Archive of SID

Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 13, Number 1 (March - April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Investigation of Mutations of *ERG11* Gene in Fluconazole Resistant Strains of *Candida Albicans* Isolated From Patients With Volvovaginitis in West of Mazandaran

Masoumeh Majdi[1], Zeinab Khazaei Koohpar[1*], Ayatollah Nasrollahi Omran[2]

1. *Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran*
2. *Department of Medical Mycology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran*

Article Information

Article Subject:
Molecular Microbiology

DOI:

Corresponding author:

Zeinab Khazaei Koohpar, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

Email:
khazaei@toniau.ac.ir

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: *Candida albicans* as an opportunistic fungal pathogen in human is the cause of volvovaginitis candidiasis. Azole resistance is cinsiderable as worldwide problem in treatment of candidiasis. Azole resistance can occur through different mechanisms such as mutation in *ERG11* gene. The aim of our study was evaluation of *ERG11* gene mutations in fluconazole resistant islotes of *C. albicans* obtained from patients with volvovaginitis in west of Mazandaran.

Materials and Methods: In this study, clinical specimens were obtained from vaginal mucosa of 120 individual. *C. albicans* isolates were identified by standard methods such as germ tubes and culture in chrome agar media. Susceptibility test to fluconazole in the isolates was evaluated by Disc diffusion and MIC methods. After DNA extraction, *ERG11* gene mutations in clinical isolates were determined by PCR-sequencing method.

Results: From 45 isolates of *C. albicans*, 40 isolates were resistant to fluconazole. The MIC of fluconazole in isolates was determined between 2 to 64µg/ml. Also, sequencing analysis showed that 7 fluconazole resistant isolates had three missense mutations (D116E, K128T and A114S) in *ERG11* gene.

Conclusion: It apears that high frequency of floconazol resistance is the results of different reasons such as mutations in *ERG11* gene in *C. albicans* isolates.

Keywords: *Candida albicans*, ERG11, Fluconazole, MIC, Mutation

Received: 2017/10/23 Accepted: 2019/05/16 Available online: 2019/06/20

Copyright © 2019 Iranian Journal of Medical Microbiology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

How to cite this article:

Majdi M, Khazaei Koohpar Z, Nasrollahi Omran A. Investigation of Mutations of ERG11 Gene in Fluconazole Resistant Strains of Candida Albicans Isolated From Patients With Volvovaginitis in West of Mazandaran. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (1) :14-21

www.SID.ir

Archive of SID

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ ـ شماره ۱ ـ فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

مقاله پژوهشی

بررسی جهش‌های ژن *ERG11* در سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول جداشده از افراد مبتلا به ولوواژینیت در غرب مازندران

معصومه مجدی[۱]، زینب خزائی کوهپر[۱*]، آیت‌الله نصرالهی عمران[۲]

۱. گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

۲. گروه قارچ‌شناسی پزشکی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۰۱

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۲۶

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۰۳/۳۰

موضوع:

میکروب‌شناسی مولکولی

IJMM1398;13(1): 14-21

نویسندهٔ مسئول:

زینب خزائی کوهپر

گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

پست الکترونیک:

dz.khazaei@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: *کاندیدا آلبیکنس* نوعی پاتوژن قارچی فرصت‌طلب در انسان است که باعث ولوواژنیت کاندیدیایی می‌شود. مقاومت به آزول مشکلی جهانی در درمان کاندیدیازیس است. مقاومت به آزول می‌تواند از طریق مکانیسم‌های متفاوتی نظیر جهش در ژن *ERG11* رخ دهد. هدف از این مطالعه، ارزیابی جهش‌های ژن *ERG11* در جدایه‌های *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول به‌دست آمده از افراد مبتلا به ولوواژینیت در غرب مازندران بود.

مواد و روش‌کار: در این مطالعه نمونه‌های کلینیکی از مخاط واژینال ۱۲۰ فرد جداسازی شد. جدایه‌های *کاندیدا آلبیکنس* با استفاده از روش‌های استاندارد همچون لوله زایا و کشت در محیط کروم آگار شناسایی شدند. تست حساسیت به فلوکونازول در جدایه‌ها به روش‌های دیسک دیفیوژن و MIC ارزیابی شد. بعد از استخراج DNA، جهش‌های ژن *ERG11* در جدایه‌های کلینیکی به روش PCR-توالی یابی تعیین شد.

یافته‌ها: از ۴۵ جدایه *کاندیدا آلبیکنس*، ۴۰ جدایه به فلوکونازول مقاوم بودند. MIC فلوکونازول در جدایه‌ها بین ۲ تا ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. همچنین تحلیل تعیین توالی نشان داد ۷ جدایه مقاوم به فلوکونازول سه جهش بدمعنی (D116E، K128T، A114S) در ژن *ERG11* داشتند.

