

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

نویسندگان: احسان فرح بخش^۱، محمد حسین یادگاری^{۲*}، معصومه رجبی بذل^۳، مجتبی تقی‌زاده ارمکی^۱، فرزاد کتیرائی^۴

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

۴- 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 از جمله شایع‌ترین عوامل مخاطره‌انگیز 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 پلیمرز معکوس است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۸ در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. سویه‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران ایدزی با استفاده از روش‌های استاندارد مانند تشکیل جرم تیوب، کلامیدوسپیور و رنگ کلنی روی محیط کروم آگار کاندیدا شناسایی شدند. ابتدا میزان حساسیت سویه‌های کاندیدا آلبیکنس مطابق روش استاندارد انتشار دیسک بررسی شد؛ 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 تعیین شد.

نتایج: آزمایش حساسیت دارویی ۶۶ سویه کاندیدا آلبیکنس نشان داد که ۶۲/۶ درصد سویه‌ها حساس، ۸/۶ درصد وابسته به دوز و ۲۸/۷ درصد مقاوم به فلوکونازول هستند. ارزیابی محصول RT-PCR مشخص کرد 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 نشان می‌دهد. 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 فراهم می‌آورد، پیشنهاد می‌شود.

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

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

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

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 کاندیدایزیس سیستمیک مهاجم به‌طور قابل‌توجهی رو به افزایش است (۲). بیماری‌های قارچی در بیماران ایدزی، اغلب به‌صورت کاندیدایزیس 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 کاندیدایزیس را سبب شده، ظهور کاندیدای مقاوم به درمان به افزایش وقوع این بیماری در افراد ایدزی منجر شده‌است. کاندیدایزیس 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 دیده می‌شود (۳-۵). درمان با استفاده از عوامل ضدقارچی آزولی به‌ویژه فلوکونازول به‌عنوان راهکاری مؤثر برای درمان عفونت‌های ناشی از مخمر کاندیدا آلبیکنس معرفی می‌شود؛ اما بروز مقاومت‌های دارویی، این روش درمان را با مشکلات جدی روبرو کرده‌است (۶ و ۷)؛ لذا شناسایی گونه‌های مقاوم به عوامل ضد-قارچی به‌منظور درمان کارآمد و جلوگیری از مصرف بی‌رویه داروها بسیار ضروری می‌نماید. مکانیسم‌های مولکولی متفاوتی در پیدایش مقاومت کاندیدا آلبیکنس

در برابر فلوکونازول شناخته شده‌اند (۸) که این مکانیسم‌ها «کاهش انتقال دارو به داخل سلول، تغییرات در آنزیم‌های مسیر بیوستز 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 ۱۴- α - دیمتیل‌از (محصول ژن ERG11) شامل جهش‌های نقطه‌ای بوده، افزایش بیان بیش از حد به کاهش پذیرش داروهای آزولی منجر می‌شود؛ همچنین ممکن است مقاومت متقاطع در برابر سایر مشتقات آزول را نیز در-پی داشته‌باشد. قارچ بیماری‌زا می‌تواند از طریق بیان بیش از حد ژن ERG11 بر اثر بازدارندگی آزول‌ها غلبه کند. بیان بیش از حد ژن ERG11 به افزایش هدف دارو منجر شده، به دنبال آن غلظت بیشتری از دارو نیاز می-شود تا با کلیه مولکول‌های آنزیمی موجود در درون سلول‌ها واکنش دهد (۹-۱۴).

هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان مقاومت ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس بومی جدا شده از بیماران ایدزی با روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی بود و اینکه «آیا کاندیدا آلبیکنس‌های مقاوم به فلوکونازول جدا شده 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 پلیمرز معکوس (Reverse transcription PCR RT-PCR) همخوانی-دارند؟».

