

جهش در ناحیه داغ جهش پذیری ژن ERG11 و مقاومت به فلوکونازول در جدایه‌های کلینیکی کاندیدا آلبیکنس در شهر رشت

سعیده بالابندی^۱، زینب خزائی کوهپیر^{۲*}، نجمه رنجی^۳

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۰۶/۱۲ تاریخ پذیرش ۱۳۹۸/۰۹/۰۱

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: امروزه مصرف متداول آزول‌ها منجر به افزایش مقاومت به آزول‌ها در میان سویه‌های کاندیدا آلبیکنس شده است. جابجایی‌های آمینواسیدی در آنزیم هدف آزول، ERG11p، به مقاومت آزولی در بعضی از سویه‌های کلینیکی کاندیدا آلبیکنس نسبت داده می‌شود. هدف از این مطالعه، ارزیابی جهش‌های ژن *ERG11* در جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس در رشت بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه، نمونه‌های کلینیکی از مخاط واژینال ۵۰ زن جداسازی شد. جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس با استفاده از روش‌های استاندارد تعیین هویت چون تولید لوله زایا و کشت در محیط کروم آگار شناسایی شدند. مقاومت و حساسیت جدایه‌ها به فلوکونازول به کمک روش‌های دیسک دیفیوژن و برات میکروداپلوشن بررسی شد. جهش‌ها در ژن *ERG11* در جدایه‌های کلینیکی به روش PCR-سکوئینسینگ تعیین شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، ۲۰ جدایه کلینیکی کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول بودند. بالاترین MIC ی فلوکونازول ۲۰۴۸ µg/ml تعیین گردید. همچنین در هشت جدایه مقاوم به فلوکونازول به روش PCR-توالی‌یابی، دو جهش بدمعنی (V488I و V437I) در ژن *ERG11* یافت شد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که داشتن هم‌زمان چند جهش در ژن ERG11، یک علت MIC ی بالا در جدایه‌های مقاوم کاندیدا آلبیکنس در این مطالعه باشد. با این حال، بررسی دیگر مکانیسم‌های مقاومت به آزول در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: کاندیدا آلبیکنس، *ERG11*، فلوکونازول، MIC، جهش، V488I

مجله پزشکی ارومیه، دوره سی‌ام، شماره دهم، ص ۸۴۴-۸۳۶، دی ۱۳۹۸

آدرس مکاتبه: گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران، تلفن: ۰۱۱۵۴۲۷۱۱۰۵

Email: khazaei@toniau.ac.ir

مقدمه

آزول‌ها هستند که مسیر بیوسنتز ارگوسترول را هدف قرار می‌دهند(۱).

از جمله داروهای آزولی رایج، فلوکونازول است که در درمان عفونت‌های قارچی سطحی و سیستمیک حاصل از کاندیدا آلبیکنس مورد استفاده قرار می‌گیرد(۵، ۶). مصرف بی‌رویه و نادرست داروهای ضدقارچی باعث شده در نواحی مختلف جهان مقاومت به این داروها افزایش یابد. بطوریکه مقاومت به آزول‌ها در کاندیدا آلبیکنس، به‌واسطه چند مکانیسم ممکن است رخ دهد: (۱) افزایش بیان ژن *ERG11* (۲) جهش در ژن *ERG11* (۳) تغییر در مسیر بیوسنتز ارگوسترول و یا (۴) بیان بیش‌ازحد ژن‌های درگیر در سیستم‌های پمپ افلاکس نظیر *CDR1*، *CDR2* و *MDR1* (۷). ارگوسترول یکی

