Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 16(77): 48-56

Identification of Candida species associated with vulvovaginal candidiasis by comparison of an innovative molecular method with culture in 2013

Sohrabi H[1], Sarookhani MR[2]*, Ezani A[3]

1- Lecturer, Department of Mycology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
2- Cell and Molecular Research Center and Department of Biotechnology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
3- Reference Laboratory, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Received:30.Jul.2013, Accepted: 11.Sep.2013

Abstract

Background: Vulvovaginal candidiasis is a common problem in women. The purpose of this study was to compare two identification methods; new PCR analysis (with DNA extracted from samples) and conventional culture technique in detection of *Candida* species in vulvovaginal samples.

Material and Methods: In this experimental-analytical study, 150 women of fertility ages participated and two vaginal discharge samples were collected by speculum. One sample used for direct DNA extraction as well as PCR and the other was used for culture and phenotypic evaluations. Phenotypic evaluations waere performed by germ tube and chlamydospore formation and specially culture in chrome agar medium to detect color of the colonies. PCR was performed by DNA extracted from samples as templates and finally size of *Candida* specific amplicons was determined.

Results: From 150 samples, 87 in culture and 127 in new PCR technique were positive. In culture method, from total 87 *Candida* species , 73 *C. albicans*, 12 *C. glabrata* and 2 *C. tropicalis* were isolated whereas in new PCR technique, from total 127 candida species 107 *C. albicans*, 18 *C. glabrata* and 2 *C. tropicalis* were identified. Concordance of the two methods were calculated as 68 percent.

Conclusions: The new molecular method (innovative PCR) has the potential to rapidly and accurately diagnose *Candida* vulvovaginitis in patients and can be used for diagnosis of *Candida* species in clinical specimens.

Keywords: Candida, Culture, Polymerase Chain Reaction, Vulvovaginitis

Archive of SID

*corresponding author:
Adress: Cell and Molecular Research Center and School of Allied Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
Email:mrsarookhani@QUMS.ac.ir

www.SID.ir

مقاله پژوهشی
مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 16، شماره 8 (شماره پیاپی 77)، آبان 1392، 56-48

شناسایی گونه‌های کاندیدای جدا شده از موارد ولوو واژینیت کاندیدایی با مقایسه دو روش کشت و مولکولی ابداعی در سال 1391

حسین سهرابی[1]، محمدرضا ساروخانی[2*]، اکرم ازعانی[3]

1. مربی، کارشناس ارشد قارچ شناسی، گروه قارچ شناسی دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
2. دانشیار، دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی و علوم آزمایشگاهی و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
3. کارشناس ارشد ویرولوژی، آزمایشگاه مرجع سلامت دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

تاریخ دریافت:92/4/9 تاریخ پذیرش: 92/6/20

چکیده

زمینه و هدف: ولوو واژینیت کاندیدایی عارضه متداولی در خانم‌ها محسوب می‌شود. هدف این مطالعه شناسایی عوامل ولوو واژینیت کاندیدایی با روش مولکولی PCR ابداعی(با استخراج DNA ازخود نمونه‌ها) و مقایسه آن با روش‌های کشت بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی- تحلیلی از150 خانم در سنین باروری با استفاده از اسپکولوم گذاری از ترشحات واژینال دو نمونه گرفته شد. یکی از این نمونه‌ها جهت استخراج مستقیم DNA از آنها و PCR و دیگری جهت آزمون‌های فنوتیپی(کشت) استفاده شد. آزمون‌های فنوتیپی با استفاده از کشت روی محیط کورن میل آگار، تشکیل جرم تیوب و تولید کلامیدوسپور و به ویژه رنگ کلونی روی محیط کروم آگار انجام شدند. PCR با استفاده از DNA استخراج شده از نمونه‌ها و در نهایت تعیین آمپلیکون مربوط به حضور کاندیداها به عمل آمد.

یافته‌ها: از تعداد 150 نمونه، 87 نمونه با روش کشت و 127 نمونه با روش مولکولی(PCR معرفی شده) مثبت بود. از بین 87 نمونه مثبت جدا شده در کشت، 73 مورد کاندیدا آلبیکنس و12 موردکاندیدا گلابراتا و 2 مورد کاندیدا تروپیکالیس به دست آمد. لیکن از میان 127 نمونه مثبت تشخیص داده شده در PCR، 107 مورد کاندیدا آلبیکنس و 18 مورد کاندیدا گلابراتا و 2 مورد کاندیدا تروپیکالیس به دست آمد. انطباق روش کشت با روش مولکولی برابر 68 درصد بود.

