Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

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

**Mohaddeseh Larypoor[1*], Tahereh Moradi Braijani[2], Fatemeh Ashrafi[1]**

[1] Dept of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran
[2] 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

**A B S T R A C T**

**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.

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]

© The Author(s) Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸
E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵



# مقایسهٔ میزان بیان ژن‌های *CDR1* و *MDR1* در مراحل تشکیل بیوفیلم گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا تروپیکالیس*

**محدثه لاری‌پور**[1*]، **طاهره مرادی برایجانی**[2]، **فاطمه اشرفی**[1]

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

[1] گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

**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

**نویسنده مسئول:**
محدثه لاری‌پور
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

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

**چکیده**

**مقدمه:** قارچ‌های فرصت‌طلب در افراد دارای ضعف ایمنی، با تشکیل بیوفیلم مقاوم به داروهای ضدقارچی، عفونت ایجاد می کنند. در این مطالعه به بررسی بیان ژن‌های CDR1,*MDR1* در مراحل تشکیل بیوفیلم توسط گونه‌های کاندیدای جداشده از نمونه‌های بالینی پرداخته‌شده است.

**مواد و روش‌ها:** ۱۰۰ سواپ 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 بیوفیلم در حضور و نبودِ آمفوتریسین- ب در جدایه‌ها با استفاده از آزمایش کریستال ویوله و عکس میکروسکوپ نگاره بررسی شد. میزان بیان ژن‌های *CDR1* و *MDR1* با استفاده از تکنیک Realtime PCR تعیین گردید.

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

**بحث و نتیجه‌گیری:** بیان ژن‌های مقاومت در *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا تروپیکالیس* در افزایش تشکیل بیوفیلم و بروز کاندیدیازیس مؤثر است. بیان هم‌زمان ژن‌های مقاومت در افزایش بیماری‌زایی *کاندیدا آلبیکنس* مؤثر است. غلظت subMIC آمفوتریسین- ب به‌صورت معنی‌داری موجب کاهش بیان ژن‌های مقاومت و کاهش تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های کاندیدا می شود.

**واژه‌های کلیدی:** *کاندیدا آلبیکنس*، کاندیدیازیس، بیوفیلم، CDR1,*MDR1*، Multiplex PCR

**استناد:** لاری‌پور محدثه، مرادی برایجانی طاهره، اشرفی فاطمه. مقایسهٔ میزان بیان ژن‌های *CDR1* و *MDR1* در مراحل تشکیل بیوفیلم گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا تروپیکالیس*. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، مرداد ۱۴۰۳؛۳۲(۳): ۶۴-۴۷.

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]

حق‌مؤلف © نویسندگان

ناشر: دانشگاه علوم پزشکی ایلام

**مقدمه**

*کاندیدا* شبه‌مخمر شایع در بروز کاندیدیازیس فرصت‌طلب 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 فرصت‌طلب است که در طبیعت بر روی برگ گیاهان، آب و خاک زندگی می‌کند (۱). قدرت چسبندگی به بافت میزبان، تولید آسپارتیل پروتئیناز، *فسفولیپاز* و تغییر شکل از صورت مخمری به هایف حقیقی، هایف کاذب و لولهٔ زایا از مهم‌ترین مؤلفه‌های بیماری‌زایی *کاندیدا آلبیکنس* محسوب می‌شود (۲). کاندیدیازیس به‌صورت فرصت‌طلب در افراد دچار نقایص ایمنی مانند لوسمی و ایدز و نقایص فیزیولوژی مانند دیابت، عفونت متنوعی را ایجاد می‌کند. گسترهٔ این بیماری‌ها از عفونت‌های سطحی و مخاطی ساده تا عفونت‌های سیستمیک خطرناک و حتی عفونت‌های منتشرهٔ کشنده متغیر است. عفونت بیمارستانی از مهم‌ترین این عفونت‌ها است که به‌صورت فرصت‌طلب توسط گونه‌های کاندیدا ازجمله *کاندیدا آلبیکنس* در افرادی با نقایص ایمنی ایجاد می‌شود (۳). گونه‌های مختلف کاندیدا نسبت به داروهای ضدقارچی حساسیت متفاوتی دارند؛ به‌عنوان‌مثال، حساسیت کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا گلابراتا نسبت به فلوکونازول ۴ برابر کمتر از *کاندیدا آلبیکنس* 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 آلبیکنس* است. *کاندیدا آلبیکنس* و برخی دیگر از گونه‌های کاندیدا فلور نرمال هستند که در شرایط طبیعی، تعداد آن‌ها توسط شرایط حاکم بر محیط ازجمله تنوع و تعداد دیگر میکروارگانیسم‌ها، دستگاه ایمنی سلولی بدن انسان، مقادیر ایمونوگلوبولین-آ، حرکات دودی روده و... کنترل میگردند و بنابراین، برای میزبان خود بیماری‌زایی ندارند (۸)؛ اما با عللی چون تغییر شرایط محیطی و یا تضعیف دستگاه ایمنی میزبان تعداد این میکروارگانیسم‌ها افزایش می‌یابد و بیماری فرصت‌طلب کشنده را ایجاد می‌کند. شایع‌ترین عامل مستعدکنندهٔ میزبان 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 آلبیکنس* 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 می نمایند (۱۰).

افزایش بیان یک یا چند پمپ افلاکس باعث ممانعت از تجمع داخل سلولی، در حد آستانهٔ موردنیاز برای فعالیت داروها می‌گردد. پمپ‌های دستهٔ یک، تنها پمپ‌های اتصالی به ATP را شامل می‌شوند و جهت جابه‌جایی سوبسترا از ATP به‌عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند و پمپ‌های دستهٔ دوم برای انتقال سوبسترا از انرژی شیب پروتون غشا استفاده می‌نمایند. خصوصیت مشترک همهٔ سیستم‌های افلاکس توانایی دفع انواع مواد ضدمیکروبی 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).

