Archive of SID

Arak Medical University Journal (AMUJ)
2017; 20(124): 13-22

Original Article

Correlation between *ERG11* Gene Mutations and Fluconazole Resistance in *Candida albicans* Strains Isolated from Rasht in Years 2015-2016

Saeedeh Balabandi[1], Zeinab Khazaei-Koohpar[2*], Najmeh Ranji[3]

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

Received: 27 May 2017, Accepted: 2 Aug 2017

Abstract

Background: *Candida albicans* as an opportunistic fungal pathogen in human causes candidiasis. The widespread use of azoles has led to the increase of azole resistance in Candida albicans isolates. Mutation in the *ERG11* gene is one of several azole resistance reasons in Candida albicans. The aim of this study was to find *ERG11* gene mutations in fluconazole resistant isolates in Rasht.

Materials and methods: *Candida albicans* isolates were identified by standard identification methods such as germ tubes. The fluconazole resistance and susceptibility of the isolates was evaluated by Disc diffusion and MIC methods. For mutation determining, *ERG11* gene was amplified by PCR and then sequenced in clinical isolates.

Results: From 23 isolates of Candida albicans, 20 isolates were fluconazole resistant. The MIC of fluconazole in these isolates was determined between 128 to 2048µg/ml. Also, sequencing analysis showed that 10 fluconazole resistant isolates had two missense mutations (D116E and E266D) in *ERG11* gene.

Conclusion: In this study, resistance to high concentration of fluconazole shows that different mechanisms simultaneously implicated in developing azoles resistance in the isolates. Association of *ERG11* gene mutation and deregulation of other genes can be led to resistance to high fluconazole concentration in this study.

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

*Corresponding Author:
Address: Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
Email: khazaei@toniau.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:43 +0330 on Monday September 25th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۲۰، شماره۷ (شماره پیاپی ۱۲۴)، مهر ۱۳۹۶، ۲۲-۱۳

ارتباط بین جهش های ژن *ERG11* و مقاومت به فلوکونازول در سویه های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از رشت در سال های ۹۵-۹۴

سعیده بالابندی[۱]، زینب خزائی کوهپر[۲*]، نجمه رنجی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.
۲. استادیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.
۳. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۶ ، تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: کاندیدا آلبیکنس به عنوان یک پاتوژن قارچی فرصت طلب در انسان باعث کاندیدیازیز می شود. مصرف گسترده آزول ها باعث افزایش مقاومت به آزول ها در جدایه های کاندیدا آلبیکنس شده است. جهش در ژن *ERG11* یکی از چندین علت مقاومت به آزول ها در کاندیدا آلبیکنس می باشد. هدف از این مطالعه، یافتن جهش های ژن *ERG11* در جدایه های مقاوم به فلوکونازول در رشت بود.

مواد و روش ها: جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس با استفاده از روش های استاندارد تعیین هویت چون لوله زایا شناسایی شدند. مقاومت و حساسیت جدایه ها به فلوکونازول به کمک روش های دیسک دیفیوژن و MIC مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین جهش، ژن *ERG11* در جدایه های کلینیکی به روش PCR تکثیر و سپس تعیین توالی شد.

یافته ها: از ۲۳ جدایه کاندیدا آلبیکنس، ۲۰ جدایه به فلوکونازول مقاوم بودند.MICی فلوکونازول در این جدایه ها بین ۱۲۸ تا ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین گردید. هم‌چنین تحلیل تعیین توالی نشان داد که ۱۰ جدایه مقاوم به فلوکونازول دو جهش بدمعنی (D116E و E266D) در ژن *ERG11* داشتند.

نتیجه گیری: در این مطالعه، مقاومت به غلظت بالای فلوکونازول نشان می دهد که مکانیسم های مختلفی به طور همزمان در ایجاد مقاومت به آزول ها در این جدایه ها نقش دارند. همراهی جهش در ژن *ERG11* و تغییر بیان دیگر ژن ها ممکن است باعث مقاومت به غلظت بالای فلوکونازول در این مطالعه شده باشد.

واژگان کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، *ERG11* ، فلوکونازول، MIC، جهش.

