

## Comparison of expression level of *CDR1* and *MDR1* genes in stages of biofilm formation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*

Mohaddeseh Larypoor<sup>1\*</sup> , Tahereh Moradi Braijani<sup>2</sup> , Fatemeh Ashrafi<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Dept of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Dept of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran

### Article Info

**Article type:**  
Research article

**Article History:**

Received: Jan. 28, 2024

Revised: May. 03, 2024

Accepted: May. 13, 2024

Published Online: July.  
29, 2024

**\* Correspondence to:**

Mohaddeseh Larypoor  
Dept of Microbiology, Faculty  
of Biological Sciences,  
Islamic Azad University,  
Tehran North Branch, Tehran,  
Iran

Email:  
m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

### ABSTRACT

**Introduction:** Opportunistic fungi create biofilm resistant to active antifungal drugs in immunocompromised people. The present study aimed to assess the expression of *CDR1* and *MDR1* genes in the stages of biofilm formation by candidate species isolated from clinical samples.

**Material & Methods:** 100 oral, vaginal, and fecal swabs were sampled from people with immune and physiological defects and normal people. The isolates were identified by laboratory tests and specific *Candida* chrome agar culture medium, and the presence of resistance genes was proved by molecular method. The formation of biofilm in the presence and absence of amphotericin B- in the strains was investigated using the crystal violet test and scanning electron microscope photo. The expression level of *CDR1* and *MDR1* genes was determined using the real-time polymerase chain reaction (PCR) technique.

**Results:** More than 50% of isolated strains were *Candida albicans*, and the frequency of other strains was 8.33%. Among the 60 strains that were investigated in terms of genotype, only 48 *Candida* strains had both *CDR1* and *MDR1* genes. The statistical analysis of the results demonstrated that the amphotericin B-drug during 30 hours after biofilm formation significantly reduced the expression of resistance genes compared to the control group ( $P < 0.05$ ).

**Discussion & Conclusion:** The expression of resistance genes in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* is effective in increasing biofilm formation and the occurrence of candidiasis. Simultaneous expression of resistance genes is effective in increasing *Candida albicans* pathogenicity. The sub-MIC concentration of amphotericin B significantly reduces the expression of resistance genes and biofilm formation in *Candida* strains.

**Keywords:** Biofilms, *Candida albicans*, Candidiasis, *CDR1*, *MDR1*, Multiplex PCR

### ➤ How to cite this paper

Larypoor M, Moradi Braijani T, Ashrafi F. Comparison of expression level of *CDR1* and *MDR1* genes in stages of biofilm formation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2024;32(3): 47-64.

## مقایسه میزان بیان ژن‌های *MDR1* و *CDR1* در مراحل تشکیل بیوفیلیم گونه‌های کاندیدای آلیکنس و کاندیدا تروپیکالیسی

محدثه لاری پور<sup>۱\*</sup> ID، طاهره مرادی برایجانی<sup>۲</sup> ID، فاطمه اشرفی<sup>۱</sup> ID

<sup>۱</sup> گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۸

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۴

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۵/۰۸

**مقدمه:** قارچ‌های فرصت طلب در افراد دارای ضعف ایمنی، با تشکیل بیوفیلیم مقاوم به داروهای ضدقارچی، عفونت ایجاد می‌کنند. در این مطالعه به بررسی بیان ژن‌های *MDR1*، *CDR1* در مراحل تشکیل بیوفیلیم توسط گونه‌های کاندیدای جدا شده از نمونه‌های بالینی پرداخته شده است.

**مواد و روش‌ها:** ۱۰۰ سوآپ دهانی، واژینال و مدفوعی از افراد دارای نقایص ایمنی و فیزیولوژی و افراد نرمال نمونه‌برداری شد. جدایه‌ها با آزمون‌های آزمایشگاهی و محیط کشت اختصاصی کروم آگار کاندیدا شناسایی و وجود ژن‌های مقاومت با روش مولکولی اثبات گردید. تشکیل بیوفیلیم در حضور و نبود آمفوتریسین-ب در جدایه‌ها با استفاده از آزمایش کریستال ویوله و عکس میکروسکوپ نگاره بررسی شد. میزان بیان ژن‌های *MDR1* و *CDR1* با استفاده از تکنیک Realtime PCR تعیین گردید.

**یافته‌های پژوهش:** بیش از ۵۰ درصد جدایه‌های جداسازی شده کاندیدا/آلیکنس و فراوانی سایر جدایه‌ها ۸/۳۳ درصد بود. از میان ۶۰ جدایه که از نظر ژنوتایپ بررسی شدند، تنها ۴۸ جدایه کاندیدا واجد هر دو ژن *MDR1*، *CDR1* بودند. بررسی های آماری نتایج نشان داد، داروی آمفوتریسین-ب طی مدت سی ساعت پس از تشکیل بیوفیلیم، به صورت معنی داری در مقایسه با گروه کنترل، موجب کاهش بیان ژن‌های مقاومت می‌شود ( $P < 0.05$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** بیان ژن‌های مقاومت در کاندیدا/آلیکنس و کاندیدا تروپیکالیسی در افزایش تشکیل بیوفیلیم و بروز کاندیدیازیس مؤثر است. بیان هم‌زمان ژن‌های مقاومت در افزایش بیماری‌زایی کاندیدا/آلیکنس مؤثر است. غلظت subMIC آمفوتریسین-ب به صورت معنی داری موجب کاهش بیان ژن‌های مقاومت و کاهش تشکیل بیوفیلیم در جدایه‌های کاندیدا می‌شود.

نویسنده مسئول:

محدثه لاری پور

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

Email:

m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

**واژه‌های کلیدی:** کاندیدا/آلیکنس، کاندیدیازیس، بیوفیلیم، *MDR1*، *CDR1*، Multiplex PCR

**استناد:** لاری پور محدثه، مرادی برایجانی طاهره، اشرفی فاطمه. مقایسه میزان بیان ژن‌های *MDR1* و *CDR1* در مراحل تشکیل بیوفیلیم گونه‌های کاندیدا/آلیکنس و کاندیدا تروپیکالیسی. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، مرداد ۱۴۰۳؛ ۳۲(۳): ۶۴-۴۷.



ایمنی میزان تعداد این میکروارگانیسم‌ها افزایش می‌یابد و بیماری فرصت طلب کشنده را ایجاد می‌کند. شایع‌ترین عامل مستعدکننده میزان مصرف طولانی آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف است که با از بین بردن باکتری‌های ساکن در سطح مخاط، شرایط را برای رشد کاندیدا فراهم می‌آورند (۹).

از میان ژن‌های CDR شناخته‌شده، CDR1 و CDR2 باعث مقاومت کاندیدا به فلوکونازول می‌شوند. دو گروه از سیستم‌های پمپ افلاکس در کاندیدا/آلبیکس وجود دارند که سبب جریان دارو به خارج از سلول قارچی می‌گردند. ژن‌های MDR دسته‌ای از ژن‌های دخیل در روند مقاومت به داروهای ضدقارچی هستند که در ایجاد ساختار پمپ‌های افلاکس مداخله می‌کنند و نقش ساختاری اساسی را ایفا می‌نمایند (۱۰).

افزایش بیان یک یا چند پمپ افلاکس باعث ممانعت از تجمع داخل سلولی، در حد آستانه موردنیاز برای فعالیت داروها می‌گردد. پمپ‌های دسته یک، تنها پمپ‌های اتصالی به ATP را شامل می‌شوند و جهت جابه‌جایی سوستر از ATP به‌عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند و پمپ‌های دسته دوم برای انتقال سوستر از انرژی شیب پروتون غشا استفاده می‌نمایند. خصوصیت مشترک همه سیستم‌های افلاکس توانایی دفع انواع مواد ضد میکروبی نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها، ضدقارچ‌ها، رنگ‌ها، پاک‌کننده‌ها، اسیدهای چرب و حلال‌های آلی است و باعث مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد سمی دیگر می‌شود. بیشترین عفونت‌های بیمارستانی ناشی از گونه‌های کاندیدا مربوط به مقاومت به داروهای آزول است. ژن CDR نقش اساسی در خروج آنتی‌بیوتیک‌ها از داخل سلول دارد و این مواد را از درون سلول به محیط خارج پمپ می‌کند؛ بنابراین، باعث کاهش غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها در فضای پری پلاسمی باکتری می‌گردد (۱۱).

بیوفلم‌های قارچی به علت افزایش توانایی جدایه‌ها در تحمل آنتی‌بیوتیک‌ها، دستگاه‌های دفاعی میزان و سایر استرس‌های خارجی، نگرانی جدی برای سلامت جهانی هستند؛ بنابراین، به عفونت‌های مزمن پایدار کمک می‌کنند

کاندیدا شبه‌مخمر شایع در بروز کاندیدیازیس فرصت طلب در سراسر دنیا است و همچنین به فراوانی روی سطح پوست و غشاهای مخاطی ساکن می‌شود. کاندیدا یکی از اعضای فلور نرمال پوست، دستگاه گوارشی و واژن و یک پاتوژن فرصت طلب است که در طبیعت بر روی برگ گیاهان، آب و خاک زندگی می‌کند (۱). قدرت چسبندگی به بافت میزان، تولید اسپاروتیل پروتیناز، فسفولیپاز و تغییر شکل از صورت مخمری به هایف حقیقی، هایف کاذب و لوله‌زایا از مهم‌ترین مؤلفه‌های بیماری‌زایی کاندیدا/آلبیکس محسوب می‌شود (۲). کاندیدیازیس به صورت فرصت طلب در افراد دچار نقایص ایمنی مانند لوسمی و ایدز و نقایص فیزیولوژی مانند دیابت، عفونت متوعی را ایجاد می‌کند. گستره این بیماری‌ها از عفونت‌های سطحی و مخاطی ساده تا عفونت‌های سیستمیک خطرناک و حتی عفونت‌های منتشره کشنده متغیر است. عفونت بیمارستانی از مهم‌ترین این عفونت‌ها است که به صورت فرصت طلب توسط گونه‌های کاندیدا از جمله کاندیدا/آلبیکس در افرادی با نقایص ایمنی ایجاد می‌شود (۳). گونه‌های مختلف کاندیدا نسبت به داروهای ضدقارچی حساسیت متفاوتی دارند؛ به‌عنوان مثال، حساسیت کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا گلابراتا نسبت به فلوکونازول ۴ برابر کمتر از کاندیدا/آلبیکس است؛ همچنین کاندیدا لوسیتانی مقاومت نسبی ذاتی به آمفوتریسین-ب دارد (۶-۴). پیدا کردن منابع عفونت و درک راه‌های انتقال بیماری، به‌ویژه در اپیدمی بیمارستانی، مستلزم شناسایی گونه‌ها است (۷).

