

**ОРИГИНАЛНИ СТАТИИ**  
**ORIGINAL ARTICLES**

**ИЗПОЛЗВАНЕ НА КОНВЕНЦИОНАЛНИ И МОЛЕКУЛЯРНОГЕНЕТИЧНИ МЕТОДИ  
В ДИАГНОСТИЧНИЯ АЛГОРИТЪМ НА ВУЛВОВАГИНАЛНАТА КАНДИДОЗА**

Р. Байкушев<sup>1</sup>, В. Узунова-Райкова<sup>1</sup>, Е. Иванова<sup>2</sup> и И. Митов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Катедра по медицинска микробиология, МУ – София

<sup>2</sup>Медицински колеж „Йорданка Филаретова” – София

**APPLICATION OF THE CONVENTIONAL AND MOLECULAR METHODS  
IN THE DIAGNOSTIC ALGORITHM OF VULVOVAGINAL CANDIDIASIS**

R. Baykushev<sup>1</sup>, V. Ouzounova-Raykova<sup>1</sup>, E. Ivanova<sup>2</sup> and I. Mitov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Microbiology, Medical University – Sofia

<sup>2</sup>Medical College “Iordanka Filaretova” – Sofia

**Резюме:**

ВВК е втората по честота инфекция сред тези на влагалището. **Цел** на настоящото проучване е определянето до вид чрез конвенционални и молекулярногенетични методи на представителите от род *Candida*. Необходимостта от видова идентификация се определя от факта, че някои от агентите са първично резистентни към широко използваните в терапията азоли и стават причина за развитие на хронично рецидивиращи форми на заболяването. **Материал и методи:** бяха изследвани 234 вагинални секрета. Бяха изготвени натривки, оцветени по Грам. Секрети бяха култивирани на *Chrom agar Candida* и *SDA Chloramphenicol* (Vecton Dickenson). Бе извършена идентификация на микотичните причинители чрез асимилационни и ферментационни тестове, както и чрез молекулярнодиагностични техники. **Резултати:** При 64 (27%) от пациентките направената посявка даде положителен резултат за микотичен агент. От тях само при 52 (81%) в микроскопските препарати бе установено наличие на различни форми на гъбички. Резултатите от идентификацията на различните видове *Candida* чрез ферментационни и асимилационни тестове показаха: *C. albicans* в 54 (84%) материала, *C. glabrata* – в 8 (13%), *C. krusei* – в 2 (3%). Получените чрез молекулярногенетичните технологии резултати потвърдиха тези от вече установените чрез конвенционалните методики. **Заключение:** Микроскопските методи са бързи, лесни и достъпни, но недостатъчно надеждни и информативни. Културалната диагностика дава добри резултати за видовата идентификация на микотичните агенти, особено комбинирана с ферментационни и асимилационни тестове. Приложените PCR технологии показват съпоставими резултати, но осъществяването им в рамките на няколко часа ги прави не само конкурентни на конвенционалните методики, а и предпочитани в лабораторната практика. Високата честота на установена микотична инфекция сред изследваните материали (27%) доказва необходимостта от търсене на инфекцията, независимо има ли, или не клинични оплаквания от страна на пациента.

**Ключови думи:**

вулвовагинална кандидоза, култивиране, PCR

**Адрес за кореспонденция:**

Д-р Радослав Байкушев, Катедра по медицинска микробиология,  
Медицински факултет, ул. „Здраве” № 2, 1431 София,  
e-mail: radoslav1961@abv.bg



патогенни гъби и позволява идентификация на отделните видове въз основа на цвета и морфологията на колонииите, които се изолират.

Идентификация на микотичните причинители бе извършена и на базата на тестове за асимилация на въглехидрати API 20C AUX и тестове за ферментация API *Candida* (bioMerieux).

На всички материали бе извършена екстракция на ДНК (AmpliSens biotechnologies, Russia), за да се подsigури материал за последваща полимеразноверижна реакция (PCR) за доказването на видовете *Candida*. Екстракция бе проведена с търговски кит DNA-Sorb-A (Sacace Biotechnologies), като бяха спазени всички указания на производителя.

