

## Identification of Biofilm Formation Genes in *Candida albicans* and Evaluation of Iron Nanoparticles on the Expression of *als* gene by Real Time-PCR

Hosseinzadeh L<sup>1</sup>, Amini K<sup>2</sup>

### Abstract

**Purpose:** Approximately three-fourths of women experience an episode of vaginal candidiasis. One of the virulence factors, is the ability of attachment of *C. albicans* to the host tissue through factors such as sticky molecules and proteins that accelerate this connection. The aim of this study was to investigate the frequency of biofilm formation genes in *C. albicans* strains isolated from vaginosis and to compare the expression of *als* gene in strains treated with iron nanoparticles in the in vitro using real time -PCR.

**Methods:** In this descriptive cross-sectional study conducted in Shariati Hospital during a 6-months period, 100 isolates *Candida* from vaginal specimens were evaluated. After identification of *C. albicans* strains using standard biochemical and microbiological tests, genomic DNA extraction was performed using the CinnaGen Company Kit. Multiplex-PCR assays were performed to detect *als*, *hwp1* and *hyr* genes. Also, to investigate the effect of iron nanoparticle on expression of *als* gene, RNA, all isolates containing this gene were extracted using Cinnapure kit. After cDNA synthesis, real time PCR test was performed.

**Results:** Molecular analysis results showed that from the total of 60 isolates of *C. albicans*, 34 isolates (56.66%) had the *hwp* gene, 46 isolates (76.66%) had *Als* gene and 33 isolates (55%) had *Hyr* gene. The results of the *asl* melting curve in clinical strains of *C. albicans* and treated with iron nanoparticles showed that the main peak for this gene occurs at 85.34 ° C.

**Conclusions:** *Als* expression in the treated isolates was lower than untreated, which indicates the positive role of the treatment in reducing *Als* gene expression in these isolates.

**Keywords:** Biofilms, *Candida albicans*, Vaginosis, Iron nanoparticles, Real Time-PCR

Received: 2018.03.13 Accepted: 2019.04.18

شناسایی ژن های مولد بیوفیلم در سویه های کاندیدا آلبیکنس و ارزیابی نانوذره آهن بر بیان ژن *als* به روش

### Real Time-PCR

لیدا حسین زاده<sup>۱</sup>، کیومرث امینی<sup>۲</sup>

**هدف:** تقریباً سه چهارم زنان در معرض واژینیت کاندیدیایی هستند. از جمله عوامل بیماری‌زا می توان به قدرت اتصال کاندیدا به بافت میزبان از طریق عواملی مانند مولکول های چسبنده و پروتئین هایی که این اتصال را تسریع می کنند اشاره نمود. هدف از انجام مطالعه حاضر؛ بررسی فراوانی ژن های مولد بیوفیلم در سویه های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از واژینوز (Vaginosis) و بررسی مقایسه ای بیان ژن *als* در سویه های تحت تیمار (Treatment) با نانوذره آهن در شرایط آزمایشگاهی به روش Real Time-PCR می باشد.

**روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی- مقطعی، تعداد ۱۰۰ نمونه کاندیدا که از نمونه های واژینوز زنان به دست آمده بود مورد بررسی قرار گرفت. پس از شناسایی سویه های کاندیدا آلبیکنس با استفاده از تست های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی استاندارد، استخراج DNA ژنوم با استفاده از کیت شرکت سیناژن انجام گردید. به منظور ردیابی ژن های *Als*، *Hwp1* و *Hyr* آزمون Multiplex-PCR انجام گردید. همچنین به منظور بررسی اثر نانوذره آهن بر بیان ژن *ALS*، RNA سویه های حاوی این ژن با استفاده از کیت Cinnapure استخراج گردید و پس از تبدیل به cDNA، آزمون Real-Time PCR انجام شد.

**یافته ها:** نتایج آنالیز مولکولی نشان داد که از ۶۰ ایزوله کاندیدا آلبیکنس ۳۴ ایزوله (۵۶/۶۶٪) واجد ژن *hwp*، ۴۶ ایزوله (۷۶/۶۶٪) واجد ژن *Als* و ۳۳ ایزوله (۵۵٪) واجد ژن *Hyr* بودند. نتایج مربوط به منحنی ذوب ژن *Als* در سویه های بالینی کاندیدا آلبیکنس و تیمار شده با نانو ذره آهن نشان داد که **Peak** اصلی برای این ژن در دمای ۸۵/۳۴ درجه سلسیوس رخ می دهد.

**نتیجه گیری:** بیان ژن *Als* در ایزوله های تحت مطالعه تیمار شده نسبت به ایزوله های تیمار نشده پایین تر بدست آمد که نشان دهنده نقش مثبت تیمار نانوذره آهن در کاهش بیان ژن *Als* در ایزوله ها می باشد.