بسیاری از گونه‌های کاندیدا می‌توانند عامل بیماری باشند؛ اما در بیشتر موارد، میکروارگانیسم جداشده از موارد بالینی کاندیدا/آلبیکس است. کاندیدا/آلبیکس و برخی دیگر از گونه‌های کاندیدا فلور نرمال هستند که در شرایط طبیعی، تعداد آن‌ها توسط شرایط حاکم بر محیط از جمله تنوع و تعداد دیگر میکروارگانیسم‌ها، دستگاه ایمنی سلولی بدن انسان، مقادیر ایمونوگلوبولین-آ، حرکات دودی روده و... کنترل می‌گردند و بنابراین، برای میزان خود بیماری‌زایی ندارند (۸)؛ اما با عللی چون تغییر شرایط محیطی و یا تضعیف دستگاه

(۱۶-۱۲). بیوفیلیم جوامع میکروبی هستند که بر روی سطوح زنده و یا غیرزنده مانند ایمپلنت‌های دندان، بخیه‌ها و کاترها تشکیل می‌شوند و محل تکثیر میکروبی و ترشح فاکتورهای پاتوژن می‌گردند و به انتشار عفونت کمک می‌کنند (۱۲، ۲). در اتصال میکروب‌ها به سطوح برای تشکیل بیوفیلیم ماتریکس خارج سلولی مانند کپسول، آگروپلی ساکاریدها، DNA خارج سلولی و پروتئین‌های آمیلوئیدی نقش دارند (۱۳، ۱۲، ۷، ۲). تشکیل بیوفیلیم شامل جذب مولکول‌ها به سطوح، چسبندگی به سطح و انتشار مواد پلیمری خارج سلولی و تشکیل و بلوغ کلنی است. فعالیت متابولیک میکروارگانیسم‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلیم در قیاس با نوع پلیمرها متغیر است و منتج به فعال یا مهارشان ژن‌های خاص مرتبط با تشکیل بیوفیلیم و تغییر سرعت رشد می‌شود. بیوفیلیم‌ها نه تنها از میکروارگانیسم در برابر تغییر pH، کمبود مواد مغذی، نیروهای مکانیکی و برشی محافظت می‌کند (۱۶، ۱)، بلکه دسترسی جوامع بیوفیلیم قارچی را به آنتی‌بیوتیک‌ها و سلول‌های ایمنی میزبان مسدود می‌سازد (۱۶-۱۴)؛ بنابراین، ماتریکس بیوفیلیم قدرت مقاومت بیشتری را به قارچ‌ها می‌دهد که سبب می‌گردد نه تنها شرایط سخت را تحمل کنند، بلکه در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مقاوم شوند که به ظهور جدایه‌های مقاوم به دارو منجر می‌گردد. بیان بیش از حد ژن‌های درگیر در سیستم‌های افلاکس پمپ ناقلین قابل اتصال به خانواده ابر ناقلین و تسهیل‌کننده بزرگ دو گروه از سیستم‌های پمپ افلاکس در گونه کاندیدا هستند که سبب نشت دارو به خارج از سلول قارچی می‌شود. در بسیاری از جدایه‌های مقاوم به آژول، گونه‌های کاندیدا بیان بیش از حد ژن CDR و MDR مشاهده شده است (۱۰، ۱). اگرچه کاندیدا آلیکس شایع‌ترین عامل اتیولوژیک عفونت فرصت طلب در افرادی با نقص دستگاه ایمنی است، گونه‌های غیر آلیکس از جمله کاندیدا ترئوپیکالیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا کروزه‌ای، کاندیدا گلیرموندی نیز کم‌و بیش از بیماران جدا می‌شوند (۲۰-۱۷). اهمیت گونه‌های غیر آلیکس در سال‌های اخیر به واسطه بروز مقاومت دارویی نسبت به برخی از داروهای ضدقارچی بیشتر است که باعث

افزایش وفور نسبی این گونه‌ها می‌گردد، ضمن اینکه تعیین فراوانی گونه‌های مسئول عفونت از نظرگاه اپیدمیولوژی و کنترل عفونت، به‌ویژه در عفونت‌های بیمارستانی ناشی از کاندیدا، اهمیت دارد (۲۱، ۶-۴).

به علت افزایش مقاومت کاندیدا ترئوپیکالیس به فلوکونازول، درمان این عفونت‌ها بسیار مشکل است و به مهاجم شدن عفونت و وضعیت بسیار وخیم افراد با نقص دستگاه ایمنی منجر می‌شود (۱). از آنجا که سازوکارهای مقاومت دارویی در گونه‌های کاندیدا متنوع و ژن‌های متعددی در این امر دخیل است؛ بنابراین، در این تحقیق سعی شده است که نقش احتمالی دو ژن CDR و MDR در مقاومت دارویی در جدایه‌های مقاوم و حساس کاندیدای جدا شده از بیماران ایرانی بررسی گردد. بررسی‌های کتابخانه‌ای نشان داده است که مطالعات بسیار نادری درباره بیان هم‌زمان این دو ژن در الگوی اپیدمیولوژیک کاندیدیازیس در دهه اخیر در جهان انجام شده است و انجام این تحقیقات به بیان چگونگی ایجاد مقاومت می‌پردازد که این مسئله به طراحی داروهای ضدقارچی کمک شایانی می‌کند.

## مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: این تحقیق مطالعه‌ای مقطعی-توصیفی تحلیلی است که از اردیبهشت سال ۱۳۹۹ تا تیرماه سال ۱۴۰۰ انجام شده است. در این تحقیق، نمونه‌های بالینی بیماران مبتلا به کاندیدیازیس واژینال و گوارشی نمونه‌برداری شده در رده‌های سنی مختلف از افراد جوان تا افراد سال‌خورده بررسی گردید و نمونه‌های گرفته شده شامل نمونه سواب دهانی و واژینال و نمونه مدفوعی است که از افراد مراجعه‌کننده به آزمایشگاه قارچ‌شناسی واحد تهران شمال و مرکز تحقیقات رویان و بیمارستان‌های سطح شهر تهران جمع‌آوری شد. همه اطلاعات این مطالعه در فرم‌های محرمانه زیر نظر کمیته اخلاق با کد اخلاق IR.IAU.TNB.REC.1400.089 جمع‌آوری گردید. با بررسی متون و مطالعات انجام شده در گذشته و همچنین تعیین میانگین شیوع و قرار دادن آن در فرمول کوکران، حجم نمونه تعیین شد که عبارت است از: (۲۲)

۵۰۰ میلی گرم در لیتر کلرامفنیکل و کروم آگار تهیه شد و نمونه‌های بالینی بر روی محیط‌ها کشت گردید. پلیت‌های حاوی محیط کشت به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. برای تشخیص گونه‌ها، از روش تولید جرم تیوب در محیط سرم، ایجاد کلامیدوکنیدی بر روی محیط کشت کورن میل آگار و ایجاد کلنی‌های رنگی روی محیط کشت کروم آگار کاندیدا استفاده گردید؛ همچنین از جدایه استاندارد کاندیدا آلیکنس ATCC14053 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. مخمرها در محیط کشت ساپورو دکستروز آگار کشت گردید و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا زمان آزمایش نگهداری شدند (۲۰).

بررسی میکروسکوپی: برای انجام آزمایش مستقیم میکروسکوپی، از هریک از نمونه‌ها یک لام مستقیم تهیه گردید و با روش رنگ آمیزی گرم بررسی شد. در صورت مشاهده مخمرهای جوانه‌دار، نمونه‌ها مثبت تلقی می‌گردید و برای دریافت کلنی خالص، مجدداً در محیط کشت پایه ساپورو دکستروز آگار کشت داده شد و سپس برای تشخیص گونه‌های کاندیدا، به محیط کشت اختصاصی کروم آگار کاندیدا منتقل گردید (۲۱).

انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی: کشت تازه مخمر به منظور بررسی تخمیر قند، بر روی محیط واجد قند و اندیکاتور فنل رد برات با اسیدیته ۶/۷ تا ۷ کشت داده شد؛ سپس محیط کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید. در طول این مدت، در صورت تغییر رنگ محیط، آزمایش به صورت مثبت گزارش شد.

به منظور آزمایش جذب نیتروژن، یک کلنی از کشت تازه مخمر برداشته و در محیط حاوی اوره تلقیح گردید و سپس نمونه‌ها به مدت سه روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد که در صورت مصرف اوره، رشد مخمرها در لوله‌ها با تغییر رنگ همراه است. نتایج بر اساس جدول استاندارد گزارش گردید (۷).

آزمایش جرم تیوب و تولید کلامیدوسپور برای تشخیص افتراقی گونه‌های کاندیدا آلیکنس: همه مخمرهای

$$N = pqz^2 / d^2$$

$$N=100$$

که در این فرمول، با توجه به  $p=0.4$ ،  $z=1.96$ ،  $d=0.1$  مطلق و ضریب اطمینان ۰/۹۵، تعداد نمونه حدود ۹۳ عدد است؛ اما به علت ریزش نمونه‌ها در طول مطالعه، تعداد کل نمونه بیشتر و ۱۰۰ در نظر گرفته شده است.