***نویسنده مسئول:** ایران، تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی
Email: khazaei@toniau.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:43 +0330 on Monday September 25th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:43 +0330 on Monday September 25th 2017

مقدمه

کاندیدا آلبیکنس یکی از علل عفونت های قارچی است (۱) که در بیماران با نقص ایمنی در اثر شیمی درمانی سرطان، پیری، پیوند اعضاء و عفونت HIV شایع است (۲). واژینیت مایکوتیک (*Mycotic vaginitis*) یکی از عفونت های شایع مخاطی حاصل از مخمر کاندیدا آلبیکنس است که در زنان بین ۲۰ تا ۳۰ سال شیوع بالایی دارد. معمولاً درمان کاندیدیازیس ولوواژینیت به علت مقاومت به دارو به سختی صورت می گیرد (۳). از داروهای ضد کاندیدیایی می توان به داروهای خانواده آزول (۴) و پلی ین ها اشاره نمود. پلی ین ها نظیر آمفوتریسین B با مهار عملکرد ارگوسترول، اثر ضد قارچی خود را اعمال می کنند. در حالی که خانواده آزول نظیر فلوکونازول، ایتراکونازول و ووریکونازول با مهار سیتوکروم P450 (Erg11p) در بیوسنتز ارگوسترول تداخل ایجاد می کنند (۵). اما به دلایل مختلف مقاومت به داروهای ضدقارچی در حال افزایش است. چندین مکانیسم مقاومت به آزولها شناسایی شده که شامل موارد ذیل است: ۱) افزایش بیان *ERG11*، ۲) کاهش تمایل Erg11p به آزول در اثر جهش در ژن کدکننده آن، ۳) از دست دادن توان محبوس کردن آزول توسط سلول در اثر افزایش بیان ژن های درگیر در سیستم های پمپ افلاکس نظیر CDR1، CDR2 و MDR1 و ۴) جهش در ژن ERG3 و مهار بیوسنتز ارگوسترول (۳). داروهای آزولی با مهار ۱۴-α لانوسترول دمتیلاز (Erg11p) در بیوسنتز ارگوسترول تداخل ایجاد می کنند(۵). ارگوسترول یک لیپید غشایی است که در استحکام، پایداری و مقاومت در برابر تنشها نقش داشته و فقدان آن منجر به تجزیه سلول می شود. جهش در *ERG11* منجر به کاهش تمایل آزول ها به این پروتئین و در نتیجه ایجاد مقاومت به دارو در جدایه های کاندیدا آلبیکنس می شود. در مطالعات مختلف صدها جهش در این ژن شناسایی شده که بسیاری از آن ها در جدایه های مقاوم گزارش شده اند. با این حال بین بعضی جهش ها (پلی مورفیسم ها) و مقاومت به دارو ارتباط معنی داری شناسایی نشده و این گروه از جهش ها در جدایه های حساس نیز گزارش شده است. بنابراین لازم است در مناطق مختلف، جهش ها یا پلی مورفیسم های موجود در ژن *ERG11* در جدایه های مقاوم و حساس بررسی شده و با مطالعات بیشتر از جمله مطالعات بیوانفورماتیکی بین موقعیت جهش و تغییر در فعالیت پروتئین حاصل، ارتباط پیدا نمود(۶). به عنوان نمونه، Y257H (۷) و A114S فقط در جدایه های مقاوم به فلوکونازول شناسایی شده (۸)، اما D116E هم در جدایه های حساس و هم مقاوم پیدا شده است (۶). هدف از این مطالعه، شناسایی جهش های ژن *ERG11* به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده مقاومت به فلوکونازول در جدایه های کاندیدا آلبیکنس در رشت مورد بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت جدایه های مخمر کاندیدا آلبیکنس

