DOI: 10.48305/jims.v40.i696.0942

مجله دانشکده پزشکی اصفهان | سال چهلم/شماره‌ی ۶۹۶/هفته‌ی چهارم دی ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۸/۲ | تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۹/۱۹ | تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۱۰/۲۸

ارزیابی توانایی تشکیل بیوفیلم، آنزیم‌های هیدرولیتیک و حساسیت ضد قارچی سلول‌های پلانکتونیک گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف

فائزه محمدی[۱]، نیما همت[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: گونه‌های کاندیدا ارگانیسم‌های مشترک مخاط انسان و حیوان هستند که باعث ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌های کاندیدایی در افراد مستعد می‌شوند. مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی توانایی تولید پروتئیناز، فسفولیپاز و همولیزین و نیز تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های بالینی مختلف *کاندیدا آلبیکنس* انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه، ۹۴ گونه *کاندیدا آلبیکنس* با استفاده از آزمون‌های فنوتیپی و تکثیر ژن پروتئین دیواره‌ی هایف HWP1 (Hyphal wall protein) شناسایی شده و از نظر تولید پروتئیناز، فسفولیپاز و همولیزین در محیط‌های اختصاصی کشت و نیز توانایی تشکیل بیوفیلم با روش کریستال ویوله (Crystal violet) CV ارزیابی شدند. سپس، حساسیت سلول‌های پلانکتونیک به داروهای ضد قارچی فلوکونازول، ایتراکونازول، وریکونازول و آمفوتریسین B بر اساس پروتوکل CLSI-M27-A3/S4 بررسی گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه، فعالیت پروتئینازی، فسفولیپازی و همولیزین ایزوله‌های جمع‌آوری شده به ترتیب۸۲، ۷۵/۵ و ۶۸ درصد بود. علاوه بر این، ۷۴/۵ درصد از ایزوله‌ها، توانایی تشکیل بیوفیلم را دارا بودند. در میان ایزوله‌های مورد مطالعه، سویه‌های جدا شده از حفره‌ی دهان بالاترین فعالیت پروتئیناز، همولیزین و تشکیل بیوفیلم و سویه‌های جدا شده از ترشحات واژن بیشترین میزان فعالیت فسفولیپازی را نشان دادند. در بررسی الگوی حساسیت دارویی، تمام ایزوله‌ها به AMB و VRC حساس بوده و مقاومت به FLC و ITC به ترتیب ۵/۴ و ۲/۲ درصد گزارش گردید.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه، اهمیت مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی و درک نقش آنزیم‌های هیدرولیتیک و تولید بیوفیلم در سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس* را نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: *کاندیدا آلبیکنس*؛ حساسیت به بیماری؛ عوامل ضد قارچی؛ ویرولانس؛ بیوفیلم

ارجاع: محمدی فائزه، همت نیما. **ارزیابی توانایی تشکیل بیوفیلم، آنزیم‌های هیدرولیتیک و حساسیت ضد قارچی سلول‌های پلانکتونیک گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۹۶): ۹۴۹-۹۴۲

مقدمه

کاندیدا آلبیکنس، یک مخمر دوشکلی است که به عنوان فلور نرمال بر روی سطوح مخاطی مختلف اکثر افراد زندگی می‌کند. با این حال، با کاهش سیستم ایمنی افراد، *کاندیدا آلبیکنس* می‌تواند به یک عفونت قارچی احشایی تبدیل شود و از طریق جریان خون به بافت‌های دیگر منتقل گردد. از طرفی، الگوی حساسیت دارویی قارچ ها درحال تغییر است و موارد عدم پاسخ به درمان به دلیل مقاومت به داروهای ضدقارچی نیز گزارش شده است (۱).

عوامل متعددی در تبدیل این ارگانیسم به پاتوژن نقش دارند، از جمله وضعیت سیستم ایمنی میزبان و همچنین فاکتورهای ویرولانس احتمالی مخمر که آن را قادر به ایجاد عفونت و نفوذ به بافت‌های میزبان می‌کند. این فاکتورها شامل توانایی چسبیدن به سطوح، ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند پروتئازها، فسفولیپازها و لیپازها و توانایی نفوذ در بافت‌های میزبان می‌باشد (۲).

آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند ترشح پروتئیناز و فسفولیپاز در اتصال گونه‌های کاندیدا به ویژه در مرحله‌ی هایف به بافت هدف و نیز در فرایند تخریب غشای سلولی میزبان نقش دارند (۳). پروتئازهای آسپارتیل یکی از عوامل مهم ویرولانس در *کاندیدا* می‌باشند که در تهاجم

۱- استادیار قارچ‌شناسی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

۲- مرکز تحقیقات میکروبیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: فائزه محمدی: استادیار قارچ‌شناسی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

Email: esf.mohamadi@gmail.com

بـه بافـت، چسـبندگی و تغییـر فنـوتیپی نقـش دارنـد (٤). همچنـین فسفولیپازهای ترشحی با هیدرولیز کردن یک یا چند اتصـال استر در گلیسروفسفولیپدها باعث تخریب غشاهای سلولی شده کـه در نهایـت سبب اتصال قارچ به بافـت هـدف و انتشـار آن در بافـت مـی‌شـوند. همولیزین ترشحی از انواع کاندیدا، یکی از فاکتورهای ویرولانس مهم کاندیدا می باشد که باعث تسهیل انتقال کاندیدا بین ارگان های مختلف میزبان، سبب تهاجم هایف و نیز با لیز کردن هموگلـوبین، سـبب آزاد شدن هم از هموگلوبین شده و آهن را در اختیار میکروارگانیسم قـرار می‌دهد (٥).

