Short Communication

Investigation of ERG11 Gene Mutations in Fluconazole Resistant *Candida albicans* Isolated from a Number of Rasht Hospitals

Azadeh Dokht Eftekhari[1], Masumeh Anvari[2*], Najmeh Ranji[3]

1- M.Sc. Student, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
2- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Rasht Branch of Islamic Azad University, Rasht, Iran
3- Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Sciences, Rasht Branch of Islamic Azad University, Rasht, Iran

**Corresponding Address: P.O.Box: 41335-3516, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Rasht Branch of Islamic Azad University, Rasht, Iran*
Email: anvari@iaurasht.ac.ir

Received: 26/Feb/2015, Accepted: 06/Oct/2015

Abstract

Objective: Azole antifungal drugs have been a treatment option for *Candida albicans* infections. However, azole resistance can occur through different mechanisms such as alterations in ERG11 (lanosterol 14α-demethylase). This study assesses ERG11 gene mutations in *Candida albicans* strains isolated from patients with *Candidia* volvovaginitis in a number of Rasht hospitals between 2012-2014 by direct PCR and sequencing.

Methods: We identified the yeast strains by standard identification methods, such as germ tubes. Drug sensitivity was determined as MIC 90 values by the macrodilution broth method based on the CLSI protocol. We screened the resistant strains prior to DNA extraction and ERG11 gene mutations were confirmed by PCR sequencing.

Results: From 40 strains, 4 showed high levels of resistance to fluconazole. Of these, two species had a MIC 90 of 512µg/ml and the other two species had a MIC 90 of 1024 µg/ml. Three strains had D116E and V456G polymorphisms.

Conclusion: The most fluconazole resistant Candida albicans strains worldwide were reported. Our results suggested a correlation between the polymorphism and fluconazole resistance in the *Candida albicans* strains.

Keywords: *Candida albicans*, Fluconazole, ERG11

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No.3, Pages: 97-107

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-27]

مقاله کوتاه

بررسی جهش‌های ژن ERG11 در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول جدا شده از مراکز بالینی شهر رشت

آزاده دخت افتخاری[1]، معصومه انوری[2*]، نجمه رنجی[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
۲- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، رشت، ایران
۳- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، رشت، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، رشت، صندوق پستی: ۳۵۱۶ -۴۱۳۳۵، پل تالشان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه میکروبیولوژی
Email: anvari@iaurasht.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۳/۱۲/۰۷ پذیرش مقاله: ۹۴/۰۷/۱۴

چکیده

هدف: داروهای ضد قارچی از خانواده آزول یک روش انتخابی درمان عفونت‌های کاندیدا است. با این حال مقاومت به آزول‌ها از طریق مکانیسم‌های متفاوتی چون تغییر در ژن ERG11 (لانوسترول ۱٤-آلفا ارگسترول) می‌تواند رخ دهد. هدف از این مطالعه، بررسی جهش‌های ژن ERG11 در سویه‌های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول جدا شده ازبیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی (بین سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۲ از برخی مراکز بالینی شهر رشت)، به روش PCR و توالی‌یابی بود.

مواد و روش‌ها: گونه‌های مخمری جدا شده از بیماران با استفاده از روش‌های استاندارد از قبیل آزمون لوله زایا تعیین هویت شدند. حساسیت دارویی بر اساس روش مرجع CLSI مقادیر MIC_{90} جدایه‌ها اندازه‌گیری و حساسیت آن‌ها تعیین شد. سپس جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول غربالگری و بعد از استخراج DNA به روش PCR- توالی‌یابی مورد تجزیه و تحلیل از نظر وجود جهش در ژن ERG11 قرار گرفتند.

نتایج: از بین ٤۰ جدایه کاندیدا آلبیکنس، چهار جدایه مقاوم به فلوکونازول، با میزان مقاومت بسیار بالا شناسایی شد (دو گونه دارای MIC90 ۵۱۲ میکروگرم/ میلی‌لیتر و دو گونه دارای MIC90 ۱۰۲٤ میکروگرم/ میلی‌لیتر). در سه جدایه پلی‌مورفیسم D116E و V456G در ژن Erg11 مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر برای اولین بار در دنیا سطح مقاومت کاندیدا آلبیکنس به فلوکونازول در حد بسیار بالا در ٤ جدایه گزارش می‌شود. همچنین به‌نظر می‌رسد بین جهش‌های D116E و V456G و ایجاد مقاومت به فلوکونازول در این جدایه‌ها ارتباط وجود داشته باشد.

