بررسی مولکولی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از عفونت‌های پریودنتال و تأثیر عصاره جلبک سارگاسوم بر بیان ژن بیو فیلم *ALS* با روش Real-Time-PCR

پونه محمودی[۱]- دکتر کیومرث امینی[۲†]- دکتر پرویز امینی[۳]

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان، سیرجان، ایران

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

۳- دانشیار گروه آموزشی پروتزهای دندانی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

Molecular study of Candida albicans isolated from periodontal infections and effect of Sargasum alga extract on biofilm *ALS* gene expression using Real-Time-PCR

Pooneh Mahmoudi[1], Kiumarss Amini[2†], Parviz Amini[3]

1- Master of Microbiology, Department of Microbiology, Sirjan Branch, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Sirjan, Iran

2†- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran (dr_kumarss_amini@yahoo.com)

3- Associate Professor, Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Background and Aims: Candida is an opportunistic pathogen that causes illness in people with a defective or weakened condition. Infectious diseases (periodontal diseases) are inflammatory and malignant inflammation of the dental-gum complex, in which the growth of biofilms caused by Candida glabrata, Parapseilosis and Tropikalis is less than Candida albicans. Brown algae Sargasum is more compatible with human medicines due to having a natural origin than chemical drugs and has less side effects. The aim of the present study was to investigate the molecular characteristics of Candida species isolated from periodontal infections and the effect of Sargassum glaucescens extract on biofilm gene expression using Real-Time-PCR.

Materials and Methods: Oral samples of periodontal infection were collected from the referred patients. To isolate the candidate species, the specimens were cultured on a Sabouraud dextrose agar containing chloramphenicol (SDAc). The extracted DNA was extracted from colonies grown from Kit and Glass pearl. Grown chickens were identified by specific primers by PCR-RFLP method. In order to detect the expression of ALS genes in Candida isolates, RNA extraction was performed using Phenol-Chloroform and Pearl glass, and the CLSI-M27-A2 method was used to evaluate the effect of Sargasum glaucescens extract of algae.

Results: The results showed that the expression of ALS gene in periodontal infection is higher than other genes. Another role is ALS in the formation of Candida albicans biofilm. The minimum inhibitory concentration of fungal growth was 256 µg/ml by algae extract. Sargasum glaucescens reduced the expression of ALS gene expression by about 62% in the sample.

Conclusion: Sargasum glaucescens algae possesses specific pharmacological properties and antimicrobial and antimicrobial effects. The results of the study using Real Time PCR showed that expression of ALS gene in isolated studied with Sargasum algae extract was lower than untreated isolates. Thus, this indicated the positive role of treatment by sargasum glaucescens extract in reducing the expression of biofilm gene in isolates.

Key Words: Candida albicans, Biofilm, Sargassum glaucescens, Real time PCR

Journal of Dental Medicine-Tehran University of Medical Sciences 2019;32(1):11-21

† مؤلف مسؤول: ساوه- دانشگاه آزاد اسلامی تهران- دانشکده علوم پایه- گروه آموزشی میکروبیولوژی

تلفن: ۴۲۴۳۳۳۳۴۲ نشانی الکترونیک: dr_kumarss_amini@yahoo.com

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-26]

چکیده

زمینه و هدف: کاندیدا، پاتوژن فرصت طلبی است که در افراد با سیستم نقص ایمنی و تضعیف شده ایجاد بیماری می‌کند. بیماری‌های پریودنتال، حالت التهابی و مخرب کمپلکس دندانی- لثه‌ای است که رشد بیوفیلم ناشی از گونه‌های کاندیدا گلابراتا، پاراپسیلوزیس و تروپیکالیس نسبت به کاندیدا آلبیکنس در آن کمتر است. جلبک قهوه‌ای سارگاسوم به علت داشتن منشاء طبیعی نسبت به داروهای شیمیایی سازگاری بیشتری با انسان دارد و عوارض جانبی کمتری ایجاد می‌کند. هدف مطالعه حاضر بررسی مولکولی گونه‌های کاندیدا جدا شده از عفونت‌های پریودنتال و تأثیر عصاره جلبک قهوه‌ای Sargassum glaucescens بر بیان ژن تشکیل دهنده بیوفیلم با روش Real-Time-PCR بود.

روش بررسی: نمونه‌های دهانی عفونت پریودنتال از بیماران مراجعه کننده جمع آوری شد. جهت ایزولاسیون گونه‌های کاندیدا از نمونه‌ها روی محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (SDAc) کشت شد. از کلنی‌های رشد یافته با روش کیت و پرل شیشه‌ای استخراج DNA انجام شد. کلنی‌های رشد یافته با پرایمرهای اختصاصی به روش PCR-RFLP شناسایی گردید. به منظور شناسایی بیان ژن‌های ALS در ایزوله‌های کاندیدا استخراج RNA با روش فنل- کلروفرم و پرل شیشه‌ای و برای ارزیابی تأثیر عصاره سارگاسوم گلسیسنس از دستورالعمل CLSI-M27-A2 استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان داد که میزان بیان ژن ALS در عفونت پریودنتال در سنین مختلف نسبت به سایر ژن‌ها بیشتر است. نقش دیگر ALS در تشکیل بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس است. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد قارچ توسط عصاره جلبک ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر بود. سارگاسوم گلوسنس حدود ۶۲٪ بیان ژن ALS را در نمونه‌های مورد بررسی کاهش داد.

نتیجه‌گیری: سارگاسوم گلوسنس دارای ویژگی‌های خاص فارماکولوژیک و اثرات ضد قارچی و ضد میکروبی قابل توجهی است. بررسی نتایج با روش Real Time PCR نشان داد که بیان ژن ALS در ایزوله‌های تحت مطالعه تیمار شده با عصاره جلبک سارگاسوم نسبت به ایزوله‌های تیمار نشده پایین‌تر بوده و نشان دهنده نقش مثبت عصاره در کاهش بیان ژن مولد بیوفیلم در ایزوله‌ها بود.

کلید واژه‌ها: کاندیدا آلبیکنس، بیوفیلم، سارگاسوم گلوسنس، Real time PCR

وصول:۹۷/۰۵/۱۰ اصلاح نهایی: ۹۸/۰۱/۱۹ تأیید چاپ: ۹۸/۰۱/۲۵

مقدمه

پریودنتال یک عفونت باکتریایی است که بافت لثه را آلوده، قرمز، متورم و استخوان اطراف لثه را از بین می‌برد و می‌تواند یک دندان یا چندین دندان را تحت تأثیر قرار دهد. بیماری پریودنتال مجموعه‌ای از شرایط التهابی است که استخوان‌های پیرامونی دندان‌ها در فک و بافت نرم حفاظتی را که به استحکام دندان در جای خود کمک می‌کنند را تحت تأثیر قرار می‌دهند. شواهد اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد شروع بیماری پریودنتال چند عاملی است. بیماری پریودنتال از باکتری‌های جمع شده متصل به دندان شروع شده و افزایش یافته که بیوفیلمی به اسم پلاک دندان را شکل می‌دهند. اگر این پلاک‌ها در دهان بماند، بافت لثه مجاور ممکن است ملتهب شده و در نتیجه ورم لثه، یک نوع بیماری زودرس لثه ایجاد نماید (۱).