کاندیدا آلبیکنس یکی از قارچ‌های بیماری‌زاست که باعث کاندیدیدایز و لولوواژینال، سیستمیک و دهانی می‌شود (۱، ۲). کاندیدیدایز و لولوواژینال به‌عنوان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های زنان، نتیجه رشد و تکثیر بی‌رویه گونه‌های کاندیدا در مخاط واژینال است. تقریباً ۷۵ درصد تمامی زنان حداقل یک‌بار در طول زندگی خود دچار کاندیدیدایز و لولوواژینال می‌شوند و ۴۰-۵۰ درصد بیش از یک‌بار در طول زندگی خود این عفونت را تجربه می‌کنند (۳). همچنین ۵-۸ درصد زنان حداقل ۴ بار در سال دچار کاندیدیدایز و لولوواژینال می‌شوند (۴). رایج‌ترین داروهای مورد استفاده در درمان این عفونت

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

^۲ استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

فلوکونازول (10µg) (شرکت HiMedia، هند) استفاده شد. بعد از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن طبق استاندارد CLSI 2013 (۹) گزارش گردید (جدول ۱).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) فلوکونازول:

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی فلوکونازول، جدایه‌ها در محیط کشت سابورود دکستروز برات حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. سپس رقت‌های متوالی فلوکونازول (محلول تزریقی ۲۰۰ میلی‌گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر، شرکت نورمون، اسپانیا) در محدوده غلظتی ۴µg/ml-۲۰۴۸ تهیه و به همراه هر جدایه کاندیدا آلبیکنس (با غلظت نیم مک فارلند) در لوله آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. رقتی که فاقد کدورت قارچی بود به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد و بر اساس استاندارد CLSI (جدول ۱) جدایه‌های حساس، حساس وابسته به دوز و مقاوم از هم تفکیک گردید.

استخراج DNA ژنومی از جدایه‌های مقاوم:

هر جدایه کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول در محیط سابورود دکستروز برات (Quelab، کانادا) کشت و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. استخراج 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، نمونه‌های DNA، در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و مورد بررسی قرار گرفتند.

واکنش PCR و تعیین توالی ژن ERG11

بعد از استخراج DNA ژنومی از هر جدایه، اجزای واکنش PCR با استفاده از کیت golden master mix (pfu) (gold double helix، ایتالیا) در حجم نهایی ۳۰ µl شامل DNA ژنومی (۳µl) و جفت پرایمر رفت و برگشتی (۲۰ µM) (هرکدام ۱µl) و مستر میکس (حاوی آنزیم، کوفاکتور و بافر مخصوص (با حجم ۲۵µl)) تهیه شد. از یک جفت پرایمر برای بررسی جهش‌ها استفاده شد (جدول ۲). به این منظور بعد از جستجوی پرایمر از مقالات معتبر (۱۰)، مناسب و منحصر به فرد بودن پرایمرهای رفت (F) و برگشتی (R) با نرم‌افزارهای Generunner و BLAST کنترل شدند. سپس سنتز پرایمرها توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) صورت گرفت. واکنش PCR در دستگاه Analaytik Jena (آلمان) طبق برنامه ذیل انجام شد: یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در ۹۵°C به مدت ۱ دقیقه، ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل به ترتیب در دمای ۹۵°C به مدت ۱ دقیقه، ۵۸°C به مدت ۱ دقیقه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه، و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه. سپس نمونه‌ها با حفظ زنجیره سرمایی توسط شرکت تکاپو زیست (ایران،

