View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـــگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۳, شماره‌ی ۹۸, مرداد و شهریور ۱۳۹٤, صفحات ۵۳ تا ٦۷

Downloaded from zums.ac.ir at 12:48 IRDT on Saturday July 29th 2017

شناسایی گونه‌های کاندیدا در بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی و ارتباط آن با علایم بالینی متفاوت

بهمن فولادی[۱]، دکتر محمد حسین یادگاری[۲]، دکتر معصومه رجبی بذل[۳]، دکتر اصغر فضائلی[۴]، دکتر مرتضی هاشم‌زاده چالشتری[۵]

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده‌ی علوم پزشکی، گروه قارچ شناسی yadegarm@modares.ac.ir

دریافت: ۹۳/۴/۱۴ پذیرش: ۹۳/۷/۵

چکیده

زمینه و هدف: *عفونت‌های کاندیدایی از مهمترین و شایع‌ترین عوامل ولوواژینیت در زنان است. با توجه به تفاوت‌های اشکال بالینی کاندیدیازیس و احتمال ارتباط گونه‌های مختلف کاندیدا، این مطالعه به‌منظور شناسایی دقیق گونه‌های کاندیدای جدا شده از بیماران با استفاده از روش‌های کشت و آنالیز مولکولی طراحی گردید.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی تحلیلی ۳۵۰ بیمار مشکوک به ولوواژینیت با علائم بالینی متفاوت مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های واژینال تهیه و پس از مشاهده مستقیم در پتاس ۱۰درصد و کشت اختصاصی در محیط‌های SDA، کروم آگار و کورن میل آگار، تست جرم تیوب و همچنین آزمون PCR-RFLP بر روی قطعه ITS1-5S-ITS2 گونه‌های کاندیدا شناسایی شدند.*

یافته‌ها: *از ۳۵۰ نمونه کشت داده شده تعداد ۱٦۵ مورد (٤۷/۱٤ درصد) از نظر کاندیدا، شامل ۷۱/۵ درصد کاندیدیازیس عود کننده و ۲۸/۵ درصد فرم حاد، مثبت بود. شش گونه کاندیدا در نمونه‌ها شناسایی شد که عبارتند از: کاندیدا آلبیکنس ۶۰/۶ درصد، کاندیدا دابلینینسیس ۳/۶ درصد، کاندیدا گلابراتا ۲۳ درصد، کاندیدا کروزئی ۱۰/۹ درصد، کاندیدا پاراپسیلوزیس ۰/۶ درصد و کاندیدا تروپیکالیس ۱/۲ درصد در ۱۰۰ بیمار مبتلا به کاندیدا آلبیکنس، ۴۴ درصد شکل شدید و ۵۶ درصد شکل خفیف تا متوسط بیماری و در گروه غیر کاندیدا آلبیکنس ۶۱/۵ درصد شکل شدید و ۳۸/۵ درصد شکل خفیف تا متوسط و دارای اختلاف معنیدار با گروه قبلی بود (P=۰/۰۲۸). رابطه معنی‌داری بین برخی عوامل مستعد کننده (دیابت و مصرف آنتی‌بیوتیک) و ابتلا به عفونت وجود داشت (P<۰/۰۰۰۱).*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه شیوع بالایی از عفونت کاندیدایی در زنان مبتلا به ولوواژینیت در جنوب شرق ایران را نشان داد. گونه‌های مختلف کاندیدا شناسایی شدند که کاندیدا آلبیکنس و سپس کاندیدا گلابراتا به عنوان شایع‌ترین عوامل بودند. با توجه به افزایش شیوع گونه‌های غیر آلبیکنس بهتر است با استفاده از روش‌های اختصاصی بالاخص روش‌های مولکولی، تشخیص دقیق و شناسایی گونه‌های مسوول بیماری عملی گردد.*

واژگان کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، کاندیدیازیس غیرآلبیکنس، ولوواژینیت، PCR-RFLP

۱- دانشجوی دکترای گروه قارچ شناسی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲- دکترای تخصصی قارچ شناسی، دانشیار گروه قارچ شناسی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۳- دکترای تخصصی بیوشیمی، استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴- دکترای تخصصی انگل شناسی، دانشیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۵- دکترای تخصصی ژنتیک، استاد گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

Downloaded from zums.ac.ir at 12:48 IRDT on Saturday July 29th 2017

مقدمه

کاندیدیازیس یک عفونت اولیه یا ثانویه‌ای است که توسط گونه‌های جنس کاندیدا خصوصاً کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) ایجاد می‌شود. سیر بالینی بیماری به اشکال حاد، تحت حاد و مزمن بوده و عفونت ممکن است در دهان، گلو، پوست، واژن، ناخن و سایر قسمت‌ها و یا به‌صورت سیستمیک همراه با سپتی سمی، اندوکاردیت و منتژیت مشاهده شود (۱). واژینیت کاندیدایی از شایع ترین بیماری های قارچی است که بیشتر در زنان باردار گزارش شده و ممکن است در نوزادان به خصوص با وزن کم در هنگام تولد و در نوزادان بعد از زایمان باعث عفونت سیستمیک شود (۳و۲). واژینیت یک بیماری متداول ناحیه‌ی ژنیتال است که هر ساله حدود ده میلیون از مراجعین پزشکی را به خود اختصاص می‌دهد. شایع‌ترین عوامل ایجاد کننده‌ی واژینیت، عوامل باکتریال و از بین قارچ‌ها *کاندیدا آلبیکنس* است (۵و ۴). این قارچ مهم‌ترین عامل ایجاد ولوواژینیت با عوارض و بدون عوارض می‌باشد (۶) که در حال حاضر به صورت پاندمی در آمده و از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی و درمانی در دنیا از جمله در شهرها و روستاهای کشور ما به حساب می‌آید. باتوجه به داده‌های آماری درکشور انگلستان در دهه‌ی اخیرافزایش شدیدی در میزان بروز ولوواژینیت کاندیدایی دیده می‌شود(۲). در کشور آمریکا، کاندیدا دومین عامل شایع عفونت‌های واژن می‌باشد؛ ۷۵ درصد زنان حداقل یکبار مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی شده‌اند و تقریبا ۴۰ تا۵۰ درصد آنان دومین تجربه ی این عفونت را طی سال‌های باروریشان داشته‌اند،گروه کوچکی از این مجموعه (حدود ۵ درصد) نیزگرفتار عودهای مکرر واژینیت کاندیدایی بوده‌اند و تخمین زده می‌شود که ۱۰ تا ۲۰ درصد از آن‌ها مبتلا به بیماری ولوواژینیت حاد با علایم وعوارض باشند (۷). کاندیدا وکاندیدیازیس طیف وسیعی از بیماری‌ها را ایجاد می‌کند و نیز میزان بالای کشندگی عفونت‌های تهاجمی و سیتمیک ناشی از آن، حایز اهمیت است؛ از طرفی با توجه به سیرفزاینده‌ی جمعیت بیماران در معرض خطر برای انواع بیماری‌های قارچی از جمله کاندیدیازیس این عفونت مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. شایع‌ترین مخمرهای جدا شده از واژن در درجه اول *کاندیدا آلبیکنس* و پس ازآن *کاندیدا گلابراتا* می‌باشد (۸و ۶).

