مجله دانشکده پزشکی اصفهان **مقاله پژوهشی**
سال بیست و نهم/شماره ۱۶۵/هفته اول بهمن ماه ۱۳۹۰
تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۱۸ **تاریخ پذیرش:** ۹۰/۷/۲۵

شناسایی گونه‌های کاندیدا در بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی در شهر کاشان با استفاده از روش PCR-RFLP

دکتر رسول محمدی[۱]، مهدی ناظری[۲]، دکتر الهه مصداقی‌نیا[۳]، دکتر سید حسین میرهندی[۴]

چکیده

مقدمه: ولوواژینیت کاندیدایی (Vulvovaginal candidiasis یا VVC)، عفونت واژینال رایجی است که در حدود ۷۵ درصد زنانی که در سنین باروری قرار دارند، دیده می‌شود و در ۵ درصد از آن‌ها به صورت عود یابنده مشاهده می‌شود. کاندیدا آلبیکنس عامل اصلی بیماری با شیوع تقریبی ۹۰-۸۰ درصد است و گونه‌های غیر آلبیکنس (اغلب کاندیدا گلابراتا) در درجه‌ی بعدی قرار دارند. تشخیص دقیق گونه‌های عامل این عفونت برای اهداف اپیدمیولوژیک ضروری و برای درمان مناسب مفید می‌باشد.

روش‌ها: در خلال سال‌های ۸۸-۱۳۸۶، تعداد ۱۳۳ جدایه‌ی مخمری از کلینیک تخصصی زنان وابسته به دانشگاه علوم پزشکی کاشان جداسازی شد. DNA ژنومی مخمرهای جدا شده از بیماران، با استفاده از فیلترهای FTA، از کشت تازه استخراج گردید و سپس، ناحیه‌ی ITS1-ITS2 آن با روش PCR (Polymerase chain reaction) تکثیر و با آنزیم HpaII برش داده شد. محصولات RFLP (Restriction fragment length polymorphism) روی ژل آگاروز، الکتروفورز و گونه‌ی مخمر بر حسب تفاوت الگوی باندهای به دست آمده شناسایی گردید.

یافته‌ها: گونه‌ی غالب جدا شده از نمونه‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس شامل ۱۱۶مورد (۸۷/۲ درصد) و به دنبال آن دو گونه‌ی گلابراتا ۱۶ مورد (۱۲ درصد) و کفیر یک مورد (۰/۷ درصد) بود. گروه سنی ۴۰-۳۱ سال بیشترین و گروه سنی ۲۰-۱۱ سال کمترین موارد ابتلاء را به خود اختصاص دادند.

نتیجه‌گیری: همانند اکثر مطالعات انجام شده در این زمینه، در مطالعه‌ی حاضر نیز کاندیدا آلبیکنس گونه‌ی غالب جداسازی شده از ولوواژینیت کاندیدایی بود. با توجه به دقت و سرعت روش‌های مولکولی و این که تا به حال هیچ گونه مطالعه‌ای با روش PCR-RFLP برای تشخیص دقیق عوامل علیتی VVC در ایران انجام نشده است، استفاده از این روش در بررسی‌های اپیدمیولوژیک در سایر مطالعات توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: کاندیدا، ولوواژینیت، PCR-RFLP.

مقدمه

ولوواژینیت کاندیدایی(Vulvovaginal candidiasis یا VVC)، عفونت واژینال رایجی است که در حدود ۷۵ درصد زنانی که در سنین باروری قرار دارند، دیده می‌شود. در ۵ درصد افرادی که مبتلا می‌شوند، عفونت به صورت عود شونده مشاهده می‌شود (۱). بر مبنای شدت علایم، فراوانی، عوامل ایجاد کننده ی بیماری و عوامل وابسته به میزبان، VVC به دو گروه ساده و پیچیده تقسیم‌بندی می‌شود (۲). هر چقدر علایم شدیدتر و گونه‌های عامل بیماری بیشتر باشد، بیماری به نوع پیچیده سوق پیدا می‌کند. حدود ۲۰-۱۰ درصد زنان به نوع پیچیده‌ی بیماری مبتلا می‌شوند (۳-۲). تشخیص و طبقه بندی انواع VVC برای درمان مناسب می‌تواند بسیار مفید باشد (۵-۴). کاندیدا آلبیکنس عامل اصلی بیماری با شیوع تقریبی ۹۰-۸۰ درصد است و گونه های غیر آلبیکنس (به طور عمده کاندیدا

