Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 8, Number 3 (10-2014)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Comparison of Biochemical and Molecular Methods for the Identification of *Candida* Species Causing Vulvovaginal Candidiasis and Recurring Vulvovaginal Candidiasis

Kambiz Diba[1], Atefeh Namaki[2], Haleh Ayatolahi[3], Haleh Hanifian[4]

1. Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.
2. Department of Gynecology, Arefian General Hospital, Urmia , Iran.
3. Department of Gynecology, Motahari University Hospital, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.
4. Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.

Article Information

Article history:
Received:2012/04/10
Accepted:2013/06/25
Available online:2014/07/20

Article Subject:
Medical Mycology

IJMM 1393; 8(3): P 45-50

Corresponding author at:

Dr Kambiz Diba

Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.

Email:
kambiz37diba@gmail.com

Abstract

Background and Aim: Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a common clinical problem that affects most adult women at least once during their life time. Many also have frequently recurring yeast infections (RVVC) caused by *Candida albicans* and non albicans *Candida* species. We studied use of CHROMagar Candida and PCR-RFLP to compare their differential ability and time consuming.

Materials and Methods: Vaginal discharge samples of all women with clinical signs were cultured on CHROM agar Candida medium .After an overnight incubation at 37°C, growth coloration of Candida isolates compared with those of standard patterns. PCR-RFLP using restriction enzyme *Msp I* were used for the identification of more *Candida* isolates in the level of species.

Results: Totally 192 vaginal discharge samples were obtained from the women with vulvovaginitis clinical signs. 90 patients had Candida vulvovaginitis, 11 case were RVVC. The *Candida species* which were identified included, *C.albicans* (78.8%), *C.glabrata* (7.7 %), *C. parapsilosis* (6.6%) , *C. tropicalis* (4.4 %) and C. *krusei* (2.2 %).

Conclusions: We concluded that, use of PCR-RFLP is recommended for the identification of *Candida* species causing VVC and RVVC in accompany with the culture based methods, regarding to its differential power and speed.

Key Words: Candida, Vulvovaginitis, PCR, RFLP, CHROMagar

Copyright © 2014 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Diba K, Namaki A, Ayatolahi H, Hanifian H. Comparison of Biochemical and Molecular Methods for the Identification of Candida Species Causing Vulvovaginal Candidiasis and Recurring Vulvovaginal Candidiasis. Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (3) :45-50

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۸ – شماره ۳ – پاییز ۱۳۹۳

Journal homepage: www.ijmm.ir

مقایسه روش های بیوشیمیایی و مولکولی در تشخیص و شناسایی گونه های کاندیدای عامل ولوواژینیت شایع و عود کننده

کامبیز دیبا [۱]، عاطفه نمکی [۲]، هاله آیت الهی [۳]، هاله حنیفیان [۴]

۱. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پرشکی ارومیه، ارومیه، ایران.
۲. بخش جراحی زنان، بیمارستان شهید عافیان، ارومیه ، ایران.
۳. گروه زنان، بیمارستان شهید مطهری، دانشگاه علوم پرشکی ارومیه، ارومیه، ایران.
۴. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پرشکی ارومیه، ارومیه، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت:۱۳۹۱/۰۳/۱۰
پذیرش:۱۳۹۲/۰۴/۲۵
انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۷/۰۵
موضوع:
قارچ شناسی پزشکی

IJMM 1392; 8(3): P 45-50

نویسنده مسئول:
دکتر کامبیز دیبا

مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پرشکی ارومیه، ارومیه. ایران.

ایران.تلفن: ۰۹۱۲۴۴۶۴۹۷۲

پست الکترونیک:
kambiz37diba@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: کاندیدیازیس ولوواژینال (VVC) یکی از شایعترین عفونت‌های ناحیه واژینال می باشد و در مواردی بدلیل دخالت سویه های مقاوم *C. albicans* و یا گونه های دیگر غیر آلبیکانس عود مجدد بیماری RVVC رخ می دهد. در این مطالعه، کشت بر روی کروم آگار و روش مولکولی PCR-RFLP صرفا به لحاظ توانایی تفکیک بین گونه ای و سرعت عمل مقایسه گردید.

