تحقیقی

دارای رتبه علمی–پژوهشی
ازکمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

مقایسه بیان ژن لیپازکاندیدا آلبیکنس مقاوم و حساس به فلوکونازول جدا شده ازبیماران مبتلا به کاندیدیازیس دهانی و واژنی

آیت نصرالهی عمران
دانشیار قارچ شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، ایران
علی ناظمی
استادیار ژنتیک، دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، ایران
شهربانو کیهانیان
دانشیار خون و انکولوژی، گروه انکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، ایران
ناهید آریانا
کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، ایران
نویسنده مسئول: آیت نصرالهی عمران
پست الکترونیک: ayat51@yahoo.co.in
تلفن : ۰۹۱۱۳۷۵۳۴۲۹
آدرس: دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، ایران

دریافت: ۹۳/۱/۱۶
ویرایش پایانی: ۹۳/٤/۲۸
پذیرش: ۹۳/۴/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: *به دنبال افزایش مقاومت دارویی در قارچ ها افزایش قابل ملاحظه مقاومت گونه های کاندیدا آلبیکنس نسبت به فلوکونازول مشاهده می شود. مطالعات ملکولی برای تعیین ارتباط این مقاومت دارویی با افزایش بیان ژن آنزیم های تولیدشده در جدایه های کاندیدایی مقاوم به دارو در حال پیشرفت است. این مطالعه به دنبال یافتن ارتباط بیان ژن لیپاز۸ خارج سلولی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به کاندیدیازیس، با مقاومت یاحساسیت به فلوکونازول بود.*

روش بررسی: *آزمون حساسیت دارویی بر روی مخمرهای کاندید آلبیکنس شناسایی شده از کاندیدیازیس دهانی و واژنی نسبت فلوکونازول جهت تعیین گونه های مقاوم و حساس مطابق با روش CLSI صورت گرفت. برای بررسی مقایسه ای بیان این ژن در گونه های حساس و مقاوم واکنش RT real_time PCRانجام شد.*

یافته ها: *از۴۶ موردکاندیدا آلبیکنس جدا شده، ۲۰ جدایه حساس، ۱۲ جدایه نیمه حساس و ۱۴ جدایه مقاوم به فلوکونازول شناسایی شدند. پس از انجام واکنش PCRنتایج نشان داد که بیان این ژن در جدایه های حساس به فلوکونازول متوسط بوده در حالی که در جدایه های مقاوم به فلوکونازول بیان این ژن، بالا بود.*

نتیجه گیری: *نتایج حاصل از بیان ژن لیپاز ۸نشان داد که بیان بیش از حد بعضی از ژن های آنزیم های مسئول حدت کاندیدا، ممکن است در ایجاد مقاومت به فلوکونازول نیز نقش داشته باشند.*

واژه های کلیدی: *کاندیدیازیس، بیان ژن لیپاز، REAL-TIME PCR، فلوکونازول*

آدرس مقاله
نصرالهی عمران آ، ناظمی ع، کیهانیان ش، آریانا ن" مقایسه بیان ژن لیپازکاندیدا آلبیکنس مقاوم و حساس به فلوکونازول جدا شده ازبیماران مبتلا به کاندیدیازیس دهان و واژنی" مجله علوم آزمایشگاهی، زمستان ۱۳۹۳، دوره هشتم (شماره ۵): ۹۰-۹۶