نتیجه‌گیری: روش مولکولی به کار گرفته شده توانایی شناسایی راحت و صحیح عوامل کاندیدایی در ولوو واژینیت را داشته و از آن می‌توان در تشخیص کاندیدا در نمونه‌ها استفاده کرد.

واژگان کلیدی: کاندیدا، کشت، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، ولوو واژینیت

***نویسنده مسئول:** دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی و دانشکده پیراپزشکی
Email :mrsarookhani@QUMS.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

کاندیداها به عنوان ارگانیسم‌های تک سلولی یا مخمری یوکاریوتی طیف وسیعی از عفونت‌ها را در بیماران به ویژه در افرادی که سیستم ایمنی آنها تضعیف شده و یا بیماری‌های زمینه‌ای دارند موجب می‌شوند.

کاندیدیازیس ژنیتال در اکثر موارد ناشی از افزایش تعداد کاندیدا است که به صورت فلور طبیعی در واژن وجود دارد. تقریباً 5 درصد این بیماران در سال چهار بار و یا بیشتر به این بیماری مبتلا می‌شوند که به آن ولوواژینیت کاندیدایی عودکننده می گویند. ولوو واژینیت کاندیدایی بیماری است که با علائمی نظیر خارش و ترشحات غلیظ سفید رنگ مشخص می‌شود. بین 75-70 درصد زنان بالغ سالم حداقل یک بار در طول دوران باروری خود به ولوو واژینیت کاندیدایی دچار می‌شوند. گونه‌های متعددی از این ارگانیسم وجود دارند که شامل آلبیکنس، پاراپسیلوزیس، تروپیکالیس، گلابراتا، کروزه‌ای، دابلینسیس و گیلرموندی و ... می باشند. عامل اکثر موارد بیماری‌ها، گونه‌ی کاندیدا آلبیکنس است ولی در بیماران مبتلا به ولوو واژینیت کاندیدایی عود کننده 47-15 درصد موارد توسط گونه‌های غیر آلبیکنس ایجاد می‌شوند. برخی معتقدند استفاده‌ی گسترده از داروهای ضد قارچی در افزایش فراوانی گونه‌های غیر آلبیکنس نقش داشته است زیرا رژیم‌های درمانی یک تا سه روزه‌ی 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 کاندیدا گلابراتا و کاندیدا کروزه ای به فلوکونازول مقاومت بیشتری نسبت به سایر گونه‌ها نشان می‌دهند. از این رو شناسایی دقیق گونه‌ی کاندیدا اهمیت به سزایی در درمان و مقابله با بیماری خواهد داشت.(1، 2).

روش‌های مختلفی در شناسایی کلی کاندیداها به کار می‌روند که به طور کلی شامل روش‌های فنوتایپی و کشت و روش‌های ژنوتایپی می‌باشند. در ایران روش استاندارد متداول فعلی تشخیص کاندیداها روش کشت می‌باشد. اما این روش نه تنها زمانبر بوده بلکه حساسیت آن نیز کم می‌باشد. بنابراین در طی سالیان متمادی استفاده از روش‌های مختلف مولکولی و PCR در تشخیص کاندیداها اجتناب ناپذیر بوده است. اما روش‌های مولکولی معرفی شده در تشخیص ولوو واژینیت، خود مبتنی بر کشت آنها بوده که در نتیجه مزیت زمانی آنها را زیر سوال می‌برد (1، 2).

در جهت تسهیل روش شناسایی، میرهندی و همکاران در سال 1387 (2008) روش ابداعی PCR-Fragment size polymorphism (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر مبنای چند شکلی اندازه قطعات) را با طراحی پرایمر برای نواحی ITS1 و ITS2 ارائه نموده‌اند. در این روش محصولات PCR بر اساس گونه کاندیداها اندازه‌های متفاوتی خواهند داشت و لذا نیاز به مراحل بعدی و استفاده از آنزیم‌های محدودگر را برای تشخیص بیشتر گونه‌های کاندیدایی مرتفع کرده است (2). همچنین در جهت کم کردن زمان تشخیص، لوو و همکاران در سال 2010 شناسایی کاندیدمی را با روش PCR مالتیپلکس به دنبال هم (multiplex-tandem PCR= MT-PCR) به انجام رسانده و این روش مستقیم تعیین کاندیداها در خون را با روش کشت خون مقایسه نموده‌اند. (3). در واقع این اولین قدمی بوده که در جهت استفاده مستقیم از نمونه برای استخراج DNA و انجام آزمون PCR بهره گرفته شده است که قطعا برای شناسایی سریع ارگانیسم خطرناکی چون گونه‌های کاندیدایی و آن هم در داخل گردش خون صورت گرفته است.