از اجزای مهم غشاء سلولی در کاندیدا آلبیکنس است که در حفظ سیالیت و عملکرد صحیح غشاء نقش ایفا می‌کند. اغلب داروهای ضدقارچی اجزای مختلف بیوسنتز ارگوسترول را هدف قرار می‌دهند. به طوری که تربینافاین (Terbinafine) مهار Erg1p، فنپروپیمورف (Fenpropimorph) مهار Erg2p، و آزول‌ها مهار لانوسترول ۱۴-α-دمتیلاز (Erg11p) را باعث می‌شوند. Erg11p توسط ژن ERG11 یکی از ژن‌های مسیر بیوسنتز ارگوسترول کد می‌شود (۱). جهش در ژن ERG11 یکی از مهم‌ترین دلایل ایجاد مقاومت به آزول‌ها شناخته شده است. وقوع هم‌زمان چند جهش در این ژن و ایجاد تغییرات ساختاری حاصل از این جهش‌ها در ایجاد مقاومت به آزول‌ها نقش دارد. با این حال پلی مورفسم ژنتیکی در این ژن پیشنهاد می‌کند که لانوسترول ۱۴-α-دمتیلاز فعال، تنها تغییرات ساختاری محدودی را می‌تواند بپذیرد و دیگر انواع تغییرات (حاصل از جهش‌ها) منجر به کاهش عملکرد آن می‌شوند. همچنین به نظر می‌رسد وقوع هم‌زمان چند جهش در ایجاد مقاومت به دارو مؤثرتر از جهش‌های تکی باشد (۸). هدف از این مطالعه بررسی جهش‌های ژن ERG11 به روش PCR-توالی یابی به‌عنوان یکی از عوامل ایجادکننده مقاومت به فلوکونازول در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس در استان گیلان بود.

مواد و روش کار

جداسازی و کشت جدایه‌های مخمر کاندیدا آلبیکنس:

در این مطالعه مقطعی توصیفی، نمونه‌های بالینی مشکوک به عفونت کاندیدایزیز واژینال از ترشحات واژن ۵۰ زن از بیمارستان الزهرا 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. سپس در محیط کشت انتقال کری بلیر (Cary Blair) (شرکت Quelab، کانادا) به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت کشت جدایه‌ها، از محیط کشت سابورود دکستروز آگار (Sabouraud dextrose agar) (شرکت Quelab، کانادا) حاوی کلرامفنیکل استفاده شد. جدایه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. جهت شناسایی کاندیدا آلبیکنس، مورفولوژی کلنی، تشکیل یا عدم تشکیل لوله زایا، و رنگ کلنی‌ها در محیط کروم آگار کاندیدا مورد بررسی قرار گرفت.

سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی:

مقاومت و حساسیت جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس نسبت به فلوکونازول، به روش کربی بوئر بر اساس روش رفرنس CLSI (Clinical and Laboratory Standard institute) بررسی شد. جهت تعیین الگوی حساسیت دارویی، از دیسک آنتی بیوگرام

تهران) به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. نمونه‌ها توسط شرکت Bioneer تعیین توالی شد. نتایج حاصل از تعیین توالی به کمک نرم‌افزار CLC main workbench v3.5 و نرم‌افزار آنالیز بلاست (BLAST) از نظر وجود جهش در نمونه‌های مقاوم در مقایسه با نمونه استاندارد رفرنس موجود در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفت.

جهش‌های ژن ERG11 در جدایه‌های مقاوم به

فلوکونازول:

بر اساس نتایج توالی یابی (جدول ۴) هشت جهش خاموش (Silent mutation) در جدایه‌های مقاوم شناسایی شد. در یک جدایه جهش بدمعنی V437I به صورت هتروزیگوت پیدا شد که در کدون ۴۳۷-م، والین به ایزولوسین تبدیل شده بود (شکل ۱). همچنین در ۷ جدایه مقاوم جهش بدمعنی V488I به صورت هتروزیگوت گزارش شد که در کدون ۴۸۸-م، والین به ایزولوسین تبدیل شده بود (شکل ۲).

یافته‌ها
میزان مقاومت جدایه‌های کاندیدا آلیکنس به فلوکونازول:

در این تحقیق ۲۰ جدایه مقاوم، ۲ جدایه حساس وابسته به دوز و ۱ جدایه حساس به فلوکونازول به روش دیسک دیفیوژن شناسایی شد (۷). همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی دارو (MIC) به روش برات دایلوژن تعیین شد (جدول ۳). ۵۰ درصد جدایه‌های مقاوم،

جدول (۱): مقادیر MIC و قطر هاله عدم رشد استاندارد برای جدایه‌های کاندیدا آلیکنس بر اساس روش CLSI (حساس وابسته به دوز=S-DD، حساس=S، مقاوم=R)