کلیدواژگان: کاندیدا آلبیکنس، فلوکونازول، Erg11

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۴، صفحات: ۹۷-۱۰۹

مقدمه

کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) شایع‌ترین عامل عفونت‌های قارچی است و بیماری‌های ناشی از آن در همه نقاط جهان شیوع دارد. برخلاف سایر گونه‌های کاندیدا، گونه آلبیکنس دو شکلی است و از فرم مخمری به شکل هیف تبدیل

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-27]

می‌شود. این پدیده در واکنش‌های مخمر با میزبان اهمیت فراوانی دارد [۱]. هیف عامل پیش روی تهاجم قارچ به سلول‌های مخاطی [۲] و مقاومت در برابر فاگوسیتوز است. فلوکونازول در درمان اشکال جلدی، مخاطی و سیستمیک کاندیدیازیس (Candidiasis) و آمفوتریسین B (Amphotericin B) در درمان عفونت کاندیدیازیس جلدی و مخاطی کاربرد دارد. قبل از ورود فلوکونازول (Fluconazole) و ایتراکونازول (Itraconazole) به بازار دارویی، کتوکونازول (Ketoconazole) داروی انتخابی در درمان کاندیدیازیس مزمن جلدی مخاطی و یک درمان جایگزین مؤثر کاندیدیازیس واژنی (Vaginal candidiasis) بود. داروهایی که بر ضد کاندیداها در بازار دارویی وجود دارد از نظر تعداد محدود است و مصرف بیش از حد این تعداد کم ممکن است باعث ایجاد مقاومت به آن‌ها شد [۳].

مکانیسم‌های مولکولی متفاوتی در پیدایش مقاومت کاندیدا آلبیکنس به داروهای آزولی نظیر فلوکونازول شناخته شده است که به چند گروه قابل تقسیم است: ۱) کاهش انتقال دارو به داخل سلول، ۲) تغییرات ساختاری در آنزیم‌های مسیر بیوسنتز ارگوسترول (Ergosterol)، ۳) تغییر ساختاری در آنزیم هدف دارو و ٤) افزایش انتشار دارو به خارج سلول در اثر افزایش تولید و فعالیت پمپ‌های انتشار غشایی [٤]. در این مسیر ژن‌هایی چون ERG11، CDR1، CDR2 و MDR1 در کاندیدا آلبیکنس شناسایی‌شده‌است که هریک از این ژن‌ها با مکانیسم‌های مولکولی متفاوتی، مقاومت ارگانیسم به داروهای ضد قارچی را سبب می‌شود [۵]. لانوسترول ١٤-α- دمتیلاز (Lanosterol 14 α demethylase) آنزیم هدف داروهای آزولی است که دارو با اتصال به آن اثر مهاری دارد و در مطالعات مختلف نشان داده شده که یا جهش در ژن کد کننده این آنزیم باعث کاهش تمایل داروی آزولی به آن شده و منجر به مقاومت در بعضی جدایه‌ها شده است یا افزایش بیان این آنزیم منجر به ایجاد مقاومت شده است؛ ژن کدکننده این آنزیم در تمامی قارچ‌ها ERG11 است [۵]. ERG11 یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز ارگوسترول در کاندیدا آلبیکنس است. ارگوسترول برای حفظ تمامیت و عملکرد طبیعی غشا سلولی کاندیدا آلبیکنس ضروری است. پروتئین ERG11 یکی از اعضای ابرخانواده سایتوکروم P450 است که از ۵۲۸ آمینواسید تشکیل شده که سوبسترای آن بعد اتصال به بخش فعالش دمتیله می‌شود [٦]. داروهای آزولی نظیر میکونازول (Miconazole)، کتوکونازول، فلوکونازول و ایتراکونازول [۷] با مهار این فرآیند باعث مهار سنتز ارگوسترول می‌شود. اغلب یک یا چند جهش در ERG11 باعث تغییر شکل پروتئین ERG11 و در نتیجه کاهش تمایل دارو به آن و در نهایت ایجاد مقاومت دارویی می‌شود [٦]. همچنین مقاومت به داروهای ضد قارچی آزولی به‌ویژه فلوکونازول با افزایش بیان بعضی ژن‌های درگیر در سیستم پمپ افلاکس (Efflux pump system) (در نتیجه خروج بیشتر دارو از سلول و عدم تأثیر آن بر سلول) [۵] یا ایجاد تغییر در مسیر بیوسنتز ارگوسترول مرتبط است [٤].

آنزیم هدف اصلی داروهای آزولی لانوسترول دمتیلاز (ERG11p) است که در جدایه‌های مقاوم افزایش بیان آن یا جهش‌های نقطه‌ای یا مضاعف شدگی آن (و در نتیجه افزایش بیان آن) دیده می‌شود. تغییر در آنزیم هدف داروی فلوکونازول یعنی لانوسترول ١٤-α-دیمتیلاز (محصول ژن ERG11) شامل جهش‌های نقطه‌ای یا افزایش بیان بیش از حد آنزیم است که به کاهش پذیرش داروهای آزولی منجر می‌شود؛ همچنین ممکن است مقاومت متقاطع در برابر سایر مشتقات آزول را نیز در پی داشته باشد [۵]. در مطالعات مختلف برای شناسایی علل مقاومت ژنتیکی به آزول‌ها از روش‌های مختلفی چون PCR-توالی‌یابی [٦، ۷]، نورترن بلات [۵]، Q-RT-PCR [۸] استفاده می‌شود. در ژن ERG11 یکی از دلایل مقاومت به آزول‌ها سه ناحیه داغ جهش‌پذیری (Hotspot regions) شامل آمینواسیدهای ۱۰۵ تا ١٦٥، ٢٦٦ تا ۲۸۷ و ٤٠٥ تا ٤٨٨ در جدایه‌های مقاوم به آزول کاندیدا آلبیکنس شناسایی شده است [۹]. در ژن ERG11 سه ناحیه داغ جهش‌پذیری شناسایی شده است. نقاط داغ جهش‌پذیری به نقاطی گفته می‌شود که بیشترین جهش‌پذیری در ژن در آن ناحیه یا نواحی رخ داده باشد. بعضی جهش‌ها در این ژن نظیر Y132H، G464S و