معیار ورود به مطالعه شامل بیمارانی با علائم گوارشی شامل اسهال، یبوست، التهاب دستگاه گوارش، سابقه بیماری التهابی روده (IBD) و سندرم روده تحریک پذیر (IBS) و معیار خروج از مطالعه شامل افرادی بود که در یک ماه گذشته به صورت دوره‌ای داروهای گوارشی یا پروبیوتیک مصرف کرده بودند و یا به تشخیص متخصص گوارش، مبتلا به بیماری کولیت حاد بودند و یا در نمونه مدفوع، خون مشاهده می‌شد و یا به هر علت از شرکت در مطالعه انصراف دادند.

تشخیص بالینی بیماری شامل بیماری‌های گوارشی مثل رفلاکس، کولیت و... بیماری‌های زمینه‌ای مانند دیابت، واژینیت و... توسط پزشک متخصص تأیید گردید و نمونه‌برداری توسط سواب استریل انجام شد؛ سپس نمونه سواب در لوله استریل محتوی سرم فیزیولوژی حاوی کلرامفنیکل تحت زنجیره سرد به آزمایشگاه برای انجام تست‌های بعدی ارسال گردید. نمونه مدفوعی افراد سال خورده از آسایشگاه کهریزک جمع‌آوری شد. حداقل پنج گرم مدفوع در ظرف‌های مخصوص استریل جمع‌آوری گردید. نمونه مدفوع فرم‌دار حداکثر دو ساعت پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه ارسال شد و سپس با روش تغلیظ با تکنیک شناورسازی و رسوب دادن آماده گردید؛ سپس با استفاده از روش مستقیم میکروسکوپی رنگ آمیزی گرم انجام شد و همچنین با استفاده از پتاس ۱۰ درصد، مخمرهای زنده درون سوسپانسیون با بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ مشاهده گردید؛ سپس نمونه‌ها بر روی محیط کشت کروم آگار کاندیدا کشت شد و بر اساس رنگ کلنی، کلنی سبزرنگ کاندیدا آلیکنس شناسایی گردید؛ همچنین سایر آزمایش‌های مولکولی، بیوشیمیایی و... صورت گرفت.

جداسازی و شناسایی گونه‌های کاندیدا: به منظور رشد جدایه‌های کاندیدا، محیط ساپورو دکستروز آگار حاوی

پس از گذشت ۴۸ ساعت، کلنی‌های ظاهر شده از نظر مورفولوژی کلنی و رنگ پیگمان تولید شده بر اساس استاندارد تعیین رنگ گونه که بر روی بروشور محیط کشت قرار دارد، تعیین شدند (۲۰).

بررسی حضور ژن‌های *MDR1* و *CDR1*؛ استخراج DNA: پس از تخلیص کلنی‌های کانیدها بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید و سپس کشت‌ها تجدید شد و به مدت ۱۸ ساعت گرماگذاری گردید. پس از رسیدن به مرحله رشد لگاریتمی، برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن استفاده شد. برای تهیه پرایمر، پرایمرهای اختصاصی بر اساس رفرنس انتخاب گردید و برای جلوگیری از تکراری بودن، در سایت NCBI بلاست شد و سپس به شرکت سیناکلون برای ساخت سفارش داده شد. پس از انجام PCR، قطعاتی با طول ۱۵۸ bp برای ژن *MDR1* و ۲۲۶ bp برای ژن *CDR1* به دست آمد. در جدول شماره ۱ مشخصات پرایمرها نشان داده شده است؛ همچنین برنامه تنظیمی زمان و حرارت برای انجام مراحل PCR در شکل شماره ۱ نشان آمده است (۱۰).

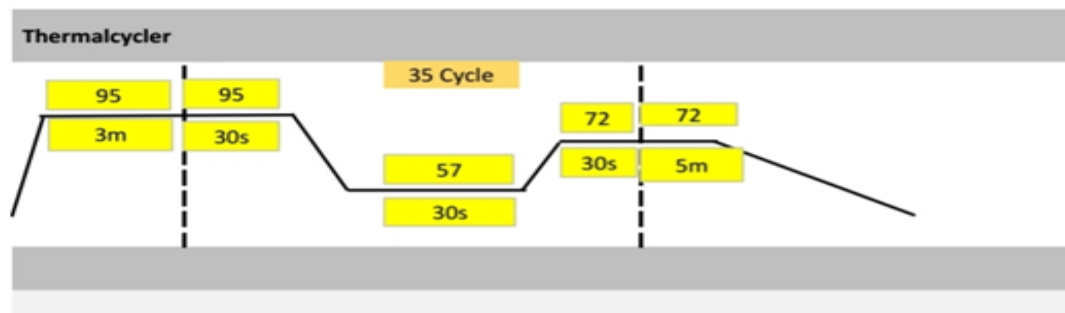
مورد بررسی ابتدا بر روی محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شدند؛ سپس جدایه‌های کشت داده شده بر روی محیط کورن میل آگار واجد یک درصد توئین ۸۰ تلقیح گردیدند و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از طی مدت انکوباسیون، با استفاده از بزرگ‌نمایی ۱۰ میکروسکوپ، وجود داشتن یا نداشتن کلایدو کونیدی بر روی محیط کشت بررسی گردید.

برای انجام آزمون لوله زایا که یکی از ابتدایی‌ترین روش‌های تشخیص کانیدها/آلیکنس است، توسط یک آنس استریل از نمونه کشت تازه بیمار برداشته و به درون نیم میلی لیتر از سرم انسان انتقال داده شد و به خوبی مخلوط گردید. سوسپانسیون بالا در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۳-۲ ساعت نگهداری شد؛ سپس وجود داشتن یا نداشتن لوله زایا در زیر میکروسکوپ بررسی گردید (۲۱).

کشت بر روی محیط افتراقی کروم آگار کانیدها؛ با استفاده از لوب استریل، مقدار کمی از جدایه‌های مخمری خالص‌سازی شده بر روی محیط کشت افتراقی کروم آگار کانیدها کشت داده شد. محیط‌های کشت تلقیح شده درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید و

جدول شماره ۱. توالی ۶‌های نوکلئوتیدی پرایمر برای شناسایی ژن‌های مقاومت آزولی در جدایه‌های کانیدها

Gene	Primer sequence	Size bp	Reference
CDR1_F CDR1_R	5'-GAA GGT GAA GGT CCG AGT C-3' (forward) 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3' (reverse)	19 20	(Gao B. et al.,2015)
MDR1_F MDR1_R	5'-CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG-3' (forward) 5'-TGT TCA AAC TTC TGC TCC TGA-3' (reverse)	20 21	Gao B. et al.,2015)



شکل شماره ۱. برنامه تنظیمی درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل PCR

استوک اولیه به هر چاهک اضافه و پس از ۲۰ دقیقه گرماگذاری در دمای اتاق، با آب مقطر شستشو داده شد. ۱۵۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد به چاهکها اضافه گردید و میزان جذب نوری در طول موج ۵۴۵ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر اندازه گیری شد. در نهایت، عکس میکروسکوپ الکترونی از بیوفیلم جدایه ها تهیه گردید (۲۳).

تهیه عکس SEM برای تأیید تشکیل بیوفیلم: برای تهیه عکس SEM، بیوفیلمها روی ظروف پلی استایرن کشت بافت با قطر ۳۵ میلی متر ساخته شدند و سپس به مدت ۱۶ ساعت در مخلوطی از ۲ درصد پارافورمالدئید و ۲ درصد گلو تار آلدئید و بافر ۰/۱۵ مولار سدیم کاکودیلات با ۷/۴ pH، با رنگ کاتیونی ۰/۱ درصد آلسیان آبی فیکس گردیدند؛ سپس به مدت ۳۰ دقیقه با هگزامتیل دیسیلان آبگیری شدند. در نهایت، به مدت ۲۴ ساعت در معرض هوا خشک گردیدند (۴۷) و پس از پردازش، با میکروسکوپ الکترونی روبشی عکس برداری شدند (۲۳).

آنتی بیوگرام: آنتی بیوگرام با استفاده از روش Kirby-Bauer به منظور به دست آوردن حداقل غلظت بازدارندگی داروی آموتریسین-ب بر اساس جدول موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی برای جدایه های کاندیدا استفاده گردید. ابتدا سوسپانسیون استاندارد مخمر با استفاده از نیم مک فارلند تهیه شد (Absorbance 0.08 to 0.1 در طول موج 625 nm معادله 108 5/1 CFU/ml)؛ سپس روی محیط مخمر بر پایه نیتروژن به روش پورپلیت دیسک فلوکونازول، کتوکونازول و آموتریسین-ب دیسک گذاری انجام گردید و پلیت ها به انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت منتقل شد و پس از آن، قطر هاله اطراف دیسک اندازه گرفته شد و نتایج به صورت کیفی بیان گردید و با جدول CLSI مقایسه شد. آزمایشها به صورت سه گانه تکرار گردید (۷).

بررسی بیان ژن های هدف: پس از جداسازی مخمرهای مولد بیوفیلم بر اساس آزمون کریستال ویوله و جداسازی جدایه های دارای ژن CDR1 و MDR1 با روش PCR و با توجه به حداقل غلظت متوقف کننده رشد

بررسی محصولات PCR به روش الکتروفورز: شش میکرولیتر از محصولات PCR با بافر بارگذاری به نسبت ۳ به ۱ مخلوط و درون چاهکها ریخته شد. برای تأیید طول قطعه، در یکی از چاهکها مارکر شرکت سیناکلون اضافه گردید. پس از قرار دادن درب تانک الکتروفورز، الکترودها به دستگاه مولد جریان الکتریکی مستقیم (DC power) متصل گردید، به طوری که جهت حرکت مولکولهای DNA به سمت قطب مثبت باشد؛ سپس دستگاه روی ولتاژ ۷۵ ولت (۱۰ ولت در هر سانتی متر) تنظیم شد. هنگامی که رنگ برموفیل بلو به اندازه کافی (حدود ۳/۴ طول ژل) پایین آمد، جریان الکتریکی قطع گردید و ژنوم استخراج شده یا محصولات PCR در مقابل نور UV مشاهده و عکس برداری شد.

