

شناسایی گونه‌های کاندیدای جدا شده از موارد ولوواژینیت کاندیدایی به روش Multiplex PCR

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۰۶/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۰۸/۰۲

چکیده

زمینه و هدف: ولوواژینیت کاندیدایی یک بیماری قارچی خارش‌دار همراه با ترشحات سفید رنگ می‌باشد. تشخیص گونه‌های کاندیدا برای به‌کارگیری درمان مناسب، امری مهم می‌باشد. در این تحقیق برای تعیین گونه ۱۹۱ کاندیدای جدا شده از نمونه‌های واژینال ۱۷۵ بیمار مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی از روش multiplex PCR استفاده شد. **روش بررسی:** ۱۷۵ نمونه سواب واژینال روی محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شد. در این بررسی، ناحیه ITS1 و قسمت‌هایی از نواحی 5.8S و 18S ریبوزومال RNA به‌همراه قطعه‌ای از ناحیه ITS2 که اختصاصی گونه *C. albicans* است تکثیر شد و محصولات multiplex PCR با الکتروفورز روی آگاروز ۲٪ جدا گردیدند. **یافته‌ها:** ۱۹۱ ایزوله کاندیدا در نمونه‌های واژینال تشخیص داده شد. در ۸۹/۷٪ نمونه‌ها یک گونه کاندیدا و در ۱۰/۳٪ آنها چند گونه کاندیدا جدا گردید. از نظر شیوع انواع گونه‌های کاندیدا، در ۱۱۴ مورد *C. albicans*، ۲۳ مورد *C. glabrata*، ۱۱ مورد *C. tropicalis*، هفت مورد *C. krusei*، یک مورد *C. guilliermondii*، یک مورد *C. parapsilosis* به‌تنهایی عامل بروز ولوواژینیت کاندیدایی بودند و در ۱۰ مورد *C. albicans* و *C. glabrata*، دو مورد *C. parapsilosis* و *C. albicans*، یک مورد *C. albicans* و *C. krusei*، یک مورد *C. albicans* و *C. tropicalis*، یک مورد *C. glabrata* و *C. tropicalis*، یک مورد *C. krusei* و *C. glabrata*، یک مورد ترکیب *C. albicans* و *C. glabrata* و *C. krusei* عامل بیماری بودند. **نتیجه‌گیری:** شایع‌ترین عامل بیماری ولوواژینیت کاندیدایی *C. albicans* و سپس *C. glabrata* و شایع‌ترین ترکیب عامل بیماری نیز این دو گونه بودند.

کلمات کلیدی: کاندیدا، ولوواژینیت کاندیدایی، PCR.

مهناز محمودی‌راد^{۱*}
آمنه شیرین ظفرقلندی^۲
مریم عامل ذبیحی^۲، یاسمن میردامادی^۳
نورینا رهبریان^۱، بهنوش عباس آبادی^۲
مهتاب شیوایی^۱، زهره امیری^۴

۱- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- گروه بیماری‌های زنان و زایمان و نازایی، بیمارستان مهدیه، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه خاتم
۴- گروه علوم پایه، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

* نویسنده مسئول: تهران، اوین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، طبقه ششم، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی
تلفن: ۲۲۷۴۳۹۴
email: mahnazrad@gmail.com

مقدمه

ولوواژینیت کاندیدایی vulvovaginal candidiasis یک بیماری قارچی است که با علائمی نظیر خارش و ترشحات غلیظ سفید رنگ مشخص می‌شود. این بیماری توسط گونه‌های مختلف کاندیدا ایجاد می‌گردد. ۷۵-۷۰٪ زنان بالغ سالم حداقل یک‌بار در طول دوران باروری زندگی خود به ولوواژینیت کاندیدایی دچار می‌شوند.^۱ کاندیدایزیس ژنیتال در اکثر موارد ناشی از افزایش تعداد کاندیدا آلیکینس است که به‌صورت فلور طبیعی در واژن وجود دارد. تقریباً ۵٪ این بیماران در سال چهار بار و یا بیشتر به این بیماری مبتلا می‌شوند که به آن ولوواژینیت کاندیدایی عود کننده می‌گویند.^۲ عامل اکثر موارد، گونه *Candida albicans* است ولی در بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی عود کننده ۴۷-۱۵٪ موارد توسط گونه‌های