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

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]

(۱۶-۱۲). بیوفیلم جوامع میکروبی هستند که بر روی سطوح زنده و یا غیرزنده مانند ایمپلنت‌های دندانی، بخیه‌ها و کاتترها تشکیل می‌شوند و محل تکثیر میکروبی و ترشح فاکتورهای پاتوژنز می‌گردند و به انتشار عفونت کمک می‌کنند (۱۲، ۲). در اتصال میکروب‌ها به سطوح برای تشکیل بیوفیلم ماتریکس خارج سلولی مانند کپسول، اگزوپلی ساکاریدها، DNA خارج سلولی و پروتئین‌های آمیلوئیدی نقش دارند (۱۳، ۱۲، ۷، ۲). تشکیل بیوفیلم شامل جذب مولکول‌ها به سطوح، چسبندگی به سطح و انتشار مواد پلیمری خارج سلولی و تشکیل و بلوغ کلنی است. فعالیت متابولیک میکروارگانیسم‌های تشکیل‌دهندهٔ بیوفیلم در قیاس با نوع پلیمرها متغیر است و منتج به فعال یا مهارشان ژن‌های خاص مرتبط با تشکیل بیوفیلم و تغییر سرعت رشد می‌شود. بیوفیلم‌ها نه‌تنها از میکروارگانیسم در برابر تغییر pH، کمبود مواد مغذی، نیروهای مکانیکی و برشی محافظت می‌کند (۱۶، ۱)، بلکه دسترسی جوامع بیوفیلم قارچی را به آنتی‌بیوتیک‌ها و سلول‌های ایمنی میزبان مسدود می‌سازد (۱۶-۱۴)؛ بنابراین، ماتریکس بیوفیلم قدرت مقاومت بیشتری را به قارچ‌ها می‌دهد که سبب می‌گردد نه‌تنها شرایط سخت را تحمل کنند، بلکه در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مقاوم شوند که به ظهور جدایه‌های مقاوم به دارو منجر میگردد. بیان بیش‌ازحد ژن‌های درگیر در سیستم‌های افلاکس پمپ ناقلین قابل اتصال به خانوادهٔ ابر ناقلین و تسهیل‌کنندهٔ بزرگ دو گروه از سیستم‌های پمپ افلاکس در گونهٔ کاندیدا هستند که سبب نشت دارو به خارج از سلول قارچی می‌شود. در بسیاری از جدایه‌های مقاوم به آزول، گونه‌های *کاندیدا* بیان بیش‌ازحد ژن CDR و MDR مشاهده‌شده است ( ۱۰، ۱ ). اگرچه *کاندیدا آلبیکنس* شایع‌ترین عامل اتیولوژیک عفونت فرصت‌طلب در افرادی با نقص دستگاه ایمنی است، گونه‌های غیر *آلبیکنس* ازجمله *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، *کاندیدا کروزه‌ای*، *کاندیدا گیلیرموندی* نیز کم‌وبیش از بیماران جدا می‌شوند (۲۰-۱۷). اهمیت گونه‌های غیر *آلبیکنس* در سال‌های اخیر به‌واسطه 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 تروپیکالیس* 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). ازآنجاکه 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 جداشده از بیماران ایرانی بررسی گردد. بررسی‌های کتابخانه‌ای نشان داده است که مطالعات بسیار نادری دربارهٔ بیان هم‌زمان این دو ژن در الگوی اپیدمیولوژیک کاندیدیازیس در دههٔ اخیر در جهان انجام‌شده است و انجام این تحقیقات به بیان چگونگی ایجاد مقاومت می‌پردازد که این مسئله به طراحی داروهای ضدقارچی کمک شایانی می کند.

## مواد و روش‌ها

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

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]

$N = pqz^2/ d^2$ N=100

که در این فرمول، با توجه به z=1.96، p=0.4، خطای مطلق d=0.1 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 گرفته‌شده است.

معیار ورود به مطالعه شامل بیمارانی با علائم گوارشی شامل اسهال، یبوست، التهاب دستگاه گوارش، سابقهٔ بیماری التهابی روده (IBD) و سندرم رودهٔ تحریک‌پذیر (IBS) و معیار خروج از مطالعه شامل افرادی بود که در یک ماه گذشته به‌صورت دوره‌ای داروهای گوارشی یا پروبیوتیک مصرف کرده بودند و یا به تشخیص متخصص گوارش، مبتلا به بیماری کولیت حاد بودند و یا در نمونهٔ 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 سواپ استریل انجام شد؛ سپس نمونهٔ سواپ در لولهٔ استریل محتوی سرم فیزیولوژی حاوی کلرامفنیکل تحت زنجیرهٔ سرد به آزمایشگاه برای انجام تست‌های بعدی ارسال گردید. نمونهٔ مدفوعی افراد سال‌خورده از آسایشگاه کهریزک جمع‌آوری شد. حداقل پنج گرم مدفوع در ظرف‌های مخصوص استریل جمع‌آوری گردید. نمونهٔ 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 رنگ‌آمیزی گرم انجام شد و همچنین با استفاده از پتاس ۱۰ درصد، مخمرهای زندهٔ 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 آلبیکنس* شناسایی گردید؛ همچنین سایر آزمایش‌های مولکولی، بیوشیمیایی و... صورت گرفت.

جداسازی و شناسایی گونه‌های کاندیدا: به‌منظور رشد جدایه‌های کاندیدا، محیط سابورو دکستروز آگار حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم 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 درجهٔ سانتی‌گراد 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 جدایهٔ استاندارد *کاندیدا آلبیکنس ATCC14053* به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. مخمرها در محیط کشت سابورو دکستروز آگار کشت گردید و در یخچال در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد 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 رنگ‌آمیزی گرم بررسی شد. در صورت مشاهدهٔ مخمرهای جوانه‌دار، نمونه‌ها مثبت تلقی می‌گردید و برای دریافت کلنی خالص، مجدداً در محیط کشت پایهٔ سابورو 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 تازهٔ مخمر به‌منظور بررسی تخمیر قند، بر روی محیط واجد قند و اندیکاتور فنل رد براث با اسیدیته ۶/۷ تا ۷ کشت داده شد؛ سپس محیط کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. در طول این مدت، در صورت تغییر رنگ محیط، آزمایش به‌صورت مثبت گزارش شد.

به‌منظور 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 درجهٔ سانتی‌گراد 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 آلبیکنس*: همهٔ مخمرهای

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]

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

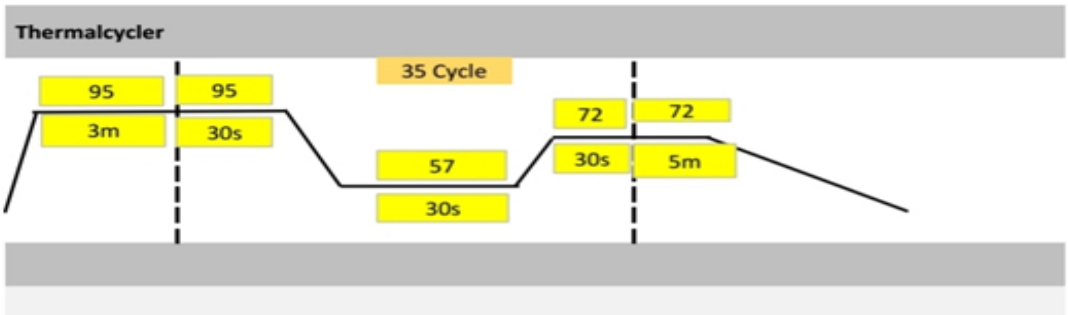
برای انجام آزمون لولهٔ زایا که یکی از ابتدایی‌ترین روش‌های تشخیص *کاندیدا آلبیکنس* است، توسط یک آنس استریل از نمونهٔ کشت تازه بیمار برداشته و به درون نیم میلی لیتر از سرم انسان انتقال داده شد و به‌خوبی مخلوط گردید. سوسپانسیون بالا در بن‌ماری ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، به مدت ۳-۲ ساعت نگهداری شد؛ سپس وجود داشتن یا نداشتن لولهٔ زایا در زیر میکروسکوپ بررسی گردید (۲۱).

