دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال هیجدهم– شماره ۹۶
دی ۱۳۹۰

دریافت: ۱۳۹۰/۵/۲۹
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۰/۹/۲۲
پذیرش: ۱۳۹۰/۹/۲۸

شناسایی ژن مقاومت به فلوکونازول ERG11 در نمونه‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس جداشده از بیماران آلوده به HIV با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس (RT-PCR)

نویسندگان: احسان فرح بخش[۱]، محمد حسین یادگاری*[۲]، معصومه رجبی بذل[۳]، مجتبی تقی‌زاده ارمکی[۱]، فرزاد کتیرائی[٤]

۱- کارشناس ارشد، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

٤- استادیار، مرکز تحقیقات قارچ شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران

* نویسنده مسئول: دکتر محمدحسین یادگاری **E-mail: Yadegarm@modares.ac.ir**

چکیده

مقدمه و هدف: امروزه قارچ‌های فرصت‌طلب به‌ویژه قارچ کاندیدا آلبیکنس ازجمله شایع‌ترین عوامل مخاطره انگیز در بیماران نقص سیستم ایمنی هستند. افزایش روزافزون سویه‌های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به داروهای آزولی مشکل اصلی بیماران مبتلا به ایدز است. هدف از این مطالعه، بررسی ژن ERG11 در سویه‌های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول در بیماران آلوده به HIV مبتلا به کاندیدیازیس دهانی حلقی به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۸ در دانشگاه تربیت مدرس انجام‌شد. سویه‌های کاندیدا آلبیکنس جداشده از بیماران ایدزی با استفاده از روش‌های استاندارد مانند تشکیل جرم تیوب، کلامیدوسپور و رنگ کلنی روی محیط کروم آگارکاندیدا شناسایی‌شدند. ابتدا میزان حساسیت سویه‌های کاندیدا آلبیکنس مطابق روش استاندارد انتشار دیسک بررسی‌شد؛ سپس افزایش بیان ژن مقاومت به فلوکونازول ERG11 با روش RT-PCR، در مقایسه با نمونه‌های شاهد ارزیابی و میزان بیان ژن با نرم‌افزار UVItec تعیین‌شد.

نتایج: آزمایش حساسیت دارویی ۶۶ سویه کاندیدا آلبیکنس نشان‌داد که ۶۲/۶ درصد سویه‌ها حساس، ۸/۶ درصد وابسته به دوز و ۲۸/۷ درصد مقاوم به فلوکونازول هستند. ارزیابی محصول RT-PCR مشخص‌کرد که ۹ درصد بیماران دارای افزایش بیان ژن مقاومت ERG11 هستند.

نتیجه‌گیری: کاندیدیازیس دهانی در مبتلایان به HIV در ایران، شیوعی قابل‌توجه دارد، نتایج حاصل از این مطالعه، درصد بالای مقاومت را در میان نمونه‌های کاندیدا آلبیکنس نشان‌می‌دهد. استفاده از روش مقرون به صرفه انتشار دیسک به همراه روش‌هایی مانند RT-PCR که امکان مطالعه روی مکانیسم مقاومت دارویی و ژن‌های دخیل در مقاومت را فراهم‌می‌آورد، پیشنهادمی‌شود.

واژگان کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، ایدز، ژن ERG11، روش RT-PCR