مواد و روش‌ها

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

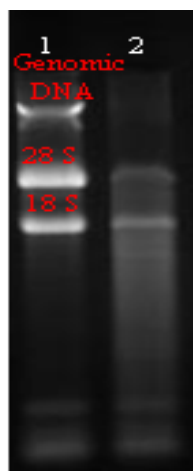
آب مقطر است که درون لوله‌های استریل در خود کیت تعبیه شده‌اند؛ هر پانل، حاوی چاهک‌های واکنشی است که درون آنها ترکیب واکنشگر قرار دارد. پس از آنکه چاهک‌ها با سوسپانسیون تلقیح شدند، براساس رنگی که ایجاد کردند طبق راهنمای مندرج در کیت، مثبت یا منفی تلقی شدند. طبق راهنمای کیت هر ترکیب، امتیاز عددی مخصوص دارد و از مجموع امتیازها یک کد شش رقمی به دست آمد؛ کد حاصل از نتایج، وقتی به نرم‌افزار موجود در کیت داده شد، نوع گونه مشخص شده. آزمایش تعیین حساسیت به فلوکونازول توسط روش استاندارد انتشار دیسک Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M44-A) صورت گرفت؛ بدین منظور ابتدا ۳۴ گرم از پودر محیط مولر هیتون آگار در یک لیتر آب مقطر حل و سپس ۲۰ گرم از پودر گلوکز و ۰/۵ میلی‌گرم از پودر متیلن بلو به آن افزوده شد. سوسپانسیون قارچی برای تلقیح به محیط کشت مولر هیتون آگار با غلظت 10^6 سلول در هر میلی‌لیتر (cfu/ml) از کشت تازه مخمر در لوله‌های استریل حاوی سرم فیزیولوژی تهیه شد. پس از انتقال سوسپانسیون به محیط کشت دیسک‌های ۲۵ میکروگرمی فلوکونازول تهیه شده از شرکت MAST در مرکز پلیت قرار داده شدند و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند و قطر ممانعت از رشد برحسب میلی‌متر ثبت شد (۱۵). داده‌ها با نرم‌افزار SPSS version 20 تجزیه و تحلیل شدند؛ برای این کار از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه One-Way ANOVA استفاده و آزمون آماری در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد.

استخراج RNA با استفاده از پرل شیشه‌ای (Glass bead)، در حضور ترکیب فنل - کلروفرم - ایزوآمیل الکل به نسبت ۱:۲۴:۲۵ صورت گرفت (۱۶). به منظور استخراج RNA از کشت تازه مخمر کاندیدا آلیکنس در فاز لگاریتمی استفاده شد؛ همچنین میکروتیوب‌ها و

دانشگاه تربیت مدرس رسید. در این مطالعه، ۶۸ نمونه شامل ۶۶ ایزوله بالینی و دو گونه کاندیدا آلیکنس استاندارد حساس و مقاوم به فلوکونازول بررسی شدند. نمونه‌برداری به صورت تصادفی از بیماران ایدزی مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات ایدز ایران واقع در بیمارستان امام خمینی تهران صورت گرفت. به منظور انجام این مطالعه، بیماران مورد بررسی از افرادی انتخاب شدند که وجود بیماری ایدز در آنها با روش‌های الایزا و بلا‌تینگ به اثبات رسیده بود. نمونه‌های بالینی از ضایعات دهانی افراد ایدزی با سواب خشک اسفنجی استریل از نواحی مورد نظر گرفته و پس از نمونه‌برداری از دهان، سواب‌های آغشته به ترشحات دهانی به طور مستقیم، روی محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شد. گونه استاندارد حساس به فلوکونازول (ATCC ۱۰۲۳۱) از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و گونه استاندارد مقاوم به فلوکونازول (ATCC ۷۶۱۵) از مرکز دارویی دانشگاه شانگهای چین تهیه شد. گونه‌های استاندارد و سویه‌های بالینی روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار Merck (۶۵ گرم در لیتر) حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (۵۰ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر الکل) کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. تک‌کلنی‌های مخمری حاصل از کشت تازه برای انجام آزمون‌های فنوتیپی و مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. از روش‌های فنوتیپی، کشت در محیط کروم آگار کاندیدا Company Paris France، آزمایش ایجاد لوله زایا، آزمایش تولید کلامیدوکونیدی به منظور شناسایی نمونه‌ها استفاده شد. آزمون جذب کربوهیدرات‌ها برای تشخیص گونه‌های مخمری با استفاده از کیت Rap ID™ (remel, USA) انجام شد. کیت یادشده، حاوی یک پانل از ترکیب‌های شیمیایی است که جذب آنها بررسی می‌شود و دو معرف A حاوی هیدروکسید پتاسیم و معرف B حاوی دی متیل امینو سینامالدیئید و یک مایع تلقیح حاوی KCl و CaCl₂ و