سایر گونه‌های مخمری مانند *کاندیدا کروزه‌ای* (*C krusei*)، *کاندیدا فماتا* (*C.famata*) و *کاندیدا استلاتوئیده* (*C.stellatoeidea*) از شیوع کمتری برخوردارند. بیش از دویست سویه از کاندیدا آلبیکنس شناسایی شده که تمامی سویه‌ها توانایی کلونیزاسیون را دارا بوده و می‌توانند باعث واژینیت شوند. ۲۵ تا۴۰ درصد از زنانی که دارای کشت مثبت کاندیدا از نمونه‌ی واژینال هستند جزو ناقلان محسوب می‌شوند (۸و ۶). از طرفی گونه‌های کاندیدا رتبه‌ی چهارم را در بین عفونت‌های گزارش شده‌ی بیمارستانی دارا هستند و ۱۰/۲ درصد همه‌ی سپتی سمی‌ها و ۲۵ درصد عفونت‌های مجرای ادراری را در بخش‌های مراقبت ویژه به خود اختصاص می‌دهند (۱۰و۹). عوامل متعدد ژنتیکی، بیولوژیکی و رفتاری در روند افزایش کلونیزاسیون کاندیدا و عود مکرر بیماری تاثیر بسزایی دارند؛ از جمله‌ی این عوامل می‌توان به مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، حاملگی، مصرف قرص‌های ضد بارداری حاوی استروژن زیاد و دیابت ملیتوس کنترل نشده اشاره کرد (۱۱). اکثر عفونت‌های کاندیدیایی توسط *کاندیدا آلبیکنس* ایجاد می‌شود که قوی‌ترین گونه‌ی کاندیدیایی مهم پزشکی محسوب می‌شود (۷). اخیرا *کاندیدا دابلینینسیس* (*C. dubliniensis*) به‌عنوان قوی‌ترین گونه‌ی جدید معرفی شده است که از نظر مورفولوژی و فیزیولوژی بسیار شبیه *کاندیدا آلبیکنس* است و در اغلب موارد به عنوان *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول تشخیص داده می‌شود.

Downloaded from zums.ac.ir at 12:48 IRDT on Saturday July 29th 2017

خوشبختانه تکنیک‌های مولکولی، افتراق صحیح *کاندیدا آلبیکنس* را از این گونه ممکن می‌سازد، بنابراین شناسایی صحیح گونه‌ها به‌منظور درمان ضد قارچی موثر با توجه به‌آگاهی از مقاومت به داروهای ضد قارچی ضروری است (۸). روش‌های مختلفی جهت شناسایی *کاندیدا آلبیکنس* و افتراق آن از سایر گونه‌ها بر اساس خصوصیات فنوتایپی و ژنوتیپی و اختلاف در ترادف قطعات خاصی از DNA استفاده شده است (۱۲).

چندین روش بر پایه‌ی DNA همچون کاریو تایپینگ، ردیابی توالی خاص با استفاده از پروب، انگشت نگاری، آنالیز پلی‌مورفیسم قطعه‌ی محدود شونده و تکثیر ناحیه‌ی خاص از DNA به وسیله‌ی روش PCR در گذشته در جهت شناخت گونه‌های کاندیدا در نمونه‌های کلینیکی استفاده شده است (۱۴و۱۳). تکنیک‌های مولکولی تکثیر DNA با هدف ارایه روش سریع و دقیق جهت تشخیص با استفاده از هضم آنزیم MspI در ناحیه‌ی مورد نظر استفاده می‌شود در نتیجه این آنزیم به عنوان یک ابزار مناسب و با ارزش در تشخیص مولکولی گونه‌های کاندیدا در بیماران مبتلا به کاندیدیازیس به شمار می‌رود (۱۵). سکانس متغیر ناحیه ITS2 قارچ و شناسایی ژن‌های rRNA در تعیین هویت پاتوژنیک و تشخیص صحیح و سریع ایزوله‌های کلینیکی قارچی استفاده می‌شود (۱۶). با توجه به ضرورت درمان صحیح و اختصاصی عفونت‌های کاندیدایی و از آنجایی که در اثر درمان ناقص امکان تغییرات فنوتیپی و ژنوتیپی زیادی وجود دارد بنابراین شناخت توزیع گونه‌های کاندیدا در اشکال بالینی متفاوت بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱۷). به‌دلیل اینکه واژینیت کاندیدایی با ترشحات غلیظ و دلمه‌ای شکل سفید و دیگر علایم بالینی مختلف همراه است و بررسی میکروسکوپی ترشحات، وجود هایف و مخمر در حال جوانه زدن را تا حدود ۵ درصد نشان می‌دهد و از طرفی کشت مثبت واژن هم باید همراه با علایم و نشانه‌های بیماری باشد (۱۸)، لذا وجود علایم ولوواژینیت همیشه دال بر اتیولوژی مشخصی از بیماری نیست و استفاده از روش‌های دقیق‌تر مولکولی جهت جداسازی و شناسایی دقیق گونه‌ها را می‌طلبد. لذا، این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی و تعیین دقیق گونه‌های کاندیدای جدا شده از بیماران مبتلا به ولوواژینیت با علایم بالینی متفاوت مراجعه کننده به مراکز درمانی شهر زاهدان با استفاده از روش PCR-RFLP به عنوان یک روش کامل، ویژه، حساس و قابل اعتماد طراحی و اجرا گردید.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه: در این مطالعه‌ی توصیفی تحلیلی، نمونه‌گیری به صورت مقطعی (Cross sectional) و به‌روش غیرتصادفی (Non-probability) از ۳۵۰ زن مشکوک به بیماری ولواژینیت دارای علایمی چون خارش، سوزش، قرمزی، ترشحات پنیری شکل و مشکوک به کاندیدیازیس واژینال که طی یک دوره‌ی ده ماهه از اسفند ۱۳۹۱ تا آبان ۱۳۹۲ به مراکز تخصصی زنان و زایمان شهر زاهدان مراجعه کرده بودند صورت گرفت.

بیماران توسط پزشک متخصص زنان شناسایی و با توجه علایم بالینی متفاوت، بر اساس معیارهای بالینی دسته بندی شدند و با استفاده از پرسشنامه، اطلاعات و مشاهدات بالینی و درجه‌بندی بیماران (به اشکال خفیف، متوسط و شدید) و نیز مشخصات دموگرافیک آنان مانند: سن، جنس، سابقه‌ی بیماری ولواژینیت، بیماری‌های زمینه‌ای، مصرف آنتی‌بیوتیک، داروهای ایمنوساپرسیو، سابقه‌ی عود بیماری و دیابت گردآوری شد. پس از ثبت اطلاعات بیمار، نمونه‌ی واژینال توسط پزشک متخصص همکار تهیه شد و هر نمونه در یک لوله فالکون استریل حاوی ۱ تا ۲ سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل اضافه گردید. از هر کدام از نمونه‌ها در مرحله‌ی اول گسترش مستقیم با KOH ۱۰ درصد تهیه و در زیر

Downloaded from zums.ac.ir at 12:48 IRDT on Saturday July 29th 2017

میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی آزمون‌های فنوتیپی مقداری از نمونه سواپ که از ترشحات واژینال بیمار گرفته شده بود بر روی محیط سابورو دکستروز آگار به‌همراه کلرامفنیکل منتقل و به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شد. پس از رشد کلنی مخمری در این محیط، نمونه‌ها برروی محیط کروم آگار از شرکت Chorom agar (پاریس، فرانسه) پاساژ داده شد و سپس در محیط کورن میل آگارمحتوی توئین ۸۰ از شرگت دیفکو کشت داده شد (Difco Laboratories Detroit, Mich, USA). همچنین تست جرم تیوب در سرم انسان روی تمام نمونه‌ها انجام شد. (در تمامی مراحل انجام کار از *کاندیدا آلبیکنس* سوش ATCC10231 به‌عنوان استاندارد استفاده شد).

استخراج DNA: پس از انجام تست‌های فنوتیپیک بر روی گونه‌های به‌دست آمده جنس کاندیدا، جداسازی DNA از نمونه‌ها با استفاده از پروتکل موجود انجام شد (۱۶). ابتدا ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده، ۳۰۰ میکرولیتر فنل کلروفرم و برابر ۳۰۰ میکرولیترگوی شیشه‌ای به لوله‌ی اپندورف همراه با یک کلنی تازه از محیط کشت اضافه و به مدت ۵ دقیقه به شدت تکان داده شد. لوله‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد و پس از آن لایه‌ی رویی به لوله‌ی اپندورف تمیز دیگر انتقال داده شد و ۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد و پس از تکان شدید دوباره به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. لایه‌ی رویی و شفاف حاوی DNA برداشت و به لوله‌ی دیگر منتقل گردید و مقدار ۳۰۰ میکرولیتر ۲-پروپانول به آن اضافه و خوب مخلوط شد. سپس مقدار ۲۵ میکرولیتر استات سدیم ۳ مولار به آن افزوده و مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد جهت رسوب DAN قرار داده شد و پس از آن ۱۲ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. DNA به صورت یک کلاف در ته لوله باقی ماند، سپس مایع رویی را خالی کرده و به آرامی ۳۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درجه اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. تمامی الکل خارج گردید و سپس درب لوله به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه باز ماند تا باقیمانده‌ی الکل تبخیر شود و پس از آن ۵۰ میکرولیتر آب مقطر یا بافر تریس EDTA به آن اضافه و چند ثانیه ورتکس و میکروفیوژ شد و تا زمان انجام PCR لوله‌های حاوی DNA در یخچال نگهداری شد.

