جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

حساسیت سویه‌های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران ایدزی به داروی فلوکونازول و تعیین ژن مقاومت CDR2 در سویه های مقاوم با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس

احسان فرح بخش [*]
محمد حسین یادگاری [**]
معصومه رجبی بذل [***]
مجتبی تقی‌زاده ارمکی [*]

[*] کارشناس ارشد قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی
[**] دکترای قارچ شناسی پزشکی، دانشیار دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه قارچ شناسی پزشکی
[***] دکترای بیوشیمی بالینی، استادیار دانشگاه شهید بهشتی ، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی

تاریخ وصول:۱۳۸۹/۱۲/۲۱
تاریخ پذیرش:۱۳۹۰/۲/۲۱

مؤلف مسئول: محمد حسین یادگاری
پست الکترونیک : Yadegarm@modares.ac.ir

چکیده:

مقدمه و هدف: امروزه قارچ‌های فرصت‌طلب به ویژه قارچ کاندیدا آلبیکنس ازجمله شایع‌ترین عوامل مخاطره‌انگیز در بیماران نقص سیستم ایمنی می‌باشند. افزایش روز افزون سویه‌های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به داروهای آزولی مشکل اصلی بیماران مبتلا به ایدز می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی ژن CDR2 در سویه‌های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول در بیماران ایدزی مبتلا به کاندیدیازیس دهانی ـ حلقی به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس بود.

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، کلامیدوسپور و رنگ کلنی بر روی محیط کروم آگار کاندیدا شناسایی شدند. ابتدا حساسیت سویه‌های کاندیدا آلبیکنس مطابق روش استاندارد انتشار دیسک بررسی شد. سپس بیان ژن مقاومت به فلوکونازول CDR2 با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس و الکتروفورز محصول واکنش، در مقایسه با نمونه های شاهد ارزیابی گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

یافته‌ها: آزمایش حساسیت دارویی ۶۶ سویه کاندیدا آلبیکنس نشان داد که ۶۲/۶ درصد سویه‌ها حساس، ۸/۶ درصد وابسته به دوز و۲۸/۷ درصد مقاوم به فلوکونازول می‌باشند. ارزیابی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس مشخص کرد که ۶ درصد بیماران دارای ژن مقاومت CDR2 بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه، استفاده از روش مقرون به صرفه انتشار دیسک به همراه روش‌هایی مانند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس که امکان مطالعه بر روی مکانیسم مقاومت دارویی و ژن‌های دخیل در مقاومت را فراهم می‌آورد، پیشنهاد می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، ژن CDR2، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

امروزه قارچ‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب از جمله عفونت‌های تهدید کننده زندگی در بیماران نقص سیستم ایمنی می‌باشند. مخمرها و در رأس آنها گونه‌های کاندیدا معمول‌ترین قارچ‌هایی هستند که از عفونت‌های انسانی جدا می‌شوند(۱). علی‌رغم پیشرفت‌های زیاد در زمینه مراقبت‌های بهداشتی و روش‌های درمانی، وقوع کاندیدیازیس سیستمیک مهاجم به طور قابل توجهی رو به افزایش است(۲). بیماری‌های قارچی در بیماران ایدزی اغلب به صورت کاندیدیازیس دهانی حلقی[۱] تظاهر می‌یابند و از جمله عوامل ایجاد کننده آن، گونه قارچ‌های مخمری کاندیدایی می‌باشد که شایع‌ترین آنها کاندیدا آلبیکنس[۲] است. کاندیدیازیس دهانی از عفونت‌های شایع در بیماران مبتلا به ویروس نقص سیستم ایمنی است و در بیش از ۹۰ درصد از این بیماران در طی عفونت با این ویروس و به ویژه در مراحل اولیه قبل از درمان و مراحل پیشرفته بیماری ایدز دیده می‌شود(۵-۳).