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 پلیمرز یکسان شد. تصویر RNAهای استخراج شده روی ژل آگارز، وجود DNA را در نمونه‌ها نشان داد؛ به همین سبب، تمامی نمونه‌های RNA برای از بین رفتن DNA با آنزیم DNase تیمار شد.

سرسمپلرهای DNase - RNase Free به کار رفتند. RNA استخراج شده از نظر کمی و کیفی با دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز، روی ژل رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. پس از مشاهده تصویر RNA بارگذاری شده بر ژل آگارز، تفاوت غلظت RNAها از شدت باند آنها مشخص شد. بدین منظور برای یکسان کردن شرایط، جذب نوری، تمامی



شکل ۱. تیمار RNAهای استخراج شده توسط آنزیم DNase

به مدت ۵ دقیقه در ۲۵ درجه سانتیگراد و به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتیگراد قرار گرفت. با قراردادن میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد، واکنش متوقف شد. cDNA حاصل تا زمان انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. به منظور بررسی ژن عامل مقاومت به فلوکونازول در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس از پرایمرهای ACT1 و ERG11 ساخت شرکت Cinnagen استفاده شد. ژن ACT1 در زمره ژن‌های House Keeping است که میزان بیان آن در شرایط مختلف یکسان می‌نماید و به عنوان کنترل داخلی در این مطالعه استفاده شد. برای صحت عملکرد پرایمرهای مورد استفاده، پرایمرها با انجام (Basic Local Alignment Search Tool BLAST)

با اطمینان یافتن از خلوص RNA، ساخت cDNA از روی آن به وسیله کیت K1621 ساخت شرکت Fermentas و براساس دستورالعمل آن انجام گرفت؛ بدین ترتیب که به ۲ میکروگرم RNA استخراج شده، ۱ میکرولیتر Random hexamer primer اضافه شد. حجم نهایی این مرحله با آب تیمار شده با DEPC به ۱۲ میکرولیتر رسانیده شد؛ میکروتیوب‌های حاوی مقادیر مذکور به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرارداده شده، سپس بی‌درنگ به یخ منتقل شدند؛ در ادامه ۴ میکرولیتر بافر ۵X، ۲ میکرولیتر مخلوط ۱۰ میلی-مولار dNTP، ۱ میکرولیتر ریونوکلاز و ۱ میکرولیتر آنزیم Reverse Transcriptase M-MuLV ۲۰۰ واحد در میلی‌لیتر به میکروتیوب اضافه شد؛ سپس محلول واکنش

۴۵ ثانیه، دمای گسترش رشته جدید ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه و ۳۴ سیکل از مرحله دوم تا چهارم تکرار شد. دمای بسط نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد؛ در آخر، محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز ۱/۸ درصد حاوی ۰/۵ میکروگرم اتیدیوم بروماید به‌ازای هر میلی‌لیتر ژل الکتروفورز شد؛ پس از اتمام الکتروفورز ژل‌ها روی دستگاه ژل داکيومنتیشن از نظر وجود باند ژن مورد نظر تکثیر شده بررسی شد. در این مطالعه برای کلیه نمونه‌های cDNA واکنش RT-PCR با پرایمرهای ERG11 و ACT1 (به‌عنوان House Keeping) انجام شد 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 UVItc Analyze سنجش شد.

یافته‌ها

۶۶ نمونه کاندیدا آلبیکنس مورد مطالعه براساس رنگ ویژه کلنی در محیط کروم آگار کاندیدا (شکل ۲)، کشت روی محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰، آزمایش تولید لوله زایا و همچنین آزمون جذب قند تأیید شدند؛ در این روش فنوتیپی، از سویه استاندارد مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس به‌عنوان شاهد مثبت و کاندیدا کروژنی به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد.



