



شناسایی جهش های نواحی جهش پذیر داغ ژن *ERG11* در جدایه های مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس در غرب مازندران

معصومه مجدی^۱، زینب خزائی کوهپر^{۲*}، آیت الله نصرالهی عمران^۳

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن،
^۲استادیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن،
^۳دانشیار، گروه قارچ شناسی پزشکی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن.

چکیده

سابقه و هدف: امروزه مصرف گسترده فلوکونازول باعث مقاومت در سویه های *کاندیدا آلبیکنس* شده است. تغییرات ساختاری *Erg11p* در نتیجه جهش در ژن *ERG11* یکی از مکانیسم های مقاومت آزولی است. این مطالعه با هدف بررسی جهش های ژن *ERG11* در جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول در غرب استان مازندران انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی توصیفی، نمونه های بالینی از مخاط واژینال ۱۲۰ زن در بیمارستان های غرب مازندران به دست آمد. جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* با استفاده از روش های استاندارد مانند لوله زایا و کشت در محیط کروم آگار تعیین هویت شدند. مقاومت و حساسیت جدایه ها نسبت به فلوکونازول به کمک روش های کربی بوئر و براث ماکرودایلوشن ارزیابی گردید. سپس جهش های ژن *ERG11* در جدایه های بالینی به روش PCR - توالی یابی در مقایسه با جدایه ATCC 5027 (PTCC 10231) تعیین شد.

یافته ها: از ۴۵ جدایه *کاندیدا آلبیکنس*، ۴۰ جدایه مقاوم و ۵ جدایه حساس به فلوکونازول بودند. MIC فلوکونازول $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ تعیین شد. آنالیز PCR- توالی یابی آشکار کرد که ۱۸ جدایه مقاوم به فلوکونازول شش جهش بدمعنی (*V404I*, *E266D*, *Y257H*، *D504V* و *V488I*، *D421N*) را در ژن *ERG11* داشتند.

نتیجه گیری: جهش های شناسایی شده در این مطالعه ممکن است با کاهش تمایل فلوکونازول به *ERG11p* در ایجاد مقاومت به فلوکونازول در جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* در غرب استان مازندران نقش داشته باشند.
واژگان کلیدی: *کاندیدا آلبیکنس*، *ERG11*، فلوکونازول، جهش *V488I*، جهش *D504V*.

پذیرش برای چاپ: بهمن ماه ۹۶

دریافت مقاله: آذر ماه ۹۶

مقدمه

(۲). آزول ها خط اول درمان و جلوگیری از کاندیدیازیز می باشند. اما مصرف مکرر آن ها باعث مقاومت به این گروه از داروها شده است (۳). استرول ها ترکیبات ضروری در حفظ سیالیت غشای سلول های یوکاریوتی هستند. ضد قارچ های خانواده آزول باعث مهار بیوستز ارگوسترول و تجمع پیش سازهای استرولی متیله شده سمی در سلول می شوند. آزول ها با اتصال N4 نوکلئوفیلیک در حلقه آزولی به آهن

کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) یکی از قارچ های پاتوژن عامل کاندیدیازیز ولوواژینال، سیستمیک و دهانی است. کاندیدیازیز ولوواژینال حداقل یک بار در طول زندگی ۷۵٪ زنان رخ می دهد (۱). در این بین حدود ۵ تا ۸٪ زنان حداقل چهار بار کاندیدیازیز ولوواژینال عود کننده را تجربه می کنند

(* آدرس برای مکاتبه: تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی.

مواد و روش‌ها

الف) تعیین هویت جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس: در این مطالعه مقطعی توصیفی، از ۱۲۰ بیمار زن مراجعه کننده به درمانگاه‌ها و بیمارستان‌های غرب مازندران (رامسر، تنکابن، نشتارود، سلمان‌شهر و کلارآباد)، مشکوک به کاندیدیازیز واژینال دارای علائم سوزش، خارش و ترشحات واژنی، پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی (کد IR.GUMS.REC.1395.25) با سوآپ استریل نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌ها در محیط کشت انتقال کری بلیر (Cary Blair) (Quelab، کانادا) به آزمایشگاه منتقل شدند و در محیط کشت سابورود دکستروز آگار (Quelab، کانادا) حاوی کلرامفنیکل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند. به منظور شناسایی کاندیدا آلبیکنس، مورفولوژی کلنی، تشکیل شدن یا نشدن لوله زایا، و رنگ کلنی‌ها در محیط کروم آگار کاندیدا مورد بررسی قرار گرفتند (۸).

ب) تعیین الگوی مقاومت دارویی به روش انتشار از دیسک: مقاومت و حساسیت جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس نسبت به فلوکونازول، به روش کربی بوئر بر اساس معیار CLSI (Clinical Laboratory Standard institute) and Laboratory Standard institute بررسی شد (۹). برای تعیین الگوی حساسیت دارویی، از دیسک آنتی بیوگرام فلوکونازول (10 µg) (HiMedia، کشورهند) استفاده گردید. پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ °C، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن طبق معیار CLSI 2013 گزارش گردید (جدول ۱).

