REVIEW ARTICLE

Molecular Techniques in Detection of Triazole Resistance Gene Mutations in Common Pathogenic Fungi

Sadegh Khodavaisy[1],
Shahram Mahmoudi[2],
Setareh Agha Kuchak Afshari[2],
Zahra Salehi[3],
Mohammad kord[2],
Hamid Badali[4]

[1] Assistant Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] PhD Student in Medical Mycology, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] PhD Student in Medical Mycology, Department of Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[4] Associate Professor, Department of Medical Mycology and Parasitology, Invasive Fungi Research Center, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 12, 2017 ; Accepted April 10, 2017)

Abstract

Invasive candidiasis and aspergillosis are amongst major medical concerns with high mortality and morbidity in immunocompromised patients. Management of these infections is dependent on early and efficient antifungal therapy, as well as drug resistance monitoring. Decreased sensitivity of these pathogens to antifungal drugs during recent decades, rapid detection of drug resistance in pathogenic fungi is highly recomended. Generally, identification of drug resistance associated mutations requires complicated and expensive methods such as DNA sequencing. However, nowadays application of accurate, fast and highly sensitive techniques, including Rolling Circle Amplification (RCA), PCR-RFLP, Real-Time PCR, and ARMS-PCR provide the possibility for detection of target sequence containing nucleotide polymorphisms even at the one base pair level. In this review we aimed to discuss the usage, advantages and disadvantages of these techniques in order to identify the mutations of the azole-resistant strains.

Keywords: triazole resistance, mutation, molecular tools

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (148):187- 202 (Persian).

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۴۸ اردیبهشت سال ۱۳۹۶ (۲۰۲-۱۸۷)

مروری بر تکنیک های مولکولی در شناسایی سریع موتاسیون های منجر به مقاومت آزولی در قارچ های پاتوژن شایع

صادق خداویسی[۱]
شهرام محمودی[۲]
ستاره آقا کوچک افشاری[۲]
زهرا صالحی[۳]
محمد کرد[۲] حمید بدلی[۴]

چکیده

کاندیدیازیس و آسپرژیلوزیس تهاجمی به عنوان یک معضل بهداشتی منجر به عفونت‌هایی با مرگ و میر بالا در بیماران مستعد با ضعف سیستم ایمنی می‌شوند. مدیریت درمان موفقیت‌آمیز این بیماری‌ها، وابسته به شروع به موقع درمان، انتخاب داروی مؤثر ضد قارچی و شناسایی مقاومت‌های دارویی می‌باشد. با توجه به کاهش حساسیت طیف وسیعی از این پاتوژن‌ها به داروهای ضد قارچی در طول دهه‌های اخیر، شناسایی سریع موتاسیون‌های منجر به مقاومت دارویی در گونه‌های قارچی پاتوژن واجد اهمیت است. عمدتاً مطالعات صورت گرفته جهت شناسایی موتاسیون های منجر به مقاومت دارویی نیازمند روش‌های پیچیده و ابزارهای گران قیمت از جمله PCR و یا تعیین توالی می‌باشد. هرچند که امروزه استفاده از تکنیک‌های دقیق، سریع و با حساسیت بالا از جمله تکثیر دایره‌ای چرخان (RCA)، PCR-RFLP، Real-Time PCR و ARMS-PCR جهت ردیابی توالی هدف شامل پلی مورفیسم‌های نوکلئوتیدی را حتی در حد یک جفت باز فراهم می‌آورد. در مقاله مروری حاضر سعی شده است که نحوه استفاده، مزایا و معایب این تکنیک‌ها در جهت شناسایی موتاسیون‌های احتمالی ایزوله‌های مقاوم به داروهای آزولی مورد بحث قرار گیرد.

واژه های کلیدی: مقاومت دارویی، موتاسیون، روش های مولکولی

مقدمه

عفونت‌های قارچی عمدتاً افراد با نقص سیستم ایمنی را مبتلا کرده و با وجود پیشرفت‌های حاصل شده در زمینه‌ی تشخیص و درمان، عامل مرگ و میر بسیاری از بیماران مستعد می‌باشند(۱). وضعیت سیستم ایمنی فرد در پیشرفت و بروز این عفونت‌ها نقش مهمی دارد. هر چند که به‌طور قابل توجهی وضعیت سیستم ایمنی فرد تعیین‌کننده روند بیماری است، اما شروع درمان ضد قارچی موثر، در کنترل عفونت بسیار مهم می‌باشد(۲). مدیریت درمان موفقیت آمیز این بیماری وابسته به شروع به موقع درمان، انتخاب داروی مؤثر ضد قارچی و عدم مقاومت قارچ به آن می‌باشد. امروزه تری آزول‌ها از جمله فلوکونازول، ایتراکونازول، وریکونازل و پوساکونازول به عنوان داروی پیشنهادی در درمان و پروفیلاکسی بیماران مبتلا به تظاهرات بالینی مختلف ناشی از قارچ ها

مولف مسئول: حمید بدلی– ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، دانشکده پزشکی، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم E-mail:badalii@yahoo.com
۱. استادیار، قارچ شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲. دانشجوی دکتری تخصصی قارچ شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. دانشجوی دکتری تخصصی قارچ شناسی پزشکی، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴. دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۱۱/۲۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۱۱/۲۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۱/۲۱

از جمله گونه‌های کاندیدا و آسپرژیلوس در بیماران دارای زمینه مستعد به این عفونت‌ها استفاده می‌شوند(۳). ترکیبات آزولی عامل مهار آنزیم لانوسترول ۱۴ α-دمتیلاز وابسته به سیتوکروم P-450 قارچی بوده و از تبدیل لانوسترول به ارگوسترول جلوگیری به عمل می‌آورد(۳). تری‌آزول‌ها (ایتراکونازول، وریکونازول و پوساکونازول) در مطالعات آزمایشگاهی علیه گونه‌های آسپرژیلوس و فلوکونازول علیه گونه‌های کاندیدا فعالیت خوبی از خود نشان داده و در حال حاضر به عنوان درمان‌های خط اول برای مدیریت و پروفیلاکسی مطرح می‌باشند(۴). مقاومت به تری‌آزول‌ها به عنوان یک فاکتور محدودکننده در حصول نتایج درمانی مناسب مطرح شده است. هر چند مقاومت به ایتراکونازول در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در اواخر دهه ۱۹۸۰ در ایزوله‌هایی از کالیفرنیا گزارش شد(۵). دهه‌های قبل مقاومت اکتسابی در ایزوله‌های کلینیکی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* نسبت به تری‌آزول‌ها به ندرت دیده می‌شد، در حالی که امروزه شکست درمان به وفور گزارش می‌شود و فراوانی ایزوله‌های مقاوم از جمله *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در چندین کشور افزایش یافته است(۶).