در این مطالعه مقطعی توصیفی در بازه زمانی یک‌ساله ۹۴-۹۵، نمونه‌های بالینی از ترشحات واژن ۵۰ زن مشکوک به عفونت کاندیدایی واژینال از بیمارستان الزهرای رشت توسط متخصص زنان و زایمان بعد از کسب مجوز از کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان (کد IR.GUMS.REC.1395.25) تهیه و تشخیص داده شد. نمونه‌ها در محیط کشت انتقال کری بلیر(Cary Blair) (شرکت Quelab، کانادا) قرار گرفته و سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس در محیط کشت سابرود دکستروز آگار (شرکت Quelab، کانادا)، به همراه کلرامفنیکل کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در ادامه شناسایی کاندیدا آلبیکنس براساس مورفولوژی کلنی، تشکیل لوله زایا، و تعیین رنگ کلنی ها در محیط کروم آگار کاندیدا (شرکت CHROMagar، فرانسه) انجام گرفت. از سویه PTCC 5027 (ATCC10231) به عنوان سویه حساس و کنترل استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:43 +0330 on Monday September 25th 2017

سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی

جهت تعیین الگوی حساسیت دارویی، حساسیت یا مقاومت جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیک فلوکونازول (۱۰ میکروگرم) (HiMedia، هند) به روش کربی بوئر بررسی شد. بعد از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری و نتایج آن طبق استاندارد CLSI 2013 (۹) گزارش گردید (جدول ۱).

تعیین MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی آنتی بیوتیک فلوکونازول، ابتدا جدایه ها در محیط کشت سابورو دکستروز براث حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. سپس رقت های متوالی آنتی بیوتیک فلوکونازول در محدوده غلظت ۴ تا ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی لیتر ، همراه با کاندیدا آلبیکنس (با غلظت نیم مک فارلند) در میکروپلیت ۹۶ خانه تهیه گردید. بعد از ۲۴ ساعت کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد میزان MIC بر اساس استاندارد CLSI تعیین گردید (جدول ۱).

جدول۱. مقادیر *MIC* و قطر هاله عدم رشد استاندارد برای جدایه های کاندیدا آلبیکنس بر اساس روش *CLSI* (حساس وابسته به دوز=*S-DD*، حساس= *S* ، مقاوم=*R*)

داروی ضد قارچ	غلظت آنتی بیوتیک در هر دیسک (μg)	قطر هاله(mm)			مقدار $MIC(gr/ml)$		
		S	*S-DD*	*R*	*S*	*S-DD*	*R*
فلوکونازول	$10\mu gr$	≥ 19	15-18	≤ 14	≤ 8	16-32	≥ 64

تخلیص DNAی ژنومی

جدایه های کاندیدا آلبیکنس در محیط سابورود دکستروز براث (Quelab، کانادا) کشت داده شدند و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. سپس تخلیص DNA با استفاده از کیت MasterPure Yeast DNA Purification KIT(شرکت Epicentre، امریکا) طبق دستورالعمل شرکت صورت گرفت. در ادامه جهت اطمینان از صحت تخلیص، نمونه های DNA، در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و مورد بررسی قرار گرفتند.

واکنش PCR و تعیین توالی ژن *ERG11*

بعد از تخلیص DNA ژنومی، اجزای واکنش PCR با استفاده از کیت Gold master mix (*pfu*) (Golden double helix، ایتالیا) در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر با افزودن DNA ژنومی (۳ میکرولیتر) و جفت پرایمر (۲۰ میکرومول) (هر کدام ۱ میکرولیتر) به مستر میکس (حاوی آنزیم، کوفاکتور و بافر مخصوص (۲۵ میکرولیتر) آماده شد. سنتز پرایمرها (۸) توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) صورت گرفت (جدول۲). واکنش PCR با استفاده از ترموسایکلر Analaytik Jena طبق برنامه ذیل انجام شد: یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل به ترتیب در دماهای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه. بعد از اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR ، نمونه ها با حفظ زنجیره سرمایی توسط شرکت تکاپو زیست (ایران، تهران) به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. نمونه ها توسط شرکت Bioneer تعیین توالی شد. سپس نتایج حاصل از توالی یابی به کمک نرم افزار CLC main workbench v3.5 و نرم افزار آنلاین بلاست

www.SID.ir

Archive of SID

(BLAST) از نظر وجود جهش در نمونه های مقاوم در مقایسه با نمونه استاندارد رفرنس موجود در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفت.