درمان به وسیله عوامل ضد قارچی آزولی به ویژه فلوکونازول به عنوان راهکاری مؤثر جهت درمان عفونت‌های ناشی از مخمر کاندیدا آلبیکنس معرفی می‌شود، اما بروز مقاومت‌های دارویی این روش درمان را با مشکلات جدی روبرو ساخته است(۷ و۶)، لذا شناسایی گونه‌های مقاوم به عوامل ضد قارچی جهت درمان کارآمد و جلوگیری از مصرف بی رویه داروها بسیار ضروری می‌باشد.

مکانیسم‌های مولکولی متفاوتی در پیدایش مقاومت کاندیدا آلبیکنس در برابر فلوکونازول شناخته شده است(۸)، که این مکانیسم‌ها شامل؛ کاهش انتقال دارو به داخل سلول، تغییرات در آنزیم‌های مسیر بیوسنتز ارگوسترول، تغییرات در آنزیم هدف(جهش‌های نقطه‌ای، افزایش بیان و تغییر ژن) و افزایش انتشار دارو به خارج به وسیله پمپ‌های انتشار غشایی می‌باشد. یک مکانیسم مهم که باعث شکل‌گیری مقاومت آزولی می‌شود، کاهش تجمع داخل سلولی دارو است که با بیان و افزایش بیان ژن‌های CDR (ژن‌های مقاومت دارویی کاندیدا) در ارتباط است. از میان ژن‌های CDR شناخته شده CDR1 و CDR2 باعث مقاومت کاندیدا به فلوکونازول می‌شوند(۱۴-۹).

هدف از انجام این مطالعه بررسی میزان مقاومت ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس بومی جدا شده از بیماران ایدزی با روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی و تعیین ژن مقاومت CDR2 در سویه‌های مقاوم با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس[۳] بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۸ در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. اجرای این تحقیق به تصویب کمیته ایمنی زیستی و اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسید. در این مطالعه، ۶۸ نمونه شامل ۶۶ ایزوله بالینی و دو گونه کاندیدا آلبیکنس استاندارد

1-Oropharyngeal Candidiasis (OPC)
2-*Candida albicans*
3-Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

حساس و مقاوم به فلوکونازول مورد بررسی قرار گرفتند. ایزوله‌های بالینی که از ضایعات دهانی افراد ایدزی جدا شده بود و گونه استاندارد حساس به فلوکونازول (ATCC ۱۰۲۳۱)[1] از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و گونه استاندارد مقاوم به فلوکونازول (ATCC ۷۶۶۱۵) از مرکز دارویی دانشگاه شانگهای چین تهیه گردید.

گونه‌های استاندارد و سویه‌های بالینی بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار (۶۵ گرم در لیتر) حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (۵۰ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر الکل) کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. تک کلنی‌های مخمری حاصل از کشت تازه جهت انجام آزمون‌های فنوتیپی و مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. از روش‌های فنوتیپی، کشت در محیط کروم آگار کاندیدا[2]، آزمایش ایجاد لوله زایا و همچنین آزمایش تولید کلامیدوکونیدی به منظور شناسایی نمونه‌ها استفاده گردید. آزمایش تعیین حساسیت به فلوکونازول با روش استاندارد انتشار دیسک صورت گرفت. بدین منظور ابتدا ۳۴ گرم از پودر محیط مولر هینتون آگار[3] در یک لیتر آب مقطر حل گردید. سپس ۲۰ گرم از پودر گلوکز و ۰/۵ میلی‌گرم از پودر متیلن بلو به آن افزوده شد. سوسپانسیون قارچی جهت تلقیح به محیط کشت مولر هینتون آگار با غلظت 10^6 سلول در هر میلی‌لیتر از کشت تازه مخمر، در لوله‌های استریل حاوی سرم فیزیولوژی تهیه گردید. پس از انتقال سوسپانسیون به محیط کشت دیسک‌های ۲۵ میکروگرمی فلوکونازول در مرکز پلیت قرار داده شدند و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند و قطر مهارکنندگی از رشد بر حسب میلی‌متر ثبت گردید.