نتیجه‌گیری: به نظر می رسد فرکانس بالای مقاومت به فلوکونازول در این مطالعه نتیجه عوامل مختلفی از جمله وقوع جهش در ژن *ERG11* در جدایه‌های *کاندیدا آلبیکنس* باشد.

کلمات کلیدی: *کاندیدا آلبیکنس*، *ERG11*، فلوکونازول، MIC، جهش

کپی‌رایت © مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) یکی از مهم‌ترین مخمرهای بیماری‌زای انسان و رایج‌ترین گونه‌ای است که در واژن ۲۰ تا ۵۰ درصد از زنان سالم وجود دارد (۱، ۲). کاندیدا یکی از فلورهای قارچی طبیعی در انسان است که می‌تواند در سطوح مخاطی و پوست کلونیزه شود و در شرایط خاص میزبان از قبیل نقص سیستم ایمنی ناشی از سرطان، پیوند اعضا، عفونت HIV و همچنین در افراد دیابتی بیماری ایجاد کند. کاندیدیازیس، عفونتی است که توسط گونه‌های کاندیدا به خصوص *کاندیدا آلبیکنس* (۳) ایجاد می‌شود. طی دو دههٔ اخیر به دلیل استفاده وسیع از آنتی‌بیوتیک‌ها، استروئیدها و سایر داروهای سرکوبگر ایمنی، فراوانی و شدت این عفونت‌ها افزایش چشمگیری داشته است (۴). برخی ترکیبات دارویی ضدقارچ همچون آزول‌ها برای درمان کاندیدیازیس ولوواژینال (*vulvovaginal Candidiasis*) به کار می‌روند (۳). خانواده آزول نظیر فلوکونازول، ایتراکونازول و وریکونازول با مهار سیتوکروم P450 (Erg11p) در بیوسنتز ارگوسترول تداخل ایجاد می‌کند (۵). ارگوسترول یک ترکیب ضروری در غشای پلاسمایی قارچ است که در حفظ پایداری غشا و مقاومت در برابر تنش‌ها نقش دارد و نبود آن به تجزیهٔ سلول منجر می‌شود (۳). چندین مکانیسم مقاومت به آزول‌ها شناسایی شده که شامل افزایش

www.SID.ir

Archive of SID

بیان *ERG11*، کاهش تمایلErg11p به آزول در اثر جهش در ژن کدکنندهٔ آن، از دست‌دادن توان محبوس‌کردن آزول توسط سلول در اثر افزایش بیان ژن‌های درگیر در سیستم‌های پمپ افلاکس نظیر CDR1، CDR2 و MDR1 و جهش در ژن ERG3 و مهار بیوسنتز ارگوسترول است (۶). آنزیم لانوسترول ۱۴ آلفا دمتیلاز آنزیمی مهم در سنتز ارگوسترول است. این آنزیم مورد هدف فلوکونازول است که با تضعیف سنتز ارگوسترول و حذف ارگوسترول در غشای سلول قارچ آن را مهار می‌کند. لانوسترول ۱۴ آلفا دمتیلاز با ژن *ERG11* رمزگذاری می‌شود (۳). جهش در ژن *ERG11* منجر به کاهش تمایل آزول‌ها به محصول پروتئینی این ژن و درنتیجه ایجاد مقاومت به دارو در جدایه‌های *کاندیدا آلبیکنس* می‌شود. در مطالعات قبلی مشخص شده است که *ERG11* سه ناحیه داغ جهش‌پذیری (Hotspot Regions) مطابق با آمینواسیدهای ۱۰۵ تا ۱۶۵، ۲۶۶ تا ۲۸۷ و ۴۰۵ تا ۴۸۸ دارد که جابه‌جایی‌های بازی در آنها به وفور رخ می‌دهد (۷). در این نواحی هم در جدایه‌های حساس و هم مقاوم به آزول‌ها جهش رخ می‌دهد. مطالعات نشان داده است بین وقوع جهش‌های خاص در بعضی نواحی و مقاومت به آزول‌ها ارتباط وجود دارد (۸)؛ به عنوان نمونه در مطالعه White و همکاران (۲۰۰۲) و Wang و همکاران (۲۰۱۵) در جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول و در مطالعه Xiang و همکاران (۲۰۱۳) و Manastir و همکاران (۲۰۱۱) در بعضی جدایه‌های حساس به فلوکونازول جهش D116E شناسایی شد (۹-۱۲).