جدول۲. جدول مشخصات پرایمرهای ژن *ERG11*

طول محصول *PCR*	توالی پرایمر	نام پرایمر
483 bp	*5′- TTAGTGTTTTATTGGATTCCTTGGTT -3′*	*ERG11-1F*
	5′-TCTCATTTCATCACCAAATAAAGATC-3′	*ERG11-1R*
482 bp	*5′-ACCAGAAATTACTATTTTCACTGCTTCA-3′*	*ERG11-2F*
	5′-AAGTCAAATCATTCAAATCACCACCT-3′	*ERG11-2R*

یافته ها

مقاومت جدایه های کاندیدا آلبیکنس به فلوکونازول

از بین ۲۳ جدایه کاندیدا آلبیکنس شناسایی شده در این تحقیق، به روش انتشار دیسک ۸۶/۹۵ درصد (۲۰ نمونه) مقاوم ، دو جدایه (۸/۶۹ درصد) نیمه حساس و یک جدایه (۴/۳۴ درصد) حساس به فلوکونازول (شکل ۱) گزارش گردید (۱۰). هم چنین حداقل غلظت مهارکنندگی دارو (MIC) به روش براث دایلوشن مشخص شد. بیشترین MIC در جدایه های مقاوم مربوط به ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که ۵۰ درصد از کل نمونه‌های مقاوم را شامل می‌شد و کمترین MIC مربوط به ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که ۵ درصد از ۲۰ نمونه ها را شامل می‌شد(۱۰).

شکل۱. نتایج دیسک آنتی بیوگرام. الف: نمونه حساس به فلوکونازول. ب) نمونه مقاوم به فلوکونازول

جهش های ژن *ERG11* در جدایه های مقاوم به فلوکونازول

بعد از انجام واکنش PCR (شکل۲)، بر اساس نتایج تعیین توالی (جدول۳) در ۱۲ جدایه جهش های خاموش شناسایی شد. در ۱۰ جدایه جهش بدمعنی E266D به صورت هموزایگوت پیدا شد که در کدون ۲۶۶ –م، گلوتامیک اسید به آسپارتیک اسید تبدیل شده بود (شکل۳). هم‌چنین در ۲ جدایه مقاوم جهش بدمعنی D116E به صورت هتروزایگوت گزارش شد که در کدون ۱۱۶–م، آسپارتیک اسید به گلوتامیک اسید تبدیل شده بود (شکل۴).

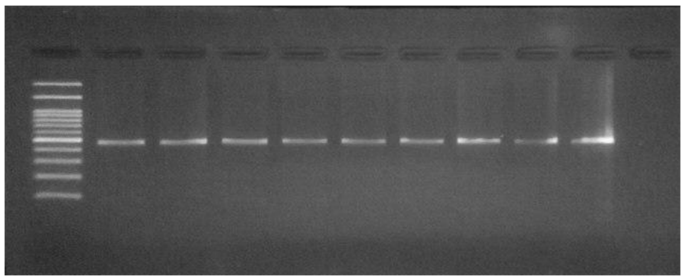
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:43 +0330 on Monday September 25th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:43 +0330 on Monday September 25th 2017

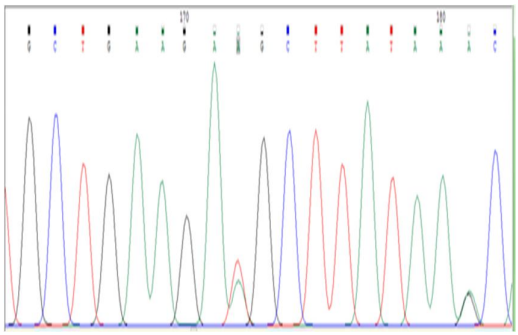
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