قابلیت تشکیل بیوفیلم، یکـی دیگـر از مشخصـات بیمـاری‌زایـی *کانـدیـدا آلبیکـنس* مـی‌باشـد. بیـوفیلم کمپلکسـی مرکـب از میکروارگانیسم‌هایی اسـت کـه بـه یکـدیگر در روی سـطحی متصـل شده‌انـد. میکروارگانیسـم‌هـای درون بیـوفیلم، توانـایی حفـظ محـیط سطحی و درونی بیـوفیلم در برابـر عوامـل گونـاگون ماننـد pH، اکسـیژن محلول و دیگر عوامل آلی و معدنی مـی‌باشـند (٦). در بیـوفیلم کاندیـدایی اتصال گونه‌های *کاندیدا* به ویژه در مرحله‌ی هایف به بافت هـدف تسـهیل می‌یابد. اگرچه بیشتر آزول ها بـر سـلول هـای پلانکتونیـک (شـناور) تـأثیر می‌گذارند، اما به اندازه‌ی کافی سلول‌های sessile (چسبیده بـه سـطوح) را مهـار نمـی‌کننـد. از آن‌جـایی کـه اشـکال پلانکتونیـک و sessile میکروارگانیسم ها حساسیت های ضـد میکروبـی متفـاوتی دارنـد، بنـابراین استراتژی هـای درمـانی مبتنـی بـر حـداقل غلظـت مهـاری (MIC) نتـایج سلول‌های پلانکتونیک ممکن است شکست بخورند (٧).

هدف از این مطالعه، بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم و آنزیم‌هـای خارج سلولی در گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شـده از نمونـه‌هـای مختلف بالینی و نیز تعیین حساسیت گونه‌ها بـه داروهـای ضـدقارچی در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش‌ها

ایزوله‌های بالینی: در مجموع ٩٤ ایزوله‌ی *کاندیدا آلبیکنس* بـه دسـت آمده از نمونه‌های مشکوک به کاندیـدیازیس ارسـال شـده بـه بخـش قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین مورد بررسی قـرار گرفـت. نمونه‌های بالینی شامل سواب واژینـال ٢٥ (٢٦/٦ درصـد)، نـاخن ١٩ (٢٠/٢ درصد)، سواب دهان ١٨ (١٩ درصد)، خلط ١٧ (١٨ درصد) و ادرار ١٥ (١٦ درصد) بود. تمامی ایزوله‌هـا بـر روی محـیط سـابورود دکسـتروز آگـار کشـت داده شـده و بـه مـدت ٤٨ تـا ٧٢ سـاعت در دمای ٣٠ درجه‌ی سانتی گراد انکوبه شدند. ایزوله‌های جمع‌آوری شـده بر اساس تولید لوله‌ی زایا و تغییر رنگ کلنی بر سـطح محـیط کشـت CHROMagar Candida شناسـایی و در دمـای ٢٠- درجـه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

واکنش PCR-HWP1 در غربالگری اولیـه، قسـمتی از DNAی ریبوزومال (ITS1-5.6S-ITS2) هدف تکثیـر قـرار گرفـت. در ایـن واکـنش از پرایمرهـای رفـت ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCG G-3′) و پرایمـر برگشـت ITS4 (5′-TCCTCC GCT TATTGATATGC-3′) استفاده شـد (٨). مراحل PCR شامل ٥ دقیقه حرارت ٩٥ ،°C ٣٠ سیکل شامل حـرارت ٩٤ درجـه بـه مـدت ٤٥ ثانیـه، حـرارت ٥٥ درجـه بـه مـدت ١ دقیقه، حرارت ٧٢ درجه بـه مـدت ١ دقیقـه و در نهایـت حـرارت ٧٢ درجه به مدت ٧ دقیقه برنامه‌ریزی شد (٩). شناسـایی گونـه‌هـای *C. albicans* Complex بر اساس تکثیر ژن پروتئین دیواره‌ی هایف HWP1 (Hyphal wall protein) بـا اسـتفاده از پرایمـر CR-f: 5’GCTACCACTTCAGAATCATCATC3’ و CR-r: 5’GCACCTTCAGTCGTAGAGACG3’ انجام شـد (١٠). در ابتدا پرمیکس PCR شامل ١٢/٥ میکرولیتر 2X Red PCR mastermix و یـک میکرولیتـر از هـر پرایمـر (١٠ میکرومـولار) در حجـم ٢٣ میکرولیتر تهیه و در نهایت ٢ میکرولیتر DNAی استخراج شده از هر ایزوله به هر تیوب PCR اضافه گردید. سیکل گرمایی به صـورت حـرارت ٩٥ درجـه بـه مـدت ٥ دقیقـه، ٣٥ سـیکل شـامل حـرارت ٩٤ درجه به مدت ٤٥ ثانیه، حرارت ٥٨°C به مدت ٤٠ ثانیه، حـرارت ٧٢ درجه به مدت ٥٥ ثانیه و در نهایت ١٠ دقیقه در حرارت ٧٢ درجه بهینه‌سازی گردید.