کاندیدا مخمر شایع در بیماری‌های قارچی فرصت طلب در سراسر دنیا می‌باشد و به فراوانی روی سطح پوست و غشاهای مخاطی کلونیزه می‌شود. کاندیدا فلور نرمال پوست و دهان، واژن و مخاط دستگاه گوارش انسان بوده و به همان میزان که پاتوژن است فرصت طلب نیز می‌باشد و در طبیعت به ویژه روی برگ گیاهان، آب و خاک یافت می‌شود. بسیاری از گونه‌های کاندیدا می توانند عامل بیماری باشند، ولی در اکثریت موارد، ارگانیسم جداشده از موارد بالینی از نوع آلبیکنس است (۲).

کاندیدا آلبیکنس و دیگر گونه‌های کاندیدا میکروارگانیسم‌های ساپروفیت بوده که در شرایط طبیعی، تعداد آن‌ها مانند دیگر میکروارگانیسم‌ها، توسط شرایط حاکم بر محیط مقادیر IgA و حرکات دودی روده کنترل شده و بیماری‌زایی چندانی برای میزبان خود ندارند. دلایلی همچون تغییر شرایط محیطی و یا تضعیف سیستم ایمنی میزبان تعداد این میکروارگانیسم‌ها را افزایش می‌دهد و در این حالت به بافت‌ها حمله‌ور گشته و ایجاد بیماری می‌کنند. در واقع بیماری در اثر تغییراتی در شرایط میکروارگانیسم، میزبان یا هر دو روی می‌دهد. شایع‌ترین عامل مستعد کننده مرتبط با میزبان، مصرف طولانی مدت آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف و دیابت می‌باشد (۳).

سلول‌های مخمری کاندیدا آلبیکنس دارای دو آنزیم با فعالیت ضد یکدیگر به نام‌های فسفولیپاز A و لیزوفسفولیپاز هستند. آنزیم فسفولیپاز A کاندیدا را در تهاجم یاری می‌دهد و لیزوفسفولیپاز خود مخمر را از اثر تخریبی آنزیم اول محافظت می‌کند. این آنزیم نقش مهمی در نفوذ میسلیوم‌های کاذب و حقیقی ارگانیسم به داخل مخاط ایفا می‌نماید (۴،۵).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-26]

آنزیم‌های فوق دارای نقش مهاری در گونه‌های آلبیکنس بوده که اثر آن عمدتاً برروی لنفوسیت‌های Th1 است و بیشتر در ارتباط با فعالیت سیستم ایمنی میزبان می‌باشد. تأثیر ایمونوساپرسیو کاندیدا آلبیکنس در مدل‌های آزمایشگاهی دیده شده که به ویژه در ارتباط با مانان است (۶).

بیشتر گونه‌های مخمری کاندیدا قادر به تشکیل بیوفیلم می‌باشند اما کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا سودوترپیکالیس، و کاندیدا گلابراتا اساساً تمایل کمتری به تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح در مقایسه با کاندیدا آلبیکنس دارند (۷). بیش از ۳۰۰ ژن مسئول خصوصیات بیوفیلم‌های تشکیل شده در شرایط متفاوت رشد هستند. ژن Gcn4p تنظیم کننده کلیدی بیوسنتز اسید آمینه بوده و برای تشکیل بیوفیلم ضروری است (۸). تفاوت گسترش بیوفیلم و بیان ژن‌ها درموتانت‌های وحشی و نوع هایفی رشد یافته بدلیل فقدان فاکتور رونویسی efg1p و cph1p می‌باشد (۹).

با از بین رفتن ژن bcr1 از تشکیل بیوفیلم جلوگیری می‌شود و این ژن مانع از بیان انواع ژن‌های هایفی و ژن‌های اتصال دهنده سلول‌ها می‌شود. با حذف bcr1 گسترش هایفی متوقف نشده در حالی که توسعه بیوفیلم متوقف می‌شود. تشکیل هایف برای توسعه بیوفیلم لازم بوده اما کافی نیست. از این رو عامل کلیدی در تشکیل بیوفیلم قارچی بیان دقیق ژن bcr1 می‌باشد (۱۰). با حذف ژن‌های nup85، mds3، kem1 و suv3 در موتانت بیوفیلم‌ها، تشکیل بیوفیلم در مراحل اولیه متوقف شده ولی با حضور kem1 گسترش بیوفیلم در مراحل میانی متوقف می‌شود. پروتئین شوک حرارتی hsp70، پیرووات دهیدروژناز، اینوزیتول، فسفات سنتتاز، انولاز و اینوزین ۵ مونوفسفات دهیدروژناز پروتئین‌های تنظیم کننده بیوفیلم هستند (۱۳-۴،۱۱). اعضای خانوادهٔ ژنی (ALS) sequence agglutinin like رمز کننده گلیکوپروتئین سطحی سلول می‌باشند. میزان بیان ژن‌های این خانواده در هنگام رشد بیوفیلم به طور چشم گیری افزایش می یابد و نقش مهم این ژن‌ها در تشکیل بیوفیلم به اثبات رسیده است. ژن‌های مؤثر در تشکیل بیوفیلم، ژن ALS بیوفیلم در مخمر کاندیدا آلبیکنس است (۱۴). ژن‌هایی که در تشکیل بیوفیلم نقش دارند: ALS1, ALS2, ALS3, ALS4, ALS5, ALS7, och1, pga1, pga10, pmt1, ALS9, csa1, eap1, fks1, hwp1 pmt2, pmt4, pmt6, rbt1, rbt5, sun41 و hwp2 می‌باشد (۱۵).

امروزه جلبک‌ها و عصاره‌های گیاهی تأثیر بسیار خوبی بر کاهش بیان ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک در باکتری‌ها و قارچ‌ها دارند (۱۶). یکی از عناصر فعال جلبک قهوه‌ای رده سارگاسوم می‌باشد. جلبک‌ها به واسطه داشتن طیف وسیعی از ترکیبات زیستی فعال به عنوان یک منبع بالقوه دارویی جدید مورد توجه ویژه هستند. این داروها به علت داشتن منشاء طبیعی نسبت به داروهای شیمیایی دارای سازگاری بیشتری با ارگانیسم‌های زنده از جمله بدن انسان بوده و عوارض جانبی کمتری ایجاد می‌کنند (۱۷). جلبک دریایی سارگاسوم (Sargassum) یک جنس از گروه جلبک‌های قهوه‌ای و از دسته بندی ماکروالگا است که در راسته فوکالس قرار دارد. توزیع آن در قسمت‌های گرمسیری و معتدل اقیانوس‌ها در جهان بوده و معمولاً به صورت توده‌های شناور در نزدیکی خواستگاه خود، به ساحل می‌آیند. خواستگاه آن‌ها بیشتر بر روی مرجان‌ها و صخره‌ها در دریاهای مناطق گرمسیری می‌باشد (۱۸).