علی‌رغم انجام برخی مطالعات در مناطق مختلف کشور با روش‌های فنوتایپی و مولکولی، در استان قزوین تنها مطالعه روی کاندیداها در سال 1386 روی نمونه‌های ولوواژینیت بوده که صرفاً از روش‌های فنوتایپی بهره‌گیری شده است و انواعی از کاندیدها را جدا و تعیین هویت نموده‌اند (4).

Archive of SID
www.SID.ir

لذا با توجه به موارد فوق، هدف این مطالعه شناسایی گونه‌های کاندیدای جدا شده از موارد ولوو واژینیت کاندیدایی با مقایسه دو روش کشت ومولکولی ابداعی می باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی- تحلیلی از150 نفر بیماری که به مراکز بهداشتی قزوین در طول سال 91 مراجعه نموده بوده‌اند به طور سرشماری و با نمونه‌گیری ساده تا رسیدن به عدد فوق نمونه برداری شد. معیارهای ورود به مطالعه خانم‌های در محدوده سنی50-20 ساله غیر باردار متاهل با شکایت ترشح واژینال سفید پنیری تا رقیق آبکی یا با علائم قرمزی و خارش در ناحیه مهبل، فرج یا هر دو و بدون مصرف دارو بود که پزشک یا ماما در روند عادی تشخیص بالینی خود تشخیص ولوو واژینیت را داده و درخواست تشخیص آزمایشگاهی را کرده بود. با استفاده از اسپکولوم گذاری، توسط سواپ داکرون از نواحی واژن و ولو نمونه گرفته شد(دو عدد) و در محیط ترانسپورت قرار گرفته و انتقال یافت.

جهت عملیات قارچ شناسی(فنوتایپی)، نمونه‌های قارچی جدا شده از واژن با استفاده از آزمون‌های فنوتیپی(تشکیل جرم تیوب(لوله زایا)) و تولید کلامیدوسپور روی محیط کورن میل آگار دارای یک درصد توئین 80 و به ویژه رنگ کلونی روی محیط کروم آگار مورد شناسایی قرار گرفتند (5).

گونه‌های مختلف کاندیدا در روی محیط‌های کشت SC (سابوردکستروز آگار حاوی کلرامفنیکول) ایجاد کلنی‌های موکوئیدی مینمایند. رشد گونه‌های کاندیدا به جز گونه کاندیدا گلابراتا که برای رشد نیاز به انکوباسیون طولانی دارد سریع بوده است. با توجه به حساسیت برخی گونه‌های کاندیدا نظیر تروپیکالیس، پاراپسیلوزیس، کروزه‌ای و راگوزا به سیکلوهگزامید از محیط SCC (سابوردکستروز آگار حاوی کلرامفنیکول و سیکلوهگزامید) استفاده نگردید. تشخیص قطعی کاندیداها با استفاده از تست‌های لوله زایا، تولیدکلامیدوکونیدی و پیگمان کاندیدا روی محیط کروم آگار انجام میشود. بیش از 90 درصد گونه‌های آلبیکنس و دابلینسیس در محیط کورن میل آکار حاوی توئین 80 ایجاد کلامیدوکونیدی مینمایند و تست لوله زایای 90 درصد گونه‌های آلبیکنس و دابلینسیس مثبت است.

در آزمون لوله زایا که یکی از ابتدایی‌ترین روش‌های تشخیصی کاندیدا آلبیکنس است توسط یک آنس استریل از نمونه کشت تازه بیمار برداشت کرده و درون نیم میلی‌لیتر از سرم انسان انتقال داده و به خوبی مخلوط گردید. سوسپانسیون فوق در دمای37 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 تا 3 ساعت نگهداری شد، سپس وجود یا فقدان لوله زایا در زیر میکروسکوپ بررسی شد. در آزمون ایجاد کلامیدوکونیدی روی محیط کورن میل آگارداری1 درصد توئین80 (*CMA-T80*) ابتدا تمام مخمرهای مورد بررسی بر روی محیط سابورو کشت داده شدند. سپس ایزوله‌های کشت داده شده بر روی محیط کورن میل آگار حاوی توئین 80 تلقیح شده و به مدت 72 ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از طی مدت انکوباسیون، با استفاده از درشت نمایی ضعیف میکروسکوپ، وجود یا عدم وجود کلامیدوکونیدی مورد بررسی قرار گرفت (5، 6).