مقدمه

کاندیدیازیس یکی از شایع ترین عفونت های قارچی ایجاد شده توسط گونه های فرصت طلب کاندیدا می باشد که به طور عمده کاندیدا آلبیکنس در ایجاد آن نقش اساسی دارد. کاندیدا آلبیکنس اغلب به تعداد کم در دهان وجود دارد، اما عوامل خاصی ممکن است باعث تکثیر بیش از حد آن شوند. درمان با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف ممکن است تعادل طبیعی ارگانیسم ها را در دهان برهم زده و باعث تکثیر کاندیدا و ایجاد برفک دهانی شوند(۲،۱). در بیمارانی مبتلا به اختلالات اندوکرین به خصوص دیابتیک‌ها و کسانی که به مدت طولانی مدت از آنتی بیوتیک‌ها استفاده می کنند، با به هم خوردن فلور طبیعی واژن، کاندیدیازیس واژنی بیشتر دیده می شود. مصرف استروئیدها، کمبود ویتامین ها، عوامل عامل سرکوب کننده ایمنی، مصرف سایتوتوکسین‌ها و سایر داروها نیز می‌تواند باعث بروز کاندیدیازیس واژنی شوند(۴،۳). اثرات ضد متابولیک شیمی درمانی موجب از کار افتادن دفاع میزبان و در نتیجه، ایجاد زخم در دهان و تهاجم میکروب های موجود در آن می شود. این عفونت ها می تواند از راه دهان و لوله گوارش وارد جریان خون شده و در نهایت منجر به سپتی سمی و تهدید حیات در این بیماران شود. میزان کلنیزاسیون کاندیدا در دهان افراد تحت شیمی درمانی و مقاوم به داروهای ضد قارچی رایج، نشان می دهد که با توجه به گسترش شدت عفونت و افزایش مرگ و میر ناشی از آنها، این افراد نیاز به توجه بیشتری دارند(۶،۵). فلوکونازول یکی از داروهای انتخابی در درمان چنین عفونت های قارچی است که افزایش میزان شیوع کاندیدا ی مقاوم به این دارو، مشکلات عدیده ای را در این بیماران ایجاد کرده است(۷). مطالعات نشان می دهد که درمان ضد قارچی نامناسب و خود درمانی می تواند دلیل اصلی افزایش مقاومت دارویی در گونه های کاندیدایی باشد(۸). افزایش مقاومت در برابر فلوکونازول، مانع درمان موثر کاندیدیازیس عفونی و بدخیم می شود. چند مورد ازمکانیسم های ملکولی ایجاد مقاومت های دارویی به فلوکونازول در کاندیدا آلبیکنس شناسایی شده است. یکی از این مکانیسم ها شامل بیان بیش از اندازه تعدادی از ژن های پمپ کننده مواد به خارج می باشدکه عملکرد این ژن ها منجر به کاهش تجمع دارو در سلول های جدایه های مقاوم به دارو می شود. دلیل دیگر مقاومت به فلوکونازول بیان بیش از حد ژن هایی باشد که در بیماری زایی نقش دارند (۱۰،۹). علاوه بر این ها مستندات دیگری نیز وجود دارد که نشان دهنده رابطه مقاومت به فلوکونازل با بیان بیش از حد بعضی از ژن های فسفولیپاز یا لیپاز یا بقیه آنزیم های کاندیدایی می باشد(۱۱). اگرچه ترشح آنزیم های لیپولیتیک از میکروارگانیسم های بیماری زا به عنوان فاکتور بیماریزایی بوده و به طور غالب در دوره عفونت مورد بحث می باشد ولی اطلاعات کمی نسبت به آنزیم لیپاز در بیماری زایی قارچ ها وجود دارد. به تازگی تولید فسفولیپازها و نحوه اثر آنها در ارتباط با بیماری زایی این مخمر مورد توجه قرارگرفته و این ارتباط نیز در برخی پژوهش ها به اثبات رسیده است. با این وجود بیان ژن های آنزیم های ترشحی دیگری مثل آسپارتیل پروتئیناز و هیدرولاز کاندیدا یی به عنوان عوامل بیماری زایی این مخمر گزارش شده است (۱۳،۱۲). ترشح آنزیم لیپاز که بیان آنها از طریق کمتر از ۱۰ ژن (Lip10- Lip1) کد بندی می شوند همسو با این بررسی ها با استفاده از RT-PCR در نمونه های کاندیدایی مقاوم به فلوکونازول، هدف این مطالعه بوده است. تایپینگ ملکولی برای این پیگیری و تعیین ارتباط مقاومت یا حساسیت به فلوکونازول با بیان ژن لیپاز در جدایه های کاندیدایی جدا شده از بیماران فوق کاری نو می باشد.