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-27]

R467K به روش جهش‌زایی (Mutagenesis) مستقیم تأیید شده که در ایجاد مقاومت به آزول‌ها از طریق کاهش تمایل به دارو مؤثر هستند [۷]. همچنین در چندین مطالعه وقوع جهش D116E در ژن ERG11 در جدایه مقاوم به آزول گزارش شده است [٦، ۱۰، ۱۱]. هدف از انجام این مطالعه، بررسی ماهیت مولکولی مقاومت نسبت به آزول‌ها در سویه‌های کاندیدا آلبیکنس جداشده از جدایه‌های واژنی (طی سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۲) نسبت به داروی فلوکونازول به روش PCR- توالی‌یابی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس

این مطالعه از نوع مشاهده‌ای توصیفی و روش نمونه‌گیری از نوع غیراحتمالی و انتخاب جدایه‌ها به روش تصادفی و از نمونه گیری آسان پیروی کرده است. در این تحقیق از ٦۰ بیمار مراجعه کننده به کلینیک درمان ناباروری مهر رشت، مشکوک به کاندیدیازیس واژنی که از سوزش، خارش و ترشح واژنی رنج می‌بردند طی یک دوره ۱۰ ماهه در سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۲ با سواپ استریل نمونه‌گیری شد، سپس جدایه‌ها در آزمایشگاه بررسی شد. پس از بررسی مستقیم میکروسکوپی، تلقیح جدایه ها در محیط سابورو دکستروز آگار (شرکت Merck، آلمان) انجام گرفت. شناسایی گونه های مخمر بعد از مشاهده رشد کلونی‌های مخمری، شناسایی جدایه‌ها با استفاده از آزمون تولید لوله زایا و آزمایش‌های بیوشیمیایی ویژه انجام شد.

آزمون حساسیت دارویی

برای انجام آزمون حساسیت دارویی سوسپانسیونی از هر یک از کشت‌های تازه حاوی سابورودکستروز براث (Sabouraud Dextrose Broth: SDB) از جدایه کاندیدایی توسط سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. در ضمن یک نمونهٔ استاندارد کاندیدا آلبیکنس با PTCC 5027 برای کنترل کیفی آزمایش به‌کار رفت. با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوگرام (Antibiogram)، حساسیت یا مقاومت کاندیدا آلبیکنس نسبت به داروی فلوکونازول بررسی شد. دیسک‌های داروی فلوکونازول (۱۰میکروگرم در هر دیسک) که از شرکت HIGH MEDIA (هند) خریداری شده بود با فواصل معینی روی محیط قرار گرفته و به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بر اساس روش مرجع M44-A که توسط کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه بالینی (Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI) توصیه شده است (جدول ۱)، قطر هاله ایجاد شده در اطراف هر دیسک اندازه‌گیری شد و حساسیت یا مقاومت کاندیدا آلبیکنس مشخص و الگوی حساسیت دارویی مخمرها تعیین شد.

جدول ۱ مقادیر MIC و قطر هاله عدم رشد استاندارد برای گونه‌های کاندیدا آلبیکنس بر اساس روش مرجع CLSI

داروی ضد قارچ	* قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)			مقدار MIC (میکروگرم/ میلی‌لیتر)		
	حساس	نیمه حساس	مقاوم	حساس	نیمه حساس	مقاوم
فلوکونازول	≥۱۹	۱۵-۱۸	≤۱٤	≤۸	۱٦-۳۲	≥ ٦٤

* غلظت آنتی‌بیوتیک در هر دیسک (۱۰ میکروگرم)

آزمایش MIC (Minimum Inhibitory Concentration) با روش ماکرودیلوشن (Macrodilution) و طبق دستورالعمل استاندارد CLSI برای جدایه ها انجام شد. بدین‌ترتیب که ابتدا کدورت استانداری از میکروارگانیسم (نیم مک فارلند) تهیه و پس از ساخت یک محلول ذخیره آنتی‌بیوتیک رقت‌های متوالی از آن تهیه شد و سپس یک میلی‌لیتر از کشت میکروبی فوق به لوله‌های حاوی یک میلی‌لیتر با غلظت‌های متفاوت آنتی‌بیوتیک از محدوده ۲ تا ۱۰۲٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و پس از گرمخانه گذاری لوله‌ها به‌مدت ٢٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، نتایج تجزیه و تحلیل شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-27]