چند روش متفاوت جهت استخراج RNA سلول‌های مخمری کاندیدا مورد آزمایش قرار گرفت و در نهایت بهترین و مؤثرترین روش پس از مشاهده باندهای RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز انتخاب گردید. استخراج RNA با استفاده از پرل شیشه‌ای[4]، در حضور فنل، کلروفرم و ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۵: ۲۴: ۱ صورت گرفت(۱۵). جهت استخراج RNA از کشت تازه مخمر کاندیدا آلبیکنس در فاز لگاریتمی استفاده شد. همچنین از میکروتیوب ها و سرسمپلرهای عاری از آنزیم RNase و DNase استفاده شد. RNA استخراج شده از نظر کمی و کیفی با دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. پس از مشاهده تصویر RNA بارگذاری شده بر روی ژل آگارز، تفاوت غلظت RNA ها از شدت باند آنها مشخص شد. بدین منظور جهت یکسان نمودن شرایط، جذب نوری تمامی نمونه‌ها با دستگاه بیوفتومتر اپندورف قرائت شد و سپس با دی‌اتیل‌پیروکربنات میزان غلظت RNA قبل از سنتز cDNA[5] و استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

1-American Type Culture Collection (ATCC)
2-Chrom Agar Candida Medium
3-Mueller Hinton Agar Medium
4-Glass Bead
5- Complementary DNA

یکسان گردید. تصویر RNA های استخراج شده بر روی ژل آگارز وجود DNA را در نمونه‌ها نشان داد، به همین علت تمامی نمونه‌های RNA برای از بین رفتن DNA با آنزیم DNase تیمار[1] گردید.

پس از اطمینان از خلوص RNA، ساخت cDNA از روی آن به وسیله کیت K۱۶۲۱ ساخت شرکت فرمنتاز و بر اساس دستور العمل آن انجام گرفت. بدین ترتیب که به ۲ میکروگرم RNA استخراج شده، ۱ میکرولیتر پرایمر رندوم هگزامر اضافه شد. حجم نهایی این مرحله با آب تیمار شده با دی‌اتیل‌پیروکربنات[2] به ۱۲ میکرولیتر رسانده شد. میکروتیوب‌های حاوی مقادیر مذکور به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس بلافاصله به یخ منتقل گردید. در ادامه ۴ میکرولیتر بافرX۵، ۲ میکرولیتر مخلوط ۱۰ میلی مولار dNTP، ۱ میکرولیتر ریبونوکلئاز و ۱ میکرولیتر آنزیم ریورس ترانس کریپتاز[3] ۲۰۰ واحد در میلی‌لیتر به میکروتیوب اضافه شد. سپس محلول واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. با قرار دادن میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد، واکنش متوقف شد. cDNA حاصل تا زمان انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور بیان ژن عامل مقاومت به فلوکونازول در سویه‌های کاندیدا آلبیکنس از پرایمرهای CDR2 و ACT1 ساخت شرکت سیناژن استفاده گردید. ژن ACT1 در زمره ژن‌های خانگی[4] است که به عنوان کنترل داخلی در این مطالعه استفاده شد. جهت صحت عملکرد پرایمرهای مورد استفاده، پرایمرها با انجام BLAST[5] در سایت NCBI[6] و با استفاده از نرم افزار ژن رانر[7] کنترل شدند. توالی اسید نوکلئیک پرایمرهای مورد استفاده به این شرح بودند؛

CDR2F: (5'-CACGTCTTTGTCGCAACAGC-3')

CDR2R:(5'-ATGTTGTGACTTGCAGTAGC-3')

ACT1F:(5'-CCAGCTTTCTACGTTTCC-3')

ACT1R:(5'-CTGTAACCACGTTCAGAC-3')