بررسی تشکیل بیوفیلم: برای ارزیابی تشکیل بیوفیلم نمونه های دارای بیان دو ژن MDR1 و CDR1 از روش رنگ آمیزی کریستال ویوله استفاده گردید. به منظور بررسی تشکیل بیوفیلم در جدایه های جداسازی شده، سوسپانسیون به غلظت  $1 \times 10^6$  محیط مخمر با پایه نیتروژن حاوی ۱۰۰ میکرولیتر گلوکز تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ تهیه شده به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شد، سپس پلیت یاد شده در انکوباتور شیکر دار ۳۰ درجه سانتی گراد با دور 75 rpm به مدت ۹۰ دقیقه قرار گرفت تا سلولها به کف چاهک متصل شوند؛ سپس ۲۰۰ میکرولیتر محیط مخمر با پایه نیتروژن غنی شده با گلوکز به هر چاهک افزوده شد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکر دار نگهداری گردید. پس از مدت مدنظر، بیوفیلم تشکیل شده با ۱۰۰ میکرولیتر PBS شست و شو داده شد؛ سپس بیوفیلم تشکیل شده با ۱۰۰ میکرولیتر بافر سالین شستشو داده شد و رقت های سریالی آموتریسین-ب به هر چاهک پلیت افزوده گردید و حجم هر چاهک با استفاده از محیط RPMI 1640 به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از شستشوی چاهکها با سرم فیزیولوژی، میزان ۱۰۰ میکرولیتر متانول ۹۹ درصد به هر چاهک اضافه گردید. پس از فیکس کردن به مدت ۱۵ دقیقه، محلول رویی دور ریخته شد و چاهکها در معرض هوا خشک گردیدند؛ سپس ۱۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱ درصد به میزان ۱:۵۰

به دست آمده برای آن جدایه، RNA ژنومی استخراج شد و پس از تأیید کمی و کیفی RNA استخراج شده و ساخت cDNA با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت سیناژن (PR891620)، بیان ژن برای هر ژن هدف نسبت به ژن مرجع

با تکنیک ریل تایم پی سی آر بررسی گردید. داده‌های ریل تایم پی سی آر به کمک نرم افزار موجود در دستگاه ABI و بر اساس فرمول زیر  $\Delta\Delta CT$  - محاسبه شد (۲۴):

$$\Delta ct = ct(MDR1 \text{ Gene or } CDR1 \text{ Gene}) - ct(18SrRNA \text{ Gene})$$

سپس میزان تغییر بیان ژن fold change با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۲۴):

$$CT = 2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(\Delta ct MDR1 - \Delta ct 18srRNA)}$$

$$CT = 2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(\Delta ct CDR1 - \Delta ct 18srRNA)}$$

نمونه گیری در جدول شماره ۲ دسته بندی شده است. از ۱۰۰ نمونه دریافت شده، ۶۰ نمونه گونه های کاندیدا داشتند. ۳۵ جدایه کاندیدا آلیکس از نمونه ها جداسازی شد که بیش از ۵۰ درصد جدایه های جداسازی شده را به خود اختصاص داد.

تجزیه و تحلیل آماری: داده های به دست آمده از این مطالعه با نرم افزار SPSS vol.28 تجزیه و تحلیل شد و ارتباطات آماری با  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته های پژوهش

نتایج نمونه برداری: داده های مربوط به نتایج کشت و

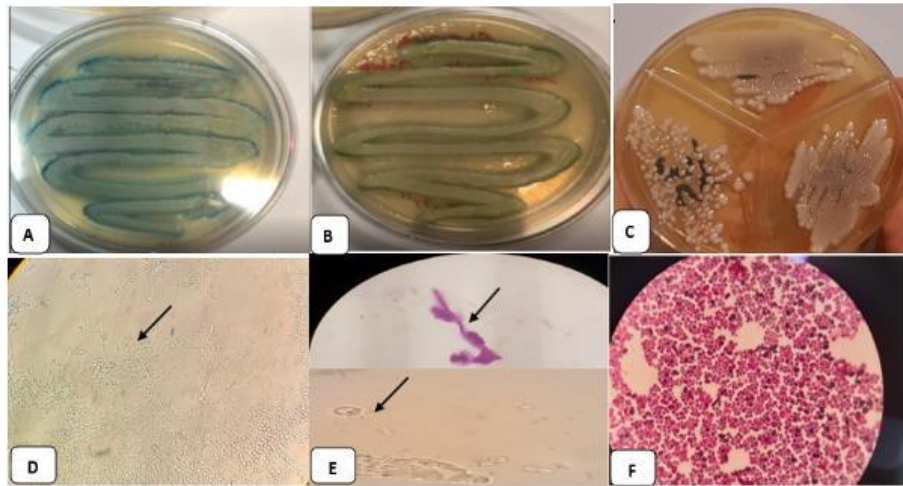
جدول شماره ۲. گونه های جداسازی شده کاندیدا از نمونه های بیماران

تعداد نمونه	نوع کاندیدا
۳۵	کاندیدا آلیکس
۵	کاندیدا گلابراتا
۷	کاندیدا تروپیکالیس
۳	کاندیدا گیلر موندی
۴	کاندیدا کروزه ای
۶	کاندیدا پاراپسیلوزیس
۶۰	مجموع نمونه ها

رنگ سفید بر روی محیط کروم آگار کاندیدا تفریق داده شدند؛ همچنین گونه های کاندیدا آلیکس توانایی تولید لوله زایا را داشتند که در نمونه میکروسکوپی رنگ آمیزی شده کاملاً مشخص است. گونه های کاندیدا آلیکس توانایی تولید کلامیدوسپور را روی محیط کشت کورن میل آگار داشتند و دیگر نتایج بررسی جدایه ها در شکل شماره ۲ قابل مشاهده است.

نتایج آزمایش هایی میکروسکوپی، ماکروسکوپی، بیوشیمیایی و محیط های کشت: بر اساس آزمایش های انجام شده، انواع گونه های کاندیدا شناسایی گردیدند. نتایج شناسایی جدایه ها در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. همان طور که در شکل شماره ۲ نشان آمده است، گونه های مختلف کاندیدا از جمله گونه کاندیدا آلیکس به رنگ سبز، کاندیدا تروپیکالیس به رنگ آبی و کاندیدا کروزه ای به رنگ صورتی، کاندیدا گلابراتا به رنگ قرمز و گونه های دیگر به

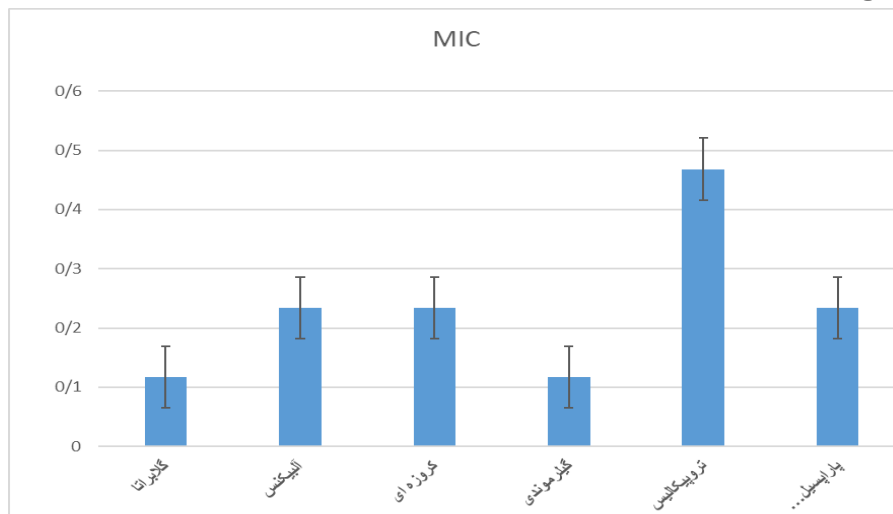




**شکل شماره ۲.** مشاهده نتایج آزمایش های مورفولوژی، میکروسکوپی و محیط های کشت اختصاصی برای تشخیص جدایه های کاندیدا. A. کلنی آبی رنگ کاندیدا/ تروپیکالینس بر روی محیط کشت کروم آگار کاندیدا؛ B. کلنی سبز رنگ کاندیدا/ آلیکنس بر روی محیط کشت کروم آگار کاندیدا؛ C. کلنی جدایه های جدا شده بر روی محیط کشت پایه؛ D. مشاهده کلامیدوسپور بر روی محیط کشت کورن میل آگار؛ E. تولید جرم تیوب توسط گونه های کاندیدا/ آلیکنس رنگ شده و رنگ نشده؛ F. تصویر میکروسکوپی جدایه های مخمری جدا شده

متوقف کننده رشد برای کاندیدا/ آلیکنس در محدوده ۰/۲۳۴ تا ۱/۸۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است.