ج) تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) فلوکونازول: به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد قارچ توسط فلوکونازول، جدایه‌ها در محیط کشت سابورود دکستروز برات حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل به مدت ۲۴ ساعت کشت داده

موجود در هم موجب مهار غیرمتیله ۱۴-α لانوسترول دمتیلاز (Erg11p) در مسیر بیوسنتز ارگوسترول می‌شوند (۴). ارگوسترول یک لیپید غشایی است که در استحکام، پایداری و مقاومت در برابر تنش‌ها در کاندیدا آلبیکنس نقش داشته و نبود آن موجب تجزیه سلول می‌گردد (۵).

تمامی آزول‌ها مانند فلوکونازول (۶)، کتوکونازول، میکونازول و ایتراکونازول توان اتصال به لانوسترول را دارند (۷). اما آنالیزهای بیوشیمیایی نشان داده که به عنوان نمونه تمایل لانوسترول به فلوکونازول بین ۲ تا ۴ برابر کمتر از ایتراکونازول و ووریکونازول است (۶).

در کاندیدا آلبیکنس، تغییر در ساختار پروتئین یا بیان ژن ERG11 در جدایه‌های مقاوم به آزول مشاهده شده است. به طوری که جهش در ژن ERG11 یکی از ژن‌های مهم موثر در بیوسنتز ارگوسترول، موجب کاهش تمایل آزول‌ها به آن و در نتیجه افزایش مقاومت به این گروه از داروها می‌شود (۷).

در مطالعات قبلی مشخص شده که ERG11 سه ناحیه داغ جهش‌پذیری (hotspot regions) مطابق با آمینواسیدهای ۱۰۵ تا ۱۶۵، ۲۶۶ تا ۲۸۷ و ۴۰۵ تا ۴۸۸ دارد که جابجایی‌های بازی در آن‌ها به وفور رخ می‌دهد (۶). شایان یادآوری است که در این نواحی هم در جدایه‌های حساس و هم مقاوم به آزول‌ها جهش رخ می‌دهد. اما بعضی مطالعات نشان داده‌اند که بین وقوع جهش‌های خاص در بعضی نواحی و مقاومت به آزول‌ها ارتباط وجود دارد (۵).

هدف از این مطالعه، بررسی دلیل ژنتیکی مقاومت به فلوکونازول در سویه‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از زنان در غرب مازندران بود که به این منظور دو ناحیه داغ جهش‌پذیری ژن ERG11 در ۴۰ جدایه کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول مورد ارزیابی مولکولی قرار گرفت.

جدول ۱: مقادیر استاندارد مربوط به قطر هاله عدم رشد و MIC برای جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس بر اساس معیار CLSI.

نام دارو	حساس	حساس وابسته به دوز	قطر هاله عدم رشد (mm)	مقدار MIC (µg/ml)
فلوکونازول	≥۱۹	حساس وابسته به دوز	۱۵-۱۸	۱۶-۳۲
		مقاوم	≤۱۴	≥۶۴

جدول ۲: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

نام ژن	پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول PCR
ERG11	F1	5'-ACCAGAAATTACTATTTTCACTGCTTCA-3'	۴۸۲ bp
	R1	5'-AAGTCAAATCATTCAAAATCACCACCT-3'	
ERG11	F2	5'-AGGTGGTGATTGGAATGATTTGACTT-3'	۴۸۹ bp
	R2	5'-GAACTATAATCAGGGTCAGGCACCTTT-3'	

۴ دقیقه، در ادامه ۳۵ سیکل به ترتیب شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۲ دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به منظور توالی‌یابی به شرکت بیونیر کره جنوبی ارسال گردیدند. نتایج حاصل از تعیین توالی به کمک نرم افزار CLC v3.5 main workbench و نرم افزار آنلاین بلاست (BLAST) از نظر وجود یا نبود جهش در نمونه‌های مقاوم در مقایسه با نمونه استاندارد موجود در سایت NCBI (ATCC10231) PTCC 5027 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

الف) الگوی مقاومت به فلوکونازول در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس: در این مطالعه از ۱۲۰ جدایه مشکوک به کاندیدا آلبیکنس، ۴۵ جدایه کاندیدا آلبیکنس شناسایی شد. ۴۰ جدایه مقاوم و ۵ جدایه حساس به فلوکونازول به روش دیسک دیفیوژن تعیین گردید. نتایج نشان داد که ۸۸/۹ درصد جدایه‌ها مقاوم و ۱۱/۱ درصد جدایه‌ها حساس به فلوکونازول بودند. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی دارو (MIC) به روش برات دایلوژن تعیین شد. در تمام جدایه‌های مقاوم، $MIC_{90} \geq 64 \mu\text{g/ml}$ برای فلوکونازول تعیین شد.

ب) جهش‌های ژن ERG11 در جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول: پس از تأیید تولید محصولات PCR (شکل ۱)، توالی‌یابی صورت گرفت. بر اساس نتایج توالی‌یابی شش جهش بد معنی (missense) و ۱۳ جهش خاموش (Silent mutation) در جدایه‌های مقاوم شناسایی شد (جدول ۳).