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز معکوس در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر با استفاده از ترموسایکلر بایو رد انجام شد. ۱ میکرولیتر از cDNA ساخته شده، مقدار ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها، ۶/۲۵ میکرولیتر از مستر میکس حاوی مخلوط نوکلئوتیدها با غلظت ۴/. میلی‌مولار، کلرید منیزیم با غلظت ۴ میلی‌مولار و آنزیم تگ پلی مراز[8] ، 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 شد 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

1-Treatment
2-Diethylpyrocarbonate (DEPC)
3- Reverse Transcriptase M-MuLV
4- House Keeping
5- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)
6-National Center for Biotechnology Information (NCBI)
7-Gene Runner
8- Taq Polymerase

اتصال پرایمر به رشته الگو ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای گسترش رشته جدید ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و ۳۴ سیکل از مرحله ۲ تا ۴ تکرار شد. دمای بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. در آخر محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر روی ژل آگارز ۱/۸ درصد حاوی ۰/۵ میکروگرم اتیدیوم بروماید به ازای هر میلی‌لیتر ژل الکتروفورز گردید. پس از اتمام الکتروفورز ژل‌ها بر روی دستگاه ژل داکیومنتیشن از نظر وجود باند ژن مورد نظر تکثیر شده، بررسی شدند و با باند حاصله از نمونه استاندارد کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول مقایسه شدند.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS[1] تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها

تعداد ۶۶ نمونه کاندیدا آلبیکنس مورد مطالعه بر اساس رنگ ویژه کلنی در محیط کروم آگار کاندیدا، کشت بر روی محیط کورن میل‌آگار حاوی توئین ۸۰ و آزمایش تولید لوله زایا[2] تأیید شدند. در این روش فنوتیپی از سویه استاندارد مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس به عنوان شاهد مثبت و کاندیدا کروزئی به عنوان شاهد منفی استفاده شدند.

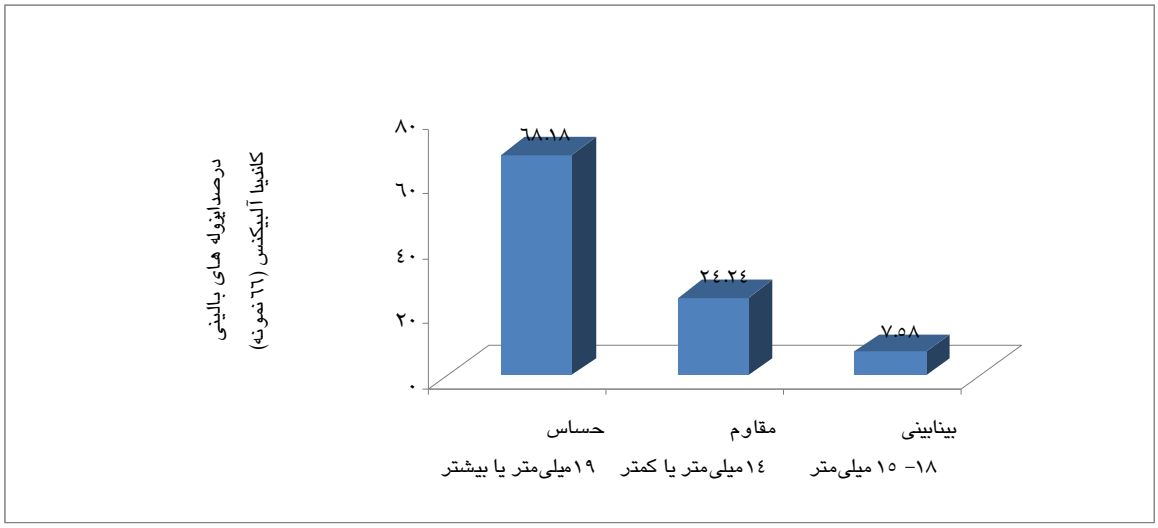
نتایج حاصل از آزمون انتشار دیسک جهت ارزیابی حساسیت ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس نسبت به داروی فلوکونازول در شرایط دمایی ۳۵ درجه سانتی‌گراد و پس از ۲۴ ساعت به دست آمد. این نتایج نشان داد که ۶۸/۱۸ درصد سویه‌ها نسبت به فلوکونازول حساس،۲۴/۲۴ درصد مقاوم و ۷/۵۸ درصد حالت بینابینی دارند(نمودار۱). جهت تأیید نتایج به دست آمده با این روش از ایزوله استاندارد مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس و ایزوله استاندارد حساس به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس استفاده گردید.