انجام PCR-RFLP: ابتدا با استفاده از روش PCR، قطعه ITS1-5.8S–ITS2 موجود در قطعه‌ی ژنی rDNA تکثیر گردید که برای این منظور از پرایمرهای یونیورسال زیر استفاده شد (۱۴):

ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و
ITS4(5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

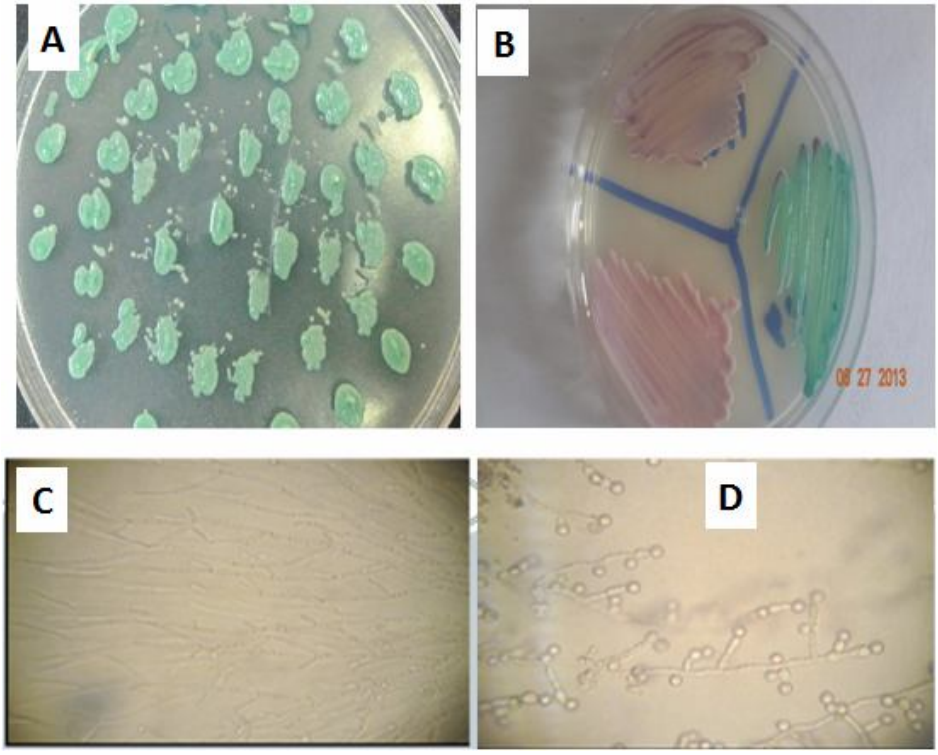
محتوای هر واکنش شامل پرایمرها به غلظت ۰/۴ میکرومول (از هر کدام ۱ میکرولیتر)، بافر PCR، ۱/۵میلی مولار، کلرور منیزیم، ۴۰۰ میکرومولار مخلوط dNTPs، ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq پلیمراز، یک میکرولیتر DNA استخراج شده از مخمرها و آب مقطر تا رساندن به حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش بود که طبق برنامه‌ی حرارتی و در سیکل معین شده در دستگاه ترمال سایکلر مدل Corbett research قطعه‌ی مورد نظر تکثیر و محصول PCR الکتروفورز شد. جهت بررسی پلی‌مورفیسم با استفاده از آنزیم برش دهنده (RFLP) محصول به دست آمده با ۱/۵میکرولیتر بافرآنزیم و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم MspI (شرکت فرمنتاس، لیتوانی) که قطعات تکثیر شده را در ناحیه‌ی CCGG برش می‌دهد و ۳ میکرولیتر آب مقطر مخلوط و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد ۲ ساعت نگهداری شد. در مرحله‌ی بعد، با الکتروفورز نمودن محصول هضم شده در ژل آگارز و مشاهده‌ی قطعات DNA در زیر اشعه‌ی UV و آنالیز الگوهای مختلف RFLP، گونه‌های مختلف کاندیدا شناسایی شدند. به دلیل اختلاف توالی ناچیز (۲ یا ۳ نوکلئوتید) در ناحیه‌ی ژن 5.8S بین دوگونه‌ی *کاندیدا آلبینس* و *کاندیدا دابلینینسیس*، جهت افتراق این دو گونه از یکدیگر، از آنزیم

Downloaded from zums.ac.ir at 12:48 IRDT on Saturday July 29th 2017

MboI نیز استفاده شد. محصولات PCR مربوط به سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس* که با آنزیم MspI تایید شده بود به کمک آنزیم MboI جهت تایید نهایی مورد هضم آنزیمی قرارگرفت.

یافته‌ها

میانگین سنی افرادی که در این مطالعه شرکت داشتند ۳۰/۹۱ و انحراف معیار ۹/۰۵ با حداقل ۱۷ و حداکثر ۶۵ سال بود. ۸۹ درصد از آن‌ها خانه‌دار و ۱۱ درصد کارمند بودند. از لحاظ تحصیلات، ۱۲ درصد بیسواد، ۲۹ درصد دارای سواد ابتدایی، ۱۷ درصد راهنمایی، ۲۲ درصد دبیرستانی بودند و ۲۰ درصد تحصیلات دانشگاهی داشتند. در آزمایشات فنوتایپی با بررسی نمونه‌های سواپ که از ترشحات واژینال بیمار بر روی محیط سابورو دکستروز آگار (محیط S) به همراه کلرامفنیکل به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شده بود، در نهایت ۱۶۵ مورد از نظر عفونت کاندیدایی مثبت شد.

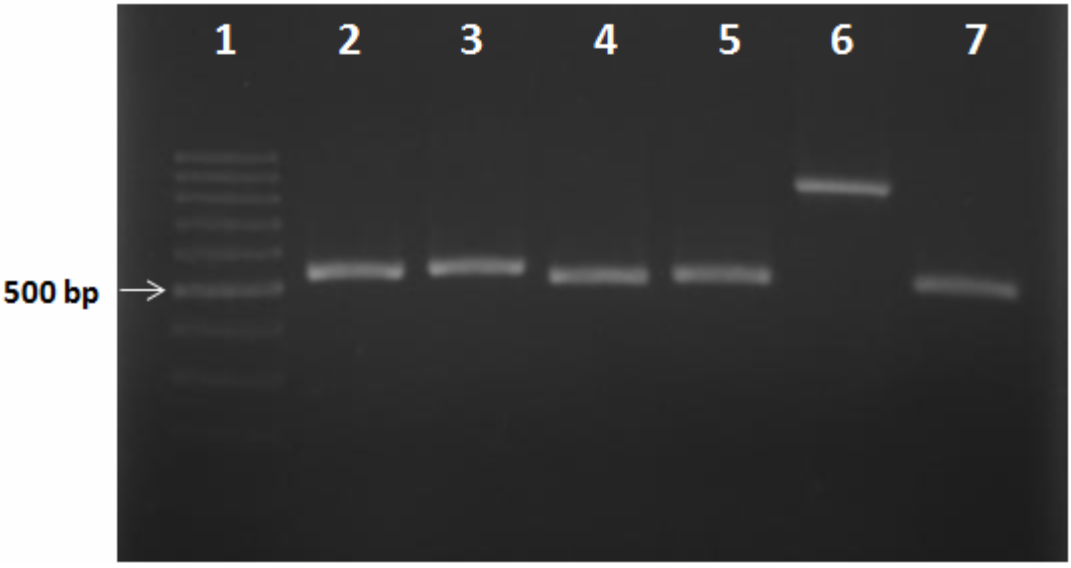


شکل ۱: تصویر نمونه‌ای از کشت ایزوله‌های کاندیدا بر روی محیط کروم آگار (پانل A و B) و محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰ (پانل C و D). A: نمونه کنترل استاندارد گونه‌ی کاندیدا آلبیکنس B: ایزوله ی کاندیدا آلبیکنس یا کاندیدا دابلینینسیس به رنگ سبز، ایزوله کاندیدا گلابراتا به رنگ صورتی پر رنگ و کاندیدا پاراپسیلوزیس صورتی کم رنگ. C: عدم ایجاد کلامیدوسپور توسط کاندیدا کروزئی D: ایجاد کلامیدوسپور توسط گونه کاندیدا آلبیکنس.