آب‌های جنوبی کشور بستر مناسبی برای زیست بسیاری از آبزیان می‌باشد، خواص زیستی بسیاری در جلبک‌های دریایی دیده شده و از آنجاکه در ایران مطالعاتی روی خواص زیست فعال جلبک دریایی Sargassum glaucescens، این منبع ارزشمند انجام نگرفته است، مطالعات متعدد زیست فناوری در این زمینه ضروری می‌باشد. از دیر زمان، گیاهان دارویی در زندگی بشر کاربردهای زیادی داشته‌اند و تحقیق و پژوهش در مورد تأثیر جلبک‌ها بر روی قارچ‌ها دارای اهمیت است (۱۹). انواع ارگانیسم‌های دریایی، از جمله جلبک‌ها، منابع غنی از متابولیت‌های فعال بیولوژیک هستند که انواع متابولیت‌های آن‌ها می‌توانند خواص دارویی داشته باشند (۲۰). هدف از انجام این مطالعه شناسایی مولکولی گونه‌های کاندیدای جدا شده از عفونت‌های پریودنتال و تأثیر عصاره جلبک قهوه‌ای Sargassum glaucescens بر روی بیان ژن‌های تشکیل دهنده بیوفیلم ALS2 و ALS9 در جدایه‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس در عوامل اتیولوژیک مبتلا به پریودنتیت با روش Real-Time-PCR بود.

روش بررسی

نوع مطالعه و جمع آوری نمونه: این تحقیق مطالعه‌ای مقطعی بود که به روش توصیفی تحلیلی طراحی و اجرا گردید. میانگین سنی افراد تحت مطالعه مبتلا به پریودنتال ۵/۳±۲۹ بود (انجام نمونه برداری با رضایت کتبی و حفظ محرمانگی اطلاعات بیماران صورت گرفت). در

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-26]

این تحقیق تعداد ۱۰۰ نمونه پریودنتال از افراد مراجعه کننده به درمانگاه بیمارستان شریعتی (کرمان) توسط دندانپزشک متخصص با سوآپ استریل نمونه برداری انجام و در ظرف استریل درپوش دار مخصوص در شرایط استریل در لوله استریل محتوی سرم فیزیولوژی و حاوی کلرامفنیکل قرار گرفت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جمع آوری شد تا به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل گردید.

جمع آوری جلبک سارگاسوم: نمونه‌های جلبک قهوه‌ای دریایی Sargassum glaucescens از منطقه جزر و مددی آب‌های چابهار که به دلیل دارا بودن سواحل صخره‌ای با شیب کم دارای وسعت بیشتری است در طی ماه‌های آبان تا آذر ماه جمع آوری شد. نمونه‌ها پس از جمع آوری سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه ابتدا چند بار با آب دریا و سپس با آب شیرین به خوبی شسته شدند تا از نمک، شن، ماسه و سایر موارد تمیز شوند، سپس سمت قسمت‌های پوسیده و نکروز شده از بدنه جلبک جداسازی و جلبک‌ها به مدت ۱۰ روز (۲۴۰ساعت) روی پارچه تمیز و استریل در سایه و دمای اتاق خشک شدند. پس از اتمام خشک شدن توسط آسیاب برقی به صورت پودر در آمد (۲۱).

عصاره گیری از جلبک سارگاسوم: به منظور جلوگیری از تغییر در ساختار شیمیایی مواد مؤثر موجود در جلبک قرمز تهیه شده بلافاصله پس از جمع آوری تحت شرایط مناسب و دور از نور و رطوبت خشک شد. برای تهیه عصاره در دو ارلن مقدار ۵۰ گرم از جلبک خشک شده با ۲۰۰ میلی لیتر اتر دوپترول (پترولیوم) و دی اتیل اتر مخلوط گردید. محتویات ارلن به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد و فعالیت عصاره گیری از مایع صاف شده توسط دستگاه روتاری در دمای ۵۰ درجه سیلسیوس و تحت شرایط خلاء صورت گرفت. به طور مشابهی عصاره هیدروالکلی نیز طی فرآیند سوکسله و با استفاده از اتانول ۸۰٪ و دی اتیل اتر به دست آمد (۲۱).

کشت برای جداسازی کاندیدا: برای کشت و جداسازی کاندیدا در عفونت‌های جلدی- مخاطی سابرو دکستروزآگار (SDA) محیط رایج بوده ولی برخی گونه‌های کاندیدا مثل کروزه‌ای، تروپیکالیس و پاراپسیلوزیس قادر به رشد روی این محیط (SCC) نیستند. برای جلوگیری از آلودگی میکروبی یا قارچ‌های ساپروفیت، به نمونه‌ها آنتی بیوتیک کلرامفنیکل، جنتامایسین یا تتراسایکلین و سیکلوهگزامید اضافه شد. از آنجایی که بعضی گونه‌های کاندیدا به سیکلوهگزامید حساس هستند، نمونه‌ها در محیط فاقد سیکلوهگزامید هم کشت شدند (۲۲).

تشخیص آزمایشگاهی کاندیداها: جمعیت تشخیص آزمایشگاهی انواع نمونه‌های جلدی- مخاطی از آزمایش مستقیم نمونه و مشاهده حضور عناصر قارچی و جداسازی قارچ از کشت جهت شناسایی استفاده شد. کروم آگار کاندیدا محیط کشت جدید، انتخابی و دقیق بوده که برای جدا سازی، تشخیص مستقیم و طبقه بندی گونه‌های کلینیکی مهم کاندیدا به کار برده شد. اساس تشخیص، کشت مخمر روی محیط کروم آگار و انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت و با تولید کلنی‌های رنگی مختلف قابل مشاهده بود (۲۴-۲۲).

تست جرم تیوب: یکی از ابتدایی‌ترین روش‌های تشخیصی کاندیدا آلبیکنس است که وجود یا فقدان لوله زایا را در زیر میکروسکوپ قابل بررسی نشان می‌دهد (۲۵،۲۶). جهت ایزوله سازی گونه‌های کاندیدا از عفونت پریودنتال، از نمونه‌ها بر روی محیط سابوروی دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (SDAc) کشت داده شدند.

از کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط کشت مذکور با روش کیت استخراج شرکت پیشگامان ژن، استخراج DNA انجام شد. بعد از مدت ۷۲ ساعت انکوباسیون کلنی‌های رشد یافته با استفاده از پرایمر مخصوص ژن مورد بررسی و با روش PCR شناسایی شدند. برای بررسی نتایج حاصل از PCR، از الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید استفاده شد (۲). به منظور شناسایی بیان ژن‌های ALS در ایزوله‌های کاندیدا استخراج RNA با استفاده از کیت اختصاصی آن انجام شد. برای ارزیابی تأثیر عصاره جلبک قهوه‌ای سارگاسوم گلسیسنس از دستورالعمل CLSI-M27-A2 استفاده شد (۲۷).

تعیین MIC عصاره گیاهی سارگاسوم: برای حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره گیاه سارگاسوم در روش MIC بر اساس دستور العمل مذکور به روش رقیق سازی و در میکروپلیت و با ۳ بار تکرار انجام گرفت، عصاره در غلظت‌های ۶۲/۵ تا ۴۰۰۰ به داخل چاهک‌ها ریخته شده و با محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) تا حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شدند. به همه چاهک‌ها با مقدار ۵۰ میکرولیتر از کشت میکروبی سویه‌های تشکیل دهنده بیوفیلم با غلظت نیم مک فارلند اضافه شد. مقدار MIC به عنوان کمترین غلظت مهار کننده رشد قارچ

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-26]

محسوب شد. از کشت کلنی‌های مواجه شده کاندیدا در برابر عصاره جلبک قهوه‌ای عمل استخراج RNA انجام و میزان بیان ژن با روش Real-Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت (۲۸).