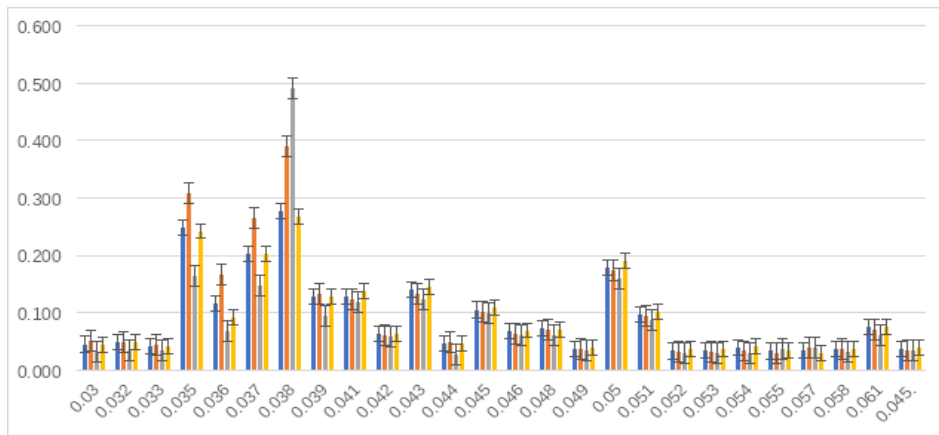
نتایج آنتی بیوگرام: بررسی میزان حداقل غلظت متوقف کننده رشد آمفوتریسین- ب به روش تهیه رقت های سریال صورت گرفت و داده ها در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد که میزان حداقل غلظت



**شکل شماره ۳.** حداقل غلظت متوقف کننده رشد در جدایه ها در مقایسه با آمفوتریسین- ب

تأثیر آمفوتریسین- ب تحت غلظت های ۰/۰۲ تا ۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر خوانده شد. نتایج میزان جذب در تشکیل بیوفیلم در شکل شماره ۴ آمده است.

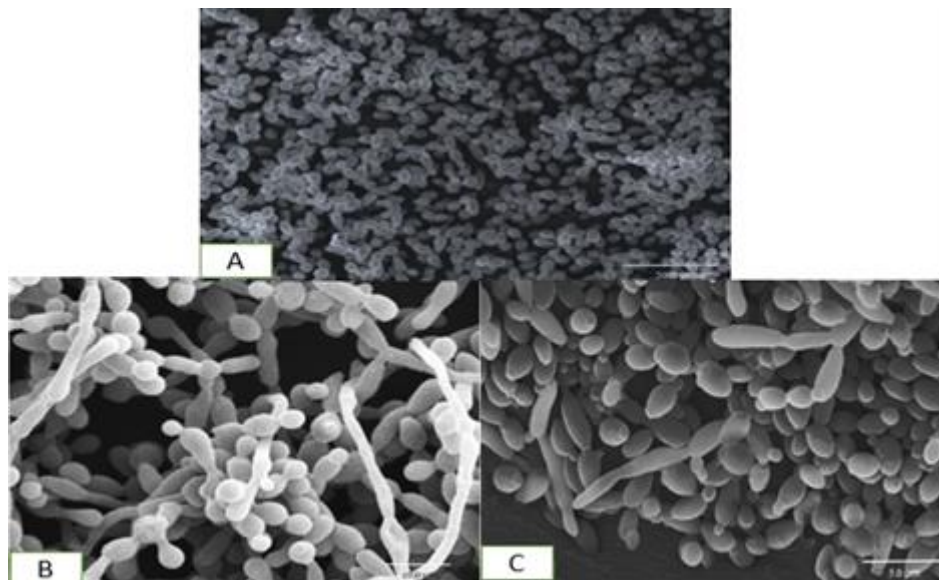
نتایج آزمایش کریستال ویوله در تشکیل بیوفیلم: پس از انجام آزمایش، تغییر رنگ در طول موج ۵۴۵ نانومتر (میلی گرم در میلی لیتر) در جدایه های شاهد و در جدایه های تحت



**شکل شماره ۴.** میانگین معیار جذب در طول موج ۵۴۵ نانومتر (میلی گرم در میلی لیتر) حاصل از تأثیر آفوتریسین - ب بر روی تشکیل بیوفیلم جداپه‌ها. ستون آبی: شاهد؛ ستون قرمز: آفوتریسین - ب؛ ستون طوسی: غلظت ۰/۰۲ گرم؛ ستون زرد: غلظت ۱۵ میلی گرم

کاندیدا به هم و در تشکیل بیوفیلم بسیار مهم هستند؛ اما در عکسی که پس از تشکیل بیوفیلم وجود دارد، تولید هایف کاذب در کاندیدا *تروپیکالیس* و تشکیل لوله‌ی زایا و هایف کاذب در کاندیدا *آلیکنس* کاملاً مشهود است و افزایش جذب نوری بیشتر رنگ کریستال ویوله در چاهک‌هایی را که بیوفیلم تشکیل شده است، تأیید می‌کند. نتایج در شکل شماره ۵ نمایش داده شده است.

نتایج تأیید تشکیل بیوفیلم با عکس میکروسکوپ الکترونی: با توجه به اینکه بیشترین گونه‌هایی که از نمونه‌های بالینی و طبیعی جدا شد، شامل کاندیدا *آلیکنس* و کاندیدا *تروپیکالیس* بودند، برای تأیید تشکیل بیوفیلم، از دو جدایه کاندیدا *آلیکنس* و کاندیدا *تروپیکالیس* عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی پیش و پس از تشکیل بیوفیلم تهیه شد. با توجه به شکل در حالت پیش از تشکیل بیوفیلم لوله‌ی زایا و هایف کاذب دیده نمی‌شوند که این دو در اتصال



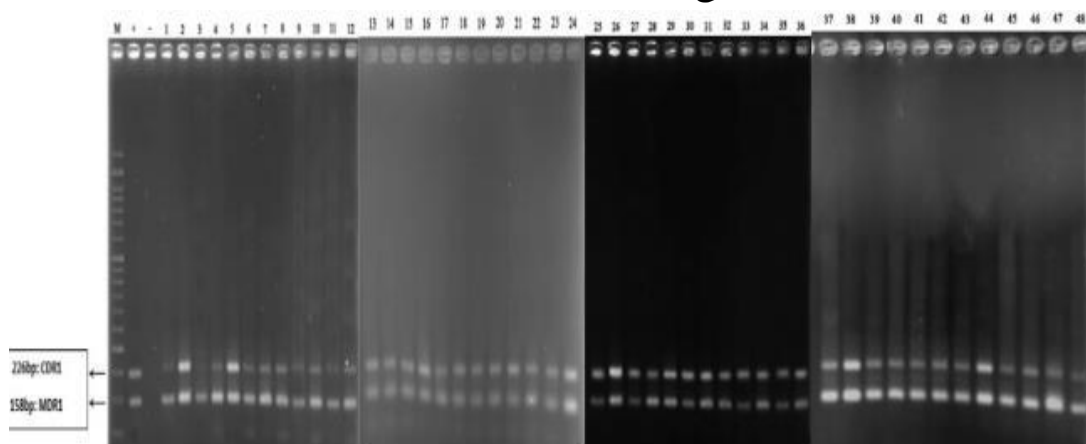
**شکل شماره ۵.** مشاهده تصویر میکروسکوپ الکترونی. A. نمونه شاهد کاندیدا *آلیکنس* پیش از تشکیل بیوفیلم؛ B. تشکیل بیوفیلم توسط کاندیدا *آلیکنس*؛ C. تشکیل بیوفیلم توسط کاندیدا *تروپیکالیس*

استخراجی نسبتاً خالص است و نیازی به پروتئیناز در جریان استخراج DNA نیست. نتایج نشان داد که ۴۸ جدایه از

نتایج PCR برای بررسی وجود دو ژن *CDRI* و *MDRI* در ۴۸ جدایه: بررسی‌ها نشان داد که DNA

شماره ۶ نشان داده شده است.

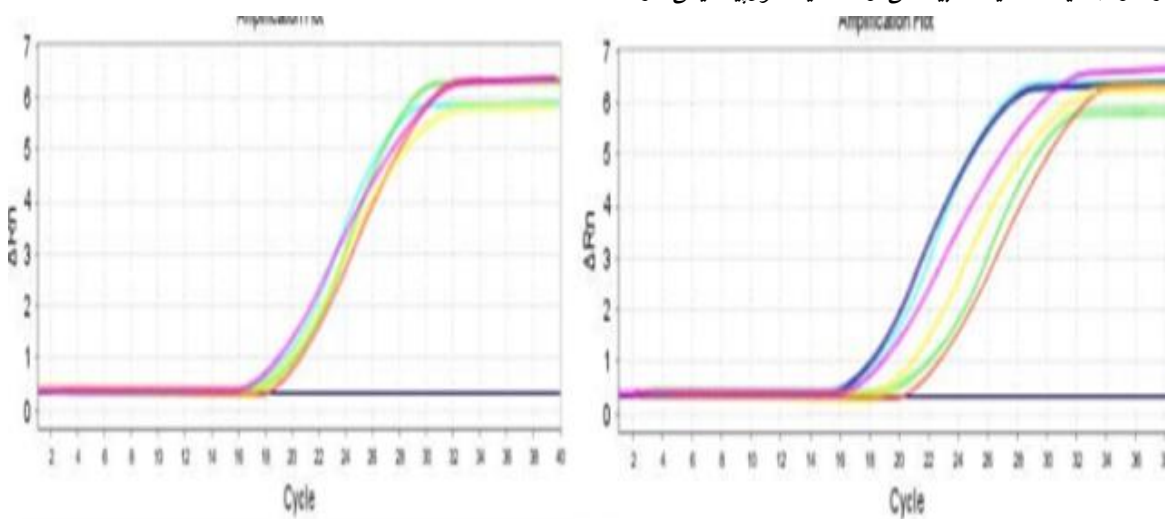
گونه های کاندیدای جداسازی شده از نمونه های مقاومت آزرولی *MDR1* و *CDR1* داشتند. نتایج در شکل