RNA های استخراج شده از ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز مورد تأیید قرار گرفتند. نتیجه استخراج RNA مخمرهای کاندیدا آلبیکنس به وسیله پرل شیشه‌ای و ترکیب سه تایی فنل، کلروفرم و ایزو آمیل الکل با افزایش زمان ورتکس موفقیت‌آمیز بود.

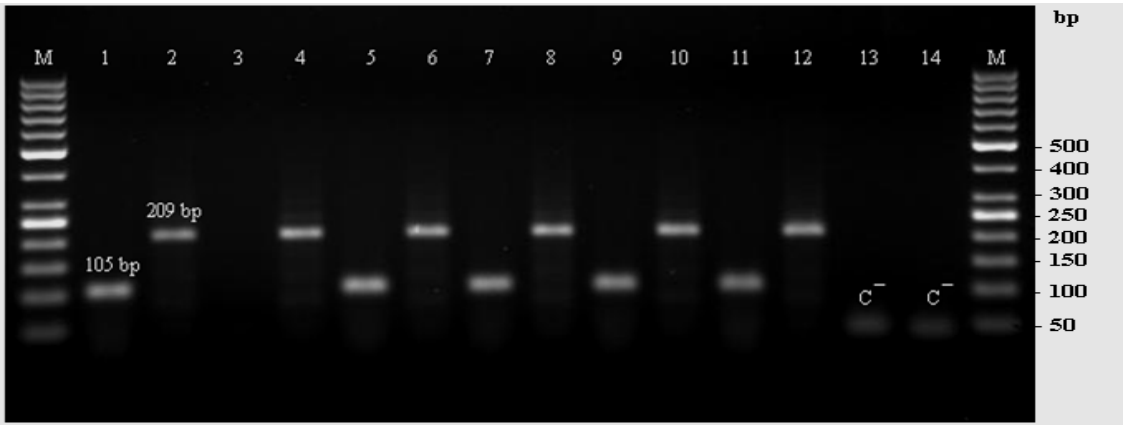
انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی CDR2 و ACT1 در سویه‌های استاندارد حساس و مقاوم به فلوکونازول و نیز نمونه‌های بالینی جدا شده از افراد ایدزی سبب به دست آمدن نتایج قابل قبولی در زمینه بررسی نسخه برداری از ژن مورد بررسی گردید. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس و الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، مشخص گردید که از ۶۶ ایزوله بالینی مورد بررسی، ۴ ایزوله(۶ درصد) دارای ژن مقاومتی CDR2 هستند(تصویر ۱).

1-Statistical Package for Social Sciences
2-Germ Tube

پس از بررسی نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس و روش انتشار دیسک نشان داده شد که هر ۴ نمونه دارای واکنش مثبت در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس، با روش انتشار دیسک نیز مقاوم می‌باشند. در تمامی مراحل انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس از ژن ACT1 به عنوان کنترل داخلی و حصول اطمینان از سنتز cDNA استفاده شد.



نمودار ۱: مقایسه درصد میزان حساسیت ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس نسبت به فلوکونازول با روش انتشار دیسک



تصویر ۱: نتایج حاصل از الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلی‌مراز معکوس ژن های CDR2 و ACT1

M؛ مارکر ۵۰ جفت باز، ۱؛ ژن CDR2 کاندیدا آلبیکنس استاندارد مقاوم به فلوکونازول، ۳؛ ژن CDR2 کاندیدا آلبیکنس استاندارد حساس به فلوکونازل،۱۱و۹، ۷، ۵؛ ژن CDR2 ایزوله های بالینی مقاوم به فلوکونازول، ۱۲و ۱۰، ۸، ۶، ۴، ۲؛ ژن‌ها خانگی ATC1، ۱۳؛ کنترل منفی ژن CDR2، ۱۴؛ کنترل منفی ژن ACT1