روش بررسی

در این مطالعه تحلیلی- مقطعی نمونه های مشکوک مخمری از افراد مشکوک به کاندیدیازیس دهان و واژنی مراجعه کننده به مراکز درمانی شهرستان های تنکابن و رامسر و با تایید پزشک متخصص تهیه شدند. کشت نمونه ها با استفاده از سوآب بر روی محیط سابورود دکستروز آگار (SDAشرکت Merck) حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل انجام شد. نگهداری پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباسیون و دمای ۳۵ درجه سانتیگراد صورت پذیرفت. مشاهده کلنی های رشد یافته مشکوک به مخمرکاندیدا از طریق آزمایش میکروسکوپی و جداسازی آنها از کشت مجدد و پاساژهای متوالی انجام گرفت. در صورت اثبات مخمری بودن کلنی

های رشد یافته مطابق با روش های استاندارد، کاندیداهای جدا شده تعیین هویت شدند. با انجام آزمون لوله زایا، تشکیل کلامیدیوسپور در محیط کورن میل آگار حاوی ۱ درصد توین ۸۰ و کشت در محیط کروم آگار نیز تشخیص نهایی مخمر کاندیدا آلبیکنس انجام شد. برای افتراق این مخمر با گونه دابلینسیس آزمون بتا گالاکتوزیداز انجام شد. برای مخمرهای کاندیدا آلبیکنس جدا شده فوق، آزمون حساسیت برای بررسی مقاوم یا حساس بودن آن نسبت به داروی فلوکونازول به روش استاندارد Broth Microdilution مطابق دستورالعمل M-27-A2, NCCLS انجام شد(۱۴). به منظور تهیه محلول ذخیره (Stock) ۲۵۶ میکروگرم درمیلی لیترفلوکونازول، مقدار ۱/۳میلی گرم پودر خالص فلوکونازول رادر ۱۰/۱ میلی لیتر آب مقطر استریل حل کرده و تا موقع استفاده از آن، این محلول را در منفی۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. جهت رقیق سازی محلول های ذخیره دارویی ازمحیط کشت RPMI1640 استفاده شد. برای تهیه این محیط کشت، ۱۰/۴ گرم از پودرRPMI1640 در یک لیتر آب مقطر دو بار استریل ریخته سپس آنتی بیوتیک های پنی سیلین ۱۰۰(واحد بر میلی لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰میکروگرم بر میلی لیتر) به این به محیط اضافه شد. محیط کشت آماده شده با استفاده از فیلتر ۰/۴میکرون در زیر هود بیولوژیکی استریل شدند. سپس PH محیط با استفاده از NaOH یک نرمال و با استفاده از کاغذ PH متر به ۷ رسانده شد. محیط به دست آمده در ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ماه نگهداری شد. جهت انجام آزمون میکرودیلوشن مطابق با روش استاندارد، ۱۰رقت دارویی از فلوکونازول ذخیره گردید. مطابق با جداول استاندارد رقت ها از ۶۴ تا ۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد(۱۴). ابتدا کاندیداهای مورد مطالعه را بر روی محیط سابورد دکستروز آگار کشت داده و در دمای ۳۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس از مخمر رشد یافته سوسپانسیون در لوله ی در پیچ دار حاوی سرم فیزیولوژی استریل تهیه کرده و غلظت سوسپانسیون مخمرها با استفاده از غلظت استاندارد نیم مک فارلند سنجیده شد (۱۴). برای انجام آزمون میکرو دایلوشن ۱۰۰میکرولیتر از داروی مورد نظر به درون حفرات ۲ تا۱۱ میکروپلیت های ۹۶ خانه ای افزوده به طوری که حفره ی اول دارای بیشترین غلظت دارو و حفره ی ۱۰ حاوی کمترین غلظت دارو بود. سپس به هریک از حفره ها ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی مخمری فوق اضافه شد. حفره دوازدهم که کمترین غلظت دارویی را داشت به عنوان حفره کنترل منفی(حفره فاقد ارگانیسم) و حفره اول به عنوان حفره کنترل مثبت (حفره فاقد دارو) در نظر گرفته شده بود. مشابه مراحل ذکر شده فوق برای تهیه سوسپانسیون مخمری تا انجام آزمون برای سوش استاندارد کاندیدا آلبیکنس(ATCC)۱۰۲۳۱ نیز انجام گرفت. میکروپلیت ها در دمای ۳۵°c به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. پایین ترین غلظت دارویی که قارچ بعد از این مدت در آن رشد نداشت، MIC۹۰ بود یعنی در آن رقت حساسیت به فلوکونازول وجود دارد. میزان رشد در مقایسه با حفره ی کنترل مثبت که فاقد هرگونه دارو بوده و همچنین با حفره ی کنترل منفی که فاقد ارگانیسم است سنجیده شد. MIC کمتر از ۸ میکروگرم در میلی لیتر به عنوان سویه حساس، MIC بین ۸ تا ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر به عنوان سویه حساس وابسته به دوز دارو و MIC بزرگتر از ۶۴ میکروگرم در میلی لیتر به عنوان سویه مقاوم به دارو در نظر گرفته شدند(۱۴). برای جداسازیRNA جهت بیان ژن لیپاز، ابتدا نمونه های حساس و مقاوم کاندیدا آلبیکنس را در محیط کشت سابورودکستروز براث (SDAشرکت Merck)کشت و به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور شیکردار۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته و بعد از رشد مخمر در این محیط به نسبت ۱/۱ به آن محیط کشت تازه افزوده و آن را مجدداً درون انکوباتور شیکردار به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد. استخراج RNA با استفاده از روش کیت استخراج RNA(شرکت INTRON) انجام شد(۱۳،۹). واکنش *RT PCR* در حجم نهایی µl۵۰ شامل ۲۰ پیکومول پرایمر معکوس،۰/۳ میلی مولdNTP ها، ۵۰ میلی مول منیزیم ۴ میلی مولار، ۴۰۰ یونیت آنزیم RT، بافر آنزیم1X،RNA الگو ۶۰۰ نانو گرم در دمای۴۲ درجه به مدت یک ساعت تهیه گردید. واکنش *RT real-time PCR* در حجم نهایی µl۲۵ , شامل۱۰ پیکومول از پرایمرها، ۰/۲ میلی مول dNTP ها، ۲/۵ واحد آنزیم DNA پلی مراز مقاوم به حرارت(Fermentas)، ۰/۲ میکرو مول و *Cyto9 (Invitrogen compony)* ,منیزیم ۲