تمامی ۱۶۵ ایزوله‌ی بالینی جدا شده از محیط S در ادامه و تکمیل روش‌های فنوتایپی در محیط کروم آگار کشت داده شد و بر اساس رنگ ویژه کلنی، در محیط کروم آگار به صورت اولیه شناسایی شدند. به همراه ایزوله‌های بالینی

Downloaded from zums.ac.ir at 12:48 IRDT on Saturday July 29th 2017

نمونه‌ی کنترل استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* نیز بر روی محیط کروم آگار کشت داده شد که کلنی‌هایی به رنگ سبز روشن ایجاد می‌کند (شکل ۱، پانل A). ۱۰۶ ایزوله (۶۴/۲ درصد) از ۱۶۵ ایزوله‌ی جدا شده رنگ سبز روشن (*کاندیدا آلبیکنس* و یا *کاندیدا دابلینینسیس*)، ۳۴ ایزوله (۲۰/۶ درصد) رنگ صورتی پر رنگ (*کاندیدا گلابراتا*)، ۲۱ ایزوله (۱۲/۷ درصد) رنگ صورتی با پرگنه پرزی (*کاندیدا کروزی*)، ۴ ایزوله (۲/۴ درصد) کلنی صورتی کمرنگ (*کاندیدا پاراپسیلوزیس*) ایجاد کردند (شکل ۱، پانل B). نتایج کشت بر روی محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰ که از روش‌های اولیه‌ی تفکیک انواع گونه‌های مخمری از یکدیگر است نشان داد که در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت از ۱۶۵ ایزوله، ۱۰۵ ایزوله (۶۳/۶ درصد) قادر به ایجاد کلامیدوسپور در این محیط شدند که نشان دهنده‌ی *کاندیدا آلبیکنس* بود. در ضمن از *کاندیدا کروزی* نیز در اینجا به عنوان کنترل منفی استفاده شد (شکل ۱، پانل C و D). نتایج آزمایش تولید لوله‌ی زایا (جرم تیوب) بر روی ۱۶۵ ایزوله‌ی جدا شده از محیط S نشان داد که در ۱۰۶ ایزوله ایجاد لوله‌ی زایا مثبت و در ۵۹ ایزوله‌ی باقی مانده، این تست منفی بود. انجام PCR در نمونه‌های مثبت منجر به تولید قطعه‌ی مورد نظر مربوط به ناحیه‌ی ITS1-5.8S-ITS2 گردید (شکل ۲).



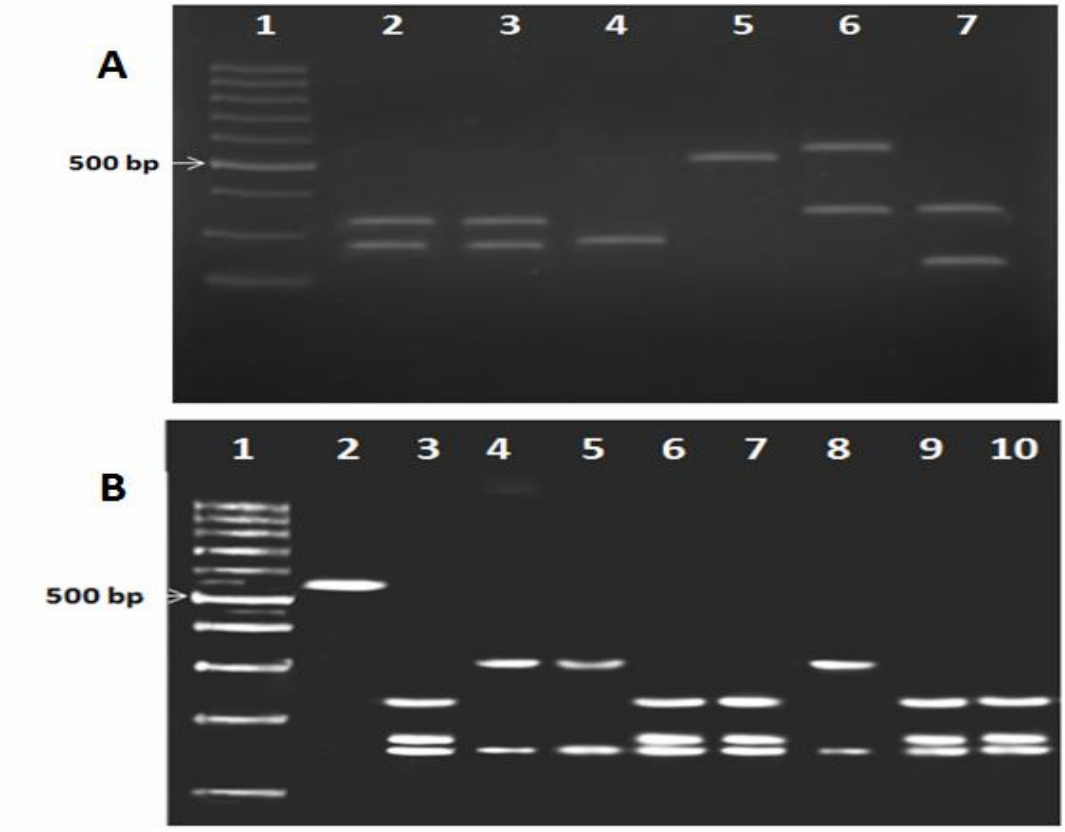
شکل ۲: نتایج الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگاروز گونه‌های کاندیدا حاصل از کشت نمونه‌های به‌دست آمده از زنان مبتلا به ولوواژینیت مراجعه کننده به مراکز درمانی زاهدان، نمونه‌های الکترفورز به ترتیب عبارتند از:

1: DNA Ladder 100 bp (Fermentas); 2: Candida albicans; 3: C. dubliniensis; 4: C. krusei; 5:C. parapsilosis; 6:C. glabrata; 7: C. Tropicalis

براساس مطالعات قبلی اندازه‌ی قطعه مورد نظر حاصل از PCR در گونه‌های مختلف عبارتند از: *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا دابلینینسیس* در حدود ۵۳۵bp، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* ۵۲۰bp، *کاندیدا تروپیکالیس* ۵۲۴bp، *کاندیدا کروزی* ۵۱۰bp و *کاندیدا گلابراتا* ۸۷۱bp (۱۴). لذا، نتایج PCR با اندازه‌های مورد انتظار هماهنگی دارد. نتایج مربوط به PCR-RFLP نشان دادکه اندازه‌ی قطعات پس از هضم آنزیمی توسط آنزیم MspI در این سویه‌ها تقریبا بالای