non-albicans ایجاد می‌شوند.^{۳،۴} برخی معتقدند استفاده گسترده از داروهای ضد قارچی در افزایش فراوانی گونه‌های غیر آلیکینس نقش داشته است زیرا رژیم‌های درمانی یک تا سه روزه ایمیدازول‌ها ممکن است رشد کاندیدا آلیکینس 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 آلیکینس نسبت به داروهای ضد قارچی مقاومت نشان می‌دهند و از این میان *Candida glabrata* و *Candida krusei* به فلوکونازول مقاومت بیشتری نسبت به سایر گونه‌ها از خود نشان می‌دهند.^۵ از این رو شناسایی دقیق گونه کاندیدا اهمیت بسزایی در درمان و مقابله با بیماری خواهد داشت. در سال‌های گذشته تشخیص و حتی رده‌بندی گونه‌ها بر اساس تظاهرات بالینی، ریخت‌شناسی ارگانایسم در محیط کشت و نیز انجام برخی

راجعه کاندیدایی) که بین سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۷ به بیمارستان مهدیه مراجعه کرده بودند انجام شد. از همه بیماران قبل از نمونه‌گیری رضایت‌نامه کتبی اخذ گردید. یک استرین از هر گونه کاندیدا نیز به‌عنوان شاهد از یک مجموعه کشت شامل: *C. parapsilosis* CBS2195، *C. glabrata* CBS2175، *C. tropicalis* CBS94، *C. krusei* CBS573 و *C. albicans* ATCC14053 در این تحقیق بررسی شدند. شناسایی گونه‌ها: از ترشحات واژن ۱۷۵ بیمار مبتلا به ولوواژنیت کاندیدایی توسط سوپ استریل نمونه واژینال تهیه، و روی محیط سابورو دکستروز آگار (SDA) کشت داده شد. گونه‌ها به‌روش تولید جرم تیوب، ایجاد کلامیدوسپور روی محیط کورن میل آگار، ایجاد کلنی‌های رنگی روی محیط کروم آگار کاندیدا (CHROMagar Company, Paris, France) و جذب کربوهیدرات‌ها شناسایی شدند. سپس کلنی‌های کاندیداهای رشد یافته جمع‌آوری، و تا زمان انجام multiplex PCR در آب مقطر استریل در دمای اتاق ذخیره شدند. در پایان مقایسه‌ای میان گونه‌های عامل ولوواژنیت راجعه و غیر راجعه کاندیدایی انجام شد و برای توصیف داده‌ها از آمار توصیفی و در تحلیل داده‌ها از آزمون‌های اختلاف نسبت‌ها و میانگین‌ها، (Student T-test و χ^2 و ANOVA) استفاده گردید.

استخراج DNA از سویه‌ها: از کیت استخراج DNA ژنومی (AccuPrp[®], Bioneer Corporation) طبق دستورالعمل استفاده شد. تشخیص گونه‌ها به‌روش multiplex PCR با استفاده از کیت PCR Premix (Bioneer Company) AccuPower[®] انجام شد. هر میکروتیوب این کیت شامل یک واحد Taq DNA polymerase، ۲۵۰ میکرومولار dNTP، ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl (pH 9.0)، ۴۰ میلی‌مولار KCl، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl₂، تثبیت‌کننده و tracking dye است. به‌هر میکروتیوب ۵-۱ نانوگرم از DNA استخراج‌شده و چهار میکرولیتر مخلوط آماده شده از چهار پرایمر با سکانس‌های زیر افزوده شد:

universal primers:

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

ITS2 (5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3')

C. albicans-specific primers:

CA3 (5'-GGT TTG CTT GAA AGA CGG TAG-3')

CA4 (5'-AGT TTG AAG ATA TAC GTG GTA G-3')

این پرایمرها قسمتی از ناحیه 18S rDNA، ITS1 و قسمتی از 28S rDNA را تکثیر می‌کنند.^{۲۴} پرایمرها از TAGC توسط شرکت ژن فن‌آوران تهیه و پس از حل کردن آنها در آب دیونیزه، مخلوطی از دو

واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی صورت می‌گرفت. این روش‌های کلاسیک، بسیار پر زحمت و وقت‌گیر هستند و چندین روز طول می‌کشد تا ایزوله‌های یک کشت شناسایی گردند.^۶ در ضمن گاهی سیستم‌های بیوشیمیایی اتوماتیک، گونه را اشتباه تشخیص می‌دهند.^۷ در مقابل، روش‌های مولکولی که در سال‌های اخیر جایگزین روش‌های قبلی شده‌اند از سرعت و دقت بالاتری برخوردار می‌باشند. روش‌های PCR گوناگونی برای افتراق برخی از گونه‌های کاندیدا گزارش شده است.^{۸-۱۴} برخی از این روش‌ها بر اساس اهداف مولکولی تک‌نسخه‌ای یا چندنسخه‌ای برای شناسایی گونه‌های کاندیدا در محیط کشت یا نمونه‌های بالینی می‌باشند. روش Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis (RAPD) نیز به‌عنوان روشی آسان و مطمئن برای شناسایی چند گونه ایزوله شده از مواد غذایی و نمونه‌های بالینی نظیر گونه‌های *Saccharomyces*^{۱۵}، *Penicillium*^{۱۶} و *Candida*^{۱۷-۲۳} به‌کار رفته است، ولی تعداد روش‌هایی که برای شناسایی گونه‌های کاندیدا از single and direct PCR یا multiplex PCR استفاده شده است بسیار کم می‌باشد.^{۲۴-۲۵} در این تحقیق از یک روش بسیار ساده، سریع و تکرارپذیر multiplex PCR برای شناسایی گونه‌های کاندیدا و مقایسه آنها در موارد ولوواژنیت‌های کاندیدایی راجعه (ابتلا چهار بار یا بیشتر در یک‌سال) و غیر راجعه (ابتلا کمتر از چهار بار در یک‌سال) استفاده گردید. در این روش برای افتراق گونه‌های کاندیدا آلیکنس و کاندیدا تروپیکالیس که توسط پرایمرهای ITS1 و ITS2 باندهای مشابهی ایجاد می‌کنند، از پرایمرهای CA3 و CA4 به‌طور هم‌زمان با پرایمرهای ITS1 و ITS2 استفاده می‌شود که در این حالت دو باند برای نمونه‌های کاندیدا آلیکنس و تنها یک باند برای کاندیدا تروپیکالیس به‌دست می‌آید. طول باندهای به‌دست آمده برای هر گونه کاندیدا عبارتند از: *C. glabrata* ۴۸۲ یا ۴۸۳ جفت باز، *C. guilliermondii* ۲۴۸ جفت باز، *C. parapsilosis* ۲۲۹ جفت باز، *C. albicans* ۲۱۸ یا ۲۱۹ و ۱۱۰ جفت باز، *C. tropicalis* ۲۱۸ جفت باز و *C. krusei* ۱۸۲ جفت باز.^{۲۴}

روش بررسی

ارگانیسم‌ها: این مطالعه مقطعی بر روی نمونه‌های کاندیدای جدا شده از ترشحات واژینال ۱۷۵ بیمار مبتلا به ولوواژنیت کاندیدایی (۸۳ نمونه ولوواژنیت راجعه کاندیدایی و ۹۲ نمونه ولوواژنیت غیر

جدول ۱- مقایسه گونه‌های کاندیدا در انواع ولوواژینیت کاندیدیایی

در مجموع (درصد از کل)	غیر راجعه	راجعه	نوع ولوواژینیت کاندیدا
۱۱۴(۶۵/۱)	۵۸(۶۳)	۵۶(۶۷/۶)	<i>Candida albicans</i>
۲۳(۱۳/۱)	۱۶(۱۷/۴)	۷(۸/۴)	<i>Candida glabrata</i>
۱۱(۶/۲)	۵(۵/۴)	۶(۷/۲)	<i>Candida tropicalis</i>
۱۰(۵/۷)	۴(۴/۳)	۶(۷/۲)	<i>C. albicans & C. glabrata</i>
۷(۴)	۳(۳/۳)	۴(۴/۸)	<i>Candida krusei</i>
۲(۱/۱)	۱(۱/۱)	۱(۱/۲)	<i>C. albicans & C. parapsilosis</i>
۱(۰/۶)	۰(۰)	۱(۱/۲)	<i>Candida parapsilosis</i>
۱(۰/۶)	۱(۱/۱)	۰(۰)	<i>Candida guilliermondii</i>
۱(۰/۶)	۰(۰)	۱(۱/۲)	<i>C. glabrata & C. tropicalis</i>
۱(۰/۶)	۰(۰)	۱(۱/۲)	<i>C. krusei & C. tropicalis</i>
۱(۰/۶)	۱(۱/۱)	۰(۰)	<i>C. albicans & C. tropicalis</i>
۱(۰/۶)	۱(۱/۱)	۰(۰)	<i>C. albicans & C. krusei</i>
۱(۰/۶)	۱(۱/۱)	۰(۰)	<i>C. krusei & C. glabrata</i>
۱(۰/۶)	۱(۱/۱)	۰(۰)	<i>C. albicans & C. krusei & C. glabrata</i>
۱۷۵(۱۰۰)	۹۲(۵۲/۶)	۸۳(۴۷/۴)	مجموع