سپس رقت‌های متوالی فلوکونازول در محدوده غلظتی ۶۴-۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و به همراه جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس با غلظت نیم مک فارلند به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس کشت داده شدند. رقتی که فاقد کدورت قابل مشاهده فارچی بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد. بر اساس معیار CLSI جدایه‌های حساس، حساس وابسته به دوز و مقاوم از هم تفکیک گردیدند (۹).

د) جداسازی DNA ژنومی از جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول: جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول در محیط سابورود دکستروز برات کشت و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند. سپس جداسازی DNA به روش جوشاندن صورت گرفت. به منظور اطمینان از جداسازی، نمونه‌های DNA بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شده و مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۰).

ه) بررسی جهش در دو ناحیه داغ جهش‌پذیری در ژن ERG11: پس از اطمینان از درستی تخلیص DNA ژنومی، با استفاده از کیت (AccuPower Pfu PCR PreMix شرکت تکاپوزیست (ایران) (حاوی آنزیم Pfu polymerase، کوفاکتور و بافر مخصوص در حجم ۵ میکرولیتر)، با افزودن ۳ میکرولیتر از DNA تخلیص شده، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای مستقیم و برگشتی و ۲۰ میکرولیتر از آب دیونیزه در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر اجزای واکنش PCR با یکدیگر مخلوط شدند. از دو جفت پرایمر به منظور بررسی جهش در نواحی داغ ۲۶۶ تا ۲۸۷ و ۴۰۵ تا ۴۸۸ استفاده شد (۱۱) (جدول ۲). واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (TUCH، آمریکا) به شرح زیر انجام شد:

واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت

جدول ۳: تغییرات بازی ایجاد شده در ژن ERG11 کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول در این مطالعه.

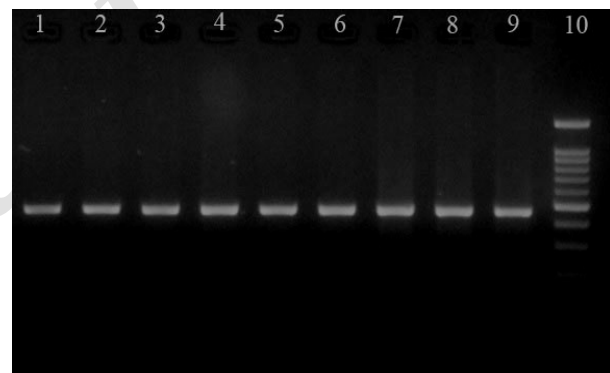
شماره نمونه	جهش بد معنی	شماره نمونه	جهش خاموش
16	TAT(Tyr)>CAT (His) Y257H	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22	CTA(Leu)>TTA (Leu) L220L
1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 17, 18, 19, 20, 22	GAA(Glu)>GAC (Asp) E266D	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 18, 19, 20, 21, 22	GTT(Val)>GTC (Val) V332V
15	GTT(Val)>ATT (Ile) V404I	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22	TTG(Leu)>TTA (Leu) L340L
15	GAT(Asp)>AAT (Asn) D421N	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 18, 19, 20, 22	AAA(Lys)>AAG (Lys) K342K
3, 4, 7, 10, 11, 18, 20	GTT(Val)>ATT (Ile) V488I	21	TCA(Ser)>TCG(Ser) S361S
1, 4	GAT(Asp)>GTT (Val) D504V	13, 16	CTT(Leu)>CTC (Leu) L370L
		1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 18, 19, 20, 21, 22	TAT(Tyr)>TAC (Tyr) Y401Y
		1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 20, 22	GCC(Ala)>GCT (Ala) A432A
		1, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 19, 20, 22	GCT(Ala)>GCC (Ala) A434A
		6	TCT(Ser)>TCC (Ser) S441S
		14, 21	GTT(Val)>GTA(Val) V456V
		1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 18, 19, 20, 22	TTG(Leu)>TTA (Leu) L480L
		1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 18, 19, 20, 22	AAC(Asn)>AAT (Asn) N490N

درمانی مقاوم به داروهای ضدباکتریایی (۱۲ و ۱۳) و ضد قارچی (۵ و ۷) است. به طوری که مقاومت به آزول ها به عنوان مؤثرترین داروهای ضد کاندیدا آلبیکنس در مراکز درمانی با رشد فزاینده ای همراه است.

در این مطالعه چندین جهش در نواحی داغ جهش پذیری ژن ERG11 در جدایه های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول در غرب مازندران به روش PCR-توالی یابی شناسایی شد. در مطالعه تیموری (Teymuri) و همکاران در سال ۲۰۱۵ از ۹۷ جدایه کاندیدا آلبیکنس به دست آمده از کودکان بستری در مرکز طبی کودکان در تهران، پنج جدایه مقاوم به فلوکونازول گزارش شد که MIC $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ تعیین شد (۱۴).

در مطالعه فرح بخش (Farahbakhsh) و همکاران در سال ۲۰۱۱، از ۶۶ نمونه کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران ایدزی در تهران، ۲۴/۲۴٪ موارد مقاوم به فلوکونازول گزارش گردید (۱۵). در مطالعه محمدی قلعه بین (Mohammadi-Ghalehbin) و همکاران در سال ۲۰۱۷ از ۱۱۸ کاندیدا آلبیکنس جدا شده از زنان باردار در شهر اردبیل، مقاومت به فلوکونازول در ۹۷ جدایه گزارش شد (۱۶).