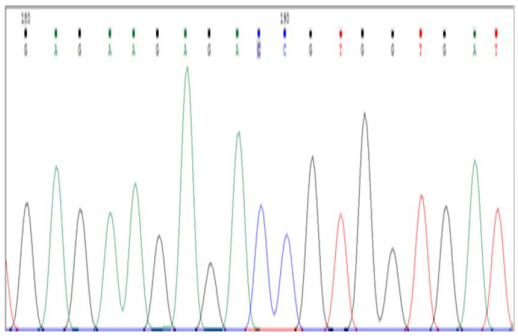
شکل۲. محصولات *PCR* در ژل آگارز ۱/۵ درصد. نمونه ۱ (*DNA* مارکر *bp*۱۰۰)،نمونه های۲ تا ۵ (محصولات*PCR* مربوط به جفت پرایمر ۱ با طول*bp* ٤٨٢)، نمونه های ٦ تا ۱۰ (محصولات*PCR* مربوط به جفت پرایمر ۲ با طول*bp* ٤٨٣)، نمونه ۱۱ (کنترل منفی).

جدول۳. تغییرات بازی و آمینواسیدی ایجاد شده در ژن *ERG11* کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول

جهش	تغییر بازی	شماره نمونه
F72F	TTC>TTT	۶و ۷و ۱۲و ۱۶و ۱۹ و ۲۱و۲۵و ۳۰ و۳۲و۳۶
F105F	TTT>TTC	۶و ۱۲و و ۱۷و۱۶و ۱۹ و ۲۱و۲۵و۳۰ و ۳۲و۳۶
S137S	TCC>TCT	۶و ۱۶و ۱۷و ۱۹ و ۲۱و۲۵و ۳۰ و۳۲و۳۶
H183H	CAT>CAC	۶و ۷و ۱۲و ۱۷و۲۱و ۲۴و۲۵و۳۰ و۳۲
D116E	GAT>GAA	۱۷و ۱۹
L220L	CTA>TTA	۶و۷ و۱۲و۱۶و۱۷و۱۹و۲۱و۲۵و ۳۲و ۳۴
E266D	GAA>GAC	۶و۷ و۱۲و۱۶و۱۷و۱۹و۲۱و۲۵و ۳۲و ۳۴
V332V	GTT>GTC	۶و۷ و۱۲و۱۶و۱۷و۱۹و۲۱و۲۵و ۳۲و ۳۴
L340L	TTG>TTA	۶و۷ و۱۲و۱۶و۱۷و۱۹و۲۱و۲۴و ۲۵و ۳۲و ۳۴
K342K	AAA>AAG	۶و۷ و۱۲و۱۶و۱۷و۱۹و۲۱و۲۵و ۳۲و ۳۴
V332V	GTT>GTC	۲۴



شکل۳. الکتروفروگرام مربوط به تغییر باز *T* به *A* در کدون ۱۱٦: با تغییر کدونی *GAT(Asp)>GAA(Glu)* و تغییر آمینواسیدی *D116E*



شکل ٤. الکتروفروگرام مربوط به تغییر باز *A* به *C* در کدون ۲٦٦: با تغییر کدونی *GAA(Glu)>GAC(Asp)* و تغییر آمینواسیدی *E266D*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:43 +0330 on Monday September 25th 2017

بحث

فلوکونازول یکی از داروهای اصلی ضدقارچی درمان عفونتهای کاندیدیایی (کاندیدیازیس) می باشد (۴, ۱۱). با این وجود درمان طولانی مدت و مصرف بی رویه داروهای خانواده آزول باعث ایجاد جدایه های مقاوم به یک یا چند داروی آزولی شده است. ایجاد جدایه های مقاوم یکی از معضلات اصلی در درمان کاندیدا آلبیکنس می باشد. بنابراین شناسایی علت مقاومت به داروهای آزولی در جدایه های کلینیکی کاندیدا آلبیکنس، امکان ارائه راهکارهای درمانی مناسب تر در آینده را فراهم می سازد.

در مطالعه سوبل و همکاران در سال ۲۰۰۲ مشخص شد که تنها ۳/۶ درصد از جدایه های کاندیدا آلبیکنس، مقاوم به فلوکونازول هستند (MIC >64 میکروگرم بر میلی لیتر) (۱۲). در مطالعه وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۵ مشخص شد که در بین ۳۰۲ جدایه کاندیدا آلبیکنس حدود ۸/۵ درصد موارد مقاوم به فلوکونازول بودند (۱۳).