بررسی شدند که ۹۲ نفر (۵۲/۶٪) از آنها کمتر از چهار بار در سال (غیر راجعه) و ۸۳ نفر (۴۷/۴٪) از آنها چهار بار یا بیشتر از آن در سال (راجعه) مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیایی شده بودند. میانگین سنی افراد ۳۱/۳۸ سال با $SD=۸/۲۲$ به دست آمد. میانگین سنی گروه غیر راجعه ۳۱/۳۲ سال با $SD=۹/۱۶$ و میانگین سنی گروه راجعه ۳۱/۴۶ سال با $SD=۷/۰۸$ بود که اختلاف معنی‌داری بین آنها به دست نیامد ($p=۰/۹۰۹$). از ۱۵۷ بیمار (۸۹/۷٪) تنها یک گونه کاندیدا و از ۱۸ بیمار (۱۰/۳٪) چند گونه کاندیدا جدا گردید. در مبتلایان به کاندیدیاز ولوواژینال غیر راجعه، در ۸۳ بیمار (۹۰/۲٪) یک گونه کاندیدا و در ۹ بیمار (۹/۸٪) بیشتر از یک گونه کاندیدا عامل بیماری بودند. در نوع راجعه، در ۷۴ بیمار (۸۹/۲٪) یک گونه کاندیدا و در ۹ بیمار (۱۰/۸٪) بیش از یک گونه عامل ایجاد بیماری بودند که اختلاف آماری معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت ($p=۱$). شیوع انواع گونه‌های کاندیدا در مبتلایان به ولوواژینیت کاندیدیایی راجعه و غیر راجعه در جدول ۱ نشان داده شده است.

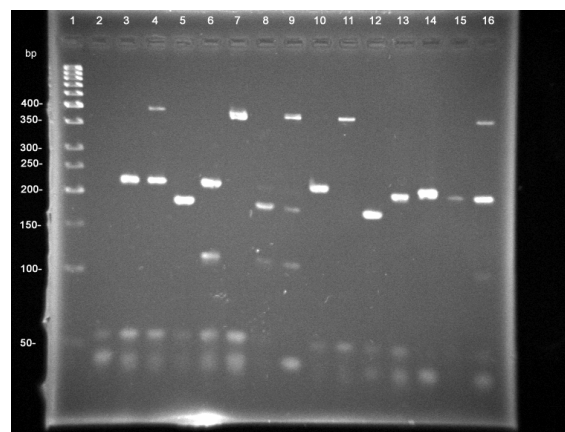
بحث

در این مطالعه از ۲۵۴ بیمار دارای علائم ولوواژینیت کاندیدیایی نمونه‌گیری شد. عده‌ای از بیماران به علت آلودگی شدید نمونه کشت

میکرولیتزر از هر پرایمر با آب مقطر به حجم ۵۰ میکرولیتزر رسانده شد که در هر PCR میزان چهار میکرولیتزر از این ترکیب به مخلوط واکنشی اضافه گردید. حجم مخلوط واکنشی بعد از افزودن پرایمرها و DNA نمونه‌ها با آب دیونیزه به ۲۰ میکرولیتزر رسانده و میکروتیوب‌ها برای تکثیر DNA در داخل دستگاه Eppendorf Mastercycler Gradient قرار داده شدند. تنظیم دستگاه برای انجام یک سیکل سه دقیقه‌ای با دمای $۹۴^{\circ}C$ به منظور دناتوراسیون اولیه، ۳۵ سیکل شامل: یک دقیقه با دمای $۹۴^{\circ}C$ برای دناتوراسیون، یک دقیقه در دمای $۶۰^{\circ}C$ برای اتصال پرایمرها و یک دقیقه در دمای $۷۲^{\circ}C$ برای پلیمریزاسیون توسط Taq پلیمرز و در نهایت یک سیکل پنج دقیقه‌ای با دمای $۷۲^{\circ}C$ برای پلیمریزاسیون نهایی صورت گرفت. محصولات PCR روی ژل آگاروز ۲٪ (Roche) الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید (Sigma) رنگ‌آمیزی شدند. سپس باندهای روی ژل، تحت اشعه UV با دستگاه Gel Documentation (UVdoc, GAS9000, England) عکس‌برداری شد. باندها با نرم‌افزار UVIsoft اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