در مطالعات مختلف صدها جهش در این ژن شناسایی شده که بسیاری از آنها در جدایه‌های مقاوم گزارش شده‌اند. با این حال بین بعضی جهش‌ها (پلی‌مورفیسم‌ها) و مقاومت به دارو ارتباط معنی‌داری شناسایی نشده و این گروه از جهش‌ها در جدایه‌های حساس نیز گزارش شده است. بنابراین لازم است در مناطق مختلف، جهش‌ها یا پلی‌مورفیسم‌های موجود در ژن *ERG11* در جدایه‌های مقاوم و حساس بررسی شود و با مطالعات بیشتر از جمله مطالعات بیوانفورماتیک، بین موقعیت جهش و تغییر در فعالیت پروتئین حاصل ارتباط پیدا کرد (۱۳). هدف از این مطالعه، شناسایی جهش‌های ژن *ERG11* به عنوان یکی از عوامل ایجادکننده مقاومت به فلوکونازول در جدایه‌های *کاندیدا آلبیکنس* در غرب مازندران به روش PCR-sequencing بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت جدایه‌های مخمر *کاندیدا آلبیکنس*

در این مطالعه مقطعی توصیفی که در طی سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۵ انجام گرفت، ۱۲۰ نمونه از نمونه‌های بالینی ترشحات واژن بیماران مشکوک به عفونت کاندیدایی واژینال مراجعه‌کننده به بیمارستان‌ها و مراکز بهداشتی درمانی غرب مازندران (رامسر، تنکابن، نشتارود، سلمان‌شهر و کلارآباد) توسط متخصص زنان و زایمان بعد از گرفتن مجوز از کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی (کد IR.GUMS.REC.1395.25) تهیه و تشخیص داده شد. نمونه‌ها در لوله‌های حاوی نرمال سالین (سرم فیزیولوژی) قرار گرفتند و سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس در محیط کشت سابرود دکستروز آگار (Sabouraud dextrose agar) (شرکتMerck آلمان)، به همراه کلرامفنیکل کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. در ادامه، شناسایی *کاندیدا آلبیکنس* بر اساس مورفولوژی کلنی، تشکیل لوله زایا و تعیین رنگ کلنی‌ها در محیط کروم آگار کاندیدا (شرکت CHROMagar، فرانسه) انجام گرفت. از سویه PTCC 5027 (ATCC10231) به عنوان سویه حساس و کنترل استفاده شد.

سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی

به منظور تعیین الگوی حساسیت دارویی، حساسیت یا مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک فلوکونازول، دیسک‌های داروی فلوکونازول (۲۵ میکروگرم) (کمپانی HiMedia، هند) به روش کربی بائر (انتشار از دیسک) بررسی شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن طبق استاندارد CLSI 2013 گزارش شد (جدول ۱).

تعیین Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی آنتی‌بیوتیک فلوکونازول، ابتدا جدایه‌ها در محیط کشت سابورودکستروز براث حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس رقت‌های متوالی آنتی‌بیوتیک فلوکونازول در محدوده غلظت ۰/۱۲۵-۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر، همراه با *کاندیدا آلبیکنس* ($۰/۲۵-۰/۵\times۱۰^{۳}$) و محیطRPMI در میکروپلیت ۹۶ خانه تهیه شد. بعد از ۲۴ ساعت کشت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور شیکردار میزان MIC بر اساس استاندارد CLSI تعیین شد (جدول ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. مقادیر MIC و قطر هالهٔ عدم رشد استاندارد برای جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس بر اساس روش CLSI

داروی ضدقارچ	غلظت آنتی‌بیوتیک در هر دیسک (µgr)	قطر هاله (mm)			مقدار MIC (gr/ml)		
		S	S-DD	R	S	S-DD	R
فلوکونازول	۱۰ µgr	≥۱۹	۱۸-۱۵	≤۱۴	≤۸	۲۳-۱۶	≥۶۴

حساس وابسته به دوز S-DD ، حساس= S ، مقاوم=R

جدول ۲. مشخصات جفت پرایمر استفاده‌شده در واکنش PCR (۱۴)

طول محصول PCR	توالی پرایمر	نام پرایمر
483 bp	5´- TTAGTGTTTTATTGGATTCCTTGGTT -3´	ERG11-1F
	5´-TCTCATTTCATCACCAAATAAAGATC-3´	ERG11-1R

تخلیص DNA ژنومی

جدایه‌های *کاندیدا آلبیکنس* در محیط سابورود دکستروز براث (Merck ، آلمان) کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس تخلیص DNA به روش جوشاندن (Boiling) صورت گرفت. در ادامه برای اطمینان از صحت تخلیص، نمونه‌های DNA در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و بررسی شد.

واکنش PCR و تعیین توالی ژن *ERG11*

بعد از تخلیص DNA ژنومی، اجزای واکنش PCR با استفاده از کیت AccuPower Pfu PCR PreMix (شرکت تکاپوزیست) در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر با افزودن DNA ژنومی (۳ میکرولیتر) و جفت پرایمر(۲۰ پیکو مول) (هر کدام ۱میکرولیتر) به مستر میکس (حاوی آنزیم، کوفاکتور و بافر مخصوص در حجم ۵ میکرولیتر) و ۲۰ میکرولیتر از آب دیونیزه آماده شد. شرکت Bioneer (کره جنوبی) سنتز پرایمرها (۱۴) را انجام داد (جدول ۲). واکنش PCR با استفاده از ترموسایکلر (TUCH ، آمریکا) طبق برنامه زیر انجام شد: یک مرحله واسرشت‌شدن ابتدایی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ سیکل به ترتیب در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه.