Martinez و همکاران در ایالات متحده برای ایزوله‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* مورد بررسی مقادیر MIC≥ ۸mg/L را در ۱۳ از ۲۵ ایزوله (۵۲ درصد) در فاصله زمانی ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۹ گزارش کردند که در مقایسه با مطالعه ی مشابه در سال‌های ۱۹۸۷ تا ۲۰۰۱ که این حالت فقط در ۱۳ از ۱۲۶ ایزوله (۱۰ درصد) مشاهده شده بود، شیوع بسیار بالاتری را نشان می‌داد(۷). هم‌چنین در Detroit نیز سیری افزایشی در تعداد ایزوله‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با مقادیر MIC بالا در بازه زمانی ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۹ گزارش شده است(۸). بررسی علل افزایش مقاومت آزولی در عفونت‌های قارچی موضوع بسیار مهمی می‌باشد، زیرا گسترش مقاومت می‌تواند در کنترل این عفونت‌ها اختلال ایجاد نماید(۹). نحوه دقیق شکل گیری و تکامل مکانیسم مقاومت آزولی مشخص نشده است، ولی شواهد زیادی نقش قارچ‌کش‌های آزولی مورد استفاده در کشاورزی را در ارتباط با این مکانیسم نشان می‌دهد(۱۰). اساس مولکولی مقاومت به تری‌آزول‌ها در ایزوله‌های کلینیکی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* جهش‌های نقطه‌ای در چندین کدون از ژن cyp51A می‌باشد که این قطعه کدکننده لانسترول ۱۴-α-دمتیلاز می‌باشد. با وجود این، مکانیسم دیگری شامل یک توالی تکراری دنبال هم ۳۴ جفت بازی (TR34) در ناحیه پروموتور با جایگزینی L98H (TR34/L98H) در cyp51A در ایزوله‌های مقاوم به تری آزول محیطی، افراد بدون درمان و نیز بیماران تحت درمان می‌باشد(۱۱). تا اواخر ۲۰۰۶، کم‌تر از ۱۳ جهش که موجب فنوتیپ مقاوم می‌شوند، در جایگاه ۶ اسیدآمینه از این ژن شناسایی شده‌اند. این جایگاه‌ها شامل Asn22, Gly54, Leu98, Gly138, Met220 و Gly448 می‌باشند(۱۲). بیش‌تر مطالعات انجام شده بر روی ایزوله‌های محیطی و کلینیکی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در هلند، استرالیا، دانمارک، هند، چین و ایران نشان می‌دهد که بیش‌ترین موتاسیون‌ها در ناحیه TR/L98H ژن cyp51A اتفاق افتاده است(۱۵-۱۳). در گونه‌های کاندیدا، آزول ها با اتصال و مهار فعالیت لانوسترول ۱۴ α-دمتیلاز (Erg11p)، آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز ارگوسترول قارچ فعالیت خود را انجام می‌دهند. چندین مکانیسم مقاومت به آزول‌ها در *کاندیدا آلبیکنس* توصیف شده است. این مکانیسم‌ها عبارتند از افزایش بیان ژن‌های پمپ جریان دارو مانند MDR1، CDR1 و CDR2، تعویض اسید آمینه در آنزیم هدف Erg11p، جهش در ژن ERG11 و احتمالاً بیان بالای ERG11. نکته مهم این است که در هر ایزوله، مقاومت ممکن است به علت ترکیبی از مکانیسم‌ها باشد(۱۶). تاکنون، بیش از ۶۰ تعویض اسید آمینه در Erg11p در حداقل ۳۰ ایزوله مقاوم به آزول شناسایی و شرح داده شده است(۱۷). ممکن است تعویض اسید آمینه بین آزول‌ها متفاوت باشد. سهم