[۱] گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۲] کارشناس ارشد، گروه انگل شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
[۳] استادیار، گروه زنان، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات تروما، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
[۴] دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سید حسین میرهندی
Email: mirhendi@tums.ac.ir

www.mui.ac.ir

گلابراتا) درصد باقی‌مانده را به خود اختصاص می‌دهند (۷-۶). علایم بیماری شامل خارش، زخم، تغییر در ترشحات واژن و مقاربت دردناک می‌باشد (۸). شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد شاید این بیماری از طریق جنسی قابل انتقال باشد، اما در زنانی که از لحاظ جنسی فعال نیستند نیز مشاهده می‌شود (۹). عوامل مستعد کننده‌ی بیماری شامل استروژن‌ها، دیابت ملیتوس، مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و ضعیف شدن سیستم ایمنی می‌باشد (۱۰).

شناسایی گونه‌های کاندیدا با استفاده از روش‌های مرسوم و سنتی از قبیل مشاهده ی میکروسکوپی مستقیم، کشت، جذب و تخمیر قندها وقت گیر و هزینه بر است، ضمن آن که تشخیص با این روش‌ها کاری مشکل و گاه غیر ممکن است (۱۲-۱۱). هدف از مطالعه ی حاضر، شناسایی و تعیین وفور گونه های مختلف مخمری در بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی در شهر کاشان با استفاده از یک روش دقیق مولکولی بود. برای این منظور از ناحیه‌ی ITS1-5.8S-ITS2 موجود در کمپلکس ژنی Ribosomal DNA و از روش PCR-RFLP استفاده شد. نتایج به دست آمده می‌تواند سرآغازی برای مطالعات جامع تر باشد وداده هایی مفید برای مسؤولین بهداشتی، درمانی و آزمایشگاهی فراهم آورد.

روش‌ها

در سال‌های ۸۸-۱۳۸۶، تعداد ۱۳۳ جدایه‌ی مخمری از مراجعه کنندگان به کلینیک تخصصی زنان وابسته به دانشگاه علوم پزشکی کاشان جداسازی شد. در ابتدا، جدایه ها بر روی محیط سابورو دکستروز آگار (SDA) منتقل و در حرارت ۳۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس از کشت تازه و تک کلنی‌های هر مخمر، به محلول آب-گلیسرول ۲۰ درصد انتقال یافت و نمونه‌ها در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. در صورت نیاز به هر نمونه یا به منظور تکرار هر مرحله از آزمایش، از نمونه‌های ذخیره شده در محلول آب-گلیسرول ۲۰ درصد استفاده شد. جدایه های مشکوک با استفاده از محلول لاکتوفنل کاتن بلو، زیر میکروسکوپ بررسی شدند.

در مطالعه‌ی حاضر از سیستم FTA-Card (Whatman ،USA) برای استخراج DNA استفاده شد (۱۵-۱۳). بدین منظور در ابتدا با استفاده از پانچر، دیسک‌هایی به قطر ۲ میلی‌متر از FTA-cardها جدا شد و مقدار ۴ میکرولیتر از سوسپانسیون غلیظ سلول های تازه‌ی مخمری به دیسک ها منتقل و حداقل ۴-۳ ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه شد تا به طور کامل خشک شوند. سپس هر دیسک به مدت چند ثانیه در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل شستشو داده شد و به تیوب های حاوی ۳۰ میکرولیتر آب مقطر درجه‌ی مولکولی منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در دستگاه Thermal cycler قرار داده شد. تیوب ها به مدت چند ثانیه میکروفیوژ شدند.، دیسک های FTA خارج و مایع داخل تیوب به عنوان DNA تا مصارف بعدی در ۲۰- درجه ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