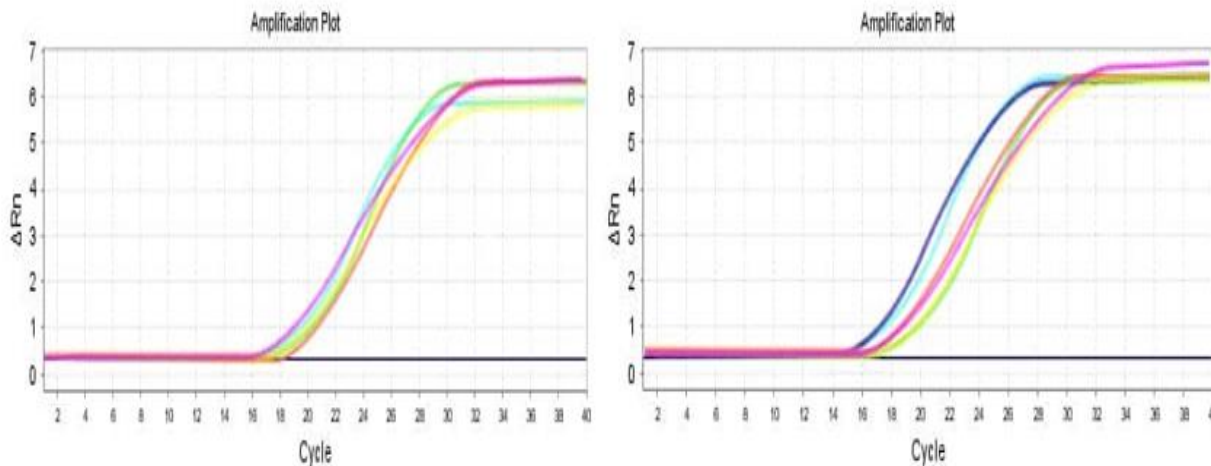
شکل شماره ۶. نتایج الکتروفورز محصولات PCR. ستون M لدر ۱۰۰ جفت بازی، ستون +: کنترل مثبت، تون -: بلانک، نمونه ها از ستون ۱ تا ۴۸.

شکل های شماره ۷ و ۸ آمده است. ژن *SrRNA18* به عنوان ژن خانه دار در نظر گرفته شده است.

نتایج بررسی تکثیر ژن های مقاومت *CDR1* و *MDR1*: نمودارهای تکثیر ژن های مقاومت *MDR1* و *CDR1* در دو جدایه کاندیدا آلیکنس و کاندیدا تروپیکاليس در



شکل شماره ۷. نمودار تکثیر ژن *MDR1* و *CDR1* در جدایه کاندیدا آلیکنس



شکل شماره ۸. نمودار تکثیر ژن *MDR1* و *CDR1* در جدایه کاندیدا تروپیکالیس

برابر با  $P < 0.05$  بوده است که بیان کننده معنادار بودن اختلاف بیان این ژن در میان دو گروه تیمار شده و تیمار نشده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان بیان ژن هدف در گروه تیمار شده با آمفوتریسین - ب، با ضریب اطمینان ۹۵ درصد، بیش از ۲ برابر کاهش داشته است و تغییرات Fold Chang پس از سی ساعت،  $1/46$  - محاسبه گردید که نشان کننده کاهش میزان بیان ژن‌های مؤثر در تشکیل بیوفیلم تحت تأثیر آمفوتریسین - ب است. برخی از نتایج T-Test برای میزان بیان هر دو ژن در جداول شماره ۳ و ۴ در سی ساعت آمده است.

نتایج میزان بیان ژن‌های مقاومت *MDR1* و *CDR1* در کاندیدا آلیکنس: برای تعیین میزان تغییرات در بیان ژن‌های دخیل در تولید بیوفیلم در ساعت ۱۱ و ۳۰ تشکیل بیوفیلم، به صورت کمی از تکنیک ریل تایم پی سی آر استفاده شد و سپس نتایج به کمک نرم افزار موجود در دستگاه ABI به روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  تجزیه و تحلیل گردید و عدد نهایی حاصل از تکرارهای مختلف به کمک نرم افزار Microsoft Office Excel تجزیه و تحلیل آماری شد. در جدول شماره ۳، میزان P-value برای ژن *CDR1* در بیوفیلم ۳۰ ساعته به ترتیب

جدول شماره ۳. مقایسه بیان ژن *CDR1* در بیوفیلم سی ساعته در گروه‌های تیمار شده و تیمار نشده کاندیدا آلیکنس با داروی آمفوتریسین - ب

بیان ژن <i>CDR1</i>		تفاوت میزان بیان	بیوفیلم سی ساعته مؤلفه‌ها
تیمار نشده	تیمار شده		
۲/۱۸۵	۲/۶۹	-۰/۵۰۵	$\Delta CT$ نمونه ۱
۲/۲۴	۲/۸۴۵	-۰/۶۰۵	$\Delta CT$ نمونه ۲
۲	۲	۲	تعداد
۲/۲۱۲۵	۲/۷۶۷۵	-۰/۵۵۵	میانگین
۰/۰۳۸۸۹	۰/۱۰۹۶	۰/۰۷۰۷۱	انحراف معیار
		۰/۰۴۲	P-Value
		۹۵ درصد	ضریب اطمینان
		-۱/۴۶	تغییرات Fold Change

در بیوفیلم سی ساعته برابر با  $P = 0.002$  بوده است که بیان کننده

در جدول شماره ۴، میزان P-value برای ژن *MDR1*

معنادار بودن اختلاف بیان این ژن در میان دو گروه تیمار شده و تیمار نشده است. نتایج نشان می دهد که میزان بیان ژن هدف و تیمار نشده است. نتایج نشان می دهد که میزان بیان ژن هدف در گروه تیمار شده، با ضریب اطمینان ۹۵ درصد، بیش از ۲/۲ برابر کاهش داشته است.

**جدول شماره ۴.** مقایسه بیان ژن *MDRI* بیوفیلیم سی ساعته در گروه های تیمار شده و تیمار نشده *کاندیدایا/تروپیکالس* با داروی آمفوتریسین - ب

<i>MDRI</i> تیمار نشده	<i>MDRI</i> تیمار شده	تفاوت میزان بیان	بیوفیلیم سی ساعته مؤلفه ها
۱/۹	۲/۱۸	-۰/۲۸	ΔCT نمونه ۱
۱/۷۷	۲/۰۹۵	-۰/۳۲۵	ΔCT نمونه ۲
۳	۳	۳	تعداد
۱/۷۱۵	۲/۰۲۶	-۰/۳۱۱	میانگین
۰/۲۱۷	۰/۱۹۶	۰/۰۲۷	انحراف معیار
		۰/۰۰۲۵	P-Value
		۹۵ درصد	ضریب اطمینان
		-۰/۴۰۳	تغییرات Fold Change
		-۲/۲۴۱	ΔCT نمونه ۱

در جدول شماره ۵، میزان P-value برای ژن *CDRI* در بیوفیلیم سی ساعته برابر با  $P < 0.01$  بوده است که بیان کننده معنادار بودن اختلاف بیان این ژن میان بین دو گروه تیمار شده و تیمار نشده است. نتایج نشان می دهد که میزان بیان ژن هدف در گروه تیمار شده، با ضریب اطمینان ۹۵ درصد، بیش از ۱/۷۵ برابر کاهش داشته است.

نتایج میزان بیان ژن های مقاومت *MDRI* و *CDRI* در *کاندیدایا/تروپیکالس*: بیان ژن *CDRI* در بیوفیلیم یازده ساعته برابر با  $P = 0.04$  بود که بیان کننده معنادار بودن اختلاف بیان این ژن در میان دو گروه تیمار شده و تیمار نشده است. نتایج نشان می دهد که میزان بیان ژن هدف در گروه تیمار شده، با ضریب اطمینان ۹۵ درصد، بیش از ۱ برابر کاهش داشته است.

**جدول شماره ۵.** مقایسه بیان ژن *CDRI* در بیوفیلیم سی ساعته در گروه های تیمار شده و تیمار نشده *کاندیدایا/تروپیکالس* با داروی آمفوتریسین - ب

بیان ژن <i>CDRI</i>		تفاوت بیان	بیوفیلیم سی ساعته مؤلفه ها
تیمار نشده	تیمار شده		
۱/۸۵۵	۲/۰۵	-۰/۱۹۵	ΔCT نمونه ۱
۲/۵۵۵	۲/۸	۰۱/۲۴۵	ΔCT نمونه ۲
۲/۱۲۶	۲/۳۶	-۰/۲۳	تعداد
۰/۳۷	۰/۳۹	۰/۰۰۹۱	میانگین
		۰/۰۱۲۱	انحراف معیار
		۹۵ درصد	P-Value
		-۱/۷۵۸	ضریب اطمینان

**جدول شماره ۶.** مقایسه بیان ژن *MDRI* بیوفیلیم سی ساعته در گروه‌های تیمار شده و تیمار نشده *کاندیدای تروپیکالیس* با داروی آمفوتریسین - ب