بررسی فنوتیپی اثرات ضد بیوفیلمی عصاره گیاه سارگاسوم: به منظور مطالعه کمی اثرات ضد بیوفیلمی عصاره گیاه از روش میکروتیتروپلیت استفاده شد. بدین منظور یک کشت ۲۴ ساعته از هر جدایه تهیه شد که کدورت آن در حدود نیم مک فارلند بود. از این سوسپانسیون در هر یک از چاهک‌های ۱۰۰ میکرومتر از هر سوسپانسیون کاندیدایی اضافه شد و به دنبال آن ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های subMIC عصاره اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محلول رویی چاهک‌ها خارج شده و هر چاهک ۳ مرتبه با سرم فیزیولوژی شسته شد. سپس کاندیداهای متصل به دیواره با ۲۵۰ میکرولیتر از اتانول ۹۶٪ تثبیت شدند. بعد از خشک کردن پلیت‌ها، سنجش کمی بیوفیلم بوسیله اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳٪ به هر چاهک صورت گرفت و جذب آن در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه Elisa Reader خوانده شد (۲۹). محاسبه حجم نمونه با توجه به مطالعات قبلی انجام شده با ضریب اطمینان ۹۵ درصدی و سطح خطای ۰/۰۴ انجام گرفت.

رسوب گیری و استخراج DNA: برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA شرکت سیناکلون با نام CAT NO: PR881612 CinnaPure-DNA, 50 Preps ۸۸۱۶۱۲ استفاده شد. برای طراحی پرایمرها لازم است توالی دو انتهای قطعه‌ای که بایستی تکثیر شود مشخص باشد. پرایمرهای مورد نظر جهت انجام این آزمایش برای تشخیص ژن بیوفیلم ALS در ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس در جدول ۱ نشان داده شده است. همچنین از سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس (ATCC14053) به عنوان کنترل مثبت به کار رفت.

تعیین میزان بیان ژن ALS با روش Real-Time PCR: استخراج RNA: برای این منظور از RNA کلی برای واکنش‌های تکثیر پرایمر استفاده شد. برای استخراج RNA از میکروکیت RNeasy (شرکت Qiagen) استفاده شد. سوسپانسیون مخمری که در فاز لگاریتمی رشد قرار دارند (در OD600= ۰/۴-۰/۶) مورد استفاده قرار گرفت. برای حذف DNA ژنومی از کیت DNase (Qiagen) استفاده شد.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز Real-Time-PCR: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت به صورت زیر انجام شد: ۱۰ میکرولیتر از Prime Qmaster mix (2x) with syber green، ۵ میکرولیتر از Depc water، یک میکرولیتر از پرایمر فوروارد، یک میکرولیتر از پرایمر ریورس و ۲ میکرولیتر از cDNA استفاده شد. تکثیر قطعه‌های موردنظر در دستگاه ABI pluse با برنامه دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، تکثیر شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن خانگی بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد. برای محاسبه میزان بیان ژنی و رسم نمودارهای مربوطه از نرم افزار مشخص و مقدار بیان ژن هدف محاسبه شد. آنالیز میزان بیان با اندازه گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با سویه استاندارد انجام شد.

آنالیز محصولات Real Time PCR: نرم افزارهای مختلفی برای بررسی اختلاف بین بیان ژن نمونه و مرجع وجود دارد از جمله Light Cycler Quantification Software، Q-Gene است. در صورتی که تعداد نمونه‌ها زیاد باشد (تا ۱۰۰ نمونه) می‌توان از نرم افزارهای REST و REST-XL استفاده کرد. در برنامه Q-Gene که یک برنامه مقایسه‌ای Excel است، پردازش ورودی‌ها، آنالیز داده‌ها و رسم نمودارها انجام شد. نتایج به دست آمده از نسخه نوزدهم نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری chi square و دقیق فیشر آنالیز گردید. Q-Gene چندین برنامه آماری دارد و نرمالایزکردن بیان ژن را انجام می‌دهد.

جدول ۱- شناسایی بیان ژن ALS در گونه‌های کاندیدا (۲۸)

Primer name	Sequence 5′ → 3′	PCR product size (bp)	Accession number
ALS 1-R	ACCAGAAGAAACAGCAGGTG	۳۱۸	L۲۵۹۰۲
ALS 2-F	GACTAGTGAACCAACAAATACCAG	۳۱۸	L۲۵۹۰۲

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-26]

یافته‌ها

عفونت‌های ایجاد شده توسط انواع گونه‌های کاندیدیایی، را می‌توان شایع‌ترین عفونت‌های قارچی نام برد. از ۱۰۰ نمونه تحت بررسی ۶۰ نمونه (۶۰٪) از نظر وجود کاندیدا آلبیکنس مثبت شناسایی شدند. این ۶۰ ایزوله از نظر وجود جرم تیوب، تولید کلامیدیوسپور مثبت بودند و در محیط کروم آگار کاندیدا کلنی به رنگ سبز روشن مشاهده شد.

تعیین نتایج MIC: نتایج اثردهی رقت‌های مختلف عصاره جلبک سارگاسوم بر سوسپانسیون مخمری با غلظت $۱/۵ \times ۱۰^{۳}$ سلول در میلی‌لیتر مطابق با استاندارد قارچ شناسی (۲۸،۲۹) پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و با کشت مجدد روی محیط سابورو دکستروز آگار بررسی و نتیجه ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.

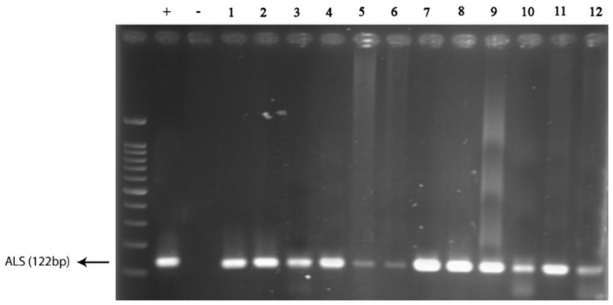
نتایج آنالیز مولکولی: پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، محصول Real-Time-PCR بر روی ژل الکتروفورز مشاهده باندهای ۱۲۲ bp برای ناحیه ژنی ALS بود. از ۶۰ ایزوله کاندیدا آلبیکنس ۵۴ ایزوله واجد ژن ALS بودند (شکل ۱).

نتایج آنالیز Real-time PCR: آنالیز نشان داد که بهترین دمای منحنی ذوب (Melting curve)، ۸۶/۷۹ درجه سانتی‌گراد بود (نمودار ۱). نتایج Real Time PCR نشان داد که بیان ژن ALS در ایزوله‌های تحت مطالعه تیمار شد نسبت به ایزوله‌های تیمار نشده پایین‌تر بوده است که نشان دهنده نقش مثبت تیمار در کاهش بیان ژن ALS در ایزوله‌ها بوده است (نمودار ۲). بر اساس داده‌های موجود در جدول ۲ مشاهده شدکه سارگاسوم گلوسنس عامل اصلی در کاهش حدود ۶۲٪ بیان این ژن در نمونه‌های مورد بررسی بوده است.