Изолираната ДНК бе подложена на амплификация чрез PCR за доказване на част от генома на различни видове *Candida*. Общият обем на реакционната смес бе 25 µl, а количеството на използваната изолирана и пречистена ДНК – 4,0 µl. Реакцията бе проведена с по 0.25 µM от всеки праймер (Alpha DNA, Canada) (табл. 1), по 0.2 mM (всеки) от деоксинуклеозид трифосфатите, 1x реакционен буфер, по MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM) и 2.5 U от *Taq* ДНК полимераза (*Prime Taq*<sup>TM</sup> DNA Polymerase, GENET BIO). Амплификацията бе проведена в апарат *Techgen* PCR thermocycler (Techne, England) и бе използван следният протокол: начална денатурация (96° C, 5 min), последвана от 40 цикъла денатурация (94° C, 30 sec), анилинг (58° C, 30 sec) и удължаване (72° C, 30 sec), с едно финално удължаване на веригата при условия 72° C за 7 min. Като положителна контрола при провеждането на PCR реакцията бяха използвани ДНК продукти от конт-

ролни щамове *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 и *C. dubliniensis* MYA 646. За всяка реакция като отрицателна контрола бе използвана чиста 3dH<sub>2</sub>O. След амплификацията 10 µl от всяка проба бяха подложени на електрофореза (установка за хоризонтална електрофореза Bio-Rad) в 1,5% агарозен гел при 160 V за 45 min, а продуктите на съответните праймери бяха визуализирани на UV трансилюминатор при дължина на вълната λ = 312 nm (Vilber Lourmat) с помощта на оцветяване с 1 µg/ml етидиев бромид.

## РЕЗУЛТАТИ

За период от 6 месеца – януари-юни 2014 г., бяха взети и изследвани 234 вагинални секрета на жени при рутинен гинекологичен преглед. На всички материали бе изготвен микроскопски препарат, оцветен по Грам, за оценка на клетъчния и видов състав. Допълнително секретите бяха културално изследвани чрез посевка на *SDA* и *Chrom agar* (Becton Dickenson).

При 64 (27%) от пациентките направената посевка даде положителен резултат за микотичен агент. Основните оплаквания при тези жени бяха от вагинално течение, дразнене, вагинално течение с дразнене (табл. 2).

От 64-те културално положителни за микотични причинители проби при 52 (81%) от направените микроскопски препарати се установиха различни форми на гъбички (бластоспори и/или хифи). При останалите 12 (19%) не бяха наблюдавани никакви елементи на гъбички (табл. 3).

Таблица 1. Праймерните двойки, използвани за идентификация на доказаните в проучването микотични агенти

Вид	Праймер	Секвенция	Ампликон, бр
<i>C. albicans</i>	CALB1	TTT ATC AAC TTG TCA CAC CAG A	273
	CALB2	ATC CCG CCT TAC CAC TAC CG	
<i>C. glabrata</i>	CGL1	TTA TCA CAC GAC TCG ACA CT	423
	CGL2	CCC ACA TAC TGA TAT GGC CTA CAA	
<i>C. krusei</i>	CkFKS1	AT TGG CCG TTT CCA TTG TGT TC	359
	CkFKS2	CAT CAA ACC AAG CGT GAT TCT TGC	

Таблица 2. Разпределение на основните оплаквания при пациентките с доказан микроскопски микотичен агент

Клинични оплаквания	Брой (%)
Вагинално течение	9 (14%)
Дразнене	21 (33%)
Вагинално течение + дразнене	20 (31%)
Без оплаквания	14 (22%)

Таблица 3. Разпределение на различните форми на микотични агенти, установени чрез микроскопско оцветяване по Грам

Гъбни елементи	Бр. (%)
Дрожди	18 (34,6%)
Хифи, псевдохифи	6 (11,5%)
Дрожди и хифи	28 (53,8%)

Видовата идентификация на култивираните върху *Chrom agar* (Becton Dickenson) материали бе реализирана според цвета и морфологията на изолираните колонии. *C. albicans* бяха зелени, *C. glabrata* – гладки розови или лилави при по-дълъг престой на културата върху средата, *C. krusei* – розови с грапава повърхност. Зелени могат да бъдат и представителите на *C. dublinensis*, докато колоните на *C. tropicalis* са стоманеносини. *C. dublinensis* и *C. tropicalis* не бяха установени чрез културални методи в нашето проучване.

Идентификацията на различните видове *Candida* бе осъществена и съответно потвърдена и чрез ферментационни (API Candida) и асимилационни тестове (API 20CAUX), като получените резултати бяха следните: *C. albicans* – 54 (84%), *C. glabrata* – 8 (13%), *C. krusei* – 2 (3%).

На всички 234 материала бе проведена и ДНК екстракция с последваща PCR методика за доказване част от генома на различните представители на род *Candida*. Получените чрез молекулярногенетичните технологии резултати потвърдиха вече установените чрез конвенционалните методики.