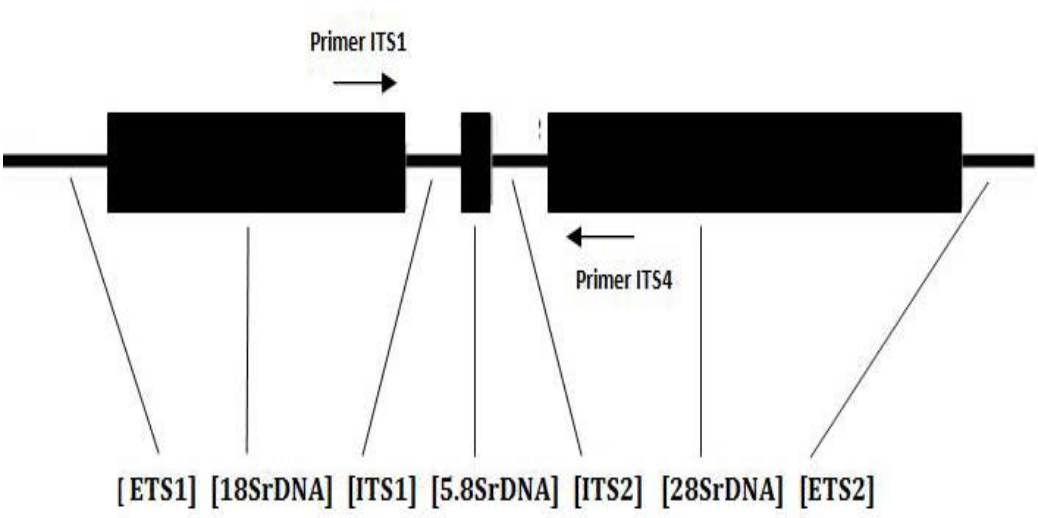
با استفاده از پرایمرهای یونیورسال ITS1 و ITS4 ناحیه‌ی ITS1-5.8S-ITS2 از DNAی ریبوزومال (rDNA)، تکثیر شد (شکل ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X بدون منیزیوم، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۵ میکرومولار پرایمر رفت: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')،

www.mui.ac.ir

۰/۵ میکرومولار پرایمر برگشت: ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') ۴۰۰ میکرومولار مخلوط دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات (dNTPs) و ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase بود. در واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR، ۲۳ میکرولیتر از مخلوط اصلی مذکور و ۲ میکرولیتر DNAی استخراج شده از هر قارچ اضافه شد. تیوب‌ها در دستگاه Thermal cycler قرار داده شد و مراحل PCR شامل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه به منظور جدا شدن دو رشته‌ی DNA، ۳۰ سیکل شامل ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و در نهایت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد.

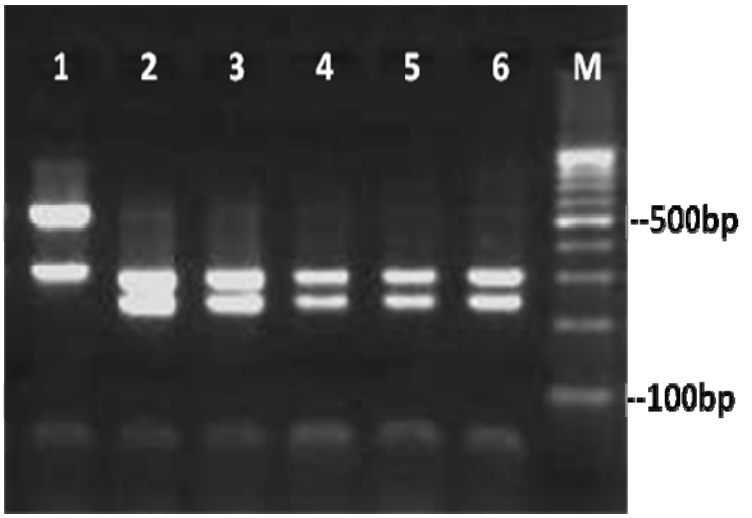
حجم کلی واکنش هضم اندونوکئازی محصولات PCR(RFLP یا Restriction fragment length polymorphism) ۱۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر آب مقطر، ۱/۵ میکرولیتر بافر و ۱ میکرولیتر (۵ واحد) آنزیم HpaII (Fast digest, fermentas lithuania) بود که ۱۰ میکرولیتر محصول PCR به آن اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. برای محصولات PCR ژل آگارز ۱/۵ درصد و برای محصولات RFLP ژل آگارز ۲درصد تهیه شد. ژل‌ها در تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE شامل ۹۰ میکرومولار تریس، ۹۰ میکرومولار بوریک اسید و ۲ میکرومولار EDTA قرار داده شد. سپس ۵ میکرولیتر از DNA تکثیر شده در واکنش PCR یا ۷ میکرولیتر از DNA هضم شده در واکنش RFLP به ترتیب بر روی ژل های ۱/۵ یا ۲ درصد بارگذاری گردید. از اتیدیوم برماید به میزان ۰/۵ میکروگرم به ازای هر میلی لیتر ژل برای رنگ‌آمیزی باندهای DNA استفاده شد. در نهایت با قرار دادن ژل‌ها در دستگاه Uvidoc و با استفاده از اشعه‌ی ماورای بنفش باندها مشاهده و از آن‌ها عکس‌برداری شد.