دوز=S-DD، حساس=S، مقاوم=R					
مقدار MIC (µg/ml)			قطر هاله (mm)		
R	S-DD	S	R	S-DD	S
≥ 64	16-32	≤8	≤14	15-18	19≥

جدول (۲): جدول مشخصات پرایمرهای ژن ERG11 مورد استفاده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول PCR
ERG11-F	5'-AGGTGGTGATTGAATGATTGACTT-3'	489 bp
ERG11-R	5'-GAACTATAATCAGGGTCAGGCACTT-3'	

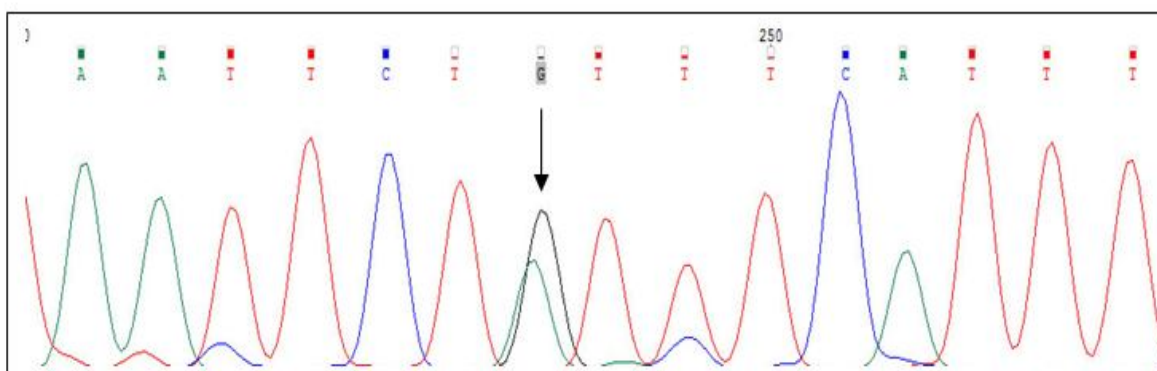
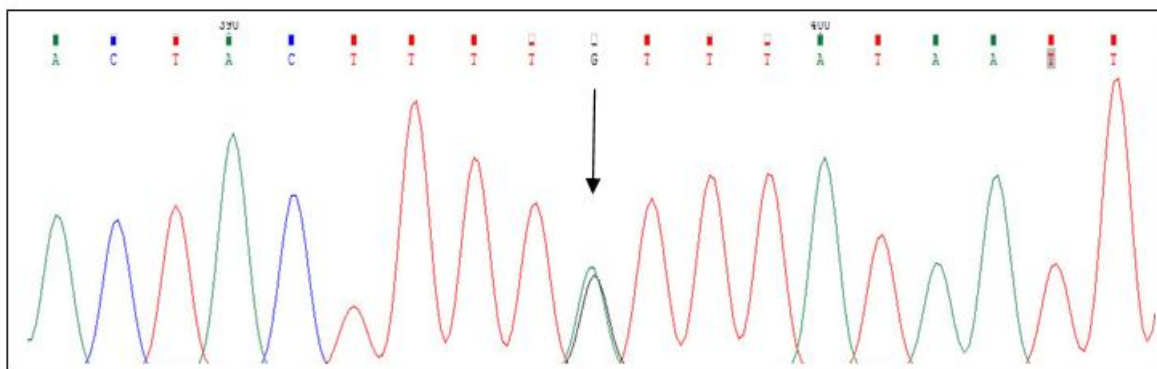
جدول (۳): نتایج تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی فلوکونازول

MIC (µg/ml)	شماره جدایه
۱۰۲۴	۶
۲۰۴۸	۹
۲۰۴۸	۱۲
۲۰۴۸	۱۷
۱۰۲۴	۱۹
۲۰۴۸	۲۱
۲۰۴۸	۲۲
۲۰۴۸	۲۳
۱۰۲۴	۲۴
۱۰۲۴	۲۵
۵۱۲	۲۶
۱۲۸	۲۹
۲۰۴۸	۳۰
۵۱۲	۳۲
۲۵۶	۳۴