استخراج DNA

بعد از جداسازی و تعیین هویت جدایه‌های قارچی با استفاده از روش‌های استاندارد، قارچ‌ها در محیط SDB کشت داده شد. کشت قارچ‌های خالص در ۵-۱۰ میلی‌لیتر از محیط فوق انجام گرفت و به‌مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای استخراج DNA از روش مهره شیشه‌ای (Glass bead) و فنل کلروفرم استفاده شد [۱۲]. با توجه به اندازه مهره‌های شیشه‌ای مورد استفاده در این مطالعه روش استخراج با پاره‌ای تغییرات به شکل زیر انجام گرفت. سلول‌ها با سانتریفوژ با دور ۱٤۰۰۰ از محیط کشت مایع جمع‌آوری و مقدار ۵۰ میکرولیتر از بافر (STES Tris-HCl 0.2M، NaCl 0.5 M، SDS 0.1 % و EDTA 0.01M) به آن اضافه شد. در ادامه ۲۰ میکرولیتر از مهره‌های شیشه‌ای شسته شده با اسید، ۲۰ میکرولیتر بافر TE (Tris-EDTA buffer) و ۱۰ میکرولیتر مخلوط فنل/ کلروفرم/ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲٤:۲۵:۱) به محتویات سلولی اضافه و به‌مدت۳۲ ثانیه (۳۰ ثانیه ملایم و۲ ثانیه شدید) ورتکس (Vortex) انجام شد. مایع رویی حاوی DNA با استفاده از اتانول آب‌گیری و تخلیص نهایی DNA صورت گرفت.

واکنش PCR- توالی‌یابی

به منظور بررسی ژن عامل مقاومت به فلوکونازول در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس از آغازگرهای (Primers) ERG11، ساخت شرکت Bioneer (کره جنوبی) استفاده شد. پس از مطالعه منابع، توالی آغازگرها انتخاب شد [٦] و در ادامه میزان اختصاصی بودن آغازگرها با استفاده از Primer BLAST ارزیابی شد. همچنین به منظور تجزیه و تحلیل آغازگرها برای اطمینان از نداشتن ساختارهای ثانویه از نرم‌افزار Gene Runner استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۲ مشخصات آغازگرهای مربوط به ژن ERG11 مورد استفاده در واکنش PCR

آغازگر	توالی آغازگر	طول محصول PCR
F1	5′- TTAGTGTTTTATTGGATTCCTTGGTT -3′	٤۸۳ جفت باز
R1	5′-TCTCATTTCATCACCAAATAAAGATC-3′	
F2	5′-ACCAGAAATTACTATTTTCACTGCTTCA-3′	٤۸۲ جفت باز
R2	5′-AAGTCAAATCATTCAAATCACCACCT-3′	
F3	5′-AGGTGGTGATTTGAATGATTTGACTT-3′	٤۸۹ جفت باز
R3	5′-GAACTATAATCAGGGTCAGGCA CTTT-3′	

واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر با استفاده از DNAی الگو، ۰/۲ میلی‌مول مخلوط dNTP، ۰/۲۵ میکرومول از هر آغازگر، ۲/۵ واحد آنزیم Pfu و بافر ۱۰X حاوی ۲۰ $MgSO_4$ میلی‌مولار (از شرکت Thermo Scientific، آمریکا) در دستگاه ترموسایکر با برنامه دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و در انتها ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. با دانستن طول محصولات PCR، غلظت ژل آگارز برای بررسی محصولات تعیین و ژل مناسب تهیه شد. پس از حصول باند واضح روی ژل، مابقی محصول PCR، در میکروتیوب‌های استریل قرار داده شد و با رعایت شرایط استریل و زنجیره سرمایی، برای تعیین توالی با روش توالی‌یابی ختم زنجیره توسط شرکت تکاپو زیست (ایران)، به شرکت Bioneer کشور کره فرستاده شد.

نتایج

میزان مقاومت گونه‌های کاندیدا آلبیکنس به فلوکونازول

آثار ضد قارچی داروی فلوکونازول روی سوش استاندارد

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-27]

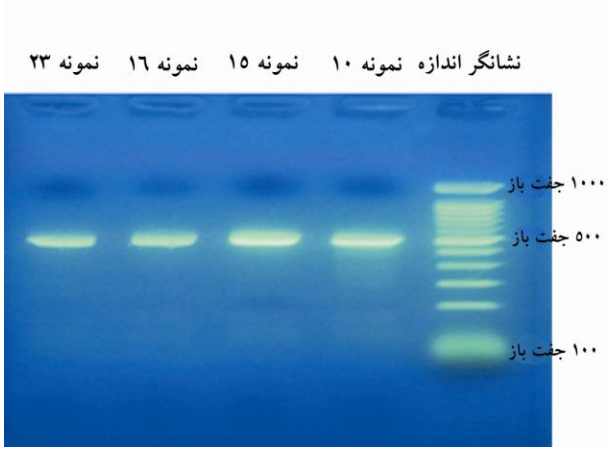
کاندیدا آلبیکنس و جدایه های تهیه شـده از بیمـاران مبـتلا بـه والواژینیت (Valvaginit) به دو روش آنتی‌بیوگرام و MIC در جدول ۳ ارایه شده است. در این بررسی ٦٠ جدایه از بیمـاران کلینیک درمان ناباروری مهر رشت گرفته شد که از این تعـداد فقط ٤٠ جدایه کاندیدا آلبیکنس شناسایی شـدند و از ایـن ٤٠ جدایـه کاندیـدا آلبیکـنس، فقـط ٤ جدایـه نسـبت بـه داروی فلوکونازول مقاوم بودند. تفسیر نتایج بر اساس جدول استاندارد CLSI (جدول ۳) صورت گرفت.