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

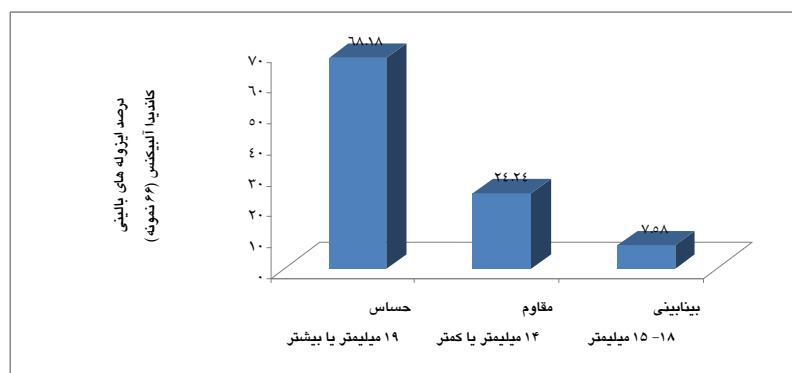
در سایت (National Center for Biotechnology Information (NCBI و با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner کنترل شدند. توالی اسید نوکلئیک پرایمرهای مورد استفاده به شرح زیرند:

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

واکنش RT-PCR در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر با استفاده از ترموسایکلر Bio Rad انجام شد. ۱ میکرولیتر از cDNA ساخته شده، مقدار ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها، ۶/۲۵ میکرولیتر از PCR Master mix شرکت Fermentas حاوی مخلوط نوکلئوتیدها با غلظت ۴ میلی‌مولار و آنزیم Taq DNA polymerase با غلظت ۰/۰۵U/ μl، به میکروتیوب واکنش اضافه شد و حجم نهایی با آب مقطر دیونیزه استریل به ۱۲/۵ میکرولیتر رسانده شد؛ مخلوط بالا در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شده و برنامه حرارتی برای آن اعمال شد. دمای واسرشتگی اولیه الگو ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، دمای واسرشتگی ثانویه الگو ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر به رشته الگو ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت

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 معنی‌دار را نشان داد. ($P < 0.05$)

نتایج حاصل از آزمون انتشار دیسک جهت ارزیابی حساسیت ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس نسبت به داروی فلوکونازول در شرایط دمایی ۳۵ درجه سانتی‌گراد و پس از ۲۴ 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



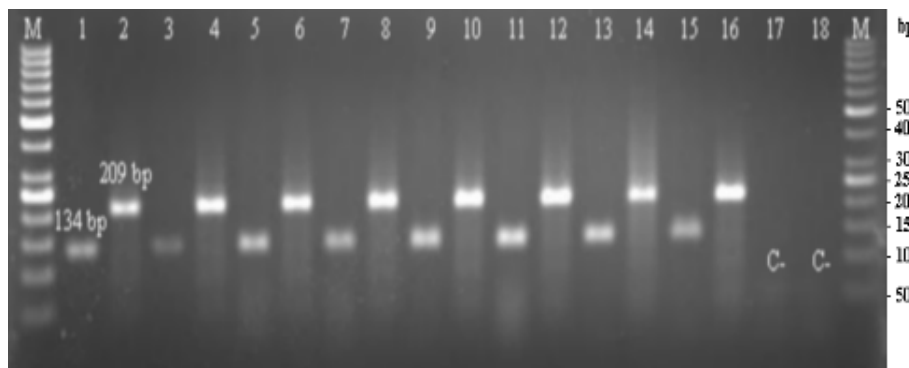
نمودار شماره ۱. درصد میزان حساسیت ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس نسبت به فلوکونازول توسط روش انتشار دیسک افزایش تعداد کپی‌های آنزیم لانوسترول α -۱۴ دیمتلاز می‌شود که نتیجه آن افزایش سنتز ارگوسترول است و در نهایت از بین رفتن توانایی داروی ضدقارچی می‌باشد (شکل ۲). واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ERG11 و ACT1 در سویه‌های استاندارد حساس و مقاوم به فلوکونازول و همچنین نمونه‌های بالینی ایزوله شده از افراد ایدزی انجام شد و نتایج مورد قبولی در مورد افزایش بیان ژن مورد بررسی بدست آمد. پس از الکتروفورز محصول PCR و مشاهده تصویر ژل در دستگاه ژل داکيومتیشن مشخص گردید که از ۶۶ ایزوله بالینی مورد بررسی، ۶ ایزوله (۹٪) برای ژن ERG11 افزایش بیان داشته‌اند (شکل ۳). افزایش بیان ژن ERG11 موجب ایجاد مقاومت نمونه‌های مورد مطالعه به داروی فلوکونازول شده بود که این نتایج با نتایج حاصل از روش انتشار دیسک همخوانی داشت و هر ۶ ایزوله که دارای افزایش بیان ژن ERG11 بودند در روش انتشار دیسک در گروه نمونه‌های مقاوم به فلوکونازول قرار گرفتند. با استفاده از نرم افزار UVitec

