction fragment length polymorphism to rapidly identify dermatophyte species related to dermatophytosis. Jundishapur J Microbiol 2015; 8(6): e17296.
17. Zarrinfar H, Kaboli S, Dolatabadi S, Mohammadi R. Rapid detection of Candida species in bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary symptoms. Braz J Microbiol 2016; 47(1): 172-6.
18. 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.
19. Pakshir K, Yazdani M, Kimiaghalam R. Etiology of vaginal candidiasis in Shiraz, Southern Iran. Res J Microbiol 2007; 2: 696-700.
20. Rivera-Sanchez R, Flores-Paz R, Arriaga-Alba M. Identification of Candida species causing vaginitis in Mexican patients. Enferm Infecc Microbiol Clin 2006; 24(10): 634-6. [In Spanish].
21. 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.
22. Fouladi B, Yadegari M, Rajabibazl M, Fazaeli A, Hashemzadeh Chaleshtori M. Identification of Candida species in patients with vulvovaginitis presenting different clinical symptoms. J Zanjan Univ Med Sci 2015; 23(98): 53-67. [In Persian].
23. Mohammadi R, Nazeri M, Mesdaghinia E, Mirhendi SH. Identification of Candida species among patients with vulvovaginal candidiasis in Kashan by PCR-RFLP method. J Isfahan Med Sch 2012; 29(165): 2230-7. [In Persian].
24. Lopes Consolaro ME, Aline AT, Shizue YC, Mazucheli J, Peralta RM, Estivalet Svidzinski TI. Correlation of Candida species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringa, Parana, Brazil. Rev Iberoam Micol 2004; 21(4): 202-5.
25. 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.
26. Mlinaric-Missoni E, Lipozencic J, Marinovic-Kulisic S, Mlinaric-Dzepina A. Fungal infections of urogenital system. Acta Dermatovenerol Croat 2004; 12(2): 77-83.
27. 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.
28. 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.
29. Morace G, Sanguinetti M, Posteraro B, Lo CG, Fadda G. Identification of various medically important Candida species in clinical specimens by PCR-restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol 1997; 35(3): 667-72.

www.SID.ir

Arshive of SID

Journal of Isfahan Medical School
Vol. 35, No. 445, 1st Week, November 2017
Received: 16.08.2017
Accepted: 02.10.2017

The Matching Rate of the Frequency of the Isolated Candida Species Calculated by Morphological and Molecular Methods in Patients with Vaginitis

Behzad Zahed[1], Javaher Chabavizadeh[2], Sedigheh Saberi[3], Parvin Dehghan[4]

Original Article

Abstract

Background: Candida vaginitis is one of the most common opportunistic fungal infections and 75% of women struggle at least once with this infection during their lifetime. The purpose of this study was to compare the results of two phenotypic and molecular methods in the diagnosis of candida vaginitis.

Methods: In this study, 125 vaginal samplings were done by two sterilized swabs from suspected patients to vaginal candidiasis. The direct experiment performed by preparing two staining slides, one with Gimsa and the second with 10% Potassium hydroxide (KOH). For culturing, Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol (SC), corn meal agar (CMA) and Chromagar candida were used. At first, the isolates were identified by microscopic observation and creation of specific color on Chromagar and chlamydoconidia on CMA culture media. For molecular methods, the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was also used with MspI enzyme.

Findings: Out of the 125 samples, 53 (42%) were positive in terms of vaginal candidiasis in both methods. Isolated species were as Candida albicans 46 isolates (87%), Candida glabrata 5 isolates (9%) and Candida kruise 2 isolates (4%).

Conclusion: In present study, Candida albicans, like most studies, diagnosed as the most frequent species. This study shows the high frequency of vaginal candidiasis. Therefore, due to the similarity of the results in both methods and considering the lack of sufficient and advanced molecular facilities in deprived areas, using phenotypic tests is recommended.

Keywords: Candidiasis, Vulvovaginal, Morphology, Polymerase chain reaction, Restriction fragment length polymorphism

Citation: Zahed B, Chabavizadeh J, Saberi S, Dehghan P. **The Matching Rate of the Frequency of the Isolated Candida Species Calculated by Morphological and Molecular Methods in Patients with Vaginitis.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(445): 1126-32.

1- MSc Student, Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- PhD in Parasitology, Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Associate Professor, Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Javaher Chabavi-Zadeh, Email: javaher_chabavi@yahoo.com

www.SID.ir