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	شماره جدایه
۵۱۲	۳۵
۵۱۲	۳۶
۲۰۴۸	۳۸
۲۰۴۸	۴۰
۲۰۴۸	۴۲

جدول (۴): تغییرات بازی و آمینواسیدی ایجادشده در ژن ERG11 کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول

شماره نمونه	تغییر بازی	جهش
۲۴	CTT>CTC	L370L
۲۴	TTT>TTC	F380F
۳۲، ۳۰، ۲۵، ۲۴، ۲۱، ۱۹، ۱۷، ۱۲	TAT>TAC	Y401Y
۱۷	CCT>CCC	P419P
۳۲، ۳۰، ۲۵، ۲۱، ۱۹، ۱۲	GCC>GCT	A432A
۳۲، ۳۰، ۲۵، ۲۱، ۱۹، ۱۲	GCT>GCC	A434A
۱۷	GTT>ATT	V437I
۳۲، ۳۰، ۲۵، ۲۴، ۲۱، ۱۹، ۱۷، ۱۶، ۱۲	TTG>TTA	L480L
۳۲، ۳۰، ۲۵، ۲۱، ۱۹، ۱۶، ۱۲	GTT>ATT	V488I
۳۲، ۳۰، ۲۵، ۲۴، ۲۱، ۱۹، ۱۷، ۱۶، ۱۲	AAC>AAT	N490N

**شکل (۱): الکتروفوروگرام مربوط به تغییر باز G به A در کدون ۴۳۷: با تغییر کدونی GTT(Val)>ATT(Ile) و تغییر آمینواسیدی V437I****شکل (۲): الکتروفوروگرام مربوط به تغییر باز G به A در کدون ۴۸۸: با تغییر کدونی GTT(Val)>ATT(Ile) و تغییر آمینواسیدی V488I**

بحث

گونه‌های کاندیدا آلبیکنس علت بیش از ۱۵ درصد موارد عفونت‌های خونی بیمارستانی هستند که بین ۵ درصد تا ۷۱ درصد موارد آن منجر به مرگ می‌شود (۱۱). مصرف بی‌رویه و نادرست داروهای ضد قارچی باعث شده جدایه‌های کلینیکی مقاوم به داروهای آزولی از معضلات مهم در درمان عفونت‌های قارچی محسوب شوند. فلوکونازول به‌عنوان یکی از رایج‌ترین داروهای آزولی ضد قارچی محسوب می‌شود که امروزه مقاومت به آن در جدایه کلینیکی کاندیدا به‌شدت افزایش یافته است (۱۲). شناسایی مکانیسم‌های ایجادکننده مقاومت در این جدایه‌ها می‌تواند به شناسایی و جایگزینی راهکارهای درمانی مناسب‌تر و مؤثرتر کمک شایانی نماید. در این مطالعه از ۵۰ نمونه مشکوک به کاندیدیازیز واژینال، ۲۳ نمونه کاندیدا آلبیکنس جداسازی شد که ۸۶/۹۵ درصد (۲۰ نمونه) از آن‌ها مقاوم به فلوکونازول بودند. در مطالعه Zhang و همکاران از بین ۲۲۷ زن مبتلا به HIV در ایالات متحده تنها ۱۰/۶ درصد موارد کاندیدا آلبیکنس، مقاوم به فلوکونازول گزارش شد (۱۳). در مطالعه Sobel و همکاران در بین ۵۵۶ زن غیر مبتلا به HIV در سال ۲۰۰۳ تنها ۳/۶ درصد موارد مقاوم به فلوکونازول تشخیص داده شد (۱۴). در مطالعه فرح‌بخش و همکاران در سال ۱۳۹۰، از ۶۶ جدایه کاندیدا آلبیکنس، ۲۸/۷ درصد موارد مقاوم به فلوکونازول بودند (۱۵). در مطالعه محمدی قلعه بین و همکاران در سال ۲۰۱۷ از ۱۱۹ جدایه کاندیدا آلبیکنس از ولوواژینیت، ۸۱/۵ درصد موارد مقاوم به فلوکونازول بودند (۱۶). در مطالعه حسن‌پور و همکاران در سال ۱۳۹۳ از ۱۶۰ نمونه مشکوک به کاندیدیازیز واژینال، ۱۵ جدایه کاندیدا آلبیکنس شناسایی شد که همگی مقاوم به فلوکونازول بودند (۱۷). در مطالعه تیموری و همکاران در سال ۲۰۱۵ از ۱۴۲ جدایه بیمارستانی کاندیدا آلبیکنس تنها ۵ مورد مقاوم به فلوکونازول شناسایی شدند (۱۸). در مطالعه شکاری ابراهیم‌آبادی از ۱۰۸ جدایه کاندیدا آلبیکنس، ۸ مورد مقاوم به فلوکونازول شناسایی شد (۱۹). در مطالعه شریفی‌نیا و همکاران در سال ۲۰۱۵ از عفونت‌های تنفسی حاصل از کاندیدا آلبیکنس، ۱۸/۹۱ درصد موارد مقاوم به فلوکونازول بودند (۲۰). با توجه به مطالعات انجام‌گرفته به نظر می‌رسد موضع عفونت کاندیدایی و شیوع آن در هر منطقه جغرافیایی به همراه مصرف نادرست دارو باعث شده نرخ متفاوتی از مقاومت به فلوکونازول در کشور گزارش شود. درحالی‌که نرخ پایین مقاومت در خارج از کشور در مطالعات ذکرشده قابل تأمل است. باین‌حال نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده نرخ بالای مقاومت به این دارو در مبتلایان به کاندیدیازیز واژینال در استان گیلان است. و انتظار می‌رود در درمان این گروه از عفونت‌ها