بر حسب الگوی اندازه‌ی DNAی بریده شده پس از RFLP، گونه‌ی مخمری مورد آزمون تعیین شد.



شکل ۱: نقشه‌ی شماتیک کمپلکس DNA ریبوزومی. در مطالعه‌ی حاضر نواحی ITS1- ITS2 و 5.8srDNA بین آن‌ها با استفاده ازپرایمرهای یونیورسال ITS1 و ITS4 تکثیر گردید.(ETS = External Transcribed Spacer, ITS = Internal Transcribed Spacer, rDNA = Ribosomal DNA)

www.mui.ac.ir



شکل ۲. الکتروفورز محصولات RFLP (Restriction fragment length polymorphism) برخی از نمونه‌های کاندیدایی جدا شده در مطالعه‌ی حاضر. ردیف ۱، کاندیدا گلابراتا، ردیف‌های ۶-۲ کاندیدا آلبیکنس، و ردیف ۷ مارکر ۱۰۰ جفت بازی (bp) می‌باشد.

یافته‌ها

پس از هضم ناحیه‌ی ITS درگونه‌های کاندیدا توسط آنزیم HpaII در کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا هر کدام دو باند تشکیل شد، ولی در کاندیدا کفیر اندازه‌ی محصول PCR و RFLP یکسان بود و تنها یک باند تشکیل گردید. در حقیقت محصول PCR در گونه‌های اخیر توسط آنزیم HpaII بریده نمی‌شود. اندازه‌ی DNA مربوط به ناحیه ITS1-ITS2 پس از هضم اندونوکلئازی توسط آنزیم *Hpa*II در گونه‌های مختلف به شرح زیر است: کاندیدا آلبیکنس ۲۹۷و۳۳۸ جفت باز، کاندیدا گلابراتا ۳۱۴و۵۵۷ جفت باز،کاندیدا تروپیکالیس ۱۸۴ و۳۴۰ جفت باز، کاندیدا کروزه‌ای ۲۴۹و۲۶۱ جفت باز،کاندیدا گیلیرموندی ۸۲ و۱۵۵ و۳۷۱ جفت باز، کاندیدا پاراپسیلوزیس ۵۲۰ جفت باز وکاندیدا کفیر۷۲۲ جفت باز (۱۶).

در مجموع ۱۳۳ جدایه‌ی مخمری، جداسازی و شناسایی شد. پس از اجرای تست‌های PCR و RFLP و با توجه به الگوهای توضیح داده شده، تعداد ۱۱۶ ایزوله به عنوان کاندیدا آلبیکنس تشخیص داده شد که این تعداد ۸۷/۲ درصد از نمونه‌ها را تشکیل می‌داد. همچنین تعداد ۱۶ نمونه (۱۲ درصد) کاندیدا گلابراتا و یک جدایه (۰/۷ درصد) از کل نمونه‌ها کاندیدا کفیر (سدوتروپیکالیس) بود. بنابراین کاندیدا آلبیکنس گونه ی غالب جدا شده از نمونه های بالینی بود. شکل ۲ الکتروفورز محصولات RFLP برخی از نمونه های مورد آزمون در مطالعه‌ی حاضر را نشان می‌دهد.