کشت بر روی محیط افتراقی کروم آگار کاندیدا: با استفاده از لوپ استریل، مقدار کمی از جدایه‌های مخمری خالص‌سازی‌شده بر روی محیط کشت افتراقی کروم آگار کاندیدا کشت داده شد. محیط‌های کشت تلقیح‌شده درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری گردید و پس از گذشت ۴۸ ساعت، کلنی‌های ظاهرشده از نظر مورفولوژی کلنی و رنگ پیگمان تولیدشده 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 کاندیدا بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری گردید و سپس کشت‌ها تجدید شد و به مدت ۱۸ ساعت گرماگذاری گردید. پس از رسیدن به مرحلهٔ رشد لگاریتمی، برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن استفاده شد. برای تهیهٔ 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 226 bp برای ژن *CDR1* bp به‌دست آمد. در جدول شمارهٔ ۱ مشخصات پرایمرها نشان داده‌شده است؛ همچنین برنامهٔ تنظیمی زمان و حرارت برای انجام مراحل PCR در شکل شمارهٔ ۱ نشان آمده است (۱۰).

**جدول شماره ۱.** توالی¬های نوکلئوتیدی پرایمر برای شناسایی ژن‌های مقاومت آزولی در جدایه‌های *کاندیدا*

| Gene | Primer sequence | Size bp | Reference |
|---|---|---|---|
| CDR1_F<br>CDR1_R | 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3' (forward)<br>5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3' (reverse) | 19<br>20 | (Gao B. et al.,2015) |
| *MDR1*_F<br>*MDR1*_R | 5'-CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG-3' (forward)<br>5'-TGT TCA AAC TTC TGC TCC TGA-3' (reverse) | 20<br>21 | Gao B. et al.,2015) |




**شکل شماره ۱.** برنامهٔ تنظیم درجهٔ حرارت و زمان برای انجام مراحل PCR

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]

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، به‌طوری‌که جهت حرکت مولکول‌های DNA به سمت قطب مثبت باشد؛ سپس دستگاه روی ولتاژ ۷۵ ولت (۱۰ ولت در هر سانتی‌متر) تنظیم شد. هنگامی‌که رنگ برموفنل بلو به‌اندازهٔ کافی (حدود ۳/۴ طول ژل) پایین آمد، جریان الکتریکی قطع گردید و ژنوم استخراج‌شده یا محصولات PCR در مقابل نور UV مشاهده و عکس‌برداری شد.

بررسی تشکیل بیوفیلم: برای ارزیابی تشکیل بیوفیلم نمونه‌های دارای بیان دو ژن MDR1 و CDR1 از روش رنگ‌آمیزی کریستال ویوله استفاده گردید. به‌منظور بررسی تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های جداسازی‌شده، سوسپانسیونی به غلظت ۱۰۶× ۱ محیط مخمر با پایهٔ نیتروژن حاوی ۱۰۰ میکرولیتر گلوکز تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ تهیه‌شده به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شد، سپس پلیت یادشده در انکوباتور شیکردار ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد با دور 75 rpm به مدت ۹۰ دقیقه قرار گرفت تا سلول‌ها به کف چاهک متصل شوند؛ سپس ۲۰۰ میکرولیتر محیط مخمر با پایهٔ نیتروژن غنی‌شده با گلوکز به هر چاهک افزوده شد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکردار نگهداری گردید. پس از مدت مدنظر، بیوفیلم تشکیل‌شده با ۱۰۰ میکرولیتر PBS شست‌وشو داده شد؛ سپس بیوفیلم تشکیل‌شده با ۱۰۰ میکرولیتر بافر سالین شستشو داده شد و رقت‌های سریالی آمفوتریسین- ب به هر چاهک پلیت افزوده گردید و حجم هر چاهک با استفاده از محیط RPMI1640 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 ویولهٔ ۱ درصد به میزان ۱:۵۰ 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 طول‌موج ۵۴۵ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. درنهایت، عکس میکروسکوپ الکترونی از بیوفیلم جدایه‌ها تهیه گردید (۲۳).

تهیهٔ عکس SEM برای تأیید تشکیل بیوفیلم: برای تهیهٔ عکس SEM، بیوفیلم‌ها روی ظروف پلی استایرن کشت بافت با قطر ۳۵ میلی‌متر ساخته شدند و سپس به مدت ۱۶ ساعت در مخلوطی از ۲ درصد پارافورمالدئید و ۲ درصد گلوتارآلدئید 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 دیسیلازان آبگیری شدند. درنهایت، به مدت ۲۴ ساعت در معرض هوا خشک گردیدند (۴۷) و پس از پردازش، با میکروسکوپ الکترونی روبشی عکس‌برداری شدند (۲۳).

آنتی‌بیوگرام: آنتی‌بیوگرام با استفاده از روش Kirby-Bauer به‌منظور به‌دست آوردن حداقل غلظت بازدارندگی داروی آمفوتریسین- ب بر اساس جدول موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی برای جدایه‌های کاندیدا استفاده گردید. ابتدا سوسپانسیون استاندارد مخمر با استفاده از نیم مک‌فارلند تهیه شد ( Absorbance 0.08 to 0.1 در طول‌موج 625 nm معادلهٔ 5/1 108 CFU/ml)؛ سپس روی محیط مخمر بر پایهٔ نیتروژن به روش پورپلیت دیسک فلوکونازول، کتوکونازول و آمفوتریسین- ب دیسک گذاری انجام گردید و پلیت‌ها به انکوباتور ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت منتقل شد و پس از آن، قطر هالهٔ اطراف دیسک اندازه گرفته شد و نتایج به‌صورت کیفی بیان گردید و با جدول CLSI مقایسه شد. آزمایش‌ها به‌صورت سه‌گانه تکرار گردید (۷).