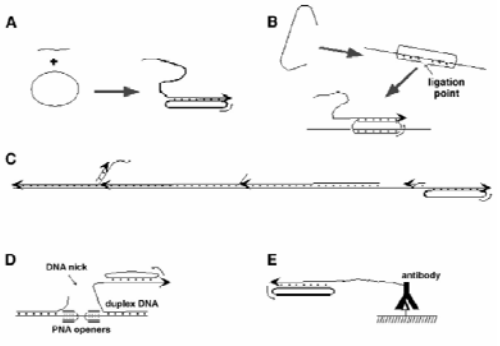
جهش ERG11 در مقاومت هنوز نامشخص است. از آن‌جا که اکثر گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* ، دیپلوئید هستند، جهش نوکلئوتیدی ممکن است به صورت هموزیگوت (در هر دو آلل) و یا به عنوان هتروزیگوت (در یک آلل) رخ دهد. رابطه بین هر نوع از جهش‌ها با فنوتیپ مقاوم به خوبی مشخص نشده است(۱۸). با این حال، مطالعات نشان می‌دهد پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP ها) در ژن ERG11 در حساسیت و مقاومت تاثیرگذار است(۱۹). با توجه به کاهش حساسیت طیف وسیعی از این پاتوژن‌ها به داروهای ضدقارچی، شناسایی سریع آن‌ها در حد گونه برای مدیریت بالینی بیماران واجد اهمیت است(۲۰). با توجه به وفور عوامل قارچی در دنیا، افزایش بیماری‌های نقص ایمنی در دو دهه اخیر و بروز مرگ و میر ناشی از آن‌ها و گزارش‌های متعدد مقاومت و کاهش حساسیت دارویی در ایران، اهمیت بررسی مقاومت دارویی به ترکیبات آزولی و در نهایت شناسایی موتاسیون‌های ایجاد شده بر روی ژن‌های کدکننده این مقاومت‌ها در قارچ‌ها با روش‌های مختلف در راستای گزینش درمان موثر بیش از پیش نمایان می‌شود. روش‌های مرسوم جهت ردیابی مقاومت نیازمند کشت مثبت می‌باشند، در حالی که تعداد زیادی از کشت‌ها منفی شده و این موضوع توانایی ما برای ردیابی مقاومت‌ها را به مقدار زیادی محدود می‌کند. در مطالعه Spiess و همکاران، یک رویکرد مولکولی، غیر مبتنی بر کشت به منظور تشخیص جهش‌های کلیدی منجر به مقاومت بالینی آزولی در ژن cyp51A *آسپرژیلوس فومیگاتوس* به طور مستقیم از نمونه بالینی مربوطه مطرح شد که در این روش نمونه مایع برونکوآلوئولار لاواژ و نمونه‌های بافتی بیش از نمونه خون مناسب و کاربردی هستند، زیرا بار قارچی آن‌ها، به ویژه در بیماران خونی تحت درمان شدید با داروهای ضد قارچی، بیش‌تر است(۲۱). در چند سال اخیر روش‌ها و راه‌کارهای علمی زیادی در جهت شناسایی موتاسیون‌های ایجاد شده جهت درمان صحیح و کاهش هزینه آزمایشات همراه با افزایش دقت، سرعت و در عین حال انعطاف‌پذیری زیاد ابداع شده است (جدول شماره ۱). از جمله این روش‌ها می‌توان به تکنیک های وابسته به PCR مثل Real time و DNA sequencing اشاره کرد که با وجود مزایای فوق الذکر، دارای محدودیت‌هایی از جمله هزینه بالا، زمان بر بودن و نیاز به تجهیزات فراوان می‌باشند(۲۲،۱۶). با پیشرفت‌های حاصل شده در علم ژنتیک راه کارهایی در پیش روی محققین قرار گرفته است که توسط آن توانسته‌اند قدم‌های بسیار بلندی در امر تسریع کنترل کیفی و تشخیص بیماری بردارند. خوشبختانه با ایجاد پایگاه داده‌های ژنی و پروتئینی، محققین به روش‌هایی دست یافته‌اند که به کمک علم نو پای بیوانفورماتیک می‌توان روش‌هایی بسیار دقیق، سریع و اختصاصی‌تر از تکنیک‌های متداول مولکولی که علاوه بر گران قیمت بودن نیازمند نیروی متخصص نیز هستند را در علوم تشخیصی ارائه نمودند. در ادامه روش‌های مولکولی مورد استفاده، مزایا و معایب این تکنیک‌ها در جهت شناسایی موتاسیون‌های احتمالی قارچ‌های پاتوژن شایع از جمله آسپرژیلوس و کاندیدای مقاوم به داروهای آزولی در زمان کم‌تر، با حساسیت و اختصاصیت بالا با کم‌ترین هزینه مورد بحث قرار می‌گیرد.

تکنیک تکثیر دایره ای چرخان [1] *(RCA)*

یکی از روش‌هایی که امروزه توسط محققین بسیار مورد توجه قرار گرفته است، روش‌های ایزوترمال است. در این روش بدون نیاز به اعمال تناوب دمایی، تکثیر DNA امکان‌پذیر می‌شود. از جمله این تکنیک‌ها، تکثیر دایره‌ای چرخان (RCA) می‌باشد که در اواسط دهه ۱۹۹۰ کشف شد و به دلیل اختصاصیت فوق العاده بالای آن بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این تکنیک از یک پروب بسته برای شناسایی منطقه خاصی از ژنوم

1. Rolling Circle Amplification

استفاده می‌شود(۲۳). اساس RCA بر تکثیر چرخان DNA تک رشته‌ای کوتاه حلقوی با DNA پلیمراز خاص در درجه حرارت ثابت است(۲۴). همان‌طور که در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است، واکنش RCA شامل سیکل‌های متعددی از سنتز آنزیمی هم دما است که پرایمر به وسیله DNA پلیمراز به طور دایره وار هیبرید می‌شود و این پروسه به طور مداوم حول DNA حلقوی پروب (چند ده نوکلئوتیدی) بارها و بارها تکرار شده و ادامه می‌یابد(۲۳). این یک فرایند کینتیک خطی است، که به راحتی در یک ساعت تا چند هزار توالی مکمل پشت سر هم[1] از یک DNA اصلی (الگو) حلقوی کوچک سنتز می‌شود. این محصولات تکثیری معمولاً دارای توزیع وسیعی از نظر طول بوده و در تصاویر الکتروفورز بر روی ژل به صورت اسمیر پهنی از DNAهای با وزن مولکولی بالا دیده می‌شوند. تکرارهای طولانی به دست آمده از توالی DNA ممکن است به عنوان یک تقویت کننده سیگنال برای شناسایی با حساسیت بالای اسیدهای نوکلئیک خاص و دیگر مولکول‌های بیولوژیکی مهم در تشخیص ژنتیک و پروتئومیکس باشد. به دلیل کارآیی بالا و سهولت استفاده، تست‌های مبتنی بر RCA، در میان روش‌های تشخیص مولکولی جایگاه خاصی را در مقایسه با سایر روش‌های تکثیر تک دمایی به خود اختصاص دادند(۲۳). به دلیل این که در این تکنیک یک قالب بسته در اتصال به هدف ایجاد می شود، امکان تکثیر توالی غیر اختصاصی را نزدیک به صفر می رساند. تکنیک مولکولی RCA از ویژگی خارق العاده‌ای برای شناسایی توالی‌های خاص DNA یا RNA و هم‌چنین برای نشانگرهای مولکولی غیر از DNA یا RNA برخوردار می‌باشد. در نتیجه امکان تعیین چندین گونه به صورت همزمان و نیز شناسایی جهش‌های تک نوکلئوتیدی و آنتی‌ژن‌های خاص را فراهم می آورد. شناسایی بر اساس RCA به عنوان روشی با تکرار پذیری خوب شناخته شده و در مقایسه با PCR، اشتباهات تکثیری در سطح پایین‌تری رخ می‌دهد. در نتیجه، چنین حساسیت بالایی امکان تعیین کمی تعداد کپی‌های یک ژن و نیز شناسایی ژن‌های تک کپی، افتراق کمپلکس‌های آنتی ژن-آنتی‌بادی و سطح بیان mRNA در سلول‌های منفرد را فراهم می‌آورد(۲۵،۲۳). در حداقل ۳۰ ایزوله مقاوم به آزول بیش از ۶۰ تعویض اسید آمینه در ژن ERG11p شناسایی و شرح داده شده است و ممکن است تعویض اسید آمینه بین آزول‌ها متفاوت باشد. با این حال، مطالعات نشان داده‌اند که پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNPها) در ژن ERG11 در حساسیت و مقاومت تاثیرگذار است(۲۶-۲۸).