میلی مولار و ۵ میکرو لیتر از cdna و مرحله RT در شرایط دمایی $95^{\circ}C$ ۹۵ بـه مـدت ۳ دقـیـقـه، سپس ۳۵ سیکل، $95^{\circ}C$ ۹۵ به واکنش توسط نرم افزار Rotrogene 6000 (Qiugen) آنالیز گردید(۱۶،۱۵).

جدول۱- پرایمرهای استفاده شده(۱۵)در واکنش *RT REAL-TIME PCR*

gene	sequence(5'→3')	PCR amplicon size(bp)
Lip8	Forward Primer : F AGAGTGATACAGACAAAAAATCAG Reverse Primer : R AAGACCATTCAGCATCATGGTG	521

یافته ها

با بررسی کشت ۵۲ نمونه کلینیکی مشکوک به واژنیت میکروبی و ۲۰ نمونه مشکوک به *کاندیدیازیس* دهانی، ۴۶ نمونه به عنوان کاندیدا آلبیکنس و ۵ مورد گونه های غیر آلبیکنس شامل کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا کروزئی شناسایی شدند. از تعداد ۴۶ جدایه بالینی *کاندیدا آلبیکنس* شناسایی شده ۱۴ نمونه مقاوم، ۲۰ نمونه حساس و ۱۲ نمونه نیمه حساس به فلوکونازول بودند. واکنش RT real-time PCR برای ژن Lip8 در جدایه های کاندیدا آلبیکنس مقاوم و حساس با استفاده از تکنیک probe free و رنگ فلورسنت CYTO9 نشان داد که در جدایه های حساس بیان این ژن متوسط بوده در حالی که در جدایه های مقاوم به فلوکونازول بیان این ژن، بیشتر بود.