**کلمات کلیدی:** بیوفیلم، کاندیدا آلبیکنس، واژینوز، نانوذره آهن، Real Time-PCR

**نویسنده مسئول:** کیومرث امینی، [dr\\_kumarss\\_amin@yahoo.com](mailto:dr_kumarss_amin@yahoo.com)، ORCID: 0000-0002-6419-3417

آدرس: ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

۲- دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

#### مقدمه

کننده گلیکوپروتئین سطحی سلول می باشند. تحقیقات نشان داده است که محصول بیان اعضای این خانواده ژنی، قدرت اتصال به سوبستراهای مختلف از جمله سلول های مخاطی میزبان را دارند. محققان دریافته اند که میزان بیان ژن های این خانواده در هنگام رشد بیوفیلم به طور چشم گیری افزایش می یابد و نقش مهم این ژن ها در تشکیل بیوفیلم به اثبات رسیده است (۵). ژن *als1* یکی از اعضای این خانواده ژنی می باشد که از جمله ژن های مؤثر در تشکیل بیوفیلم در کاندیدا آلبیکنس است. بررسی ها نشان داده است که در کاندیدا آلبیکنس سویه SC5314، ژن *als1* در کنار ژن های *als9*، *als5*، *als2* و *als4* روی کروموزوم ۶ واقع شده است. یکی دیگر از ژن های مهم در اتصال این مخمر ژن *Hyphal Wall Protein 1* یا همان *hwp1* می باشد. *Hwp1* یک گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول متصل به مانوپروتئین است که همانند پروتئین رمز شده توسط ژن های خانواده *asl* نقش مؤثری در اتصال دارد. این ژن روی کروموزوم شماره ۴ کاندیدا آلبیکنس سویه SC5314 وجود دارد. ژن تنظیم کننده هیفی (*Hyr1*)<sup>۳</sup> که در قارچ های دی مورفیک و پلی مورفیک، مسئول تبدیل فاز مخمری به هیفی می باشد و با فعال شدن این ژن باعث طولی شدن فاز مخمری کاندیدا آلبیکنس به فرم میسلیال (هیفی) می شود (۴، ۶). به علت موارد مکرر عود بیماری و عوارض جانبی آزرل ها، درصد زیادی از زنان تمایل به استفاده از درمان-

کاندیدا یکی از اعضاء فلور نرمال پوست، دهان، واژن و دستگاه گوارش می باشد. یکی از مهم ترین فاکتورهای بیماری زایی این مخمر تشکیل بیوفیلم می باشد (۱). ولوواژینیت کاندیدیایی یکی از شایع ترین عفونت های زنان به شمار می رود و یک بیماری آزار دهنده با ترشحات غیرطبیعی، احساس ناراحتی در ناحیه ولو، واژن یا هر دو می باشد (۱). تقریباً ۷۵٪ از خانم ها حداقل یک بار در طول عمر خود واژینیت کاندیدیایی را تجربه می کنند. این بیماری با ترشحات غیرطبیعی واژن (به صورت دلمه سفت و یا آبکی)، غشاء کاذب سفید خاکستری در سطح مخاط واژن، خارش و سوزش همراه است (۲). حاملگی، مصرف داروهای خوراکی ضد بارداری، استروژن درمانی با دوز بالا، آلرژی، چاقی، استرس، دوش واژینال مکرر، نحوه مراقبت های بهداشتی، استفاده از مواد شوینده و مواد پاک کننده، از عوامل مستعد کننده بیماری به شمار می آیند (۳). بیوفیلم به فرم اجتماعات میکروبی شامل؛ یک مجموعه و یا ترکیبی از گونه های باکتری و قارچی گفته می شود که با اتصال به یک سطح، تشکیل ساختار می دهند. این گونه ارگانسیم ها، در یک بستر پلی ساکارییدی محصور شده و روی سطوح زنده مانند بافت های مخاطی و همچنین سطوح غیرزنده از قبیل وسایل پزشکی تشکیل می شوند (۴). ژن های متعددی در تشکیل بیوفیلم در مخمر کاندیدا آلبیکنس نقش دارند. اعضای خانواده ژنی (*Als*)<sup>۳</sup> کد

<sup>3</sup> Agglutinin Like Sequence

<sup>4</sup> Hyphally Regulated

<sup>1</sup> Candida Vulvovaginitis

<sup>2</sup> Candida Albicans

کرم داخلی و دوش واژینال در سه روز قبل از مراجعه، عدم خونریزی واضح واژینال و فقدان بارداری پرخطر بودند (۷، ۱).

### جداسازی نمونه‌های مخمری

در این مطالعه ابتدا سواب<sup>۱</sup> بلافاصله به درون لوله محتوی ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل منتقل و به آزمایشگاه ارسال گردید. تمامی نمونه‌ها جهت جداسازی مخمرها بر روی محیط سابورو دکستروز آگار (مرک، آلمان) حاوی کلرامفنیکل کشت داده شده و پلیت‌ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. پس از تهیه لام از کلنی‌های حاصل و رنگ‌آمیزی گرم، کلنی‌ها از لحاظ حالت مخمری بودن مورد بررسی قرار گرفتند. کلنی‌های مخمر حاصله بر روی محیط کروم آگار کاندیدا به صورت خطی کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شدند. تشخیص فنوتیپی جدایه‌های کاندیدایی بر اساس پیگمان تولید شده در محیط کروم آگار (مرک، آلمان) انجام شد. سپس وجود یا عدم وجود کلامیدوکونیدی در محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰، بررسی گردید. به منظور مطالعه تولید لوله زایا، قسمتی از کلنی مخمر به لوله حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم انسان منتقل و سوسپانسیون حاصله به مدت ۲-۳ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. در ادامه، قطره‌ای از سوسپانسیون مزبور بین لام و لامل در زیر میکروسکوپ بررسی گردید. آزمایش تجزیه قندها با استفاده از کیت API20C (شرکت Bio Mériex، فرانسه) انجام شد. در کنار نمونه‌های جمع‌آوری شده از سویه استاندارد ATCC ۱۰۲۳۱ به عنوان سویه مرجع استفاده شد. برای افتراق بین مخمر کاندیدا آلبیکنس از کاندیدا دابلینسیس<sup>۳</sup> آزمون بتاگالاکتوزیداز انجام شد. در نهایت، به منظور استفاده طولانی مدت، تمامی ایزوله‌ها در محیط برین هارت اینفوزیون برات حاوی ۱۵٪ گلیسرول کشت داده شد و در دمای ۷۰°C- ذخیره شدند (۹، ۱).