در استان گیلان از داروهای مناسب‌تری چون کلوتریمازول (نتایج حساسیت به این دارو ارائه نشده) استفاده شود. تغییرات ساختاری در Erg11p به‌واسطه جهش‌هایی متنوعی است که در ژن کد کننده آن (ERG11) رخ می‌دهد. این جهش‌ها معمولاً در نقاط داغ جهش پذیری به‌وفور در جدایه‌های مقاوم به دارو رخ می‌دهند. نقاط داغ جهش پذیری در ژن ERG11 شامل آمینواسیدهای ۱۰۵ تا ۱۶۵، ۲۶۶ تا ۲۸۷ و ۴۰۵ تا ۴۸۸ می‌باشد (۸). در مطالعه حاضر دو جهش V437I و V488I واقع در سومین ناحیه داغ جهش پذیری در هشت جدایه شناسایی شد که نشان‌دهنده اهمیت این ناحیه در ایجاد مقاومت به دارو می‌باشد. در مطالعه Wang و همکاران جهش V437I در ۳ جدایه مقاوم به فلوکونازول و ۲ جدایه حساس به آن مشاهده شد (۲۱). در مطالعه Xiang و همکاران جهش V437I در جدایه‌های مقاوم و حساس مشاهده شد (۲۲). در مطالعه White و همکاران جهش V437I در جدایه‌های مقاوم شناسایی شد (۲۳). از سوی دیگر وقوع جهش V488I نیز در هر دو گروه جدایه‌های مقاوم و حساس به دارو گزارش شده است. به‌عنوان نمونه، در مطالعه Wang و همکاران جهش V488I در ۵ جدایه مقاوم به فلوکونازول، ۳ جدایه حساس وابسته به دوز و ۷ جدایه حساس به آن مشاهده شد. در مطالعه Wang و همکاران این جهش هم در جدایه‌های حساس و هم مقاوم به فلوکونازول شناسایی شد (۲۱). در مطالعه Manastir و همکاران جهش V488I در سه جدایه مقاوم و حساس وابسته به دوز گزارش شد (۲۴). در مطالعه Rosana و همکاران جهش V488I در یک جدایه حساس و چند جدایه مقاوم به فلوکونازول تعیین شد (۶). در مطالعه Maebashi و همکاران مشخص شد که وقوع جهش V488I در افزایش دوز فلوکونازول در جدایه‌های مقاوم به دارو مؤثر است (۲۵). کدون‌های ۴۳۷ و ۴۸۸ در سمت C-ترمینال پروتئین Erg11p (۲۱) و کدون ۴۸۸ در انتهای مارپیچ L قرار گرفته (۲۶) و از نقاط داغ جهش پذیری در این ژن محسوب می‌شود. فلوکونازول با اتصال اتم N خود به گروه هم Erg11p و اشغال جایگاه سوبسترا باعث مهار عملکرد سیتوکروم P450 می‌شود (۲۴). گروه هم بین ابتدای مارپیچ I و انتهای مارپیچ L قرار گرفته (۲۶)؛ بنابراین تغییر آمینواسیدی در انتهای مارپیچ L از جمله در کدون ۴۸۸ می‌تواند در اتصال آن به گروه هم تأثیر منفی داشته باشد و در نتیجه در اتصال فلوکونازول به گروه هم در Erg11p تأثیرگذار باشد. با توجه به اینکه دو جهش شناسایی‌شده در مطالعه حاضر در بعضی موارد حساس یا حساس وابسته به دوز فلوکونازول در مطالعات قبلی گزارش شده (۲۱، ۲۴) به نظر می‌رسد به‌تنهایی اثر مهار در اتصال ارگوسترول به فلوکونازول نداشته باشند بلکه مجموعه‌ای از تغییرات آمینواسیدی از جمله این دو جهش و دیگر جهش‌ها، در کاهش تمایل