بحث

در این مطالعه از مجموع ۷۲ نمونه بالینی ۴۶ مورد (۶۴٪) به عنوان کاندیدا آلبیکنس شناسایی شدند. Akpan و همکاران در یک بررسی اجمالی بر روی *کاندیدیازیس* دهانی در افراد سرطانی نتیجه گرفتند پروفیلاکسی با داروهای ضد قارچی می تواند منجر به کاهش بروز و شدت بیماری شود و کاندیدا آلبیکنس را از این بیماران جدا نمودند(۱). در بررسی Ramirez-Amador و همکاران گزارش گردید که رادیوتراپی می تواند منجر به کلنیزاسیون کاندیدا در دهان افراد سرطانی و ایجاد کاندیدیازیس دهانی شود. از ۴۶ بیمار دچار سرطان حلق، در حین و بعد از رادیوتراپی شیوع *کاندیدا آلبیکنس* ۴۳ درصد، در زمان رادیوتراپی ۶۲ درصد و پس از گذشت زمان ۷۵ درصد گزارش گردید(۶). Gravina و مدت ۴۰ ثانیه، $62^{\circ}C$ به مدت ۴۰ ثانیه، $72^{\circ}C$ به مدت ۴۰ثانیه و تک مرحله $72^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه در انتها اجرا گردید و همکاران در سال۲۰۰۷ در نمونه برداری مستقیم از زخم های کودکان بیماران سرطانی مبتلا به کاندیدیازیس دهانی، حضور کاندیدا آلبیکنس را ۶۹/۳۵ درصد و به دنبال آن کاندیدا تروپیکالیس ۷۷/۱۲ درصد، کاندیدا پاراپیلوزیس ۱۴/۸۹ درصد، کاندیدا کروزه ای ۲۶/۴درصد، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا لوزیتانیا ۲/۱۳ درصد را گزارش کردند(۱۷). در بررسی Abu-Elteen از۸۶ نمونه تهیه شده از دهان ۹۵ بیماران سرطانی، ۷۲ درصد گونه کاندیدا شناسایی گردیدند که شامل ۳۰ *درصد کاندیدا آلبیکنس*، ۲۲ درصد *کاندیدا گلابراتا* ۵ *درصد کاندیدا تروپیکالیس* و۱۲ *درصد کاندیدا پارا پسلیوزیس* بودند(۱۸). با توجه به تشابه نتایج مطالعات فوق و نتایج به دست آمده از این بررسی جداسازی کاندیدا از این افراد قابل اثبات است. پس از شناسایی جدایه ها و با انجام آزمون حساسیت مشخص گردید که از ۴۶ مورد جدایه های *کاندیدایی*،۲۰ جدایه حساس به داروی فلوکونازول، ۱۲ نمونه حساس وابسته به دوز، ۱۴ نمونه مقاوم به فلوکونازول بودند. Lee در تحقیقات خود پس از انجام روش MIC برای داروی فلوکونازول از ۱۲ جدایه کاندیدا آلبیکنس، ۷ نمونه را حساس ۳ نمونه حساس وابسته به دوز و۲ نمونه را مقاوم گزارش کرد که با تحقیق ما مطابقت دارد. Redding و همکاران به بررسی تنوع سویه های مقاوم به فلوکونازول *کاندیدا آلبیکنس* در جمعیت هایی با عفونت کاندیدایی درمان شده با فلوکونازول با انجام آزمون های ملکولی و حساسیت دارویی ضد قارچی نشان دادند که در اغلب بیماران سویه های کاندیدایی مشابه بوده تنها در یک بیمار، یک سویه جدید با میزان بالای شیوع بالا وجود داردکه مشابه این کار بود(۱۱). در این تحقیق بیان ژن لیپاز ۸ در