بعد از اطمینان از تک‌باند بودن محصولات PCR، نمونه‌ها با حفظ زنجیرهٔ سرمایی توسط شرکت تکاپوزیست (ایران، تهران) به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. نمونه‌ها توسط شرکت Bioneer تعیین توالی شد. سپس نتایج حاصل از توالی‌یابی به کمک نرم‌افزار CLC main workbench v3.5 و نرم‌افزار آنلاین بلاست (BLAST) از نظر وجود جهش در نمونه‌های مقاوم در مقایسه با نمونه استاندارد رفرنس موجود در سایت NCBI بررسی شد.

یافته‌ها

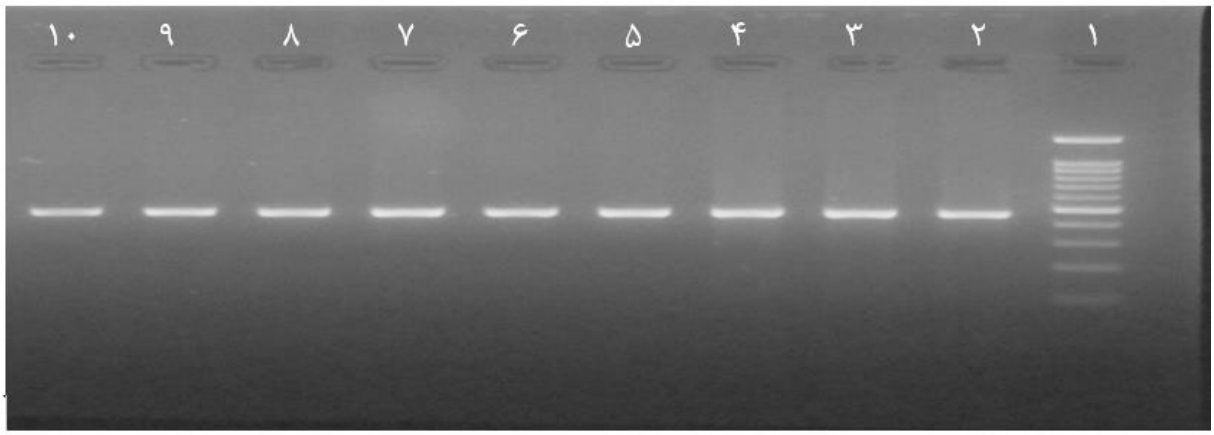
در این مطالعه مقطعی از زنان در محدودهٔ سنی ۲۰ تا ۴۵ سال که حدود ۶۰ درصد از آنها کاندیدیازیس عودکننده داشتند نمونه‌گیری شد. از بین ۵۰ نمونه کاندیدای شناسایی‌شده در این تحقیق، با تست‌های تشخیصی از جمله کشت در محیط کروم آگار ۴۵ نمونه *کاندیدا آلبیکنس* و ۵ نمونه *کاندیدا کروزویی* گزارش شد. از بین ۴۵ جدایه *کاندیدا آلبیکنس* شناسایی‌شده، به روش انتشار از دیسک ۴۰ نمونه (۸۹ درصد) مقاوم و ۵ نمونه (۱۱ درصد) حساس به فلوکونازول گزارش شد. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی دارو (MIC) به روش براث دایلوشن برای نمونه‌های حساس و مقاوم تعیین شد. نتایج MIC، نتایج روش انتشار از دیسک را تأیید کرد. نمونه‌های حساس به روش انتشار دیسک MIC بین ۲ تا ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر و همهٔ جدایه‌های مقاوم MIC ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر داشتند.

جهش‌های ژن *ERG11* در جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول

بعد از انجام واکنش PCR (شکل ۱)، بر اساس نتایج تعیین-توالی (جدول ۳) در ۱۸ جدایه جهش‌های خاموش شناسایی شد. در شش جدایه جهش بدمعنی D116E به صورت هتروزایگوت گزارش شد که در کدون M-116، آسپارتیک اسید به گلوتامیک اسید تبدیل شده بود (شکل ۲). همچنین در یک جدایه مقاوم جهش بدمعنی K128T به صورت هتروزایگوت بود که در کدون M-128، لایزین به تیروزین تبدیل شده بود (شکل ۳). در یک جدایه مقاوم نیز جهش بدمعنی A114S به صورت هموزایگوت گزارش شد که در کدون M-114، آلانین به سرین تبدیل شده بود (شکل ۴).