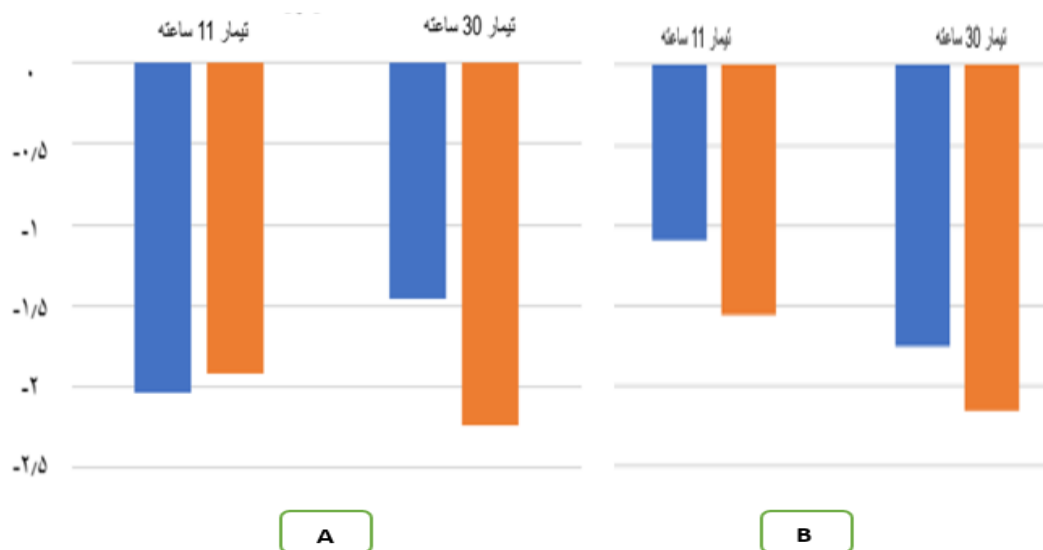
<i>MDRI</i> تیمار نشده	<i>MDRI</i> تیمار شده	تفاوت بیان	بیوفیلیم سی ساعته مؤلفه‌ها
۱/۸۲	۲/۳۶	-۰/۵۴	ΔCT نمونه ۱
۱/۸۱	۲/۲۱۰	-۰/۴۰۰	ΔCT نمونه ۲
۱/۷۱۵	۲/۰۲۶	-۰/۳۱۱	تعداد
۰/۲۱۷	۰/۱۹۶	۰/۰۲۷	میانگین
		۰/۰۱	انحراف معیار
		۹۵ درصد	P-Value
		-۲/۱۵۴	ضریب اطمینان

در جدول شماره ۶، میزان P-value برای ژن *MDRI*

در بیوفیلیم ۳۰ ساعته برابر با  $P=0.01$  بود که بیان کننده معنادار بودن اختلاف بیان این ژن در میان دو گروه تیمار شده و تیمار نشده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان بیان ژن هدف در گروه تیمار شده، با ضریب اطمینان ۹۵ درصد، بیش از ۲/۱

برابر کاهش داشته است.

شکل شماره ۹ (A) مقادیر تغییر در بیان ژن‌های هدف طی ۱۱ و ۳۰ ساعت تیمار *کاندیدای آلپیکنس* و شکل شماره ۹ (B) مقادیر تغییر در بیان ژن‌های هدف طی ۱۱ و ۳۰ ساعت تیمار *کاندیدای تروپیکالیس* با آمفوتریسین - ب را نشان می‌دهد.



**شکل شماره ۹.** مقادیر تغییر در بیان ژن‌های هدف طی ۱۱ و ۳۰ ساعت تیمار *کاندیدای آلپیکنس* و B. مقادیر تغییر بیان ژن‌های هدف در مقایسه با ژن مرجع در جدایه‌های *کاندیدای تروپیکالیس* در تیمار با آمفوتریسین - ب. رنگ نارنجی ژن *MDRI* و رنگ آبی ژن *CDRI* را نشان می‌دهد.

دارد (۷). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آمفوتریسین - ب به میزان معنی‌داری با اثرگذاری بر روی میزان بیان ژن‌های *MDRI* و *CDRI*، بیان این ژن‌های مقاومت دارویی را در جدایه‌های *کاندیدای تروپیکالیس* و *کاندیدای آلپیکنس* کاهش داده است و از این طریق، موجب تخریب زیست‌ساختار بیوفیلیم می‌گردد و می‌توان گفت، دارو به‌نوعی هم‌زمان سبب

### بحث و نتیجه‌گیری

افزایش مقاومت به آمفوتریسین - ب در درمان *کاندیدازیس* منتشر، سبب ایجاد عوارض در بیماران، اتلاف وقت و صرف هزینه‌های فراوان برای درمان بیماران می‌شود (۲۷). تشکیل بیوفیلیم توسط برخی از گونه‌های *کاندیدا* بر روی کاتتر، آنژیو و غیره به ورود *کاندیدا* به خون و *کاندیدمی* منجر می‌شود و مرگ را در بیماران بستری به‌همراه

عدم اتصال و مرگ قارچ می‌شود.

در پژوهش فرح‌بخش و همکاران (۱۳۹۰)، در جدایه‌های *کاندیدا آلیکس* جداشده از بیماران مبتلا به ایدز، بیان ژن مقاومت به فلوکونازول *CDR2* در مقایسه با نمونه‌های شاهد ارزیابی گردید. ۲۸/۷ درصد از جدایه‌های *کاندیدا آلیکس* مقاوم به فلوکونازول بودند و ۶ درصد آن‌ها ژن مقاومت *CDR2* داشتند (۶). در تحقیق حاضر نیز، ۸۰ درصد جدایه‌ها (۴۲ گونه *کاندیدا*) حامل ژن *CDRI* بودند. علاوه بر این، همهٔ جدایه‌ها ژن *MDRI* داشتند. از سوی دیگر، در تحقیق ناظری و همکاران در سال ۱۳۸۸، با مطالعهٔ مقطعی بر روی ۲۳۲ بیمار، ۱۰۵ بیمار با *والوژینیت کاندیدا*ی شناسایی شدند که از میان آنان، ۱۳ نفر (۱۲/۳ درصد) به *ولوواژینیت کاندیدا*یی عودکننده مبتلا بودند. *کاندیدا آلیکس* و پس از آن *کاندیدا گلابراتا* بیشترین فراوانی را داشتند و خارش شایع‌ترین علامت بالینی (۸۲/۹ درصد) در زنان با کشت مثبت بود (۶). در مطالعهٔ حاضر نیز، *کاندیدا آلیکس* به میزان شش برابر نسبت به سایر جدایه‌های *کاندیدا* از کشت نمونه‌های بالینی مشاهده گردید و پس از آن، *کاندیدا تروپیکالیس* بیشترین تعداد جداشده را داشت. علت اختلاف نتایج محل نمونه‌برداری است که به‌طور معمول شامل گونه‌های متنوعی از *کاندیدا* است. کاظمی و همکاران به بررسی حساسیت دارویی ایزوله‌های کلینیکی *کاندیدا آلیکس* نسبت به داروهای *آمفوتریسین-ب* و *کتوکونازول* پرداختند و نتایج آنان نشان داد که علی‌رغم محدودیت‌های مصرف *آمفوتریسین-ب*، این دارو انتخاب بهتری در درمان *کاندیدایزیس* نسبت به *کتوکونازول* است (۲۸)؛ به همین علت، در این تحقیق هم داروی انتخاب‌شده *آمفوتریسین-ب* بود و مشخص گردید که مقادیر *subMIC* داروی *آمفوتریسین-ب* موجب کاهش سطح بیان ژن‌های *MDRI* و *CDRI* در بیوفیلم تشکیل شده به مدت ۱۱ ساعت و ۳۰ ساعت است. داده‌های مطالعهٔ حاضر با مطالعهٔ کاظمی و همکاران تطابق دارد. نوربخش و همکاران در سال ۱۳۹۵، در تعداد ۱۰۰ جدایهٔ *کاندیدا آلیکس* جداشده از نمونه‌های بالینی، بیان ژن‌های *LIP2*، *LIP3* و *LIP5* را بررسی کردند. از این تعداد، در بیست‌وچهار جدایه

بیان هر سه ژن مثبت بود (۲۹). در این تحقیق، بیان دو ژن *MDRI* و *CDR* در ۴۶ نمونه مثبت گزارش شد. علت اختلاف نتایج به نوع ژن و عملکرد آن بستگی دارد. ژن‌های بررسی‌شده در این تحقیق در تشکیل بیوفیلم مؤثر هستند؛ اما ژن‌های پژوهش نوربخش در تولید آنزیم لیپاز به‌عنوان یک عامل پاتوژن نقش داشتند.

هاکیو و همکاران در تحقیقی بررسی کردند که مقاومت دارویی *کاندیدا* نسبت به داروهای آزول، مربوط به بیان ژن *CDRI* است. در این مطالعه، بیماران دیابتی هندی بررسی شدند و وجود این ژن و جهش‌زایی و تغییرات آلی بررسی و اثبات گردید که موتاسیون‌های طبیعی به‌دست آمده بیشتر در مناطق غیر حفاظت‌شدهٔ پروتئین وجود دارد که به مقاومت دارویی *کاندیدا آلیکس* در برابر فلوکونازول منجر می‌شود (۳۰). نتایج این مطالعه در تأیید مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد که سازوکار تغییر بیان ژن‌های دخیل در انتقال مواد به خارج از سلول قارچی در مقاومت به داروها دخیل است. علاوه بر این، مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد که در غلظت‌های *SubMIC*، تغییرات معنی‌دار بیان ژن‌ها می‌تواند به خروج غلظت‌های غیرکشندهٔ *آمفوتریسین-ب* از سلول منجر گردد. الدهری و همکارانش فعالیت کاسپاز مسیر آپوپتوز را با استفاده از *SR-FLICA* و *آسپارتیل ۲* -رودآمین ۱۱۰۴ بر پایهٔ معرف‌های رنگ‌آمیزی فلوروکروم را در تشکیل بیوفیلم‌ها بررسی کردند. مهارکننده‌های کاسپاز-۱، -۹، -۵، -۳ و -۲ همگی بقای سلولی را به‌طور چشمگیری افزایش دادند و مهارکننده‌های هیستون داستیلاز (*HDA*) فعالیت *آمفوتریسین-ب* را برای بیوفیلم‌های هر سه گونهٔ *کاندیدا* افزایش دادند. نتایج یک فرایند آپوپتوز را در بیوفیلم‌های سه گونهٔ *کاندیدای* تحت تیمار با *آمفوتریسین-ب* نشان می‌داد (۳۱). داده‌های این تحقیق در تأیید مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد که *آمفوتریسین-ب* علی‌رغم مقاومت دارویی شایع در دهه‌های اخیر، هنوز می‌تواند با تغییر در سازوکارهای پیام‌دهی درون‌سلولی، تأثیر خود را اعمال کند که نویسندگان مایل هستند این بخش را در تحقیقات آتی بررسی نمایند.

در این مطالعه، ژن‌های دخیل در مقاومت قارچ‌ها به

پور؛ تحلیل نهایی: محدثه لاری پور، طاهره مرادی برایجانی، فاطمه اشرفی.