جهت کشت روی محیط کروم آگار کاندیدا (شرکت کروم آگار رامباخ فرانسه) با استفاده از لوپ استریل، مقدار کمی از مخمرهای گونه‌های مختلف بر روی محیط کشت افتراقی کروم آگار کاندیدا کشت داده می‌شوند، کشت تلقیح شده، درون انکوباتور با دمای 37 درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و بعد از گذشت 48 ساعت، کلنی‌های ظاهر شده از نظر مورفولوژی کلنی و رنگ پیگمان تولید شده مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده محیط کشت، رنگ سبز موید کاندیداآلبیکنس و رنگ بنفش موید کاندیدا گلابراتا و رنگ آبی موید کاندیدا تروپیکالیس می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

جهت روش‌های مولکولی ابتدا برای استخراج DNA از خود نمونه‌های سواپ واژینال (به طور مستقیم و نه از DNA استخراج شده از کلنی) با استفاده از Glass bead (ذرات شیشه)، دیواره کاندیداها شکافته شده و سپس استخراج با کیت igenomic BYF DNA extraction mini kit (Intron Biotechnology Inc., Seongnam, South Korea) انجام شد.

برای طراحی پرایمرهای رفت و برگشت یونیورسال ویژه مناطق 1و2 در ITS (7) و تمام منطقه 5SrRNA ژن rDNA (ویژه کاندیداها) بر اساس منابع مختلف(8) که با استفاده از نرم افزارهای طراحی پرایمر و تایید آنها با منابع اطلاعاتی (BLAST) نیز به دست آمد، استفاده گردید:

Forward: (ITS1:5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')

Reverse: (ITS4: 5'-TCC TCC GCT TATTGA TAT GC-3')

جهت انجام PCR با استفاده از DNA استخراج شده از نمونه‌ها به عنوان الگو(2میکرولیتر) و نیز از پرایمرهای رفت و برگشت (هر کدام یک میکرولیتر) و master mix (10میکرولیتر) (شرکت آمپلیکون دانمارک) استفاده شد و مابقی حجم تا 25 میکرولیتر را آب مقطر تشکیل داد (9). هم‌چنین از نمونه‌های DNA استخراج شده سویه‌های کاندیدای مشخص به عنوان کنترل مثبت (تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی ایران با شماره‌های Candida albicans PTCC:5027 و Candida glabrata PTCC:5297 و Candida crusei PTCC:5295) و از DW به عنوان کنترل منفی استفاده شد. در نهایت با استفاده ازترموسایکلر ABI veriti (USA) مقادیر سیکل‌های حرارتی زیر به عنوان مقادیر بهینه به کار گرفته شدند(10):

دمای اولیه:94 درجه سانتی‌گراد به مدت 7 دقیقه

30 سیکل شامل:

دناتوره: 94 درجه به مدت 45 ثانیه

اتصال: 56 درجه به مدت یک دقیقه

دمای گسترش یا بسط: 72 درجه به مدت یک دقیقه

دمای نهایی گسترش: 72 درجه به مدت هفت دقیقه

از الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگاروز جهت شناسایی استفاده شد. محصولات تکثیری با رنگ ژل رد رنگ آمیزی شدند. از مارکر DNA (Intronbio Co. south Korea) در کنار نمونه‌ها استفاده شد.

نتایج تمام آزمایشات در نرم افزار EXCEL ذخیره شد و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزارSPSS نسخه 16 و محاسبه فراوانی و میانگین استفاده شد.