های طبیعی گیاهی دارند (۸، ۷). به دلیل ظهور سویه‌های مقاوم به درمان و گسترش علم نانوتکنولوژی در دهه گذشته، امکان ساخت و بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات فلزی فراهم آمده است. نانومواد جایگاه ویژه‌ای در پزشکی به خصوص در تشخیص و درمان بیماری‌های گوناگون دارند. مطالعات مختلفی اثر ضد میکروبی نانوذرات آهن را بر روی میکروارگانیسم‌های مختلف نشان داد (۱۰، ۹). لذا هدف از انجام مطالعه پیش رو، بررسی فراوانی ژن‌های مولد بیوفیلم (*Hwp*، *Als* و *Hyr1*) در سویه‌های کاندیدا آلبیکنس جداسازی شده از واژینوز و بیان ژن *Als1* در سویه‌های مجاور شده با نانو آهن به روش Real-Time PCR می‌باشد.

### روش بررسی

در این مطالعه توصیفی-مقطعی که در یک بازه زمانی ۶ ماهه انجام گرفت تعداد ۱۰۰ جدایه کاندیدا از بیماران مبتلا به عفونت‌های واژینال<sup>۱</sup> مراجعه کننده به بخش زنان بیمارستان شریعتی (تهران) به دست آمد. نمونه‌گیری به صورت کاملاً تصادفی و زیر نظر پزشک متخصص زنان انجام گرفت. برای حجم نمونه از فرمول  $\frac{z^2pq}{d^2}$  حساب شد (n حجم نمونه، t یا Z در صد خطای معیار ضریب اطمینان قابل قبول، p نسبتی از جمعیت فاقد صفت معین، q (1-p) نسبتی از جمعیت فاقد صفت معین (مثلاً جمعیت زنان، d درجه اطمینان یا دقت احتمالی مطلوب) با در نظر گرفتن شیوع ۲۱٪ عفونت در زنان در مطالعات مشابه، دقت ۰/۰۸ (معادل ۴۰ درصد شیوع) و الفای ۰/۰۵ حجم نمونه ۱۰۰ نفر برآورد شد (۷). نمونه‌ها از ترشحات واژن زنان مشکوک به عفونت کاندیدیازیس پس از اخذ رضایت نامه کتبی از بیماران، جمع‌آوری شده و سریعاً جهت انجام آزمون‌های تشخیصی به آزمایشگاه منتقل شدند. تشخیص بالینی ولوواژینت کاندیدیایی با علائمی از قبیل ترشحات سفیدرنگ، خارش، سوزش و ادم توسط پزشک متخصص زنان مورد تأیید قرار گرفت. در این مطالعه معیار خروج استفاده از آنتی‌بیوتیک در دو هفته قبل، عدم استفاده از

<sup>1</sup> Swab

<sup>2</sup> Sabouraud Dextrose Agar

<sup>3</sup> Candida Dubliniensis

## شناسایی مولکولی ژن های کد کننده بیوفیلیم

به منظور مطالعات مولکولی، ابتدا DNA ژنومی تمامی سویه ها با استفاده از کیت شرکت پیشگامان انتقال ژن با شماره CAT. NO: DM05050 استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل الکتروفورز ۱٪ (ولتاژ ۲۲۰ ولت و آمپراژ ۸۵ اهم) و دستگاه نانودرآپ (OD 260/280=1.8-2nm) مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی الیگونوکلوئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است (۱۱، ۶). پس انتخاب پرایمرهای مناسب و BLAST نمودن آن ها سایت NCBI، واکنش Multiplex-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر شامل ۱۲/۵ میکرو لیتر PCR Master Mix (سینا کلون، ایران) حاوی Taq DNA Polymerase (0.05 U/μl)، 3 mM MgCl<sub>2</sub> و dNTPs (0.4mM) ۰/۸ میکرو لیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرو لیتر از الگو (۱۰ نانوگرم) و ۸/۳ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر استریل با استفاده از گرادینت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۰ سیکل به صورت زیر انجام گرفت؛ با انتخاب برنامه مرتبط به صورت ذیل عمل گردید: گام اول واسرشت ثانویه ۹۴ درجه سانتی گراد ۵۰ ثانیه، گام دوم اتصال آغازگر ۵۵ درجه برای ۴۵ ثانیه، گام سوم بسط اولیه ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۲ دقیقه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. در پایان، محصولات واکنش PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (۰.۵ μg/ml) الکتروفورز گردید (۱۲).