همچنین در مطالعه بالابندی (Balabandi) و همکاران در

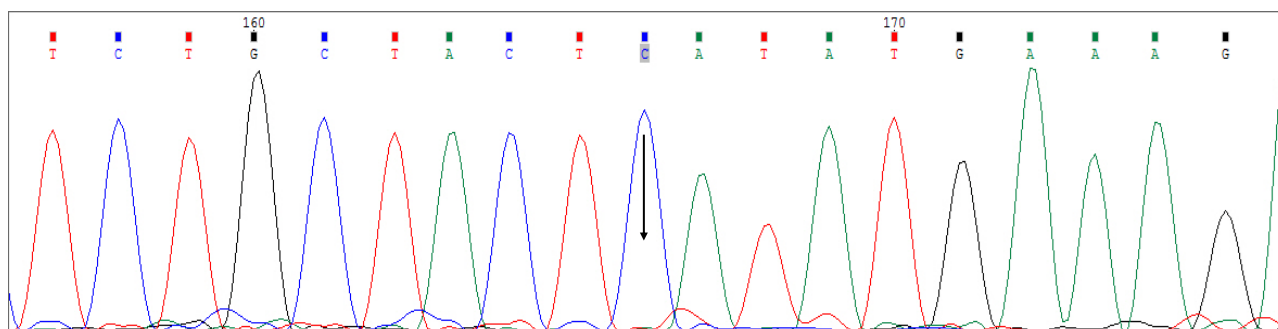


شکل ۱: محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵٪. ستون های ۱ تا ۵) محصولات PCR مربوط به جفت پرایمر ۱ با طول ۴۸۲ جفت باز، ستون های ۶ تا ۹) محصولات PCR مربوط به جفت پرایمر ۲ با طول ۴۸۹ جفت باز، ستون ۱۰) مارکر ۱۰۰ جفت بازی.

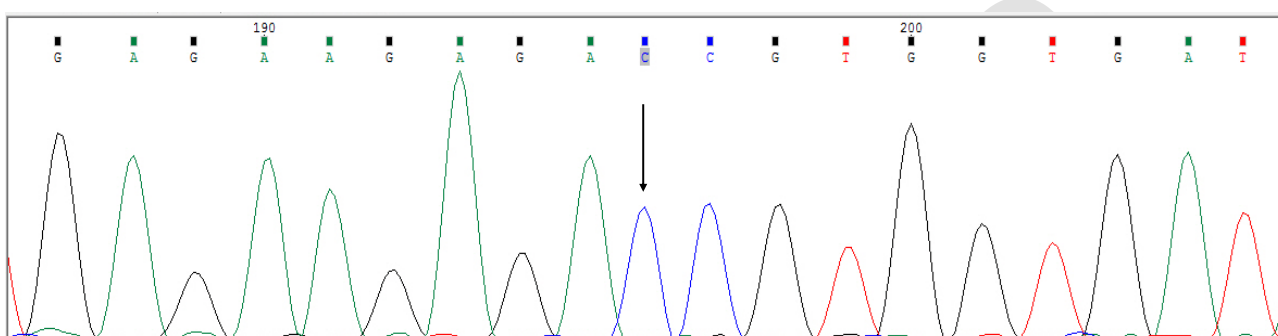
در یک جدایه جهش بد معنی Y257H، در دوازده جدایه جهش بد معنی E266D، در یک جدایه جهش بد معنی V404I، در یک جدایه جهش بد معنی D421N، در هفت جدایه جهش بد معنی V488I و در دو جدایه جهش بد معنی D504V شناسایی شد (شکل ۲ تا ۷).

بحث

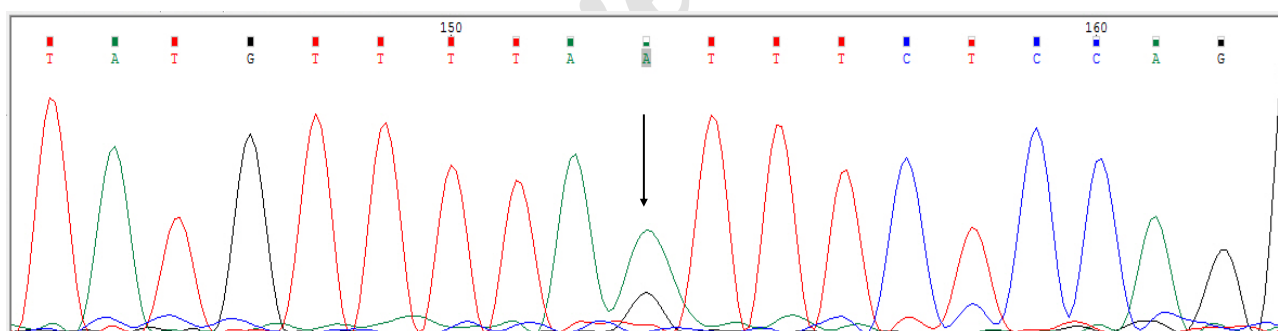
در ایران یکی از مهمترین مشکلات بیمارستان ها و مراکز