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

امروزه قارچ‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب از جمله عفونت‌های تهدیدکننده زندگی در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی هستند. مخمرها و در رأس آنها گونه‌های کاندیدا، معمول‌ترین قارچ‌هایی هستند که از عفونت‌های انسانی جدا می‌شوند (۱). به‌رغم پیشرفت‌های زیاد در زمینه مراقبت‌های بهداشتی و روش‌های درمانی، وقوع کاندیدیازیس سیستمیک مهاجم به‌طور قابل‌توجهی رو به افزایش است (۲). بیماری‌های قارچی در بیماران ایدزی، اغلب به‌صورت کاندیدیازیس دهانی حلقی (Oropharyngeal Candidiasis OPC) ظاهر می‌شود و از جمله عوامل ایجادکننده آن، گونه قارچ‌های مخمری کاندیدایی هستند که شایع‌ترین آنها کاندیدا آلبیکنس است. با وجود اینکه درمان فعال ضدویروسی (Highly Active Anti Retroviral Therapy HAART)، کاهش عفونت‌های فرصت‌طلب از جمله کاندیدیازیس را سبب‌شده، ظهور کاندیدای مقاوم به درمان به افزایش وقوع این بیماری در افراد ایدزی منجرشده‌است. کاندیدیازیس دهانی از عفونت‌های شایع در بیماران مبتلا به ویروس نقص سیستم ایمنی است و در بیش از ۹۰ درصد این بیماران در طی عفونت با این ویروس و به‌ویژه در مراحل اولیه پیش از درمان و مراحل پیشرفته بیماری ایدز دیده‌می‌شود (۵-۳). درمان با استفاده از عوامل ضدقارچی آزولی به‌ویژه فلوکونازول به‌عنوان راهکاری مؤثر برای درمان عفونت‌های ناشی از مخمر کاندیدا آلبیکنس معرفی‌می‌شود؛ اما بروز مقاومت‌های دارویی، این روش درمان را با مشکلات جدی روبروکرده‌است (٦ و۷)؛ لذا شناسایی گونه‌های مقاوم به عوامل ضد‌قارچی به‌منظور درمان کارآمد و جلوگیری از مصرف بی‌رویه داروها بسیار ضروری می‌نماید. مکانیسم‌های مولکولی متفاوتی در پیدایش مقاومت کاندیدا آلبیکنس در برابر فلوکونازول شناخته‌شده‌اند (۸) که این مکانیسم‌ها «کاهش انتقال دارو به داخل سلول، تغییرات در آنزیم‌های مسیر بیوسنتز ارگوسترول، تغییرات در آنزیم هدف (جهش‌های نقطه‌ای، افزایش بیان و تغییر ژن) و افزایش انتشار دارو به خارج توسط پمپ‌های انتشار غشایی» را شامل می‌شوند. تغییرات در آنزیم هدف داروی فلوکونازول لانوسترول ١٤- α - دیمتیلاز (محصول ژن ERG11) شامل جهش‌های نقطه‌ای بوده، افزایش بیان بیش از حد به کاهش پذیرش داروهای آزولی منجرمی‌شود؛ همچنین ممکن است مقاومت متقاطع در برابر سایر مشتقات آزول را نیز در‌پی‌داشته‌باشد. قارچ بیماری‌زا می‌تواند از طریق بیان بیش از حد ژن ERG11 بر اثر بازدارندگی آزول‌ها غلبه‌کند. بیان بیش از حد ژن ERG11 به افزایش هدف دارو منجرشده، به دنبال آن غلظت بیشتری از دارو نیاز می‌شود تا با کلیه مولکول‌های آنزیمی موجود در درون سلول‌ها واکنش‌دهد (۹-١٤).

هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان مقاومت ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس بومی جداشده از بیماران ایدزی با روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی بود و اینکه «آیا کاندیدا آلبیکنس‌های مقاوم به فلوکونازول جداشده از افراد ایدزی دارای افزایش بیان ژن ERG11 هستند؟ و نتایج حاصل از بررسی مقاومت ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس با استفاده از روش‌های فنوتیپی و انتشار دیسک با روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس (Reverse transcriptionPCR RT-PCR) همخوانی‌دارند؟».

مواد و روش‌ها

این مطالعه‌ای تجربی است که طی سال‌های ۱۳۸۸-۱۳۸۹ در دانشگاه تربیت مدرس انجام‌شد. اجرای این تحقیق به تصویب کمیته ایمنی زیستی و اخلاق پزشکی