## بررسی بیان ژن در سویه های تحت تیمار با نانوذره آهن

در این مطالعه نانوذرات آهن به قطر میانگین ۲۰ نانومتر به صورت محلول با رعایت تمامی موارد اخلاقی از شرکت Nano Sunny (کشور آمریکا) خریداری شد. برای جداسازی RNA به منظور بیان ژن *asl*، ابتدا نمونه های تیمار (مجاور شده با نانو آهن) و غیر تیمار (غیر مجاور با نانوذره آهن) کاندیدا آلیکنس را در محیط کشت سابورودکستروز براث (SDA، شرکت مرک) کشت و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس و انکوباتور شیکردار گذاشته و بعد از رشد مخمر در این محیط به نسبت ۱/۱ به

آن محیط کشت تازه افزوده و آن ها مجدداً درون انکوباتور شیکردار به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد. پس از رسیدن به فاز رشد لگاریتمی (در ۰/۴-۰/۶ OD<sub>600</sub>)، برای استخراج RNA از کیت Cinnapure با Cat No: PR891620 شرکت سیناژن استفاده شد (۹). سپس اندازه گیری غلظت RNA ها توسط دستگاه نانودرآپ (OD: 260/280) انجام و نمونه ها در دمای ۷۰- درجه سلسیوس قرار داده شدند.

با توجه به اینکه برای تبدیل RNA به cDNA و انجام Real-Time PCR، نمونه های RNA می بایست عاری از آلودگی با DNA ژنومی باشد، قبل از سنتز cDNA تمامی نمونه های RNA با آنزیم DNase تیمار شدند. تیمار RNA با استفاده از کیت فرمنتاز و طی دو مرحله انجام شد. به یک میکروتیوب استریل عاری از نوکلئاز یک میکروگرم RNA اضافه شد. سپس یک میکرو لیتر Reaction Buffer 10x Dnase1 و یک میکرو لیتر RNase-free به میکرو تیوب ها اضافه شد و تیوب ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. نهایت یک میکرو لیتر EDTA ۲۵ مولار به هر میکروتیوب اضافه و میکروتیوب ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵°C قرار داده شدند. بعد از تأیید صحت RNA و حذف DNA های اضافی موجود به سرعت همه نمونه های RNA به cDNA تبدیل و صحت تبدیل آن توسط انجام الکتروفورز ژل آگارز تأیید شد. سپس، سنتز cDNA با استفاده از آنزیم کیت RT PCR شرکت سیناژن با Product code: RTPL12 انجام شد و cDNA سنتز شده در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید. صحت انجام واکنش cDNA سازی از طریق انجام PCR روی ژل آگارز تأیید گردید. در نهایت، واکنش Real-Time PCR در حجم ۲۰ میکرو لیتر با استفاده از کیت شرکت (Genet Bio CAT. NO: Q9210) کره جنوبی به صورت زیر انجام شد: ۱۰ میکرو لیتر از Master Mix (SYBR Green)، ۵ میکرو لیتر از Depc Water، یک میکرو لیتر از پرایمر، یک میکرو لیتر از Rox dye و ۲ میکرو لیتر از cDNA استفاده شد. تکثیر قطعه های مورد نظر در دستگاه ABI step one با برنامه دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، تکثیر شامل ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی گراد برای مدت

جدول ۱: توالی های نوکلئوتیدی پرایمر ژن های بیوفیلیم ایزوله های کاندیدا آلبیکنس (۱۳)

پرایمر	(3' → 5') سکانس پرایمر
<i>ALS3</i>	Forward: 5'-CTGGACCACCAGGAAACACT-3' Reverse: 5'-ACCTGGAGGAGCAGTGAAAG-3'
<i>HWPI</i>	Forward: 5'-GCCCAGAAAGTTCTGTTCCA-3' Reverse: 5'-TTTGGTTTCAGTAGTAGTGGTTGG-3'
<i>HYRI</i>	Forward: 5'-TTGTTTGCATCAAGACTTTG-3' Reverse: 5'-GTCTTCATCAGCAGTAACACAACCA-3'
<i>Als2 (Real time PCR)</i>	Forward: 5'-AGGTTTCATCGGTTGATTTGG-3' Reverse: 5'-CCCATTGCACCAGATGTGTA-3'

۴۰٪)، کاندیدا کروزئی (۱ مورد؛ ۱٪) و سایر کاندیداها (۴ مورد؛ ۰٫۴٪) بودند.

نتایج آنالیز مولکولی نشان داد که از ۶۰ ایزوله کاندیدا آلبیکنس ۳۴ ایزوله (۵۶/۶۶٪) واجد ژن *Hwp*، ۴۶ ایزوله (۷۶/۱۶۶٪) واجد ژن *Als* و ۳۳ ایزوله (۵۵٪) واجد ژن *Hyr* بودند (شکل ۱). نتایج مربوط به منحنی ذوب (Melting Curve) ژن *Als* در سویه های بالینی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از نمونه های واژینوز و تیمار شده با نانو ذره آهن نشان داد که Peak اصلی برای این ژن در دمای ۸۵/۳۴ درجه سلسیوس رخ می دهد. کنترل های فاقد الگو یا همان NTC فاقد نمودار پیشرفت واکنش بوده ولی نمونه های مورد بررسی دارای نمودار تکثیر نمایی (لگاریتمی) بوده و تکثیر صورت گرفته است. در مقایسه نمودار تکثیر قبل و بعد از مواجهه با نانو- ذره مشخص شد که میزان  $\Delta Ct$  افزایش یافته است. Ct ژن بتا-اکتین در قبل و بعد از تیمار به ترتیب ۱۲/۸۲ و ۱۳/۵۸ به دست آمد. با توجه به اینکه اختلاف Ct قبل و بعد از تیمار با نانو آهن تنها ۰/۷۶- اختلاف دارد و این اختلاف ناچیز بوده بنابراین از ژن  $\beta$ -اکتین به عنوان ژن خانگی و استاندارد داخلی استفاده شده است.