داروهای ضدقارچی در جدایه‌های کاندیدای جدا شده از نمونه‌های بالینی با روش PCR شناسایی شدند. تعداد ۶۰ جدایه کانیدیدا از نظر ژنوتایپ بررسی گردیدند که از این تعداد، ۸۰ درصد جدایه‌ها به‌طور هم‌زمان واجد هر دو ژن *CDRI* و *MDRI* بودند. این تنوع ژنتیکی می‌تواند در اتصال، تشکیل بیوفیلم و بیماری‌زایی این میکروارگانیسم نقش ویژه‌ای داشته باشد. از سوی دیگر، مشخص گردید که غلظت subMIC داروی آمفوتریسین- ب می‌تواند به‌صورت معنی‌داری موجب کاهش بیان ژن‌های مقاومت به عوامل ضدقارچی در جدایه‌های کانیدیدا شود. به‌طور خلاصه، کاهش بیان ژن‌های مقاومت، تأثیر غلظت‌های subMIC آمفوتریسین- ب، تخریب زیست‌ساختار بیوفیلم و تغییر در سازوکارهای پیام‌دهی درون‌سلولی سبب عدم اتصال و مرگ سلول قارچی می‌گردد که در مجموع، به کاهش مقاومت برخی از گونه‌های کانیدیدا در برابر آمفوتریسین- ب می‌انجامد. مطالعه حاضر می‌تواند به‌عنوان گامی برای مقابله با مقاومت‌های کانیدیدی و طراحی داروهای جدید محسوب شود و در ابتدای راه قرار دارد

### سپاس‌گزاری

نویسندگان از کادر پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال تشکر و قدردانی می‌کنند.

### تعارض منافع

نویسندگان در این تحقیق تضاد منافع ندارند. همه نویسندگان این مقاله متن مقاله را مطالعه و با انتشار همه داده‌ها موافقت کرده‌اند.

### کد اخلاق

IR.IAU.TNB.REC.1400.089

### حمایت مالی

نویسندگان هیچ گونه حمایت مالی دریافت نکرده‌اند.

### مشارکت نویسندگان

مفهوم سازی و طرح اولیه تحقیق: محدثه لاری پور، تحلیل و تفسیر داده‌ها: محدثه لاری پور؛ طاهره مرادی برایجانی، پیش‌نویس نسخه: طاهره مرادی برایجانی؛ بازنگری انتقادی نسخه خطی برای محتوای مهم فکری: محدثه لاری



## References

- Spettel K, Barousch W, Makristathis A, Zeller I, Nehr M, Selitsch B, et al. Analysis of antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata* using next generation sequencing. *PloS One* 2019;14:e0210397. doi: 10.1371/journal.pone.0210397.
- Marak MB, Dhanashree B. Antifungal susceptibility and biofilm production of *Candida* spp. isolated from clinical samples. *Int J Microbiol* 2018;2018. doi: 10.1155/2018/7495218.
- Larypoor M, Frsad S. Evaluation of nosocomial infections in one of hospitals of Qom, 2008. *Iran J Med Microbiol* 2011;5:7-17.
- Harrison JJ, Rabiei M, Turner RJ, Badry EA, Sproule KM, Ceri H. Metal resistance in *Candida* biofilms. *FEMS Microbiol Ecol* 2006;55:479-91. doi: 10.1111/j.1574-6941.2005.00045.x.
- Galleh PR, Nwosisi C, Mohammed FA. Phytochemical and Antibiofilm Activity of *Aloe barbadensismiller* (*Aloe vera*) on *Candida albicans* Isolated from Urinary Catheter. *J Pharm Res Int* 2021;93-103. doi:10.9734/jpri/2021/v33i731206.
- Farahbakhsh E, Yadegari M, Rajabi Bazl M, Taghizadeh Armaki M. Evaluation of Susceptibility of Strains of *Candida Albicans* Isolated from AIDS Patients to Fluconazole and Determination of CDR2 Resistance Gene in Resistant Strains by RT-PCR Method. *Armaghan J* 2011;16:201-10.
- Goodarz Ghaleh Mehdikhani Z, Larypoor M, Razavi MR. The epidemiologic pattern of candidiasis in people with predisposing backgrounds. *Med J Mashhad Univ Med Sci* 2023; 65: 2080-69.
- Nailis H, Kuchariková S, Řičicová M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H, et al. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and-independent gene expression. *BMC Microbiol* 2010;10:1-11. doi: 10.1186/1471-2180-10-114.
- Aaa- Gao B, Yang FM, Yu ZT, Li R, Xie F, Chen J, et al. Relationship between the expression of *MDRI* in hepatocellular cancer and its biological behaviors. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:6995.
- Haddadi Zahmatkesh M S, Laripoor M, Mirzaie A, Ashrafi F. Prevalence of norA and norB efflux pump genes in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and their contribution in ciprofloxacin resistance. *Iran J Med Microbiol* 2017; 10: 20-30.
- Nishimoto AT, Sharma C, Rogers PD. Molecular and genetic basis of azole antifungal resistance in the opportunistic pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Antimicrobiol Chem* 2020;75:257-70. doi: 10.1093/jac/dkz400.
- Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol* 2018;16:19-31. doi: 10.1038/nrmicro.2017.107.
- Yan Y, Tan F, Miao H, Wang H, Cao Y. Effect of shikonin against *Candida albicans* biofilms. *Front Microbiol* 2019;10:1085. doi: 10.3389/fmicb.2019.01085.
- Rossoni RD, de Barros PP, de Alvarenga JA, Ribeiro FdC, Velloso MdS, Fuchs BB, et al. Antifungal activity of clinical *Lactobacillus* strains against *Candida albicans* biofilms: identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. *Biofouling* 2018;34:212-25. doi: 10.1080/08927014.2018.1425402.
- Su L, Li Y, Liu Y, Ma R, Liu Y, Huang F, et al. Antifungal-inbuilt metal-organic-frameworks eradicate *candida albicans* biofilms. *Adv Funct Mater* 2020;30:2000537. doi: 10.1002/adfm.202202895.
- Pereira R, dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Moraes SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol* 2021;131:11-22. doi: 10.1111/jam.14949.
- Pourakbari B, Teymuri M, Mahmoudi S, K Valian S, Movahedi Z, Eshaghi H, et al. Expression of major efflux pumps in fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Infect Disord Drug Targets* 2017;17:178-84. doi: 10.2174/1871526517666170531114335.
- Abirami G, Alexpandi R, Durgadevi R, Kannappan A, Veera Ravi A. Inhibitory effect of morin against *Candida albicans* pathogenicity and virulence factor production: An in vitro and in vivo approaches. *Front Microbiol* 2020;11:561298. doi: 10.3389/fmicb.2020.561298.
- Li SX, Wu HT, Liu YT, Jiang YY, Zhang YS, Liu WD, et al. The FIFO-ATP synthase  $\beta$  subunit is required for *Candida albicans* pathogenicity due to its role in carbon flexibility. *Front Microbiol* 2018;9:1025. doi: 10.3389/fmicb.2018.01025.
- Soltani MA, Larypoor M, Hamedani MP. Effect of allicin of garlic on production nitric oxide of macrophage to *Candida albicans*. *J Med Plant Res* 2009;8:164-71.
- Shams K, Larypoor M, Salimian J. The immunomodulatory effects of *Candida albicans* isolated from the normal gastrointestinal microbiome of the elderly on

- colorectal cancer. *Med Oncol* 2021;38:1-2. doi: 10.1007/s12032-021-01591-x.
22. Moosazadeh M, Akbari M, Tabrizi R, Ghorbani A, Golkari A, Banakar M, et al. Denture stomatitis and *Candida albicans* in Iranian population: A systematic review and meta-analysis. *Int Dent J* 2016;17:283.
  23. Zahran KM, Agban MN, Ahmed SH, Hassan EA, Sabet MA. Patterns of *Candida* biofilm on intrauterine devices. *J Med Microbiol* 2015;64:375-81. doi: 10.1099/jmm.0.000042.
  24. Park EJ, Chang HW, Kim KH, Nam YD, Roh SW, Bae JW. Application of quantitative real-time PCR for enumeration of total bacterial, archaeal, and yeast populations in kimchi. *J Microbiol* 2009;47:682-5. doi: 10.1007/s12275-009-0297-1.
  25. Eckert LO. Acute vulvovaginitis. *N Engl J Med* 2006;355:1244-52. doi: 10.1056/NEJMcp053720.
  26. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007;369:1961-71. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60917-9.
  27. Ahmady L, Gothwal M, Mukkoli MM, Bari VK. Antifungal drug resistance in *Candida*: a special emphasis on amphotericin B. *APMIS* 2024; 132:291-316. doi: 10.1111/apm.13389.
  28. Kazemi A, Falahati M, Hajipoor A, Jafari NA, Asgharzadeh M. Comparison of phenotypic tests and PCR to detect *Candida Albicans* from vaginal specimens (Tabriz, 2009-2010). *Jundishapur J Microbiol* 2013;6: e4734. doi: 10.5812/jjm.4734.
  29. Ghaffari M, Noorbakhsh F, Kachuei R. Study of Lipase genes expression (Lip2, 3, 5) in *Candida albicans* isolated from patients. *Iran J Med Microbiol* 2017;11:53-60.
  30. Haque A, Rai V, Bahal BS, Shukla S, Lattif AA, Mukhopadhyay G, et al. Allelic variants of ABC drug transporter *Cdr1p* in clinical isolates of *Candida albicans*. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;352:491-7. doi:10.1016/j.bbrc.2006.11.035.
  31. Al-Dhaheri RS, Douglas LJ. Apoptosis in *Candida* biofilms exposed to amphotericin B. *J Med Microbiol* 2010;59:149-57. doi: 10.1099/jmm.0.015784-0.