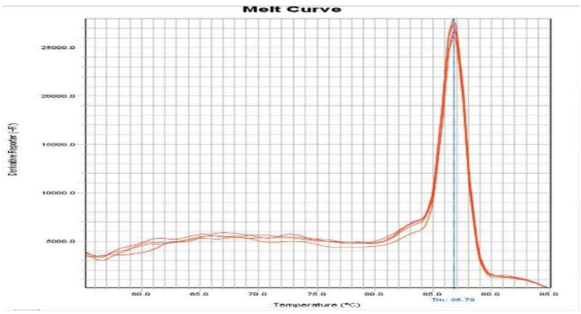
بحث و نتیجه‌گیری

عفونت‌های ایجاد شده توسط انواع گونه‌های کاندیدیایی، شایع‌ترین عفونت‌های قارچی در میان افراد دریافت کننده پیوند اعضا می‌باشد. این بیماری در قسمت‌های مختلف بدن از جمله، پوست، ناخن، دهان، دستگاه تناسلی و ارگان‌های دیگر بدن ایجاد می گردد. کاندیدیازیس متنوع‌ترین بیماری قارچی است (۳۰).

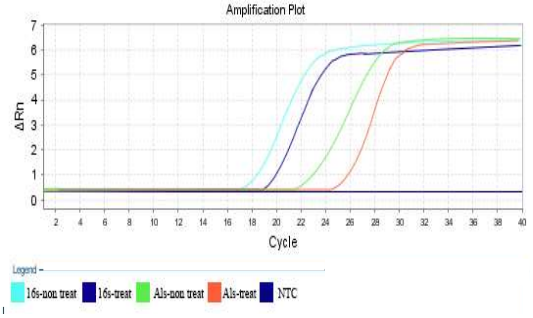
Haghighi و همکاران (۳۱) در سال (۱۳۹۰) به ارزیابی اثر کاتچین بر تشکیل بیوفیلم قارچی سویه‌های استاندارد حساس و مقاوم کاندیدا آلبیکنس پرداختند. حداقل غلظت مهارکنندگی ۵۰ از کاتچین، ۵/۷۷ میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت مهارکنندگی ۹۰، ۸/۳۳ میکروگرم در میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی آن ۹/۴۷ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. غلظت مهارکنندگی بیوفیلم کاتچین و فلوکونازول برای سویه حساس به فلوکونازول به ترتیب؛ ۱۹/۳۵ و ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر و همچنین برای سویه مقاوم به فلوکونازول به ترتیب؛ ۲۳/۵۳ و ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در این بررسی که در محیط قارچی صورت گرفت و نتیجه حاصل که در این تحقیق ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.



شکل ۱- ژل الکتروفورز محصول آزمون PCRاز چپ به راست: Ladder 100bp– کنترل مثبت (کاندیدا آلبکنس حاوی ژن مورد نظر)- کنترل منفی (آب مقطر)- آغازگر اختصاصی ALS (۱۲۲ bp)



نمودار ۱- نمودار ۱- منحنی ذوب در جریان آزمایش



نمودار ۲- نتایج منحنی تکثیر Real Time PCR

Ct - 16s –Non = 18.01, Ct – 16s – Treat = 19.2, Ct –A1s – Non = 22.71, Ct – A1s – Treat = 5.3

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-26]

جدول ۲- مقادیر حاصل از تست Real Time PCR

△Ct Value (Experimental)	△Ct Value (control)	Delta Delta Ct Value	Expression Fold Change
△CTE	△CTC	△△Ct	2 ^-△△Ct
6.10	4.70	1.40	0.378929142

Knockdown 62.10708584

Heidari و همکاران (۳۲) در سال (۱۳۹۴)، به مطالعه اثرات ضدباکتریایی و ضداکسیدانی عصاره سه گونه جلبک سبز، قرمز و قهوه‌ای سواحل شمالی خلیج فارس پرداختند. عصاره‌های اتانولی به‌روش خیساندن از سه گونه جلبکی سبز، قرمز و قهوه‌ای در سواحل شمالی خلیج فارس و استان بوشهر تهیه گردید. گونه‌های جلبکی مورد بررسی اثر ضداکسیدانی بسیار خوبی نسبت به فعالیت ضدباکتریایی از خود نشان دادند. به نحوی که بالاترین فعالیت ضد اکسیدانی را جلبک قهوه‌ای C.Trinodis نشان داد. در این بررسی که در محیط قارچی صورت گرفت، نتیجه حاصل از تحقیق ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی کاندیدا آلبیکنس به دست آمد.

Pakdel و همکاران (۳۳) در سال (۲۰۱۴) به شناسایی دو ژن ALS1 و hwp1 در ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از عفونت واژینال پرداختند. استخراج DNA به روش فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل انجام شده و سپس Multiplex PCR با پرایمرهای اختصاصی انجام شد. نتایج حاصل حضور دو ژن ALS1 و hwp1 را به ترتیب با فراوانی ۵۷٪ و ۲۸٪ در جدایه‌های مورد مطالعه نشان داد. نتایج آن‌ها دلالت بر این دارد که ٪۵۰ از جدایه‌های واجد ژن ALS1 دارای ژن hwp1نیز می‌باشند. نتایج حاصل از این مطالعه بر روی ژل الکتروفورز بیانگر وجود باندهای قابل مشاهده bp ۱۲۲ در ناحیه ژنی ALS بوده که از ۶۰ ایزوله کاندیدا آلبیکنس ۵۴ ایزوله واجد ژن ALS بودند.

Nailis و همکاران (۳۴) در سال (۲۰۱۰) به شناسایی ژن فاکتورهای ویرولانس بیوفیلم بالقوه در کاندیدا آلبیکنس با روش Real-Time-PCR پرداختند. بیان ژن‌های بیوفیلم مربوط به wp1، ALS، sap، plb و lip در کاندیدا آلبیکانس مشاهده شد. ALS1-5 در تمام ایزوله‌های مورد بررسی بیان بیشتری داشت در حالی که کم‌ترین بیان ژن مربوط به ALS9 بود. که با نتایج حاصل از این مطالعه بر روی ژل الکتروفورز که بیانگر وجود باندهای قابل مشاهده bp ۱۲۲ در ناحیه ژنی ALS بوده از ۶۰ ایزوله کاندیدا آلبیکنس ۵۴ ایزوله واجد ژن ALS بودند در یک راستا است.

Bruder-Nascimento و همکاران (۳۵) در سال (۲۰۱۴) به شناسایی بیوفیلم گونه کاندیدا و تعیین پلی مورفیسم ALS3 در ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس پرداختند. گونه‌های مختلف کاندیدا از نمونه‌های خون، ادرار، ترشحات وولوواژینال و مایع دیالیز صفاقی جدا شدند. تولید بیوفیلم در ۳۲۷ کاندیدا بررسی شد. از ۱۹۸ کل ایزوله کاندیدا با بیوفیلم مثبت، ۷۲ و ۱۲۶ سویه تشکیل بیوفیلم به صورت پایین و بالا در نظر گرفته شد. تولید بیوفیلم توسط کاندیدا آلبیکانس به طور قابل توجهی پایین‌تر از ایزوله غیر آلبیکانس بود. نتیجه حاصل در این تحقیق ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی کاندیدا آلبیکنس به دست آمد.