آنالیز کمی Real Time PCR نشان داد که بیان ژن *Als* در ایزوله های تحت مطالعه تیمار شده نسبت به ایزوله های تیمار نشده پایین تر بوده است، که نشان دهنده نقش مثبت تیمار در کاهش بیان ژن *Als* در ایزوله ها بوده است (نمودار ۱). آنالیز محصولات Real time PCR برای

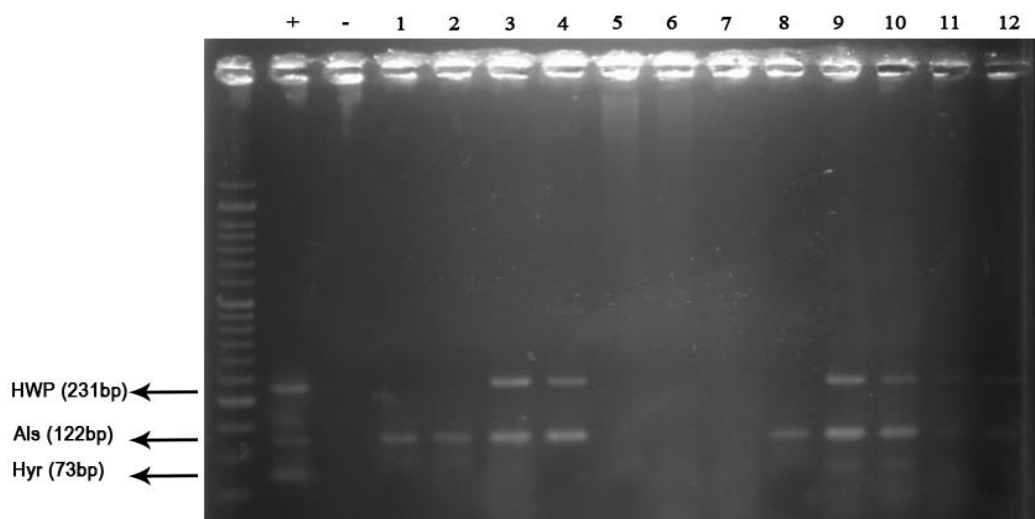
۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن خانگی  $\beta$ -اکتین به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد. دمای Annealing در مورد ژن *Als* ۵۸ درجه سلسیوس و برای بتا-اکتین  $52/8^{\circ}C$  می باشد (۱۳). پس از انجام Real-Time PCR از چندین طریق می توان کمیت سنجی نسبی را انجام داد، از جمله: استفاده از منحنی استاندارد یک ژن، استفاده از منحنی استاندارد هر دو ژن، و روش  $\Delta Ct$  پیش- فرض روش  $\Delta Ct$  برابری نسبی کارایی واکنش تکثیر cDNA با دو پرایمر مزبور است. با توجه به برابری کارایی تکثیر دو پرایمر در مطالعه حاضر، کمیت سنجی نسبی cDNA ژن های مورد بررسی در مقایسه با cDNA ژن بتا-اکتین (ژن مرجع داخلی) به روش  $\Delta Ct$  انجام شد (۱۳).

آنالیز آماری: از درصد به منظور بررسی شیوع ژن های کد کننده بیوفیلیم در جدایه های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مبتلابه واژینوز در نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ استفاده شد.

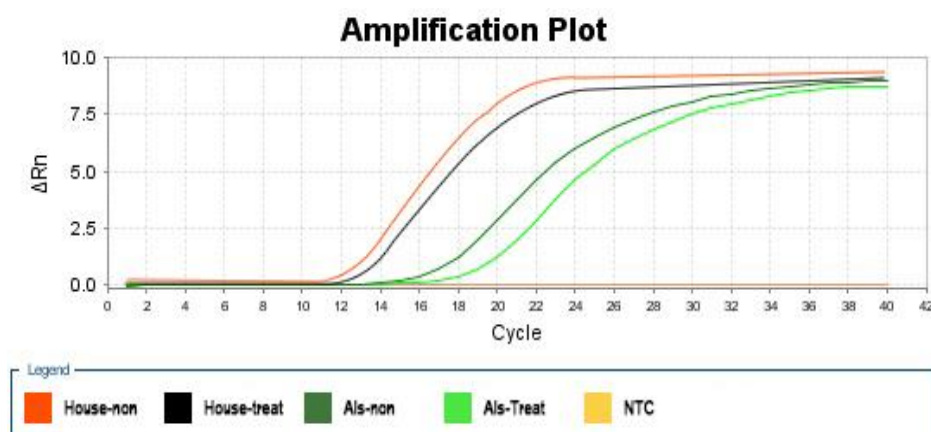
#### یافته ها

میانگین سنی افراد تحت مطالعه مبتلا به واژینیت کاندیدایی  $5/3 \pm 29$  بود. از ۱۰۰ نمونه کاندیدا تحت بررسی تعداد ۶۰ نمونه (۶۰٪) از نظر وجود کاندیدا آلبیکنس مثبت بودند. این ۶۰ ایزوله از نظر وجود جرم تیوب، تولید کلامیدئوسپور مثبت و در محیط کروم آگار کاندیدا کلنی به رنگ سبز روشن ایجاد کردند. سایر کاندیداها شامل کاندیدا گلابراتا (۲۱ مورد؛ ۲۱٪)، کاندیدا تروپیکالیس (۱۲ مورد؛ ۱۲٪)، کاندیدا دابلینسیس (۲ مورد؛