در بیماران مورد مطالعه گروه سنی ۴۰-۳۱ سال بیشترین و گروه سنی ۲۰-۱۱ سال کمترین موارد ابتلا را به خود اختصاص دادند (جدول ۱).

تنها ایزوله‌ای که در مطالعه‌ی حاضر به عنوان کاندیدا کفیر شناسایی شد، مربوط به یک خانم ۲۸ ساله بود. در بین گونه های گلابراتا، بیشترین تعداد شامل ۷ نفر (۴۳/۷ درصد)، مربوط به گروه سنی ۴۰-۳۱ و کمترین تعداد شامل ۱ نفر (۶/۲۵ درصد)، مربوط به گروه سنی ۶۰-۵۱ سال بود.

www.mui.ac.ir

جدول ۱. تعداد موارد ابتلا به ولوواژینیت در گروه‌های سنی مختلف

محدوده‌ی سنی	کاندیدا آلبیکنس	کاندیدا گلابراتا	کاندیدا کفیر	تعداد (درصد)
۱۱-۲۰	۲	۰	۰	۲ (۱/۵)
۲۱-۳۰	۴۰	۴	۱	۴۵ (۳۳/۸)
۳۱-۴۰	۵۵	۷	۰	۶۲ (۴۶/۶)
۴۱-۵۰	۱۳	۴	۰	۱۷ (۱۲/۷)
۵۱-۶۰	۶	۱	۰	۷ (۵/۲)
تعداد کل (درصد)	۱۱۶(۸۷/۲)	۱۶(۱۲)	۱(۰/۷)	۱۳۳ (۱۰۰)

بحث

در مطالعه‌ی حاضر گونه‌های مخمری عامل واژینیت و فراوانی هر کدام از آن‌ها در بیماران مشکوک به واژینیت کاندیدایی در شهر کاشان مورد بررسی قرار گرفت. مطابق با دیگر مطالعات انجام شده در سایر نقاط دنیا (۱۸-۱۷، ۱)، در این مطالعه نیز گونه‌ی غالب جدا شده از ولوواژینیت، کاندیدا آلبیکنس بود. شیوع این گونه در بین بیماران مبتلا به ولوواژینیت در مطالعات مختلف ۹۰-۷۰ درصد گزارش شده است. نتایج مطالعه‌ی Nyirjesy و همکاران فراوانی گلابراتا را ۱۰-۵ درصد، تروپیکالیس ۱۰-۵ درصد، پاراپسیلوزیس و کروزه‌ای ۵-۲ درصد نشان داد (۱۹). در مطالعه ای Chong و همکاران، با استفاده از روش RAPD-PCR، عوامل ایجاد کننده‌ی ولوواژینیت را در ۷۱ بیمار مورد بررسی قرار دادند. آن ها بیماران خود را به سه گروه دارای سابقه ی ولوواژینیت با بیش از یک گونه کاندیدا، دارای سابقه‌ی ولوواژینیت با یک گونه کاندیدا و بیماران دارای سابقه‌ی یک ساله تقسیم کردند. در این مطالعه گونه های آلبیکنس، لوزیتانیا، گلابراتا، فاماتا، کروزه‌ای و پاراپسیلوزیس از نمونه‌ها جداسازی شدند. نکته‌ی جالب توجه در این مطالعه، میزان وفور گونه های غیر آلبیکنسی در گروه اول (۵۰ درصد)، گروه دوم (۳۶ درصد) و گروه سوم (۱۸/۹ درصد) بود. در این مطالعه همانند مطالعه ی حاضر گونه‌های آلبیکنس با فراوانی ۷۰/۱ درصد و گلابراتا با فراوانی ۱۴/۹ درصد دو گونه‌ی غالب بودند (۲۰). در مطالعه ی دیگری Singh و همکاران (۲۱)، ۱۲ زن مبتلا به واژینت کاندیدایی را با عامل کاندیدا کروزه ای مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه محدوده‌ی سنی بیماران ۶۳-۳۲ سال بود، در حالی که این مقدار در مطالعه‌ی حاضر ۶۰-۱۱ سال می‌باشد. در بین این ۱۲ بیمار، یک بیمار به هر دو گونه ی کروزه ای و گلابراتا مبتلا بود. در بقیه‌ی بیماران علاوه بر گونه‌ی کروزه‌ای، گونه‌های آلبیکنس، تروپیکالیس، گلابراتا و گیلیرموندی شناسایی شدند. McClelland و همکاران، با روش تهیه ی لام و استفاده از پتاس (KOH)، میزان شیوع ولوواژینیت را ۱۰/۳ درصد گزارش کردند و متوجه شدند که در بیماران مبتلا به واژینوز باکتریایی، میزان شیوع ولوواژینیت کاندیدایی به وضوح کمتر است (۲۲).

