DOI: 10.48305/jims.2022.16284

مجله دانشکده پزشکی اصفهان | سال چهلم/شماره‌ی ۶۵۸/هفته‌ی دوم فروردین ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۶/۱۵ | تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۱۳ | تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۱/۱۴

ارزیابی فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک و تعیین حضور ژن‌های SAP5 و PLB1 در مخمرهای جدا شده از واژینیت کاندیدایی

فائزه محمدی[۱]، امیررضا گرانفر[۲]، بهناز فامیل ستاریان[۳]، نازنین امانت[۴]، محمدرضا جواهری[۵]، منیرالسادات میرزاده[۶]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کاندیدیازیس ولوواژینال (Volvovaginal Candidiasis) VVC یک عفونت قارچی شایع در زنان است. تولید آنزیم‌های خارج سلولی به عنوان عوامل ویرولانس در پاتوژنز گونه‌های *کاندیدا* نقش دارند. هدف از این مطالعه، ارزیابی فعالیت فسفولیپاز، پروتئیناز و بررسی الگوی توزیع ژن‌های SAP5 و PLB1 در ایزوله‌های *کاندیدا* جدا شده از زنان مبتلا به VVC می‌باشد.

روش‌ها: این مطالعه‌ی توصیفی- مقطعی، بر روی ۱۳۵ سواپ واژینال زنان مشکوک به VVC انجام شد. گونه‌های *کاندیدا* جدا شده توسط PCR-RFLP شناسایی و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیکی و آنالیز فراوانی ژن‌های SAP5 و PLB1 بر روی آن‌ها ارزیابی گردید.

یافته‌ها: طبق یافته‌های این مطالعه، *کاندیدا آلبیکنس* دارای بیشترین فراوانی (۶۷ درصد) می‌باشد. در مجموع، ۸۰ درصد ایزوله‌های مورد مطالعه، دارای فعالیت پروتئولیتیک و ۷۳ درصد، دارای فعالیت فسفولیپازی می‌باشند. همچنین، فراوانی ژن‌های PLB1 و SAP5 در بین گونه‌های *کاندیدا* به ترتیب ۹۵/۷ و ۹۱/۴ درصد گزارش گردید. حضور همزمان ژن‌های SAP5 و PLB1 در ۸۷ درصد از ایزوله‌ها مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه، اهمیت مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی و درک نقش فاکتورهای ویرولانس مرتبط با آنزیم‌های خارج سلولی در پاتوژنز سویه‌های *کاندیدا* را نشان داد.

واژگان کلیدی: *کاندیدا آلبیکنس*؛ پروتئاز؛ فسفولیپاز؛ SAP5 و PLB1

ارجاع: محمدی فائزه، گرانفر امیررضا، فامیل ستاریان بهناز، امانت نازنین، جواهری محمدرضا، میرزاده منیرالسادات. **ارزیابی فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک و تعیین حضور ژن‌های SAP5 و PLB1 در مخمرهای جدا شده از واژینیت کاندیدایی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۵۸): ۳۹-۳۳

مقدمه

واژینیت کاندیدایی (Volvovaginal candidiasis) VVC، مخاط دستگاه تناسلی را پس از عفونت باکتریایی در زنان در سنین باروری تحت تأثیر قرار می‌دهد. عوامل اصلی مستعدکننده در این بیماری، سرکوب سیستم ایمنی بدن، دیابت، استفاده از قرص‌های پیشگیری از بارداری و درمان‌های ضد باکتریایی است (۱). شایع‌ترین عامل بیماری‌زا، *کاندیدا آلبیکنس* بوده و پس از آن گونه‌های کاندیدایی غیر آلبیکنس مانند *کاندیدا گلابراتا* می‌باشند (۲). تشخیص واژینیت کاندیدایی اغلب بر اساس نشانه‌های بالینی است و بیشتر از داروی ضد قارچی فلوکونازول برای درمان استفاده می‌شود (۳). تحقیقات نشان می‌دهند که ایزوله‌های مختلف *کاندیدا* از نظر قدرت بیماری‌زایی با یکدیگر تفاوت دارند. این تفاوت‌ها به فاکتورهای ویرولانس و نیز خصوصیات میزبان و بافت هدف نسبت داده می‌شود (٤).