<sup>1</sup> No Template Controls



شکل ۱: تصویر ژل الکتروفورز +C؛ کنترل مثبت (کاندیدا آلبیکنس ۱۰۲۳۱ ATCC)، -C؛ کنترل منفی (آب مقطر)، M؛ DNA سایز مارکر 100bp (فرمنتاز)؛ سویه ها از شماره ۱-۱۲.



نمودار ۱: بیان ژن Als با روش Real-Time Pcr -به ترتیب کنترل داخلی، سویه تیمار و غیر تیمار، کنترل منفی

### بحث و نتیجه گیری

ولوواژینیت کاندیدایی بیماری است که توسط رشد غیرطبیعی مخمرها در موکوس دستگاه تناسلی خانم ها ایجاد می شود و به طور قابل ملاحظه ای در سال های اخیر افزایش پیدا کرده است (۴). بر اساس نتایج تحقیقات دیگر بیشترین شیوع بیماری در رده سنی ۲۹-۲۰ سال قرار دارد. نتایج حاصل از مطالعات Mahmoudi Rad در تهران (۱۴) و Adesiji در نیجریه (۱۵) نیز با مطالعه ما هماهنگ بود. در مطالعه حاضر از نظر آماری بین سن و ابتلا به بیماری رابطه معناداری وجود نداشت ( $p=0/137$ ). علت این تفاوت ها در مطالعات انجام شده عدم تشخیص صحیح پاتوژن، عدم اتخاذ درمان مناسب مقاومت دارویی، کامل نکردن دوره درمان، مصرف خودسرانه دارو، عدم رعایت

ژن *Als* با استفاده از رنگ ROX نشان داد که بیان این ژن در جدایه های تحت تیمار با نانوذره آهن نسبت به ایزوله های تیمار نشده پایین تر بوده است که نشان دهنده نقش مثبت تیمار در کاهش بیان ژن *Als* در ایزوله ها می باشد برای تعیین میزان بیان ژن *Als* از روش  $\Delta\Delta Ct$  استفاده شد (۹). در این روش فرض بر این است که بازده نمونه و کنترل داخلی برابر ۱۰۰٪ و از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  به منظور بررسی بیان ژن استفاده شد. همان طوری که مشاهده می شود نانوذره آهن توانست در شرایط آزمایشگاهی بیان ژن *Als* را در سلول های تیمار در مقایسه با گروه غیر تیمار ۲۶/۰۸۲ برابر کاهش دهد.

سلولی را در این پروتئین ایجاد می‌کند. طبق مطالعات Inci و همکاران (۲۷) فراوانی ژن *hwp1* در ۷۷ نمونه جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت واژینال ۹/۳٪ گزارش شده است. سایر مطالعات نشان می‌دهند که حضور ژن *hwp1* در تشکیل بیوفیلم ضروری می‌باشد. از سویی دیگر، برخی مطالعات بیانگر آن است که عدم حضور این ژن مانع از تشکیل بیوفیلم نمی‌شود. محققان به نام Nas و همکاران (۲۹) مطالعاتی را در زمینه بیان ژن های *Hwp1* و *SAP4* در سویه های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از نمونه‌های واژینیت کاندیدیایی با روش RT-PCR انجام دادند. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که میزان بیان ژن *Als1* در زنان در سنین باروری نسبت به دو ژن دیگر بیشتر بوده است. Inci و همکاران (۲۷) گزارش نمود فراوانی ژن *als* در جدایه های بیماران مبتلا به عفونت واژینال ۴۸٪ می‌باشد. همچنین فراوانی ژن *hwp1* در ۷۷ نمونه جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت واژینال ۹/۳٪ بوده است. نتایج مطالعه Real Time PCR نشان داد که بیان ژن *Als* در ایزوله های تحت مطالعه تیمار شده نسبت به ایزوله های تیمار نشده پایین تر بوده است. که نشان دهنده نقش مثبت تیمار در کاهش بیان ژن *Als* در ایزوله ها بوده است. Ghani و همکاران (۳۰) اثرات ضد میکروبی نانوذرات مختلفی را بررسی نمودند اما نانو ذرات آهن به دلیل ویژگی های مغناطیسی مناسب، سمیت اندک، سازگاری زیستی بالا و سهولت نسبی در سنتز نسبت به نانو ذرات دیگر بیشتر مورد توجه محققین هستند. این ترکیبات دارای خواص ضد میکروبی نیز هستند و گزارشات متعددی مبنی بر اثرات ضد میکروبی این نانو ذرات علیه باکتری های گرم منفی و گرم مثبت و قارچ ها وجود دارد.