www.SID.ir

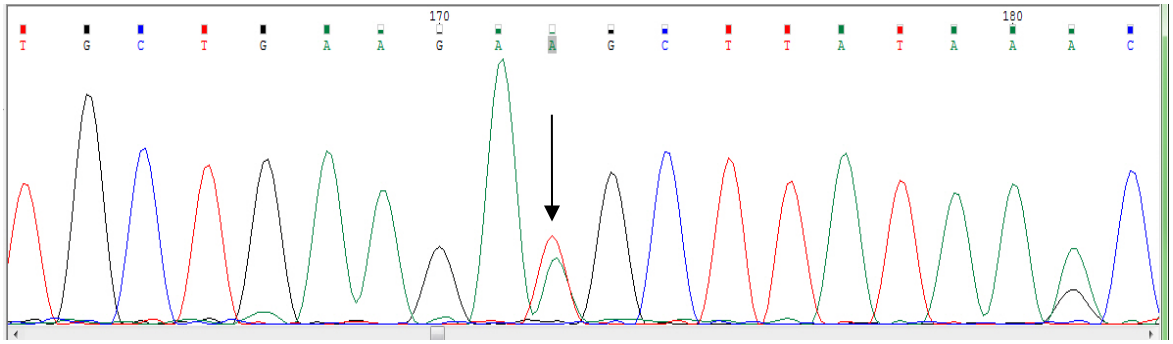
Archive of SID



شکل ۱. محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد. ستون ۱: DNA مارکر ۱۰۰جفت بازی، ستون‌های ۲ تا ۱۰: محصولات PCR مربوط به جفت پرایمر ۱ با طول ۴۸۳ جفت باز

جدول ۳. تغییرات بازی و آمینواسیدی ایجادشده در ژن ERG11 در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول

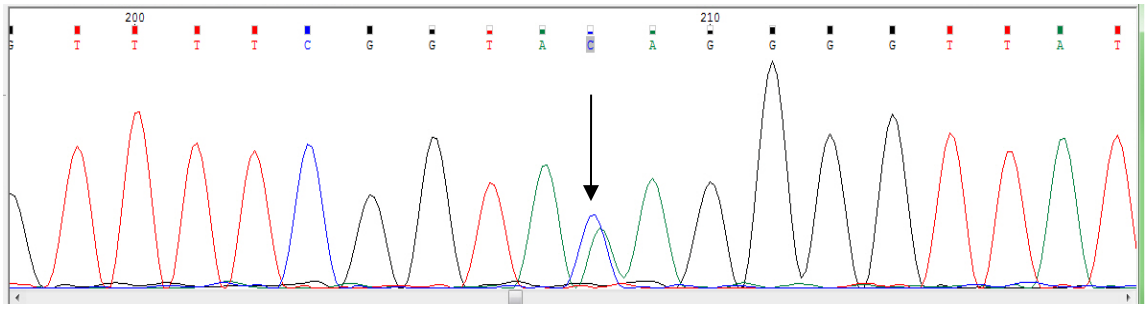
تغییر آمینواسیدی	تغییر بازی	تعداد جدایه‌های دارای جهش (درصد)
F72F	TTC(Phe)>TTT(Phe)	(۱۵) ۶
F105F	TTT(Phe)>TTC(Phe)	(۴۵) ۱۸
A114S	GCT(Ala)>TCT(Ser)	(۲/۵) ۱
D116E	GAT(Asp)>GAA(Glu)	(۱۵) ۶
K119K	AAA(Lys)>AAG(Lys)	(۱۵) ۶
K128T	AAA(Lys)>ACA(Thr)	(۲/۵) ۱
S137S	TCC(Ser)>TCA(Ser)	(۴۵) ۱۸
L161L	AAG(Lys)>AAA(Lys)	(۲/۵) ۱
H183H	CAT(His)>CAC(His)	(۲۷) ۱۱



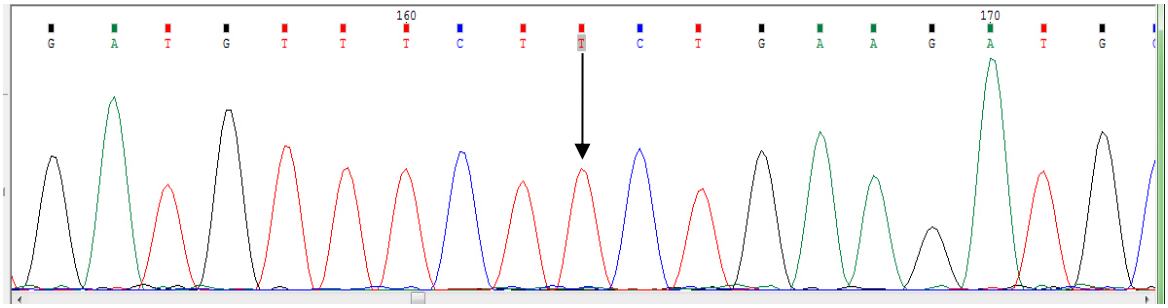
شکل ۲. الکتروفروگرام مربوط به تغییر باز T به A در کدون ۱۱۶ با تغییر کدونی (GAT(Asp)>GAA(Glu) و تغییر آمینواسیدی D116E

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. الکتروفروگرام مربوط به تغییر باز A به C در کدون ۱۲۸ با تغییر کدونی (AAA(Lys)>ACA(Thr) و تغییر آمینواسیدی K128T