بحث و نتیجه‌گیری

داروهـای گـروه آزول بـه ویـژه فلوکونـازول از جملـه مـؤثرترین داروهـای مـورد اسـتفاده در درمـان عفونـت‌هـای ناشـی از کاندیـدا آلبیکـنس بـوده و هـم‌چنـین رایـج‌تـرین و پرمـصرف‌تـرین عامـل ضـد قـارچی شـناخته شـده مـی‌باشـند. فلوکونازول به علت دارا بودن خاصیت درمانی بالا به طـور معمـول جهـت درمـان عفونـت‌هـای ناشـی از کاندیدا استفاده می‌شود(۱۶). مقاومت در برابر عوامـل ضد قارچی آزولی تا دهه ۱۹۸۰ بسیار نـادر بـود، امـا در دهه ۱۹۹۰ تاکنون مقاومـت نـسبت بـه ایـن عوامـل ضـد قـارچی (آزول هـا) افـزایش چـشم‌گیـری یافتـه است(۱۷). شیوع عفونت های قارچی منجر به افـزایش اسـتفاده از داروهـای ضـد قـارچی و افـزایش قابـل ملاحظه مقاومت گونه‌های کاندیدا نسبت به ترکیب‌های مورد استفاده شده اسـت. شـیوع عفونـت‌هـای حـاد و سیستمیک کاندیدایی و متعاقب آن درمان با داروهـای ضد قارچی بـه ویـژه ترکیـب‌هـای آزولـی و مقاومـت نسبت به این ترکیب‌ها، ضرورت استفاده از روش‌های تعیین حساسیت دارویی عوامل قارچی را بیش از پیش آشکار سـاخته اسـت. تعیـین حـساسیت عامـل ایجـاد بیماری قبل از شروع درمـان جهـت درمـان مناسـب و ریـشه‌کنـی و حـذف عوامـل قـارچی روش بـسیار سودمندی می‌باشد تا بدین ترتیب از مصرف بی رویه داروها و بالطبع از ایجاد مقاومت‌های دارویی ثانویه و ناخواسته جلوگیری شود(۱۴ و ۹).

بـا توجـه بـه نتـایج بـه دسـت آمـده از روش انتشار دیسک می‌توان ادعا نمـود کـه در ارزیـابی اثـر بخشی داروهای ضد قـارچی، در صـورت اسـتفاده از دیـسک‌هـای مـورد تأییـد اسـتانداردهای بـین المللـی، روشـی قابـل اطمینـان و کـم هزینـه در کلیـه آزمایشگاه‌های تـشخیص طبـی مـی‌باشـد. هـدف ایـن مطالعـه بررسـی ژن CDR2 در سـویه‌هـای کاندیـدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول در بیماران ایدزی مبتلا بـه کاندیدیازیس دهانی ـ حلقی بـه روش واکـنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس بود.

این مطالعه نشان داد کـه بـا اسـتفاده از روش انتشار دیسک میزان مقاومـت بـه داروی فلوکونـازول در ۶۶ سـویه کاندیـدا آلبیکـنس جـدا شـده از بیمـاران ایدزی، ۲۴/۳ درصد بود. این امر نشان می‌دهد میانگین میـزان مقاومـت بـه ایـن دارو در بیمـاران مبـتلا بـه کاندیدیازیس دهانی علی رغم جذب مناسـب گوارشـی بالا می‌باشد. در مجموع، تحقیق حاضـر نـشان داد کـه آزمایش حساسیت دارویی گام اول و ضروری جهـت انتخاب داروی مناسب برای درمان انواع کاندیدیازیس است، تا بدین ترتیـب از مـصرف بـی رویـه داروهـا و ایجاد مقاومت دارویی ناخواسته جلوگیری شود.