در مطالعه‌ی Richter و همکاران بر روی ۵۹۳ جدایه‌ی به دست آمده از ولوواژینیت، کاندیدا آلبیکنس در ۴۲۰ نمونه، گلابراتا در ۱۱۲ نمونه، پاراپسیلوزیس در ۳۰ نمونه، کروزه‌ای در ۱۲ نمونه، ساکارومیسس در ۹ نمونه، تروپیکالیس در ۸ نمونه، لوزیتانیا در ۱ نمونه و تریکوسپورون نیز در ۱ نمونه گزارش شد. در مطالعه‌ی آن‌ها نیز مشابه تحقیق حاضر، گونه‌های غالب جدا شده از ولوواژینیت،

www.mui.ac.ir

آلبیکنس و گلابراتا بودند (۲۳). Marot-Leblond و همکاران با استفاده از روش‌های سنتی و آزمون ایمنوکروماتوگرافی سریع، تعداد ۴۷ جدایه‌ی کاندیدا آلبیکنس، ۷ جدایه‌ی گلابراتا و ۱ جدایه‌ی تروپیکالیس را در بیماران مبتلا به ولوواژینیت شناسایی کردند (۲۴). محمودی راد و همکاران، در تحقیقی که بر روی ۱۷۵ بیمار انجام دادند، در مجموع ۱۹۱ جدایه ی کاندیدا را با استفاده از محیط کشت کروم آگار کاندیدا بررسی کردند که ۶۷ درصد جدایه‌ها کاندیدا آلبیکنس، ۱۸/۳ درصد گلابراتا، ۶/۸ درصد تروپیکالیس، ۵/۸ درصد کروزه‌ای، ۱/۶ درصد پاراپسیلوزیس و ۰/۵ درصد گیلیرموندی شناسایی شد. در مطالعه ی مذکور نیز گونه‌های غالب آلبیکنس و گلابراتا بودند (۲۵). جمیلیان و همکاران، در مطالعه‌ای که بر روی ۲۲۰ زن مشکوک به ولوواژینیت کاندیدایی انجام دادند، ۴۲ درصد از جدایه‌ها را آلبیکنس، ۲۹ درصد دابلینینسیس، ۱۴/۵ درصد گلابراتا، ۶ درصد گیلیرموندی و گونه های تروپیکالیس، نروژنسیس و کفیر هر یک به تفکیک ۲/۷ درصد گزارش کردند (۲۶). آقامیریان و همکاران، با استفاده از روش‌های سنتی همچون مشاهده‌ی مستقیم و کشت، ۸۳ درصد از جدایه‌های به دست آمده از ولوواژینیت را کاندیدا آلبیکنس و مابقی را کاندیداهای گلابراتا، تروپیکالیس، کروزه ای و پاراپسیلوزیس شناسایی کردند (۲۷).