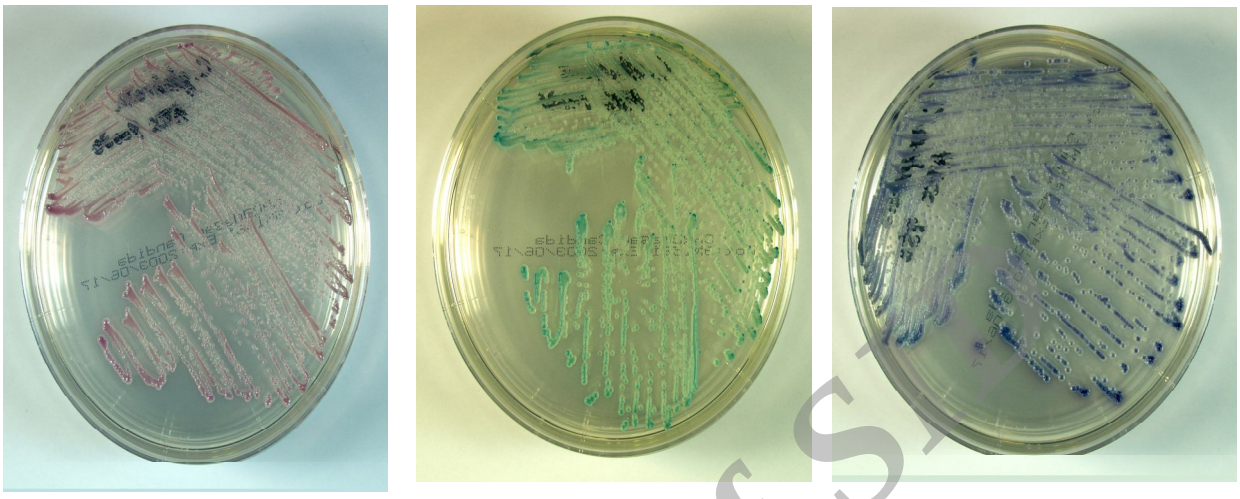
یافته‌ها

میانگین سنی جامعه دارای ولووواژینیت کاندیدایی در این مطالعه 10/5±32 سال به دست آمد. از تعداد 150 نمونه ولوو واژینیت گرفته شده از بیماران، تعداد 87 نمونه با این روش کشت مثبت داشته و تعیین گونه کاندیدایی برای آنها انجام شد. اما در روش مولکولی تعداد 127 نمونه مثبت شد و گونه کاندیدایی مشخص گردید. انطباق روش کشت (فنوتایپی) با روش مولکولی برابر 68 درصد به دست آمد.

در روش کشت (فنوتایپی) از میان 87 نمونه مثبت، 72 مورد گونه کاندیدا آلبیکنس و 12 مورد گونه کاندیدا گلابراتا و 2 مورد گونه کاندیدا تروپیکالیس به دست آمد(تصویر1 و جدول 1).

Archive of SID

www.SID.ir

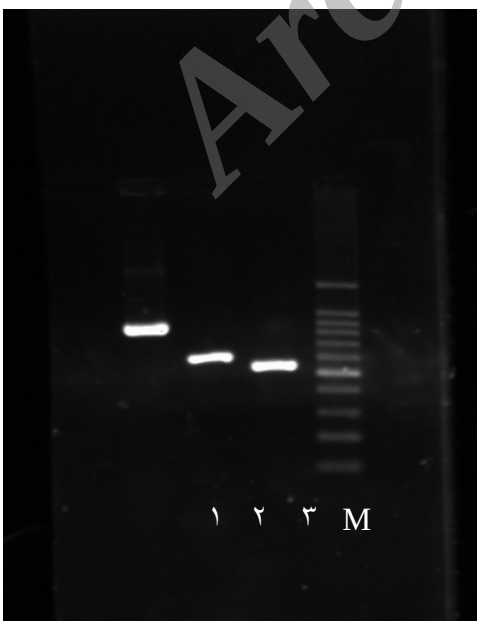


Candida glabrata Candida albicans Candida tropicalis

تصویر 1. محیط کشت کروم آگاردر جداسازی 3 گونه کاندیدای آلبیکنس و گلابراتا و تروپیکالیس

جدول 1. مقایسه نتایج دو روش کشت و PCR ابداعی در جداسازی کاندیداها در نمونه‌های ولووواژینیتی

گونه کاندیدا	تعداد در کشت	درصد	تعداد در PCR	درصد
آلبیکنس	73	84	107	84
گلابراتا	12	14	18	14
تروپیکالیس	2	2	2	2
جمع	87	100	127	100