آنزیم‌های هیدرولیتیک در اتصال گونه‌های *کاندیدا* به ویژه در

۱- استادیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۲- دانشجوی پزشکی، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۳- کارشناس ارشد ایمنی‌شناسی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۴- دانشجوی علوم آزمایشگاهی، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۵- کارشناس ارشد قارچ‌شناسی، سازمان تأمین اجتماعی، تأمین اجتماعی بیمارستان سنندج، سنندج، ایران
۶- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: فائزه محمدی: استادیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
Email: esf.mohamadi@gmail.com

مرحله‌ی هایف به بافت هدف و نیز در فرایند تخریب غشای سلولی میزبان نقش دارند (۵، ٦). آسپارتیل پروتئیناز ترشحی به عنوان یکی از مهم‌ترین فاکتورهای ویرولانس گونه‌های *کاندیدا* باعث تقویت توانایی ارگانیسم در کلونیزه شدن و نفوذ در بافت‌های میزبان می‌گردد و با تخریب پروتئین‌های ساختاری، نیتروژن مورد نیاز برای بقای سلول‌های قارچی را فراهم می‌نماید (۷). این آنزیم توسط یک خانواده‌ی ۱۰ ژنی شناخته شده تحت عنوان SAPs (Secretedaspartic proteinases) تولید می‌شوند که در بین گونه‌های مختلف به طور متفاوت توزیع شده‌اند (۸).

فسفولیپازهای ترشحی به عنوان یکی دیگر از فاکتورهای اصلی بیماری‌زایی در کاندیدا مطرح می‌باشد. این دسته از آنزیم‌ها با هیدرولیز کردن یک یا چند اتصال استر در گلیسروفسفولیپدها باعث تخریب غشاهای سلولی شده که در نهایت سبب اتصال قارچ به بافت هدف و انتشار آن در بافت می‌شوند. در گونه‌های کاندیدا، ٤ نوع فسفولیپاز وجود دارد که B1 و D1 بیشترین نقش را در پاتوژنیسیتی قارچ ایفا می‌کنند. گزارشات نشان می‌دهد که PLB در استرین *کاندیدا* باعث نفوذ مخمر به اعماق بافت مخاطی می‌گردد (۹). بنابراین به نظر می‌رسد که PLB از طریق آسیب رساندن به غشای سلول میزبان به عنوان فاکتور پاتوژنیک کاندیدا عمل می‌نماید (۱۰، ۱۱). هدف از این مطالعه، ارزیابی فنوتیپی آنزیم‌های هیدرولیتیک و بررسی الگوی توزیع ژن‌های ویرولانس SAP5 و PLB1 گونه‌های *کاندیدا* جدا شده از بیماران مبتلا به VVC بود.

روش‌ها

تعداد ۱۳۵ نمونه‌ی بالینی از دستگاه تناسلی زنان مشکوک به VVC که به درمانگاه زنان در استان قزوین مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری گردید. فرم رضایت‌نامه از همه‌ی شرکت‌کنندگان اخذ گردید. بیماران از نظر وضعیت تأهل، سن، عدم وجود بیماری زمینه‌ای، تعداد بارداری، علائم عفونت واژن و روش جلوگیری از بارداری مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌گیری با استفاده از دو سواب استریل جهت بررسی آزمایش مستقیم و کشت بر روی محیط سابورود دکستروز آگار انجام گردید. همچنین آزمایش فنوتیپی با استفاده از محیط CHROMagar Candida انجام شد.

ارزیابی تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک: جهت ارزیابی فعالیت آنزیم پروتئیناز از محیط حاوی Mgso4.7H2O، NaCl، K2HPO4، Yeast extract، آلبومین سرم گاوی و گلوکز استفاده شد (۱۲). برای هر ایزوله، سوسپانسیون قارچی (10^6 cells/mL) تهیه و به سطح محیط کشت تلقیح گردید. جهت بررسی فعالیت آنزیم فسفولیپاز از محیط کشت حاوی سابورو دکستروز آگار، NaCl، CaCl2 و زرده‌ی تخم‌مرغ استفاده گردید. ۱۰µl از سوسپانسیون مخمری به پلیت‌های کشت اضافه گردید و همه‌ی پلیت‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد.

شناسایی مولکولی

استخراج DNA و ITS-PCR: DNA ژنومی با استفاده از دانه‌های شیشه‌ای و فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۲۵:۲٤:۱) استخراج گردید. به طور خلاصه، منطقه ITS1-5.8S-ITS2 گونه‌های *کاندیدا* با استفاده از آغازگر ITS1 (5´- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´) و ITS4 (5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´) تقویت شد (۱۳). جهت انجام تست، ۱۲/۵µl از مسترمیکس، ۱/۵µl از هر پرایمر و ۱ µl DNA استخراج شده را مخلوط نموده و جهت رسیدن به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، آب مقطر اضافه گردید. سیکل گرمایی به صورت حرارت ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارت ۹٤ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ٤۵ درجه به مدت ۵۵ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و یک سیکل ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه بهینه‌سازی گردید.