جدول ۳ مقادیر MIC و قطر هاله عدم رشد گونه‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به والواژینیت

نام جدایه	مقدار MIC (میکروگرم/ میلی‌لیتر)	قطر هاله (میلی‌متر)	حساسیت به فلوکونازول
۱۰	۱۰۲٤	٤	مقاوم
۱۵	۱۰۲٤	۲	مقاوم
۱٦	۵۱۲	٦	مقاوم
۲۳	۵۱۲	٦	مقاوم
۱۱	۱٦	۱٦	حساس وابسته به دوز
۱٤	۸	۲۰	حساس
۱۲	۸	۲۵	حساس
۱۳	۸	۲۲	حساس
۱	۸	۲۰	سویه حساس PTCC 5027

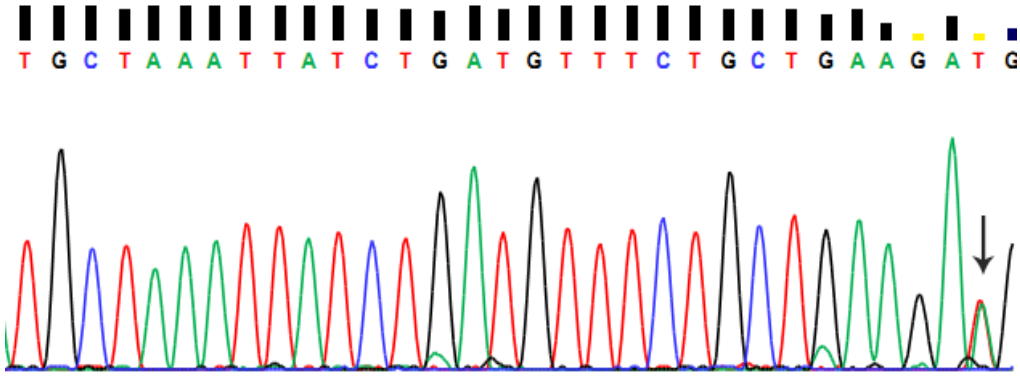
تعیین توالی و یافتن پلی‌مورفیسم در ژن ERG11

بعد از حصول اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR روی ژل آگارز جدایه (شکل ۱) نمونه‌ها تعیین توالی شد. بعد از تعیین توالی، بـا اسـتفاده از نـرم‌افـزار Chromas تـوالی‌هـا ارزیابی شد و با مقایسه آن‌ها با توالی نمونه حساس استاندارد (PTCC 5027) و تـوالی مرجـع موجـود در سـایت Blast مشخص شد که سه جدایه مقاوم به فلوکونازول در موقعیـت ۱۱٦ ژن ERG11 دچـار تغییـر اسـید آسـپارژیک بـه اسـید گلوتامیک بودند (شکل ۲) و سه جدایه در موقعیت ٤٥٦ ایـن ژن دچار تغییر والین به گلایسین بودند (جدول ٤).



شکل ۱ الکتروفورز محصولات PCR ژن ERG11 کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول، روی ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ‌آمیزی شده با Gel-red؛ از راست به چپ ۱) نشانگر اندازه (M100)، ۲) DNA شماره ۱۰، ۳) DNA شماره ۱۵، ٤) DNA شماره۱٦، ۵) DNA شماره ۲۳

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-27]



شکل ۲ نتیجه تعیین توالی از قسمتی از ژن ERG11. نوکلئوتیدها به صورت نقاط اوج (Peaks) مجزا در الکتروگرام نشان داده شده‌است. پیکان عمودی موقعیت جابه‌جایی T با A را در یکی از دو کروموزوم مخمری نشان می‌دهد که این امر نشان‌دهنده هتروزایگوس بودن پلی‌مورفیسم در این موقعیت ژنی است.

جدول ٤ ارتباط بین میزان MIC و پلی‌مورفیسم موجود در ژن Erg11 در جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول

نام جدایه	مقدار MIC (میکروگرم/ میلی‌لیتر)	نوع پلی‌مورفیسم	
۱۰	۱۰۲٤	GTT(Val)>GGT(Gly)	--
۱۵	۱۰۲٤	GTT(Val)>GGT(Gly)	GAT(Asp)>GAA(Glu)
۱٦	۵۱۲	---	GAT(Asp)>GAA(Glu)
۲۳	۵۱۲	GTT(Val)>GGT(Gly)	GAT(Asp)>GAA(Glu)

بحث

هدف از انجام این مطالعه، بررسی ماهیت مولکولی مقاومت نسبت به آزول‌ها در سویه‌های کاندیدای جدا شده طی سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۲ در کلینیک درمان ناباروری مهر رشت بود. بدین منظور ٤۰ جدایه کاندیدا آلبیکنس جداسازی شد و از نظر مقاومت آزولی و جهش در ژن ERG11 ارزیابی شد.