تصویر شماره ۱: شکل شماتیک از فرآیندهای RCA (۲۳).

نوک پیکان نماد DNA پلی مراز است. DNA کوچک حلقوی با سایز کم‌تر از ۱۰۰ نوکلئوتید و قطعات مولکول بسیار پایدار dsDNA با این سایز در RCA استفاده شده، فقط قسمتی از پروب حلقوی می‌تواند در هر زمان جفت شود. شکل هندسی کمپلکس‌های حاصل شده در RCA مشابه کمان است.

(A) واکنش RCA بر روی DNA کوچک حلقوی آزاد و با استفاده از یک پرایمر انجام می‌شود. اگر هدف استفاده شده برای شروع واکنش RCA مولکول DNA باشد، محصولات تکثیر به طور ثابتی به مولکول‌های هدف متصل می‌شوند (رجوع شود به شکل شماتیک D). برای هدف های متصل شده به سطح، این محصولات بر روی فاز جامد ثابت می شوند.

(B) تشخیص تکثیر پروب بر اساس RCA در محل حلقوی شدن پروب الیگونوکلئوتید خطی و یک پرایمر هدف غیر مرتبط (L-RCAیا اتصال-RCA). در برخی از موارد، ارتباط توپولوژیک

1. Tandem Repeats

بین DNA حلقوی کوچک و محل DNA هدف یا مارکر ممکن است در تکثیر حلقوی تاثیر گذار باشد. پروب حلقوی برای ادامه هیبریدیزیشن باید از DNA هدف جدا شود.

(C) مراحل اولیه RCA double-primed. در این واکنش، پرایمر دوم، که مکمل محصول اصلی RCA است، استفاده شده است. در این جا، حضور DNA پلیمراز برای سنتز رشته جایگزین ضروری است.

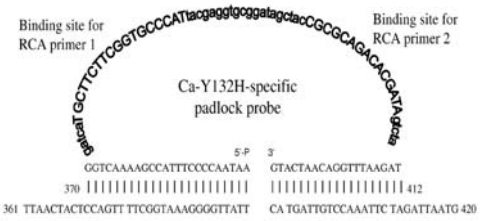
(D). پیشرفت در واکنش RCA برای تولید dsDNA با همکاری شروع کننده‌های PNA و شکاف DNA انجام می‌شود.

(E) در immuno-RCA، انتهای ′۵ پرایمر به یک ریپورتر آنتی‌بادی متصل می‌شود که به صورت انتخابی به یک آنالیت ثابت شده بر یک سطح جامد متصل می‌شود.

اخیراً استفاده از روش RCA، به عنوان روش قابل اعتماد، سریع و با ویژگی بالا، به عنوان جایگزینی ساده برای تعیین توالی در تشخیص SNP ها معرفی شده است(۳۰،۲۹). پروتکل RCA به‌طور خاص، برای تشخیص پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP ها) در مجموعه‌ای از DNA ژنومی انسان با حساسیت در حد نانوگرم، تعریف شده است(۳۱). به‌طوری که تشخیص بسیار حساس کانون جهش سوماتیک در فراوانی بسیار پایین نیز گزارش شده است(۳۲).