RNAهای استخراج شده از ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس پس از الکتروفورز روی ژل آگارز مورد تأیید قرار گرفت. 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 بارگذاری شده بر ژل آگارز، تفاوت غلظت RNAها از شدت باند آنها مشخص بود؛ به همین دلیل به منظور یکسان کردن شرایط PCR، جذب نوری تمامی نمونه‌ها با دستگاه بیوفتومتر قرائت شدند و سپس با DEPC میزان غلظت RNA برای سنتز cDNA و استفاده در واکنش PCR یکسان شد. در ادامه تمامی نمونه‌های RNA برای از بین رفتن DNA با استفاده از آنزیم DNase تیمار شدند.

مقاومت به داروهای ضدقارچی با افزایش بیان و جهش نقطه‌ای و همچنین تغییرات در مسیر بیوسنتز ارگوسترول مرتبط است. بیان بالای ژن ERG11 منجر به

keeping ACT1 سبب بدست آمدن اعداد دقیق میزان بیان ژن ERG11 گردید.

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



شکل ۳. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول RT-PCR ژن‌های ERG11 و ACT1

متعاقب آن درمان با داروهای ضد قارچی به ویژه ترکیبات آزولی و مقاومت نسبت به این ترکیبات، ضرورت استفاده از روش‌های 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 می‌باشد تا بدین ترتیب از مصرف بی‌رویه داروها و بالطبع ایجاد مقاومت‌های دارویی ثانویه و ناخواسته جلوگیری شود.

تاکنون ژن‌های مقاومتی متعددی مانند CDR1، CDR2، ERG11، ERG9، ERG6، ERG3، MDR1، NAG2، RTA2، ERG11، ERG9، ERG6، ERG3، MDR1 و ... در کاندیدا آلبیکنس شناسایی شده‌اند که هر یک از این ژن‌ها با مکانیسم‌های مولکولی متفاوتی، مقاومت ارگانیسم به داروهای ضدقارچی را سبب می‌شوند. آنزیم هدف داروهای آزولی لانوسترول α -14 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 -14 دی‌متیلاز منجر می‌شود

(M) مارکر 50 bp، (۱) ژن ERG11 کاندیدا آلبیکنس استاندارد مقاوم به فلوکونازول، (۳) ژن ERG11 کاندیدا آلبیکنس استاندارد حساس به فلوکونازول، (۵-۷-۹-۱۱-۱۳-۱۵) افزایش بیان ژن ERG11 ایزوله‌های 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 عفونت‌های ناشی از کاندیدا آلبیکنس بوده و همچنین رایج‌ترین و پرمصرف‌ترین عامل ضد قارچی شناخته شده می‌باشند. فلوکونازول به علت دارا بودن خاصیت درمانی بالا به طور معمول جهت درمان عفونت‌های ناشی از کاندیدا استفاده می‌شود (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 (آزول‌ها) افزایش چشمگیری یافته است (۱۸) شیوع عفونت‌های قارچی منجر به افزایش استفاده از داروهای ضد قارچی و افزایش قابل ملاحظه مقاومت گونه‌های کاندیدا نسبت به ترکیبات مورد استفاده شده است. شیوع عفونت‌های حاد و سیستمیک کاندیدیایی و