تست حساسیت بـه داروهـای ضـد قـارچی: تسـت حساسـیت ضـدقارچی بـرای آمفوتریسـین ب (AMB)، فلوکونـازول (FLC)، ایتراکونازول (ITC) وریکونازول (VRC) بر اساس پروتوکل CLSI-M27-A3/S4 استفاده شد (١١). به این منظور، سوسپانسـیون سـلولی در سرم فیزیولوژی استریل از کلنی خـالص هـر ایزولـه تهیـه گردیـد. غلظت استوک هر دارو در یک حلال مناسب تهیه و بـا RPMI رقیـق شد تا محلول غلظت کاری به دسـت آیـد. رقـت‌هـای سـریالی بـرای AMB، ITC و VRC از ٠/٠١٦ تا ١٦ میکروگرم بر میلی لیتر و بـرای FLC از ٠/٠٦٣ تا ٦٤ میکروگرم بر میلی لیتر، با محـیط RPMI تهیـه شد و به میزان ١٠٠ میکرولیتر از رقت‌هـا بـه چاهـک‌هـای پلیـت ٩٦ خانه‌ای اضافه شد. برای هر سری، کنترل مثبـت (چاهـک بـدون ضـد قارچ) و منفی (چاهک بدون مخمر) در نظر گرفتـه شـد. در مرحلـه‌ی بعد، ١٠٠ میکرولیتر از سوسپانسـیون قـارچی بـه هـر چاهـک اضـافه گردید و بدین ترتیب تعداد سلول‌های مخمری در هر چاهک برابر بـا $2/5\times10^{3}$ CFU/ml شد. پلیت‌ها به مدت ٤٨ ساعت در دمـای ٣٥ °C انکوبه گردیدند. حداقل غلظت مهـاری (MIC) بـه عنـوان کـم‌تـرین غلظت دارو که می تواند رشد قارچ را ٥٠ تا ٩٠ درصد در مقایسـه بـا گـروه شـاهد مثبـت کـاهش دهـد، توصـیف شـد (١٢). از سـویه‌ی

استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* (ATCC10231) به عنوان کنترل نیز استفاده گردید. آزمایشات در غلظت‌های مختلف داروهای ضدقارچی بر اساس روش رقت‌سازی با سه تکرار انجام شد.

ارزیابی تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک: جهت ارزیابی فعالیت آنزیم پروتئیناز از محیط حاوی ۰/۵ درصد Nacl، ۰/۲۵ درصد K2HPO4، ۰/۰۲ درصد MgSO4.7H2O و ۰/۲۵ درصد آلبومین سرم گاوی استفاده شد (۱۳). پس از تلقیح ۱۰µl از سوسپانسیون مخمری (نیم مک فارلند) تهیه شده از هر نمونه، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه به مدت ۵ روز انکوبه گردید. جهت بررسی فعالیت آنزیم فسفولیپاز، ۱۰µl از سوسپانسیون مخمری به محیط کشت حاوی سابورو دکستروز آگار، NaCl (۱۱/۷ گرم)، CaCl2 (۰/۱۱۱ گرم) و ۱۰ درصد زرده تخم‌مرغ و جهت بررسی فعالیت آنزیم همولیزین، سوسپانسیون مخمری به محیط کشت سابورو دکستروز آگار همراه با ۵ درصد خون گوسفندی و ۳ درصد گلوکز تلقیح گردید (۱۳). همه‌ی پلیت‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۳۷ ^{o}C انکوبه شد. با توجه به انجام سه بار تکرار هر آزمون، میانگین قطر کلونی و قطر هاله‌ی اطراف هر کلونی اندازه‌گیری گردید.

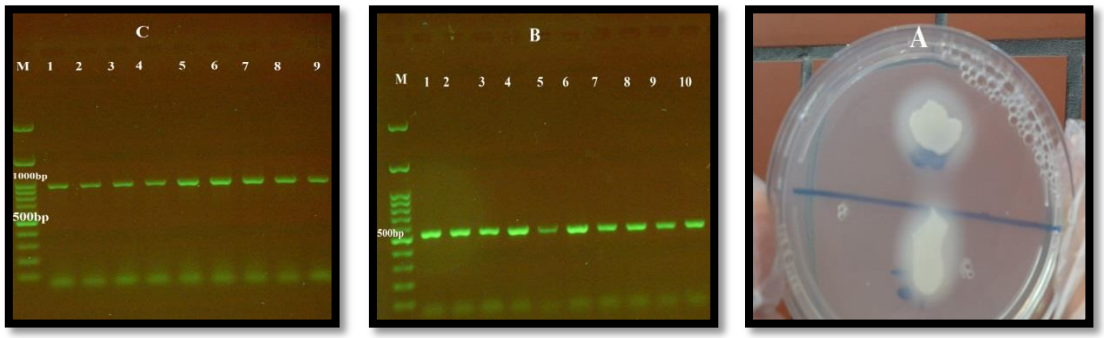
بررسی کمی بیوفیلم با روش کریستال ویوله: سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس* در محیط کشت سابور دکستروز براث در دمای ۳۷ درجه و دور ۱۸۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت رشد نمودند. سپس مایع رویی سلول‌های سانتریفیوژ شده (۵ min، ۱۰/۰۰۰ g) خارج و رسوب با PBS استریل شستشو داده شد. سوسپانسیون سلولی (^{6}۱۰ × ۱) در محیط RPMI-1640 تهیه و به چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای پلی‌استرن ته صاف تلقیح و در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. پس از ۲۴ ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی محیط حذف و ۱۰۰ میکرولیتر RPMI 1640 تازه همراه با ۲ درصد گلوکز اضافه گردید و مجدد انکوبه شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، بیوفیلم‌ها دوبار با PBS استریل شسته شدند تا سلول‌های غیرچسبنده حذف شوند (۱۴).