با وجودی که هنوز کاندیدا آلبیکنس گونه‌ی غالب در بیماران ولووواژینیت کاندیدایی است، افزایش گونه های غیر آلبیکنسی و مقاومت احتمالی بیشتر این گونه‌ها به ترکیبات ضد قارچی واقعیتی است که مطالعات بیشتر محققان این زمینه را می‌طلبد. روش های تشخیصی مولکولی سریع و دقیق هستند و روش PCR-RFLP به کار رفته در بررسی حاضر اولین گزارش تعیین هویت کاندیداها در این گروه از بیماران در ایران است. استفاده از این روش در بررسی های اپیدمیولوژیک در سایر بیماران کاندیدایی و در دیگر نقاط کشور توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

از کلیه‌ی کارکنان کلینیک تخصصی زنان وابسته به دانشگاه علوم پزشکی کاشان و نیز پرسنل و مدیریت مؤسسه‌ی ملی تحقیقات سلامت واحد اصفهان آقای رضا جعفری که ما را در این تحقیق یاری دادند، صمیمانه سپاسگزاریم.

References

1. Fan SR, Bai FY, Liao QP, Liu ZH, Li J, Liu XP. Genotype distribution of Candida albicans strains associated with different conditions of vulvovaginal candidiasis, as revealed by microsatellite typing. Sex Transm Infect 2008; 84(2): 103-6.
2. White DJ, Vanthuyne A. Vulvovaginal candidiasis. Sex Transm Infect 2006; 82(Suppl 4): iv28-iv30.
3. Sobel JD, Faro S, Force RW, Foxman B, Ledger WJ, Nyirjesy PR, et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. Am J Obstet Gynecol 1998; 178(2): 203-11.
4. Sobel JD, Kapernick PS, Zervos M, Reed BD, Hooton T, Soper D, et al. Treatment of complicated Candida vaginitis: comparison of single and sequential doses of fluconazole. Am J Obstet Gynecol 2001; 185(2): 363-9.
5. White DJ, Habib AR, Vanthuyne A, Langford S, Symonds M. Combined topical flucytosine and amphotericin B for refractory vaginal Candida glabrata infections. Sex Transm Infect 2001; 77(3): 212-3.
6. Geiger AM, Foxman B, Sobel JD. Chronic vulvovaginal candidiasis: characteristics of women with Candida albicans, C glabrata and no candida. Genitourin Med 1995; 71(5): 304-7.
7. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. Lancet 2007; 369(9577): 1961-71.
8. Sobel JD. Vaginitis. N Engl J Med 1997; 337(26): 1896-903.

www.mui.ac.ir

9. Lindua ST, Mendosa K, Surawska H, Jordan JA. Vaginal Swab Measurement of Candidiasis in Wave I of the National Social Life Health & Aging Project. NSHAP Biomeasures Technical Report; 2008.

10. Sobel JD. Genital candidiasis. Med 2005: 33(10); 62-5.

11. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature 1989; 339(6221): 237-8.

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. Mohammadi R, Mirhendi SH, Yadegari MH, Shadzi S, Jalalizand N. Identification and frequency of Candida species in patients with different forms of Candidiasis in Isfahan, using PCR-RFLP method. Journal of Isfahan Medical school 2011; 29(133): 336-43.

14. Mohammadi R, Mirhendi SH, Yadegari MH, Ghahri M, Shadzi S, Jalalizand N, et al. Evaluation of prevalence of the new Candida species (C. Orthopsilosis and C. Metapsilosis) among C. Parapsilosis group isolated from patients by PCR-RFLP of SADH Gene in Iran. Journal of Isfahan Medical school 2011; 29(134): 376-85.

15. Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, Campbell CK, Johnson EM. Ultra-rapid preparation of total genomic DNA from isolates of yeast and mould using Whatman FTA filter paper technology - a reusable DNA archiving system. Med Mycol 2006; 44(5): 389-98.

16. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important Candida species. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi 2006; 47(3): 225-9.

17. Darce BM, Gonzalez A, Barnabe C, 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.

18. Cheng G, Yeater KM, Hoyer LL. Cellular and molecular biology of Candida albicans estrogen response. Eukaryot Cell 2006; 5(1): 180-91.

19. Nyirjesy P, Seeney SM, Grody MH, Jordan CA, Buckley HR. Chronic fungal vaginitis: the value of cultures. Am J Obstet Gynecol 1995; 173(3 Pt 1): 820-3.