Barros و همکاران (۳۶) در سال (۲۰۱۶) به بررسی تأثیر کاندیدا کروزئی و کاندیدا گلابراتا بر بیان ژن بیوفیلم درکاندیدا آلبیکنس شرایط آزمایشگاهی پرداختند. ژن‌های مطالعه شامل ALS1، ALS3، hwp1، bcr1، efg1، tec1، sap5، plb2 و lip9 بود که در حضور کاندیدا کروزئی، بیان ژن‌های ALS3، hwp1، bcr1، efg1 و tec1 کاندیدا آلبیکانس به طور کامل مهار شد که نشان دهنده تفاوت در رونوشت و تضاد فنوتیپی موجود بین این دو گونه است، اما ژن‌های مربوط به ترشح آنزیم‌های تحریک افزایش یافته بود. در حضور کاندیدا گلابراتا، کاندیدا آلبیکانس نشان داد یک پروفایل بیان ژن مشابه که به دست آمده در ارتباط با کاندیدا کروزئی، هر چند دامنه تغییرات میزانش کمتر بود. نتیجه حاصل در این تحقیق ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی کاندیدا آلبیکنس به دست آمد.

Li و همکاران (۳۷) (۲۰۱۴) به ارزیابی بیان ژن‌های بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس در برابر تروستیلبن در شرایط in-vitro و in-vivo پرداختند. ژن‌های بیوفیلم تحت بررسی در این مطالعه شامل ce1، ALS3، hwp1، hgc1 و ras1 بودند که میزان بیان ژن توسط روش Real-Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت. تروستیلبن (PTE) یک phytoalexin-stilbene مشتق شده که از منابع مختلف گیاهی طبیعی است. تروستیلبن در شرایط in-vitro و in-vivo بر روی تشکیل بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس اثر مهاری بالقوه ای را نشان داد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-26]

Bhaigyabathi و همکاران (۳۸) (۲۰۱۱) فعالیت‌های فیتوشیمیایی و آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف جلبک Sargassum muticum را بررسی نموده و با بررسی‌های فیتوشیمیایی توانستند ترکیباتی از قبیل آلکالوئیدها، کربوهیدرات‌ها، تانن‌ها، فنول، استروئیدها، فلاونوئیدها و ساپونین‌ها را شناسایی نموده و دریافتند که در میان عصاره‌های مختلف، عصاره‌های متانولی بیشترین اثرات آنتی اکسیدانی را از خود نشان داده است.

در مطالعه‌ای کـه Mahmoudi و همکاران (۳۹) و Adesigi و همکاران (۴۰) در سـال ۱۹۹۱ بـه منظـور ارزیـابی اثـر تـنفس دهـانی بـر سـلامت پریودنتـال دویست و چهل کودک ۱۴-۱۰ سـاله انجـام دادنـد، شـاخص لثه‌ای و پلاک در نمونـه‌های دارای تـنفس دهـانی بیـشتر از افراد دارای تنفس طبیعی گزارش شد. Asadi و همکـاران (۴۱) در سـال ۱۹۹۸ در بررسـی سـلامت پریودنتال کودکان نشان دادند افراد با تنفس دهـانی، التهاب لثه و پلاک زیادی داشته که ایـن عـوارض بیـشتر در نواحی قدامی فک بالا مشهود بوده است. همچنین میـزان التهاب لثه در نواحی خلفی نسبت به نواحی قدامی کمتر بوده اسـت. عـلاوه بـر آن در مطالعـه دیگـری، یـک مـورد Hyperplasia لثه ای شدید مرتبط با تنفس دهانی در فک بـالا و پایین یک پسر ۱۳ساله گزارش شد.

در برخی مطالعات Bhardwaj و Angayarkanni (۴۲) می‌توان علت این تنوع در شیوع را، تفاوت در شرایط اقلیمی، شرایط جغرافیایی، ویژگی‌های فرهنگی، میزان رعایت بهداشت، تفاوت در میزان شیوع عفونت‌های غیر قارچی، شیوه‌های آزمایش و ملاک‌های نمونه برداری، عنوان کرد. در این مطالعه براساس نتایج کشت و یا آزمایش مستقیم ۶۰ نفر آلوده به عفونت پریودنتال بودند (۴۶-۴۲).

در این تحقیق حاضر و مطالعه Adesigi و همکاران (۴۰) به طور کلی تنها یک مورد کشت منفی بود که می‌تواند تأکیدی بر ارجحیت روش کشت در تشخیص بیماری باشد. در مطالعه Zhao و همکاران (۴۷) سال ۲۰۰۵ نشان داد که حذف ژن‌های ALS2 و ALS4 باعث کاهش
شکل گیری فرم جرم تیوب و کاهش قدرت اتصال کاندیدا آلبیکنس به سلول‌های اندوتلیال عروقی می‌شود. نتیجه حاصل در این تحقیق ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی کاندیدا آلبیکنس به دست آمد.

در مطالعه Green و همکاران (۴۸) در سال ۲۰۰۴ در مدل حیوانی رت که از جدایه بیماران ایدزی برای ایجاد کاندیدیازیس دهانی استفاده شد با گذشت ۳ و ۵ روز پس از ایجاد عفونت با انجام آزمون RT-PCR حضور ژن‌های ALS1, 2, 3, 4 بارز بود. در حالیکه حضور ژن‌های ALS5, 9 در روز پنجم مشاهده شد. در سال ۲۰۰۸ NAS و همکاران (۴۹) مطالعاتی را در زمینه بیان ژن‌های hwp1، ALS1 و sap4 در سویه‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از نمونه‌های واژینیت کاندیدیایی با روش RT-PCR انجام دادند. افزایش بیان ALS9 در ساکارومایسس سرویسیه سبب اتصال به لامینین می‌شود پس حذف آن باعث کاهش قدرت اتصالی کاندیدا آلبیکنس نسبت به سلول‌های اندوتلیال می‌شود اما نسبت به سلول‌های مخاطی تغییری ندارد (۵۰). نتایج حاصل از این مطالعه بر روی ژل الکتروفورز بیانگر وجود باندهای قابل مشاهده ۱۲۲ bp در ناحیه ژنی ALS بوده که از ۶۰ ایزوله کاندیدا آلبیکنس ۵۴ ایزوله واجد ژن ALS بودند که اهمیت بررسی در این مورد را تأیید می‌کند.

نقش دیگر برای پروتئین‌های ALS در زمینه تشکیل بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس است. اجزای اتصالی در زمینه تشکیل بیوفیلم مهم است و اشاره به این دارد که پروتئین‌های ALS ممکن است در این جریان نقش داشته باشد. با توجه به نقش ژن‌های ALS در اتصال و چسبندگی به سلول‌های میزبان، همچنین ارتباط بیان ژن‌های ALS2 و ALS9 را در ابتلا به پریودنتیت به خوبی بیان کرده است. نتایج حاصل از مطالعه Rahimi و همکاران (۵۱) 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 ژن‌های ALS2 و ALS9 را بیان نمودند.