در مطالعه فرح بخش و همکاران در سال ۱۳۸۸ در دانشگاه تربیت مدرس مشخص شد که ۲۸/۷ درصد جدایه های حاصل از کاندیدیازیس دهانی در مبتلایان به HIV تهیه شده از بیمارستان امام خمینی تهران، مقاوم به فلوکونازول هستند(۱۴). در مطالعه نصرالهی عمران و همکاران در سال ۱۳۹۳ بر روی ۴۶ جدایه کاندیدا آلبیکنس ، ۱۴ جدایه مقاوم به فلوکونازول شناسایی گردید (۱۵). در مطالعه حسن پور و همکاران در سال ۱۳۹۳ از ۱۶۰ سواب واژینال از بیماران مشکوک به کاندیدیازیز، ۱۵ جدایه کاندیدا آلبیکنس شناسایی شد که همگی مقاوم به فلوکونازول بودند (۱۶). در مطالعه حاضر، ۸۶/۹۵ درصد موارد مقاوم به فلوکونازول بودند که نشان دهنده افزایش مقاومت به این دارو در ایران در سال‌های اخیر می باشد و لازم است در درمان این گروه از عفونت ها راه‌کارهای مناسب‌تری لحاظ گردد.

مکانیسم های مختلفی در ایجاد مقاومت به آزول ها شناسایی شده است. آزول ها با اتصال اتم N خود به گروه هم موجود در Erg11p و اشغال جایگاه اتصال سوبسترا باعث مهار سیتوکروم P450 می شوند. جهش در *ERG11* می‌تواند بواسطه تغییرات ساختاری تمایل آزول ها را به این پروتئین از طریق ممانعت از ورود آزولها به داخل ساختارش کاهش دهد (۱۱).

تغییرات ساختاری در Erg11p نتیجه جهش هایی است که در نواحی خاصی از ژن *ERG11* به نام نقاط داغ رخ می دهد. نقاط داغ جهش پذیری نقاطی هستند که جهش در آنها در انواع موتانت موجود به وفور رخ می دهد و این امر نشان دهنده اهمیت این نواحی در عملکرد یا ساختار صحیح پروتئین می باشد. نقاط داغ جهش پذیری در این ژن شامل آمینو اسیدهای ۱۰۵ تا ۱۶۵، ۲۶۶ تا ۲۸۷ و ۴۰۵ تا ۴۸۸ می باشد (۶). در این مطالعه در ۱۰ درصد جدایه ها جهش در کدون ۱۱۶ (D116E) در ژن *ERG11* مشاهده شد. این جهش در اولین نقطه داغ جهش پذیری در ژن *ERG11* رخ داده است. هم چنین در ۵۰ درصد جدایه ها جهش در کدون ۲۶۶ (E266D) در ژن *ERG11* مشاهده شد. این جهش در دومین نقطه داغ جهش پذیری در این ژن قرار دارد که در ساختار پروتئین در محدوده هلیکس های G و H قرار دارد. این دو هلیکس به عنوان محور اصلی در دست‌یابی دیگر هلیکس ها به کانال نقش ایفا می کنند (۶).

در مطالعات مختلف در بعضی از جدایه های مقاوم به فلوکونازول این جهش گزارش شده است (۱۷-۲۰). در مطالعه وایت و همکاران درصد بالایی از جدایه های مقاوم به فلوکونازول دارای جهش D116E و E266D بودند (۲۱). در مطالعه وانگ و همکاران این دو جهش در جدایه های مقاوم به فلوکونازول با فراوانی بالا گزارش گردید (۱۳). در مطالعه روسانا و همکاران در سال ۲۰۱۵ شش جابه جایی در ژن *ERG11* از جمله D116E و E266D شناسایی شد (۲۲). در مطالعه سرنیکا و همکاران جهش D116E در جدایه های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول مشاهده شد(۳).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:43 +0330 on Monday September 25th 2017

در مطالعه گولدمانا و همکاران جهش E266D در جدایه های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول گزارش گردید (۱۸). هم‌چنین در بعضی مطالعات همراهی این جهش بدمعنی با حساسیت به فلوکونازول نیز گزارش شده است. به طوری که در مطالعه زیانگ و همکاران در بعضی جدایه های حساس به فلوکونازول یکی از دو جهش ذکر شده گزارش گردید(۲۳).