Archive of SID

www.SID.ir

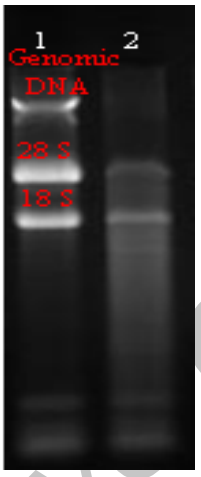
دانشگاه تربیت مدرس رسید. در این مطالعه، ٦٨ نمونه شامل ٦٦ ایزوله بالینی و دو گونه کاندیدا آلبیکنس استاندارد حساس و مقاوم به فلوکونازول بررسی‌شدند. نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی از بیماران ایدزی مراجعه-کننده به مرکز تحقیقات ایدز ایران واقع در بیمارستان امام خمینی تهران صورت‌گرفت. به‌منظور انجام این مطالعه، بیماران مورد بررسی از افرادی انتخاب‌شدند که وجود بیماری ایدز در آنها با روش‌های الایزا و بلاتینگ به-اثبات‌رسیده‌بود. نمونه‌های بالینی از ضایعات دهانی افراد ایدزی با سوآب خشک اسفنجی استریل از نواحی موردنظر گرفته و پس از نمونه‌برداری از دهان، سوآب‌های آغشته به ترشحات دهانی به‌طور مستقیم، روی محیط سابورو دکستروز آگار کشت‌داده‌شد. گونه استاندارد حساس به فلوکونازول (ATCC ١٠٢٣١) از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و گونه استاندارد مقاوم به فلوکونازول (ATCCv٦٦١٥) از مرکز دارویی دانشگاه شانگهای چین تهیه‌شد. گونه‌های استاندارد و سویه‌های بالینی روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار Merck (٦٥ گرم در لیتر) حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (٥٠ میلی‌گرم در ١٠ میلی‌لیتر الکل) کشت‌داده‌شد و به مدت ٤٨ ساعت در انکوباتور ٣٠ درجه سانتیگراد قرارگرفت. تک‌کلنی‌های مخمری حاصل از کشت تازه برای انجام آزمون‌های فنوتیپی و مولکولی مورد استفاده قرارگرفت. از روش‌های فنوتیپی، کشت در محیط کروم آگار کاندیدا Company Paris France، آزمایش ایجاد لوله زایا، آزمایش تولید کلامیدوکونیدی به‌منظور شناسایی نمونه‌ها استفاده-شد. آزمون جذب کربوهیدرات‌ها برای تشخیص گونه‌های مخمری با استفاده از کیت Rap ID^{TM} (remel،USA) انجام‌شد. کیت یادشده، حاوی یک پانل از ترکیب‌های شیمیایی است که جذب آنها بررسی‌می‌شود و دو معرف A حاوی هیدروکسید پتاسیم و معرف B حاوی دی متیل امینو سینامالدیئید و یک مایع تلقیح حاوی Kcl و Cacl2 و آب مقطر است که درون لوله‌های استریل در خود کیت تعبیه‌شده‌اند؛ هر پانل، حاوی چاهک‌های واکنشی است که درون آنها ترکیب واکنشگر قراردارد. پس از آنکه چاهک‌ها با سوسپانسیون تلقیح‌شدند، براساس رنگی که ایجادکردند طبق راهنمای مندرج در کیت، مثبت یا منفی تلقی‌شدند. طبق راهنمای کیت هر ترکیب، امتیاز عددی مخصوص دارد و از مجموع امتیازها یک کد شش رقمی به‌دست‌آمد؛ کد حاصل از نتایج، وقتی به نرم‌افزار موجود در کیت داده‌شد، نوع گونه مشخص شده. آزمایش تعیین حساسیت به فلوکونازول توسط روش استاندارد انتشار دیسک Clinical and Laboratory Standars Institute (CLSI M44 –A)) صورت‌گرفت؛ بدین منظور ابتدا ٣٤ گرم از پودر محیط مولر هینتون آگار در یک لیتر آب مقطر حل و سپس ٢٠ گرم از پودر گلوکز و ٠/٥ میلی‌گرم از پودرمتیلن بلو به آن افزوده شد. سوسپانسیون قارچی برای تلقیح به محیط کشت مولر هینتون آگار با غلظت ^{6} ١٠ سلول در هر میلی‌لیتر (cfu/ml) از کشت تازه مخمر در لوله‌های استریل حاوی سرم فیزیولوژی تهیه‌شد. پس از انتقال سوسپانسیون به محیط کشت دیسک‌های ٢٥ میکروگرمی فلوکونازول تهیه‌شده از شرکت MAST در مرکز پلیت قرارداده‌شدند و در دمای ٣٥ درجه سانتیگراد در زمان‌های ٢٤ و ٤٨ ساعت مورد بررسی قرارگرفتند و قطر ممانعت از رشد برحسب میلی‌متر ثبت‌شد (١٥). داده‌ها با نرم‌افزار SPSS version 20 تجزیه‌وتحلیل‌شدند؛ برای این کار از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه One-Way ANOVA استفاده و آزمون آماری در سطح معنی‌داری ٠/٠٥ انجام‌شد.

استخراج RNA با استفاده از پرل شیشه‌ای (Glass bead)، در حضور ترکیب فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل به نسبت ١: ٢٤: ٢٥ صورت‌گرفت (١٦). به‌منظور استخراج RNA از کشت تازه مخمر کاندیدا آلبیکنس در فاز لگاریتمی استفاده‌شد؛ همچنین میکروتیوب‌ها و

Archive of SID

www.SID.ir

سرسمپلرهای DNase –RNase Free به‌کاررفتند. RNA استخراج‌شده از نظر کمی و کیفی با دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز، روی ژل رنگ‌آمیزی‌شده با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرارگرفت. پس از مشاهده تصویر RNA بارگذاری‌شده بر ژل آگارز، تفاوت غلظت RNAها از شدت باند آنها مشخص شد. بدین منظور برای یکسان‌کردن شرایط، جذب نوری، تمامی نمونه‌ها توسط دستگاه بیوفتومتر Eppendorf قرائت شدند و سپس با دی اتیل پیروکربنات Diethylpyrocarbonate (DEPC) میزان غلظت RNA قبل از سنتز cDNA و استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یکسان شد. تصویر RNAهای استخراج‌شده روی ژل آگارز، وجود DNA را در نمونه‌ها نشان‌داد؛ به همین سبب، تمامی نمونه‌های RNA برای ازبین‌رفتن DNA با آنزیم DNase تیمارشد.