سپس تمام چاهک‌ها با اتانول ۹۶ درصد به مدت ۱۵ دقیقه فیکس گردید. بعد از آن به مدت ۱۵ دقیقه با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله رنگ شده و پس از شستشو با PBS، آنالیز کمی بیوفیلم با افزودن اسید استیک ۳۳ درصد و خواندن میزان OD آن‌ها در طول موج ۵۹۰ nm توسط دستگاه الایزا ریدر محاسبه شد. جهت انجام صحت آزمون، هر نمونه سه بار تکرار گردید.

میکروسکوپی الکترونی (SEM): در این مطالعه، بیوفیلم بالغ *کاندیدا آلبیکنس* با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. به طور خلاصه، پس از تشکیل بیوفیلم طبق روش بالا، سلول‌ها با گلوتارآلدئید ثابت در ٤ درجه به مدت ٢٤ ساعت انکوبه گردید. در مرحله‌ی بعدی، آبگیری در مجاورت رقت‌های مختلف اتانول ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد انجام شد (۱۵). در نهایت، پلیت جهت تهیه‌ی تصاویر میکروسکوپی با بزرگنمایی و قدرت تفکیک بالا آماده شدند.

یافته‌ها

انجام آزمایش مولکولی HWP-PCR بر روی ایزوله‌های مورد مطالعه نشان داد که تمامی ۹۴ ایزوله متعلق به گونه *کاندیدا آلبیکنس* بود و نتیجه‌ی حاصل شده عدم وجود سویه‌ی *کاندیدا دابلینینسیس* و *کاندیدا افریکانا* بین ایزوله را نشان داد (شکل ۱). در بررسی الگوی حساسیت، تمام گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* (۱۰۰ درصد) به آمفوتریسین B و وریکونازول حساس بودند. در داروی فلوکونازول، ۳ ایزوله جدا شده از واژن (۱۲ درصد) و ۲ ایزوله جدا شده از دهان (۱۱/۲ درصد) مقاوم به فلوکونازول بودند. علاوه بر این، ۲ ایزوله جدا شده از ترشحات واژن (۸ درصد) مقاومت به ایتراکونازول را نشان دادند. حساسیت وابسته به دوز در فلوکونازول و ایتراکونازول به ترتیب در ۲/۲ و ۱ درصد از ایزوله‌ها مشاهده شد. مقادیر MIC50، MIC90 و الگوی حساسیت دارویی در جدول ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. (A) تغییر رنگ کلنی بر سطح محیط کشت کروم آگار کاندیدا، (B) الکتروفورز ژل آگاروز محصولات ITS-PCR: (M)، نشانگر مولکولی 100bp، چاهک ۱۰-۱، باند (537bp) *C.albicans* complex، (C) الکتروفورز ژل آگاروز محصولات HWP-PCR: (M) نشانگر مولکولی 100bp، چاهک ۹-۱، باند اختصاصی (~1000bp) *کاندیدا آلبیکنس*.

جدول ۱. مقادیر MIC50 ، MIC90 و الگوی حساسیت در ۹۴ گونه‌ی *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف (µg/ml)

ضد قارچ	MIC (µg/ml)			الگوی حساسیت		
	MIC50	MIC 90	MIC (range)	حساس	حساس وابسته به دوز	مقاوم
				(٪)	(٪)	(٪)
آمفوتریسین B	۰/۰۶۲	۰/۲۵	۰/۰۳۲ -۲۵	۱۰۰	-	-
فلوکونازول	۰/۵	۲	۰/۰۶۲-۶۴	۹۲/۴	۲/۲	۵/۴
ایتراکونازول	۰/۰۶۲	۰/۱۲۵	۰/۰۳۲-۱	۹۶/۸	۱	۲/۲
وریکونازول	۰/۰۶۲	۰/۱۲۵	۰/۰۳۲-۰/۱۲۵	۱۰۰	-	-

توزیع فعالیت فاکتورهای ویرولانس در ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس* بر اساس نمونه‌های بالینی مختلف در جدول ۲ و شکل ۲ نشان داده شد. در میان ۹۴ ایزوله *کاندیدا آلبیکنس*، میزان فعالیت پروتئیناز، فسفولیپاز و همولیزین به ترتیب در ۷۷ (۸۲ درصد)، ۷۱ (۷۵/۵ درصد) و ٦٤ (٦٨ درصد) ایزوله گزارش گردید. بیشترین میزان فعالیت پروتئیناز در ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از حفره‌ی دهان (۱۰۰ درصد) با میانگین ۰/۱۵ ± ۰/٦۹ گزارش شد. بر اساس آزمون Chi-Square، تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری بین فعالیت پروتئیناز در بین نمونه‌های بالینی مختلف مشاهده گردید (P < ۰/۰۵). بیشترین میزان فعالیت فسفولیپاز در ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از ترشحات واژن (۸٤ درصد) با میانگین ۷۳/۱۸ ± ۰/۱ گزارش شد. تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری بین فعالیت فسفولیپازی در بین نمونه‌های بالینی مختلف مشاهده گردید (P > ۰/۰۵). فعالیت همولیزین نشان داد که ایزوله‌های جدا شده از حفره‌ی دهان بیشترین میزان فعالیت (۸۳/۳ درصد) با میانگین ۰/۱۵ ± ۰/۷۵ را دارا بودند. تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری بین فعالیت همولیزین در بین نمونه‌های بالینی مختلف مشاهده نگردید (P > ۰/۰۵).