جدایه های *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم و حساس به فلوکونازول بررسی شد. مقایسه ی میزان بیان این ژن ها در جدایه های مقاوم و حساس با یکدیگر با استفاده از روش Real Time RT-PCR که روشی بسیار دقیق و پیشرفته می باشد، انجام شد. نتایج به دست آمده از واکنش real time RT- PCR برای بیان مقایسه ای ژن Lip8 در جدایه های حساس و مقاوم کاندیدا آلبیکنس نشان داد که پس از انجام این واکنش نتایج بیان ژن Lip8 در جدایه های کاندیدا آلبیکنس حساس به فلوکونازول با بیان متوسطی بوده در حالی که در جدایه های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول بیان این ژن ها، بیشتر بود. در بررسی خانواده ژن لیپاز به طور متفاوت در تراز mRNA در محیط های کشت متفاوت بیان می شوند. توانایی نشان دادن بیان بعضی از این ژن ها از طریق RT–PCR می تواند در شرایط محیطی متفاوت القا شود. بررسی میزان بیان ژن لیپاز در عفونت زایی کاندیدا آلبیکنس در حالات بالینی مختلف به شکل تجربی نشان دهنده این است که افزایش میزان بیان ژن لیپاز در مرحله عفونت زایی این مخمر نقش آن را در بیماری زایی بیشتر نشان می دهد. در تحقیق Lan مشخص گردید که بیان بیش از حد ژن لیپاز ۵ در بیماری زایی نقش دارد(۱۹). Gallè و همکاران در بررسی خود نقش مستقیم ژن های CDR1, CDR2 and MDR1 با مقاومت به فلوکونازول در کاندیدا را طریق روشRT-PCR گزارش کردند(۲۰). Gygax همکاران با هدف توسعه کمی سنجش حساسیت آزولی RT-PCR برای ایزوله‌های واژینال *کاندیدا گلابراتا* مقاوم به فلوکونازول، روش سنجش کمی PCR معکوس را انجام دادند و منجر به یافتن مقاومت آزولی در *کاندیداگلابراتا* جدا شده تا حدود ۱۰۰ درصد حساس شدند(۲۱). در بررسیGa´cser بیان ده نوع لیپاز تولید شده توسط گونه های کاندیدا به روش RT-PCR گزارش گردید. این آنزیم نقش مهمی در بیماری زایی داشته و به عنوان فاکتور حدت کاندیدا بوده و بیان ژنی بسیار بالا در مطالعات ملکولی داشته است(۲۲). در تحقیق Lee با روش ملکولی PCR based taq man و با استفاده از رنگ فلورسنت cyto9 گزارش گردید که دلیل استفاده از این روش بسیارعالی، توان عملیاتی بسیار بالا در توالی یابی و هیبرید کردن اطلاعات ذوب شده و با حساسیت و اختصاصیت بالا می باشد(۴). Stehrدر سال ۲۰۰۳ با بررسی بیان ژن های خانواده لیپاز در عفونت تجربی، بیان این ژن را وابسته به مرحله عفونت زایی در مدل تجربی *کاندیازیس* دهانی دانست(۱۵).Lyon و همکاران در بررسی ارتباط بین تولید آنزیم و حساسیت به فلوکونازول در *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده افراد استفاده کننده از پروتز دهانی در حفره دهانی ۹۵ بیمار سرطانی نشان دادند که در حضور فلوکونازول، اتصال *کاندیدا آلبیکنس* به سلول های اپیتلیال کاهش می یابد(۲۳).

نتیجه گیری

مقاومت به فلوکونازول می تواند در نتیجه افزایش بیان ژن کد کننده آنزیم لیپاز ۸ درگونه های کاندیدایی مقاوم به فلوکونازول می باشد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر طرح پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن بوده و هزینه های مالی انجام مطابق قرارداد شماره ۷۵۶۹ مورخ ۱۳۹۱/۴/۱۱ توسط معاونت پژوهشی این دانشگاه تامین گردید. نویسنده مسئول این مقاله مجری طرح بوده و بدین وسیله مجری و همکاران مراتب احترام و قدردانی خود را نسبت به کلیه همکاران وکارکنان آزمایشگاه میکروب شناسی و ژنتیک این واحد دانشگاهی به دلیل همکاری های انجام یافته با اجرای این تحقیق را اعلام می دارند.