این مطالعه نشان داد که تشکیل بیوفیلم یکی از فاکتورهای مهم در پاتوژنز کاندیدا آلبیکنس در ایجاد واژینوز می باشد و این می تواند عاملی برای بقا کاندیدا در محیط اسیدی واژن باشد همچنین، نتایج مطالعه Real Time PCR نشان داد که بیان ژن *Als* در ایزوله های تحت تیمار نسبت به ایزوله های تیمار نشده پایین تر بوده است که نشان دهنده نقش مثبت نانوذره آهن در کاهش بیان ژن *Als* در ایزوله ها می باشد.

#### سپاسگزاری

بدین وسیله از تمامی کارکنان بخش زنان بیمارستان

اصول اولیه بهداشت فردی و آلودگی روده‌ای می باشد (۸،۱۶). در مطالعه گذشته نگر Trama و همکاران (۱۶) که در ۶ ایالت آمریکا بر روی ۳۹۷۸ انجام شد. میزان شیوع آلبیکنس ۸۰/۲٪، گلابراتا ۱۴/۳٪، پاراپسیلوزیس ۵/۹٪ و تروپیکالیس ۸٪ گزارش شده است. در این مطالعه با توجه به نتایج کشت مثبت میزان شیوع ولوواژینیت حاصل از کاندیدا آلبیکنس ۶۰٪ تعیین شد که با مطالعات دیگر از جمله، Asadi در کاشان (۲۲/۳٪) (۱۷)، Meisami در تهران (۲۲/۷۳٪) (۱۹)، Adesiji در نیجریه (۲۵٪) (۱۴)، Holland در برزیل (۲۰/۸٪) (۲۰)، Solanki در هند (۲۳٪) (۲۱) مغایرت داشت، اما در برخی مطالعات به عنوان مثال Folavand در بوشهر (۵۱/۲٪) (۲۲)، Jamilian در اراک (۴۰٪) (۲۳)، Mahmoudabadi در اهواز (۴۹٪) (۲۴) و Soble در آمریکا (۲۵) میزان شیوع تقریباً شبیه مطالعه ی حاضر بود. می توان علت این تشابهات و یا تفاوت ها در شیوع را، تفاوت در شرایط اقلیمی، شرایط جغرافیایی، ویژگی های فرهنگی، میزان رعایت بهداشت، تفاوت در میزان شیوع عفونت های غیر قارچی، شیوه های آزمایش و ملاک های نمونه برداری، عنوان کرد.

نتایج حاصل از مطالعه Rahimi و همکارانشان (۲۶) نشان داد که از میان ۵۵ نمونه بالینی کاندیدا آلبیکنس که ۲۰ ایزوله (۳۶/۳۶٪) هر دو ژن *Als2* و *Als9* را به طور هم زمان بیان نمودند. و ۲۳ ایزوله (۴۱/۸٪) و ۲۱ ایزوله (۳۸/۱٪) به ترتیب ژن های *Als2* و *Als9* را بیان نمودند. میزان بالای بیان ژن های ذکر شده در سویه های بالینی می تواند بیانگر ایفای نقش این دو ژن در ایجاد چسبندگی و تشکیل بیوفیلم در قارچ کاندیدا آلبیکنس باشد. طبق مطالعات Inci و همکاران (۲۷) نتایج آنالیز مولکولی نشان داد که از ۶۰ ایزوله کاندیدا آلبیکنس ۳۴ ایزوله (۵۶/۶۶٪) واجد ژن *hwp* ۴۶ ایزوله (۷۶/۶۶٪) واجد ژن *Als* و ۳۳ ایزوله (۵۵٪) واجد ژن *Hyr* بودند. در سال ۲۰۱۲ فراوانی ژن *Als1* در جدایه های بیماران مبتلا به عفونت واژینال ۴۸٪ گزارش شده است. طبق مطالعات صورت گرفته موتاسیون در ژن *Als1* منجر به نقص در تشکیل بیوفیلم می شود (۲۵). از طرف دیگر تحقیقات گروه Nailis و همکاران (۲۶) نشان می دهد که حضور ژن *Als1* در تشکیل بیوفیلم کاندیدیایی ضروری نمی باشد. تحقیقات نشان داده است که پروتئین *hwp1* در سطح بیرونی خود متصل به قند مانوز می باشد که قابلیت اتصال به سطح

شریعتی و آزمایشگاه میکروبی شناسی آن بیمارستان و همچنین آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد که ما را در انجام این پروژه یاری رساندند تقدیر و تشکر می نماییم.