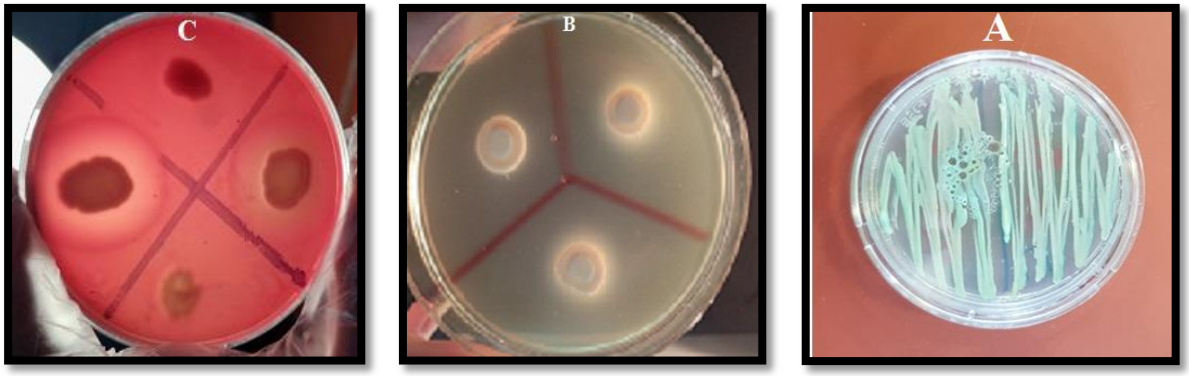
نتایج حاصل از بررسی کمی تشکیل بیوفیلم نشان داد که ۷٤/۵ درصد از ایزوله‌های مورد مطالعه، توانایی تشکیل بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی را دارا بودند به طوری که ۱۸ درصد از سویه‌ها تولیدکننده‌ی قوی بیوفیلم، ۳۹/۵ درصد به عنوان تولیدکننده‌ی متوسط و ۱۵ درصد به عنوان تولید ضعیف در نظر گرفته شدند. بیشترین میزان تولید بیوفیلم مربوط به ایزوله‌های جدا شده از حفره‌ی دهان (۹٤/۵ درصد) با میانگین ۰/۳۲ ± ۰/۵۱ و کم‌ترین میزان تولید، مربوط به ایزوله‌های جدا شده از خلط (٤۷ درصد) با میانگین ۰/۲۵ ± ۰/۲۹ بود. تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری بین تشکیل بیوفیلم در بین نمونه‌های بالینی مختلف مشاهده گردید (P < ۰/۰۵). شبکه‌ی متراکم از هیف و بلاستوکونیدی توسط میکروسکوپ الکترونی در شکل ۳ نشان داده شده است.

بحث

در سال‌های اخیر، به دلیل افزایش نقص سیستم ایمنی در بیماران، قارچ‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب به عفونت‌های تهدیدکننده‌ی زندگی در این بیماران تبدیل شده‌اند. گونه‌های *کاندیدا* قادر به ایجاد بیماری در افراد دارای نقص سیستم ایمنی می‌باشند (۱٦). امروزه مقاومت دارویی تعدادی از عوامل قارچی نسبت به برخی از داروها مانند فلوکونازول نسبت به گذشته افزایش یافته است. در مطالعه‌ی ما، الگوی حساسیت آنتی فونگال گونه های کاندیدا آلبیکنس جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی نشان داد که همه‌ی سویه‌های به AMB وVRC حساس بوده و مقاومت به FLC و ITC به ترتیب ۵/۳ و ۳/۲ درصد بود.

جدول۲. فعالیت آنزیم‌های خارج سلولی و تشکیل بیوفیلم گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف

نمونه‌های بالینی	فاکتورهای ویرولانس			
	پروتئیناز (درصد)	فسفولیپاز (درصد)	همولیزین (درصد)	تشکیل بیوفیلم (درصد)
ترشحات واژن (n = ۲۵)	۲۳ (۹۲)	۲۱ (۸۴)	۱۹ (۷۶)	۲۳ (۹۲)
تراشه‌های ناخن (n = ۱۹)	۱۵ (۷۹)	۱۳ (۶۸/۴)	۱۲ (۶۳/۲)	۱۲ (۶۳/۲)
سواب دهان (n = ۱۸)	۱۸ (۱۰۰) ۸	۱۴ (۷۷/۸)	۱۵ (۸۳/۳)	۱۷ (۹۴/۵)
خلط (n = ۱۷)	۱۰ (۵۸/۸)	۱۳ (۷۶/۵)	۹ (۵۳)	۸ (۴۷)
ادرار (n = ۱۵)	۱۱ (۷۳/۳)	۱۰ (۶۶/۷)	۹ (۶۰)	۱۰ (۶۶/۷)
کل (n = ۹۴)	۷۷ (۸۲)	۷۱ (۷۵/۵)	۶۴ (۶۸)	۷۰ (۷۴/۵)