با استفاده از روش انتشار دیسک میزان مقاومت به داروی فلوکونازول در ٤۰ جدایه کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به وولواژینیت (Vulvovaginitis)، ۱۰درصد به‌دست آمد. این امر نشان می‌دهد میانگین میزان مقاومت به این دارو در بیماران مبتلا به کاندیدیازیس واژنی با وجود جذب مناسب گوارشی دارو، بالا است. در مجموع، تحقیق حاضر نشان داد که آزمایش حساسیت دارویی گام اول و ضروری برای انتخاب داروی مناسب برای درمان انواع کاندیدیازیس است تا بدین ترتیب از مصرف بی‌رویه داروها و ایجاد مقاومت دارویی ناخواسته جلوگیری شود. در این مطالعه به‌طور قابل توجهی افزایش مقاومت به فلوکونازول در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس با MIC (۱۰۲٤ و ۵۱۲ میکروگرم/ میلی‌لیتر) به‌دست آمد که تا به‌حال در هیچ جای دنیا این شدت مقاومت گزارش نشده بود. مقاومت نسبت به فلوکونازول در گذشته هم مورد توجه بوده و در مطالعاتی که در نقاط مختلف ایران و جهان صورت گرفته است، گزارش شده است. به‌عنوان مثال در کشورمان، زارعی و همکاران، حساسیت ٦٤ جدایه کاندیدا به داروی فلوکونازول را ارزیابی کرده‌اند که ٦/۳ درصد موارد از نوع کاندیدا آلبیکنس مقاوم به داروی فلوکونازول بودند [۱۳]. در مطالعه تیموری و همکاران نیز از ۹۷ جدایه کاندیدا آلبیکنس، ٤ جدایه مقاوم به فلوکونازول شناسایی شد [۱٤]. در مطالعه محمدی و همکاران ۳۳/۳ درصد جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس و ۳۵/۸ درصد جدایه‌های غیر آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول بودند [۱۵] که این نشان‌دهنده میزان بالای مقاومت نسبت به داروی فلوکونازول بود. همچنین در

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-27]

بررسی‌های خارج از کشور نیز، سوبل (Sobel) و همکاران در سال 2003 مشاهده کردند که زنان مبتلا به واژینیت کاندیدایی (*Candida* vaginitis) دارای MIC فلوکونازول در ۹٦ درصد موارد کمتر از ۸ میکروگرم/ میلی‌لیتر و در ۳/٦ درصد موارد بیشتر از ٦٤ میکروگرم/ میلی‌لیتر دارا بودند [١٦] که این مقدار MIC در مقایسه با مطالعه حاضر پایین‌تر بود. شکوهی و همکاران در ایران با مطالعه روی جدایه‌های کاندیدا بیشترین MIC را برای فلوکونازول ٦٤ میکروگرم/ میلی‌لیتر تعیین کردند [١٧] که از مطالعه حاضر مقدار آن پایین‌تر بود. جوس (Jose) و همکاران در۲۰۱۳ به بررسی حساسیت ضد قارچی گونه‌های کاندیدایی نسبت به داروی فلوکونازول در زنان مبتلا به ویروس ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS)، پرداختند. دراین مطالعه زنان دارای تعداد $CD4^+$ بالاتر از ۳۰۰ سلول در میلی‌متر مکعب، ۲۰۰ میلی‌گرم در هفته، فلوکونازول گرفتند. میزان MIC جدایه‌های مقاوم در این مطالعه با روش میکرودیلوشن، ٦٤ میکروگرم/ میلی‌لیتر به‌دست آمد [١٨] که در مقایسه با مطالعه حاضر، مقدارMIC پایین‌تر بود. پره‌آ (Perea) و همکاران در سال ۲۰۰۱ ، مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به آزول را در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس جداشده از افراد دچار نقص سیستم ایمنی (Human Immunodeficiency Virus: HIV) که مقاومت بالایی به فلوکونازول (٦٤ میکروگرم/ میلی‌لیتر MIC≥) داشتند، بررسی‌کردند [٥]. MIC جدایه‌های مقاوم مورد بررسی در مقالات ذکر شده فوق، در مقایسه با MIC به‌دست آمده در مطالعه حاضر (١٠٢٤ و ٥١٢ میکروگرم/ میلی‌لیتر) پایین‌تر است و این امر نشان دهنده مقاومت بسیار بالای جدایه‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر است و این مقاومت بالا ممکن است به علت تعداد بیشتر جهش‌های رخ داده در جدایه‌های مقاوم مطالعه حاضر یا شدت بیشتر اثر آن‌ها باشد.

در مطالعه‌ای پره‌آ و همکاران، در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس جداشده از افراد دچار نقص سیستم ایمنی (HIV) با مقاومت بالا به فلوکونازول (٦٤ میکروگرم/ میلی‌لیتر MIC≥) افزایش سطح بیان ژن‌های کدکننده لانوسترول α – ١٤ دمتیلاز (ERG11) و پمپ‌های انتشار [MDR (Multiple Drug Resistance) و CDR (Candida Drug Resistance) و جهش‌های نقطه‌ای در ERG11 را گزارش کردند [٥]. سنگلارد (Sanglard) و همکاران مشاهده کردند که جهش G464S و G129A باعث افزایش مقاومت به فلوکونازول می‌شود [١٩]. ژو (Xu) و همکاران در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول جهش‌های G487T و T916C در ژن ERG11 گزارش دادند [٤]. لی (Lee) که روی ژن‌های عامل مقاومت دارویی در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس کار می‌کرد، نشان داد که در جدایه‌های مقاوم، بیان بیش از حد ژن ERG11 عامل مقاومت دارویی است. همچنین بیان کرد که جهش‌های هموزیگوس اغلب در جدایه‌های مقاوم و جهش‌های هتروزیگوس اغلب در جدایه‌های حساس مشاهده می‌شود [٢٠].

امروزه بیش از ٦٠ نوع جابه‌جایی آمینواسیدی در پروتئین Erg11 گزارش شده که حداقل ۳۰ نوع از آن‌ها در جدایه‌های مقاوم به آزول‌ها شناسایی شده‌است. با این‌حال اهمیت این جابه‌جایی‌ها بین انواع آزول‌ها بسیار متغیر است. به‌طوری که جابه‌جایی‌هایی نظیر Y132H، G464S G450E، R467K و S405F به‌نظر می‌رسد در حساسیت به فلوکونازول و وریکونازول (Voriconazole) اهمیت داشته باشند؛ در حالی که در جدایه‌های مقاوم به پوساکونازول (Posaconazole) نقشی نداشته باشند. همچنین در مواردی وجود چند جابه‌جایی در کنار هم در یک سویه نظیر جابه‌جایی‌های G129A و G464S باعث افزایش MIC آزولی نسبت به سویه‌های دارای یک جابه‌جایی نظیر G129A شده است. اغلب سویه‌های کاندیدا آلبیکنس دیپلویید هستند. در نتیجه جهش‌های نوکلئوتیدی ممکن است به‌صورت جابه‌جایی‌های هموزیگوس (در هر دو آلل) یا هتروزیگوس (تنها در یک آلل) باشد. همچنین مطالعات نشان داده است که پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (Single nucleotide polymorphisms: SNP) در ژن ERG11 ممکن است در ایجاد مقاومت با تغییر در

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-27]

آمینواسیدهای این ژن مؤثر باشد [۱۰]. ایـن SNP هـا بـه‌نظـر می‌رسد در افزایش مقاومت به دارو مؤثر باشد اما مستقیماً و به تنهایی باعث مقاومت نشده‌اند. در این مطالعه در جدایـه‌هـای مقاوم به فلوکونـازول پلـی‌مورفیسـم D116E در ژن ERG11 شناسایی شد. جدایه‌های ۱۵، ۱٦ و ۲۳ در این مطالعه بـا MIC حـدود ۵۱۲ و ۱۰۲٤ میکروگـرم در میلـی‌لیتـر پلـی‌مورفیسـم D116E در موقعیت ۱۱٦ (تغییر تایمیدین به آدنـین) را نشـان دادند که باعث تبدیل آسپارتیک اسید به گلوتامیک اسید شـده است. جهش D116E در چندین مطالعه در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول گزارش شده است [۸، ۲۱، ۲۲] در حالی که جهش V456G اولین بار در ایران گزارش می‌شود. این دو جهش که در یکی از سه ناحیه داغ جهش‌پذیری ژن ERG11 قرار گرفته‌است، به‌نظر می‌رسـد کـه در اتصـال مهارکننـده یـا سوبسترا به آنزیم مؤثر باشد و جهش در آن باعث تغییر ساختار آنزیم و در نتیجه تغییر در تمایل آن به اتصال بـه آن دو شـود [۲۲]. این امر نیز به‌نظر می‌رسد در ایجاد مقاومت با اتصال غیر مؤثر به دارو نقش داشته باشد.

نتایج بررسی مقاومت به آزول‌ها به‌ویژه فلوکونازول در این مطالعه و مقایسه آن با نتایج حاصل از تحقیقـات دیگـران در ایران و کشورهای دیگر نشان داد که میزان مقاومت نسبت بـه این آنتی‌بیوتیک به‌طور فزآینده‌ای رو به افزایش است که زنگ خطری برای درمان آنتی‌بیوتیکی عفونـت‌هـای کاندیـدایی در کشور محسوب می‌شود. روش‌های مولکولی به کار گرفته شده در این مطالعه قادر بودند به‌طور موفقیت‌آمیزی ارتباط فنوتیپ مقاومت و ماهیت ژنتیکی آن‌ها را نشـان دهـد. در مطالعـات دیگران تـا بـه‌حـال مقاومـت در ایـن حـد MIC~512-1024 گزارش نشده است. از سوی دیگر؛ بر اساس مطالعـات انجـام شده وجود مقاومت بالا در جدایه‌های مورد مطالعه ممکن است نتیجه تغییر و جهش در چنـدین ژن مـرتبط بـه مقاومـت بـه آزول‌ها نظیر CDR1، ERG3، MDR1 یـا دیگـر ژن‌هـا باشـد [۸] که به آزمایش‌های تکمیلی در این زمینه در آینده نیاز دارد. شناسایی جهش‌های ژنی ایجاد کننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در عفونت‌های قارچی می‌تواند گام مهمی برای درمان به هنگام بیماری با جایگزینی داروهای مناسب باشد.

تشکر و قدردانی

این پروژه از طریق پژوهانه دانشـگاه آزاد اسـلامی واحـد رشت به شماره قرارداد ٤/٥٨٣٠ تـأمین اعتبـار شـده اسـت. از جناب مهندس رضا پورسیفی که در انجام آزمایش‌هـا کمـک شایانی فرمودند تشکر فراوان داریم.

منابع

[1] Davies JM, Stacey AJ, Gilligan CA. *Candida albicans* hyphal invasion: thigmotropism or chemotropism? FEMS Microbiol Lett 1999; 171(2): 245-9.

[2] Kavanaugh NL, Zhang AQ, Nobile CJ, Johnson AD, Ribbeck K. Mucins suppress virulence traits of *Candida albicans*. MBio 2014; 5(6): e01911.

[3] Seneviratne CJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(9): 3259-66.

[4] Xiang MJ, Liu JY, Ni PH, Wang S, Shi C, Wei B, Ni YX, Ge HL. Erg11 mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. FEMS Yeast Res 2013; 13(4): 386-93.

[5] Perea S, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillán RA, Martínez M, Calabrese D, Sanglard D, Patterson TF. Prevalence of molecular mechanisms of

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-27]

DNA sequencing. BMC Microbiol 2009; 9: 167.

[11] Gołąbek K, Strzelczyk JK, Owczarek A, Cuber P, Ślemp-Migiel A, Wiczkowski A. Selected mechanisms of molecular resistance of *Candida albicans* to azole drugs. Acta Biochim Pol 2015; 62(2): 247-51.

[12] Sambrook J, Russell DW. Rapid isolation of yeast DNA. CSH Protoc 2006; 2006(1). pii: pdb.prot4039.

[13] Zarei Mahmoudabadi A, Rezaei-Matehkolaei A, Navid M, Torabizadeh M, Mazdarani S. Colonization and antifungals susceptibility patterns of *Candida* species isolated from hospitalized patients in ICUs and NICUs. J Nephropathol 2015; 4(3): 77-84.

[14] Teymuri M, Mamishi S, Pourakbari B, Mahmoudi S, Ashtiani MT, Sadeghi RH, Yadegari MH. Investigation of ERG11 gene expression among fluconazole-resistant *Candida albicans*: first report from an Iranian referral paediatric hospital. Br J Biomed Sci 2015; 72(1): 28-31.

[15] Mohamadi J, Motaghi M, Panahi J, Havasian MR, Delpisheh A, Azizian M, Pakzad I. Anti-fungal resistance in *Candida* isolated from oral and diaper rash candidiasis in neonates. Bioinformation 2014; 10(11): 667-70.

[16] Sobel JD, Zervos M, Reed BD, Hooton T, Soper D, Nyirjesy P, Heine MW, Willems J, Panzer H. Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from women with complicated *Candida* vaginitis: clinical implications. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(1): 34-8.

[17] Shokohi T, Bandalizadeh Z, Hedayati MT, resistance to azole antifungal agents in Candida albicans strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(10): 2676-84.

[6] Xu Y, Chen L, Li C. Susceptibility of clinical isolates of Candida species to fluconazole and detection of *Candida albicans* ERG11 mutations. J Antimicrob Chemother 2008; 61(4): 798-804.

[7] Feng LJ, Wan Z, Wang XH, Li RY, Liu W. Relationship between antifungal resistance of fluconazole resistant *Candida albicans* and mutations in ERG11 gene. Chin Med J (Engl) 2010; 123(5): 544-8.

[8] Yan L, Zhang J, Li M, Cao Y, Xu Z, Cao Y, Gao P, Wang Y, Jiang Y. DNA microarray analysis of fluconazole resistance in a laboratory *Candida albicans* strain. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2008; 40(12): 1048-60.

[9] Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, Borgers M, Ramaekers FC, Odds FC, Bossche HV. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. Microbiology 1999; 145(Pt 10): 2701-13.

[10] Wang H, Kong F, Sorrell TC, Wang B, McNicholas P, Pantarat N, Ellis D, Xiao M, Widmer F, Chen SC. Rapid detection of ERG11 gene mutations in clinical *Candida albicans* isolates with reduced susceptibility to fluconazole by rolling circle amplification and

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-27]

Mayahi S. In vitro antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from oropharyngeal lesions of patients with cancer to some antifungal agents. JJM 2011; 4(Supplement 1): S19-S26.

[18] Vazquez JA, Peng G, Sobel JD, Steele-Moore L, Schuman P, Holloway W, Neaton JD. Evolution of antifungal susceptibility among *Candida* species isolates recovered from human immunodeficiency virus-infected women receiving fluconazole prophylaxis. Clin Infect Dis 2001; 33(7): 1069-75.

[19] Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14alpha-demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42(2): 241-53.

[20] Lee MK, Williams LE, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. J Antimicrob Chemother 2004; 53(2): 217-24.

[21] Strzelczyk JK, Slemp-Migiel A, Rother M, Gołąbek K, Wiczkowski A. Nucleotide substitutions in the *Candida albicans* ERG11 gene of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates. Acta Biochim Pol 2013; 60(4): 547-52.

[22] Goldman GH, da Silva Ferreira ME, dos Reis Marques E, Savoldi M, Perlin D, Park S, Godoy Martinez PC, Goldman MH, Colombo AL. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in candida albicans clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 50(1): 25-32.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-27]