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

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]

به‌دست‌آمده برای آن جدایه، RNA ژنومی استخراج شد و پس از تأیید کمی و کیفی RNA استخراج‌شده و ساخت cDNA با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت سیناژن (PR891620)، بیان ژن برای هر ژن هدف نسبت به ژن مرجع SrRNA۱۸ با تکنیک ریل‌تایم پی‌سی‌آر بررسی گردید. داده‌های ریل‌تایم پی‌سی‌آر به کمک نرم‌افزار موجود در دستگاه ABI و بر اساس فرمول زیر ΔΔCT –محاسبه شد (۲۴):

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

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

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

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

تجزیه‌وتحلیل آماری: داده‌های به‌دست‌آمده از این مطالعه با نرم‌افزار SPSS vol.28 تجزیه‌وتحلیل شد و ارتباطات آماری با $P<0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌های پژوهش

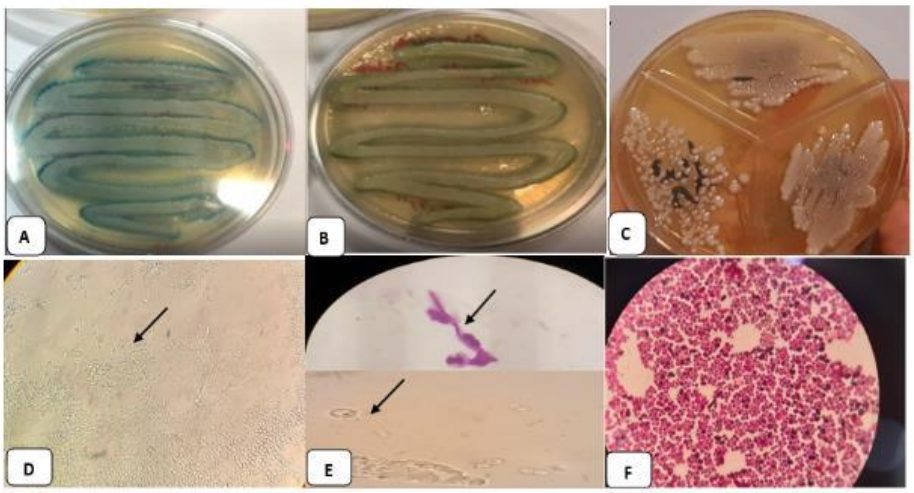
نتایج نمونه‌برداری: داده‌های مربوط به نتایج کشت و نمونه‌گیری در جدول شمارهٔ ۲ دسته‌بندی‌شده است. از ۱۰۰ نمونهٔ دریافت‌شده، ۶۰ نمونه گونه‌های کاندیدا داشتند. ۳۵ جدایهٔ *کاندیدا آلبیکنس* از نمونه‌ها جداسازی شد که بیش از ۵۰ درصد جدایه‌های جداسازی‌شده را به خود اختصاص داد.

**جدول شماره ۲.** گونه‌های جداسازیشدهٔ کاندیدا از نمونه‌های بیماران

| نوع کاندیدا | تعداد نمونه |
|---|---|
| *کاندیدا آلبیکنس* | ۳۵ |
| *کاندیدا گلابراتا* | ۵ |
| *کاندیدا تروپیکالیس* | ۷ |
| *کاندیدا گیلرموندیی* | ۳ |
| *کاندیدا کروزه‌ای* | ۴ |
| *کاندیدا پاراپسیلوزیس* | ۶ |
| مجموع نمونه‌ها | ۶۰ |

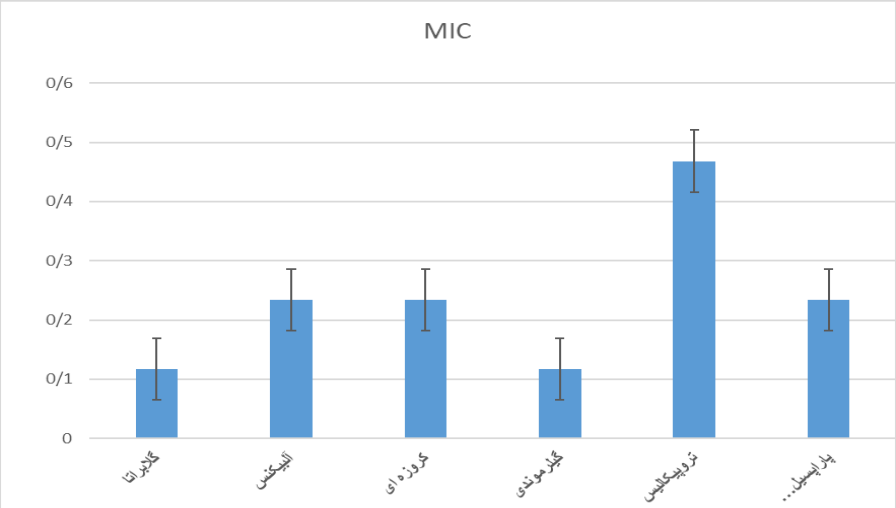
نتایج آزمایش‌هایی میکروسکوپی، ماکروسکوپی، بیوشیمیایی و محیط‌های کشت: بر اساس آزمایش‌های انجام‌شده، انواع گونه‌های کاندیدا شناسایی گردیدند. نتایج شناسایی جدایه‌ها در جدول شمارهٔ ۲ نشان داده‌شده است. همان‌طور که در شکل شمارهٔ ۲ نشان آمده است، گونه‌های مختلف کاندیدا ازجمله گونهٔ *کاندیدا آلبیکنس* به رنگ سبز، *کاندیدا تروپیکالیس* به رنگ آبی و *کاندیدا کروزه‌ای* به رنگ صورتی، *کاندیدا گلابراتا* به رنگ قرمز و گونه‌های دیگر به رنگ سفید بر روی محیط کروم آگار کاندیدا تفریق داده شدند؛ همچنین گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* توانایی تولید لولهٔ زایا را داشتند که در نمونهٔ میکروسکوپی رنگ‌آمیزی‌شده کاملاً مشخص است. گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* توانایی تولید کلامیدوسپور را روی محیط کشت کورن میل آگار داشتند و دیگر نتایج بررسی جدایه‌ها در شکل شمارهٔ ۲ قابل‌مشاهده است.

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]




**شکل شماره ۲.** مشاهدهٔ نتایج آزمایش‌های مورفولوژی، میکروسکوپی و محیط‌های کشت اختصاصی برای تشخیص جدایه‌های کاندیدا. A. کلنی آبی‌رنگ *کاندیدا تروپیکالیس* بر روی محیط کشت کروم آگار کاندیدا؛ B. کلنی سبزرنگ *کاندیدا آلبیکنس* بر روی محیط کشت کروم آگار کاندیدا؛ C. کلنی جدایه‌های جداشده بر روی محیط کشت پایه؛ D. مشاهدهٔ کلامیدوسپور بر روی محیط کشت کورن میل آگار؛ E. تولید جرم تیوب توسط گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* رنگ‌شده و رنگ‌نشده؛ F. تصویر میکروسکوپی جدایه‌های مخمری جداشده