Downloaded from zums.ac.ir at 12:48 IRDT on Saturday July 29th 2017

۲۰۰bp تا حدود ۶۰۰bp بود. عملکرد آنزیم MspI بر روی محصولات PCR در تمامی نمونه‌های مربوط به گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا دابلینینسیس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* منجر به تولید دو باند مشخص شد اما در مورد *کاندیدا پاراپسیلوزیس* اندازه‌ی قطعه‌ی حاصل از PCR و قطعه پس از هضم آنزیمی یکسان بود که موید عدم وجود سایت آنزیمی MspI در DNA هدف مربوط به این گونه است. در خصوص *کاندیدا کروزی* به دلیل اینکه اندازه‌ی دو باند ایجاد شده پس از هضم آنزیمی تفاوت بسیار جزیی دارد در ژل به صورت یک باند دیده می‌شود. در نتیجه از مجموع ۱۶۵ نمونه کاندیدای جدا شده از محیط S که در این مرحله مورد آزمون PCR و هضم آنزیمی توسط MspI قرارگرفت تعداد ۱۰۶ ایزوله (۶۴/۲ درصد) *کاندیدا آلبیکنس* و یا *کاندیدا دابلینینسیس* و ۵۹ ایزوله (۳۵/۷ درصد) غیر از *کاندیدا آلبیکنس* تشخیص داده شدکه از این تعداد ۳۸ ایزوله (۲۳ درصد) مربوط به *کاندیدا گلابراتا*، ۱۸ ایزوله (۱۰/۹ درصد) *کاندیدا کروزی*، ۱ ایزوله (۰/۶ درصد) *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و ۲ ایزوله (۱/۲ درصد) *کاندیدا تروپیکالیس* تشخیص داده شد. نمونه‌ای از الگوهای هضم آنزیمی گونه‌های فوق در شکل ۳ (پانل A) آمده است. اندازه‌ی باند PCR براساس مطالعات گذشته برای *کاندیدا گلابراتا* (ستون ۶) حدود ۸۷۰ باز و برای سایر گونه‌های فوق بین ۵۱۰ تا ۵۳۵ باز می‌باشد (۱۴). در ادامه تمامی ایزوله‌هایی که در محیط کروم آگار و همچنین به‌وسیله‌ی آزمون مولکولی PCR-RFLP به عنوان *کاندیدا آلبیکنس* شناسایی و تایید گردید، مورد آزمایش مجدد PCR-RFLP باآنزیم MboI قرار گرفت. این آنزیم قادر به افتراق دوگونه‌ی *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا دابلینینسیس* می‌باشد (شکل ۳ پانل B).



شکل ۳: نمونه‌ای از نتایج الکتروفورز DNA رایبوزومی بعد از هضم آنزیمی گونه‌های کاندیدا جدا شده از کشت

Downloaded from zums.ac.ir at 12:48 IRDT on Saturday July 29th 2017

پانل A: نتیجه‌ی هضم با آنزیم MspI برای افتراق گونه‌های مختلف کاندیدا: 1: 100 bp DNA ladder (*Fermentas*); 2: *Candida albicans*; 3: *C. dubliniensis*; 4:*C. krusei*; 5: *C. tropicalis*. 6: *C. glabrata*; 7: *C. parapsilosis*.

پانل B: نتیجه‌ی هضم با آنزیم MboI جهت افتراق *کاندیدا آلبیکنس* از *کاندیدا دابلینینسیس*: 1: DNA Ladder; 2: PCR Product (uncut); 3: Standard *C. albicans* strain ATCC(10231); 4,5 and 8: *C. dubliniensis* isolates; 6,7,9 and 10: *C. albicance* isolates.

با آزمایش PCR-RFLP و استفاده از آنزیم **MboI** بر روی ۱۰۶ ایزوله جهت افتراق *کاندیدا آلبیکنس* از *کاندیدا دابلینینسیس*، تعداد ۱۰۰ ایزوله (۶۰/۶ درصد از کل ۱۶۵ نمونه مثبت) به‌عنوان *کاندیدا آلبیکنس* و تعداد ۶ ایزوله (۳/۶ درصد) به‌عنوان *کاندیدا دابلینینسیس* شناخته شد.

از ۱۶۵ نفر بیمار مبتلا به واژینیت کاندیدایی، ۱۱۸ نفر (۷۱/۵ درصد) مبتلا به فرم کاندیدیازیس عود کننده و ۴۷ نفر (۲۸/۵ درصد) آن‌ها مبتلا به فرم حاد بیماری بودند (جدول ۱). میانگین سن در مبتلایان به کاندیدیازیس عود کننده، ۳۲ سال با انحراف معیار ۱۰/۰۱ بود و میانگین سن در مبتلایان به فرم حاد، ۳۱ سال با انحراف معیار ۹/۷۷ بود. طبق اطلاعات به دست آمده (جدول ۱) و بر اساس آزمون کای دو، رابطه‌ی معنی‌داری بین شیوع عفونت در مرحله‌ی حاد و مرحله‌ی عود بیماری با گونه‌ی *کاندیدا آلبیکنس* وگونه‌های غیر از *کاندیدا آلبیکنس* وجود نداشت (P=۰/۶).

جدول ۱: توزیع بیماران مبتلا به ولوواژینیت عود کننده و فرم حاد بر حسب نوع کاندیدا (کاندیدا آلبیکنس و غیر کاندیدا آلبیکنس) جدا شده از ترشحات واژینال

فرم بیماری / نوع ایزوله	فرم عود کننده	فرم حاد	جمع
گونه‌ی آلبیکنس	۷۳ (%۷۳)	۲۷ (%۲۷)	۱۰۰ (%۱۰۰)*
گونه‌ی غیر آلبیکنس	۴۵ (%۶۹/۲)	۲۰ (%۳۰/۸)	۶۵ (%۱۰۰)
جمع	۱۱۸ (%۷۱/۵)	۴۷ (%۲۸/۵)	۱۰۰ (%۱۰۰)

x^2 = ۰/۲۷ df= ۱ P =۰/۶

* *اعداد به درصد بیان شده‌اند.*

از طرفی توزیع شکل بیماری در بیماران مبتلا به ولوواژینیت با عامل *کاندیدا آلبیکنس* نشان داد که در بیماران مبتلا به ولوواژینیت با عامل *کاندیدا آلبیکنس*، ۴۴ نفر (۴۴ درصد) مبتلا به شکل شدید بیماری و ۵۶ نفر (۵۶ درصد) شکل خفیف تا متوسط بیماری را نشان دادند و در گروه غیر از *کاندیدا آلبیکنس* از ۶۵ نفر، ۴۰ نفر (۶۱/۵ درصد) شکل شدید و ۲۵ نفر (۳۸/۵ درصد) شکل خفیف تا متوسط بیماری را نشان دادند. با استفاده از آزمون ناپارامتری کای اسکوئر، مقدار P=۰/۰۲۸ به دست آمد ($df = 1, x^2 = ۴/۸۴$) که نشان داد بین دو گروه وابستگی وجود دارد. بنابراین بر اساس آزمون کای اسکوئر، توزیع شکل بیماری در بیماران مبتلا در دو شکل شدید و خفیف تا متوسط بیماری با عامل *کاندیدا آلبیکنس* و غیر *کاندیدا آلبیکنس* اختلاف معنی‌داری را نشان داد. طبق اطلاعات حاصل از پرسشنامه، ۲۷ نفر (۱۶/۴ درصد)

Downloaded from zums.ac.ir at 12:48 IRDT on Saturday July 29th 2017

از بیماران حامله و ۲۰ نفر (۱۲/۲ درصد) مبتلا به دیابت، ۹۴ نفر (۵۷ درصد) دارای سابقه‌ی مصرف آنتی‌بیوتیک، ۳ نفر (۴/۹ درصد) سابقه‌ی بیماری‌های زمینه‌ای و بقیه‌ی بیماران فاقد فاکتور خطرساز بودند. توزیع عوامل مستعد کننده در مبتلایان به ولوواژینیت عود کننده و حاد در جدول ۲ آمده است. بر اساس نتایج این مطالعه، رابطه‌ی معنی‌داری بین مصرف آنتی‌بیوتیک، وجودحاملگی، دیابت و بیماری زمینه‌ای با ابتلا به عفونت وجود داشت و نتایج با حدود اطمینان ۹۵ درصد حاصل شد.