در روش مولکولی(PCR) ابداعی از تعداد 150 نمونه کار شده تعداد 127 مورد با این روش PCR مثبت شدند یعنی در الکتروفورز ژل آکاروز محصول PCR آنها باند مشهود در ناحیه 530 تا 870 بازی ملاحظه شد و در مجموع با توجه به پرایمرهای به کار گرفته شده 107 مورد کاندیدا آلبیکنس با باند با اندازه 533 جفت باز و 18 مورد کاندیداگلابراتا با باند با اندازه 874 جفت باز و 2 مورد کاندیدا تروپیکالیس با باند با اندازه 521 جفت باز ایجاد نمودند و به این ترتیب از هم تفکیک گردیدند (تصویر2 و جدول 1)

Archive of SID

www.SID.ir

تصویر 2. PCR و الکتروفورز نمونه‌های ولووواژینیتی استان قزوین برای جداسازی گونه‌های کاندیدایی:1) گلابراتا 2)تروپیکالیس 3)آلبیکنسM) سایز مارکر

در انتها در انطباق روش مولکولی جدید با روش کشت(فنوتایپی) مشخص گردید که از 150 نمونه آنالیز شده با دو روش کشت یا جداسازی فنوتایپی(به عنوان روش متداول) و روش PCR(به عنوان روش مولکولی طراحی شده)، تعداد 87 نمونه با هر دو روش مطابقت مثبت داشته و تعداد 41 نمونه در روش PCR مثبت و در روش کشت منفی و تعداد 22 نمونه نیز در هر دو روش منفی بودند و هیچ موردی از کشت مثبت ولی PCR منفی به دست نیامد(جدول 2).

جدول 2. تطابق دو روش کشت و مولکولی معرفی شده در شناسایی کلی کاندیداها در نمونه‌های ولووواژینیتی

تطابق دو روش	مولکولی مثبت و کشت مثبت	مولکولی مثبت ولی کشت منفی	مولکولی منفی و کشت منفی	مولکولی منفی ولی کشت مثبت	جمع کل
تعداد	87	41	22	0	150

بحث

جهت تسهیل و کاهش زمان شناسایی، در این مطالعه با حذف مرحله کشت نمونه‌ها، روش جدید و کاملا ساده‌ای برای تشخیص کاندیداهای مولد ولوو واژینیت تا سر حد شناسایی گونه آنها معرفی شد و با روش متداول کشت و یافته‌های فنوتایپی مربوطه مقایسه گردید.

در این مطالعه متوسط سن شیوع ولوو واژینیت کاندیدایی (نمونه‌های مثبت) برابر 10/5±32 سال می‌باشد که با برخی مطالعات داخل کشور انطباق دارد (4، 11).

شایع‌ترین گونه کاندیدایی جدا شده در این مطالعه و در هر دو روش کشت و مولکولی آلبیکنس بوده که از منظر اپیدمیولوژی در اکثر مطالعات نیز چنین است. اما دومین گونه شایع در این مطالعه کاندیدا گلابراتا بوده که این وفور با برخی تحقیقات مطابقت دارد که در مجموع حکایت از افزایش سویه‌های دارای پتانسیل عود مجدد و نیز خطر افزایش مقاومت به داروهای کتوکونازول و فلوکونازول را دارد. درمطالعات سوبل و پاولیک و فیلد نیز شیوع این گونه کاندیدا را در ولووواژینیت گزارش کرده‌اند(12-14). در آخرین و تنها مطالعه میریان و همکاران در استان قزوین نیز شیوع عوامل کاندیدایی ولوو واژینیت و نسبت سویه‌های آلبیکنس به نان آلبیکنس(از جمله گلابراتا) در همین محدوده‌ها قرار دارند (4). در تحقیق جاری هیچ موردی از گونه کاندیدا دابلینسیس در هر دو روش جدا نشد که می‌توانست یا ناشی از ناتوانی این روش مولکولی و نوع پرایمرهای به کار گرفته شده برای PCR باشد و یا هم‌چنین ناشی از این واقعیت باشد که حتی از روی رنگ کلنی در محیط کروم آگار نیز نمی‌توان در روش‌های فنوتایپی دو گونه آلبیکنس و دابلینسیس را از یکدیگر باز شناخت و بایستی از روش دیگری برای افتراق آنها سود جست (11). به این جهت در ادامه این تحقیق و در یک بررسی جدا (منتشر نشده) بر روی 72 نمونه کاندیدا آلبیکنس جدا شده در روش کشت، متد مقاومت به حرارت 45 درجه اعمال و استفاده شد(11) که البته با رشد همه این ایزوله‌ها که موید کاندیدا آلبیکنس است هیچ موردی از گونه کاندیدا دابلینسیس در میان آنها به دست نیامد. البته به هر حال روش مولکولی معرفی شده در این تحقیق نیز نمی‌تواند گونه دابلینسیس را از آلبیکنس جدا کند و به این منظور باید از روش‌های PCR و متعاقبا هضم با آنزیم‌های محدودگر بهره جست که در تحقیق میرهندی و همکاران