شکل ۲. ناحیه‌ی شفاف اطراف کلنی برای فعالیت پروتئیناز (A) در سطح محیط کشت سرم آلبومین گاوی، فسفولیپاز (B) بر روی محیط SDA حاوی عصاره‌ی تخم مرغ و همولیزین (C) بر روی SDA حاوی خون گوسفندی

در مطالعه‌ی Kalkanci و همکاران، بر روی ۱۰۳ گونه *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف در ترکیه گزارش نمودند که ٦ درصد از ایزوله‌ها به FLC مقاوم هستند (۱۷).

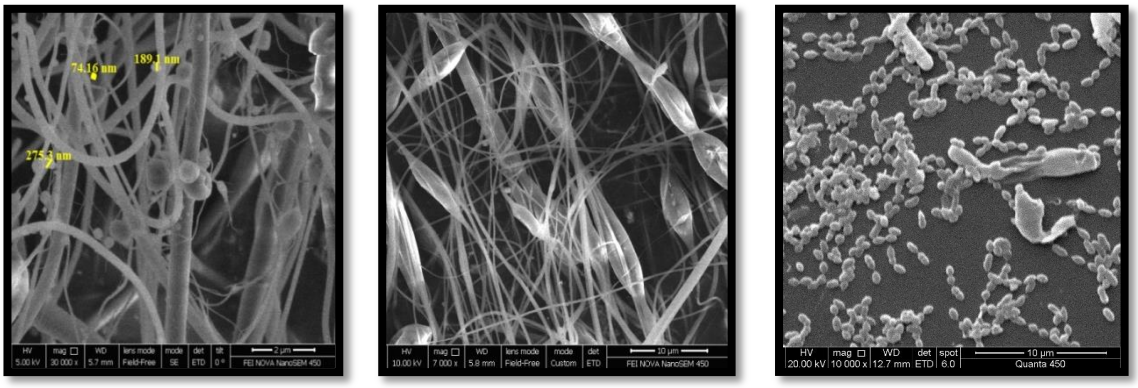
Pahwa و همکاران در هند، مقاومت گونه‌های کاندیدا به AMB، FLC، ITC و VRC را به ترتیب ۲/۹، ۵/۹، ٤/۲ و ۲/۵ درصد گزارش نمودند (۱۸).

در مطالعه‌ی حاضر، بررسی فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک نشان داد که میزان فعالیت پروتئولیتیک سویه‌های بالینی از فعالیت فسفولیپازی و همولیزین بیشتر می‌باشد. تفاوت در ویژگی‌های فاکتورهای ویرولانس در *کاندیدا آلبیکنس* ممکن است به ناحیه‌ی درگیر شده، مرحله‌ی عفونت و وضعیت ایمنی بیماران بستگی داشته باشد. آنزیم پروتئیناز، پروتئین‌های غشای سلول میزبان را هضم می‌کند و باعث تغییراتی در ویژگی‌های سطحی می‌شود که چسبندگی و در نتیجه عفونت را افزایش می‌دهد. چسبندگی مخمر به سلول‌های میزبان، یک فرایند پیچیده و چندعاملی است که یک مکانیسم آن از طریق تولید پروتئیناز می‌باشد (۱۹).

مطالعات نشان دادند که سطح بالای فعالیت پروتئیناز با افزایش سطح سلولی و SAP ترشح شده مرتبط می‌باشد که از نقش پروتئینازها در طول فرایند عفونت پشتیبانی می‌کنند. علاوه بر این، پروتئینازها در فعال‌سازی و حفظ پاسخ التهابی در سطوح اپیتلیال در داخل بدن نقش مهمی دارند (٤). همراستا با نتایج مطالعه‌ی ما، Yenisehirli و همکاران گزارش نمودند، فعالیت پروتئولیتیک (۸۱ درصد) ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف بیشتر از فعالیت فسفولیپازی (۷٦ درصد) می‌باشند (۲۰).

Basu و همکاران، فعالیت پروتئیناز و فسفولیپاز در گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف به ترتیب ٦٦ و ٤۸/۷ درصد گزارش نمودند (۲۱).

در مطالعه‌ی محمدی و همکاران بر روی ۷۰ ایزوله‌ی جدا شده از ترشحات واژن، قدرت تولید پروتئیناز و فسفولیپاز به ترتیب ۸۰ و ۷۳ درصد گزارش گردید (۲۲). در مطالعه‌ی ما، میزان فعالیت همولیزین در بین گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف ٦۸ درصد بود که در بین سایر آنزیم‌های مورد مطالعه، کم‌ترین میزان را نشان داد.



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از ساختار بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* متشکل از شبکه‌ای متراکم از سلول‌های مخمری و هایف در شرایط آزمایشگاهی

در مطالعه‌ی Noori و همکاران بر روی نمونه‌های کاندیدای جدا شده از واژن، نشان دادند که فعالیت آنزیم همولیزین در گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* ۲۲/۷ درصد می‌باشد (۲۳). تفاوت در تعداد ایزوله‌های مورد مطالعه و محل جداسازی گونه‌های *کاندیدا* از دلایل تفاوت در میزان فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک در مطالعات مختلف می‌باشد.