شکل ۱. تیمار RNAهای استخراج‌شده توسط آنزیم DNase

با اطمینان‌یافتن از خلوص RNA، ساخت cDNA از روی آن به‌وسیله کیت K1621 ساخت شرکت Fermentas و براساس دستورالعمل آن انجام‌گرفت؛ بدین ترتیب که به ۲ میکروگرم RNA استخراج‌شده، ۱ میکرولیتر Random hexamer primer اضافه شد. حجم نهایی این مرحله با آب تیمارشده با DEPC به ۱۲ میکرولیتر رسانیده‌شد؛ میکروتیوب‌های حاوی مقادیر مذکور به مدت ۵ دقیقه در دمای ٦٥ درجه سانتیگراد قرارداده‌شده، سپس بی‌درنگ به یخ منتقل شدند؛ در ادامه ٤ میکرولیتر بافر ۵X، ۲ میکرولیتر مخلوط ۱۰ میلی-مولار dNTP، ۱ میکرولیتر ریبونوکلئاز و ۱ میکرولیتر آنزیم Reverse Transcriptase M-MuLV ۲۰۰ واحد در میلی‌لیتر به میکروتیوب اضافه شد؛ سپس محلول واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۲۵ درجه سانتیگراد و به مدت ٦۰ دقیقه در ٤۲ درجه سانتیگراد قرارگرفت. با قراردادن میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد، واکنش متوقف شد. cDNA حاصل تا زمان انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری‌شد. به‌منظور بررسی ژن عامل مقاومت به فلوکونازول در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس از پرایمرهای ERG11 و ACT1 ساخت شرکت Cinnagen استفاده‌شد. ژن ACT1 در زمرهٔ ژن‌های House Keeping است که میزان بیان آن در شرایط مختلف یکسان می-نماید و به‌عنوان کنترل داخلی در این مطالعه استفاده‌شد. برای صحت عملکرد پرایمرهای مورد استفاده، پرایمرها با انجام (Basic Local Alignement Search Tool BLAST)

Archive of SID

www.SID.ir

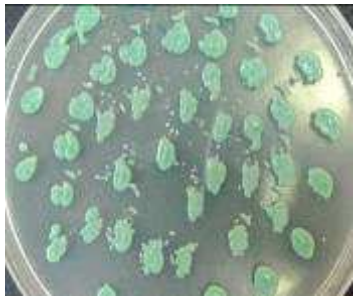
در سایت (National Center for Biotechnology Information (NCBIو با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner کنترل‌شدند. توالی اسید نوکلئیک پرایمرهای مورد استفاده به شرح زیرند:

ERG11/F
$(5'-TTTGGTGGTGGTAGACATA-3')$
ERG11/R
$(5'-GAACTATAATCAGGGTCAGG-3')$
ACT1/F
$(5'-CCAGCTTTCTACGTTTCC-3')$
ACT1/R
$(5'-CTGTAACCACGTTCAGAC-3')$

واکنش RT-PCR در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر با استفاده از ترموسایکلر Bio Rad انجام‌شد. ۱ میکرولیتر از cDNA ساخته‌شده، مقدار ۱۰ پیکومول از هریک از پرایمرها، ٦/۲۵ میکرولیتر از PCR Master mix ساخت شرکت Fermentas حاوی مخلوط نوکلئوتیدها با غلظت ٤/. میلی‌مولار، کلرید منیزیم با غلظت ٤ میلی‌مولار و آنزیم Taq DNA polymerase با غلظت µl /U/۰۵/.، به میکروتیوب واکنش اضافه شد و حجم نهایی با آب مقطر دیونیزه استریل به ۱۲/۵ میکرولیتر رسانده‌شد؛ مخلوط بالا در دستگاه ترموسایکلر قرارداده‌شده و برنامه حرارتی برای آن اعمال‌شد. دمای واسرشتگی اولیه الگو ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، دمای واسرشتگی ثانویه الگو ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر به رشته الگو ٦۰ درجه سانتیگراد به مدت ٤۵ ثانیه، دمای گسترش رشته جدید ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه و ۳٤ سیکل از مرحله دوم تا چهارم تکرارشد. دمای بسط نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه درنظرگرفته‌شد؛ در آخر، محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ۱/۸ درصد حاوی ۵/. میکروگرم اتیدیوم بروماید به‌ازای هر میلی‌لیتر ژل الکتروفورز شد؛ پس از اتمام الکتروفورز ژل‌ها روی دستگاه ژل داکیومنتیشن از نظر وجود باند ژن موردنظر تکثیرشده بررسی‌شد. در این مطالعه برای کلیه نمونه‌های cDNA واکنش RT-PCR با پرایمرهای ERG11 و ACT1 (به‌عنوان House Keeping) انجام‌شد و داده‌های هر نمونه با ژن House Keeping همان نمونه و نمونه‌های استاندارد حساس و مقاوم به فلوکونازول برای بررسی میزان بیان ژن ERG11 با نرم‌افزار UVItec Analyze سنجش‌شد.

یافته‌ها

٦٦ نمونه کاندیدا آلبیکنس مورد مطالعه براساس رنگ ویژه کلنی در محیط کروم آگار کاندیدا (شکل۲)، کشت روی محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰، آزمایش تولید لوله زایا و همچنین آزمون جذب قند تأییدشدند؛ در این روش فنوتیپی، از سویه استاندارد مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس به‌عنوان شاهد مثبت و کاندیدا کروزئی به‌عنوان شاهد منفی استفاده‌شد.