همان‌طور که در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است، در مطالعه Wang و همکاران، پروب اختصاصی RCA برای بررسی جهش نقطه‌ای ناحیه پلی‌مورفیسم ژن هدف ERG11 طراحی شد(۳۳). در این مطالعه برای تمام نمونه‌های مورد بررسی، یک سیگنال فلورسانس RCA واضح با حساسیت تشخیص 10^9 کپی مشاهده شد؛ کم‌تر از این تعداد کپی، سیگنال به راحتی قابل تشخیص از سیگنال پس زمینه نبود و فقط سیگنال هایی که به وضوح از پس زمینه قابل اندازه گیری بودند، به عنوان جهش در نظر گرفته شد. قابلیت سنجش RCA برای تشخیص هتروزیگوت و هم‌چنین تغییرات نوکلئوتیدی هتروزیگوت ERG11، به‌طور غیر مستقیم با استفاده از هشت ایزوله استاندارد و آزمایشی که توانایی شناسایی حضور جهش خاصی را در تایپ وحشی شناسایی می‌کند، مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه برای هر جهش شناخته شده ERG11، مخلوطی از هر دو الگوی دارای جهش و تایپ وحشی (الگوی هدف دارای جهش (10^{11} کپی) در غلظت‌های ۱۰۰ درصد، ۵۰ درصد، ۲۰ درصد، ۱۰ درصد، ۵ درصد، ۲ درصد و ۰ درصد، در یک پس زمینه از الگوی تایپ وحشی) فراهم شد. در مورد همه نمونه‌ها تا رقت ۵ درصد الگوی هدف، یک سیگنال واضح RCA بالای پس زمینه مشاهده شد. این مطالعه نشان داد که نتایج RCA قابل تکرار بوده و تکرار آزمایشات با کم ترین تغییر و یا بدون تغییر بود. در کل نتایج نشان داد که روش RCA قابلیت شناسایی جهش‌های ERG11 را با حساسیت بالا در مخلوطی از DNAها دارد و این حساسیت به خوبی حساسیت به کار رفته در تشخیص تغییرات نوکلئوتید هتروزیگوت بوده و بسیار اختصاصی است (نسبت ژن هدف با جهش به ژن بدون جهش ۱:۱) و اگر ایزوله‌ای شامل پلی‌مورفیسم ERG11 مکمل padlock پروب خاص مورد نظر نباشد، هیچ سیگنالی دیده نمی‌شود(۳۳). بسیاری از مطالعات ارتباط مستقیمی را بین جهش‌های نقطه‌ای خاص در cyp51A و مقاومت آزولی در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* نشان داده‌اند(۱۳). در *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، ۲ محدوده ژنی نزدیک و مرتبط به هم وجود دارد (cyp51B,cyp51A) این دو محدوده ژنی در ۶۳ درصد سکانس‌های شناخته شده برای پروتئین cyp51 یکسان هستند(۳۴). مطالعات نشان داده است که cyp51A پیوند محکم تری را با ترکیبات آزولی نسبت به cyp51B ایجاد می‌کند و به‌طور معمول حساسیت بیش‌تری نسبت به ترکیبات آزولی دارد. cyp51A کدکننده آنزیم α۱۴- دی متیلاز می‌باشد که برای رشد قارچ ضروری است و cyp51B در شرایط خاص رشد و با عملکرد آلترناتیو، نقش خود را ایفا می‌کند(۱۱). بر این اساس استفاده از روش RCA و طراحی پروب اختصاصی برای بررسی موتاسیون‌های رخ داده ناحیه ژنی cyp51A برای جلوگیری از اتلاف وقت، هزینه و جلوگیری از انتشار بیماری توسط سوش‌های

مقاوم، درمان نابجا، صرف هزینه‌های زیاد تشخیص و درمان و کاهش دوز مصرف دارو که منجر به کاهش عوارض آن‌ها می‌شود، بسیار ضروری است.

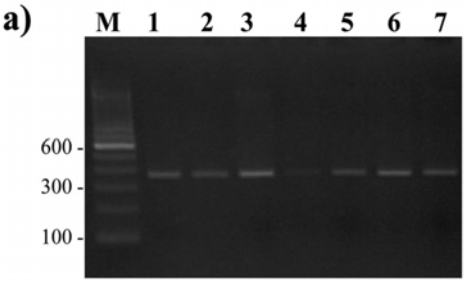


تصویر شماره ۲: پروب RCA اختصاصی جهش نقطه ای بر اساس ناحیه پلی مورفیسم ژن هدف ERG11 (۳۳).

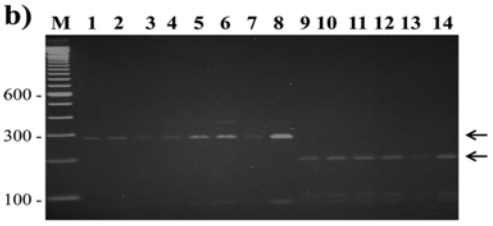
پروب شامل: ۱) یک انتهای ′۵-فسفریله؛ ۲) backbone حاوی محل‌های اتصال برای پرایمرهای RCA (پرایمر RCA ۱ و ۲، به ترتیب) و هم‌چنین ناحیه لینکر غیر اختصاصی و ۳) یک انتهای ′۳. انتهای ′۵ و ′۳ پروب، مکمل انتهای ′۵ و ′۳ از توالی هدف در جهت معکوس می‌باشد، برای مثال، توالی *کاندیدا آلبیکنس*.

تکنیک PCR-RFLP[1]

در مطالعه Ahmad و همکاران، روش ساده PCR-RFLP جهت ردیابی سریع موتاسیون‌های TR34/L98H در ژن cyp51A معرفی شد(۳۵). در این مطالعه استرین رفرانس *آسپرژیلوس فومیگاتوس* حامل سکانس وحشی در ناحیه پروموتور و کدون ۹۸ cyp51A و نیز استرین حامل توالی جهش یافته TR34/L98H در ناحیه ی پروموتور و کدون ۹۸ برای تایید روش PCR استفاده شدند. به منظور شناسایی ایزوله‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، DNA کلیه ایزوله‌ها استخراج و آماده شده و ناحیه ITS از DNA ریبوزومی با استفاده از پرایمرهای AFUF2 و AFUR2 تکثیر شد و هم‌چنین حضور یا عدم حضور TR34 در ناحیه‌ی پروموتور از طریق تکثیر با استفاده از پرایمرهای AFCYPPF و AFCYPPR مشخص گردید (تصویر شماره ۴). ایزوله‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* حاوی TR34 در ناحیه پروموتور cyp51A می‌بایست محصولی به اندازه ۱۳۹ جفت باز و در حالی که ایزوله‌های حاوی سکانس وحشی (فاقد توالی‌های تکراری پشت سرهم) می‌بایست محصولی به اندازه ۱۰۵ جفت باز بدهند (شکل ۴). برای ردیابی توالی نوع وحشی یا موتاسیون L98H در cyp51A ایزوله‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، محصول تکثیر شده پس از تخلیص با استفاده از ۵ واحد آنزیم *AluI* هضم شده و به دنبال آن با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲ درصد از هم جدا شدند تا الگوهای PCR-RFLP حاصل شود. همان‌طور که در تصویر شماره ۳ نشان داده شده است، در محصولات تکثیر شده ۳۵۰ جفت بازی ایزوله‌های حاوی سکانس نوع وحشی (L98H) *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در ناحیه cyp51A می‌بایست ۳ قطعه‌ی DNA با اندازه‌های ۱۹۸، ۹۰ و ۷۱ جفت باز (با حفظ قطعه‌ی ۱۸۹ جفت بازی به عنوان قطعه ی تشخیصی) تشکیل دهد. در حالی که ایزوله‌های حاوی جهش در L98H در cyp51A نتایجی به صورت ۲ قطعه ۲۷۹ و ۷۱ جفت بازی (با قطعه‌ای ۲۷۹ جفت بازی به عنوان قطعه شاخص) نشان خواهند داد(۳۵). بر اساس یافته های این مطالعه، هیچ یک از ایزوله‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* فاقد جهش TR34/L98H نتایج مثبت کاذب در تست PCR-RFLP ندادند. لازم به ذکر است که PCR-RFLP توصیف شده در این مطالعه صرفا برای بررسی جهش‌های L98H در ژن cyp51A طراحی شده است.