20. Chong PP, Lee YL, Tan BC, Ng KP. Genetic relatedness of Candida strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. J Med Microbiol 2003; 52(Pt 8): 657-66.

21. Singh S, Sobel JD, Bhargava P, Boikov D, Vazquez JA. Vaginitis due to Candida krusei: epidemiology, clinical aspects, and therapy. Clin Infect Dis 2002; 35(9): 1066-70.

22. McClelland RS, Richardson BA, Hassan WM, Graham SM, Kiarie J, Baeten JM, et al. Prospective study of vaginal bacterial flora and other risk factors for vulvovaginal candidiasis. J Infect Dis 2009; 199(12): 1883-90.

23. 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.

24. Marot-Leblond A, Nail-Billaud S, Pilon F, Beucher B, Poulain D, Robert R. Efficient diagnosis of vulvovaginal candidiasis by use of a new rapid immunochromatography test. J Clin Microbiol 2009; 47(12): 3821-5.

25. Mahmoudi Rad M, Zafarghandi A, Abbasabadi B, Amiri Z, Shivayi M, Amel Zabihi M, et al. Identification and comparison of etiologic agents in vulvovaginal candidiasis and recurrent vulvovaginal candidiasis by a differential medium. Pejouhesh 2010; 33(3): 189-94.

26. Jamilian M, Mashadi E, Sarmadi F, Banijamali M, Farhadi E, Ghanatpishe E. Frequancy of vulvovaginal Candidiasis species in nonpregnant 15-50 years old women in spring 2005 in Arak. Arak Medical University Journal 2007; 10(2): 7-14.

27. Aghamirian MR, Keshavarz D, Jahani Hashemi H, Sadeghi Qazvini M. Agents associated with candida vulvovaginitis in women referred to health centers in Qazvin. The Journal of Qazvin Univ of Med Sci 2007; 11(3): 35-9.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29, No 165, 1st week, February 2012 Received: 9.8.2011 Accepted: 17.10.2011

Identification of *Candida* Species among Patients with Vulvovaginal Candidiasis in Kashan by PCR-RFLP Method

Rasoul Mohammadi PhD[1], Mehdi Nazeri MSc[2], Elaheh Mesdaghinia MD[3], Seyed Hossein Mirhendi PhD[4]

Abstract

Background: Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a common vaginal infection, affecting up to 75% of women in child-bearing age. Approximately 5% of patients may experience recurrent VVC. *Candida albicans* is the most common causative agent with a prevalence of approximately 70–90%. Non-albicans *Candida* species, predominantly *Candida glabrata*, are responsible for the remainder. Precise diagnosis of causative agents of VVC is necessary for epidemiological purposes and for effective treatment.

Methods: One hundred and thirty three yeast isolates were collected from a gynecology clinic affiliated to Kashan University, Iran, during 2007-2009. Genomic DNA of each isolate was extracted from fresh cultures using FTA-card. The ITS1-ITS2 region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) assay and was digested by the restriction enzyme *HpaII*. The products of restriction fragment length polymorphism (RFLP) were electrophoresed on agarose gel and the yeast species were determined according to differences in their electrophoretic band patterns.

Findings: Prominent species isolated from clinical specimens were *Candida albicans* responsible for 116 cases (87.2%), followed by 16 cases of *C. glabrata* (12%) and 1 case of *C. kefyr* (0.7%). The age bracket of 31-40 years had the highest and the age bracket of 11-20 years had the lowest frequency of occurrence.

Conclusion: Like the majority of similar studies performed in this field, the present study found *Candida albicans* as predominant species isolated from vulvovaginal candidiasis. As molecular diagnostic methods are rapid and reliable and as there are no any other studies that used PCR-RFLP for diagnosis of etiologic agents of VVC in Iran, we recommend this approach for other similar epidemiological studies.

Keywords: *Candida*, Vulvovaginitis, PCR-RFLP.

[1] Department of Medical Mycology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2] Department of Parasitology, School of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology and Trauma Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
[4] Associate Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health and National Institute of Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Seyed Hossein Mirhendi PhD, Email: mirhendi@tums.ac.ir