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

با استفاده از روش انتشار دیسک میزان مقاومت به داروی فلوکونازول در ۶۶ سویه کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران ایدزی، ۳/۲۴ درصد بدست آمد. این امر نشان می‌دهد میانگین میزان مقاومت به این دارو در بیماران مبتلا به کاندیدیازیس دهانی علی‌رغم جذب مناسب گوارشی بالا می‌باشد. 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 بی‌رویه داروها و ایجاد مقاومت دارویی ناخواسته جلوگیری شود. در این مطالعه ۶ ایزوله دارای بیان بیش از اندازه ژن ERG11 بودند، هر ۶ ایزوله بالینی مورد بررسی با پرایمر ژن ERG11 که در فرآیند RT-PCR دارای واکنش مثبت بودند، در روش دیسک دیفیوژن نیز به عنوان ایزوله‌های مقاوم به فلوکونازول گزارش شدند. در روش دیسک دیفیوژن از ۶۶ ایزوله مورد بررسی ۱۶ ایزوله مقاوم بودند، که این نشان دهنده عوامل مختلف و نقش سایر ژن‌ها با مکانیسم‌های مولکولی متفاوت در ایجاد مقاومت می‌باشد.

امروزه روش‌های مولکولی به دلیل اختصاصیت و حساسیت بالا بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند و بیولوژی مولکولی علم فارچ‌شناسی 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 پلیمرز معکوس را برای ارزیابی مقاومت سویه‌های مخمری کاندیدا آلبیکنس راه‌اندازی کنیم.

در مطالعه انجام‌شده توسط Saleh، حساسیت ۱۰۷ ایزوله کاندیدا آلبیکنس به داروی فلوکونازول با روش دیسک دیفیوژن مورد ارزیابی قرارگرفت که ۲۶/۱

درصد از ایزوله‌های مورد بررسی به داروی فلوکونازول مقاوم بودند (۲۰). 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 مطرح کرد (۲۱). 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 (۲۲). Perea، مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به آزول را در کاندیدا آلبیکنس‌های جداشده از افراد دچار نقص سیستم ایمنی (HIV) که مقاومت بالایی به فلوکونازول ($\mu\text{g/ml} \geq 64$) داشتند، بررسی کردند. افزایش سطح بیان ژن‌های کدکننده لانوسترول α - ۱۴ دیمیتلاز (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 منجر می‌شود، نشان‌داد (۲۳).

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

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. Casalnuovo 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, Shanker 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 Chemother* 1998; 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-Flörl C, Einsele H. Molecular analysis of *cyp51* from fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 151:263-268.

استفاده شود. بررسی ژن‌های باعث مقاومت نسبت به فلوکونازول و سایر عوامل ضدقارچی در انواع گونه‌های بومی کاندیدا آلبیکنس در ایران می‌تواند اطلاعاتی مفید برای یک ارزیابی دائمی به ما ارائه دهد؛ لذا پیشنهاد می‌شود که محققان علاقه‌مند به این زمینه در بیماران و جمعیت‌های مختلف و تعداد جدایه‌های بیشتر، این روند را ادامه دهند تا پس از مدتی به ارزیابی جامعی از وضعیت ارگانیزم‌های بیماری‌زا (کاندیدا آلبیکنس) در کشورمان دست‌یابیم.

تقدیر و تشکر

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

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 fluconazole-resistant oropharyngeal candidiasis in HIV-infected 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. White T. 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 Chemother 1997; 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.

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 Farahbakhsh¹, Mohammad Hossein Yadegari^{2*}, Masoumeh Rajabi Bazl³, Mojtaba Taghizadeh Armaki¹, Farzad Katiraei⁴

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-threatening 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, chlamydoconidia 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 UVItect 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