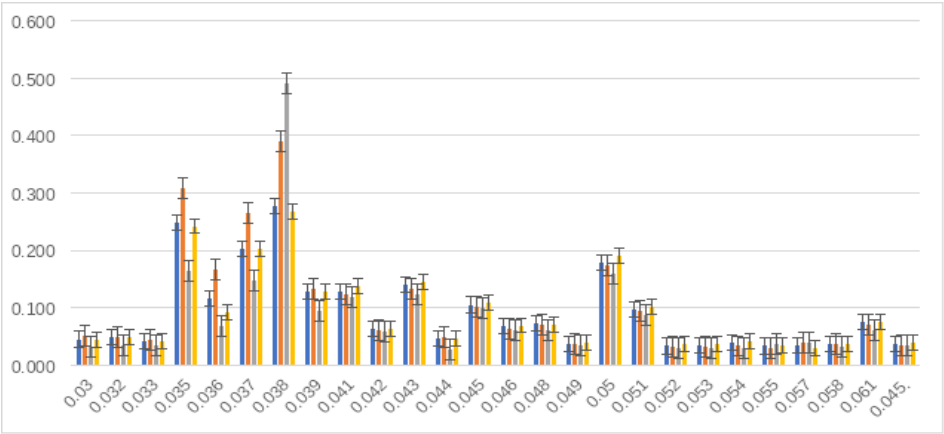
نتایج آنتی‌بیوگرام: بررسی میزان حداقل غلظت متوقف‌کنندهٔ رشد آمفوتریسین- ب به روش تهیهٔ رقت‌های سریال صورت گرفت و داده‌ها در شکل شمارهٔ ۳ نشان داده‌شده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان حداقل غلظت متوقف‌کنندهٔ رشد برای *کاندیدا آلبیکنس* در محدودهٔ ۰/۲۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر تا ۱/۸۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است.




**شکل شماره ۳.** حداقل غلظت متوقفکنندهٔ رشد در جدایه‌ها در مقایسه با آمفوتریسین- ب

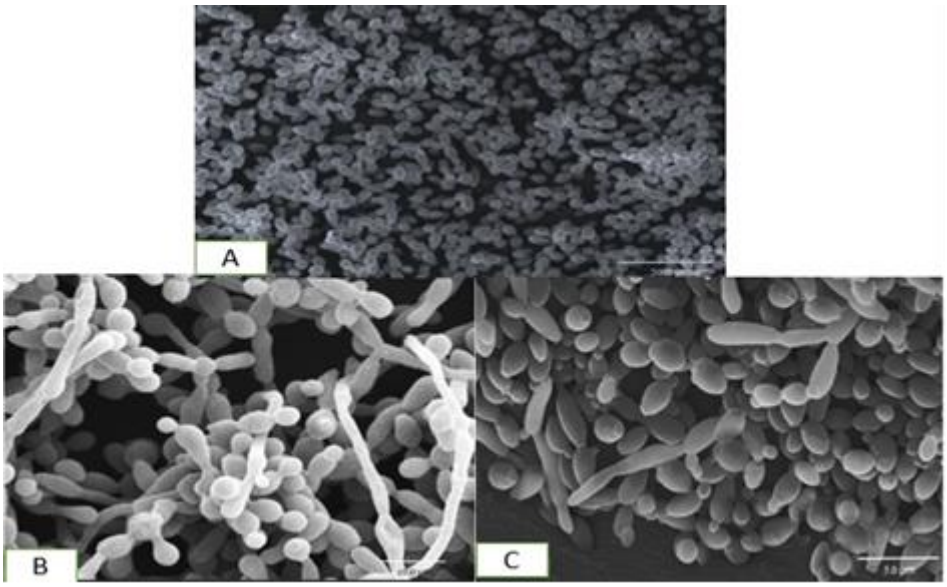
نتایج آزمایش کریستال ویوله در تشکیل بیوفیلم: پس از انجام آزمایش، تغییر رنگ در طول‌موج ۵۴۵ نانومتر (میلی گرم در میلی‌لیتر) در جدایه‌های شاهد و در جدایه‌های تحت تأثیر آمفوتریسین- ب تحت غلظت‌های ۰/۰۲ تا ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر خوانده شد. نتایج میزان جذب در تشکیل بیوفیلم در شکل شمارهٔ ۴ آمده است.

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]




**شکل شماره ٤.** میانگین معیار جذب در طول‌موج ۵۴۵ نانومتر (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) حاصل از تأثیر آمفوتریسین- ب بر روی تشکیل بیوفیلم جدایه‌ها. ستون آبی: شاهد؛ ستون قرمز: آمفوتریسین- ب؛ ستون طوسی: غلظت ۰/۰۲ گرم؛ ستون زرد: غلظت ۱۵ میلی‌گرم

نتایج تأیید تشکیل بیوفیلم با عکس میکروسکوپ الکترونی: با توجه به اینکه بیشترین گونه‌هایی که از نمونه‌های بالینی و طبیعی جدا شد، شامل *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا تروپیکالیس* بودند، برای تأیید تشکیل بیوفیلم، از دو جدایهٔ *کاندیدا آلبیکنس* 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 لولهٔ زایا و هایف کاذب دیده نمی‌شوند که این دو در اتصال کاندیدا به‌هم 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 لولهٔ زایا و هایف کاذب در *کاندیدا آلبیکنس* کاملاً مشهود است و افزایش جذب نوری بیشتر رنگ کریستال ویوله در چاهک‌هایی را که بیوفیلم تشکیل‌شده است، تأیید می‌کند. نتایج در شکل شمارهٔ ۵ نمایش داده‌شده است.

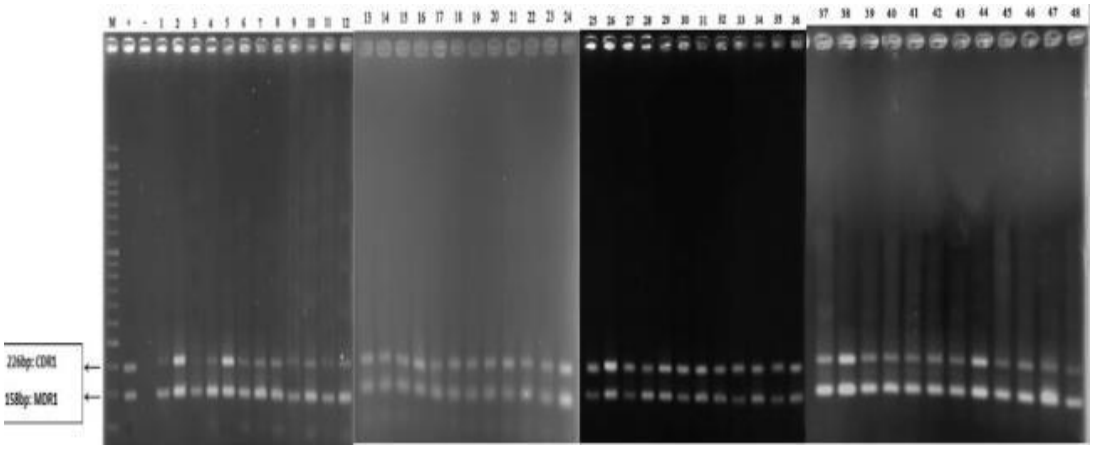



**شکل شماره ۵.** مشاهدهٔ تصویر میکروسکوپ الکترونی. .A نمونهٔ شاهد *کاندیدا آلبیکنس* پیش از تشکیل بیوفیلم؛ B. تشکیل بیوفیلم توسط *کاندیدا آلبیکنس*؛ C. تشکیل بیوفیلم توسط *کاندیدا تروپیکالیس*