نمونه‌های استخراج شده DNA با استفاده از multiplex PCR تکثیر شدند و پس از الکتروفورز محصولات PCR (شکل ۱) نتایج زیر به دست آمد: در این مطالعه ۱۷۵ خانم مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیایی



شکل ۱- multiplex PCR توسط پرایمرهای JTS1، JTS2، CA3 و CA4. ردیف ۱ مارکر DNA ۵۰ bp، ردیف ۲ کنترل منفی، ردیف‌های ۳ تا ۸ و ردیف‌های ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۵ مربوط به نمونه‌های ۱۱ بیمار، ردیف ۹ ترکیب *C. krusei* CBS573، *C. glabrata* CBS2175 و *C. albicans* ATCC14053، ردیف ۱۰ *C. tropicalis* CBS94 و ردیف ۱۴ *C. parapsilosis* CBS2195 می‌باشد.

بیشترین عامل ولوواژنیت کاندیدیایی *C. albicans* با شیوع ۴۳٪ تا ۹۱٪ بوده است. در مطالعه ما *C. glabrata* از نظر شیوع در رده دوم قرار داشت که در سایر مطالعات مشابه،^{۳۶-۳۳ و ۳۷} نیز همین نتیجه به دست آمده است و طیف شیوع آن از ۴/۹٪ تا ۳۴/۷٪ بوده است. به همین ترتیب شیوع گونه‌های دیگر نیز در مطالعه ما مشابه گزارشات دیگر می‌باشد.^{۳۹-۳۷ و ۳۴-۲۹} در تحقیقات مشابهی که پیش از این در ایران، در شهرهای ساری، یاسوج و قزوین انجام شده است نیز شایع‌ترین گونه‌ها کاندیدا آلبیکنس و سپس کاندیدا گلابراتا بوده است.^{۴۰-۴۲} بنابراین در مجموعه این مطالعات، همچون نتایج به دست آمده از این تحقیق، افزایش شیوع گونه‌های غیرآلبیکنس به خصوص افزایش گونه کاندیدا گلابراتا قابل توجه می‌باشد، که خود شاهدی بر افزایش شیوع گونه‌های مقاوم به داروی ضد قارچی در ایجاد ولوواژنیت کاندیدیایی است. در این تحقیق از روش multiplex PCR به منظور شناسایی گونه‌های کاندیدا در موارد ولوواژنیت کاندیدیایی استفاده شد. این روش از پرایمرهای قارچی یونیورسال ITS1 و ITS2 برای تکثیر قسمتی از ناحیه 18S rDNA، ناحیه ITS1 مجاور آن و بخش کوچکی از ناحیه 5.8S rDNA بهره می‌گیرد. جفت پرایمر دیگر (CA3 و CA4) نیز برای تکثیر قسمتی از ناحیه ITS2 در کاندیدا آلبیکنس به کار رفت. این روش حداکثر در طی شش ساعت قابل انجام است و از مزایای دیگر این روش شناسایی موارد عفونت هم‌زمان با چند کاندیدا در یک آزمایش بود. کیت تجارتي استخراج DNA ژنومی (AccuPip[®] Genomic DNA Extraction Kit, Bioneer Corporation) استفاده شده در این تحقیق نیز بسیار کارآمد و روشی ساده برای استخراج DNA از نمونه‌ها داشت و زمان لازم برای انجام استخراج DNA با این کیت ۳۵ دقیقه بود. با این کیت دیگر نیازی به فنل- کلروفرم برای تخلیص DNA نبود. از آنجا که rDNA قارچ‌ها تعدد کپی دارد (۴۰ تا ۸۰ کپی در ژنوم هاپلوئید)، استفاده از این قطعات برای شناسایی گونه‌های کاندیدا نتایج خوبی به دست می‌دهد.