می‌توان چنین اظهار داشت که حضور مشترک هر دو ژن در ۳۶/۳۶٪ ایزوله‌ها در ایجاد هم افزایی این ژن‌ها در تقویت عملکرد یکدیگر نقش دارد. طبق مطالعات Inci و همکاران (۵۲) در سال ۲۰۱۲ فراوانی ژن ALS1 در جدایه‌های بیماران مبتلا به عفونت واژینال ۴۸٪ گزارش شده است. نتایج مطالعه نشان داد که میزان بیان ژن ALS در زنان در سنین باروری نسبت به دو ژن دیگر بیشتر بوده است. در اتصال کاندیدا به بافت میزبان ژن‌هایی مانند hwp1، ALS، hyr و sap نقش بارزی دارند. بیان آن‌ها موجب تشکیل پروتئین‌های اتصال یابنده به فیبرونکتین و لامینین

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-26]

می‌شود. به دنبال اتصال آن قدرت اتصال به سلول‌های اندوتلیال و مخاطی افزایش می‌یابد. پروتئین‌های ALS از عوامل شناخته شده است که در تشکیل بیوفیلم و اتصال دارای نقش مهمی است. ژن‌های ALS کاندیدا آلبیکنس روی کروموزوم‌های مختلف وجود دارند که در این میان ژن‌های ALS2, ALS9 روی کروموزوم ۶ کاندیدا آلبیکنس قرار دارند (۵۳).

طبق مطالعات صورت گرفته موتاسیون در ژن ALS1 منجر به نقص در تشکیل بیوفیلم می‌شود. از طرف دیگر تحقیقات گروه Nailis و همکاران (۵۴) در سال ۲۰۰۹ نشان می‌دهد که حضور ژن ALS1 در تشکیل بیوفیلم کاندیدیایی ضروری نمی باشد. طبق مطالعات گروه Inci، ۱۸٪ ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت واژینال واجد ژن ALS1 دارای ژن hwp1 می‌باشند (۵۲).

سارگاسوم گلوسنس دارای ویژگی‌های فارماکولوژیک خاصی است، اثرات ضد قارچی و ضد میکروبی قابل توجهی دارد. مطالعه حاضر با روش Real Time PCR نشان داد که بیان ژن ALS در ایزوله‌های تحت مطالعه تیمار شده با عصاره گیاه سارگاسوم نسبت به ایزوله‌های تیمار نشده پایین‌تر بوده است و نشان دهنده نقش مثبت تیمار در کاهش بیان ژن مولد بیوفیلم در ایزوله‌ها است. ژن ALS در ایجاد بیوفیلم از طریق اتصال گونه‌های کاندیدا به بافت میزبان و سطوح مخاطی دهان نقش مهمی ایفا می‌کند، سارگاسوم با تأثیر بر سطح بافت‌های سلولی میزبان مانع از این اتصال و باعث کاهش بیان این ژن می شود. از آنجایی که در مطالعه حاضر حضور این ژن‌ها در ایزوله‌های مورد بررسی به اثبات رسیده است، بنابراین نقش آن‌ها در ایجاد بیماری با مکانیسم‌های مختلف که مهم ترین آن‌ها ایجاد بیوفیلم می‌باشد به اثبات رسید. نتایج مطالعه حاضر با روش Real Time PCR نشان داد که بیان ژن ALS در ایزوله‌های تحت مطالعه تیمار شده نسبت به ایزوله‌های تیمار نشده پایین‌تر بوده است که نشان دهنده نقش مثبت تیمار در کاهش بیان ژن ALS در ایزوله‌ها می‌باشد. این میزان بیان ژن‌ها در جدایه‌های بالینی می‌تواند بیانگر ایفای نقش این ژن‌ها در ارتقاء چسبندگی و تشکیل بیوفیلم در قارچ کاندیدا آلبیکنس باشد، چرا که تمامی نمونه‌هایی که بیان ژن‌ها در آن‌ها مثبت بوده در ایجاد پریودنتیت علامت دار در بیماران تحت بررسی نقش داشتند.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد میکروبیولوژی با کد ۱۳۹۵۴۲۶۳۱ استخراج شده است. بدین وسیله از آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد و کارشناسان میکروب شناسی به ویژه آقای مهندس مجید صادقپور و کلیه عزیزانی که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند قدردانی و تشکر می‌گردد.

منابع:

1- Armitage GC. The complete periodontal examination. Periodontology 2000. 2004;34(1):22-33.

2- Nikoomanesh F, Roudbarmohammadi S, Roudbary M, Bayat M, Heidari G. Investigation of bcr1 Gene Expression in Candida albicans Isolates by RT-PCR Technique and its Impact on Biofilm Formation. Infect Epidemiol Med. 2016;2(1):22-4.

3- Odds FC. Pathogenesis of Candida infections. J Am Acad Dermatol. 1994;31(3):S2-S5.

4- Hoyer LL. The ALS gene family of Candida albicans. Trends in microbiol. 2001;9(4):176-80.

5- Hube B. Candida albicans secreted aspartyl proteinases. Curr Top Med Mycol. 1996;7(1):55-69.

6- Lin L, Ibrahim AS, Xu X, Farber JM, Avanesian V, Baquir B, et al. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against Staphylococcus aureus and Candida albicans infection in mice. PLoS Pathol. 2009;5(12):e1000703.

7- García-Sánchez S, Aubert S, Iraqui I, Janbon G, Ghigo J-M, d'Enfert C. Candida albicans biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. Eukaryotic cell. 2004;3(2):536-45.

8- Martchenko M, Levitin A, Whiteway M. Transcriptional activation domains of the Candida albicans Gcn4p and Gal4p homologs. Eukaryotic cell. 2007;6(2):291-301.

9- Giusani AD, Vinces M, Kumamoto CA. Invasive filamentous growth of Candida albicans is promoted by Czf1p-dependent relief of Efg1p-mediated repression. Genetics. 2002;160(4):1749-53.

10- Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, Smith Jr FJ, Yue F, Phan Q-T, et al. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in C. albicans biofilm formation in vitro and in vivo. PLoS Pathog. 2006;2(7):e63.

11- Klotz SA, Gaur NK, De Armond R, Sheppard D, Khardori N, Edwards Jr JE, et al. Candida albicans als proteins mediate aggregation with bacteria and yeasts. Med Mycol. 2007;45(4):363-70.

12- Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Phan QT, Fu Y, Ibrahim AS, et al. Functional and structural diversity in the als protein family of Candida albicans. J Biol Chem. 2004;279(29):30480-9.

13- Hoyer LL, Payne TL, Bell M, Myers AM, Scherer S.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-26]

Candida albicans ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. Curr Genet. 1998;33(6):451-9.

14- Chaffin WL. Candida albicans cell wall proteins. Mol Microbiol Biology Reviews. 2008;72(3):495-544.

15- Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of Candida albicans biofilm development. Nature Rev Microbiol. 2011;9(2):109-18.

16- Ho C-L, Phang S-M, Pang T. Molecular characterisation of Sargassum polycystum and S. siliquosum (Phaeophyta) by polymerase chain reaction (PCR) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers. J Appl Phycol. 1995;7(1):33-41.

17- Mosaddegh M, Gharanjik B, Naghibi F, Esmaeili S, Pirani A, Eslami Tehrani B, et al. A survey of cytotoxic effects of some marine algae in the Chabahar coast of Oman Sea. Research J Pharmacogn. 2014;1(1):27-31.

18- Adl A, Shojaee NS, Motamedifar M. A comparison between the antimicrobial effects of triple antibiotic paste and calcium hydroxide against Entrococcus faecalis. Iran Endod J. 2012;7(3):149.

19- Naddafi K, Nabizadeh R, Saeedi R, Mahvi AH, Vaezi F, Yaghmaeian K, et al. Biosorption of lead (II) and cadmium (II) by protonated Sargassum glaucescens biomass in a continuous packed bed column. J Hazard Mater. 2007;147(3):785-91.