نتایج PCR برای بررسی وجود دو ژن *CDR1* و *MDR1* در ۴۸ جدایه: بررسی‌ها نشان داد که DNA استخراجی نسبتاً خالص است و نیازی به پروتئیناز در جریان استخراج DNA نیست. نتایج نشان داد که ۴۸ جدایه از

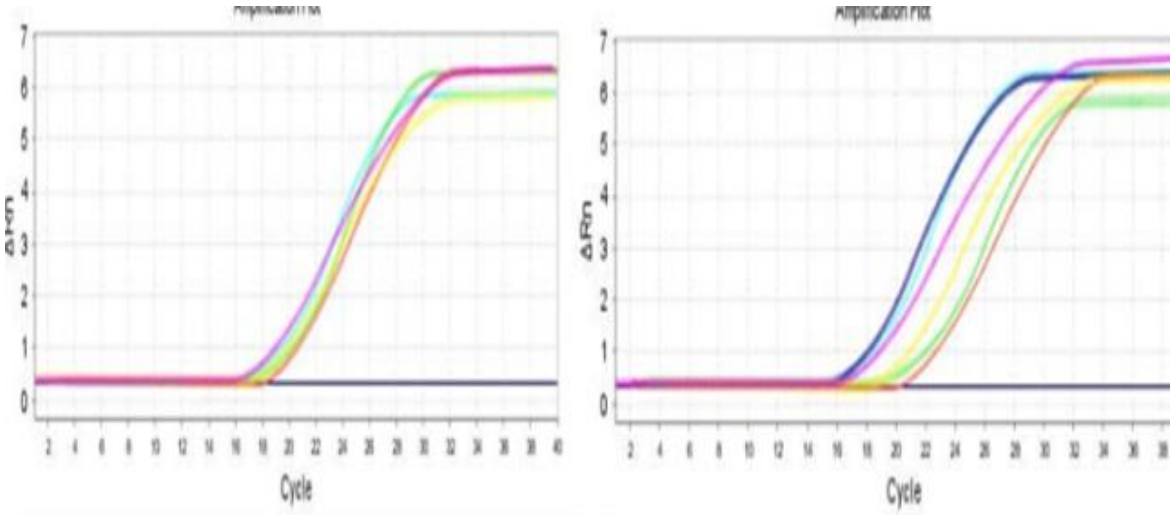
[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]

گونه‌های کاندیدای جداسازی‌شده از نمونه‌ها ژن‌های مقاومت آزولی *MDR1* و *CDR1* داشتند. نتایج در شکل شمارهٔ ۶ نشان داده‌شده است.



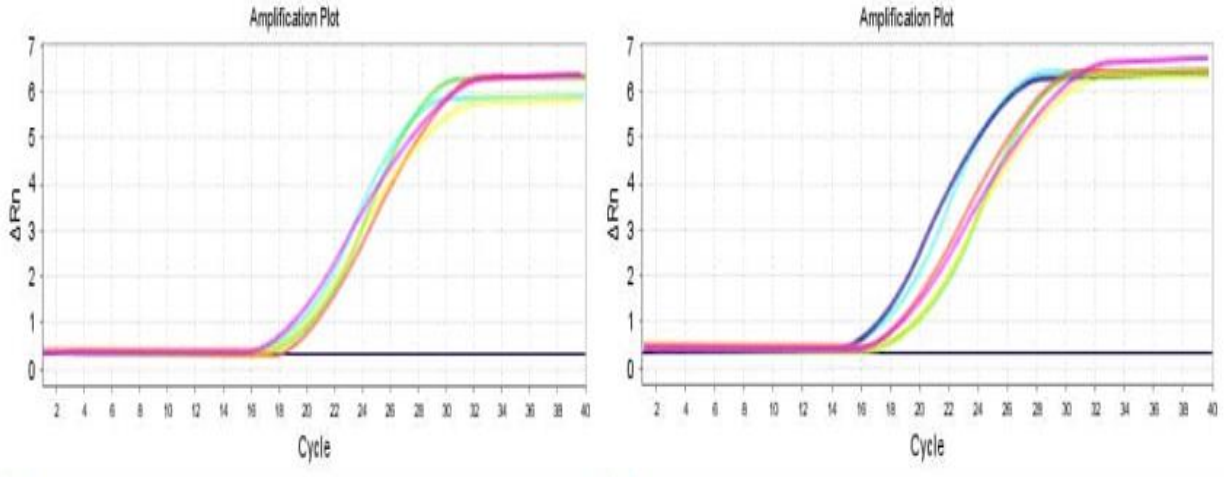

**شکل شماره ٦.** نتایج الکتروفورز محصولات PCR. ستون M لدر ۱۰۰ جفت بازی، ستون +: کنترل مثبت، تون -: بلانک، نمونه‌ها از ستون ۱ تا ۴۸.

نتایج بررسی تکثیر ژن‌های مقاومت *CDR1* و *MDR1*: نمودارهای تکثیر ژن‌های مقاومت *CDR1* و *MDR1* در دو جدایهٔ *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا تروپیکالیس* در شکل‌های شمارهٔ ۷ و ۸ آمده است. ژن SrRNA۱۸ به‌عنوان ژن خانه‌دار در نظر گرفته‌شده است.




**شکل شماره ۷.** نمودار تکثیر ژن *CDR1* و *MDR1* در جدایهٔ *کاندیدا آلبیکنس*

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]




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

نتایج میزان بیان ژن‌های مقاومت *CDR1* و *MDR1* در *کاندیدا آلبیکنس*: برای تعیین میزان تغییرات در بیان ژن‌های دخیل در تولید بیوفیلم در ساعت ۱۱ و ۳۰ تشکیل بیوفیلم، به‌صورت کمی از تکنیک ریل‌تایم پی‌سی‌آر استفاده شد و سپس نتایج به کمک نرم‌افزار موجود در دستگاه ABI به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ تجزیه‌وتحلیل گردید و عدد نهایی حاصل از تکرارهای مختلف به کمک نرم‌افزار Microsoft Office Excel تجزیه‌وتحلیل آماری شد. در جدول شمارهٔ ۳، میزان P-value برای ژن *CDR1* در بیوفیلم ۳۰ ساعته به‌ترتیب برابر با $P<0.05$ بوده است که بیان‌کنندهٔ معنادار بودن اختلاف بیان این ژن در میان دو گروه تیمارشده و تیمارنشده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان بیان ژن هدف در گروه تیمارشده با آمفوتریسین- ب، با ضریب اطمینان ۹۵ درصد، بیش از ۲ برابر کاهش داشته است و تغییرات Fold Chang پس از سی ساعت، ۱/۴۶- محاسبه گردید که نشان‌کنندهٔ 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 شمارهٔ ۳ و ۴ در سی ساعت آمده است.