Archive of SID
www.SID.ir

نیزاین موضوع نشان داده شده است(8). عدم به کار گیری این تکنیک خود از محدودیت‌های مطالعه جاری می‌باشد.

روش متداول و استاندارد فعلی در تشخیص کاندیداها روش کشت می‌باشد(15). اما این روش نه تنها زمان بر بوده بلکه حساسیت آن نیز کمتر می‌باشد(2). بنابراین به طوری که ذکر شد استفاده از روش‌های مختلف مولکولی و PCR برای تشخیص کاندیداها اجتناب ناپذیر می‌باشد. اما تمام روش‌های مولکولی معرفی شده در تشخیص ولوو واژینیت هم خود مبتنی بر کشت آنها بوده که در نتیجه مزیت کم کردن زمان تشخیص آنها را زیر سوال می‌برد(16).

لذا مطالعه میرهندی و همکاران در انجام مستقیم PCR با برداشت ازخود کلنی به عنوان نمونه (template) جهت شناسایی کاندیداها در این راستا بوده است که خود اقدامی جالب برای کم کردن زمان و حذف یک مرحله سخت و وقت گیر در استخراج DNA و تهیه الگو بوده است (10). لیکن چنانچه مشهود است در این روش نیز مبادرت به کشت اولیه نمونه‌ها می‌شود که انتظار 48 تا 72 ساعته را برای ظهور کلنی‌های کاندیدایی داریم اما این تحقیق با هدف حذف مرحله کشت و استخراج مستقیم DNA از خود نمونه‌های ولوو واژینیتی و آنگاه انجام PCR که بسیار سریع‌تر و در حد چند ساعت است بر مشکل زمان طولانی تشخیص غلبه کرده است.

نظیر سایر مطالعات، روش مولکولی PCR معرفی شده توانست بر اساس سایز آمپلیکون ایجادی گونه‌های اصلی کاندیدایی یعنی آلبیکنس و گلابراتا و تروپیکالیس را از هم تفکیک و شناسایی کند (7، 8).

از میان روش‌های متعدد مولکولی معرفی شده در شناسایی گونه‌های مختلف کاندیدایی، به نظر می‌رسد روش PCR به کار گرفته شده در این طرح و استفاده از پرایمرهای یونیورسال کارایی بهتری داشته و ضمنا از اختلاف در سایز آمپلیکون تولیدی که از تفاوت گونه‌های کاندیدایی در فاصله و تعداد نوکلئوتیدهای حد فاصل نواحی مابین بخشی ITS از ژن 18S rDNA وتمام ژن 5.8 S rDNA و مابین بخشی ITS از ژن 28S rDNA که در سایر مطالعات نیز آمده است (17، 18) بهره می‌برد و می‌تواند آنها را تفکیک نماید.

نتیجه‌گیری

روش PCR معرفی شده با سرعت و به راحتی می‌تواند انواع کاندیداها و گونه‌های اصلی آنها را در نمونه‌های مشکوک ولوو واژینیتی شناسایی کند و این امر قابل تسری به سایر نمونه‌های کلینیکی در آزمایشگاه‌های تشخیصی خواهد بود. محققین این طرح روش ابداعی بسیار ساده‌تری را نیز در تشخیص ولوو واژینیت کاندیدایی طراحی کرده‌اند که در مقاله‌ای جداگانه عرضه خواهد شد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش از محل طرح تحقیقاتی با شماره 28/44/11027 معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و مساعدت مالی مربوطه صورت پذیرفته است. در تصویب این طرح به دلیل استفاده از نمونه‌هایی که صرفا به دلایل تشخیصی و درمانی در روند معمول اخذ می‌شوند، گرفتن موافقت کمیته اخلاق الزام نشده است. نویسندگان از زحمات کادر بهداشتی و درمانی دانشگاه به ویژه همکاری صمیمانه مامای محترم سرکار خانم سپیده حسینی در اخذ و در اختیار قرار دادن نمونه‌های مصرف شده پس از استفاده در تشخیص متداول ازآنها، تقدیر می‌نمایند.