20- Peymani J, Gharaei A, Ghaffari M, Taheri A. Antibacterial activity of the brown algae (Sargassum glaucescens) ethanolic and aqueous extracts from Chabahar coasts, Oman Sea, Iran. ISFJ. 2014;22(4):13-20.

21- Amirsharifi M, Jamili S, Larijani K, Mashinchian Moradi A, Amini K. Investigation of antibacterial and antifungal activities of the extract marine algae Sargassum glaucescens. Iranian Scientific Fisheries J. 2016;25(3):113-20.

22- Yera H, Sendid B, Francois N, Camus D, Poulain D. Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001;20(12):864-70.

23- Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. Direct isolation of Candida spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar Candida. J Clin Microbiol. 2003;41(6):2629-32.

24- Willinger B, Manafi M. Evaluation of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for Candida species. Mycoses. 1999;42(1-2):61-5.

25- Jones J. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. Clin Microbiol Rev. 1990;3(1):32-45.

26- Cuenca-Estrella M, Verweij P, Arendrup M, Arikan-Akdagli S, Bille J, Donnelly J, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: diagnostic procedures. Clin Microbiol Infect. 2012;18(s7):9-18.

27- Rodriguez-Tudela JL, Donnelly JP, Pfaller MA, Chryssantou E, Warn P, Denning DW, et al. Statistical analyses of correlation between fluconazole MICs for Candida spp. assessed by standard methods set forth by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (E. Dis. 7.1) and CLSI (M27-A2). J Clin Microbiol. 2007;45(1):109-11.

28- Roudbarmohammadi S, Roudbary M, Bakhshi B, Katiraee F, Mohammadi R, Falahati M. ALS1 and ALS3 gene expression and biofilm formation in Candida albicans isolated from vulvovaginal candidiasis. Adv Biomed Res. 2016;5.

29- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Resistance of planktonic and biofilm-grown Burkholderia cepacia complex isolates to the transition metal gallium. J Antimicrob Chemother. 2008;61(5):1062-5.

30- Brooks G, Carroll KC, Butel J, Morse S. Medical Microbiology, (Jawetz, Melnick, Adelberg's Medical Microbiology). 2013;197-213.

31- Haghighi F, Roudbar Mohammadi S, Farhadi Z. The Effect of Catechin on Fungal Biofilm Formation of Standard Susceptible and Resistant Strains of Candida albicans. Armaghane danesh. 2011;16(4):332-40.

32- Heidari M, Zolgharnine H, Sakhaei N, Mirzaei A, movahedinia A. Antibacterial and Anti-oxidant activity of three species of green, brown and red algae from Northern coast of Persian Gulf. ISMJ. 2015;18(2):383-92.

33- Pakdel M, Mahbobe Z, Asgarani EM, Parisa Roudbary, Maryam Usefi. Identification of als1 and hwp1 Genes in Candida albicans Isolated Vaginal Infection. Genetics in the 3rd Millennium. 2014;12(1):3378-85.

34- 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):1.

35- Bruder-Nascimento A, Camargo CH, Mondelli AL, Sugizaki MF, Sadatsune T, Bagagli E. Candida species biofilm and Candida albicans ALS3 polymorphisms in clinical isolates. Braz J Microbiol. 2014;45(4):1371-7.

36- Barros PP, Ribeiro FC, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AOC. Influence of Candida krusei and Candida glabrata on Candida albicans gene expression in in vitro biofilms. Archives of oral biol. 2016;64:92-101.

37- Li DD, Zhao LX, Mylonakis E, Hu GH, Zou Y, Huang TK, et al. In vitro and in vivo activities of pterostilbene against Candida albicans biofilms. Antimicrob agents and Chemother. 2014;58(4):2344-55.

38- Bhaigyabathi T, Kirthika T, Shiny K, Usha K. Phytochemical screening and antioxidant activity of various extracts of Sargassum muticum. IJPRD. 2011;3(10):25-30.

39- Mahmoudi Rad M, Zafarghandi AS, Amel Zabihi M, Tavallaee M, Mirdamadi Y. Identification of Candida species associated with vulvovaginal candidiasis by multiplex PCR. Infect Dis Obstet Gynecol. 2012;2012.

40- Adesiji Y, Ndukwe N, Okanlawon B. Isolation and antifungal sensitivity to Candida isolates in young females. Open Medicine. 2011;6(2):172-6.

41- Asadi A, Rasti S, Arbaby M. Prevalence of Candida vaginitis. Fayze J Med Sci. 1997;1:21-7.

42- Bhardwaj S, Angayarkanni J. Streptokinase production from Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis SK-6 in the presence of surfactants, growth factors and trace elements. 3 Biotech. 2015;5(2):187-93.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-26]

43- Zia MA, Shahid M, Abdullah S. Improved streptokinase production; uv irradiation of streptococcus equisimilis. Professional Med J. 2015;22(5).

44- 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):607-10.

45- Sobel JD, Brooker D, Stein GE, Thomason JL, Wermeling DP, Bradley B, et al. Single oral dose fluconazole compared with conventional clotrimazole topical therapy of Candida vaginitis. Am J Obstet Gynecol. 1995;172(4):1263-8.

46- Shanmugasamy M, Velayutham T, Rajeswar J. Inv A gene specific PCR for detection of Salmonella from broilers. 2011.

47- Zhao X, Oh SH, Yeater K, Hoyer L. Analysis of the Candida albicans Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family. Microbiol. 2005;151(5):1619-30.

48- Green CB, Marretta SM, Cheng G, Faddoul FF, Ehrhart E, Hoyer LL. RT–PCR analysis of Candida albicans ALS gene expression in a hyposalivatory rat model of oral candidiasis and in HIV-positive human patients. Med Mycol. 2006;44(2):103-11.

49- Nas T, Kalkanci A, Fidan I, Hizel K, Bolat S, Yolbakan S, et al. Expression of ALS1, HWP1 and SAP4 genes in Candida albicans strains isolated from women with vaginitis. Folia Microbiol (Praha). 2008;53(2):179-83.

50- Hoyer LL, Green CB, Oh S-H, Zhao X. Discovering the secrets of the Candida albicans agglutinin-like sequence (ALS) gene family–a sticky pursuit. Med Mycol. 2008;46(1):1-15.

51- Rahimi H, Roudbarmohammadi S, Kachouei R, Roudbari M. Expression of Candida albicans ALS 2 and ALS 9 Genes Isolated from Women with Vaginal Candidiasis by RT-PCR. Pathobiol Research. 2013;16(2):39-49.

52- Inci M, Atalay MA, Özer B, Evirgen Ö ,Duran N, Koç AN, et al. Investigations of ALS1 and HWP1 genes in clinical isolates of Candida albicans. Turk J Med Sci. 2013;43(1):125-30.

53- Zhao X, Oh SH, Cheng G, Green CB, Nuessen JA, Yeater K, et al. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a Candida albicans adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. Microbiol. 2004;150(7):2415-28.

54- Nailis H, Vandenbroucke R, Tilleman K, Deforce D, Nelis H, Coenye T. Monitoring ALS1 and ALS3 gene expression during in vitro Candida albicans biofilm formation under continuous flow conditions. Mycopathologia. 2009;167(1):9.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-26]