**جدول شماره ۳.** مقایسهٔ بیان ژن *CDR1* در بیوفیلم سی‌ساعته در گروه‌های تیمارشده و تیمارنشدهٔ *کاندیدا آلبیکنس* با داروی آمفوتریسین- ب

| بیوفیلم سی‌ساعته<br>مؤلفه‌ها | تفاوت میزان بیان | بیان ژن CDR1 | |
|---|---|---|---|
| | | تیمارشده | تیمارنشده |
| ΔCT نمونهٔ ۱ | -۰/۵۰۵ | ۲/۶۹ | ۲/۱۸۵ |
| ΔCT نمونهٔ ۲ | -۰/۶۰۵ | ۲/۸۴۵ | ۲/۲۴ |
| تعداد | ۲ | ۲ | ۲ |
| میانگین | -۰/۵۵۵ | ۲/۷۶۷۵ | ۲/۲۱۲۵ |
| انحراف معیار | ۰/۰۷۰۷۱ | ۰/۱۰۹۶ | ۰/۰۳۸۸۹ |
| P-Value | ۰/۰۴۲ | | |
| ضریب اطمینان | ۹۵ درصد | | |
| تغییرات Fold Change | -۱/۴۶ | | |

در جدول شمارهٔ ۴، میزان P-value برای ژن *MDR1* در بیوفیلم سی‌ساعته برابر با $P=0.002$ بوده است که بیان‌کنندهٔ

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]

معنادار بودن اختلاف بیان این ژن در میان دو گروه تیمارشده و تیمارنشده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان بیان ژن هدف در گروه تیمارشده، با ضریب اطمینان ۹۵ درصد، بیش از ۲/۲ برابر کاهش داشته است.

**جدول شماره ٤.** مقایسهٔ بیان ژن *MDR1* بیوفیلم سی‌ساعته در گروه‌های تیمارشده و تیمارنشدهٔ *کاندیدا آلبیکنس* با داروی آمفوتریسین- ب

| بیوفیلم سی‌ساعته<br>مؤلفه‌ها | تفاوت میزان بیان | *MDR1*<br>تیمارشده | *MDR1*<br>تیمارنشده |
|---|---|---|---|
| ΔCT نمونهٔ ۱ | -۰/۲۸ | ۲/۱۸ | ۱/۹ |
| ΔCT نمونهٔ ۲ | -۰/۳۲۵ | ۲/۰۹۵ | ۱/۷۷ |
| تعداد | ۳ | ۳ | ۳ |
| میانگین | -۰/۳۱۱ | ۲/۰۲۶ | ۱/۷۱۵ |
| انحراف معیار | ۰/۰۲۷ | ۰/۱۹۶ | ۰/۲۱۷ |
| P-Value | ۰/۰۰۲۵ | | |
| ضریب اطمینان | ۹۵ درصد | | |
| تغییرات Fold Change | -۰/۴۰۳ | | |
| ΔCT نمونهٔ ۱ | -۲/۲۴۱ | | |

نتایج میزان بیان ژن‌های مقاومت *CDR1* و *MDR1* در *کاندیدا تروپیکالیس*: بیان ژن *CDR1* در بیوفیلم یازده‌ساعته برابر با P=0.04 بود که بیان‌کنندهٔ معنادار بودن اختلاف بیان این ژن در میان دو گروه تیمارشده و تیمارنشده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان بیان ژن هدف در گروه تیمارشده، با ضریب اطمینان ۹۵ درصد، بیش از ۱ برابر کاهش داشته است.

در جدول شمارهٔ ۵، میزان P-value برای ژن *CDR1* در بیوفیلم سی‌ساعته برابر با P<0.01 بوده است که بیان‌کنندهٔ معنادار بودن اختلاف بیان این ژن میان بین دو گروه تیمارشده و تیمارنشده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان بیان ژن هدف در گروه تیمارشده، با ضریب اطمینان ۹۵ درصد، بیش از ۱/۷۵ برابر کاهش داشته است.

**جدول شماره ۵.** مقایسهٔ بیان ژن *CDR1* در بیوفیلم سی‌ساعته در گروه‌های تیمارشده و تیمارنشدهٔ *کاندیدا تروپیکالیس* با داروی آمفوتریسین- ب

| بیوفیلم سی‌ساعته مؤلفه‌ها | تفاوت بیان | بیان ژن CDR1 | |
|---|---|---|---|
| | | تیمارشده | تیمارنشده |
| ΔCT نمونهٔ ۱ | -۰/۱۹۵ | ۲/۰۵ | ۱/۸۵۵ |
| ΔCT نمونهٔ ۲ | ۰۱/۲۴۵ | ۲/۸ | ۲/۵۵۵ |
| تعداد | -۰/۲۳ | ۲/۳۶ | ۲/۱۲۶ |
| میانگین | ۰/۰۰۹۱ | ۰/۳۹ | ۰/۳۷ |
| انحراف معیار | ۰/۰۱۲۱ | | |
| P-Value | ۹۵ درصد | | |
| ضریب اطمینان | -۱/۷۵۸ | | |

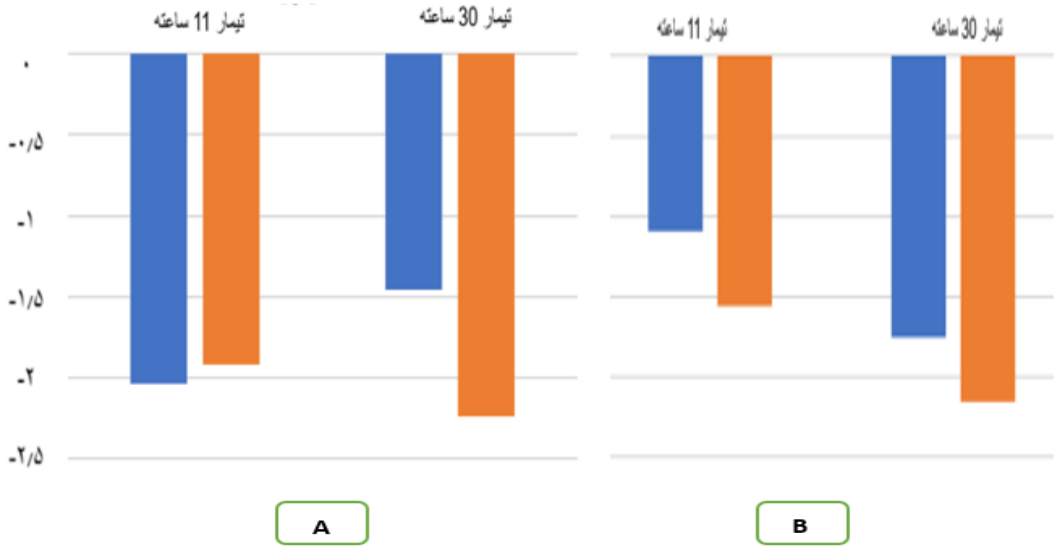
[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]