هم چنین در مطالعه ماناستیر و همکاران در بعضی جدایه های حساس به دوز کاندیدا آلبیکنس یکی از دو جهش مشاهده شد(۱۱). بر اساس مطالعات مختلف، به نظر می رسد این دو جهش به تنهایی قادر به تغییر ساختار Erg11p نبوده و همراهی جهش در دیگر نواحی با این دو جهش بتواند باعث تغییر ساختار Erg11p ، کاهش تمایل آن به داروهای آزولی و در نتیجه ایجاد مقاومت به آزول‌ها گردد.

هم چنین میزان بالای MIC تعیین شده برای جدایه های مقاوم به فلوکونازول در این مطالعه نشان دهنده وجود چندین عامل تشدید کننده مقاومت به این دارو در این جدایه هاست. به طوری‌که در مطالعه پِریه و همکاران، MIC≥۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر برای فلوکونازول در جدایه های کاندیدا آلبیکنس تعیین شد. در این جدایه ها علاوه بر جهش های نقطه ای در *ERG11* ، افزایش سطح بیان ژن‌های کدکننده لانوسترول α-۱۴دمتیلاز (*ERG11*) و پمپ های انتشار (*MDR* و *CDR*) نیز گزارش گردید (۲۴).

در مطالعه لی و همکاران نیز در جدایه های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به دارو، افزایش بیان ژنهای *ERG11* ، *CDR1* و *MDR1* به همراه جهش هایی چون D116E و E266D در جدایه های مقاوم به فلوکونازول مشاهده گردید. در این مطالعه نیز میزان MIC تا غلظت ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر ارزیابی شده بود و در جدایه های مقاوم به صورت۶۴ < MIC میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شد(۲۵).

در حالی که در مطالعه حاضر میزان MIC ی فلوکونازول تا غلظت ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی لیتر بررسی شد و در این غلظت ۵۰ درصد جدایه ها مقاوم گزارش شد که نشان دهنده افزایش غلظت بی اثر فلوکونازول در نمونه های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از زنان مبتلا به ولوواژینیت در رشت است. این امر می تواند به دلیل مصرف بی رویه و نادرست دارو در زمان ابتلا به این عفونت و همچنین ایجاد انواع جهش های القاء کننده 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.

نتیجه گیری

با مقایسه نتایج این مطالعه و دیگر مطالعات در داخل و خارج از کشور مشخص شد که مقاومت به فلوکونازول یکی از مهم‌ترین داروهای مورد استفاده در ولوواژینیت در استان گیلان در حال افزایش است. نکته قابل توجه در زمینه مقاومت به این دارو، مقاومت به غلظت های بالای آن در نمونه های جدا شده از زنان مبتلا می باشد که این امر نشان دهنده عدم کارآیی این دارو در درمان این گروه از عفونت ها می باشد. هم‌چنین وجود جهش در ژن‌هایی چون *ERG11* نشان دهنده کاهش کارآیی داروهای آزولی چون فلوکونازول در درمان عفونتهای کاندیدیایی به دلیل کاهش تمایل دارو به Erg11p و مهار بیوسنتز ارگوسترول می باشد.