شکل ۴. الکتروفروگرام مربوط به تغییر باز G به T در کدون ۱۱۴ با تغییر کدونی (GCT(Ala)>TCT(Ser و تغییر آمینواسیدی A114S

بحث

کاندیدا پاتوژن فرصت‌طلبی است که قادر به ایجاد بیماری در افراد دارای نقص ایمنی و یا ایمنی تضعیف‌شده است. کاندیدیازیس عفونتی است که توسط گونه‌های مختلف کاندیدایی، به‌خصوص *کاندیدا آلبیکنس*، ایجاد می‌شود (۸). فلوکونازول یکی از داروهای اصلی ضدقارچ درمان عفونت‌های کاندیدیایی (کاندیدیازیس) است (۱۲). در این مطالعه برای اولین بار در غرب مازندران جهش در ژن *ERG11*، یکی از مهم‌ترین علل ایجاد مقاومت به فلوکونازول در زنان دچار ولوواژینیت، بررسی و سه جهش D116E، K128T و A114S در جدایه‌های مقاوم به این دارو شناسایی شد.

در مطالعه Xu و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی ۴۲۶ ایزوله جمع‌آوری‌شده از بیماران غیرایدزی که ۶۸/۶ درصد از موارد *کاندیدا آلبیکنس* بودند تنها ۵/۱ درصد مقاوم به فلوکونازول بود (۱۴). در مطالعهٔ Wang و همکاران در سال ۲۰۱۵ مشخص شد که در بین ۳۰۲ جدایهٔ *کاندیدا آلبیکنس* حدود ۸/۵ درصد موارد مقاوم به فلوکونازول بودند (۱۰). در مطالعه Ungureanu و همکاران در سال‌های ۲۰۱۴ تا ۲۰۱۵ بر روی ۴۰۲۷ بیمار، ۶۲۵ جدایه *کاندیدا آلبیکنس* همگی مقاوم به فلوکونازول (۱۰۰ درصد) و همگی حساس به کلوتریمازول و کتوکونازول بودند (۱۵). در مطالعه Farahbakhsh و همکاران در سال ۲۰۱۲ مشخص شد که ۲۸/۷ درصد جدایه‌های حاصل از کاندیدیازیس دهانی در مبتلایان به HIV مقاوم به فلوکونازول هستند (۱۶). در مطالعهٔ Nasrollahi و Omran و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی ۴۶ جدایه *کاندیدا آلبیکنس*، ۱۴ جدایه (۰/۳۰) مقاوم به فلوکونازول شناسایی شد (۱۷). در مطالعهٔ Mohammadi-Ghalehbin و همکاران در شهر اردبیل در سال ۲۰۱۷ از ۱۱۸ *کاندیدا آلبیکنس* جداشده از زنان باردار، مقاومت به فلوکونازول در ۹۷ جدایه (۰/۸۲) گزارش شد (۱۸). در مطالعه Balabandi و همکاران در سال های ۲۰۱۵ و ۲۰۱۶ از ۲۳ جدایه *کاندیدا آلبیکنس* جداشده از زنان دچار ولوواژینیت در شهر رشت، ۲۰ جدایه (۰/۸۷) به فلوکونازول مقاوم بودند (۸).

بر اساس تحقیقات صورت‌گرفته موضع عفونت کاندیدیایی و شیوع آن در هر منطقه جغرافیایی و همچنین مصرف نادرست دارو باعث شده است نرخ متفاوتی از مقاومت به فلوکونازول در کشور و دیگر نقاط جهان گزارش شود. با این حال نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهندهٔ نرخ بالای مقاومت به این دارو در مبتلایان به کاندیدیازیس واژینال در استان مازندران است. در مطالعات Xu در سال ۲۰۰۸ و Wang در سال ۲۰۱۵ هر دو در چین درصد مقاومت کمتر از ۱۰ درصد مشاهده شد. ممکن است درصد کم مقاومت به این دارو در این کشور به دلیل استفاده صحیح از آنتی بیوتیک‌ها و یا استفاده‌نکردن از این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها باشد که طی ۷ سال افزایش چندانی در مقاومت به دارو ایجاد نشده است. همچنین در مطالعات Nasrollahi Omran در مازندران و Farahbakhsh در تهران به ترتیب در سال‌های ۲۰۱۵ و ۲۰۱۲

www.SID.ir

Archive of SID

فراوانی مشابهی از مقاومت به دارو مشاهده شده بود. که در مطالعات جدیدتر (Mohammadi-Ghalehbin و Balabandi) افزایش مقاومت به دارو مشاهده شد. این امر ممکن است به دلایل مختلف از جمله مصرف نادرست و بی‌رویه این دارو و ایجاد جهش‌های مختلف در سویه‌ها رخ داده باشد. در تأیید این موضوع مطالعه Ungureanu (۲۰۱۶) در رومانی نیز مقاومت بالایی نشان داده است که نشان می‌دهد در بعضی کشورها یا مناطق افزایش مقاومت به این دارو همچنان از مشکلات مهم محسوب می‌شود و لازم است در مراکز بهداشتی و درمانی استان و همچنین کشور برای درمان این گروه از عفونت‌ها راهکارهای مناسب‌تری لحاظ شود.