**جدول شماره ٦.** مقایسهٔ بیان ژن *MDR1* بیوفیلم سی‌ساعته در گروه‌های تیمارشده و تیمارنشده *کاندیدا تروپیکالیس* با داروی آمفوتریسین- ب

| بیوفیلم سی‌ساعته مؤلفه‌ها | تفاوت بیان | *MDR1* تیمارشده | *MDR1* تیمارنشده |
|---|---|---|---|
| ΔCTنمونهٔ ۱ | -۰/۵۴ | ۲/۳۶ | ۱/۸۲ |
| ΔCTنمونهٔ ۲ | -۰/۴۰۰ | ۲/۲۱۰ | ۱/۸۱ |
| تعداد | -۰/۳۱۱ | ۲/۰۲۶ | ۱/۷۱۵ |
| میانگین | ۰/۰۲۷ | ۰/۱۹۶ | ۰/۲۱۷ |
| انحراف معیار | ۰/۰۱ | | |
| P-Value | ۹۵ درصد | | |
| ضریب اطمینان | -۲/۱۵۴ | | |

در جدول شمارهٔ ۶، میزان P-value برای ژن *MDR1* در بیوفیلم ۳۰ ساعته برابر با P=0.01 بود که بیان‌کنندهٔ معنادار بودن اختلاف بیان این ژن در میان دو گروه تیمارشده و تیمارنشده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان بیان ژن هدف در گروه تیمارشده، با ضریب اطمینان ۹۵ درصد، بیش از ۲/۱ برابر کاهش داشته است.

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




**شکل شماره ۹.** مقادیر تغییر در بیان ژن‌های هدف طی ۱۱ و ۳۰ ساعت تیمار *کاندیدا آلبیکنس* و B. مقادیر تغییر بیان ژن‌های هدف در مقایسه با ژن مرجع در جدایه‌های *کاندیدا تروپیکالیس* در تیمار با آمفوتریسین- ب. رنگ نارنجی ژن *MDR1* و رنگ آبی ژن *CDR1* را نشان می‌دهد.

## بحث و نتیجه‌گیری

افزایش مقاومت به آمفوتریسین- ب در درمان کاندیدیازیس منتشر، سبب ایجاد عوارض در بیماران، اتلاف وقت و صرف هزینه‌های فراوان برای درمان بیماران می‌شود (۲۷). تشکیل بیوفیلم توسط برخی از گونه‌های کاندیدا بر روی کاتاتر، آنژیو و غیره به ورود کاندیدا به خون و کاندیدمی منجر می‌شود و مرگ را در بیماران بستری به‌همراه دارد (۷). نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد که آمفوتریسین- ب به میزان معنی‌داری با اثرگذاری بر روی میزان بیان ژن‌های *CDR1* و *MDR1*، بیان این ژن‌های مقاومت دارویی را در جدایه‌های *کاندیدا تروپیکالیس* و *کاندیدا آلبیکنس* کاهش داده است و از این طریق، موجب تخریب زیست‌ساختار بیوفیلم می‌گردد و می‌توان گفت، دارو به‌نوعی هم‌زمان سبب

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]

عدم اتصال و مرگ قارچ می‌شود.

در پژوهش فرح‌بخش و همکاران (۱۳۹۰)، در جدایه‌های *کاندیدا آلبیکنس* 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 آلبیکنس* 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 *CDR1* بودند. علاوه بر این، همهٔ جدایه‌ها ژن *MDR1* داشتند. از سوی دیگر، در تحقیق ناظری و همکاران در سال ۱۳۸۸، با مطالعهٔ مقطعی بر روی ۲۳۲ بیمار، ۱۰۵ بیمار با *والووژینیت کاندیدایی* شناسایی شدند که از میان آنان، ۱۳ نفر (۱۲/۳ درصد) به ولوواژینیت کاندیدایی عودکننده مبتلا بودند. *کاندیدا آلبیکنس* 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 آلبیکنس* 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 به‌طورمعمول شامل گونه‌های متنوعی از کاندیدا است. کاظمی و همکاران به بررسی حساسیت دارویی ایزوله‌های کلینیکی کاندیدا آلبیکنس 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 کاندیدیازیس 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 *MDR1* و *CDR1* در بیوفیلم تشکیل‌شده 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 آلبیکنس* 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 *MDR1* و CDRدر 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 پاتوژنز نقش داشتند.

هاکیو و همکاران در تحقیقی بررسی کردند که مقاومت دارویی کاندیدا نسبت به داروهای آزول، مربوط به بیان ژن *CDR1* است. در این مطالعه، بیماران دیابتی هندی بررسی شدند و وجود این ژن و جهش‌زایی و تغییرات آللی بررسی و اثبات گردید که موتاسیون‌های طبیعی به‌دست‌آمده بیشتر در مناطق غیرحفاظت‌شدهٔ پروتئین وجود دارد که به مقاومت دارویی *کاندیدا آلبیکنس* در برابر فلوکونازول منجر می‌شود (۳۰). نتایج این مطالعه در تأیید مطالعهٔ حاضر نشان می دهد 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

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]

داروهای ضدقارچی در جدایه‌های کاندیدای جداشده از نمونه‌های بالینی با روش PCR شناسایی شدند. تعداد ۶۰ جدایهٔ کاندیدا از نظر ژنوتایپ بررسی گردیدند که از این تعداد، ۸۰ درصد جدایه‌ها به‌طور هم‌زمان واجد هر دو ژن *CDR1* و *MDR1* 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 کاندیدا 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 درمجموع، به کاهش مقاومت برخی از گونه‌های کاندیدا در برابر آمفوتریسین- ب می‌انجامد. مطالعهٔ حاضر می تواند به‌عنوان گامی برای مقابله با مقاومت‌های کاندیدایی 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. همهٔ نویسندگان این مقاله متن مقاله را مطالعه و با انتشار همهٔ داده‌ها موافقت کرده‌اند.

## کد اخلاق

IR.IAU.TNB.REC.1400.089


## حمایت مالی

نویسندگان هیچ گونه حمایت مالی دریافت نکرده اند.


## مشارکت نویسندگان

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

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]

## References


1. 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.
2. 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.
3. Larypoor M, Frsad S. Evaluation of nosocomial infections in one of hospitals of Qom, 2008. Iran J Med Microbiol 2011;5:7-17.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Nailis H, Kucharíková 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.
9. Aaa- Gao B, Yang FM, Yu ZT, Li R, Xie F, Chen J, et al. Relationship between the expression of *MDR1* in hepatocellular cancer and its biological behaviors. Int J Clin Exp Pathol 2015;8:6995.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Pereira R, dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Morais SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. J Appl Microbiol 2021;131:11-22. doi: 10.1111/jam.14949.
17. 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.
18. 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.
19. Li SX, Wu HT, Liu YT, Jiang YY, Zhang YS, Liu WD, et al. The F1FO-ATP synthase β 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.
20. 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.
21. Shams K, Larypoor M, Salimian J. The immunomodulatory effects of *Candida albicans* isolated from the normal gastrointestinal microbiome of the elderly on


[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]

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.

[ Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-07-14 ]