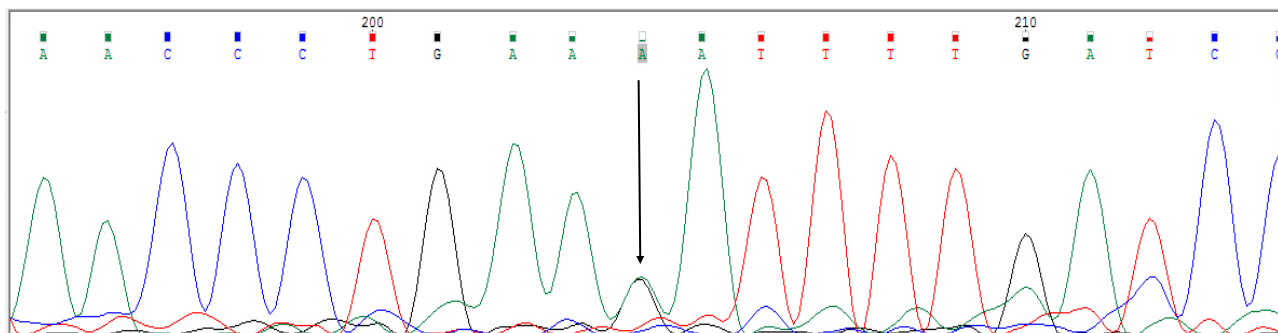
شکل ۲: الکتروفورگرام مربوط به تغییر باز T به C در باز ۷۶۹ بصورت هموزیگوت: با تغییر کدونی CAT (His) > TAT (Tyr) و تغییر آمینواسیدی Y257H.



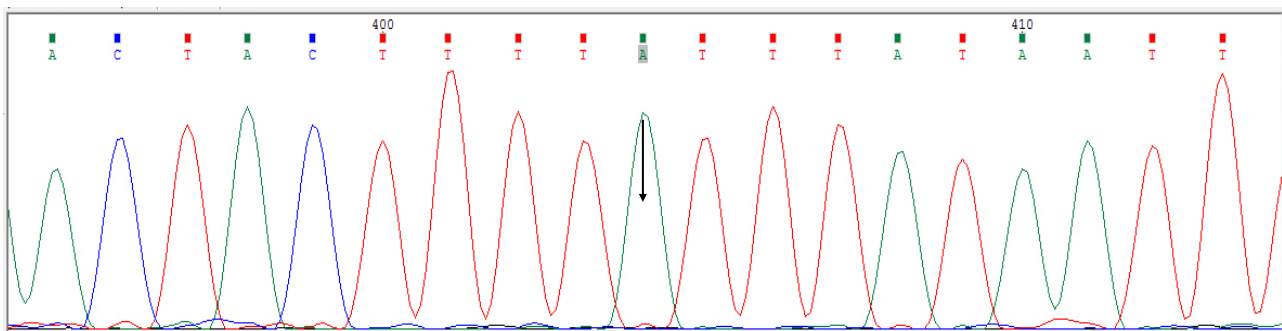
شکل ۳: الکتروفورگرام مربوط به تغییر باز A به C در باز ۷۹۸ بصورت هموزیگوت: با تغییر کدونی GAA(Glu)>GAC(Asp) و تغییر آمینواسیدی E266D.



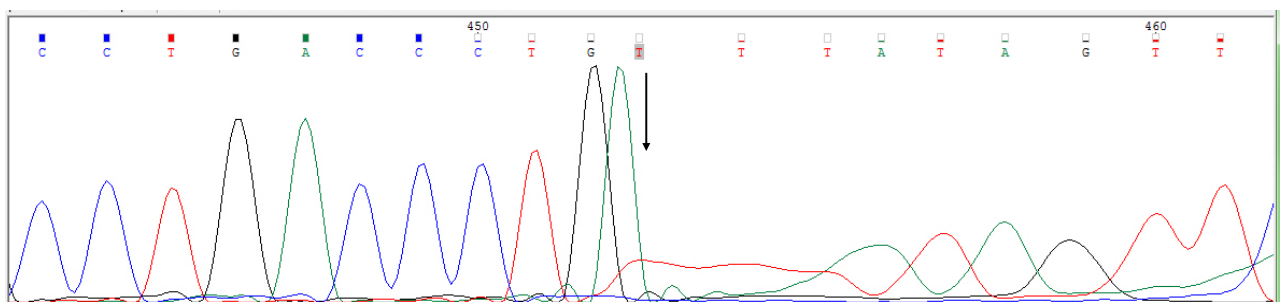
شکل ۴: الکتروفورگرام مربوط به تغییر باز G به A در باز ۱۲۱۰ بصورت هتروزیگوت: با تغییر کدونی GTT (Val) > ATT (Ile) و تغییر آمینواسیدی V404I.



شکل ۵: الکتروفورگرام مربوط به تغییر باز G به A در باز ۱۲۶۱ بصورت هتروزیگوت: با تغییر کدونی GAT(Asp) > AAT(Asn) و تغییر آمینواسیدی D421N.