### منابع

- Alli J, Okonko I, Odu N, Kolade A, et al. Detection and prevalence of *Candida* isolates among patients in Ibadan, Southwestern Nigeria. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 2017; 1(3): 176-184.
- Gaydos CA, Beqaj S, Schwebke JR, Lebed J, TE, et al. Clinical Validation of a Test for the Diagnosis of Vaginitis. *Obstetrics and gynecology* 2017; 130(1): 181-189.
- Jaeger M, Plantinga TS, Joosten LA, Kullberg B-J, et al. Genetic basis for recurrent vulvo-vaginal candidiasis. *Current infectious disease reports* 2013; 15(2): 136-142.
- Nakajima S, Harrison O, Linehan JL, Belkaid Y. *Candida albicans* colonization exacerbates skin inflammation in a murine model of psoriasis. *Am Assoc Immunol*; 2017.
- Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology* 2001; 9(7): 327-335.
- Pakdel M, Zarrabi M, Asgarani E, Mohamadi P, et al. Identification of *als1* and *hwp1* Genes in *Candida albicans* Isolated Vaginal Infection. 2014; G3. [Persian]
- Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, et al. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(5): 2155-62.
- Lynch M, Sobel J, Fidel Jr P. Role of antifungal drug resistance in the pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Journal of medical and veterinary mycology* 1996; 34(5): 337-9.
- Van de Ven H, Paulussen C, Feijens P, Matheussen A, Rombaut P, Kayaert P, et al. PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent in vitro and in vivo alternatives to Fungizone and AmBisome. *Journal of controlled release* 2012; 161(3): 795-803.
- Qian J, Pan C, Liang C. Antimicrobial activity of Fe-loaded chitosan nanoparticles. *Engineering in Life Sciences*. 2017.
- Wangsanut T, Ghosh AK, Metzger PG, Fonzi WA, et al. *Grf10* and *Bas1* Regulate Transcription of Adenylate and One-Carbon Biosynthesis Genes and Affect Virulence in the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*. *mSphere* 2017; 2(4): e00161-17.
- Tsang PW, Bandara HM, Fong WP. Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. *PLoS One*. 2012 Nov 30; 7(11): e50866
- Hosseini SS, Ghaemi E, Noroozi A, Niknejad F. Zinc Oxide and *ALS3* Gene Expression in *Candida albicans* Strains from Urinary Tract Infections. Nanoparticles Inhibition of Initial Adhesion and *ALS1*. *Mycopathologia*. 2019 Apr; 184(2): 261-271.
- Mahmoudi Rad M, Zafarghandi AS, Amel Zabihi M, Tavallaee M, Mirdamadi Y. Identification of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis by multiplex PCR. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology* 2012; 872169.
- Adesiji Y, Ndukwe N, Okanlawon B. Isolation and antifungal sensitivity to *Candida* isolates in young females. *Open Medicine* 2011; 6(2): 172-176.
- Ayatollahi Mousavi SA, Karami Robati A, Madani M, Hadizadeh S. Prevalence of Systemic fungal Infections in Kerman Teaching Hospitals. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2013; 22(97): 105-112.
- Hurley R, de Louvois J. *Candida* vaginitis. *Postgraduate medical journal*. 1979; 55(647): 645.
- Trama JP, Adelson ME, Raphaelli I, Stemmer SM, et al. Detection of *Candida* species in vaginal



- samples in a clinical laboratory setting. Infectious diseases in obstetrics and gynecology 2005; 13(2): 63-7.
19. Meisami F. A study common causes of bacterial vaginitis in woman referred to Mirza kochak khan hospital, Tehran, 2011. J Med Sci 1992; 3: 51-58
  20. Holland J, Young M, Lee O, Chen SC. Vulvovaginal carriage of yeasts other than *Candida albicans*. Sexually transmitted infections 2003; 79(3): 249-50.
  21. Solanki A, Mathur D, Joshi K. Bacterial, fungal and parasitic flora in vaginitis. Journal of the Indian Medical Association 1983; 81(9-10): 151-3.
  22. Foladvand M, Naeimi B, Haghighi M. Identification of candida species isolated of vaginitis in woman referred to specialized hospital Bushehr. J Univ Med Sci & Health Services of Bushehr 2011; 2: 113-108.
  23. Jamilian M, Mashad A, Sarmadi F, Ghaznavi-Rad A, et al, Ghena. Vulvovaginitis in non-pregnant woman 15-50 referred to Taleghani hospital Arak, 2005. 2006; 2: 1-7.
  24. Mahmoudabadi AZ, Najafyan M, Alidadi M. Clinical study of *Candida* vaginitis in Ahvaz, Iran and susceptibility of agents to topical antifungal. Pak J Med Sci 2010; 26(3): 607-610.
  25. Sobel JD, Brooker D, Stein GE, Thomason JL, et al. Single oral dose fluconazole compared with conventional clotrimazole topical therapy of *Candida* vaginitis. American journal of obstetrics and gynecology 1995; 172(4): 1263-1268.
  26. Rahimi H, Roudbar Ms, Kachouei R, Roudbari M. Expression of *Candida albicans als 2* and *als 9* genes isolated from women with vaginal candidiasis by RT-PCR. 2013.
  27. Inci M, Atalay MA, Özer B, Evirgen Ö, et al. Investigations of ALS1 and HWP1 genes in clinical isolates of *Candida albicans*. Turkish Journal of Medical Sciences 2013; 43(1): 125-130.
  28. Nailis H, Vandenbroucke R, Tilleman K, Deforce D, et al. Monitoring ALS1 and ALS3 gene expression during in vitro *Candida albicans* biofilm formation under continuous flow conditions. Mycopathologia 2009; 167(1): 9.
  29. Nas T, Kalkanci A, Fidan I, Hizel K, et al. Expression of ALS1, HWP1 and SAP4 genes in *Candida albicans* strains isolated from women with vaginitis. Folia Microbiol (Praha) 2008; 53(2): 179-183.
  30. Ghani S, Rafiee B, Sadeghi D, Ahsani M. Biosynthesis of Iron Nano-Particles by *Bacillus Megaterium* and Its Anti-Bacterial Properties. Journal of Babol University of Medical Sciences 2017; 19(7): 13-19.