امـروزه تکنیـکهـای مولکـولی بـه علـت اختصاصیت و حساسیت بالا بسیار مورد توجه قـرار گرفته‌انـد و بیولـوژی مولکـولی علـم قـارچ‌شناسـی را هماننـد سـایر علـوم متحـول سـاخته اسـت. گـسترش واکنش زنجیره‌ای پلـی‌مـراز بـه عنـوان روشـی بـرای بررسی الگوی بیان ژن‌ها و تشخیص مقادیر کم نمونه

الگو، حساسیت روش‌های بررسی بیان ژن‌ها را متحول کرده است. بادی و همکاران(۲۰۰۹) حساسیت ۱۷۲ ایزوله کاندیدا آلبیکنس را نسبت به فلوکونازول با روش مایکرودایلوشن براث ارزیابی نمودند. تعداد ایزوله کاندیدا آلبیکنس مقاوم به دارو ۹ عدد گزارش شد (۱۸). در مطالعه صالح(۲۰۰۸) حساسیت ۱۰۷ ایزوله کاندیدا آلبیکنس به داروی فلوکونازول با روش دیسک دیفیوژن ارزیابی شد، که ۲۶/۱ درصد از ایزوله‌های مورد بررسی به داروی فلوکونازول مقاوم بودند(۱۹). یان و همکاران[۱](۲۰۰۸) در مطالعه خود ژن‌های متعددی مانند CDR2، ERG11، MDR1 را عوامل ایجاد کننده مقاومت در سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول عنوان کردند(۲۰). فراد و همکاران[۲](۲۰۰۴) اظهار داشتند، جهت بررسی ژن‌های مقاومتی مانند CDR2 حساسیت و اختصاصیت روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس و هیبریداسیون پروب نشاندار[۳] از روش نورترن بلات[۴] بیشتر است(۲۱).

در این تحقیق از سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول که دارای ژن‌های مقاومتی متعددی از جمله CDR2 می‌باشد و همچنین از سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس حساس به فلوکونازول استفاده شد. جهت شناسایی و ارزیابی سویه‌های بالینی مقاوم به فلوکونازول، الگوی الکتروفورزی باندهای سویه‌های بالینی با الگوی الکتروفورزی باندهای سویه‌های استاندارد حساس و مقاوم مقایسه شد. در مجموع از نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس توانایی شناسایی سریع، صحیح و قابل اعتماد ایزوله‌های مقاوم به عوامل ضد قارچی را دارا می‌باشد. با وجود این مطلوب آن است که از روش فنوتیپی انتشار دیسک با هزینه کمتر و امکان شناسایی تعداد زیادی نمونه در هر آزمایش همراه با روش‌های ژنوتیپی مانند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس با امکان بررسی مکانیسم‌های مقاومت دارویی و ژن‌های دخیل در آن استفاده شود.

تقدیر و تشکر

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

1-Yan et al
2-Frade et al
3-Fluorescent Probe Hybridization
4-Northern Blot

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

Farahbakhsh E[*], Yadegari MH[**], Rajabi Bazl M[***], Taghizadeh Armaki M[*].

[*]MSc in Medical Mycology, Department of Medical science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[**]Associate Professor of Medical Mycology, Department of Medical science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[***]Assistant Professor of Clinical Biochemistry, Department of Medical Science, Shaheed Beheshti Medical University, Tehran, Iran.

Received: 12/03/2011
Accepted: 11/05/2011

Corresponding Author:Yadegari MH
Email: Yadegarm@modares.ac.ir

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Nowadays, opportunistic fungi especially Candida 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 to evaluate the CDR2 gene in C.albicans azole resistant strains, isolated from AIDS patients with oropharyngeal candidiasis by RT-PCR method.