شکل ۶: الکتروفورگرام مربوط به تغییر باز A به G در باز ۱۴۶۲ بصورت هموزیگوت: با تغییر کدونی GTT(Val)>ATT(Ile) و تغییر آمینو اسیدی V488I



شکل ۷: الکتروفورگرام مربوط به تغییر باز A به T در باز ۱۵۱۱ بصورت هموزیگوت: با تغییر کدونی GAT(Asp)>GTT(Val) و تغییر آمینو اسیدی D504V

سال‌های ۲۰۱۵ و ۲۰۱۶ از ۲۳ جدایه کاندیدا آلبیکنس جدا شده از زنان دچار ولوژینیت، ۲۰ جدایه به فلوکونازول مقاوم بودند. در این مطالعه میزان MIC ی فلوکونازول در این جدایه‌ها بین ۱۲۸ تا ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد (۵). در مطالعه حاضر مشابه با مطالعه بالابندی و همکاران و مطالعه محمدی قلعه بین و همکاران مقاومت به فلوکونازول شیوع بالایی در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس داشت. در حالی که در کودکان و افراد مبتلا به ایدز در مطالعه تیموری و همکاران و مطالعه فرح بخش و همکاران میزان مقاومت به این دارو به میزان کمتری گزارش شد که نشان دهنده شیوع بالای این عفونت در زنان و مصرف بی رویه این دارو در آن‌هاست. در مطالعات مختلف جهش در نواحی داغ جهش‌پذیری ژن ERG11 در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول گزارش شده است. در مطالعه یانگ (Xiang) و همکاران در بعضی از جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول جهش Y257H شناسایی شد (۱۷). در مطالعه زو (Xu) و همکاران در ۱۴ جدایه مقاوم به فلوکونازول این جهش یافت شد (۳). در مطالعه وانگ (Wang) و همکاران در جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول جهش Y257H گزارش شد (۱۸). در نظر نیز در یک جدایه مقاوم به فلوکونازول گزارش شد که به نظر می‌رسد این جهش در ایجاد مقاومت به دارو در این جدایه مشابه با مطالعات یادشده نقش داشته باشد. در مطالعه بالابندی و همکاران بر روی ۲۰ جدایه مقاوم به فلوکونازول، در ده جدایه جهش E266D گزارش گردید (۵). در مطالعه وایت (White) و همکاران در بعضی از جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول جهش E266D شناسایی گردید (۱۹). در مطالعه وانگ (Wang) و همکاران این جهش در جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول با فراوانی بالا گزارش شد (۱۸). در مطالعه روسانا (Rosana) و همکاران در سال ۲۰۱۵ جهش E266D در ژن ERG11 در بعضی از جدایه‌ها شناسایی شد (۲۰). در مطالعه گلدمن (Goldman) و همکاران جهش E266D در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول گزارش گردید (۲۱). همچنین در بعضی مطالعات همراهی این جهش بدمعنی با

در مطالعه هو (Hu) و همکاران جهش *V488I* در جدایه های کاندیدا آلبیکنس هم حساس و هم مقاوم گزارش گردید (۲۶). در مطالعه زو (Xu) و همکاران در یک جدایه کاندیدا آلبیکنس حساس به دوز فلوکونازول جهش *V488I* شناسایی شد (۳). در مطالعه زو و همکاران جهش *V488I* و *V488G* در جدایه های مقاوم به فلوکونازول یافت شد (۱۱).

با توجه به اینکه این جهش هم در جدایه های حساس و هم مقاوم در مطالعات مختلف گزارش شده، وجود آن در هفت جدایه مقاوم در این مطالعه می تواند اهمیت آن را در ایجاد مقاومت به دارو کم کند. اما ممکن است حضور آن به همراه دیگر جهش ها در ژن *ERG11* اثر تشدید کنندگی در کاهش تمایل دارو به پروتئین حاصل، داشته باشد. شایان یادآوری است که این جهش نیز در یکی از نواحی داغ جهش پذیری (ناحیه ۴۰۵ تا ۴۸۸) رخ داده است و می تواند اهمیت آن را در کاهش تمایل به دارو بیشتر نماید. جهش *D504V* نیز در این مطالعه در دو جدایه مقاوم به فلوکونازول برای اولین بار در جهان از غرب مازندران گزارش می گردد. در مطالعه زو و همکاران در یک جدایه حساس جهش *D504G* شناسایی شد (۱۱).

بنابراین به نظر می رسد جهش مشاهده شده در این مطالعه بتواند در ایجاد مقاومت در جدایه های کاندیدا آلبیکنس نقش داشته باشد. با اینحال حضور این جهش ها در جدایه های مقاوم در مطالعه حاضر مشابه با دیگر مطالعات (۲۲ و ۲۷) می تواند نشان دهنده این امر باشد که برای ایجاد مقاومت، تنها یک جهش تعیین کننده نیست و حضور هم زمان چند جهش (۱۷، ۲۲ و ۲۷-۲۹) ممکن است در کاهش تمایل *ERG11p* به دارو نقش داشته باشد.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر مشخص شد که ۸۸٪ موارد کاندیدا آلبیکنس جدا شده از غرب مازندران، مقاوم به فلوکونازول هستند که این امر نشان دهنده تاثیر اندک این دارو در درمان ولوآزینیت در این استان می باشد و لازم است تدابیر درمانی دیگری جایگزین

حساسیت به فلوکونازول نیز گزارش شده است. به طوری که در مطالعه یانگ و همکاران در بعضی از جدایه های حساس به فلوکونازول نیز این جهش مشاهده گردید (۱۷).