شکل شماره ۲. ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس که روی کروم آگار رنگ سبز روشن ایجادمی‌کند.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج حاصل از آزمون انتشار دیسک جهت ارزیابی حساسیت ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس نسبت به داروی فلوکونازول در شرایط دمایی ۳۵ درجه سانتی گراد و پس از ۲٤ ساعت (نمودار ۱) به دست آمد. جهت تایید نتایج بدست آمده با این روش از ایزوله استاندارد مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس و ایزوله استاندارد حساس به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس استفاده گردید و آزمون ANOVA نشان داد که در حالت کلی بین سه گروه ایزوله‌های حساس، وابسته به دوز و مقاوم تفاوت معنی‌دار از نظر قطر نواحی مهار رشد وجود دارد و همچنین مقایسه نمونه‌های مقاوم با وابسته به دوز، حساس با وابسته به دوز و حساس با مقاوم تفاوت معنی دار را نشان داد.($P < 0.05$)

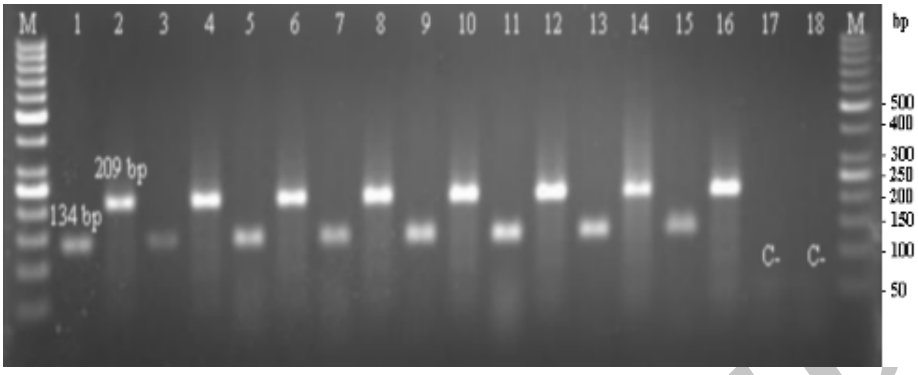
نمودار شماره ۱. درصد میزان حساسیت ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس نسبت‌به فلوکونازول توسط روش انتشار دیسک

RNAهای استخراج‌شده از ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس پس از الکتروفورز روی ژل آگارز مورد تأیید قرارگرفت. نتیجه استخراج RNA مخمرهای کاندیدا آلبیکنس توسط پرل شیشه‌ای و ترکیب سه‌تایی فنل- کلروفرم- ایزو آمیل الکل با افزایش زمان ورتکس موفقیت‌آمیز بود. پس از مشاهده تصویر RNA بارگذاری‌شده بر ژل آگارز، تفاوت غلظت RNAها از شدت باند آنها مشخص بود؛ به همین دلیل به‌منظور یکسان‌کردن شرایط PCR، جذب نوری تمامی نمونه‌ها با دستگاه بیوفتومتر قرائت‌شدند و سپس با DEPC میزان غلظت RNA برای سنتز cDNA و استفاده در واکنش PCR یکسان شد. در ادامه تمامی نمونه‌های RNA برای ازبین‌رفتن DNA با استفاده از آنزیم DNase تیمار- شدند.

مقاومت به داروهای ضدقارچی با افزایش بیان و یا جهش نقطه ای و همچنین تغییرات در مسیر بیوسنتز ارگوسترول مرتبط است. بیان بالای ژن ERG11 منجر به افزایش تعداد کپی های آنزیم لانوسترول α-۱٤ دیمتیلاز می شود که نتیجه آن افزایش سنتز ارگوسترول است و در نهایت از بین رفتن توانایی داروی ضدقارچی می باشد(شکل۲). واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ERG11 و ACT1 در سویه های استاندارد حساس و مقاوم به فلوکونازول و همچنین نمونه های بالینی ایزوله شده از افراد ایدزی انجام شد و نتایج مورد قبولی در مورد افزایش بیان ژن مورد بررسی بدست آمد. پس از الکتروفوزر محصول PCR و مشاهده تصویر ژل در دستگاه ژل داکیومنتیشن مشخص گردید که از ٦٦ ایزوله بالینی مورد بررسی، ٦ ایزوله(۹٪) برای ژن ERG11 افزایش بیان داشته اند (شکل ۳). افزایش بیان ژن ERG11 موجب ایجاد مقاومت نمونه های مورد مطالعه به داروی فلوکونازول شده بود که این نتایج با نتایج حاصل از روش انتشار دیسک همخوانی داشت و هر ٦ ایزوله که دارای افزایش بیان ژن ERG11 بودند در روش انتشار دیسک در گروه نمونه های مقاوم به فلوکونازول قرار گرفتند. با استفاده از نرم افزار UVItec

www.SID.ir

Analyze بررسی کمی شدت باندهای حاصل از الکتروفورز محصول PCR انجام شد. با استفاده از این نرم افزار میزان بیان ژن ERG11 نسبت به ژن House keeping ACT1 سبب بدست آمدن اعداد دقیق میزان بیان ژن ERG11 گردید.