مواد و روش کار: نمونه سواب واژینال زنان علامت دار در تیوب های مخصوص به آزمایشگاه ارسال گردید. تمامی نمونه ها بر روی محیط کروم آگار کاندیدا برده شده، پس از انکوباسیون رنگزایی حاصل رشد مخمر با الگو های استاندارد مقایسه شدند. همچنین روش PCR-RFLP با کاربرد آنزیم محدودساز *Msp I* برای شناسایی سویه ها مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: بطورکلی از ۱۹۲ نمونه بیمار علامت دار ولوواژینیت مورد مطالعه، ۹۰ سویه کاندیدایی به دست آمد که ۱۱ سویه مربوط به بیماران با عفونت راجعه بودند. یافته های مولکولی شامل: *کاندیدا آلبیکانس* ۷۱ (۷۸,۸٪) ، *کاندیدا گلابراتا* ۷ (۷,۷٪) ، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* ٦ (٦,٦٪) ، *کاندیدا تروپیکالیس* ٤ (٤,٤٪) و *کاندیدا کروزئی* ۲ جدایه (۲,۲٪) بودند که بسیار نزدیک به داده های روش کروم آگار می باشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه روش مولکولی از سرعت عمل بالاتر حدود ٦-٥ ساعت پس از یک کشت شبانه نسبت به روش بیوشیمیایی برخوردار بود لذا کاربرد روش آزمون شده در شناسایی گونه های کاندیدای عامل VVC و RVVC به همراه روش های مبتنی بر کشت توصیه می گردد.

کلمات کلیدی : کاندیدا، Vulvovaginitis, PCR, RFLP, CHROMagar

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

گونه های مختلف کاندیدا، از جمله *کاندیدا آلبیکانس* همزیست-های اختیاری انسان هستند که عمدتا در دستگاه گوارشی ساکن می باشند یا اینکه در محیط زندگی انسان همواره یافت می‌شوند. این دسته از قارچ ها در جائی که مقاومت میزبان به عفونت بطور موضعی یا سیستمیک کاهش می یابد بیماری‌زا می‌گردند. در چنین شرایطی گونه های مختلف کاندیدا قادر به ایجاد بیماری در هر ناحیه از بدن انسان می باشند (۱). شیوع عفونت‌های کاندیدائی در طی ۴۰ سال گذشته افزایش قابل ملاحظه ای داشته اند. عوامل فوق الذکر علاقه بسیاری را برای مطالعه در تمام جنبه های بیولوژی کاندیداها در ارتباط با تدابیر پزشکی ایجاد نموده اند. در این راستا یافته های بیولوژی مولکولی، فرصت‌های بالنده ای برای ردیابی مستقیم و غیر مستقیم عفونت های کاندیدائی ایجاد نموده اند. گزارشات آماری اخیر از کشور های آمریکا و انگلیس افزایش چشمگیری را در میزان ولوواژینیت کاندیدائی در طی دهه های گذشته نشان می دهد و قارچ کاندیدا اکنون به عنوان دومین عامل شایع عفونت های واژینال شناخته می شود. حدودا ۵۵٪ زنان جهان حداقل یک اپیزود از (VVC: Vulvovaginal candidiasis) را

در طی سالهای باروری خود تجربه می کنند که ۵۰-۴۰ ٪ آنان دچار عفونت مجدد می گردند. گونه های کاندیدا عوامل بیماری هستند که ممکن است از ناحیه واژن حداقل۲۰٪ زنان در سن باروری که سالم و بدون علامت هستند جدا سازی شود (۲). درصدی از عفونت‌های ولوواژینیت کاندیدایی از نوع مقاوم و راجعه هستند که با عنوان RVVC (Vulvovaginal candidiasis) شناخته می شود. تاکنون ارزیابی های انجام گرفته برای کشف مکانیزم عامل واژینیت های عود کننده ناموفق بوده اند. عفونت RVVC در مواردی که *کاندیدا آلبیکنس* عامل ایجاد کننده می‌باشد به ندرت ناشی از مقاومت دارویی می‌باشد، هر چند که گزارشاتی از این نوع وجود دارد در حالیکه در عفونت‌های با عوامل *C. glabrata* و *C.tropicalis* فقدان حساسیت به داروهای ضد قارچی آزول میتواند عامل عفونت مزمن یا راجعه باشد. عوامل دیگری چون آلودگی مدفوعی ناحیه واژینال که به کرات ایجاد می گردد و نیز نوع پوشش ها در زمینه بیماریهای راجعه قرار می گیرند که البته بیشتر مرتبط با گونه *C. albicans* هستند. به هر ترتیب عفونت‌های ولوواژینیت کاندیدایی چه نوع شایع و چه شکل راجعه نیاز به مطالعات بومی برای بررسی بیشتر زمینه های بیماری دارد. این مطالعه با تمرکز بیشتر بر روی گونه های غیر *کاندیدا آلبیکانس* از روش های مختلف برای شناسایی دقیق تر عوامل ایجاد کننده بهره برده و به منظور بررسی روش های سریع تر در شناسایی گونه های کاندیدای جداسازی شده از عفونتهای واژینال، کاربرد کشت بر روی کروم آگار و روش مولکولی PCR-restriction fragment length polymorphism صرفا به لحاظ توانایی تفکیک بین گونه ای و سرعت عمل مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه ها:

این مطالعه در فاصله زمانی بهار ۱۳۸۸ تا تابستان ۱۳۸۹ به مدت یکسال و دو ماه در محل آزمایشگاه تحقیقات قارچ شناسی پزشکی دانشکده پزشکی ارومیه انجام گرفت. نمونه‌های مطالعه شامل سوآب‌های واژینال بیماران علامت دار مشکوک به ولوواژینیت کاندیدایی بودند. بیماران علامت دار از میان مراجعه کنندگان به درمانگاه تخصصی زنان کوثر و بیمارستان عارفیان شهر ارومیه و همچنین چند مطب تخصصی زنان انتخاب شدند و دو یا سه اپیزود عفونت در طول یک سال به عنوان عفونت ولوواژینیت کاندیدایی عود کننده (RVVC) در نظر گرفته شد. البته انتخاب افراد، میزان نمونه و روش برداشت نمونه با سواب بر عهده پزشک متخصص زنان بوده است. سواب ها در هنگام نمونه برداری استریل بوده و پس از برداشتن نمونه ترشحات واژن، در لوله های کوچک ۱/۵ میلی لیتری (اپندورف) حاوی ۰/۵ میلی لیتر نرمال سالین استریل قرار داده به آزمایشگاه قارچ شناسی پزشکی منتقل شدند.

آزمایش مستقیم:

در آزمایشگاه اسمیر های تهیه شده بروش های شفاف سازی و رنگ آمیزی در زیر میکروسکوپ با درشت‌نمایی ۴۰ و ۱۰۰ از نظر چند ارگانیزم شایع در عفونت های واژینال: کاندیداها، *تریکوموناس واژینالیس*، *گاردنرلا واژینالیس* و *نایسریا گونوره آ* بررسی صورت گرفت. جلوه های اختصاصی هریک از موارد مذکور با توجه به روش های تشخیصی جاری برای شناسایی و تفکیک ارگانیزم های مطرح در عفونت‌های واژینال در حدکلی مورد استفاده قرار گرفت، از جمله *نایسریا گونوره آ* با مشاهده دیپلوکوکسی‌های گرم منفی، *گاردنرلا واژینالیس* با حضور سلولهای نشانگر (Clue cell) ، *تریکوموناس واژینالیس* با دیدن تک یاخته فلاژل دار متحرک در نمونه و گونه های مخمری با مشاهده میکروسکوپی هیف کاذب و یا بلاستوکونیدی‌ها تشخیص داده شدند (۳).

کشت و جداسازی:

در صورت مثبت بودن آزمایش از نظر مخمرها، کشت نمونه بر روی محیط پایه سابورودگلوکز آگار بدون پادزیست به همراه کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید (SCC) انجام شد. در نتیجه رشد، پیدایش کلنی ها با قوام خامه ای به رنگ سفید و شیری با سطح صاف که بتدریج چین می خورد نشان دهنده رشد مخمرهای جنس کاندیدا بودند. پس از تأیید رشد مخمر پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس از کلنی های منفرد، به دو محیط کشت افتراقی انتقال یافتند.

الف) CMA (Corn Meal Agar) :

محیطی حاوی عصاره ذرت و آگار می‌باشد و روش کشت بدین ترتیب بود که ابتدا دو شیار موازی هم بر روی محیط کشت داخل پلیت ایجاد شده، سپس داخل شیارها مملو از کلنی های رشد کرده بر روی محیط پایه SCC می گردد سپس سطح آگار محل تلقیح با یک لامل استریل پوشانده شده برای انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. در این محیط برخی گونه های کاندیدا بر اساس نوع و شکل سلول‌ها،

تشکیل هیف و سودوهیف و آرایش رشد مخمر ها بر روی شاخه-ها افتراق داده شدند.