با قارچ‌هایی مثل آسپرژیلوس‌ها که خالص‌سازی کاندیدا را غیر ممکن می‌ساخت و یا وجود ولوواژنیت‌های غیرکاندیدیایی از مطالعه حذف شدند. با توجه به ماهیت بیماری و اینکه بروز این بیماری در دوره باروری رخ می‌دهد میانگین سنی بیماران حدود ۳۱/۳۸ سال (SD=۸/۲۲) به دست آمد که در هر دو گروه ولوواژنیت کاندیدیایی راجعه و غیر راجعه نیز حدود ۳۱ سال بود و اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند. ۸۹/۷٪ از بیماران توسط یک نوع از کاندیداها مبتلا به ولوواژنیت کاندیدیایی شده بودند و در ۱۰/۳٪ موارد بیش از یک نوع کاندیدا عامل بیماری بود که بین دو گروه بیماران مبتلا به ولوواژنیت کاندیدیایی راجعه و غیر راجعه اختلاف آماری معنی‌داری از این نظر وجود نداشت. در مطالعه Fan، از ۱۰۷۰ بیمار مبتلا به ولوواژنیت کاندیدیایی، تنها در ۰/۰۲٪ موارد بیش از یک گونه کاندیدا عامل بیماری بود.^{۲۶} در مطالعه Richter عامل بیماری در ۴/۸٪ موارد بیشتر از یک گونه کاندیدا بود که نسبت به مطالعه ما کمتر می‌باشد و از نظر شیوع گونه‌های مختلط در یک بیمار، مشابه نتایج ما بود.^{۲۷} شایع‌ترین حالت، جداسازی گونه‌های *C. albicans* و *C. glabrata* از یک بیمار بود و سایر موارد مختلط نیز شیوعی کم و بیش مشابه داشتند.^{۲۷} در مطالعات دیگر، شیوع موارد بیشتر از یک گونه کاندیدا در یک بیمار به ترتیب ۱۳٪، ۵٪، ۰/۱۲٪ بوده است.^{۲۸-۳۰} به نظر می‌رسد شیوع موارد ولوواژنیت کاندیدیایی که چند گونه کاندیدا در آن دخیل هستند در بیماران مورد بررسی ما نسبت به مقالات مشابه افزایش نشان داده است که این موضوع می‌تواند از نظر بهداشتی مهم باشد اما نیازمند مطالعه‌ای گسترده در سطح کشور می‌باشد. شایع‌ترین عوامل بیماری ولوواژنیت کاندیدیایی در این مطالعه به ترتیب *C. albicans*، *C. glabrata*، *C. tropicalis*، *C. krusei*، *C. parapsilosis* و *C. guilliermondii* بودند و بین دو گروه بیماران ولوواژنیت کاندیدیایی راجعه و غیر راجعه نیز از نظر شیوع انواع کاندیدا اختلاف آماری معنی‌دار به دست نیامد. در تمامی گزارشات مشابه^{۳۶-۳۱ و ۲۷} نیز

References

- MacNeill C, Carey JC. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Curr Womens Health Rep* 2001;1(1):31-5.
- Nyirjesy P. Chronic vulvovaginal candidiasis. *Am Fam Physician* 2001;63(4):697-702.
- Kunzelmann V, Tietz HJ, Rossner D, Czaika V, Hopp M, Schmalreck A, et al. Prerequisites for effective therapy of chronic recurrent vaginal candidiasis. *Mycoses* 1996;39 Suppl 1:65-72.
- Handa VL, Stice CW. Fungal culture findings in cyclic vulvitis. *Obstet Gynecol* 2000;96(2):301-3.
- Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Doern GV, Brandt ME, et al. Trends in species distribution and susceptibility to fluconazole among blood stream isolates of Candida species in the United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;33(4):217-22.
- Warren NG, Hazen KC. Candida, Cryptococcus, and other yeasts of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover PC, Tenover RH, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology (ASM) Press; 1999. p. 1184-99.