References

1. Akpan A, Morgan R. *Oral candidiasis*. Postgrad Med J. 2002; 78(922): 455-9.

2. Antonopoulous S, Aoun M, Alexopoulos EC, Baka S, Logothetis E, Kalambokas T, et al. *Fenticonazole activity measured by the methods of the EuropeanCommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing and CLSI against 260 Candida vulvovaginitis isolates from two European regions and annotations on the prevalent genotypes*. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(5): 2181-2184.

3. Odds FC, Jacobsen MD. *Multilocus Sequence Typing of Pathogenic Candida Species.* Eukaryot Cell. 2008; 7(7): 1075-84.

4. Chong PP, Lee YL, Phan CL, Tan BC, Seow HF. *Genotyping and resistance profile of Candida spp.in recurrent and one-off vaginitis and high association of non-albicans species with non-pregnant status*. Infect Genet Evol. 2007; 7(4): 449-50.

5. Fan SR, Liu XP, Li JW. *Clinical characteristics of vulvovaginal candidiasis and antifungal susceptibilities of Candida species isolates among patients in southern China from 2003 to 2006*. Obstetrics and Gynaecology Research. 2008; 34(4): 561-6.

6. Ramirez-Amador V, Silverman S, Mayer P, Tyler M, Quivey J. *Candidal colonization and oral candidiasis in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy*. Oral Radiology and Endodontology**.** 1997; 84(2): 149-153.

7. Cirak MY, Kalkanci A, Kustimur S. *Use of Molecular Methods in Identification of Candida Speciesand Evaluation of Fluconazole Resistance*. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2003; 98(8): 1027-1032.

8. Moran GP, Sanglard D, Donnelly SM, Shanley DB, Sullivan DJ, Coleman DC. *Identification and Expression of Multidrug Transporters Responsible for Fluconazole Resistance in* Candida dubliniensis. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42(7): 1819-18.

9. Sun J, Qi C, Lafleur MD, Qi QG. *Fluconazole Susceptibility and Genotypic Heterogeneity of Oral Candida albicans Colonies from the Patients with Cancer Receiving Chemotherapy in China*. Int J Oral Sci. 2009; 1(3): 156-62.

10. Li RY, Li DM, Yu J, Liu W, Ji ZH, Wang DL. *Application of molecular biology techniques in identification of pathogenic fungi and the diagnosis of fungal infection*. Beijing Da Xue Xue Bao. 2004; 36(5): 536-9.

11. Redding SW, Zellars RC, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Caceres MA, Fothergill AW. *Epidemiology of Oropharyngeal* Candida*Colonization and Infection in Patients Receiving Radiation for Head and Neck Cancer*. J Clin Microbiol. 1999; 37(12): 3896-900.

12. Shen DK, Noodeh AD, Kazemi A, Grillot R, Robson G, Brugère JF. *Characterisation and expression of phospholipases B from the opportunistic fungus Aspergillus fumigatus*. FEMS Microbiol Lett. 2004; 239(1): 87-93.

13. Ying S, Chunyang L. *Correlation between phospholipase of Candida albicans and resistance to fluconazole.* Mycoses. 2012; 55(1): 50-5.

14. NCCLS. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; ap-proved standard NCCLS document M27–A2*. Wayne (PA): National Committee for Clini-cal Laboratory Standards. 2012.

15.Stehr F, Felk A, Gácser A, Kretschmar M, Mähnss B, Neuber K, et al. *Expression analysis of the Candida albicans lipase gene family during experimental infections and in patient sample*. FEMS Yeast Research. 2004; 4(4-5): 401-8.

16. Metwally L, Hogg G, Coyle PV, Hay RJ, Hedderwick S, McCloskey B, et al.*Rapid differentiation between fluconazole- sensitive and -resistant species of Candida directly from positive blood-culture bottles by real-time PCR.* J Med Microbiol. 2007; 56(Pt 7): 964-70.