همچنین در مطالعه ماناستیر (Manastir) و همکاران در بعضی جدایه های حساس به دوز کاندیدا آلبیکنس این جهش گزارش گردید (۲۲). بنابراین این جهش به تنهایی قادر به تغییر ساختار پروتئین *ERG11* (*ERG11p*) نیست و در جدایه هایی که چندین جهش در این ژن دارند (۵) کاهش تمایل به داروهای آزولی و در نتیجه مقاومت به دارو مشاهده می گردد. در مطالعه مائی باشی (Maebashi) و همکاران در یک جدایه مقاوم به فلوکونازول جهش *V404L* گزارش شد (۲۳).

در مطالعه لی (Lee) و همکاران بر روی ۱۲ جدایه کاندیدا آلبیکنس در یک جدایه حساس به دوز فلوکونازول، جهش *V404L* شناسایی شد (۲۴).

در مطالعه حاضر مشابه با مطالعه مائی باشی و همکاران، جهش در کدون ۴۰۴ ژن *ERG11* در یک جدایه مقاوم رخ داد، اما با این تفاوت که در پژوهش حاضر ایزولوسین جایگزین والین شد و در مطالعه مائی باشی و همکاران لوسین جایگزین والین شده بود. از سوی دیگر جهش مشاهده شده در این مطالعه در مطالعه لی و همکاران نیز گزارش شد با این تفاوت که در مطالعه آن ها این جهش در جدایه حساس به دوز رخ داده بود.

به نظر می رسد این جهش در مطالعه لی و همکاران در جدایه هایی که به مرور زمان مقاوم به فلوکونازول می شوند نقش داشته باشد و به عبارتی در مقاومت به فلوکونازول ممکن است مؤثر باشد. از سوی دیگر جهش *D421N* برای اولین بار در جهان از غرب مازندران گزارش می گردد. در مطالعه فنگ (Feng) و همکاران بر روی ۱۰ جدایه مقاوم به فلوکونازول جهش *F422L* مشاهده شد (۲۵).

با توجه به اینکه این دو کدون (۴۲۱ و ۴۲۲) در یکی از نواحی داغ جهش پذیری (ناحیه ۴۰۵ تا ۴۸۸) قرار دارند و این نواحی معمولاً در جدایه های مقاوم دچار جهش می شوند به نظر می رسد جهش *D421N* در ایجاد مقاومت به فلوکونازول در جدایه مطالعه شده نقش داشته باشد.

این نوع درمان شود. جدایه های حساس و حساس وابسته به دوز نیز

گزارش شده باشد.

از سوی دیگر در مطالعه حاضر مشخص شد که بعضی

جدایه های مقاوم دارای جهش در بعضی از نواحی داغ

جهش پذیری در ژن ERG11 هستند که اهمیت این نواحی ژنی

در تمایل پروتئین به دارو در مطالعات مختلف مشخص شده

است. به نظر می رسد بعضی جهش ها چون D421N, Y257H

و D504V تنها در جدایه های مقاوم گزارش شود و

بعضی دیگر چون E266D, V404L و V488I در

این مقاله تحقیقاتی حاصل پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد

علوم سلولی و مولکولی می باشد. نویسندگان مقاله از تمامی

کسانی که در انجام این پژوهش همکاری صمیمانه داشته اند

سپاسگزاری می نمایند.

تشکر و قدردانی

References

1. Bhattacharya S, Sobel JD, White TC. A combination fluorescence assay demonstrates increased efflux pump activity as a resistance mechanism in azole-resistant vaginal *Candida albicans* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(10): 5858-66.
2. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013; 4(2): 119-128.
3. Xu Y, Sheng F, Zhao J, Chen L, Li C. ERG11 mutations and expression of resistance genes in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates. *Arch Microbiol.* 2015; 197(9): 1087-1093.
4. Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille J. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(8): 2404-2412.
5. Balabandi S, Khazaei -Kooohpar 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 Univ Med Sci J.* 2017; 20(7): 13-22. [In Persian]
6. Flowers SA, Colon B, Whaley SG, Schuler MA, Rogers PD. Contribution of clinically derived mutations in ERG11 to azole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(1): 450-60.
7. Eftekhari AD, Anvari M, Ranji N. Investigation of ERG11 gene mutations in fluconazole resistant *Candida albicans* isolated from a number of Rasht hospitals. *Pharm Res.* 2015; 18(3): 98-107.
8. Trnovsky J, Merz W, Della-Latta P, Wu F, Arendrup MC, Stender H. Rapid and accurate identification of *Candida albicans* isolates by use of PNA FISH Flow. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(4): 1537-1540.
9. Cockerill F, Patel J, Alder J, Bradford P, Dudley M, Eliopoulos G. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement; M100-S23: Clinical & Laboratory Standards Institute; 2013.
10. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of