7. Dooley DP, Beckius ML, Jeffrey BS. Misidentification of clinical yeast isolates by using the updated Vitek Yeast Biochemical Card. *J Clin Microbiol* 1994;32(12):2889-92.
 8. Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1454-9.
 9. Shin JH, Nolte FS, Holloway BP, Morrison CJ. Rapid identification of up to three *Candida* species in a single reaction tube by a 5' exonuclease assay using fluorescent DNA probes. *J Clin Microbiol* 1999;37(1):165-70.
 10. Jordan JA. PCR identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair. *J Clin Microbiol* 1994;32(12):2962-7.
 11. Haynes KA, Westerneng TJ. Rapid identification of *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. krusei* by species-specific PCR of large subunit ribosomal DNA. *J Med Microbiol* 1996;44(5):390-6.
 12. Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. *J Clin Microbiol* 1998;36(11):3260-5.
 13. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1353-60.
 14. Burgener-Kairuz P, Zuber JP, Jaunin P, Buchman TG, Bille J, Rossier M. Rapid detection and identification of *Candida albicans* and *Torulopsis (Candida) glabrata* in clinical specimens by species-specific nested PCR amplification of a cytochrome P-450 lanosterol-alpha-demethylase (L1A1) gene fragment. *J Clin Microbiol* 1994;32(8):1902-7.
 15. Molnar O, Messner R, Prillinger H, Stahl U, Slavikova E. Genotypic identification of *Saccharomyces* species using random amplified polymorphic DNA analysis. *Syst Appl Microbiol* 1995;18: 136-45.
 16. Dupont J, Magnin S, Marti A, Brousse M. Molecular tools for identification of *Penicillium* starter cultures used in the food industry. *Int J Food Microbiol* 1999;49(3):109-18.
 17. 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.
 18. Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol* 1992;30(12):3249-54.
 19. Liu D, Coloe S, Jones SL, Baird R, Pedersen J. Genetic speciation of *Candida* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* 1996;145(1):23-6.
 20. 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.
 21. Steffan P, Vazquez JA, Boikov D, Xu C, Sobel JD, Akins RA. Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. *J Clin Microbiol* 1997;35(8):2031-9.
 22. Thanos M, Schonian G, Meyer W, Schweynoch C, Graser Y, Mitchell TG, et al. Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. *J Clin Microbiol* 1996;34(3):615-21.
 23. Tietz HJ, Küssner A, Thanos M, De Andrade MP, Presber W, Schönian G. Phenotypic and genotypic characterization of unusual vaginal isolates of *Candida albicans* from Africa. *J Clin Microbiol* 1995;33(9):2462-5.
 24. Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J Clin Microbiol* 2001;39(10):3466-71.
 25. 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. *J Clin Microbiol* 2001;39(10):3617-22.
 26. Fan SR, Liu XP, Li JW. Clinical characteristics of vulvovaginal candidiasis and antifungal susceptibilities of *Candida* species isolates among patients in southern China from 2003 to 2006. *J Obstet Gynaecol Res* 2008;34(4):561-6.
 27. 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.
 28. Willinger B, Manafi M. Evaluation of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. *Mycoses* 1999;42(1-2):61-5.
 29. Kunzelmann V, Tietz HJ, Rossner D, Czaika V, Hopp M, Schmalreck A, et al. Prerequisites for effective therapy of chronic recurrent vaginal candidiasis. *Mycoses* 1996;39 Suppl 1:65-72.
 30. Abu-Elteen KH. Increased incidence of vulvovaginal candidiasis caused by *Candida glabrata* in Jordan. *Jpn J Infect Dis* 2001;54(3):103-7.
 31. Fleury FJ. Adult vaginitis. *Clin Obstet Gynecol* 1981;24(2):407-38.
 32. 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.
 33. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994;32(8):1923-9.
 34. Pádua RAF, Guilhermetti E, Svidzinski TIE. In vitro activity of antifungal agents on yeasts isolated from vaginal secretion. *Maringá* 2003;25(1):51-4.
 35. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. In vitro susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species to itraconazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods. *J Clin Microbiol* 2005;43(8):3807-10.
 36. Arzeni D, Del Poeta M, Simonetti O, Offidani AM, Lamura L, Balducci M, et al. Prevalence and antifungal susceptibility of vaginal yeasts in outpatients attending a gynecological center in Ancona, Italy. *Eur J Epidemiol* 1997;13(4):447-50.
 37. Houang ET, Chu KC, Koehler AP, Cheng AF. Use of CHROMagar *Candida* for genital specimens in the diagnostic laboratory. *J Clin Pathol* 1997;50(7):563-5.
 38. Ahmad A, Khan AU. Prevalence of *Candida* species and potential risk factors for vulvovaginal candidiasis in Aligarh, India. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;144(1):68-71.
 39. 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.
۴۰. شکوهی طاهره. ولووواژینیت کاندیدیایی در مراجعه کنندگان به درمانگاه های زنان شهرستان ساری در سالهای ۱۳۷۳-۱۳۷۲. مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان ۱۳۷۵: شماره ۱۹ و ۱۸: صفحات ۲۲ تا ۲۷.
۴۱. صفری میرزا، یزدان پناه بهروز، ملکزاده جان محمد. شیوع عفونت های علامت دار واژن و ارتباط آن با روش های پیشگیری از بارداری در زنان مراجعه کننده به درمانگاه زنان پاسوج. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی پاسوج ۱۳۷۷: سال ۳، شماره ۹ و ۱۰: صفحات ۱۵ تا ۲۲.
۴۲. آقامیریان محمد رضا، کشاورز داوود، جهانی هاشمی حسن. صادقی قزوینی مجوبه. عوامل ولووواژینیت کاندیدیایی در مراجعین به مراکز درمانی قزوین. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین ۱۳۸۶: سال ۱۰، شماره ۳: صفحات ۳۵ تا ۴۰.