منابع

1. Tietz HJ, Kussner A, Thanos M, De Andrade MP, Presber W, Schonian G. Phenotypic and genotypic characterization of unusual vaginal isolates of Candida albicans from Africa. Journal of clinical microbiology. 1995;33(9):2462-5.
2. Adin H, Shidfar M, Kordbacheh P, Hashemi S, Moazeni M, Hosseinpur L. [Identification of Pathogenic Candida Species: PCR-Fragment Size Polymorphism (PCR-FSP) Method]. TUMJ. 2008;66(9):639-45.

Archive of SID
www.SID.ir

3. Lau A, Halliday C, Chen SC, Playford EG, Stanley K, Sorrell TC. Comparison of whole blood, serum, and plasma for early detection of candidemia by multiplex-tandem PCR. Journal of clinical microbiology. 2010;48(3):811-6.
4. Aghamirian MR, Keshavarz D, Jahani Hashemi H, Sadeghi Qazvini M. [Agents associated with candida vulvovaginitis in women referred to health centers in Qazvin]. J Qazvin Uni Med. 2007;11(3):35-9.
5. Zafarghandi A, Zabihi A, Mirdamadi Y, Rahbarian N, Abbasabadi B, Shivaei M, et al. [Identification of Candida species associated with vulvovaginal candidiasis by Multiplex PCR method]. TUMJ. 2009;67(9):623-8.
6. Shokohi T, Hashemi Soteh MB, Saltanat Pouri Z, Hedayati MT, Mayahi S. Identification of Candida species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran. Indian journal of medical microbiology. 2010;28(2):147-51.
7. 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. Journal of clinical microbiology. 2001;39(10):3617-22.
8. Ghahri M, Mirhendi SH, Yadegari MH, Hajizadeh E, Shidfar MR. [Identification of pathogenic yeasts isolated from onychomycosis in Tehran, using polymerase chain reaction and enzymatic digestion]. Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology. 2010;13(1):79-91.
9. Moallaei H, Mirhendi SH, Brandao J, Mirdashti R, Rosado L. Comparison of Enzymatic Method Rapid Yeast Plus System with RFLP-PCR for Identification of Isolated Yeast from Vulvovaginal Candidiasis. Iranian journal of basic medical sciences. 2011;14(5):443-50.
10. Mirhendi H, Diba K, Rezaei A, Jalalizand N, Hosseinpur L, Khodadadi H. Colony PCR is a rapid and sensitive method for DNA amplification in yeasts. Iranian J Publ Health. 2007;36(1):40-4.
11. Jamilian M, Mashadi E, Sarmadi F, Banijamali M, Farhadi E, Ghanatpishe E. [Frequancy of vulvovaginal Candidiasis species in nonpregnant 15-50 years old women in spring 2005 in Arak]. AMUJ. 2007;10(2):7-14.
12. Sobel JD. Vulvovaginitis due to Candida glabrata. An emerging problem. Mycoses. 1998;41 Suppl 2:18-22.
13. Pawlik B, Liber Z, Warzynska R. [Diagnostic and clinical characteristics of mycotic vaginitis caused by Candida glabrata (Torulopsis glabrata)]. Med Dosw Mikrobiol. 1989;41(3-4):206-14.
14. Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD. Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison toC. albicans. Clin Microbiol Rev. 1999;12(1):80-96.
15. Akbarzadeh M, Bonyadpoure B, Pacshir K, Mohagheghzadeh A. [Causes and clinical symptoms of vaginal candidiasis in patients referring to selective clinics of Shiraz University of Medical Sciences (2009)]. AMUJ. 2010;13(3):12-20.
16. Santos MS, Souza ES, RM SJ, Talhari S, Souza JV. Identification of fungemia agents using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Brazilian journal of medical and biological research. 2010;43(8):712-6.
17. Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology. 2002;40(1):87-109.
18. Shah Hosseini MH, Ghahri M, Nematian Souteh M, Saadatmand S, Hosseini SA. [Identification of candida isolates from onychomycosis by mycological and molecular methods]. Journal Of Microbial Biotechnology. 2010;1(3):33-42

Archive of SID

www.SID.ir