ب) CHROM Agar:

روش کشت بدین ترتیب بود که یا با ایجاد سوسپانسیون مخمری در سرم فیزیولوژی، یک لوپ از آن بر روی Hicrome Candida Differential agar (HIMEDIA, Mumbai, India) گسترش داده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. همچنین یک لوپ کامل از کلنی مخمری در شیاری داخل محیط کشت CMA (Scharlou Chemie, S.A, Barcelona, European Union) تلقیح گردید. محیط کروم آگار معمولا پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مورد بررسی واقع میشوند روش افتراق مخمرها بدین ترتیب بود که : تشکیل رنگ زرد مایل به سبز یا سبز مایل به آبی، *کاندیدا آلبیکنس*؛ رنگ آبی خاکستری تیره با حاشیه های قهوه ای تا بنفش، *کاندیدا تروپیکالیس* و کلنی های تخت و گسترده با رنگ صورتی مایل به قهوه ای، *کاندیدا کروزه-ای* و رنگ ارغوانی تیره و خاکستری ، *کاندیدا گلابراتا* و ترایکوسپورون را شناسایی می کردند. در محیط CMA بسیاری از گونه های کاندیدا با آرایش رشد متفاوتی ظاهر می گردند توان افتراق بین گونه ها را تاحدودی ایجاد می کنند.

تست مولکولی PCR-RFLP:

در این مطالعه روش مولکولی PCR-RFLP برای شناسایی گونه های غیر آلبیکانس کاندیدا و افتراق آنها از یکدیگر و با *کاندیدا آلبیکانس* مورد استفاده قرار گرفت. منطقه ژنی ITS (Internal transcript spacer) مربوط به ژن ریبوزومال DNA برای تکثیر انتخاب گردید. برای تکثیر این ناحیه ژنی از یک روش بدون نیاز به استخراج بنام Rapid Colony PCR استفاده گردید (۴). سلولهای مخمری مستقیماً به پروفایل PCR برده شده در فرآیند اخیر از یک جفت پرایمر یونیورسال:{ITS- 5- (TCCGTA GGT GAA CCT GCG G-3) به عنوان پیشرو و (ITS-4 5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3) به عنوان پرایمر معکوس، از مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دکتر Mirhendi، ایستگاه تحقیقات بهداشتی اصفهان، TUMS خریداری شد} استفاده گردید و برای تأیید آمپلیفیکاسیون قطعه ژنی، محصول PCR الکتروفورز افقی بکار برده شد. سپس با کاربرد آنزیم محدودساز بنام *Msp* I، اقدام به هضم قطعات تکثیر یافته DNA ناحیه ژنی ITS نموده تا با توجه به الگوهای برش متفاوت در گونه های مختلف، امکان شناسایی و تفکیک بین گونه های کاندیدا از روی جداول الگو فراهم گردید (۵).

یافته‌ها

در طول مدت مطالعه، تعداد کل ۱۹۲ نمونه سواب واژینال مشکوک به VVC و RVVC فراهم گردید که یافته های تشخیص آزمایشگاهی به ترتیب ذیل می باشد. از میان تعداد کل نمونه های مورد بررسی ۱۰۷ مورد از نظر عوامل باکتریایی و قارچی مثبت بودند و در ۸۶ مورد هیچگونه عوامل عفونی یافت نگردید. در میان عوامل عفونی یافت شده، ۸۹ مورد را مخمرها و ۱۹ مورد را باکتری ها تشکیل می دادند (جدول ۱).

جدول ۱ : فراوانی های و درصد ارگانیسم های تشخیص داده شده در نمونه بیماران مشکوک به ولوواژینیت کاندیدایی

عامل ولوواژینیت	تعداد	درصد
باکتری	۱۷	٪ ۱۵/۸
مخمر	۸۷	٪ ۸۱/۳
عفونت توام	۳	٪ ۲/۸
کل	۱۰۷	۱۰۰

شناسایی مخمرها با دو روش، مورفولوژیک و مولکولی انجام گرفت که با اختلاف کمی منتهی به شناسایی گونه های کاندیدا گردید. در روش مورفولوژیک با کاربرد دو محیط کشت افتراقی مخمر ها (CMA, CHA) گونه های *کاندیدا آلبیکانس*، *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا گلابراتا* ، *کاندیدا کروزئی*، *کاندیدا گیلرموندیی* و *کاندیدا دوبلینینسیس* شناسایی شدند (جدول۲). نسبت درصد *کاندیدا آلبیکانس* و گونه های دیگر در جدول ۲ مشاهده می‌گردد. چنانکه ملاحظه می گردد، یافته-های *C.albicans* نسبت به گونه های دیگر کاندیدا درصد فراوانی بالایی (۷۶/۶۶ ٪) ۶۹ را تشکیل می دهند. در پی آن *C. glabrata* ، *C. tropicalis, parapsilosis* قرار گرفتند و دو گونه *C. dubliniensis* و *C. guilliermondii* هر یک با (۱/۱۱ ٪) ۱ سویه کمترین درصد موارد را نشان دادند (جدول۲).