جدول ۲: توزیع بیماران مبتلا به واژینیت حاد و عودکننده بر حسب فاکتورهای مستعدکننده

فاکتور مستعد کننده	واژینیت عود کننده		واژینیت حاد	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
حاملگی	۲۱	۱۷/۷۹	٦	۱۲/۷٦
مصرف آنتی بیوتیک	۷۵	٦۳/۵۵	۱۹	٤۰/٤۲
دیابت	۱٦	۱۳/۵۵	٤	۸/۵۱
بیماری زمینه ای	۲	۱/٦۹	۱	۲/۱۲
هیچکدام	۵	٤/۲۳	۱۷	۳٦/۱۷
جمع	۱۱۸	۱۰۰	٤۷	۱۰۰
x^2= ۳۰/۲۲	df=۴	P =۰/۰۰۰۱		

بحث

ولوواژینیت کاندیدایی یک عفونت مخاطی فرصت طلب و شایع می‌باشد که یک سوم موارد واژینیت‌ها را شامل می‌شود. ۲۰ تا ۵۰ درصد زنان این ارگانیسم را به‌عنوان فلور در واژن خود دارند و ۷۵ درصد زنان حداقل یک بار به این عفونت مبتلا می‌شوند و ۴۵ درصد زنان یک بار یا بیشتر درگیر پیامدهای بالینی آن می‌شوند و کاندیدیازیس عود کننده در کسانی است که در طول یک سال گذشته چهار بار یا بیشتر به این عفونت مبتلا شوند (۱۹).

مطالعه‌ی حاضر با نمونه برداری از ۳۵۰ بیمار مشکوک به واژینیت کاندیدایی جهت شناسایی و جدا سازی گونه‌های کاندیدا انجام شد. در این مطالعه علاوه بر آزمون‌های مورفولوژیک و روش‌های فنوتیپی، از روش مولکولی PCR-RFLP برای تعیین دقیق هویت عوامل مخمری استفاده شد چراکه این تست‌ها بر خلاف روش‌های فنوتیپی کمتر تحت تاثیر عوامل محیطی بوده واز طرفی تکرار پذیری و قابلیت اعتماد بالاتری دارند. تست‌های فنوتیپی مورد استفاده در این مطالعه کشت در محیط سابورو دکستروز آگار، آزمون لوله‌ی زایا در سرم تازه‌ی انسان، کشت در محیط کروم آگار، کشت در محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰ بود. از ۳۵۰ بیمار مشکوک به واژینیت کاندیدایی، در مورد ۱۶۵ بیمار عامل کاندیدا در محیط سابورو دکستروزآگار جدا گردید. ۱۱۸ نفر (۷۱/۵ درصد) مبتلا به فرم کاندیدیازیس عود کننده و ۴۷ نفر (۲۸/۵ درصد) آن‌ها مبتلا به فرم حاد بیماری بودند. میانگین سن در مبتلایان به کاندیدیازیس عود کننده، ۳۲ سال با انحراف معیار ۱۰/۰۱ بود و میانگین سن در مبتلایان به فرم

Downloaded from zums.ac.ir at 12:48 IRDT on Saturday July 29th 2017

حاد ۳۱ سال، با انحراف معیار ۹/۷۷ بود. طبق اطلاعات به دست آمده و بر اساس آزمون کای دو، رابطه‌ی معنی‌داری بین شیوع عفونت در مرحله‌ی حاد و مرحله‌ی عود بیماری با گونه‌ی *کاندیدا آلبیکنس* وگونه‌های غیر از *کاندیدا آلبیکنس* وجود نداشت (P=۰/۶). در مطالعه‌ی زارعی و همکاران که در سال ۱۳۸۸ در اهواز انجام شد از ۳۰۰ بیمار بررسی شده ۴۹ درصد مبتلا به کاندیدیازیس واژینال بودند، و ازاین تعداد ۴۳/۸ درصد به ولوواژینیت عودکننده و ۵۱/۷ درصد به ولوواژینیت حاد مبتلا بودند؛ در این بررسی شایع‌ترین گونه‌ی عامل، *کاندیدا آلبیکنس* و بعد ازآن به ترتیب *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا دابلینینسیس* وگونه‌های دیگر شناسایی شدند (۲۰) که با مطالعه‌ی ما متفاوت بود.

۴۷/۱۴ درصد افرادی که بر اساس معاینات بالینی مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی بودند کاندیدا از محیط کشت سابورو دکستروز آگار جدا شد که در بسیاری از مطالعات دیگر شیوع واژینیت کاندیدایی بین ۱۵ تا ۳۰ درصد تخمین زده شده است (۲۱). بایدگفت که این میزان شیوع در مطالعه‌ی حاضر (۴۷/۱۴ درصد) بالا است بنابراین تنها بر اساس علایم کلینیکی و بالینی تعریف شده نمی توان نسبت به درمان بیماران مبتلا پرداخت.در مطالعه ی پاکشیر که در سال ۸۶ صورت گرفت تقریبا ۴۳ درصد بیماران مبتلا به کاندیدیازیس از محیط کشت جدا شد(۲۲). در مطالعه‌ی آقامیریان و همکاران که در سال ۸۴ انجام شد ۴۶ درصد در بیماران با روش کشت در محیط سابورو شناسایی شد (۲۳)، که با این شواهد می‌توان گفت همیشه علایم بالینی و تشخیص آزمایشگاهی با یکدیگر مطابقت ندارد.

در مطالعه‌ی حاضر ۱۶۵ ایزوله‌ی بالینی جداشده از محیط S در ادامه‌ی تکمیل روش‌های فنوتایپی در محیط کروم آگار کشت داده شد که بر اساس رنگ ویژه‌ی کلنی از محیط کروم آگار به صورت اولیه شناسایی شدند. ۱۰۶ ایزوله (۶۴/۲ درصد) از ۱۶۵ ایزوله‌ی جدا شده درمحیط S، رنگ سبز روشن (*کاندیداآلبیکنس* و یا *کاندیدا دابلینینسیس*)، ۳۴ ایزوله (۲۰/۶ درصد) رنگ صورتی پر رنگ (*کاندیدا گلابراتا*)، ۲۱ ایزوله (۱۲/۷ درصد) رنگ با پرگنه پرزی (*کاندیدا کروزی*)، ۴ ایزوله (۲/۴ درصد) صورتی کم رنگ (*کاندیدا پاراپسیلوزیس*) ایجاد کردند که گونه‌های مذکور بیش از ۸۰ درصد ایزوله‌های رایج کاندیدایی را شامل می‌شود که با نتایج حاصل از مطالعه‌ی شکوهی و همکاران (۲۴) مشابه است. از طرفی حضور دیگر گونه‌های جنس کاندیدا از جمله دابلینسیس و کروزی رو به افزایش است و این افزایش همان طور که قبلا هم مطرح شده است (۲۱) می‌تواند با گستردگی مصرف داروهای تری آزولی و استفاده‌ی بی‌رویه از پروفیلاکسی فلوکونازول مرتبط باشد.

نتایج مربوط به PCR-RFLP قطعه ITS1-5.8s-ITS2 با استفاده از آنزیم MspI (با سایت برش CCGG) در مورد گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا دابلینینسیس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* با توجه به اینکه یک محل برش در روی قطعه تکثیر شده دارند دو باند مشخص (با الگوهای متفاوت از نظر اندازه) را نشان داد که با آنچه مورد انتظار بود و با نتایج سایر مطالعات مطابقت دارد. میرهندی و همکاران در سال ۲۰۰۶ با استفاده از این روش ۶ گونه از کاندیداهای مهم را شناسایی کردند که برای گونه‌های آلبیکنس، گلابراتا، تروپیکالیس و کروزی ۲ باند و برای گونه گایلرموندی ۳ باند به دست آمد؛ ضمنا الگوی الکتروفورز (از نظر اندازه‌ی باندها) برای *کاندیدا آلبیکنس*، دابلینینسیس و استلاتوئیده توسط این روش یکسان بود (۱۴). در مطالعه‌ی ما از مجموع ۱۶۵ کاندیدای ایزوله شده از محیط S که در این مرحله مورد آزمون PCR و هضم آنزیمی توسط MSPI قرار گرفتند تعداد ۱۰۶ ایزوله (۶۴/۲ درصد) جدا شده دارای الگوی *کاندیدا آلبیکنس* بود که البته با این آنزیم غیر قابل افتراق از گونه های دابلینینسیس و گایلرموندی بود و ۵۹ ایزوله (۳۵/۷ درصد) سایر گونه‌های کاندیدا تشخیص داده

Downloaded from zums.ac.ir at 12:48 IRDT on Saturday July 29th 2017

شد که شامل ۳۸ ایزوله (۲۳ درصد) *کاندیدا گلابراتا*، ۱۸ ایزوله (۱۰/۹ درصد) *کاندیدا کروزی*، ۱ ایزوله (۰/۶ درصد) *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و ۲ ایزوله (۱/۲ درصد) *کاندیدا تروپیکالیس* بود. مطالعه‌ی مرادی و همکاران در سال ۹۳ نشان داد که شایع‌ترین عامل ولوواژینیت کاندیدایی، *کاندیدا آلبیکنس* ودر گروه غیر البیکنس *کاندیدا گلابراتا* می‌باشد (۳۰). با کمک این روش تمامی ایزوله‌ها درسطح گونه شناسایی شدند به استثناء افتراق گونه دابلینینسیس ازگونه آلبیکنس. نتایج حاصل از PCR-RFLP با سه روش فنوتایپی مورد استفاده مطابقت داشت. اختلاف جزیی بین نتایج فنوتیپی و نتایج PCR-RLFP (از نظر تعداد) در شناسایی گونه‌های گلابراتا، کروزی و پاراپسیلوزیس مشاهده گردید که این ناشی از دقت بالای روش مولکولی نسبت به روش‌های کشت می‌باشد.

با توجه به عدم افتراق دو گونه دابلینینسیس و گایلرموندی از *کاندیدا آلبیکنس* با آنزیم MspI، از آنزیم MboI استفاده گردید که نتیجه‌ی آن شناسایی و افتراق ۶ مورد *کاندیدا دابلینینسیس* بود. هیچ موردی از گونه *کاندیدا گیلرموندی* در بین ایزوله‌ها شناسایی نشد. شیوع گونه‌های کاندیدا با این روش در جعیت مورد مطالعه ۴۷/۱ درصد به دست آمد که بیشتر از میزانی است که در مطالعه‌ی اسماعیل‌زاده و همکاران در سال ۱۳۸۸ گزارش کردند، میزان فراوانی این گونه‌ها در مطالعه مذکور ۴۳/۳ درصد بود (۲۵). از بین فاکتورهای خطرساز بیماری، بیماران مبتلا به دیابت خطر بیشتری برای عفونت‌های مجرای ادراری از جمله عفونت‌های باکتریایی و قارچی دارند. در مطالعه‌ی انجام شده طبق اطلاعات حاصل از پرسشنامه ۲۷ نفر (۱۶/۴ درصد) از بیماران حامله و ۲۰ نفر (۱۲/۲ درصد) از بیماران مبتلا به دیابت، ۹۴ نفر (۵۷ درصد) دارای سابقه‌ی مصرف آنتی‌بیوتیک، ۳ نفر (۴/۹ درصد) دارای سابقه‌ی بیماری‌های زمینه‌ای و بقیه بیماران فاقد فاکتور خطر ساز بودند. توزیع عوامل مستعد کننده در مبتلایان به ولوواژینیت عود کننده و حاد نشان داد رابطه‌ی معنی‌داری بین مصرف آنتی‌بیوتیک، حاملگی، دیابت و بیماری زمینه‌ای با ابتلا به عفونت وجود دارد (P<۰/۰۰۰۱) و نتایج حاصله در خصوص عوامل مستعد کننده‌ی کاندیدیازیس با نتایج مطالعات انجام شده در سایر کشورها همچون یونان (۲۶)، ترکیه (۲۷) و تونس (۲۸) مطابقت داشت. بنابراین چنان که سایر محققین نیز تاکید نموده‌اند، توصیه می‌گردد جهت درمان مناسب بیماران، عوامل مستعد کننده یا خطر ساز مورد توجه جدی قرارگیرد. توزیع شکل بیماری در بیماران مبتلا به ولوواژینیت با عامل *کاندیدا آلبیکنس* نشان داد که در ۱۰۰ بیمار مبتلا به ولوواژینیت با عامل *کاندیدا آلبیکنس* ۴۴ نفر (۴۴ درصد) مبتلا به شکل شدید بیماری و ۵۶ نفر (۵۶ درصد) شکل خفیف تا متوسط بیماری را داشتند، در حالی که درگروه غیر *کاندیدا آلبیکنس* از ۶۵ نفر ۴۰ نفر (۶۱/۵ درصد) شکل شدید و ۲۵ نفر (۳۸/۵ درصد) شکل خفیف تا متوسط بیماری را نشان دادند. بر اساس آزمون کای اسکوئر توزیع شکل بیماری در بیماران مبتلا در دو شکل شدید و خفیف تا متوسط بیماری با عامل *کاندیدا آلبیکنس* و غیر*کاندیدا آلبیکنس* اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P=۰/۰۲۵). مطالعه‌ی انجام شده توسط پلیتسه و همکاران (۲۹)، در سال ۲۰۰۶ میلادی در کشور اتریش نشان داد که *کاندیدا آلبیکنس* عامل ۸۹/۹ درصد واژینیت کاندیدایی در شکل شدید بیماری و گونه‌های غیر از آلبیکنس از ۱۲/۱ درصد بیماران مبتلا بود که این میزان شیوع، از مطالعه‌ی ما بیشتر بود. این اختلاف معنی‌دار در مطالعه‌ی انجام شده نشان دهنده‌ی این است که *کاندیدا آلبیکنس* مهم‌ترین گونه‌ی پاتوژن در بیماران مورد مطالعه بوده است و از طرفی گونه‌های غیرآلبیکنس هم تا حدودی در شکل شدید بیماری می‌توانند نقش داشته باشند که به نظر می‌رسد تشخیص آزمایشگاهی در بیماران مبتلا به این شکل بیماری جهت درمان موثر و جلوگیری از عود مجدد ضروری می‌باشد.

Downloaded from zums.ac.ir at 12:48 IRDT on Saturday July 29th 2017

نتیجه گیری

در این پژوهش *کاندیدا آلبیکنس* و سپس *کاندیدا گلابراتا* به‌عنوان شایع‌ترین عوامل ایجاد کاندیدیازیس واژینال بوده‌اند و میزان شیوع گونه‌ی پاتوژن آلبیکنس نسبت به مطالعات انجام شده در دیگر نقاط کشور ما بالاتر است و از طرفی افزایش شیوع گونه‌های غیر آلبیکنس هم در بیماران مبتلا به ولوواژینیت عود کننده و هم در شکل شدید بیماری دیده شد بهتر است علاوه بر کشت اولیه در محیط‌های مورد نظر و کشت در محیط کروم آگار، بررسی مولکولی تا تعیین سطح گونه، جهت شناسایی عوامل اصلی بیماری انجام شود که در این میان استفاده از روش PCR-RFLP می‌تواند به عنوان یک روش قابل اعتماد جهت شناسایی گونه‌ها تلقی شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله بخشی از رساله‌ی دکترای تخصصی قارچ شناسی مصوب دانشکده‌ی علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد که ضرورت دارد از حمایت‌های بی‌دریغ معاونت پژوهشی و گروه قارچ شناسی دانشگاه تربیت مدرس و تمام کسانی که در انجام این طرح همکاری نموده‌اند تشکر و قدردانی گردد.

References

1- Geiger AM, Foxman B, Sobel JD. Chronic vulvovaginal candidiasis. Characteristics of women with *Candida albicans, Candida glabarta* and no Candida. *Genitourin Med*. 1995; 304.

2- Filippi L, Poggi C, Gozzini E, Meleleo R, Mirabile L, Fiorini P. Neonatal liver abscesses due to candida infection effectively treated with caspofungin. *Acta Paediatr*. 2009; 98: 906-9.

3- Mendling W, Brasch J. Guideline vulvovaginal candidosis of the german society for gynecology and obstetrics, the working group for infections and infectimmunology in gynecology and obstetrics. *Mycoses*. 2012; 55: 1-13.

4- Farina C, Salari N, Lombart JP, et al. Epidemiological phenotypic characteristics of vaginal yeast at the comoros. *Mycoses*. 2009; 52: 458-610.