Всички 64 положителни за *Candida spp.* проби бяха изследвани и за *G. vaginalis* чрез PCR, като 57 дадоха положителна находка без сигурни микроскопски данни от оцветяването по Грам за анаеробна инфекция.

### ОБСЪЖДАНЕ

Описани са повече от 170 вида дрождеподобни гъби, сред които водещо място като причинител на вулвовагиналната кандидоза заема видът *C. albicans* – в до 85-90% [1, 3, 6]. Сред останалите видове клинично значими са *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, значително по-рядко *C. pseudotropicalis* и *Saccharomyces cerevisiae*. Представителите от род *Candida* са микроорганизми опортюнисти, които нормално обитават кожата и лигавиците при здрави хора. Като опортюнисти те могат да се изолират от напълно здрави жени без клинична симптоматика (състояние, означавано като носителство). При определени ситуации, провокирани от екзогенни или ендогенни фактори, кандидите могат да станат патогенни и да предизвикат заболяване.

Има данни, че около 30-40% от инфекциите на вулвата и влагалището се свързват с микотичен причинител. Инфекцията заема второ място по честота сред тези на влагалището и е обичайна причина за търсене на специализирана медицинска помощ.

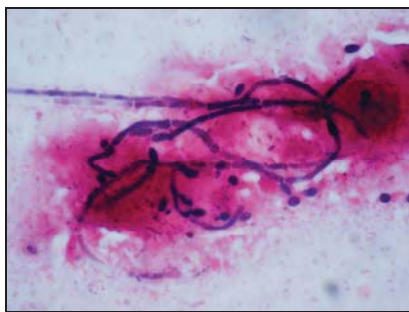
Заболяването се среща често при състояние като бременност, ендокринни или злокачествени заболявания. В проведеното проучване честотата на микотичната инфекция бе относително висока – 27% от материалите, взети при рутинен преглед от специалист.

Диагностиката на ВВК изисква комплексност. Водеща роля има клиничната симптоматика, но тя винаги трябва да бъде подкрепена от резултатите на микробиологичните методи на изследване. Микроскопското изследване е бърз, лесен и достъпен метод, използван в практиката. Наблюдава се нативен или оцветен по Грам, или метиленово синьо препарат. В нашето проучване бе приложено оцветяване по Грам, с което се установи наличие на бластоспори и/или хифи при 52 (81%) (фиг. 1) от културално положителните проби.

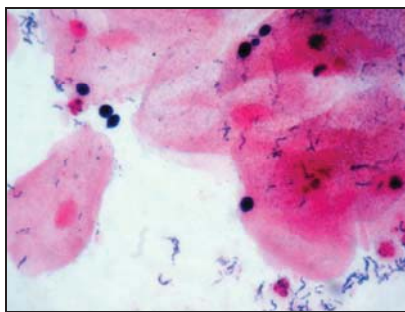
Към конвенционалните методи на изследване освен микроскопията се причислява и културалният метод. Той включва посевка на материала върху хранителна среда, която позволява да се определят количеството, родът и видът на причинителя, както и чувствителността към антимикотични препарати. Конвенционалната идентификация на патогенните гъби се прави на базата на морфологични и физиологични тестове и често изисква продължително време – от порядъка на 3 и повече дни, а за съжаление може да бъде и неточна [8, 9]. Установено е, че конвенционалните микроскопски и културални методики водят до 95% успеваемост при диагностицирането на проблема [7].

В това изследване бяха приложени в комбинация конвенционални (микроскопски и културални) методи с асимилационни и ферментационни тестове за видовото определяне на причинителите. По този начин от културално положителните 64 проби *C. albicans* бе доказана в 54 (84%), *C. glabrata* – в 8 (13%) (фиг. 2), *C. krusei* – в 2 (3%) (фиг. 3). На тази база *C. albicans* бе определен като основният причинител на ВВК в проучваните материали, но сериозен процент заема и *C. glabrata*, която е първично резистентна на най-широко използваните в клиничната практика антимикотици и е предпоставка за нови прояви и рецидиви на заболяването.