شکل ۳. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول RT-PCR ژن‌های ERG11 وACT1

(M) مارکر bp ۵۰، (۱) ژن ERG11 کاندیدا آلبیکنس استاندارد مقاوم به فلوکونازول، (۳) ژن ERG11 کاندیدا آلبیکنس استاندارد حساس به فلوکونازل، (۵-۷-۹-۱۱-۱۳-۱۵) افزایش بیان ژن ERG11 ایزوله های بالینی مقاوم به فلوکونازول، (۲-۴-۶-۸-۱۰-۱۲-۱۴-۱۶) ژن House Keeping ACT1، (۱۷) کنترل منفی ژن ERG11، (۱۸) کنترل منفی ژن ACT1

بحث

داروهای گروه آزول به ویژه فلوکونازول از جمله موثرترین داروهای مورد استفاده در درمان عفونت های ناشی از کاندیدا آلبیکنس بوده و همچنین رایج ترین و پرمصرف ترین عامل ضد قارچی شناخته شده می باشند. فلوکونازول به علت دارا بودن خاصیت درمانی بالا به طور معمول جهت درمان عفونت های ناشی از کاندیدا استفاده می شود(۱۷). مقاومت در برابر عوامل ضد قارچی آزولی تا دهه ۱۹۸۰ بسیار نادر بود اما در دهه ۱۹۹۰ تاکنون مقاومت نسبت به این عوامل ضد قارچی (آزول ها) افزایش چشمگیری یافته است(۱۸) شیوع عفونت های قارچی منجر به افزایش استفاده از داروهای ضد قارچی و افزایش قابل ملاحظه مقاومت گونه های کاندیدا نسبت به ترکیبات مورد استفاده شده است. شیوع عفونت های حاد و سیستمیک کاندیدایی و متعاقب آن درمان با داروهای ضد قارچی به ویژه ترکیبات آزولی و مقاومت نسبت به این ترکیبات، ضرورت استفاده از روش های تعیین حساسیت دارویی عوامل قارچی را بیش از پیش آشکار ساخته است. تعیین حساسیت عامل ایجاد بیماری قبل از شروع درمان جهت درمان مناسب و ریشه کنی و حذف عوامل قارچی روش بسیار سودمندی می باشد تا بدین ترتیب از مصرف بی رویه داروها و بالطبع ایجاد مقاومت های دارویی ثانویه و ناخواسته جلوگیری شود.

تاکنون ژن‌های مقاومتی متعددی مانند CDR1، CDR2، MDR1، ERG3، ERG6، ERG9، ERG11، RTA2، NAG2 و ... در کاندیدا آلبیکنس شناسایی‌شده‌اند که هریک از این ژن‌ها با مکانیسم‌های مولکولی متفاوتی، مقاومت ارگانیسم به داروهای ضدقارچی را سبب‌می‌شوند. آنزیم هدف داروهای آزولی لانوسترول α-۱۴ دیمتیلاز است؛ ژن کدکننده این آنزیم در تمامی قارچ‌ها ERG11 است. مقاومت به داروهای ضدقارچی آزولی به‌ویژه فلوکونازول با افزایش بیان، جهش نقطه‌ای و همچنین ایجاد تغییرها در مسیر بیوسنتز ارگوسترول مرتبط است (۱۹). بیان بیش از اندازه ژن ERG11 به افزایش تعداد کپی‌های آنزیم لانوسترول α-۱۴ دیمتیلاز منجرمی‌شود

Archive of SID
www.SID.ir

که نتیجه آن، افزایش سنتز ارگوسترول و ازبین‌رفتن توانایی داروی فلوکونازول است.

با استفاده از روش انتشار دیسک میزان مقاومت به داروی فلوکونازول در ٦٦ سویه کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران ایدزی، ٢٤/٣ درصد بدست آمد. این امر نشان می دهد میانگین میزان مقاومت به این دارو در بیماران مبتلا به کاندیدیازیس دهانی علی رغم جذب مناسب گوارشی بالا می باشد. در مجموع، تحقیق حاضر نشان داد که آزمایش حساسیت دارویی گام اول و ضروری جهت انتخاب داروی مناسب برای درمان انواع کاندیدیازیس است تا بدین ترتیب از مصرف بی رویه داروها و ایجاد مقاومت دارویی ناخواسته جلوگیری شود. در این مطالعه ٦ ایزوله دارای بیان بیش از اندازه ژن ERG11 بودند، هر٦ ایزوله بالینی مورد بررسی با پرایمر ژن ERG11 که در فرآیند RT-PCR دارای واکنش مثبت بودند، در روش دیسک دیفیوژن نیز به عنوان ایزوله های مقاوم به فلوکونازول گزارش شدند. در روش دیسک دیفیوژن از ٦٦ ایزوله مورد بررسی ١٦ ایزوله مقاوم بودند، که این نشان دهنده عوامل مختلف و نقش سایر ژن ها با مکانیسم های مولکولی متفاوت در ایجاد مقاومت می باشد.

امروزه روش‌های مولکولی به دلیل اختصاصیت و حساسیت بالا بسیار مورد توجه قرارگرفته‌اند و بیولوژی مولکولی علم قارچ‌شناسی را همانند سایر علوم متحول-ساخته‌است. گسترش روش PCR به‌عنوان روشی برای بررسی الگوی بیان ژن‌ها و تشخیص مقادیر کم نمونه الگو، حساسیت روش‌های بررسی بیان ژن‌ها را متحول-کرده‌است. در این مطالعه بر آن شدیم روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس را برای ارزیابی مقاومت سویه‌های مخمری کاندیدا آلبیکنس راه‌اندازی‌کنیم.