در ایجاد مقاومت به آزول‌ها مکانیسم‌های مختلفی نقش دارند. آزول‌ها با اتصال اتم N خود به گروه هم موجود در Erg11p و اشغال جایگاه اتصال سوبسترا باعث مهار فعالیت سیتوکروم P450 می‌شوند. جهش در *ERG11* می‌تواند با تغییرات ساختاری، تمایل آزول‌ها را به این پروتئین کاهش دهد (۱۲). تغییرات ساختاری در Erg11p نتیجه جهش‌هایی است که در نواحی خاصی از ژن *ERG11* به نام نقاط داغ رخ می‌دهد. نرخ جهش‌پذیری بالا در این نواحی نشان‌دهندهٔ اهمیت این نواحی در عملکرد یا ساختار صحیح پروتئین است (۱۳). در این مطالعه از جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول در ۱۵ درصد جدایه‌ها، جهش در کدون ۱۱۶ (D116E) در ژن *ERG11* مشاهده شد. همچنین در ۲/۵ درصد جدایه‌ها جهش در کدون ۱۱۴ (A114S) و ۲/۵ درصد جدایه‌ها جهش در کدون ۱۲۸ (K128T) در ژن *ERG11* مشاهده شد. این جهش‌ها در اولین نقاط داغ جهش‌پذیر در ژن *ERG11* رخ داده است.

در مطالعه Xiang و همکاران در ۲۰۱۳، از جدایه‌های مقاوم و نیمه‌حساس به فلوکونازول جهش‌های D116E، A114S وK128T شناسایی شد که در رابطه با مقاومت ارتباط معناداری نداشت (۱۱).

در مطالعهٔ Xu و همکاران در سال ۲۰۰۸، درصد بالایی از جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول جهش D116E، A114S وK128T داشتند که با درصد کمتری در مطالعه حاضر تطابق دارد (۱۴). در مطالعهٔ Rosana و همکاران در سال ۲۰۱۵، شش جابه‌جایی در ژن *ERG11* از جمله D116E شناسایی شد(۱۹). در مطالعه Perea و همکاران در سال ۲۰۰۱، هر دو جدایه‌های مقاوم و حساس به فلوکونازول دارای جهش‌های D116E وK128T بودند که در مطالعه حاضر فقط در نمونه‌های مقاوم این دو جهش دیده شد (۲۰). بر اساس مطالعات مختلف به نظر می‌رسد این جهش‌ها به تنهایی قادر به تغییر ساختار ERG11p نیستند و همراهی جهش در دیگر نواحی با این جهش‌ها می‌تواند باعث تغییر ساختار ERG11p، کاهش تمایل آن به داروهای آزولی و در نتیجه ایجاد مقاومت به آزول‌ها شود.

همچنین میزان بالا MIC تعیین‌شده برای جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول در این مطالعه نشان‌دهندهٔ وجود چندین عامل تشدیدکننده مقاومت به این دارو در این جدایه‌ها است. به طوری که در مطالعهٔ Perea و همکاران،MIC ≥۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای فلوکونازول در جدایه‌های *کاندیدا آلبیکنس* تعیین شد. در این جدایه‌ها علاوه بر جهش‌های نقطه‌ای ERG11، افزایش سطح بیان ژن‌های کدکننده لانوسترول ۱۴ آلفا دمتیلاز (*ERG11*) و پمپ‌های انتشار (CDR و MDR) نیز گزارش شد (۲۰). در مطالعه حاضر میزان MIC فلوکونازول تا غلظت ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد که نشان‌دهندهٔ افزایش غلظت بی‌اثر فلوکونازول در نمونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* جداشده از زنان مبتلا به ولوواژینیت در غرب مازندران است. این امر می‌تواند به دلیل مصرف بی‌رویه و نادرست دارو در زمان ابتلا به این عفونت و همچنین ایجاد انواع جهش‌های القاکنندهٔ مقاومت به این دارو از جمله در ژن *ERG11* و افزایش بیان چندین ژن چون *ERG11*، *CDR1*، *CDR2* و *MDR1* باشد که به مطالعات بیشتری در این زمینه نیازمند است.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه نرخ بالای مقاومت به فلوکونازول در جدایه‌های *کاندیدا آلبیکنس* به همراه جهش‌های D116E، K128T و A114S در ژن *ERG11* مشاهده شد. بنابراین همراهی این جهش‌ها با مقاومت تنها علت افزایش مقاومت در استان نیست و به مطالعات بیشتری در این زمینه از جمله بررسی بیان ژن‌هایی چون *ERG11*، *CDR1*، *CDR2* و *MDR1* در جدایه‌های مقاوم در استان نیاز است.