بنابر این با وجود دلایل ژنتیکی مقاومت در کاندیدا آلبیکنس در استان گیلان لازم است از داروهای جایگزین مناسب جهت درمان سریع‌تر و مؤثرتر در مبتلایان استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله تحقیقاتی حاصل پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی می‌باشد. نویسندگان مقاله از سرکار خانم دکتر سیده هاجر شارمی به خاطر همکاری دلسوزانه ایشان، نهایت تشکر را دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:43 +0330 on Monday September 25th 2017

منابع

1. Haghighi F, Roudbar Mohammdi S, Mohammadi P, Eskandari M. Comparative evaluation of the effects of TiO2 nanoparticles and its photocatalystic form on the formation of fungal biofilms. Arak Medical University Journal. 2012;15(1):27-34.
2. Garcia-Gomes AS, Curvelo JA, Soares RM, Ferreira-Pereira A. Curcumin acts synergistically with fluconazole to sensitize a clinical isolate of Candida albicans showing a MDR phenotype. Medical mycology. 2012;50(1):26-32. Epub 2011/05/05.
3. 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. Epub 2006/04/20.
4. Bahmani M, Ghorbani M, Momtaz H, Bahmani E, Rafieian M. The comparison of the in-vitro effects of Scrophularia deserti plant and amphotricin B on Candida albicans. Arak Medical University Journal. 2011;13(4):15-21.
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. Epub 2003/07/25.
6. Debnath S, Addya S. Structural basis for heterogeneous phenotype of ERG11 dependent Azole resistance in C.albicans clinical isolates. SpringerPlus. 2014;3:660. Epub 2014/12/17.
7. Chau AS, Mendrick CA, Sabatelli FJ, Loebenberg D, McNicholas PM. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of Candida albicans strains exhibiting reduced susceptibility to azoles .Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004;48(6):2124-31. Epub 2004/05/25.
8. 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. Epub 2008/01/26.
9. Cockerill F, Patel J, Alder J, Bradford P, Dudley M, Eliopoulos G, et al. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement; M100-S23: Clinical & Laboratory Standards Institute; 2013.
10. Golpour H, Ranji N, Sharami SH. Investigation of Antifungal effect of curcumin encapsulated in micelle nanoparticles on the expression of CDR1 gene in fluconazole resistant isolates of Candida albicans. Journal of Microbial World. 2017.-:
11. 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. Epub 2009/09/08.
12. Sobel JD, Zervos M, Reed BD, Hooton T, Soper D, Nyirjesy P, et al. Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from women with complicated Candida vaginitis: clinical implications. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2003;47(1):34-8. Epub 2002/12/25.
13. Wang B, Huang L-H ,Zhao J-X, Wei M, Fang H, Wang D-Y, 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.
14. 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.
15. 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):9.٦-٠
16. Hasanpour Zaferani Z, Bayat M, Roudbar Mohammadi S. Evaluating the Adherence of Fluconazole Resistant Candida albicans Species in comparison with Candida glabrata Species on Vagina and Intestine Cell Lines. New Cellularand Molecular Biotechnology Journal. 2015;5(17):74-80.
17. Strzelczyk JK, Slemp-Migiel A, Rother M, Golabek K, Wiczkowski A. Nucleotide substitutions in the Candida albicans ERG11 gene of azole-susceptible and azole-resistant

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:43 +0330 on Monday September 25th 2017

clinical isolates. Acta biochimica Polonica. 2013;60(4 .٥٢-٥٤٧:(Epub 2013/12/18.
18. Goldman GH, da Silva Ferreira ME, dos Reis Marques E, Savoldi M, Perlin D, Park S, et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in candida albicans clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2004;50(1):25-32. Epub 2004/09/24.
19. Yan L, Zhang J, Li M, Cao Y, Xu Z, Gao P, et al. DNA microarray analysis of fluconazole resistance in a laboratory Candida albicans strain. Acta biochimica et biophysica Sinica. 20 .٦٠-١٠٤٨:(١٢)٤٠;٠٨Epub 2008/12/18.
20. Eftekhari AD, Anvari M, Ranji N. Investigation of ERG11 Gene Mutations in Fluconazole Resistant Candida albicans Isolated from a Number of Rasht Hospitals. Pathobiology Research. 2015;18(3):98-107.
21. 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. Epub 2002/05/23.
22. 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):1046-52. Epub 2015/08/25.
23. 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. Epub 2013/03/14.
24 .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):2676-84. Epub 20.١٥/٠٩/٠١
25. Lee MK, Williams LE, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Drug resistance genes and trailing growth in Candida albicans isolates. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2004;53(2):217-24. Epub 2003/12/23.

www.SID.ir