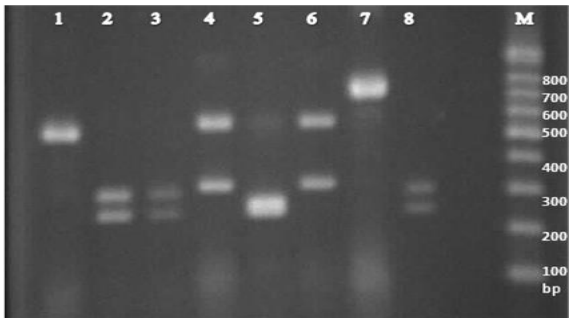
جدول ۲: فراوانی و درصد گونه های مختلف کاندیدا جداسازی شده از موارد عفونت شایع و راجعه با روش مورفولوژی مبتنی بر رشد بر محیطهای کشت CMA و CHA

گونه های کاندیدا	RVVC	VVC	مجموع
کاندیدا آلبیکانس	۲	۶۷	۶۹ (٪۷۶/۶۶)
کاندیدا تروپیکالیس	۴	۰	۴ (٪۴/۴۴)
کاندیدا گلابراتا	۳	۴	۷ (٪۷/۷۷)
کاندیدا کروزئی	۰	۲	۲ (٪۲/۲۲)
کاندیدا پاراپسیلوزیس	۲	۴	۶ (٪۶/۶۶)
کاندیدا گیلرموندیی	۰	۱	۱ (٪۱/۱۱)
کاندیدا دوبلینینسیس	۰	۱	۱ (٪۱/۱۱)
کل	**۱۱ (٪۱۲/۲۲)**	**۷۹ (٪۸۷/۷۷)**	**۹۰ (٪۱۰۰)**

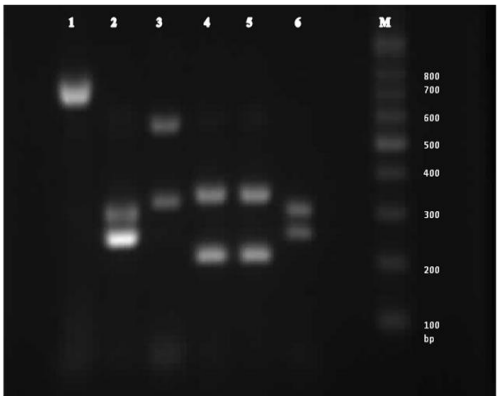
همانطوریکه گفته شد، شناسایی بر پایه مولکولی با روش PCR-RFLP اختلاف چندانی به لحاظ درصد فراوانی با روش سنتی نداشت و تنها اختلاف آن عدم شناسایی دو گونه *C. guilliermondii* و *C. dubliniensis* در روش مولکولی بود که به جای آن ۲ سویه *کاندیدا آلبیکانس* تشخیص داده شد. در روش اخیر گونه *C. krusei* با (٪ ۲/۲۲) ۲، کمترین درصد فراوانی را تشکیل داده است (جدول ۳).

بحث

در دهه های اخیر روش های تشخیص مولکولی با استقبال زیادی در تشخیص های آزمایشگاهی روبرو شده اند. این روش ها بسرعت در حیطه تشخیص عفونت ها و شناسایی عوامل ایجاد کننده راه یافته اند. از جمله مواردی که ردپای تشخیص های مولکولی را می توان در آن جستجو نمود، تشخیص کاندیدیازیس و شناسایی عوامل کاندیدا می باشد. بطور کلی روش های شناسایی گونه های کاندیدا و افتراق بین آنها در چند حیطه قابل بررسی می باشد. استفاده از خصوصیات مورفولوژیک رشد شامل: بررسی رشد، آرایش سلول‌های جوانه دار در کنار هم، تشکیل هیف کاذب و حقیقی و ایجاد کلامیدوکونیدی های متورم یکی از راههای تشخیصی می باشد. Suarez (۶) ، Linhares (۷) و Hernando (۸) برای شناسایی گونه های کاندیدایی عامل RVVC و افتراق آنها از *C. albicans* روش های مورفولوژیک شامل اسلایدهای میکروسکوپی و محیط‌های کشت را بکار بردند.



شکل ۱: نتیجه هضم محصولات PCR تعدادی از ایزوله های مخمری جداسازی شده از نمونه های ترشحات واژینال بیماران RVVC. ستون‌های ۱-۹ شامل: *1-C. parapsilosis* و *2-C. albicans* و *3-C. albicans* و *4- C. glabrata, 5- C. krusei, 6- C.glabrata, , 8- C. albicans.* و در ستون ۷ قطعه DNA محصول PCR بریده نشده است.



شکل ۲: نتیجه RFLP محصولات PCR تعداد دیگری از ایزوله های مخمری. به ترتیب ستونهای ۶-۲ شامل: *C. albicans, C.glabrata, C.tropicalis, C.tropicalis C.albicans* می باشد و در ستون ۱ قطعه DNA محصول PCR بریده نشده است.

شکل ۳: فراوانی و درصد گونه های مختلف کاندیدا جداسازی شده از موارد عفونت شایع و راجعه با روش مولکولی PCR-RFLP

گونه های کاندیدا	RVVC	VVC	مجموع
کاندیدا آلبیکانس	۲	۶۹	۷۱ (٪۷۸/۸۸)
کاندیدا تروپیکالیس	۴	۰	۴ (٪۴/۴۴)
کاندیدا گلابراتا	۳	۴	۷ (٪۷/۷۷)
کاندیدا کروزئی	۰	۲	۲ (٪۲/۲۲)
کاندیدا پاراپسیلوزیس	۲	۴	۶ (٪۶/۶۶)
کل	**۱۱ (٪۱۲/۲۲)**	**۷۹ (٪۸۷/۷۷)**	**۹۰ (٪۱۰۰)**

در مطالعه ما محیط کشت Corn Meal Agar (CMA) برای تشکیل اشکال رویشی مخمرها مورد استفاده قرار گرفت. در این محیط بواسطه حضور پودر ذرت رشد گونه های کاندیدا تقویت

گردیده ، آرایش خاصی را بر روی سطح محیط مذکور ایجاد می-نمایند که آرایش تشکیل هایف، سودوهایف ، بلاستوکونیدی ها و کلامیدوکونیدی ها در گونه های مختلف کاندیدا متفاوت ظاهر می گردد. برپایه این تفاوت ها، برخی گونه های کاندیدایی از همدیگر افتراق داده می شوند (۲). البته می بایست توجه داشت که حساسیت این روش ها برای شناسایی گونه های غیر آلبیکانس پایین است بطوریکه محیط کشت CMA اصولاً فقط برای شناسایی و افتراق *Candida albicans* از گونه های دیگر مورد استفاده قرار می گیرد (۹). در واقع روش بالا قادر نیست با حساسیت بالا گونه های عامل ولوواژینیت عود کننده و مقاوم به درمان را افتراق دهد. در مطالعه Lascar (۱۰) مشاهده میکروسکوپی نمونه بالینی تنها در مقایسه با تشخیص بالینی روشی به نسبه مفید مطرح شده است. کاربرد محیط CMA همراه با محیط افتراقی CHROM agar Candida در این مطالعه، گونه های کاندیدایی عامل عفونت واژینال حاد و مزمن از جمله *C. guilliermondi* ، *C. dubliniensis* ، *C. tropicalis* ، *C.parapsilosis* و *C. krusei* را شناسایی نمود (جدول۲).

هرچند یافته های مولکولی ما گونه های *کاندیدا گیلرموندیی* و *کاندیدا دوبلینینسیس* را تائید نمی کند اما با این حال نمی توان حضور دو گونه اخیر را رد نمود. روش های بیوشیمیایی شامل محیط های کشت حاوی نشانگر های رنگی از روش های سریع و مطلوب برای شناسایی مخمرها می باشند و محیط کشت معروف CHROM agar Candida با حساسیت نسبتاً بالایی در شناسایی گونه های کاندیدا توسط دیگران نیز بکار رفته است (۱۴-۱۱). گذشته از کارایی نسبی روش کشت بر روی کروم آگار این روش نیز باتوجه به محدودیت دامنه شناسایی مخمرها و نیاز به طی زمان برای نتیجه گیری قطعی لذا نتوانسته است رقیب قدرتمندی برای روش های شناسایی بر پایه PCR، از جمله روش تعیین ترادف ژنی باشد. Weissenbacher (۱۵) تشخیص واژینیت کاندیدایی با روش های مبتنی بر PCR و مورفولوژی را مقایسه نمود و حساسیت بالاتر روش مولکولی را تجربه نمود. Mard (۱۶) ، Smith (۱۷) ، Astin (۱۸) و Darce Bello (۱۹) و همکارانشان همگی روش های مبتنی بر PCR را همراه با روش‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی در تفکیک و افتراق گونه های کاندیدای عامل RVVC بکار بردند.

در مطالعه حاضر روش مولکولی PCR-RFLP با کاربرد آنزیم محدودساز از نوع *Msp*I هرچند نمی توانست با قدرت تفکیک و حساسیت بالای روش مولکولی تعیین ترادف ژنی عمل نماید اما به لحاظ اینکه از سرعت نتیجه گیری و سهولت کاربرد نسبت به روش های مبتنی بر کشت برخوردار بود (۵)، لذا برای شناسایی گونه های مهم و شایع کاندیدا می توانست روش های مورفولوژیک را به چالش بکشد. نتایجی که بر این اساس حاصل شد از نظر آماری بسیار نزدیک با آنچه که در مورد کاربرد روش های مبتنی بر کشت افتراقی CMA, CHA مشاهده گردید، اما همانطور که در نتایج ملاحظه می گردد یک ناهمگونی به شکل عدم شناسایی دو گونه کاندیدا شامل : *C. guilliermondii* و *C. dubliniensis* با روش مولکولی حاصل گردید و به عبارت دقیق تر با استفاده از روش PCR-RFLP گونه های کاندیدای : *C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. krusei* و *C. parapsilosis* شناسایی شدند. این اختلاف در تعداد و درصد فراوانی یافته های دو روش: مبتنی بر PCR و مبتنی بر کشت نیز بطور جزئی دیده می شود (جدول ۲و۳). در چند مطالعه مشابه که دیگران (۱۴) و (۱۷) انجام دادند نیز نا همگونی در نتایج روش های مولکولی و مورفولوژیک حاصل شده است.

در مطالعه ای که در کشور ترکیه بر روی ۱۰۶ بیمار با علایم واژینیت انجام شد، مخمرهای جداسازی شده از نمونه سواب واژینال بدین صورت گزارش گردید: ۶۷ *کاندیدا آلبیکانس*، ۱۰ *کاندیدا گلابراتا*، ۶ *کاندیدا تروپیکالیس*، ۵ *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و ۵ *کاندیدا کروزئی*، این یافته ها با نتایج مطالعه ما مشابهت زیادی نشان می دهد؛ اما در مطالعه مشابه دیگری که در ایتالیا انجام گرفت، نسبت فراوانی *کاندیدا آلبیکانس* به گونه های غیر آلبیکانس ۹۰ به ۱۰ گزارش گردید (۲۱). در عین حال نتایج مطالعات دیگر در ونزئولا (۲۲) و اسپانیا (۲۳) یافته های بسیار مشابهی در نسبت فراوانی گونه *کاندیدا آلبیکانس* و گونه های غیر آلبیکانس را گزارش می نمایند. یافته های این مطالعه در نهایت از ترکیب دو روش مولکولی و مورفولوژی با کاربرد کورن میل آگار و کروم آگار برای شناسایی و تفکیک بین گونه-های کاندیدا به خصوص در مواردی نظیر عفونت کاندیدیازیس واژینال راجعه که گونه های متعددی به غیر از *کاندیدا آلبیکانس* نیز نقش مهمی دارند حمایت می نماید. در این ترکیب پیشنهادی ضمن اینکه از سریع ترین و مقرون به صرفه ترین روش های شناسایی گونه های کاندیدا استفاده می گردد. ضمناً

عدم موفقیت در شناسایی برخی گونه های مخمری توسط یکی از روش ها، روش دیگر به عنوان مکمل این نقص را برطرف خواهد نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله برخود لازم می دانند تا از همه عزیزانی که ما را در انجام این پروژه یاری نمودند تقدیر و تشکر نمایند.

تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

References

1. Zaini F, Mehbod ASA and, Emami M. Comprehensive Medical Mycology. 2nd ed. Theran: University of Tehran Press ;2009.
2. Burk D, Dawson D and Stearn T. Methods in yeast genetics. Cold spring harbour Press. 2000.
3. Berek J and Ghazijahani B. Novak's Gynecology. 13th edition. Tehran: Golban Medical Publication. 2002.
4. Mirhendi H, Diba K, Rezaie A and Hosseinpur L . Colony PCR is a reliable and rapid method for DNA extraction of Candida species. Iran J Public Health 2007. 36: 40-44.
5. Mirhendi H, Makimura K and Khoramizadeh M. A one-Enzyme PCR-RFLP Assay for Identification of Six Medically Important Candida Species. Jpn Med Mycol 2006.47:225-229.
6. Suarez V and Lanch M R. Identification of yeasts in pap smears: clinical characteristics associated with candidiasis. Rev Cubana Med Trop 2004. 56(1):21-5
7. Linhares LM, Witkin SS, Miranda SD, Fonseca AM, Pinotti JA and Ledger WJ. Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for Candida species by culture. Infect Dis Obstet Gynecol 2001. 9(4):221-5.
8. Hernando FL, Estevez JJ, Cebrian M, Poulain D and Ponton J. Identification of Candida albicans cell wall antigens lost during subculture in synthetic media. J Med Vet Mycol 1993. 31(3):227-37.
9. Evens EGV, Richardson MD. Medical mycology –a practical approach. IRL PRESS; 1999.
10. Lascar R M, Divakumar H, Jungman E, Copas A, et al. Is vaginal microscopy an essential tool for the management of women presenting with vaginal discharge .Int J STD AIDS 2008. 19:859-860 .
11. Gultekin B, Yazici V, Aydin N. Distribution of Candida species in vaginal specimens and evaluation of CHROMagar Candida medium. Mikrobiyol Bul 2005. 39(3):319-24.
12. Muriel MA, Vizcaino MJ, Bilbao R, Herruzo R. Identification of yeast and sensitivity in vitro against different antifungal agents. Enferm Infecc Microbiol Clin 2000. 18(3):120-4.
13. Shopova E, Ioneva M. The identification of species of the genus Candida. Akush Ginekol (Sofiia) 1996. 35(1-2):36-7 .
14. Lisiak M, Klyszejko C, Marcinkowski Z and Gwiezdzinski Z. Yeast species identification in vulvovaginal candidiasis: susceptibility to nystatin. Ginekol Pol 2000. 71(9): 959-63.
15. Weissenbacher T, Witkin SS, Ledger WJ, Tolbert V, Gingelmaier A, Scholz C and et al. Relationship between clinical diagnosis of recurrent vulvovaginal candidiasis and detection of Candida species by culture and polymerase chain reaction. Arch Gynecol Obstet 2009. 279(2):125-9 .
16. Mardh PA, Novikova N, Witkin SS, Korneeva I and Rodriques AR. Detection of candida by polymerase chain reaction vs microscopy and culture in women diagnosed as recurrent vulvovaginal cases. Int J STD AIDS 2003. 14(11) :753-6.
17. Smith RA, Hitchcock CA, Evans EG, Lacey CJ and Adams DJ. The identification of Candida albicans strains by restriction fragment length polymorphism analysis of DNA. J Med Vet Mycol 1989. 27(6):431-4.
18. Stein GE, Sheridan VL, Magee BB and Magee PT. Use of rDNA restriction fragment length polymorphisms to differentiate strains of Candida albicans in women with vulvovaginal candidiasis. Diagn Microbiol Infect Dis. 1991. 14(6):459-64.
19. Darce Bello M, Gonzalez A, Barnabe C and Larrouy G. First characterization of Candida albicans by random amplified polymorphic DNA method in Nicaragua and comparison of the diagnosis methods for vaginal candidiasis in Nicaraguan women. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002. 97(7):985-9.
20. Erdem H, Cetin M, Timuroglu T, Cetin A, Yanar O and Pahsa A. Identification of yeasts in public hospital primary care patients with or without clinical vaginitis. Aust N Z J Obstet Gynaecol 2003. 43(4) :312-6.
21. Senterre JM, Carpentier M and Foidart JM. Vulvovaginal candidiasis: prevalence of different Candida species in the Liege region. Rev Med Liege 2005. 60(11): 882-4.
22. Mendoza M, Gonzalez I, Bellorin EJ, Salazar W, Mendoza L, Zambrano EA and et al. Isolation, identification and serotyping of yeasts obtained from the vaginal fluid in patients with clinical vaginitis. Invest Clin 1999. 40(1): 25-36.
23. Garcia Heredia M, Garcia SD, Copolillo EF, Cora Eliseth M and Barata AD. Prevalence of vaginal candidiasis in pregnant women. Identification of yeasts and susceptibility to antifungal agents. Rev Argent Microbiol 2006. 38(1): 9-12.