17. González Gravina H, González de Morán E, Zambrano O, Lozano Chourio M, Rodríguez de Valero S, Robertis S. *Oral Candidiasis in children and adolescents with cancer . Identification of Candida spp.* Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2007; 12(6): E419-23.

18. Al-Abeid HM, Abu-Elteen KH, Elkarmi AZ, Hamad MA. *Isolation and Characterization of Candida Spp. in Jordanian Cancer Patients:Prevalence, Pathogenic Determinants, and Antifungal Sensitivity*. Jpn J Infect Dis. 2004; 57(6): 279-284.

19. Lan DM, Yang N, Wang WK, Shen YF, Yang B, Wang YH. *A Novel Cold-Active Lipase from Candida albicans: Cloning, Expression and Characterization of the Recombinant Enzyme.* Int J Mol Sci. 2011; 12(6): 3950-65.

20. Morschhäuser J. *The genetic basis of f luconazole resistance development in Candida albicans.* Biochim Biophys Acta. 2002; 1587(2-3): 240-8.

21. Gygax SE1, Vermitsky JP, Chadwick SG, Self MJ, Zimmerman JA, Mordechai E, et al. *Antifungal resistance of candida glabrata vaginal isolates and development of a quantitiver RT-PCR-based azole susceptibility assay.* Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(9): 3424-6.

22. Ga´cser A, Stehr F, Kroger C, Kredics L, Schafer W, Nosanchuk JD. *Lipase 8 Affects the Pathogenesis of Candida albicans.* Infection and Immunity. 2007; 75(10): 4710-1478.

23. Lyon JP, de Resende MA. *Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in Candida albicans obtained from denture wearers*. Oral Radiology and Endodontology. 2006; 102(5): 632-638.

Lipase Gene Expression of Resistant and Sensitive *Candida Albicans* to Fluconazole Isolated from Patients Suffering from Oral Candidiasis and Vaginal Candidiasis

NasrollahiOmran, A. (PhD)
Associat professor of Mycology, Faculty of Biology Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Iran

Nazemi, A. (PhD)
Assistant professor of Genetic, Faculty of Biology Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Iran

Keihanian, SH. (PhD)
Associate Professor of Oncology, Department of Oncology, Faculty of Medicine, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Iran

Aryana, N. (MSc)
MSc of Microbiology, Faculty of Biology Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Iran

Corresponding Author:
NasrollahiOmran, A.

Email: ayat51@yahoo.co.in

Received: 5 Apr 2014
Revised: 19 Jul 2014
Accepted: 21 Jul 2014

Abstract

Background and Objective: With the development of drug resistance in strains of fungi, there is a considerable resistance of *Candida albicans* strains to fluconazole. Molecular studies are developing to determine the relationship of such a drug resistance with the increased gene expression of enzymes produced in drug-resistant Candida isolates. We aimed to evaluate the relationship between extracellular lipase gene (LIP8) expression of *Candida albicans* isolated from candidiasis and sensitivity or resistance to fluconazole.

Material and Methods: Drug susceptibility of *Candida albicans* was performed in oral and vaginal candidiasis to determine the proportion of strains sensitive or resistant to fluconazole using NCCLS method. To evaluate and compare the expression of these genes in the susceptible and resistant strains, RT real-time PCR reaction was used.

Results: Of 46 *Candida albicans*, 20 were susceptible, 12 were semi-susceptible and 14 were resistant to fluconazole. By using PCR reaction, the results showed that the expression of this gene in fluconazole-susceptible isolates was moderate, while it was high in the isolates resistant to fluconazole.

Conclusion: The results of lipase gene (LIP8) expression showed that the additional expression of some genes of the enzymes responsible for virulence of Candida may also play a role in resistance to fluconazole.

Keywords: Candidiasis, Lipase Gene Expression, RT real-time PCR, Fluconazole

This paper should be cited as: NasrollahiOmran A. Nazemi A, Keihanian SH, Aryana N. [Lipase Gene Expression of Resistant and Sensitive Candida Albicans to Fluconazole Isolated from Patients Suffering from Oral Candidiasis and Vaginal Candidiasis]. mljgoums. 2015; 8(5): 90-96[Article in Persian]