در مطالعه‌ی حاضر، ۷٤/۵ درصد از گونه‌ها توانایی تشکیل بیوفیلم را دارا می‌باشند که بیشترین میزان مربوط به ایزوله‌های جدا شده از حفره‌ی دهان (۹٤ درصد) و ترشحات واژن (۹۲ درصد) بود. بیوفیلم ها جوامع میکروبی هستند که روی سطوح تشکیل شده و در یک ماتریکس خارج سلولی قرار می گیرند. درجه‌ی تشکیل بیوفیلم به گونه و منشأ بالینی بستگی دارد. *کاندیدا آلبیکنس* قادر به تشکیل بیوفیلم‌های مخاطی بیماری‌زا بوده که با تغییر در ایمنی میزبان یا اکولوژی مخاطی برانگیخته می‌شوند (۲٤).

از دلایل ایجاد کلونیزاسیون و تشکیل بیوفیلم در حفره‌ی دهان، می‌توان به شرایط سیستمیک همچون دیابت، استفاده از دندان مصنوعی، خشکی دهان و تغییرات pH اشاره نمود. محصولات گلیکوزیله در محیط دهان باعث افزایش متابولیسم کربوهیدرات ها شده که همین امر باعث افزایش تشکیل بیوفیلم در زمان کمتری می‌شود. تشکیل بیوفیلم حاصل، ممکن است حساسیت این بیماران را به سپتی سمی افزایش دهد(۲۵).

Jose و همکاران در هند نشان دادند که ۵۳/۵ درصد از گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند (۲٦).

Mohamed و Al-Ahmadey در مصر، توانایی تولید بیوفیلم در گونه‌های آلبیکنس جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف را ٤٦ درصد گزارش نمودند (۲۷).

Marak و Dhanashree نشان دادند که ۵۱/۲ درصد از گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از نمونه‌های مختلف، توانایی تشکیل بیوفیلم را نشان دادند (۲۸).

نتیجه‌گیری

آنزیم‌های هیدرولیتیک در اتصال گونه‌های کاندیدا به ویژه در مرحله‌ی هایف به بافت هدف و نیز در فرایند تخریب غشای سلولی میزبان نقش دارند. در مطالعه‌ی حاضر، ایزوله‌های بالینی *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از حفره‌ی دهان دارای بیشترین فعالیت پروتئینازی و همولیزینی و ایزوله های جدا شده از ترشحات واژن دارای بالاترین فعالیت فسفولیپازی و تولید بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی بودند. بنابراین، می‌توان نقش احتمالی این عوامل را در ایجاد بیماری های ناشی از *کاندیدا آلبیکنس* پیشنهاد نمود. با این حال، نقش پاتوژنتیک این فاکتورهای ویرولانس نیاز به مطالعات بالینی بیشتری دارد.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر حاصل از طرح تحقیقاتی (۱٤۰۰۳٦۷۷) با کد اخلاق IR.QUMS.REC.1397.369 مصوب در دانشگاه علوم پزشکی قزوین می‌باشد. از تمام کسانی که صمیمانه و با صبر و حوصله ما را یاری رساندند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Ciurea CN, Kosovski IB, Mare AD, Toma F, Pintea-Simon IA, Man A. Candida and candidiasis-opportunism versus pathogenicity: a review of the virulence traits. Microorganisms 2020; 8(6): 857.
2. Staniszewska M. Virulence factors in Candida species. Curr Protein Pept Sci 2020; 21(3): 313-23.
3. Noumi E, Snoussi M, Hentati H, Mahdouani K, Del Castillo L, Valentin E, et al. Adhesive properties and hydrolytic enzymes of oral Candida albicans strains. Mycopathologia 2010; 169(4): 269-78.
4. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev 2003; 67(3): 400-28.
5. Sachin CD, Ruchi K, Santosh S. In vitro evaluation of proteinase, phospholipase and haemolysin activities of Candida species isolated from clinical specimens. Int J Med Biomed Res 2012; 1(2): 153-7.
6. Renner LD, Weibel DB. Physicochemical regulation of biofilm formation. MRS Bull 2011; 36(5): 347-55.
7. Turan H, Demirbilek M. Biofilm-forming capacity of blood-borne Candida albicans strains and effects of antifungal agents. Rev Argent Microbiol 2018; 50(1): 62-9.
8. Javaheri MR, Mohammadi F, Chadeganipour M, Nekoian S, Dehghan P. Identification of Candida species in oral cavity of smokers and nonsmokers [in Persian]. J Isfahan Med Sch 2016; 33(362): 2105-10.
9. Bitar I, Khalaf RA, Harastani H, Tokajian S. Identification, typing, antifungal resistance profile, and biofilm formation of Candida albicans isolates from Lebanese hospital patients. Bio Med Res Int 2014; 2014: 931372.
10. Romeo O, Criseo G. First molecular method for discriminating between Candida africana, Candida albicans, and Candida dubliniensis by using hwp1 gene. Diagn Microbiol Infect Dis 2008; 62(2): 230-3.
11. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts M27. 3rd ed. Wayne, PA: Clin Lab Stand Inst; 2008.
12. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts M 27-S4, approved standard. Wayne, PA: Clin Lab Stand Ins; 2012.
13. Brilhante RSN, Sales JA, da Silva MLQ, de Oliveira

