

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

Sohrabi H<sup>1</sup>, Sarookhani MR<sup>2\*</sup>, Ezani A<sup>3</sup>

- 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 were performed by germ tube and chlamyospore 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

\*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](mailto:mrsarookhani@QUMS.ac.ir)

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

حسین سهرابی<sup>1</sup>، محمدرضا ساروخانی<sup>2\*</sup>، اکرم ازعانی<sup>3</sup>

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 ویروولوژی، 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 از خود نمونه‌ها) و مقایسه آن با روش‌های کشت بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی - تحلیلی از 150 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 و 12 مورد کاندیدا 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

## مقدمه

کاندیداهای ارگانسیم های تک سلولی یا مخمیری یوکاریوتی طیف وسیعی از عفونت ها را در بیماران به ویژه در افرادی که سیستم ایمنی آنها تضعیف شده و یا بیماری های زمینه ای دارند موجب می شوند.

کاندیدایزیس 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 می شوند که به آن ولوواژینیت کاندیدایی عودکننده می گویند. ولوواژینیت کاندیدایی بیماری است که با علائمی نظیر خارش و ترشحات غلیظ سفید رنگ مشخص می شود. بین 70-75 درصد زنان بالغ سالم حداقل یک بار در طول دوران باروری خود به ولوواژینیت کاندیدایی دچار می شوند. گونه های متعددی از این ارگانسیم وجود دارند که شامل آلبیکنکس، پاراسیلوزیس، تروپیکالیکس، گلابراتا، کروزه ای، دابلینسیس و گیلرموندی و ... می باشند. عامل اکثر موارد بیماری ها، گونه ای کاندیدا آلبیکنکس است ولی در بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی عودکننده 47-15 درصد موارد توسط گونه های غیر آلبیکنکس ایجاد می شوند. برخی معتقدند استفاده گسترده از داروهای ضد قارچی در افزایش فراوانی گونه های غیر آلبیکنکس نقش داشته است زیرا رژیم های درمانی یک تا سه روزه ای میمیدازولها ممکن است رشد کاندیدا آلبیکنکس را متوقف کند اما باعث عدم تعادلی در فلور واژن می شود، که رشد بیش از حد گونه های دیگر کاندیدا را تسهیل خواهد کرد. اغلب گونه های کاندیدای غیر آلبیکنکس نسبت به داروهای ضد قارچی مقاومت نشان می دهند و از این میان کاندیدا گلابراتا و کاندیدا کروزه ای به فلوکونازول مقاومت بیشتری نسبت به سایر گونه ها نشان می دهند. از این رو شناسایی دقیق گونه ای کاندیدا اهمیت به سزایی در درمان و مقابله با بیماری خواهد داشت. (1، 2).

روش های مختلفی در شناسایی کلی کاندیداهای کار می روند که به طور کلی شامل روش های فنوتایپی و

کشت و روش های ژنوتایپی می باشند. در ایران روش استاندارد متداول فعلی تشخیص کاندیداهای روش کشت می باشد. اما این روش نه تنها زمانبر بوده بلکه حساسیت آن نیز کم می باشد. بنابراین در طی سالیان متمادی استفاده از روش های مختلف مولکولی و PCR در تشخیص کاندیداهای اجتناب ناپذیر بوده است. اما روش های مولکولی معرفی شده در تشخیص ولوواژینیت، خود مبتنی بر کشت آنها بوده که در نتیجه مزیت زمانی آنها را زیر سوال می برد (1، 2).

در جهت تسهیل روش شناسایی، میرهندی و همکاران در سال 1387 (2008) روش ابداعی PCR-Fragment size polymorphism (واکنش زنجیره ای پلیمرز بر مبنای چند شکلی اندازه قطعات) را با طراحی پرایمر برای نواحی ITS1 و ITS2 ارائه نموده اند. در این روش محصولات PCR بر اساس گونه کاندیداهای اندازه های متفاوتی خواهند داشت و لذا نیاز به مراحل بعدی و استفاده از آنزیم های محدودگر را برای تشخیص بیشتر گونه های کاندیدایی مرتفع کرده است (2). همچنین در جهت کم کردن زمان تشخیص، لوو و همکاران در سال 2010 شناسایی کاندیدی را با روش PCR مالتیپلکس به دنبال هم (multiplex-tandem PCR= MT-PCR) به انجام رسانده و این روش مستقیم تعیین کاندیداهای در خون را با روش کشت خون مقایسه نموده اند. (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 قطعاً برای شناسایی سریع ارگانسیم خطرناکی چون گونه های کاندیدایی و آن هم در داخل گردش خون صورت گرفته است.

علی رغم انجام برخی مطالعات در مناطق مختلف کشور با روش های فنوتایپی و مولکولی، در استان قزوین تنها مطالعه روی کاندیداهای در سال 1386 روی نمونه های ولوواژینیت بوده که صرفاً از روش های فنوتایپی بهره گیری شده است و انواعی از کاندیداهای جدا و تعیین هویت نموده اند (4).

با استفاده از تست های لوله زایا، تولید کلامیدو کونیدی و پیگمان کاندیدا روی محیط کروم آگار انجام میشود. بیش از 90 درصد گونه های آلیکنس و دابلینسیس در محیط کورن میل آگار حاوی توئین 80 ایجاد کلامیدو کونیدی مینمایند و تست لوله زایای 90 درصد گونه های آلیکنس و دابلینسیس مثبت است.

در آزمون لوله زایا که یکی از ابتدایی ترین روش های تشخیصی کاندیدا آلیکنس است توسط یک آنس استریل از نمونه کشت تازه بیمار برداشت کرده و درون نیم میلی لیتر از سرم انسان انتقال داده و به خوبی مخلوط گردید. سوسپانسیون فوق در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 2 تا 3 ساعت نگهداری شد، سپس وجود یا فقدان لوله زایا در زیر میکروسکوپ بررسی شد. در آزمون ایجاد کلامیدو کونیدی روی محیط کورن میل آگار دارای 1 درصد توئین 80 (CMA-T80) ابتدا تمام مخمرهای مورد بررسی بر روی محیط سابورو کشت داده شدند. سپس ایزوله های کشت داده شده بر روی محیط کورن میل آگار حاوی توئین 80 تلقیح شده و به مدت 72 ساعت در دمای 30 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از طی مدت انکوباسیون، با استفاده از درشت نمایی ضعیف میکروسکوپ، وجود یا عدم وجود کلامیدو کونیدی 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 گونه های مختلف بر روی محیط کشت افتراقی کروم آگار کاندیدا کشت داده می شوند، کشت تلقیح شده، درون انکوباتور با دمای 37 درجه سانتی گراد نگهداری شده و بعد از گذشت 48 ساعت، کلنی های 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 کاندیدا آلیکنس و رنگ بنفش موید کاندیدا گلابراتا و رنگ آبی موید کاندیدا تروپیکالیس می باشد.

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

## مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی - تحلیلی از 150 نفر بیماری که به مراکز بهداشتی قزوین در طول سال 91 مراجعه نموده بوده اند به طور سرشماری و با نمونه گیری ساده تا رسیدن به عدد فوق نمونه برداری شد. معیارهای ورود به مطالعه خانم های در محدوده سنی 20-50 ساله غیر باردار متاهل با شکایت ترشح واژینال سفید پنیری تا رقیق آبیکی 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 اسپیکولوم گذاری، توسط سوپ دا کرون از نواحی واژن و ولو نمونه گرفته شد (دو عدد) و در محیط ترانسپورت قرار گرفته و انتقال یافت.

جهت عملیات قارچ شناسی (فوتایی)، نمونه های قارچی جدا شده از واژن با استفاده از آزمون های فوتایی (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).

گونه های مختلف کاندیدا در روی محیط های کشت SC (سابورد کستروز آگار حاوی کلرامفنیکول) ایجاد کلنی های موکوئیدی مینمایند. رشد گونه های کاندیدا به جز گونه کاندیدا گلابراتا که برای رشد نیاز به انکوباسیون طولانی دارد سریع بوده است. با توجه به حساسیت برخی گونه های کاندیدا نظیر تروپیکالیس، پاراپسیلویس، کروزه ای و راگوزا به سیکلو هگزامید از محیط SCC (سابورد کستروز آگار حاوی کلرامفنیکول و سیکلو هگزامید) استفاده نگردید. تشخیص قطعی کاندیداها

30 سیکل شامل:

دنا توره: 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 نمونه ها

استفاده شد.

نتایج تمام آزمایشات در نرم افزار EXCEL

ذخیره شد و برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم

افزار SPSS نسخه 16 و محاسبه فراوانی و میانگین استفاده

شد.

#### یافته ها

میانگین سنی جامعه دارای ولوواژینیت

کاندیدایی در این مطالعه  $32 \pm 10/5$  سال به دست آمد. از

تعداد 150 نمونه ولوواژینیت 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 (فوتاییبی) با روش مولکولی برابر 68

درصد به دست آمد.

در روش کشت (فوتاییبی) 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 (تصویر 1 و جدول 1).

جهت روش های مولکولی ابتدا برای استخراج

DNA از خود نمونه های سوپ 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 genomic BYF DNA

extraction mini kit (Intron Biotechnology

Inc., Seongnam, South Korea) انجام شد.

برای طراحی پرایمرهای رفت و برگشت یونیورسال

ویژه مناطق 2 و 1 در ITS (7) و تمام منطقه 5S rRNA 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 نمونه ها به عنوان الگو (2 میکرولیتر) و نیز از

پرایمرهای رفت و برگشت (هر کدام یک میکرولیتر)

و master mix (10 میکرولیتر) (شرکت آمپلیکون

دانمارک) استفاده شد و مابقی حجم تا 25 میکرولیتر را آب

مقطر تشکیل داد (9). هم چنین از نمونه های DNA

استخراج شده سویه های کاندیدای مشخص به عنوان کنترل

مثبت (تهیه شده از سازمان پژوهش های علمی ایران با

شماره های *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 از ترموسایکلر ABI

veriti (USA) مقادیر سیکل های حرارتی زیر به عنوان

مقادیر بهینه به کار گرفته شدند (10):

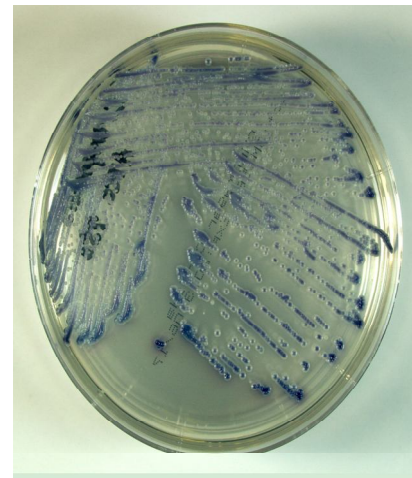
دمای اولیه: 94 درجه سانتی گراد به مدت 7 دقیقه



Candida glabrata



Candida albicans

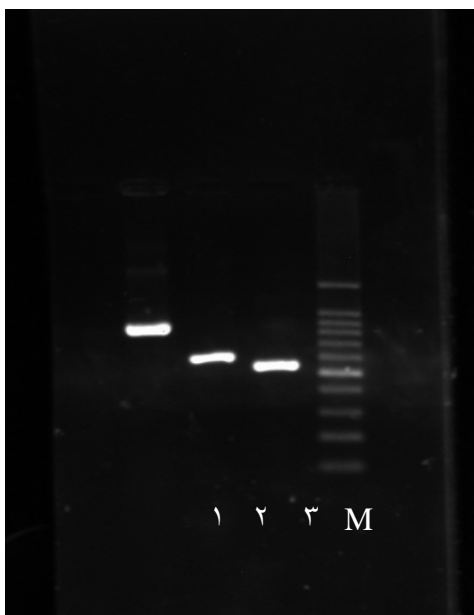


Candida tropicalis

تصویر 1. محیط کشت کروم آکاردر جداسازی 3 گونه کاندیدای آلبیکنس و گلابراتا و تروپیکاليس

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

گونه کاندیدا	تعداد در کشت	درصد	تعداد در PCR	درصد
آلبیکنس	73	84	107	84
گلابراتا	12	14	18	14
تروپیکاليس	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 کاندیدا گلابراتا با باند با اندازه 874 جفت باز و 2 مورد کاندیدا تروپیکاليس با باند با اندازه 521 جفت باز ایجاد نمودند و به این ترتیب از هم تفکیک گردیدند (تصویر 2 و جدول 1)

تصویر 2. PCR و الکتروفورز نمونه های ولووواژینیتی استان قزوین برای جداسازی گونه های کاندیدایی: (1) گلابراتا (2) تروپیکاليس (3) آلیکنس (M) سایز مارکر

در انتها در انطباق روش مولکولی جدید با روش کشت (فوتوتایی) مشخص گردید که از 150 نمونه آنالیز شده با دو روش کشت یا جداسازی فوتوتایی (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 نمونه های ولووواژینیتی

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

## بحث

جهت تسهیل و کاهش زمان شناسایی، در این مطالعه با حذف مرحله کشت نمونه ها، روش جدید و کاملاً ساده ای برای تشخیص کاندیداهاى مولد ولووواژینیت تا سر حد شناسایی گونه آنها معرفی شد و با روش متداول کشت و یافته های فوتوتایی مربوطه مقایسه گردید.

در این مطالعه متوسط سن شیوع ولووواژینیت کاندیدایی (نمونه های مثبت) برابر  $32 \pm 10/5$  سال می باشد که با برخی مطالعات داخل کشور انطباق دارد (4، 11).

شایع ترین گونه کاندیدایی جدا شده در این مطالعه و در هر دو روش کشت و مولکولی آلیکنس 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 سویه های دارای پتانسیل عود مجدد و نیز خطر افزایش مقاومت به داروهای کتوکونازول و فلوکونازول را دارد. در مطالعات سوبل و پاولیک و فیلد نیز شیوع این گونه کاندیدا را در ولووواژینیت گزارش کرده اند (12-14). در آخرین و تنها مطالعه میریان و همکاران در استان قزوین نیز شیوع عوامل کاندیدایی ولووواژینیت و نسبت سویه های آلیکنس به نان آلیکنس (از جمله گلابراتا) در همین محدوده ها قرار دارند (4). در تحقیق جاری هیچ موردی از گونه کاندیدا دابلینسیس در هر دو روش جدا نشد که می توانست یا ناشی از ناتوانی این روش مولکولی و نوع پرایمرهای به کار گرفته شده برای PCR باشد و یا هم چنین ناشی از این واقعیت باشد که حتی از روی رنگ کلنی در محیط کروم آگار نیز نمی توان در روش های فوتوتایی دو گونه آلیکنس 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 آلیکنس جدا شده در روش کشت، متد مقاومت به حرارت 45 درجه اعمال و استفاده شد (11) که البته با رشد همه این ایزوله ها که موید کاندیدا آلیکنس 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 نمی تواند گونه دابلینسیس را از آلیکنس جدا کند و به این منظور باید از روش های PCR و متعاقباً هضم با آنزیم های محدودگر بهره جست که در تحقیق میرهندی و همکاران

واژینیت و نسبت سویه های آلیکنس به نان آلیکنس (از جمله گلابراتا) در همین محدوده ها قرار دارند (4). در تحقیق جاری هیچ موردی از گونه کاندیدا دابلینسیس در هر دو روش جدا نشد که می توانست یا ناشی از ناتوانی این روش مولکولی و نوع پرایمرهای به کار گرفته شده برای PCR باشد و یا هم چنین ناشی از این واقعیت باشد که حتی از روی رنگ کلنی در محیط کروم آگار نیز نمی توان در روش های فوتوتایی دو گونه آلیکنس 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 آلیکنس جدا شده در روش کشت، متد مقاومت به حرارت 45 درجه اعمال و استفاده شد (11) که البته با رشد همه این ایزوله ها که موید کاندیدا آلیکنس 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 نمی تواند گونه دابلینسیس را از آلیکنس جدا کند و به این منظور باید از روش های PCR و متعاقباً هضم با آنزیم های محدودگر بهره جست که در تحقیق میرهندی و همکاران

S rDNA و مابین بخشی ITS از ژن 28S rDNA که در سایر مطالعات نیز آمده است (17، 18) بهره می برد و می تواند آنها را تفکیک نماید.

### نتیجه گیری

روش PCR معرفی شده با سرعت و به راحتی می تواند انواع کاندیداها و گونه های اصلی آنها را در نمونه های مشکوک ولو و واژینیتی شناسایی کند و این امر قابل تسری به سایر نمونه های کلینیکی در آزمایشگاه های تشخیصی خواهد بود. محققین این طرح روش ابداعی بسیار ساده تری را نیز در تشخیص ولو و واژینیتی کاندیدایی طراحی کرده اند که در مقاله ای 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 نمونه هایی که صرفاً به دلایل تشخیصی و درمانی در روند معمول اخذ می شوند، 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 نمونه های مصرف شده پس از استفاده در تشخیص متداول از آنها، تقدیر می نمایند.

### 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, Hosseinpour L. [Identification of Pathogenic *Candida* Species: PCR-Fragment Size Polymorphism (PCR-FSP) Method]. *TUMJ*. 2008;66(9):639-45.

نیز این موضوع نشان داده شده است (8). عدم به کار گیری این تکنیک خود از محدودیت های مطالعه جاری می باشد.

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

لذا مطالعه می رهندی و همکاران در انجام مستقیم PCR با برداشت از خود 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 نمونه ها می شود که انتظار 48 تا 72 ساعته را برای ظهور کلنی های کاندیدایی داریم اما این تحقیق با هدف حذف مرحله کشت و استخراج مستقیم DNA از خود نمونه های ولو و واژینیتی و آنگاه انجام PCR که بسیار سریع تر 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 ساینز آمپلیکون ایجاد می کند (7، 8). اصلی کاندیدایی یعنی آلیکس و گلابراتا و تروپیکالین را از هم تفکیک و شناسایی کند (7، 8).

از میان روش های متعدد مولکولی معرفی شده در شناسایی گونه های مختلف کاندیدایی، به نظر می رسد روش PCR به کار گرفته شده در این طرح و استفاده از پرایمرهای یونیورسال کارایی بهتری داشته و ضمناً از اختلاف در ساینز آمپلیکون تولیدی که از تفاوت گونه های کاندیدایی در فاصله و تعداد نوکلئوتیدهای حد فاصل نواحی مابین بخشی ITS از ژن 18S rDNA و تمام ژن 5.8



11. Jamilian M, Mashadi E, Sarmadi F, Banijamali M, Farhadi E, Ghanatpishe E. [Frequency 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 to *C. 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
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, Shivaie 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, Hosseinpour 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.