Identification of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis by Multiplex PCR method

Received: September 09, 2009 Accepted: October 24, 2009

Abstract

Mahmoudi Rad M.^{1*}
Zafarghandi AS.²
Amel Zabihi M.²
Mirdamadi Y.³
Rahbarian N.¹
Abbasabadi B.²
Shivaei M.²
Amiri Z.⁴

1- Cellular and Molecular Biology Research Center, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences
2- Department of Gynecology, Obstetrics and Infertility, Mahdiah Hospital, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences
3- Department of Biology, Khatam University

4- Department of Basic Sciences, Nutrition School, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences

Background: Vulvovaginal candidiasis is a fungal disease with itching, and vaginal thick white discharge. Most of non-*albicans* species have less sensitivity to azoles. So, definition of *Candida* species which lead to vulvovaginal candidiasis is very important to perfect usage of drugs. In the present study 191 *Candida* isolates from 175 patients who admitted in Gynecology department of Mahdiah Hospital during the period 1385-1387 were identified by multiplex PCR.

Methods: One hundred seventy five vaginal swab specimens from patients were cultured on Sabouraud Dextrose Agar (SDA). The internal transcribed spacer 1 (ITS1) region between the 18S and 5.8S rRNA genes and a specific DNA fragment within the ITS2 region of *Candida albicans* were amplified and the multiplex PCR products were separated by electrophoresis in 2% agarose gel (200 mA, 140V), visualized by staining with ethidium bromide, and photographed.

Results: One hundred ninety one *Candida* isolates were identified in vaginal swab specimens from 175 patients. In 89.7% of cases, single *Candida* species and in 10.3% cases, multiple *Candida* species were isolated. *C. albicans* (65.1%), *C. glabrata* (13.1%), *C. tropicalis* (6.2%), *C. krusei* (4%), *C. guilliermondii* (0.6%), *C. parapsilosis* (0.6%), *C. glabrata* and *C. albicans* (5.7%), *C. albicans* and *C. parapsilosis* (1.1%), *C. glabrata* and *C. tropicalis* (0.6%), *C. krusei* and *C. tropicalis* (0.6%), *C. albicans* and *C. tropicalis* (0.6%), *C. krusei* and *C. albicans* (0.6%), *C. glabrata* and *C. krusei* (0.6%), and *C. glabrata* and *C. krusei* and *C. albicans* (0.6%) were the cause of disease.

Conclusion: Our findings suggest that, the common cause of both recurrent and non-recurrent vulvovaginal candidiasis was *C. albicans*, and then *C. glabrata*. Also the most common mixtures of *Candida* species were combination of them.

Keywords: *Candida*, vulvovaginal candidiasis, polymerase chain reaction.

* Corresponding author: Cellular and Molecular Biology Research Center, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Evin, Tehran, Iran
Tel: +98-21-23872552
email: mahnazrad@gmail.com