JS, de Alencar Pereira L, Pereira-Neto WA, et al. Antifungal susceptibility and virulence of Candida parapsilosis species complex: an overview of their pathogenic potential. J Med Microbiol 2018; 67(7): 903-14.
14. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbiol Methods 2008; 72(2): 157-65.
15. 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.
16. Sims CR, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH. Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients. Arch Med Res 2005; 36(6): 660-71.
17. Kalkanci A, Berk E, Aykan B, Caglar K, Hizel K, Arman D, et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of Candida species isolated from hospitalized patients. J Mycol Médicale 2007; 17(1): 16-20.
18. Pahwa N, Kumar R, Nirkhiwale S, Bandi A. Species distribution and drug susceptibility of Candida in clinical isolates from a tertiary care centre at Indore. Indian J Med Microbiol 2014; 32(1): 44-8.
19. Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. Candida albicans proteinases and host/pathogen interactions. Cell Microbiol 2004; 6(10): 915-26.
20. Yenişehirli G, Bulut Y, Tuncoglu E. Phospholipase, proteinase and hemolytic activities of Candida albicans isolates obtained from clinical specimens [in Turkish]. Mikrobiyol Bul 2010; 44(1): 71-7.
21. Basu S, Gugnani HC, Joshi S, Gupta N. Distribution of Candida species in different clinical sources in Delhi, India, and proteinase and phospholipase activity of Candida albicans isolates. Rev Iberoam Micol 2003; 20(4): 137-40.
22. 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 [in Persian]. J Isfahan Med Sch 2022; 40(658): 32-40.
23. Noori M, Dakhili M, Sepahvand A, Davari N. Evaluation of esterase and hemolysin activities of different Candida species isolated from vulvovaginitis cases in Lorestan Province, Iran. Curr Med Mycol 2017; 3(4): 1-5.
24. Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilms of Candida albicans. Curr Opin Microbiol 2011; 14(4): 380-5.
25. Sánchez-Vargas LO, Estrada-Barraza D, Pozos-Guillen AJ, Rivas-Caceres R. Biofilm formation by oral clinical isolates of Candida species. Arch Oral Biol 2013; 58(10): 1318-26.
26. Jose NV, Mudhigeti N, Asir J, Chandrakesan SD. Detection of virulence factors and phenotypic characterization of Candida isolates from clinical specimens. J Curr Res Sci Med 2015; 1(1): 27.
27. Mohamed SA, Al-Ahmadey ZZ. Biofilm formation and antifungal susceptibility of Candida isolates from various clinical specimens. Br Microbiol Res J 2013; 3(4): 590-601.
28. Marak MB, Dhanashree B. Antifungal susceptibility and biofilm production of Candida spp. isolated from clinical samples. Int J Microbiol 2018; 2018: 7495218.

DOI: *10.48305/jims.v40.i696.0942*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 40, No. 696, 4th Week, January 2023**

Received: 24.10.2022 Accepted: 07.12.2022 Published: 18.01.2023

Evaluation of Biofilm Formation, Hydrolytic Eenzymes and Antifungal Susceptibility of Planktonic Cells of *Candida Albicans* Species Isolated from Different Clinical Samples

Faezeh Mohammadi[1], Nima Hemmat[2]

Original Article

Abstract

Background: *Candida* species are common organisms in human and animal mucosa that cause a wide range of *Candida* infections in immunocompromised patients. This study investigated the ability to produce proteinase, phospholipase and hemolysin as well as biofilm formation in different clinical isolates of *Candida albicans*.

Methods: In this study, ninety-four *C. albicans* were identified using phenotypic tests and amplification of the hyphal wall protein (HWP1) gene, and the proteinase, phospholipase and hemolysin production in specific mediums, as well as the ability to biofilm formation using the crystal violet method were evaluated. Then, the antifungal susceptibility of planktonic cells was tested on the basis of the CLSI- M27-A3/S protocol.

Findings: In this study, the proteinase, phospholipase and hemolysin activities of *C.albicans* isolated from different body sites were 82%, 75.5%, and 68%, respectively. Additionally, 74.5% of the isolates had the ability to biofilm formation. Among the isolates being studied, the strains isolated from the oral cavity showed the highest activity of proteinase, hemolysin and biofilm formation, and the strains isolated from vaginal secretions showed the highest level of phospholipase activity. The susceptibility pattern of *C. albicans* species to antifungals showed that all isolates were sensitive to AMB and VRC, and resistance to FLC and ITC was reported as 5.4% and 2.2%, respectively.

Conclusion: The results show the importance of molecular epidemiology studies and understanding the role of hydrolytic enzymes and biofilm production in *C. albicans* strains.

Keywords: *Candida albicans*; Antifungal agents; Disease susceptibility; Virulence; Biofilms

Citation: Mohammadi F, Hemmat N. **Evaluation of Biofilm Formation, Hydrolytic Eenzymes and Antifungal Susceptibility of Planktonic Cells of *Candida Albicans* Species Isolated from Different Clinical Samples.** J Isfahan Med Sch 2023; 40(696): 942-9.

1- Assistant Professor, Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
2- Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Non-Communicable Disease 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