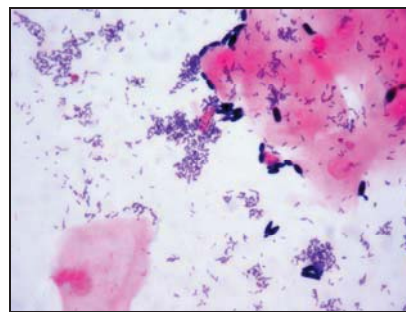
В последните години във всяка област на микробиологията все по-активно се прилагат и молекулярногенетични методи [2] поради тяхната висока специфичност и чувствителност, както и бързина на изпълнение. Същото се отнася и за диагностиката на микотичните инфекции. В проведеното проучване изследваните материали бяха подложени на ДНК екстракция с последваща идентификация на различните видове *Candida* чрез PCR. Резултатите от молекулярногенетичните методи бяха съпоставими с конвенционалните, но осъществяването им в рамките на няколко часа ги прави не само конкурентни на конвенционалните техники, но и предпочитани в лабораторната практика. Недостатък на използваната PCR методика е невъзможността едновременно с идентификацията на видовете да се получат резултати и за чувствителността им спрямо различни антимикотични препарати.



Фиг. 1. Влагалищен секрет, оцветен по Грам, с налични дрожди и псевдохифи



Фиг. 2. Влагалищен секрет, оцветен по Грам, с налични *C. glabrata*



Фиг. 3. Влагалищен секрет, оцветен по Грам, с налични *C. krusei*

Интерес предизвиква фактът, че 57 от изследваните 64 положителни за микотичен агент материала дадоха положителна находка и за *G. vaginalis*, изследвани също чрез PCR, без да има микроскопски данни за възможна анаеробна инфекция.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микроскопските методи са бързи, лесни и достъпни, но недостатъчно надеждни и информативни.

Културалната диагностика дава добри резултати за видовата идентификация на микотичните агенти, особено комбинирана с ферментационни и асимилационни тестове.

Приложените PCR технологии показват съпоставими резултати, но осъществяването им в рамките на няколко часа ги прави не само конкурентни на конвенционалните методики, а и предпочитани в лабораторната практика.

Високата честота на установена микотична инфекция сред изследваните материали (27%) доказва необходимостта от търсене на инфекцията, независимо има или не клинични оплаквания от страна на пациента. Показва се и необходимостта от видова идентификация на инфекциозния причинител, поради факта че някои от видовете са първично резистентни на различни антимикотици, което е и предпоставка за нови прояви, рецидиви и усложнение от страна на заболяването, от една страна, а от друга, че различните щамове водят до клинично неразличими състояния.

Доказването на *G. vaginalis* във висок процент от материалите с микотични причинители е

интересен и провокиращ факт, който трябва допълнително да се обмисли и да генерира провеждането на по-мощни проучвания, с отношение към други клинични състояния, ангажиращи гениталния тракт при жените.

### Библиография

1. Sobel, G. D. Vaginitis. – N. Engl. J. Med., **337**, 1997, 1896-1903.
2. Zhou, X., S. J. Benet, M. G. Schneider et al. Characterization of vaginal microbial communities in healthy women using cultivation-independent methods. – Microbiology, **150**, 2004, 2565-2573.
3. Sobel, G. D. Is there a protective role for vaginal flora? – Curr. Infect. Dis. Rep., **1**, 1999, 379-383.
4. Horowitz, B. J. Mycotic vulvovaginitis: a broad overview. – Am. J. Obstet. Gynecol., **165**, 1991, № 4, 1188-1192.
5. Bingham, J. S. What to do with the patient with recurrent vulvovaginal candidiasis. – Sex. Transm. Inf., **75**, 1999, 225-227.
6. Sobel, J. D. Vulvovaginal candidosis. – Seminar, **369**, 2007, 1961-1971.
7. Муравьева, В. В. и А. С. Анкирская. Особенности микробиологии влагалища при бактериальном вагинозе и вагинальном кандидозе. – Акуш. и гинекол., 1996, № 6, 27-30.
8. Goodwin, S. D., J. Fiedler-Kelly, T. H. Grasela et al. A nationwide survey of clinical laboratory methodologies for fungal infections. – J. Med. Vet. Mycol., **30**, 1992, 153-160.
9. Hazen, K. C. New and emerging yeast pathogens. – Clin. Microbiol. Rev., **8**, 1995, 462-478.
10. Fidel, Jr. P. L., J. A. Vazquez et J. D. Sobel. Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. – Clin. Microbiol. Rev., **12**, 1999, № 1, 80-96.
11. Spinillo, A., S. Nicola, L. Colonna et al. Frequency and significance of drug resistance in vulvovaginal candidiasis. – Gynecol. Obstet. Invest., **38**, 1994, 130-133.

Постъпила за печат на 10 март 2015 г.