- DNA fragments. J Vis Exp. 2012; pii: 3923. doi: 10.3791/3923.
11. 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.
 12. Ranji N, Rahbar Takrami S. Role of *mexZ* gene in ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Guilan province. Urmia Med J. 2017; 27(1): 902-913. [In Persian]
 13. Mohammad-Alipour Z, Asadpour L, Ranji N. Fluoroquinolone resistance and mutation in *gyrA* gene in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Iran J Med Microbiol. 2016; 10(5): 31-37.
 14. Teymuri M, Mamishi S, Pourakbari B, Mahmoudi S, Ashtiani MT, Sadeghi RH. 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. Farahbakhsh E, Yadegari M, Rajabi Bazl M, Taghizadeh Armaki M. Evaluation of susceptibility of strains of *Candida albicans* isolated from AIDS patients to fluconazole and determination of CDR2 resistance gene in resistant strains by RT-PCR method. Armaghane danesh. 2011; 16(3): 201-210. [In Persian]
 16. 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. J Ardabil Uni Med Sci. 2017; 16(4): 409-421. [In Persian]
 17. Xiang MJ, Liu JY, Ni PH, Wang S, Shi C, Wei B. Erg11 mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. FEMS Yeast Res. 2013; 13(4): 386-393.
 18. Wang B, Huang LH, Zhao JX, Wei M, Fang H, Wang DY. ERG11 mutations associated with azole resistance in *Candida albicans* isolates from vulvovaginal candidosis patients. Asian Pac J Trop Biomed. 2015; 5(11): 909-914.
 19. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(6): 1704-1713.
 20. 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. J Med Microbiol. 2015; 64(9): 1046-1052.
 21. Goldman GH, da Silva Ferreira ME, dos Reis Marques E, Savoldi M, Perlin D, Park S. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. Diag Microbiol Infect Dis. 2004; 50(1): 25-32.
 22. 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.
 23. Maebashi K, Kudoh M, Nishiyama Y, Makimura K, Kamai Y, Uchida K. Proliferation of intracellular structure corresponding to reduced affinity of fluconazole for cytochrome P-450 in two low-susceptibility strains of *Candida albicans* isolated from a Japanese AIDS patient. Microbiol Immunol. 2003; 47(2): 117-124.
 24. 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): 217-224.
25. Feng LJ, Wan Z, Wang XH, Li RY, Liu W. Relationship between antifungal resistance of fluconazole resistant *Candida albicans* and mutations in ERG11 gene. Chinese Med J. 2010; 123(5): 544-548.
 26. Hu L, Du X, Li T, Song Y, Zai S, Hu X. Genetic and phenotypic characterization of *Candida albicans* strains isolated from infectious disease patients in Shanghai. J Med Microbiol. 2015; 64(Pt 1): 74-83.
 27. Wang H, Kong F, Sorrell TC, Wang B, McNicholas P, Pantarat N. 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.
 28. Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. Microbiol. 1999; 145 (Pt 10): 2701-2713.
 29. Strzelczyk JK, Slempl-Migiel A, Rother M, Golabek 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): 547-552.



Investigation of mutations in hotspot regions of *ERG11* gene in fluconazole-resistant isolates of *Candida albicans* in the west of Mazandaran

Masoumeh Majdi¹, Zeinab Khazaei Koohpar², Ayatollah Nasrollahi Omran³

¹MSc Student, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran. ²Assistant Professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran. ³Associate Professor, Department of Medical Mycology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Nowadays, widespread use of fluconazole has resulted in resistance in *Candida albicans* strains. The conformational changes of Erg11p due to mutations in the *ERG11* gene is one of the mechanisms resulting in azole resistance. The aim of our study was to investigate *ERG11* gene mutations in fluconazole-resistant isolates of *C. albicans* in the west of Mazandaran province.

Materials & Methods: In this descriptive cross-sectional study, clinical specimens were obtained from vaginal mucosa of 120 women in hospitals of the west of Mazandaran province. *C. albicans* isolates were identified by standard methods such as germ tubes and CHROMEagar medium culture. The fluconazole resistance and susceptibility of the isolates were evaluated by Kirby Bauer and broth micro-dilution methods. Then, *ERG11* gene mutations in resistant isolates were determined by PCR-sequencing method as compared with PTCC5027 (ATCC10231) reference strain.

Results: Out of 45 *C. albicans* isolates, 40 isolates were resistant and 5 isolates were susceptible to fluconazole. The MIC of fluconazole was determined as ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$. PCR-sequencing analysis revealed that 18 fluconazole-resistant isolates have six missense mutations (*Y257H*, *E266D*, *V404I*, *D421N*, *V488I*, and *D504V*) in the *ERG11* gene.

Conclusion: The identified mutations in this study may play role in developing fluconazole resistance in *C. albicans* isolates in the west of Mazandaran province by decreasing fluconazole affinity to Erg11p.

Keywords: *Candida albicans*, *ERG11*, Fluconazole, *V488I* mutation, *D504V* mutation.

Correspondence to: Zeinab Khazaei Koohpar

Tel: +98 1154271105

E-mail: khazaei@toniau.ac.ir

Journal of Microbial World 2018, 11(3): 258-268.