سپاسگزاری

این مقالهٔ تحقیقاتی حاصل پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی است. نویسندگان مقاله از تمام کسانی که در انجام این پژوهش همکاری صمیمانه داشته‌اند سپاسگزاری می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Gavanji S, Larki B. Comparative Effect of Propolis of Honey Bee and Some Herbal Extracts on Candida Albicans. Chinese Journal of Integrative Medicine. 2017; 23(3):201-7.
2. Kabir MA, Hussain MA, Ahmad Z. Candida Albicans: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. ISRN Microbiology. 2012; 2012:538694.
3. Pam VK, Akpan JU, Oduyebo OO, Nwaokorie FO, Fowora MA, Oladele RO, et al. Fluconazole Susceptibility and Erg11 Gene Expression in Vaginal Candida Species Isolated From Lagos Nigeria. International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics. 2012;3(1):84-90.
4. Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeaupuis JP, et al. Molecular Diagnosis and Epidemiology of Fungal Infections. Medical Mycology. 1998; 36(Suppl 1):249-57.
5. Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille J. Candida Albicans Mutations in the Ergosterol Biosynthetic Pathway and Resistance to Several Antifungal Agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2003; 47(8):2404-12.
6. Cernicka J, Subik J. Resistance Mechanisms in Fluconazole-Resistant Candida Albicans Isolates From Vaginal Candidiasis. International Journal of Antimicrobial Agents. 2006; 27(5):403-8.
7. Flowers SA, Colon B, Whaley SG, Schuler MA, Rogers PD. Contribution of Clinically Derived Mutations in Erg11 to Azole Resistance in Candida Albicans. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2015; 59(1):450-60.
8. Balabandi S, Khazaei -Koohpar Z, Ranji N. Correlation Between Erg11 Gene Mutations and Fluconazole Resistance in Candida Albicans Strains Isolates Isolated in From Rasht in 2015-2016 Years. Arak Medical University Journal. 2017; 20(7):13-22.
9. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance Mechanisms in Clinical Isolates of Candida Albicans. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002; 46(6):1704-13.
10. Wang B, Huang LH, Zhao JX, Wei M, Fang H, Wang DY, et al. ERG11 Mutations Associated With Azole Resistance in Candida Albicans Isolates From Vulvovaginal Candidosis Patients. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2015; 5(11):909-14.
11. Xiang MJ, Liu JY, Ni PH, Wang S, Shi C, Wei B, et al. Erg11 Mutations Associated With Azole Resistance in Clinical Isolates of Candida Albicans. FEMS Yeast Research. 2013; 13(4):386-93.
12. Manastir L, Ergon MC, Yucesoy M. Investigation of Mutations in Erg11 Gene of Fluconazole Resistant Candida Albicans Isolates From Turkish Hospitals. Mycoses. 2011; 54(2):99-104.
13. Debnath S, Addya S. Structural Basis for Heterogeneous Phenotype of ERG11 Dependent Azole Resistance in C.Albicans Clinical Isolates. SpringerPlus. 2014; 3:660.
14. Xu Y, Chen L, Li C. Susceptibility of Clinical Isolates of Candida Species to Fluconazole and Detection of Candida Albicans ERG11 Mutations. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008; 61(4):798-804.
15. Ungureanu A, Gaman AE, Turculeanu A, Mitroi M, Drocas AI, Dobritoiu M, et al. Incidence and Antifungal Susceptibility of Candida Albicans Infections. Current Health Sciences Journal. 2016; 42(2):164-8.
16. Farahbakhsh E, Yadegari MH, Rajabi Bazl M, Taghizadeh Armaki M, Katiraee F. Identification of Fluconazole Resistance Gene Erg11 in Clinical Candida Albicans Samples Isolated From Hiv-Infected Patients by Reverse Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Daneshvar. 2012; 19(96):19-28.
17. Nasrollahi Omran A, Nazemi A, Kihanian S, Aryana N. Lipase Gene Expression of Resistant and Sensitive Candida Albicans to Fluconazole Isolated From Patients Suffering From Oral Candidiasis and Vaginal Candidiasis. Medical Laboratory Journal. 2015; 8(5):90-96.
18. Mohammadi-Ghalehbin B, Javanpour Heravi H, Arzanlou M, Sarvi M. Prevalence and Antibiotic Resistance Pattern of Candida spp; Isolated From Pregnant Women Referred to Health Centers in Ardabil, Iran. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2017; 16(4):409-421.
19. Rosana Y, Yasmon A, Lestari DC. Overexpression and Mutation as a Genetic Mechanism of Fluconazole Resistance in Candida Albicans Isolated From Human Immunodeficiency Virus Patients in Indonesia. Journal of Medical Microbiology. 2015; 64(9):1046-1052.
20. Perea S, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillan RA, Martinez M, et al. 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. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001; 45(10):2676-2684.

www.SID.ir