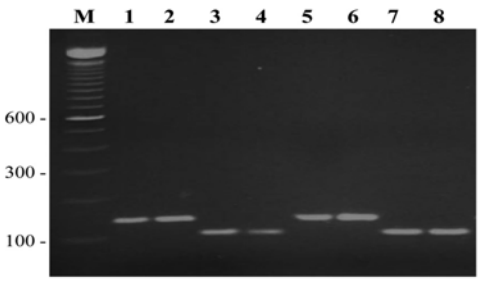
1. PCR restriction fragment length polymorphism



تصویر شماره ۳: ژل آگاروز محصول PCR به دست آمده با پرایمرهای AFCYP98R و AFCYP98F از ۷ ایزوله *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (ستون های ۱ تا ۷) (تصویر A) و الگوی به دست آمده RFLP از ۸ ایزوله ی مقاوم به تری آزول (ستون های ۱ تا ۸) و ۶ ایزوله ی حساس به تری‌آزول (ستون های ۹ تا ۱۴) *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (تصویر B). محل قرارگیری قطعات شاخص ۲۸۹ جفت بازی (برای جهش‌های L98H) و ۱۸۹ جفت بازی (برای کدون وحشی cyp51A98) توسط فلش نشان داده شده‌اند. باندهای کوچک ۳۵۰ جفت بازی در برخی ستون‌ها نشانگر محصول های PCR هضم نشده توسط آنزیم‌های محدودالاثر می‌باشد. در هر دو شکل ستون M نشانگر سایز ۱۰۰ جفت بازی می‌باشد و محل قرارگیری قطعات ۱۰۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ جفت بازی مشخص شده اند (۳۵).

از آن جایی که جهش‌های دیگری در ژن cyp51A به عنوان عامل مقاومت به تری آزول‌ها در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* معرفی شده‌اند، عدم شناسایی موتاسیون L98H با روش PCR-RFLP مقاومت به تری‌آزول‌ها را منتفی نمی‌کند. بنابراین احتمال وجود چند ایزوله *آسپرژیلوس فومیگاتوس* مقاوم به تری آزول‌ها وجود دارد که در روش PCR-RFLP نتایج منفی کاذب داده و به صورت الگوی نوع وحشی ناحیه پروموتور و کدون ۹۸ ژن cyp51A گزارش شده‌اند. روش مبتنی بر PCR توصیف شده در این مطالعه دارای سرعت بالا برای شناسایی موتاسیون‌های TR34/L98H بوده، اجرای آن‌ها ساده بوده و نیازمند تجهیزات پایه PCR و الکتروفورز است که در خیلی از آزمایشگاه‌های قارچ شناسی وجود دارد.

هم‌چنین این روش‌ها در مدت ۱ تا ۲ روز قابل انجام بوده و بدون احتساب هزینه‌ی کشت و پرسنل، هزینه‌ای حدود ۵ دلار برای هر نمونه نیاز دارد. این روش در تعیین شیوع موتاسیون‌های TR34/L98H در ژن cyp51A ایزوله‌های بالینی و محیطی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* کمک‌کننده خواهند بود. کاربرد این روش‌ها می‌تواند هم‌چنین در شناسایی سایر مکانیسم‌های تازه تعریف شده دخیل در مقاومت به تری‌آزول‌ها (موتاسیون‌های TR46/Y121F/T289A) در ایزوله‌های بالینی و محیطی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* نیز مفید واقع شود(۳۶).



تصویر شماره ۴: ژل آگاروز محصول PCR به دست آمده با پرایمرهای AFCYPPF و AFCYPPR از ۸ ایزوله *آسپرژیلوس فومیگاتوس*(۳۵). محصول تکثیر شده دارای طول تقریباً ۱۳۹ جفت باز در ستون های ۱، ۲، ۵ و ۶ نشانگر حضور TR34 می باشند، در حالی که محصول تکثیر شده دارای طول تقریبی ۱۰۵ جفت باز در ستون های ۳، ۴، ۷ و ۸ نشانگر عدم وجود TR34 (سکانس تیپ وحشی) در ناحیه پروموتور .cyp51A

تکنیک *ARMS-PCR*[1] تکنیک ARMS-PCR

یک روش کاربردی و کم هزینه جهت بررسی و شناسایی موتاسیون‌های نقطه‌ای می‌باشد(۳۷). از جمله مزایای این روش کم هزینه بودن و عدم نیاز به تجهیزات فراوان است. واکنش ARMS_PCR طی یک مرحله PCR انجام گرفته و متعاقباً با استفاده از الکتروفورز محصول آن قابل رویت گشته و نتیجه‌ی کار تفسیر می‌گردد. هدف از این روش پیدا کردن واکنش‌های اختصاصی آللی می‌باشد و این اختصاصیت با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آللی که حاوی نولکئوتید خاص هر آلل در انتهای ´۳ خود هستند، حاصل می‌گردد(۳۸). بدین صورت اگر پرایمر در ناحیه ۳ کاملاً با DNA الگو