Materials & Methods: The present experimental study was conducted at Tarbiat Modares University of Medical Sciences in 2009. C. albicans isolates from HIV infected patients were identified by standard procedures, including germ tube formation, clamidospor and color of colonies on CHROM agar. At first, susceptibility of C. albicans isolates was assessed by disk diffusion agar technique. Then, CDR2 resistance gene was analyzed by RT-PCR and electrophoresis of the PCR products. Finally, patterns of the resulted bands were compared with standard fluconazole resistant strains. The collected data was analyzed using the SPSS software.

Results: The results of drug sensitivity of 66 C. albicans isolates from AIDS patients revealed that 62.6% were susceptible, 8.6% were susceptible-dose dependent (SDD) and 28.7% were resistant. In RT-PCR analysis, 6% of patients had the CDR2 gene.

Conclusion: The use of phenotypic methods like disk diffusion agar, which is cheaper, along with genotypic methods, like RT-PCR, which provide the possibility of studying the mechanism of drug resistance, is recommended.

Key words: Candida albicans, CDR2 gene, RT-PCR

REFERENCES:

1.Neppelenbroek KH, Campanha Nh, Spolidorio DMP, Spolidorio LC, Seó RS, Pavarina AC. Molecular fingerprinting Methods for discrimination between C. albicans and C. dubliniensis. Mycoses 2006; 12: 242-253.
2.Mirhendi H, Makimurak A, Khoram zade M, Yamaguchi H. A one-Enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically Important Candida species. Jpn J Med Mycol 2006; 47: 225-9.
3.Casalinuovo IA, Francesco PD, Garaci E . Fluconazole resistance in Candida albicans: a review of mechanism. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2004; 8 (2): 69-77.
4.Fichtenbaum CJ, Koletar S, Powderly WG .Refractory mucosal candidiasis in advanced human immunodeficiency virus infection. Clin Infect Dis 2000; 30: 749-56.
5.Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med 1981; 305:1425-31.
6.Revankar SG, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Dib OP, Fothergill AW, Redding SW, et al. Detection and significance of fluconazole resistance in oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. J Infect Dis 1996; 174:821–7.
7.Redding S, Smith J, Farinacci G, Rinaldi M, Fothergill A, Rhine- Chalberg J, et al. Resistance of Candida albicans to fluconazole during treatment of oropharyngeal candidiasis in a patient with AIDS: documentation by in vitro susceptibility testing and DNA subtype analysis. Clin Infect Dis 1994; 18:240–2.
8.Franz R, Kelly S, Lamb DC, Kelly D, Ruhnke M, Morschha J. Development of fluconazole resistance in clinical Candida albicans strains. Antimicrob. Agents Chemother1998; 42: 3065–3072.
9.White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev 1998; 11:382–402.
10.Sanglard D, Odds FC. Resistance of Candida species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis 2002; 2:73–85.
11.Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol 1992; 8:67–113.
12.Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Cloning of Candida albicans genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. Microbiology 1997; 143:405–416.
13.Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, Jenkinson HF. Multiple efflux mechanisms are involved in Candida albicans fluconazole resistance. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40:2835–41.
14.Coste AT, Karababa M, Ischer F, Bille J, Sanglard D. TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of Candida albicans ABC transporters CDR1 and CDR2. Eukaryot Cell 2004; 3:1639–52.
15.Dunn B, Wobbe RC. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons Inc 1992; 13(3):1-9.
16.Troillet N, Durussel C, Bille J, Glauser MP,Chave JP. Correlation between in vitro susceptibility of Candida albicans and fluconazoleresistant oropharyngeal candidiasis in HIVinfected patients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis 1993; 12: 911 – 5.
17.White TC, Marr KA, Bowden R A**.** Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol 1998; Rev. 11**:**382–402.
18.Badiee P, Alborzi A,Shakiba E, Ziyaeyan M,Rasuli M.Molecular Identification and In-Vitro Susceptibility of Candida albicans and C. dubliniensis Isolated from Immunocompromised Patients. Iranian Red Crescent Medical Journal 2009;11(4):391-397.
19.Saleh A**K.** 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 Journal of Biological Sciences 2008; 15(2): 189-98.
20.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.
21.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; 2085–93.