RFLP-PCR: جهت انجام آزمایش، واکنش حاوی ۱ میکرولیتر آنزیم *MspI*، ۲µl بافر، ۱۰µl محصول PCR و آب مقطر استریل تا حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت انکوباسیون گردید (۱٤). محصولات با الکتروفورز ژل آگارز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

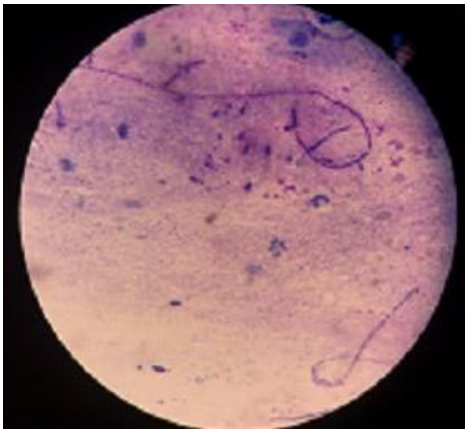
آزمون PCR برای ردیابی ژن‌های SAP5 و PLB1: جهت انجام کار از پرایمرهای اختصاصی SAP5 و PLB1 استفاده شد (جدول ۱). واکنش زنجیرهای پلیمراز با حجم نهایی ۲۵ µl شامل ۱۲/۵ µl مستر میکس، ۱/۵µl از هر پرایمر، ۲µl DNA قارچی و آب مقطر انجام گرفت. شرایط دمایی واکنش به صورت حرارت ۹۵ درجه به مدت ٤ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارت ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ٦۰ درجه و ۵۸ درجه به مدت ۳۰ ثانیه به ترتیب برای SAP5 و PLB1، ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و یک سیکل ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه بهینه‌سازی گردید.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای استفاده شده در مطالعه

پرایمر	توالی (3´-5´)	اندازه‌ی محصول (bp)
AGAATTTCCCGTCGATGAGACTGGT	SAP5	۲۷۷
CAAATTTTGGGAAGTGCGGGAAGA		
CCTATTGCCAAACAAGCATTGTC	PBL1	۱۷۹
CCAAGCTACTGATTTCACCTGCTCC		

یافته‌ها

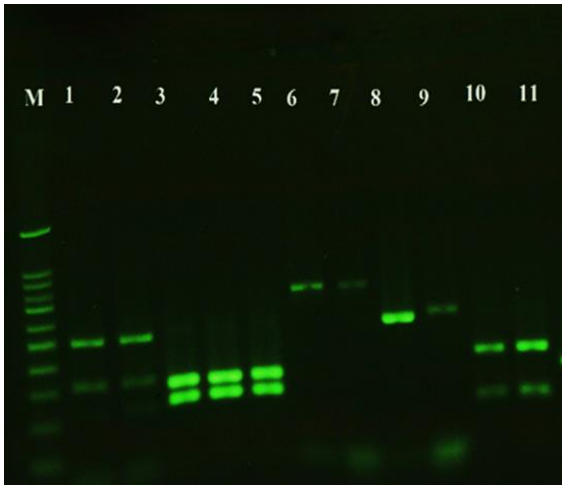
در این بررسی، میانگین سنی بیماران مورد مطالعه ٦/٥ ± ٣١ سال (دامنه: ١٩ تا ٤٦ سال) بود. مشاهده‌ی بلاستوکونیدی و سودوهایف در آزمایش مستقیم و نیز رشد کلنی مخمری سفید مایل به کرم رنگ در محیط کشت سابورو دکستروز آگار نشان داد که از ١٣٥ نمونه‌ی بالینی واژینال ٧٠ نفر (٥١/٨ درصد) از نظر VVC مثبت بودند (شکل ١). در میان زنان مبتلا، فراوانی علائم بالینی به ترتیب شامل ترشح سفید (٨٣ درصد)، خارش (٧٧ درصد) و التهاب (٦٠ درصد) بود.



شکل ١. Pseudohyphae و مخمر کاندیدا در آزمایش مستقیم، بزرگ‌نمایی X١٠٠

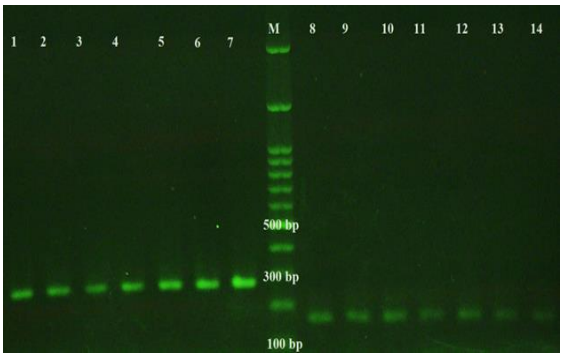
همچنین نتایج کشت کروم آگار کاندیدا و RFLP-PCR نشان داد که بیشترین فراوانی مخمری مربوط به *کاندیدا آلبیکنس* (٦٧ درصد) و به دنبال آن *کاندیدا گلابراتا* (١٨/٧ درصد)، *کاندیدا کفایر* (٧ درصد)، *کاندیدا تروپیکالیس* (٤/٣ درصد) و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* (٣ درصد) می‌باشد (شکل ٢).

از ٧٠ ایزوله‌ی *کاندیدای* مورد آزمایش، قدرت تولید پروتئیناز در ٥٦ ایزوله (٨٠ درصد) و توانایی تولید فسفولیپاز در ٥١ (ایزله ٧٣ درصد) مشاهده گردید. در میان ٤٧ ایزوله‌ی *کاندیدا آلبیکنس*، میزان فعالیت فسفولیپاز و پروتئیناز به ترتیب ٩٥/٧ و ٩٣/٦ درصد گزارش گردید. در میان سویه‌های غیر *آلبیکنس*، توانایی تولید پروتئیناز و فسفولیپاز در ١٣ ایزوله‌ی *کاندیدا گلابراتا* به ترتیب ٤٦/٢ و ٣٠/٨ درصد بود. در میان سویه‌های *کاندیدا کفایر* تنها دو ایزوله (٤٠ درصد) فعالیت پروتئینازی را نشان دادند. همچنین، دو ایزوله از سه ایزوله‌ی *کاندیدا تروپیکالیس* (٦٦/٧ درصد) دارای فعالیت پروتئینازی و تنها یک ایزوله (٣٣/٣ درصد) توانایی تولید فسفولیپاز را نشان داد. فعالیت پروتئیناز و فسفولیپاز در دو گونه *کاندیدا پاراپسیلوزیس* به ترتیب ١٠٠ و ٥٠ درصد گزارش گردید.



شکل ٢. الکتروفورز ژل آگاروز محصولات ITS-PCR پس از هضم با *MspI*. M: نشانگر مولکولی 100bp، چاهک ٢-١: *کاندیدا گلابراتا*، چاهک ٥-٣: *کاندیدا آلبیکنس*، چاهک٧-٦: *کاندیدا کفایر*، چاهک ٩-٨: *کاندیدا پاراپسیلوزیس*، چاهک ١١-١٠: *کاندیدا تروپیکالیس*.

در میان سویه‌های مورد مطالعه، ٦٤/٣ درصد ایزوله‌ها هر دو آنزیم را تولید می‌نمودند. توزیع سویه‌های *کاندیدا* با مقادیر مختلف تولید آنزیم‌های خارج سلولی در جدول ٢ نشان می‌دهد که فعالیت +٤ پروتئیناز در ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا گلابراتا* به ترتیب٥٣/٢، ٥٠ و ٧/٧ درصد گزارش گردید. علاوه بر این، فعالیت +٤ فسفولیپاز در ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا تروپیکالیس* به ترتیب ٤٤/٧٧ و ٣٣/٣ درصد مشاهده گردید. همچنین، در مطالعه‌ی حاضر ٧٠ جدایه‌ی *کاندیدا* از نظر وجود ژن SAP5 و PLB1 مورد آزمایش قرار گرفتند. ژن SAP5 در ٩١/٤ درصد و ژن PLB1 در ٩٥/٧ درصد جدایه‌ها تشخیص داده شد. ٨٧ درصد ایزوله‌ها، دارای هر دو ژن SAP5 و PLB1 به طور همزمان بودند (شکل ٣).



شکل ٣. ژل الکتروفورز PCR ژن‌های SAP5 و PBL1. M: نشانگر مولکولی 100bp، چاهک ٧-١: ژن SAP5 (277bp) و چاهک ١٤-٨: ژن PBL1 (179 bp)

جدول ۲. فعالیت پروتئیناز و فسفولیپاز گونه‌های مختلف *کاندیدا*

گونه‌های *کاندیدا*	میزان فعالیت پروتئیناز					میزان فعالیت فسفولیپاز				
	+٤*	+٣*	+٢*	+١*	منفی*	+٤*	+٣*	+٢*	+١*	منفی*
کاندیدا آلبیکنس (n = ۴۷) درصد	۵۳/۲	۲۹/۸	۱۰/٦	–	۱۰/٦	٤٤/۷	۳٤	۱۷	–	٤/۳
کاندیدا گلابراتا (n = ۱۳) درصد	۷/۷	۱۵/٤	۲۳	–	۵۳/۸	–	/۷/۷	۷/۷	۱۵/٤	٦۹/۲
کاندیدا کفایر (n = ۵) درصد	–	–	٤۰	–	٦۰	–	–	–	–	۱۰۰
کاندیدا تروپیکالیس (n = ۳) درصد	–	۳۳/۳	۳۳/۳	–	۳۳/۳	۳۳/۳	–	–	–	٦٦/۷
کاندیدا پاراپسیلوزیس (n = ۲) درصد	۵۰	۵۰	–	–	–	–	۵۰	–	–	۵۰

* فعالیت آنزیمی مساوی ۱: معادل منفی، فعالیت آنزیمی مساوی ۱– ۰/۹ : معادل ۱+، فعالیت آنزیمی مساوی ۰/۸–۰/۸۹: معادل ۲+، فعالیت آنزیمی مساوی ۰/۷–۰/۷۹: معادل ۳+ و فعالیت آنزیمی کمتر از۰/٦۹ :معادل ٤+

بحث

در سال‌های اخیر، گزارش‌هایی مبنی بر جدا شدن عوامل کاندیدای غیر آلبیکنس از زنان مبتلا به VVC گزارش شده است. در این مطالعه مانند اکثر مطالعات، *کاندیدا آلبیکنس* به عنوان گونه‌ی غالب (٦۷ درصد) جدا شده مطرح بود و بعد از آن به ترتیب *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا کفایر*، *کاندیدا تروپیکالیس* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* گزارش گردید. یکی از فاکتورهای ویرولانس در گونه‌های *کاندیدا*، چسبندگی مخمر به سطح سلول میزبان است. در این رابطه، آنزیم‌های مختلف هیدرولیتیک مانند فسفولیپاز و پروتئیناز در *کاندیدا* شناسایی شده که در کلونیزاسیون مخمر در سلول میزبان نقش دارند (۱۵). پروتئازهای آسپارتیل یکی از عوامل مهم ویرولانس در *کاندیدا* می‌باشند که در تهاجم به بافت، چسبندگی و تغییر فنوتیپی نقش دارند (۱٦). همچنین فسفولیپازهای ترشحی با هیدرولیز کردن یک یا چند اتصال استر در گلیسروفسفولیپیدها، باعث تخریب غشاهای سلولی شده که در نهایت سبب اتصال قارچ به بافت هدف و انتشار آن در بافت می‌شوند (۱۱).

در مطالعه‌ی ما، فعالیت هر دو آنزیم توسط سویه‌های *کاندیدا* جدا شده از زنان مبتلا به VVC در استان قزوین ارزیابی گردید. یافته‌های ما نشان داد که در مجموع میزان فعالیت پروتئولیتیک (۸۰ درصد) سویه‌های *کاندیدا* جدا شده بیش از فعالیت فسفولیپازی (۷۳ درصد) آن‌ها می‌باشد. علاوه بر این، فعالیت پروتئینازی و فسفولیپازی سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس* بیش از سویه‌های غیر آلبیکنس گزارش گردید. همراستا با نتایج مطالعه‌ی ما، Shirkhani و همکاران در سال ۲۰۱٦ گزارش نمودند که میزان فعالیت پروتئولیتیک (۹۰/۲ درصد) ایزوله‌های جدا شده از واژن، بیشتر از فعالیت فسفولیپاز می‌باشند (۱۷).

Seifi و همکاران نشان دادند که فعالیت پروتئیناز و فسفولیپاز سویه‌های *کاندیدا* جدا شده از زنان مبتلا به VVC به ترتیب ۷٤/۲ و ٦٦/۷ درصد می‌باشد (۱۸).

Kumar و همکاران، فعالیت پروتئیناز و فسفولیپاز در سویه‌های مختلف *کاندیدا* جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان و HIV را به ترتیب ۸۳/٦ و ٦۸/۸ درصد گزارش نمودند (۱۹).

Bassyouni و همکاران نشان دادند که فعالیت فسفولیپازی و پروتئینازی در سویه‌های *کاندیدا* جدا شده از زنان غیر دیابتی مبتلا به VVC به ترتیب ۱۰۰ و ٦۵ درصد می‌باشد (۲۰).

مطالعه‌ای در مصر، میزان فعالیت فسفولیپاز (۷۷/٤ درصد) گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از بیماران VVC را بیش از فعالیت پروتئیناز (٦٤/۵ درصد) گزارش نمودند (۲۱). تفاوت در تعداد ایزوله‌ها، سویه‌های مختلف *کاندیدای* مورد مطالعه و محل جداسازی گونه‌های *کاندیدا* از دلایل تفاوت در میزان فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک در مطالعات مختلف می‌باشد. علاوه بر این، استفاده از محیط کشت‌های BSA آگار و egg yolk آگار نسبتاً غیر حساس بوده و ممکن است برای ایزوله‌هایی که سطوح پایینی از پروتئیناز و فسفولیپاز را تولید می‌کنند، مناسب نباشد.

همچنین مطالعات نشان دادند که آنزیم آسپارتیل پروتئیناز ترشحی توسط خانواده‌ی ده ژنی SAP تولید می‌گردد. SAPs یک عامل مهم برای رشد *کاندیدا* در میزبان انسان است که امکان استفاده از پروتئین‌های میزبان را به عنوان منبع نیتروژن فراهم می‌کند (۲۲). شواهد زیادی نقش ژن‌های SAP را در بیماری‌زایی اثبات می‌نمایند، به طوری که بیماران مبتلا به عفونت *کاندیدیازیس* دارای فعالیت پروتئولیتیک بالاتری نسبت به افراد سالم می‌باشند (۱٦). همچنین، از

چهار کلاس فسفولیپازهای شناسایی شده، PLB1 و PLD1 برای ویرولانس مخمر لازم می‌باشد (۲۳).

گزارشات نشان که PLB در *کاندیدا*، باعث نفوذ مخمر به اعماق بافت مخاطی و زیر مخاطی می‌گردد. از طرفی، جهش در ژن PLB باعث شده که *کاندیدا* از حالت تهاجمی خود خارج شود. بنابراین به نظر می‌رسد که PLB از طریق آسیب رساندن به غشای سلول میزبان به عنوان فاکتور پاتوژنیک *کاندیدا* عمل می‌نماید (۱۰، ۱۱).

در مطالعه‌ی حاضر، ژن SAP5 در ۹۱/٤ درصد جدایه‌های *کاندیدا* شناسایی گردید. ١٤ درصد از سویه‌های SAP5 مثبت، توانایی تولید پروتئیناز را در روش فنوتیپی نداشتند. این موضوع می‌تواند به نقش سایر ژن‌های SAP در تولید پروتئیناز اشاره نماید. علاوه بر این، ممکن است سطح فعالیت پروتئیناز در این سویه‌ها پایین بوده به طوری که در روش‌های فنوتیپی، قابل ردیابی نمی‌باشند.

Sanglard و همکاران بیان نمودند که گروه ایزوآنزیم‌های SAP4، SAP5 و SAP6 جهت پیشرفت عفونت سیستمیک توسط *کاندیدا آلبیکنس* دارای اهمیت می‌باشند (٢٤).

Bernardis و همکاران نشان دادند که اعضای خانواده‌ی SAP نقش بیماری‌زایی در واژینیت ایفا می‌کنند (۲۵).

در مطالعه‌ی ما، ژن PLB1 در ۹۵/۷ درصد سویه‌های *کاندیدا* شناسایی گردید. در مطالعه‌ای در عراق، حضور ۱۰۰ درصد ژن‌های PLB1 و SAP5 در ٤٩ سویه‌ی *آلبیکنس* جدا شده از زنان مبتلا به VVC را نشان داد (۲٦).

در مطالعه‌ای دیگر در مکزیک بر روی ۳۹ سویه‌ی *آلبیکنس* جدا شده از زنان مبتلا به VVC نیز گزارش گردید که ۱۰۰ درصد دارای هر دو ژن PLB1 و SAP5 می‌باشند (۲۷).

Bassyouni و همکاران، فراوانی ژن SAP5 در سویه‌های *کاندیدا* جدا شده از زنان غیر دیابتی مبتلا به VVC را ۷۵ درصد و ژن PLB1 را ۹۵ درصد گزارش نمودند (۲۰).

تفاوت در میزان شیوع ژن‌های ویرولانس در مطالعات مختلف ممکن است به عوامل متعددی از جمله تعداد جدایه‌های مورد مطالعه و تفاوت در محل جداسازی گونه‌های *کاندیدا* بستگی داشته باشد. مطالعات نشان می‌دهند که پروتئین‌های SAP نقش مهمی در پاتوژنز عفونت دارند. SAPها علاوه بر عملکرد اصلی خود که تجزیه‌ی پروتئین‌ها می‌باشد در چسبندگی سلول به سلول نیز نقش دارند. به طوری که ژن‌های SAP4-6 در طی انتقال مخمر به سودوهایف بیان می‌گردند (١٦، ٢٨).

Taylor و همکاران، الگوی بیان ژن‌های SAP در جریان عفونت واژن در موشرا مورد بررسی قرار دادند و بیان نمودند که از بین ژن‌های SAP1-6، تنها SAP4 و SAP5 در طول این عفونت به طور قابل تشخیص القا شده و بیان هر دوی این ژن‌ها با رشد هایفی همراه می‌باشد (۲۹).

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی ما، فراوانی بالای ژن SAP5 نسبت به ژن PLB1 را در سویه‌های مختلف *کاندیدا* جدا شده از ولوواژینیت را نشان داد که این امر می‌تواند نشان دهنده‌ی اهمیت ژن‌های مرتبط با SAP در عفونت زنان مبتلا به VVC باشد و ممکن است بین بیان این ژن‌ها با مقاومت دارویی ارتباط وجود داشته باشد. بنابراین، پیشنهاد می‌گردد که الگوهای بیان ژن‌های ویرولانس SAP و PLB در ارتباط با مقاومت سویه‌های مختلف *کاندیدا* جدا شده از نمونه‌های مختلف، مورد بررسی قرار گیرد تا بتوان درک بهتری از مشارکت و پاتوژنز سویه‌های *کاندیدا* در طول عفونت *کاندیدیازیس* داشته باشیم.

تشکر و قدردانی

این مطالعه توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین با شناسه ی اختصاصی کمیته ی اخلاق IR.QUMS.REC.1397.147 پشتیبانی گردید. از کلیه‌ی پرسنل محترم بیمارستان که صمیمانه و با صبر و حوصله ما را یاری رساندند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Gonçalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. Vulvovaginal candidiasis: epidemiology, microbiology and risk factors. Crit Rev Microbiol 2016; 42(6): 905-27.
2. Shi Y, Zhu Y, Fan S, Liu X, Liang Y, Shan Y. Molecular identification and antifungal susceptibility profile of yeast from vulvovaginal candidiasis. BMC Infect Dis 2020; 20(1): 287.
3. Hilmioğlu-Polat S, Sharifynia S, Öz Y, Aslan M, Gündoğdu N, Serin A, et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility of Candida parapsilosis sensu stricto isolated from bloodstream infections in Turkish patients. Mycopathologia 2018; 183(4): 701-8.
4. Mohammadi F, Hemmat N, Bajalan Z, Javadi A. Analysis of biofilm-related genes and antifungal susceptibility pattern of vaginal Candida albicans and non-candida albicans species. Biomed Res Int 2021; 2021: 5598907.
5. Miramón P, Lorenz MC. A feast for Candida: Metabolic plasticity confers an edge for virulence. PLoS Pathog 2017; 13(2): e1006144.
6. O'Donnell LE, Robertson D, Ramage G. Candida

virulence factors. In: Rosa EAR, editor. Oral Candidosis. Berlin, Germany: Springer; 2015. p. 7-19.
7. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of Candida albicans. Trends Microbiol 2001; 9(7): 327-35.
8. Rapala-Kozik M, Bochenska O, Zajac D, Karkowska-Kuleta J, Gogol M, Zawrotniak M, et al. Extracellular proteinases of Candida species pathogenic yeasts. Mol Oral Microbiol 2018; 33(2): 113-24.
9. Barman A, Gohain D, Bora U, Tamuli R. Phospholipases play multiple cellular roles including growth, stress tolerance, sexual development, and virulence in fungi. Microbiol Res 2018; 209: 55-69.
10. Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of Candida albicans. Mycoses 2001; 44(9-10): 361-7.
11. Sharma Y, Chumber SK, Kaur M. Studying the prevalence, species distribution, and detection of in vitro production of phospholipase from Candida isolated from cases of invasive candidiasis. J Glob Infect Dis 2017; 9(1): 8-11.
12. Mohammadi F, Hemmat N, Familsatarian B, Maghami-Mehr A. Molecular identification and evaluation of the ability to produce phospholipase and proteinase by aspergillus environmental isolates obtained from hospital. J Isfahan Med Sch 2021; 38(603): 929-35. [In Persian].
13. Mohammadi F, Hashemi SJ, Seyedmousavi SM, Akbarzade D. Isolation and characterization of clinical triazole resistance Aspergillus fumigatus in Iran. Iran J Public Health 2018; 47(7): 994-1000.
14. Javaheri M, Mohammadi F, Chadeganipour M, Nekoian S, Dehghan P. Identification of Candida species in oral cavity of smokers and nonsmokers. J Isfahan Med Sch 2016; 33(362): 2105-10. [In Persian].
15. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of Candida albicans. Mycoses 2005; 48(6): 365-77.
16. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev 2003; 67(3): 400-28.
17. Shirkhani S, Sepahvand A, Mirzaee M, Anbari K. Phospholipase and proteinase activities of Candida spp. isolates from vulvovaginitis in Iran. J Mycol Med 2016; 26(3): 255-60.
18. Seifi Z, Zarei Mahmoudabadi A, Zarrin M. Extracellular enzymes and susceptibility to fluconazole in Candida strains isolated from patients with vaginitis and healthy individuals. Jundishapur J Microbiol 20015; 8(3): e20162.
19. Kumar CPG, Kumar SSJ, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of Candida from immunocompromised patients. Mycopathologia 2006; 161(4): 213-8.
20. Bassyouni RH, Wegdan AA, Abdelmoneim A, Said W, AboElnaga F. Phospholipase and aspartyl proteinase activities of Candida species causing vulvovaginal candidiasis in patients with type 2 diabetes mellitus. J Microbiol Biotechnol 2015; 25(10): 1734-41.
21. Emam SM, Elazm AA, Walid A, Morad A. Exoenzymes production and antifungal susceptibility of Candida species isolated from pregnant women with vulvovaginitis. J Am Sci 2012; 8(12): 1392-9.
22. Chen YT, Lin CY, Tsai PW, Yang CY, Hsieh WP, Lan CY. Rhb1 regulates the expression of secreted aspartic protease 2 through the TOR signaling pathway in Candida albicans. Eukaryotic Cell 2012; 11(2): 168-82.
23. Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglik LL, Greenspan D, et al. Differential expression of Candida albicans secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. J Infect Dis 2003; 188(3): 469-79.
24. Sanglard D, Hube B, Monod M, Odds FC, Gow N. A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of Candida albicans causes attenuated virulence. Infect Immun 1997; 65(9): 3539-46.
25. De Bernardis F, Arancia S, Morelli L, Hube B, Sanglard D, Schäfer W, et al. Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for Candida vaginitis. J Infect Dis 1999; 179(1): 201-8.
26. Mohammed NA, Ajah HA, Abdulbaqi NJ. Detection the prevalence of adhesins and extracellular hydrolytic enzymes genes in Candida albicans biofilm formation. Iraqi J Sci 2017; 58(2): 988-1000.
27. Monroy-Pérez E, Paniagua-Contreras GL, Rodríguez-Purata P, Vaca-Paniagua F, Vázquez-Villaseñor M, Díaz-Velásquez C, et al. High virulence and antifungal resistance in clinical strains of Candida albicans. Can J Infect Dis Med Microbiol 2016; 2016: 5930489.
28. White TC, Agabian N. Candida albicans secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. J Bacteriol 1995; 177(18): 5215-21.
29. Taylor BN, Staib P, Binder A, Biesemeier A, Sehnal M, Röllinghoff M, et al. Profile of Candida albicans-secreted aspartic proteinase elicited during vaginal infection. Infect Immun 2005; 73(3): 1828-35.

DOI: *10.48305/jims.2022.16284*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 40, No. 658, 2nd Week, April 2022**

Received: 06.09.2021 Accepted: 14.12.2021 Published: 03.04.2022

Evaluation of Hydrolytic Enzyme Activity and Determination of SAP5 and PLB1 Genes in *Candida* Isolates of Vaginal Infection

Faezeh Mohammadi[1], Amirreza Geranfar[2], Behnaz Familsatarian[3], Nazanin Amanat[4], Mohammad Reza Javaheri[5], Monirsadat Mirzadeh[6]

Original Article

Abstract

Background: Volvovaginal candidiasis (VVC) is a common fungal infection in women. The production of extracellular enzymes act as virulence factors in the pathogenesis of *Candida* species. The aim of this study was to evaluate the activity of phospholipase, proteinase and to investigate the distribution pattern of Sap5 and PLB1 genes in *Candida* isolates isolated from women with VVC.

Methods: This descriptive cross-sectional study was performed on 135 vaginal swabs of women with suspected VVC. *Candida* species were identified by PCR-RFLP and the activity of hydrolytic enzymes and frequency analysis of SAP5 and PLB1 genes were evaluated.

Findings: The results showed that *C. albicans* has the highest frequency (67%). In total, 80% of the studied isolates have proteolytic activity and 73% have phospholipase activity. Furthermore, the frequencies of PLB1 and SAP5 genes among *Candida* species were reported 95.7% and 91.4%, respectively. Simultaneous presence of SAP5 and PLB1 genes was observed in 87% of the isolates.

Conclusion: The results of present study showed the importance of molecular epidemiological studies and understanding the role of virulence factors associated with extracellular enzymes in the pathogenesis of *Candida* strains.

Keywords: *Candida albicans*; Protease; Phospholipases; SAP5; PLB1

Citation: Mohammadi F, Geranfar A, Familsatarian B, Amanat N, Javaheri MR, Mirzadeh M. **Evaluation of Hydrolytic Enzyme Activity and Determination of SAP5 and PLB1 Genes in *Candida* Isolates of Vaginal Infection.** J Isfahan Med Sch 2022; 40(658): 33-9.

1- Assistant Professor, Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
2- Medical Student, Student Research Committee, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
3- MSc of Immunology, Medical Microbiology Research Center, Qazvin university of Medical Science, Qazvin, Iran
4- Laboratory Science Student, Student Research Committee, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
5- MSc of Medical Mycology, Social Security Organizations, Sanandaj Social Security of Hospital, Sanandaj, Iran
6- Assistant Professor, Metabolic Disease Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
Corresponding Author: Faezeh Mohammadi: Assistant Professor, Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran; Email: esf.mohamadi@gmail.com