5- Alves IA, Comargo FP, Goulart LS. Identification by PCR and antifungal susceptibility of vaginal clinical candida sp isolated. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43: 575-9.

6- Mahmoudi Rad M, Zafarghandi AS, Amelzabihi M, Mirhamadi Y, Shivaei M, Amiri Z. Identification of candida species assotiated with vulvuvaginal candidiasis by multiplex PCR method. 2012; Article ID872169, 5Pages.

7- Lian C, Zhao J, Zhang Z, Liu W. Genotype of candida species associated with different conditions of vulvovaginal candidiasis. *Mycoses*. 2004; 47: 495-502.

8- Ahmad A, Khan AU. Prevalence of Candida species and potential risk factor for vulvovaginal candidiasis in Aligar. *Indian J Obestet Gynecol Reprod Biol*. 2009; 144: 68-71.

9- Dooley DP, Beckius ML, Jeffrey BS. Misidentification of clinical yeast isolated by using the updated vitek yeast biochemical card. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 2889-92.

Downloaded from zums.ac.ir at 12:48 IRDT on Saturday July 29th 2017

10- Chavesco JK, Paulaq CA, Hirata MK. Molecular indentification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in Saopaulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop*. 2006; 48: 21-6.

11- Galan A, Veses V, Murgui A, Casanova M, Martinez JP. Rapid PCR-bassed test for identifying *Candida albicans* by using primer derived from the PH-regulated KERI gene. *Fems Yeast Res*. 2006; 6: 1094-1100.

12- Freydiere AM, Parant F, Chaux C, Gille Y, Candid ID. A new chromagenic medium compared to albicans ID. *Clin Microbial Infect*; 2006; 181.

13- White PC, Shetly A, Bames RA. Detection of seven candida species using the light-cycler system. *J Med Microbial*. 2003; 52: 229-38.

14- Mirhendi SH, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi HA. One-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important candida species. *Jap J Med*. 2006; 47: 225-9.

15- Ayatollahi SA, Khalesi E, Shahidi bonjar, Aghighi S, Sharifi F, Aram F. Rapid molecular diagnosis for candida species using PCR- RFLP. *Biotechnology*. 2006; 6: 583-7.

16- Baere T, Glaeys G, Swine C, Massonet G, Verschraegen A. Identification of cultured isolates of clinically important yeast species using fluorescent fragment length analysis of the amplified internally transcribed rRNA spacer 2 regions (ITS2). *BMC Microbiol*. 2002; 2: 21-5.

17- Zeng Jun, Zong LI, Li M. Distribution of *Candida albicans* genotype and candida species is associated with the severity of vulvovaginal candidiasis. *J South Med Univ*. 2011; 1640-53.

18- Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lanset*. 2007; 369: 1961-71.

19- Sobel JD. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol*. 1985; 152: 924-35.

20- Zarei Mahmoudabadi A, Najafyan M, Alidadi M. Clinical study of candida vaginitis in Ahvaz, Iran, and susceptibibility of agents to topical antifungal. *Pak J Med Sci*. 2010; 26: 607-10.

21- Jacqueline M, Bettina C. Candida Infections of the genitourinary tract. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23: 253-73

22- Pakshir K, Yazdani M, Kimiaghalam R. Etiology of vaginal candidiasis in Shiraz, southern Iran. *Res J Microbiol*. 2009; 2: 969-700.

23- Aghamirian MR, Keshavarz D, Jahani HH, Sadeghi M. Agents associated with candida volvovaginits in women referred to health centers in Qazvin. *J Qazvin Uni Med Sci*. 2007; 3: 9-35.

24- Shokohi T, Hashemi Soteh MB, Saltanatpouri Z, Hedayati MT, Mayahi S. Identification of candida species using PCR-RFLP in canser pateints in Iran. *Acta Med Iran*. 2013; 51: 799-804.

25- Esmaeilzadeh S, Mahdaviomran S, Rahmani Z. Frequency and etiology of vulvovaginal candidiasis in women referred to gynocological

Downloaded from zums.ac.ir at 12:48 IRDT on Saturday July 29th 2017

center in Babol, Iran. *Int J Fertility and Sterility*. 2009; 3: 74-7.

26- Grigoriou O, Baka S, Makrakis E, Hassiakos D, Kapparos G, Kouskouni E. Prevalence of clinical vaginal candidiasis in a university hospital and possible risk factors. *Eur J Obstet Gynocol Reprod Biol*. 2006; 126: 121-5.

27- Ozcan SK, Budak F, Yucesoy G, Ssever S, Willke A. Prevalence, susceptibility profile and proteinase production of yeasts causing vulvovaginitis in Turkish women. *APMIS*. 2006; 114: 139-45.

28- Amouri I, Sellami H, Borji N, Abbes S, Sellami A. Epidemiological survey of vulvovaginal candidosis in sfaxTunisia. *Mycoses*. 2010; 29: 176-8.

29- Paulitsch A, Weger W, Ginter-Hanselmayer G, Marth E, Buzina W. A 5-year (2000-2004) epidemiological survey of candida and non-candida yeast species causing vulvovaginal candidiasis in Graz, Austria. *Mycoses*. 2006; 49: 471-5.

30- Moradi R, Moghaddam-Benaem L, Roudbar Mohammadi Sh, Asghari M, Roudbary M. Assessment of the prevalence of candida species in cervicovaginal smear, before and 3 months after IUD, Tcu380A insertion. *J Zanjan Unvi Med Sci*. 2014; 93: 67-76.

Downloaded from zums.ac.ir at 12:48 IRDT on Saturday July 29th 2017

Identification of Candida Species in Patients with Vulvovaginitis Presenting Different Clinical Symptoms

Fouladi B[1], Yadegari M[1], Rajabibazl M[2], Fazaeli A[3], Hashemzadehchaleshtari M[4].

[1]Dept. of Mycology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[2]Dept. of Biochimestry, Shahidbeheshti University of Medical Sciences,Tehran. Iran.

[3]Dept. of Parasitology & Mycology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan. Iran.

[4]Dept. of Genetics, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord. Iran.

Corresponding Adress: Yadegari M, Dept. of Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

E-mail: yadegarm@modares.ac.ir

Received: 5 Jul 2014 **Accepted:** 27 Sep 2014

Background and Objective: Candidiasis is one of the most important and common agents of vulvovaginitis in women. Various clinical manifestations of candidiasis in patients may be associated with different species of Candida. The present study was designed to accurately determine Candida species isolates from patients using culture methods and molecular analysis.

Materials and Methods: In this cross-sectional analytical study, 350 patients with suspected vulvovaginal diseases who manifested various clinical symptoms were entered. Vaginal specimens from the patients were collected. Direct microscopy, primary and specific cultures using SDA, CRA and CMA media, germ tube test, as well as DNA based techniques targeting ITS1-5S-ITS2 fragment, were used for diagnosis and identification of Candida species.

Results: 165 out of 350 patients (47.14%) were positive with Candida species including 71.5% recurrent candidiasis and 28.5% acute candidiasis. Characterization of the isolates in the specific sub-cultures and by PCR-RFLP resulted in identification of six different species consisted of *Candida albicans* (60.6%), *C. dubliniensis* (3.6%), *C. glabrata* (23%), *C. krusei* (10.9%), *C. parapsilosis* (0.6%) and *C. tropicalis* (1.2%). In the group consisting of 100 patients with *C. albicans*, 44% and 56% presented severe and mild to moderate clinical vulvovaginitis, respectively. In patients with non albicans candidiasis, 61.5% showed severe and 38.5% showed mild to moderate vulvovaginitis, significantly different from those of the former group ($P = 0.028$). The results indicated significant involvement of some risk factors (i.e. diabetes and antibiotic consumption) in clinically different vaginal infections ($P < 0.0001$)

Conclusion: The study showed a high prevalence of candida infection in patients with vulvovaginitis in Southeast of Iran, involving several species, mostly *C. albicans* and *C. glabrata*. Considering the increasing prevalence of non-albicans species among these patients, precise determination of causative Candida species with more reliable methods such as molecular techniques are recommended.

Keywords: Candida albicans, Non-albicans candidiasis, Vulvovaginitis, PCR-RFLP