به فلوکونازول اثر تشدیدکنندگی داشته باشند و هر جهش نقطه‌ای در نواحی داغ جهش‌پذیری تنها بتواند تا حدی تمایل دارو به این پروتئین را کاهش دهد. قابل ذکر است که جهش‌های نقطه‌ای در همه موارد مقاوم به فلوکونازول به صورت جمعی گزارش شده است (۲۱، ۲۲، ۲۴، ۲۶، ۲۷) که دلیلی بر این مدعاست. با توجه به محدودیت زمانی و بودجه‌ای در این مطالعه قادر به بررسی دیگر مکانیسم‌های مقاومت به آزول در جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس نبودیم و انجام آن در مطالعات بعدی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله تحقیقاتی حاصل پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی با کد پایان‌نامه ۱۵۹۳۰۵۵۴۹۴۲۰۱۴ بوده که در تاریخ ۱۳۹۵/۰۴/۰۹ به تصویب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن رسیده است. نویسندگان مقاله از سرکار خانم دکتر سیده هاجر شارمی به دلیل تشخیص و تهیه نمونه‌های مشکوک به کاندیدا آلبیکنس، نهایت تشکر را دارند.

References

- 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.
- habibian R, Jafarzadeh L, Shahriari K. Investigating the relationship between recurrent vulvovaginal candidiasis with predisposing factors and symptoms of disease. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2013;15(5): 38-46.
- 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 Pac J Trop Biomed* 2015;5(11): 909-14.
- Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 2013;4(2): 119-28.
- Zia m, Bayat m, Khalkhali h. In vitro antifungal effect of *Thymus vulgaris* essence on *Candida albicans* isolated from patients with oral candidiasis. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2011;13(3): 44-52.
- 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): 1046-52.
- 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; 10(3): 222-30.
- Debnath S, Addya S. Structural basis for heterogeneous phenotype of ERG11 dependent Azole resistance in *C.albicans* clinical isolates. *Springerplus*. 2014;3: 660.
- 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.
- 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.
- Moran C, Grussemeyer CA, Spalding JR, Benjamin DK, Jr., Reed SD. *Candida albicans* and non-*albicans* bloodstream infections in adult and pediatric patients: comparison of mortality and costs. *The Pediatr Infect Dis J* 2009;28(5): 433-5.
- Martinez M, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Bachmann SP, Perea S, Ruesga MT, et al. Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy

- for oropharyngeal candidosis. *J Antimicrob Chemother* 2002;49(3): 515-24.
13. Zhang L, She X, Merenstein D, Wang C, Hamilton P, Blackmon A, et al. Fluconazole Resistance Patterns in Candida Species that Colonize Women with HIV Infection. *Curr Ther Res Clin Exp* 2014;76: 84-9.
 14. 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. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(1): 34-8.
 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): 201-10.
 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. *JAUMS* 2017;16(4): 409-21.
 17. Hasanpour Zafarani 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.
 18. Teymuri M, Mamishi S, Pourakbari B, Mahmoudi S, Ashtiani MT, Sadeghi RH, et al. 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.
 19. Shekari Ebrahim Abad H, Zaini F, Kordbacheh P, Mahmoudi M, Safara M, Mortezaee V. In Vitro Activity of Caspofungin Against Fluconazole-Resistant Candida Species Isolated From Clinical Samples in Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2015;8(6): e18353.
 20. Sharifynia S, Badali H, Sharifi Sorkherizi M, Shidfar MR, Hadian A, Shahrokhi S, et al. In Vitro Antifungal Susceptibility Profiles of Candida albicans Complex Isolated from Patients with Respiratory Infections. *Acta med Iran* 2016;54(6): 376-81.
 21. Wang H, Kong F, Sorrell TC, Wang B, McNicholas P, Pantarat N, et al. 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;14 (9): 167.
 22. 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 Res* 2013;13(4): 386-93.
 23. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of Candida albicans. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(6): 1704-13.
 24. 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.
 25. Maebashi K, Kudoh M, Nishiyama Y, Makimura K, Kamai Y, Uchida K, et al. 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): 117-24.
 26. Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, et al. Contribution of

- mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* 1999;145 (Pt 10): 2701-13.
27. Strzelczyk JK, Slemp-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): 547-52.

MUTATION IN HOTSPOT REGIONS OF THE ERG11 GENE AND FLUCONAZOLE RESISTANCE IN CLINICAL ISOLATES OF CANDIDA ALBICANS IN RASHT CITY

Saeedeh Balabandi¹, Zeinab Khazaei -Koozpar^{2*}, Najmeh Ranji³

Received: 03 Sep , 2019; Accepted: 23 Nov , 2019

Abstract

Background & Aims: Nowadays, the common use of azoles has led to increased resistance to azole among *Candida albicans* strains. Amino acid substitutions in azole target enzyme, ERG11p, is attributed to azole resistance in some clinical strains of *Candida albicans*. The aim of this study was to evaluate ERG11 gene mutations in fluconazole-resistant isolates of *Candida albicans* in Rasht.

Materials & Methods: In this study, the clinical specimens were isolated from the vaginal mucosa of 50 women. *Candida albicans* isolates were identified using standard identification methods such as germ tubes production and culture in CHROMagar media. Resistance and susceptibility of isolates to fluconazole were investigated through disc diffusion and broth micro-dilution methods. The mutations in the ERG11 gene were determined in clinical isolates using PCR-sequencing method.

Results: In this study, 20 clinical isolates of *Candida albicans* were resistant to fluconazole. The highest MIC of fluconazole was determined at 2048 µg/ml. Also, in eight fluconazole-resistant isolates by PCR-sequencing, two missense mutations (V437I and V488I) were found in the ERG11 gene.

Conclusion: It seems that having several mutations in the ERG11 gene is a reason for high MIC in resistant isolates of *Candida albicans* in this study. However, investigating other mechanisms of azole resistance is recommended in *Candida albicans* isolates.

Keywords: *Candida albicans*, ERG11, fluconazole, MIC, mutation, V488I

Address: Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

Tel: +981154271105

Email: khazaei@toniau.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2020: 30(10): 844 ISSN: 1027-3727

¹ MSc, 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 (Corresponding Author)

³ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran