

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

Azadeh Dokht Eftekhari¹, Masumeh Anvari^{2*}, Najmeh Ranji³

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 14 α -demethylase). This study assesses ERG11 gene mutations in *Candida albicans* strains isolated from patients with *Candidia* vulvovaginitis 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 512 μ g/ml and the other two species had a MIC 90 of 1024 μ g/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

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

آزاده دخت افتخاری^۱، معصومه انوری^{۲*}، نجمه رنجی^۳

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 تالش، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه میکروبیولوژی
Email: anvari@iaurasht.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۴/۰۷/۱۴

دریافت مقاله: ۹۳/۱۲/۰۷

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 ۱۴-آلفا ارگسترول) می‌تواند رخ دهد. هدف از این مطالعه، بررسی جهش‌های ژن ERG11 در سویه‌های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول جدا شده از بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیایی (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 MIC₉₀ 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 ۴۰ 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 ۱۰۲۴ میکروگرم/ میلی‌لیتر). در سه جدایه پلیمورفیک 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 ۴ جدایه گزارش می‌شود. همچنین به نظر 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

نقاط جهان شیوع دارد. برخلاف سایر گونه‌های کاندیدا، گونه آلبیکنس دو شکلی است و از فرم مخمری به شکل هیف تبدیل

کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) شایع‌ترین عامل عفونت‌های قارچی است و بیماری‌های ناشی از آن در همه

طبیعی غشا سلولی کاندیدا آلیکنس 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 می شود [۶]. داروهای آزولی نظیر میکونازول (Miconazole)، کتوکونازول، فلوکونازول و ایتراکونازول [۷] با مهار این فرآیند باعث مهار سنتز ارگوسترول می شود. 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 می شود [۶]. همچنین مقاومت به داروهای ضد قارچی آزولی به ویژه فلوکونازول با افزایش بیان بعضی ژن های 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 [۴].

آنزیم هدف اصلی داروهای آزولی لانوسترول دمتیلاز (ERG11p) است که در جدایه های مقاوم افزایش بیان آن یا جهش های نقطه ای یا مضاعف شدگی آن (و در نتیجه افزایش بیان آن) دیده می شود. تغییر در آنزیم هدف داروی فلوکونازول یعنی لانوسترول ۱۴- α -دمتیلاز (محصول ژن ERG11) شامل جهش های نقطه ای یا افزایش بیان بیش از حد آنزیم است که به کاهش پذیرش داروهای آزولی منجر می شود؛ 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 آزول ها از روش های مختلفی چون PCR-توالی یابی [۶، ۷]، نورترن بلات [۵]، Q-RT-PCR [۸] استفاده می شود. در ژن ERG11 یکی از دلایل مقاومت به آزول ها سه ناحیه داغ جهش پذیری (Hotspot regions) شامل آمینواسیدهای ۱۰۵ تا ۱۶۵، ۲۶۶ تا ۲۸۷ و ۴۰۵ تا ۴۸۸ در جدایه های مقاوم به آزول کاندیدا آلیکنس شناسایی شده است [۹]. در ژن ERG11 سه ناحیه داغ جهش پذیری شناسایی شده است. نقاط داغ جهش پذیری به نقاطی گفته می شود که بیشترین جهش پذیری در ژن در آن ناحیه یا نواحی رخ داده باشد. بعضی جهش ها در این ژن نظیر Y132H، G464S و

می شود. این پدیده در واکنش های مخمر با میزبان اهمیت فراوانی دارد [۱]. هیف عامل پیش روی تهاجم قارچ به سلول های 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 آن ها شد [۳].

مکانیسم های مولکولی متفاوتی در پیدایش مقاومت کاندیدا آلیکنس 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 آنزیم های مسیر بیوسنتز ارگوسترول (Ergosterol)، ۳) تغییر ساختاری در آنزیم هدف دارو و ۴) افزایش انتشار دارو به خارج سلول در اثر افزایش تولید و فعالیت پمپ های انتشار غشایی [۴]. در این مسیر ژن های چون ERG11، CDR1، CDR2 و MDR1 در کاندیدا آلیکنس شناسایی شده است که هر یک از این ژن ها با مکانیسم های مولکولی متفاوتی، مقاومت ارگانیسم به داروهای ضد قارچی را سبب می شود [۵]. لانوسترول ۱۴- α -دمتیلاز (Lanosterol 14 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 کدکننده این آنزیم باعث کاهش تمایل داروی آزولی به آن شده و منجر به مقاومت در بعضی جدایه ها شده است یا افزایش بیان این آنزیم منجر به ایجاد مقاومت شده است؛ ژن کدکننده این آنزیم در تمامی قارچ ها ERG11 است [۵]. ERG11 یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز ارگوسترول در کاندیدا آلیکنس است. ارگوسترول برای حفظ تمامیت و عملکرد

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 سابوردکستروز براث (Sabouraud Dextrose Broth: SDB) از جدایه کاندیدایی توسط سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. در ضمن یک نمونه استاندارد کاندیدا آلبیکنس با PTCC 5027 برای کنترل کیفی آزمایش به کار رفت. با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوگرام (Antibiogram)، حساسیت یا مقاومت کاندیدا آلبیکنس نسبت به داروی فلوکونازول بررسی شد. دیسک‌های داروی فلوکونازول (۱۰ میکروگرم در هر دیسک) که از شرکت HIGH MEDIA (هند) خریداری شده بود با فواصل معینی روی محیط قرار گرفته و به مدت ۲۴ 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.

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 [۶، 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 نمونه‌گیری آسان پیروی کرده است. در این تحقیق از ۶۰ بیمار مراجعه کننده به کلینیک درمان ناباروری مهر رشت، مشکوک به کاندیدایازیس واژنی که از سوزش، خارش و ترشح واژنی رنج می‌بردند طی یک دوره ۱۰ ماهه در سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۲ با سواب استریل نمونه‌گیری شد، سپس جدایه‌ها در آزمایشگاه بررسی شد. پس از بررسی مستقیم میکروسکوپی، تلقیح جدایه‌ها در محیط سابورو دکستروز آگار (شرکت Merck، آلمان) انجام گرفت. شناسایی گونه‌های مخمر بعد از مشاهده

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	مقاوم
≥ ۱۹	۱۵-۱۸	≤ ۱۴	≤ ۸	۱۶-۳۲	≥ ۶۴	

* غلظت آنتی‌بیوتیک در هر دیسک (۱۰ میکروگرم)

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 ۱۰۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و پس از گرمخانه‌گذاری لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، نتایج تجزیه و تحلیل شد.

آزمایش MIC (Minimum Inhibitory Concentration) با روش ماکرودیلوشن (Macrodilution) و طبق دستورالعمل استاندارد CLSI برای جدایه‌ها انجام شد. بدین ترتیب که ابتدا کدورت استاندارد از میکروارگانیزم (نیم مک فارلند) تهیه و پس از ساخت یک محلول ذخیره آنتی‌بیوتیک رقت‌های متوالی

استخراج DNA

بعد از جداسازی و تعیین هویت جدایه های قارچی با استفاده از روش های استاندارد، قارچ ها در محیط SDB کشت داده شد. کشت قارچ های خالص در ۵-۱۰ میلی لیتر از محیط فوق انجام گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. برای استخراج DNA از روش مهره شیشه ای (Glass bead) و فنل کلروفرم استفاده شد [۱۲]. با توجه به اندازه مهره های شیشه ای مورد استفاده در این مطالعه روش استخراج با پاره ای تغییرات به شکل زیر انجام گرفت. سلول ها با سانتریفوژ با دور ۱۴۰۰۰ از محیط کشت مایع جمع آوری و مقدار ۵۰ میکرولیتر از بافر (NaCl 0.5 M, STES Tris-HCl 0.2M, SDS 0.1 % و EDTA 0.01M) به آن اضافه شد. در ادامه ۲۰ میکرولیتر از مهره های شیشه ای شسته شده با اسید، ۲۰ میکرولیتر بافر TE (Tris-EDTA buffer) و ۱۰ میکرولیتر مخلوط فنل/

کلروفرم/ایزوامیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) به محتویات سلولی اضافه و به مدت ۳۲ ثانیه (۳۰ ثانیه ملایم و ۲ ثانیه شدید) ورتکس (Vortex) انجام شد. مایع رویی حاوی DNA با استفاده از اتانول آب گیری و تخلیص نهایی DNA صورت گرفت.

واکنش PCR - توالی یابی

به منظور بررسی ژن عامل مقاومت به فلوکونازول در جدایه های کاندیدا آلیکس از آغازگرهای (Primers) ERG11، ساخت شرکت Bioneer (کره جنوبی) استفاده شد. پس از مطالعه منابع، توالی آغازگرها انتخاب شد [۶] 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 نرم افزار 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'-TTAGTGTTTTATTGGATTCTTGGTT-3'	۴۸۳ جفت باز
R1	5'-TCTCATTTTCATCACCAATAAAGATC-3'	
F2	5'-ACCAGAAATTACTATTTTCACTGCTTCA-3'	۴۸۲ جفت باز
R2	5'-AAGTCAAATCATTCAAATCACCACT-3'	
F3	5'-AGGTGGTGATTTGAATGATTTGACTT-3'	۴۸۹ جفت باز
R3	5'-GAACTATAATCAGGGTCAGGCACTTT-3'	

تعیین و ژل مناسب تهیه شد. پس از حصول باند واضح روی ژل، مابقی محصول PCR، در میکروتیوب های استریل قرار داده شد و با رعایت شرایط استریل و زنجیره سرمایی، برای تعیین توالی با روش توالی یابی ختم زنجیره توسط شرکت تکاپو زیست (ایران)، به شرکت Bioneer کشور کره فرستاده شد.

نتایج

میزان مقاومت گونه های کاندیدا آلیکس به فلوکونازول

آثار ضد قارچی داروی فلوکونازول روی سوش استاندارد

واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر با استفاده از DNA الگو، ۰/۲ میلی مول مخلوط dNTP، ۰/۲۵ میکرومول از هر آغازگر، ۲/۵ واحد آنزیم Pfu و بافر ۱۰X حاوی $MgSO_4$ ۲۰ میلی مولار (از شرکت Thermo Scientific، آمریکا) در دستگاه ترموسایکریک با برنامه دمایی ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در انتها ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد صورت گرفت. با دانستن طول محصولات PCR، غلظت ژل آگارز برای بررسی محصولات

فقط ۴۰ جدایه کاندیدا آلیکنس شناسایی شدند و از این ۴۰ جدایه کاندیدا آلیکنس، فقط ۴ جدایه نسبت به داروی فلوکونازول مقاوم بودند. تفسیر نتایج بر اساس جدول استاندارد CLSI (جدول ۳) صورت گرفت.

کاندیدا آلیکنس و جدایه های تهیه شده از بیماران مبتلا به والواژینیت (Valvaginit) به دو روش آنتی بیوگرام و MIC در جدول ۳ ارائه شده است. در این بررسی ۶۰ جدایه از بیماران کلینیک درمان ناباروری مهر رشت گرفته شد که از این تعداد

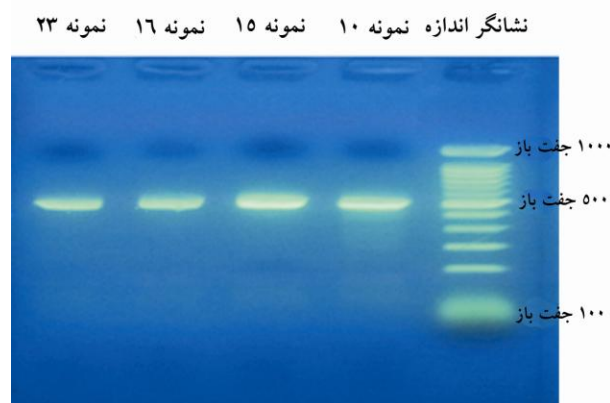
جدول ۳ مقادیر MIC و قطر هاله عدم رشد گونه های کاندیدا آلیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به والواژینیت

نام جدایه	مقدار MIC (میکروگرم/میلی لیتر)	قطر هاله (میلی متر)	حساسیت به فلوکونازول
۱۰	۱۰۲۴	۴	مقاوم
۱۵	۱۰۲۴	۲	مقاوم
۱۶	۵۱۲	۶	مقاوم
۲۳	۵۱۲	۶	مقاوم
۱۱	۱۶	۱۶	حساس وابسته به دوز
۱۴	۸	۲۰	حساس
۱۲	۸	۲۵	حساس
۱۳	۸	۲۲	حساس
۱	۸	۲۰	سویه حساس PTCC 5027

(PTCC 5027) و توالی مرجع موجود در سایت Blast مشخص شد که سه جدایه مقاوم به فلوکونازول در موقعیت ۱۱۶ ژن ERG11 دچار تغییر اسید آسپارژیک به اسید گلوتامیک بودند (شکل ۲) و سه جدایه در موقعیت ۴۵۶ این ژن دچار تغییر والین به گلايسين بودند (جدول ۴).

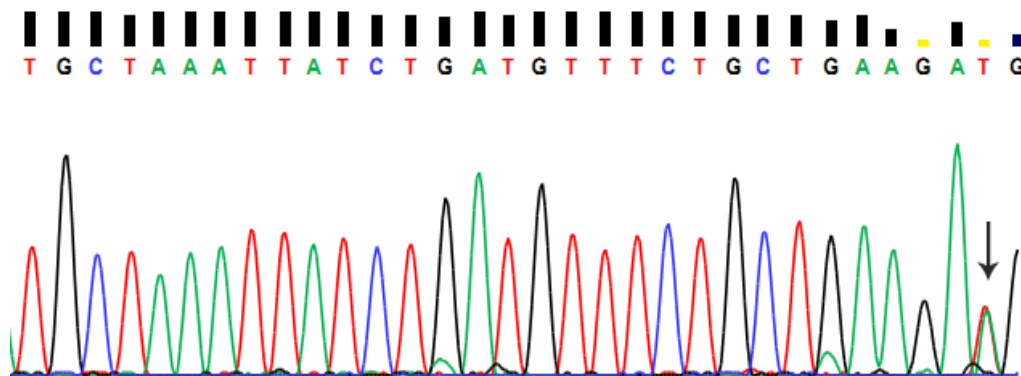
تعیین توالی و یافتن پلی مورفیسم در ژن ERG11

بعد از حصول اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR روی ژل آگارز جدایه (شکل ۱) نمونه ها تعیین توالی شد. بعد از تعیین توالی، با استفاده از نرم افزار Chromas توالی ها ارزیابی شد و با مقایسه آن ها با توالی نمونه حساس استاندارد



شکل ۱ الکتروفورز محصولات PCR ژن ERG11 کاندیدا آلیکنس مقاوم به فلوکونازول، روی ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ آمیزی شده با Gel-red؛ از راست به چپ (۱) نشانگر اندازه (M100)، (۲) DNA شماره ۱۰، (۳) DNA شماره ۱۵، (۴) DNA شماره ۱۶، (۵) DNA شماره ۲۳

جهش های ژن ERG11 در جدایه های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول



شکل ۲ نتیجه تعیین توالی از قسمتی از ژن ERG11 نوکلئوتیدها به صورت نقاط اوج (Peaks) مجزا در الکتروگرام نشان داده شده است. پیکان عمودی موقعیت جابه جایی T با A را در یکی از دو کروموزوم مخمری نشان می دهد که این امر نشان دهنده هتروزیگوس بودن پلی مورفیسم در این موقعیت ژنی است.

جدول ۴ ارتباط بین میزان MIC و پلی مورفیسم موجود در ژن ERG11 در جدایه های مقاوم به فلوکونازول

نام جدایه	مقدار MIC (میکروگرم/ میلی لیتر)	نوع پلی مورفیسم
۱۰	۱۰۲۴	GT T (Val)>GGT (Gly)
۱۵	۱۰۲۴	GAT (Asp)>GAA (Glu) GT T (Val)>GGT (Gly)
۱۶	۵۱۲	GAT (Asp)>GAA (Glu) —
۲۳	۵۱۲	GAT (Asp)>GAA (Glu) GT T (Val)>GGT (Gly)

بحث

هدف از انجام این مطالعه، بررسی ماهیت مولکولی مقاومت نسبت به آزولها در سویه های کاندیدای جدا شده طی سال های ۱۳۹۱-۱۳۹۲ در کلینیک درمان ناباروری مهر رشت بود. بدین منظور ۴۰ 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 ۴۰ جدایه کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به وولواژینیت (Vulvovaginitis)، ۱۰ درصد به دست آمد. این امر نشان می دهد میانگین میزان مقاومت به این دارو در بیماران مبتلا به کاندیدایزیس 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 کاندیدایزیس است تا بدین ترتیب از مصرف بی رویه داروها و ایجاد مقاومت دارویی ناخواسته جلوگیری شود. در این

مطالعه به طور قابل توجهی افزایش مقاومت به فلوکونازول در جدایه های کاندیدا آلبیکنس با MIC (۱۰۲۴ و ۵۱۲ میکروگرم/ میلی لیتر) به دست آمد که تا به حال 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. به عنوان مثال در کشورمان، زارعی و همکاران، حساسیت ۶۴ جدایه کاندیدا به داروی فلوکونازول را ارزیابی کرده اند که ۶۳ درصد موارد از نوع کاندیدا آلبیکنس مقاوم به داروی فلوکونازول بودند [۱۳]. در مطالعه تیموری و همکاران نیز از ۹۷ جدایه کاندیدا آلبیکنس، ۴ جدایه مقاوم به فلوکونازول شناسایی شد [۱۴]. در مطالعه محمدی و همکاران ۳۳/۳ درصد جدایه های کاندیدا آلبیکنس و ۳۵/۸ درصد جدایه های غیر آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول بودند [۱۵] که این نشان دهنده میزان بالای مقاومت نسبت به داروی فلوکونازول بود. همچنین در

بررسی‌های خارج از کشور نیز، سوبل (Sobel) و همکاران در سال 2003 مشاهده کردند که زنان مبتلا به واژینیت کاندیدیایی (*Candida vaginitis*) دارای MIC فلوکونازول در ۹۶ درصد موارد کمتر از ۸ میکروگرم/ میلی‌لیتر و در ۳/۶ درصد موارد بیشتر از ۶۴ میکروگرم/ میلی‌لیتر دارا بودند [۱۶] 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 ۶۴ میکروگرم/ میلی‌لیتر تعیین کردند [۱۷] که از مطالعه حاضر مقدار آن پایین‌تر بود. جوس (Jose) و همکاران در ۲۰۱۳ به بررسی حساسیت ضد قارچی گونه‌های کاندیدیایی نسبت به داروی فلوکونازول در زنان مبتلا به ویروس ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS)، پرداختند. در این 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 میکرودیوشن، ۶۴ میکروگرم/ میلی‌لیتر به‌دست آمد [۱۸] که در مقایسه با مطالعه حاضر، مقدار MIC 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 (۶۴ میکروگرم/ میلی‌لیتر $MIC \geq$) داشتند، بررسی کردند [۵]. MIC جدایه‌های مقاوم مورد بررسی در مقالات ذکر شده فوق، در مقایسه با MIC به‌دست آمده در مطالعه حاضر (۱۰۲۴ و ۵۱۲ 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 (۶۴ میکروگرم/ میلی‌لیتر $MIC \geq$)

افزایش سطح بیان ژن‌های کدکننده لانوسترول α - ۱۴ دمتیلاز (ERG11) و پمپ‌های انتشار [MDR (Multiple Drug Resistance) و (Candida Drug Resistance) CDR] و جهش‌های نقطه‌ای در ERG11 را گزارش کردند [۵]. سنگلارد (Sanglard) و همکاران مشاهده کردند که جهش G464S و G129A باعث افزایش مقاومت به فلوکونازول می‌شود [۱۹]. ژو (Xu) و همکاران در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول جهش‌های G487T و T916C در ژن ERG11 گزارش دادند [۴]. 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 [۲۰]. امروزه بیش از ۶۰ نوع جابه‌جایی آمینواسیدی در پروتئین Erg11 گزارش شده که حداقل ۳۰ نوع از آن‌ها در جدایه‌های مقاوم به آزول‌ها شناسایی شده‌است. با این حال اهمیت این جابه‌جایی‌ها بین انواع آزول‌ها بسیار متغیر است. به‌طوری‌که جابه‌جایی‌هایی نظیر Y132H, G450E, G464S, R467K و S405F به‌نظر می‌رسد در حساسیت به فلوکونازول و ووریکونازول (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 شده‌است. اغلب سویه‌های کاندیدا آلبیکنس دیپلوئید هستند. در نتیجه جهش‌های نوکلئوتیدی ممکن است به‌صورت جابه‌جایی‌های هموزیگوس (در هر دو آلل) یا هتروزیگوس (تنها در یک آلل) باشد. همچنین مطالعات نشان داده‌است که پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (Single nucleotide polymorphisms: SNP) در ژن ERG11 ممکن است در ایجاد مقاومت با تغییر در

این آنتی بیوتیک به طور فزاینده ای رو به افزایش است که زنگ خطری برای درمان آنتی بیوتیکی عفونت های کاندیدایی در کشور محسوب می شود. روش های مولکولی به کار گرفته شده در این مطالعه قادر بودند به طور موفقیت آمیزی ارتباط فنوتیپ مقاومت و ماهیت ژنتیکی آن ها را نشان دهد. در مطالعات دیگران تا به حال مقاومت در این حد MIC~512-1024 گزارش نشده است. از سوی دیگر؛ بر اساس مطالعات انجام شده وجود مقاومت بالا در جدایه های مورد مطالعه ممکن است نتیجه تغییر و جهش در چندین ژن مرتبط به مقاومت به آزول ها نظیر CDR1، ERG3، MDR1 یا دیگر ژن ها باشد [۸] که به آزمایش های تکمیلی در این زمینه در آینده نیاز دارد. شناسایی جهش های ژنی ایجاد کننده مقاومت به آنتی بیوتیک ها در عفونت های قارچی می تواند گام مهمی برای درمان به هنگام بیماری با جایگزینی داروهای مناسب باشد.

تشکر و قدردانی

این پروژه از طریق پژوهانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به شماره قرارداد ۴/۵۸۳۰ تأمین اعتبار شده است. از جناب مهندس رضا پورسینی که در انجام آزمایش ها کمک شایانی فرمودند تشکر فراوان داریم.

آمینواسیدهای این ژن مؤثر باشد [۱۰]. این SNP ها به نظر می رسد در افزایش مقاومت به دارو مؤثر باشد اما مستقیماً و به تنهایی باعث مقاومت نشده اند. در این مطالعه در جدایه های مقاوم به فلوکونازول پلی مورفیسم D116E در ژن ERG11 شناسایی شد. جدایه های ۱۵، ۱۶ و ۲۳ در این مطالعه با MIC حدود ۵۱۲ و ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی لیتر پلی مورفیسم D116E در موقعیت ۱۱۶ (تغییر تایمیدین به آدنین) را نشان دادند که باعث تبدیل آسپارتیک اسید به گلوتامیک اسید شده است. جهش D116E در چندین مطالعه در جدایه های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول گزارش شده است [۸، ۲۱، ۲۲] در حالی که جهش V456G اولین بار در ایران گزارش می شود. این دو جهش که در یکی از سه ناحیه داغ جهش پذیری ژن ERG11 قرار گرفته است، به نظر می رسد که در اتصال مهارکننده یا سوستر به آنزیم مؤثر باشد و جهش در آن باعث تغییر ساختار آنزیم و در نتیجه تغییر در تمایل آن به اتصال به آن دو شود [۲۲]. این امر نیز به نظر می رسد در ایجاد مقاومت با اتصال غیر مؤثر به دارو نقش داشته باشد.

نتایج بررسی مقاومت به آزول ها به ویژه فلوکونازول در این مطالعه و مقایسه آن با نتایج حاصل از تحقیقات دیگران در ایران و کشورهای دیگر نشان داد که میزان مقاومت نسبت به

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

- 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 DNA sequencing. *BMC Microbiol* 2009; 9: 167.
- [11] Gołabek K, Strzelczyk JK, Owczarek A, Cuber P, Ślęmp-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,

- 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, Slempl-Migiel A, Rother M, Gołabek K, Wiczowski 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.