در مطالعه انجام‌شده توسط Saleh، حساسیت ١٠٧ ایزوله کاندیدا آلبیکنس به داروی فلوکونازول با روش دیسک دیفیوژن مورد ارزیابی قرارگرفت که ٢٦/١ درصد از ایزوله‌های مورد بررسی به داروی فلوکونازول مقاوم بودند (٢٠). Yan، در مطالعه خود افزایش بیان ژن‌هایی متعدد مانند CDR1، ERG11، MDR1 را از عوامل ایجادکننده مقاومت در سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول مطرح‌کرد (٢١). Joao، به تشخیص سریع بیان بیش از اندازه ژن‌های مقاومت به داروی فلوکونازول در ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس با استفاده از روش Reverse Transcriptase Light Cycler PCR و هیبریداسیون پروب نشاندار موفق شدند؛ این محققان بیان‌کردند که برای بررسی ژن‌های مقاومتی حساسیت و اختصاصیت PT-PCR و هیبریداسیون پروب نشاندار از Northern blot بیشتر است (٢٢). Perea، مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به آزول را در کاندیدا آلبیکنس‌های جداشده از افراد دچار نقص سیستم ایمنی (HIV(که مقاومت بالایی به فلوکونازول ($\mu g/ml$ ،MIC ≥ ۶۴) داشتند، بررسی‌کردند. افزایش سطح بیان ژن‌های کدکننده لانوسترول α- ١٤ دیمتیلاز (ERG11) و پمپ‌های انتشار (MDR ,CDR) دلالت بر مقاومت به آزول‌ها دارد. ژن‌های ERG11 با PCR تکثیر-شد و تعیین توالی نوکلئوتیدهای آنها، موتاسیون‌های نقطه‌ای را که به کاهش تمایل به آزول‌ها منجرمی‌شود، نشان‌داد (٢٣).

درمجموع از نتایج حاصل از این مطالعه اینچنین می‌توان نتیجه‌گرفت که روش مولکولی واکنش زنجیره-ای پلیمراز معکوس، توانایی شناسایی سریع، صحیح و قابل اعتماد ایزوله‌های مقاوم به عوامل ضدقارچی را دارد؛ بااین‌وجود، مطلوب، آن است که از روش فنوتیپی انتشار دیسک با هزینه کمتر و امکان شناسایی تعداد زیادی نمونه در هر آزمایش همراه با روش‌های ژنوتیپی، مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس با امکان بررسی مکانیسم‌های مقاومت دارویی و ژن‌های دخیل در آن

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده‌شود. بررسی ژن‌های باعث مقاومت نسبت‌به فلوکونازول و سایر عوامل ضدقارچی در انواع گونه‌های بومی کاندیدا آلبیکنس در ایران می‌تواند اطلاعاتی مفید برای یک ارزیابی دائمی به ما ارائه‌دهد؛ لذا پیشنهاد-می‌شود که محققان علاقه‌مند به این زمینه در بیماران و جمعیت‌های مختلف و تعداد جدایه‌های بیشتر، این روند را ادامه‌دهند تا پس از مدتی به ارزیابی جامعی از وضعیت ارگانیسم‌های بیماری‌زا (کاندیدا آلبیکنس) در کشورمان دست‌یابیم.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس با عنوان پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد رشته قارچ شناسی پزشکی انجام شده است.

منابع

1. Neppelenbroek KH, Campanha Nh, Spolidorio DMP, Spolidorio LC, Seó RS, Pavarina AC. Molecular fingerprinting Methods for discrimination between C. albicans and C. dubliniensis. Mycoses 2006; 12: 242-253.
2. Mirhendi H, Makimurak A, Khoram zade M, Yamaguchi H. A one-Enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically Important Candida species. Jpn J Med Mycol 2006; 47: 225-9.
3. Casalinuovo IA, Francesco PD, Garaci E . Fluconazole resistance in Candida albicans: a review of mechanism. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2004; 8 (2): 69-77.
4. Fichtenbaum CJ, Koletar S, Powderly WG .Refractory mucosal candidiasis in advanced human immunodeficiency virus infection. Clin Infect Dis 2000; 30: 749-56.
5. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med 1981; 305:1425-31.
6. Revankar SG, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Dib OP, Fothergill AW, Redding SW, et al. Detection and significance of fluconazole resistance in oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. J Infect Dis 1996; 174:821–7.
7. Redding S, Smith J, Farinacci G, Rinaldi M, Fothergill A, Rhine- Chalberg J, et al. Resistance of Candida albicans to fluconazole during treatment of oropharyngeal candidiasis in a patient with AIDS: documentation by in vitro susceptibility testing and DNA subtype analysis. Clin Infect Dis 1994; 18:240–2.
8. Franz R, Kelly S, Lamb DC, Kelly D, Ruhnke M, Morschha J. development of fluconazole resistance in clinical Candida albicans strains. Antimicrob. Agents Chemother1998; 42: 3065–3072.
9. Hitchcock CA. Cytochrome P-450-dependent 14 alpha-sterol demethylase of Candida albicans and its interaction with azole antifungals. Biochem Soc Trans 1991; 19:782–787.
10. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev 1998; 11:382–402.
11. Sanglard D, Odds FC. Resistance of Candida species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis 2002; 2:73–85.
12. Favre B, Didmon M, Ryder NS. Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14alpha-demethylase contribute to azole resistance in Candida albicans. Microbiol 1999; 145:2715–2725.
13. Li X, Brown N, Chau AS, Lopez-Ribot JL, Ruesga MT, Quindos G, Mendrick CA, Hare RS, Loebenberg D, DiDomenico B,McNicholas PM. Changes in susceptibility to posaconazole in clinical isolates of Candida albicans. J Antimicrob Chemother 2004; 53:74–80.
14. Loffler J, Kelly SL, Hebart H, Schumacher U, Lass-Florl C, Einsele H. Molecular analysis of cyp51 from fluconazole- resistant Candida albicans strains. FEMS Microbiol Lett 1997; 151:263–268.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Clinical Laboratory Standard Institute. Methods for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard M44-A. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standard Institute 2004.

16. Dunn B, Wobbe RC. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons Inc 1992; 13(3):1-9.

17. Troillet N, Durussel C, Bille J, Glauser MP,Chave JP. Correlation between in vitro susceptibility of Candida albicans and fluconazoleresistant oropharyngeal candidiasis in HIVinfected patients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis 1993; 12: 911 – 5.

18. White TC, Marr KA, Bowden R A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev 1998;.11:382–402.

19. WhiteT. C. The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14a demethylase in Candida albicans. Antimicrob Agents Chemother1997; 41:1488–1494.

20. Saleh Ak .In vitro, Susceptibilities of Clinical Yeast Isolates to Antifungal Drugs of Polyene, Pyrimidine, and Azoles, and their Effect in Yeast Adhesion and Mycelial Formation. The Official Journal of the Saudi Biological Society. Saudi J of Biolog Sci 2008; 15 (2(189-198.

21. Yan L, Zhang J, Li M, Cao Y, Xu Z, Cao Y, et al. DNA microarray analysis of fluconazole resistance in a laboratory Candida albicans strain. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2008; 40(12):1048-60.

22. Frade JP, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Rapid Quantification of Drug Resistance Gene Expression in Candida albicans by Reverse Transcriptase Light Cycler PCR and Fluorescent Probe Hybridization. J Clin Microbiol 2004; 42(5):2085-93.

23. 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University Seventeenth Year, No.96 December, January 2011-2012

Received: 20/8/2011
Last revised: 13/12/2011
Accepted: 19/12/2011

Identification of fluconazole resistance gene ERG11 in clinical *Candida albicans* samples isolated from HIV-infected patients by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR)

Ehsan Farahbakhsh[1], Mohammad Hossein Yadegari[2*], Masoumeh Rajabi Bazl[3], Mojtaba Taghizadeh Armaki[1], Farzad Katiraee[4]

1. M. Sc in Medical Mycology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Associate Professor of Medical Mycology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor of Clinical Biochemistry, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Shaheed Beheshti Medical University, Tehran, Iran.
4. Mycology Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

E-mail: yadegarm@modares.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Nowadays opportunistic fungi especially C. albicans are the most common cause of life-threating infections in immunodeficiency patients. Increasing Azole-resistant strains of C. albicans are a main problem in human immunodeficiency virus-infected patients. The aim of this study was the evaluation of ERG11 gene in C. albicans Azole resistant strains that were isolated from AIDS patients with oropharyngeal candidiasis by RT-PCR method.

Materials and Methods: The present experimental study was conducted at Tarbiat Modares University during the years 2009-2011. C.albicans isolates from HIV-infected patients were identified by standard procedures including germ tube formation, clamydoconidia and color of colonies on CHROM agar. At first, susceptibility of C. albicans isolates was assessed by disk diffusion agar technique. Then, overexpression of fluconazole resistance gene ERG11 using RT-PCR was compared with control samples and gene expression levels were determined by UVItec software.

Results: The results of drug sensitivity for 66 C. albicans isolated from AIDS patients showed that 62.6% were susceptible, 8.6% were susceptible-dose dependent (SDD) and 28.7% were resistant. Product evaluation of RT-PCR showed that 9% of patients have increased expression of ERG11 gene resistance.

Conclusion: Oral candidiasis is a frequent complication among Iranian HIV individuals. The results of this study showed the high percentage of resistant strains among samples of C. albicans. However, the use of phenotypic methods like disk diffusion agar which has lower costs together with genotypic methods like RT-PCR which provide the possibility of studying the mechanism of drug resistance and genes involved is highly recommended.

Key words: Candida albicans, AIDS, ERG11 gene, RT-PCR method

www.SID.ir