1. Amplification Refractory Mutation System-PCR

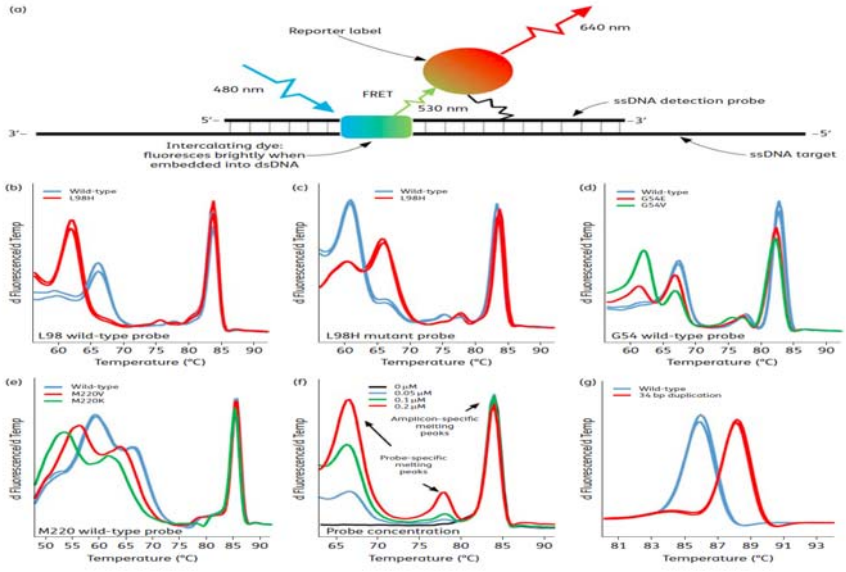
تطبیق داشته و مکمل هم باشند، واکنش صورت گرفته و محصول PCR حاصل می‌گردد. بنابراین بر اساس این که محصول PCR تولید شده و یا تولید نشده باشد، می‌توان ژنوتیپ DNA هدف را تعیین کرد. در این روش از پرایمرهای جهش یافته و طبیعی در دو لوله جداگانه استفاده می‌شود. اگر عمل پلیمریزاسیون در لوله حاوی پرایمر طبیعی انجام شود، نشان‌دهنده نبود جهش نقطه‌ای در باز مورد نظر است و اگر عمل پلیمریزاسیون در لوله حاوی پرایمر جهش یافته انجام شود، نشان‌دهنده حضور جهش نقطه‌ای در باز مورد نظر است. این روش نام‌های دیگری نیز دارد(۳۹).

تکنیک Real-Time PCR

در مطالعه Klaassen و همکاران، روش mixed-format real-time PCR برای شناسایی موتاسیون‌های عامل مقاومت به تری‌آزول‌ها و شیوع مقاومت چندگانه تری‌آزولی در جایگاه‌های Gly54, Leu98, Gly138 و Met220 از ژن cyp51A در میان ایزوله‌های بالینی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* به کار برده شد (۴۰). در این تکنیک یک جفت از پرایمرها و یک پروب نشاندار شده با فلورسنت در ترکیب با DNA دو رشته ای، اجازه تشخیص همزمان جهش‌های اختصاصی و هم چنین محصول تکثیر شده که به عنوان یک کنترل تکثیر داخلی عمل می‌کند را می‌دهد. این روش بر روی یک مجموعه تصادفی از ۲۰۹ سویه بالینی از سراسر هلند مورد استفاده قرار گرفت و با تست حساسیت دارویی فنوتیپی مقایسه شد. همان طورکه در تصویر شماره ۵ نشان داده شده است، در این تکنیک، هیبریداسیون پروب اختصاصی با DNA تک رشته‌ای هدف (ssDNA)، منجر به ایجاد مولکول هیبریدی DNA دو رشته‌ای (dsDNA) می‌شود. پس از تعبیه در مولکول dsDNA، رنگ فلورسنت توسط نور آبی (۴۸۰ نانومتر) برانگیخته و رنگ سبز روشنی (~۵۳۰ nm) را ساطع می‌کند. انرژی از نور سبز ساطع شده (۵۳۰ نانومتر) توسط یک فرایند شناخته شده به عنوان انتقال انرژی رزونانسی فلورسانس (FRET) به یک گیرنده فلورسانس که نور قرمز ساطع می‌کند، منتقل می‌شود (~۶۴۰ nm). هنگامی که درجه حرارت افزایش می‌یابد، تا اندازه‌ای مولکول هیبریدی DNA دو رشته‌ای (dsDNA) دناتوره شده و منجر به از دست دادن سیگنال در ۶۴۰ نانومتر شده و موجب ایجاد melting peaks می‌شود. پروب‌ها طوری طراحی شده اند که یک هیبرید عالی عملکرد melting peak تقریباً در ۶۵ درجه سانتی‌گراد دارد. عدم تطابق با پروب در درجه حرارت پایین‌تر توسط پیک ذوب آشکار خواهد شد. واکنش‌های تکثیری به سبک نامتقارن انجام شده و مخلوطی از مولکول‌های DNA دو رشته‌ای و DNA تک رشته‌ای هدف ایجاد می شود. مولکول‌های dsDNA هدف از طریق حضور رنگی که در ۶۴۰ نانومتر قابل تشخیص است، شناسایی می‌شوند. حضور آن‌ها با تشکیل پیک ذوب در دمای حدود ۸۵ درجه سانتی‌گراد تائید شده است (درجه حرارت ممکن است برای محصولات PCR با اندازه‌های مختلف و یا محتوای GC مختلف متفاوت باشد). میزان عدم تقارن در طول PCR به طور مستقیم نسبت بین ssDNA و dsDNA هدف را تحت تاثیر قرار می دهد. شرایط مطلوب شامل نسبت پرایمر ۱:۱,۵ تا ۱:۵ است. اگر مقدار عدم تقارن بیش از حد بالا است، محصول ضعیفی به دست می‌آید (که منجر به ایجاد کم سیگنال‌های کلی شده)، اگر مقدار عدم تقارن بیش از حد کم است، مقدار ssDNA هدف خیلی کم خواهد بود (که منجر به ایجاد سیگنال‌های کم اختصاصی پروب می‌شود). در تصویر شماره ۵ (b و c) نتایج برای جایگاه Leu98، به ترتیب با استفاده از پروب تیپ وحشی و یا پروب اختصاصی L98H، نشان داده شده است. در تصویر شماره ۵ (d و e) نتایج به ترتیب با استفاده از پروب تیپ وحشی برای Gly54 و Met220 نشان داده شده‌اند. در هر دو مثال به وضوح قابل مشاهده است که جهش‌های مختلف منجر به شکل‌گیری

پروفایل‌های حرارتی (ذوب) متفاوت شده است، که اجازه استفاده از یک پروب به تنهایی در هر جایگاه را برای افتراق محصولات تیپ وحشی و محصولات شامل یکی از چندین موتاسیون مختلف، می دهد. پیک های فرعی با شدت کم نیز در طیف دمایی ۸۰-۷۵ درجه سانتی گراد مشاهده شده است. این پیک‌ها به شدت وابسته به غلظت پروب تشخیص‌دهنده جهش‌ها (تصویرشماره 5f) است و ممکن است در نتیجه ایجاد ساختارهای ثانویه باشند. در تصویر شماره ۵ (g)، منحنی‌های amplification و پیک‌های melting برای ناحیه پروموتور cyp51A نشان داده شده است. تکثیر قطعه ۳۴ جفت بازی در پروموتور cyp51A منجر به تولید محصول PCR ای می‌شود که به آسانی قابل افتراق با محصول PCR تیپ وحشی توسط نقطه ذوب با افزایش دما (۸۸ درجه سانتی گراد در مقابل ۸۶ درجه سانتی گراد) می‌شود. در این تکنیک کنترل‌های منفی بدون نمونه DNA نقطه ذوبی را نشان ندادند. در مطالعه Klaassen و همکاران با استفاده از این تکنیک، ۴ نمونه از ۲۰۹ نمونه بالینی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* شامل ترکیب موتاسیون های L98H + TR بودند(۴۰). بنابراین نتایج این روش real-time PCR با روش‌های فنوتیپیک تشخیص مقاومت ۱۰۰ درصد مطابقت داشتند. هم‌چنین در مطالعه Mellado بررسی‌های کمی بیان با استفاده از تکنیک real-time PCR، افزایش بیان تا هشت برابر در سطح ژن cyp51A در مقایسه با سوش حساس را نشان داد(۴۱).

در مطالعه Spiess و همکاران با استفاده از روش Nested PCR برای تشخیص تغییرات TR در پروموتور ژن cyp51A، حساسیت بالاتری از دو روش دیگر PCR نشان داده شد (۲۱). بر اساس یافته‌های این مطالعه، روش تشخیص جهش‌ها در L98H و M220 به صورت PCR تک مرحله‌ای بود زیرا روش Nested PCR برای تشخیص این تغییرات منجر به ایجاد محصولات PCR غیراختصاصی



تصویر شماره ۵: اصول تکنیک جدید mixed-format real-time PCR برای شناسایی جهش های نقطه ای اختصاصی در ارتباط با مقاومت آزولی در *آسپرژیلوس فومیگاتوس(40)* . (a): تصویری از اصول روش پس از هیبریداسیون پروب به مولکول ssDNA هدف، یک مولکول هیبریدی dsDNA تشکیل می‌شود. برانگیختن (تحریک) رنگ Reso light به این مولکول dsDNA منجر به خروج فلورسنت شده که برای تحریک reporter استفاده می‌شود. این فرمت اجازه تشخیص همزمان از محصول تکثیر شده و هم‌چنین جهش های اختصاصی در این هدف را می‌دهد. (b): تشخیص جهش در L98 با استفاده از یک پروب wild-type (c): تشخیص اختصاصی L98H با استفاده از پروب اختصاصی L98H. (d): تشخیص جهش‌های مختلف در G54 (e): تشخیص جهش های مختلف در M220 (f): اثر غلظت پروب (g): تشخیص tandem repeat polymorphism در منطقه پروموتور (بدون نیاز به پروب).

تکنیک Nested PCR

بدون حساسیت بیش‌تر می‌شد. در روش nested PCR بر روی نمونه‌های بالینی مستقیم، هیچ یک از جفت پرایمرها با DNA ژنومی انسان زمانی که ۱۰۰ نانوگرم از این DNA به عنوان کنترل منفی استفاده شد، واکنش متقاطع نشان ندادند. به همین دلیل، محصولات PCR نمونه‌های بیماران حاوی مخلوطی از DNA ژنومی انسان و DNA آسپرژیلوس، می‌توانند به‌طور مستقیم بدون استخراج از ژل برای آنالیز توالی DNA مورد استفاده قرار گرفته و موجب صرفه‌جویی در زمان شود. تنها زمانی که نمونه‌های بالینی شامل مقدار زیادی از DNA ژنومی انسان باشد، DNA الگو برای آنالیز، از طریق PCR نمونه‌های حاوی بیش از ۱۰۰ نانوگرم از DNA انسان گرفته می‌شود. در این موارد، PCR از L98H گاهی اوقات منجر به سیگنال‌های ضعیف اضافی شده که نیازمند استخراج محصول PCR از ژل آگارز قبل از تعیین توالی DNA می باشد. بر اساس یافته‌های این مطالعه با بررسی نمونه‌های بالینی با این روش PCR، تغییرات L98H در ۵ بیمار بدون تغییر در TR شناسایی شدند. جهش L98H به تنهایی موجب مقاومت آزولی نمی‌شود. در بیمار دارای ALL، جهش L98H در ترکیب با تغییرات TR در نمونه بیوپسی مغز تشخیص داده شد(۲۱).

MALDI-TOF MS[1]

این تکنیک قادر است میکروارگانیسم‌ها را تا حد گونه شناسایی و حتی ممکن است قادر به شناسایی مقاومت ضد میکروبی نیز باشد. MALDI-TOF MS متکی بر انگشت نگاری پروتئین یک میکروارگانیسم است. شناسایی یک میکروارگانیسم به وسیله این روش بر اساس مقایسه فینگرپرینت پروتئین آن با طیف مرجع در یک پایگاه داده‌ای متشکل از ایزوله‌ها است(۴۲). این تکنولوژی هم‌چنین به عنوان یک ابزار برای بررسی تست حساسیت دارویی در برابر باکتری ها و گونه های کاندیدا ارزیابی شده است(۴۸-۴۳). قبلاً مشاهده شده که ترکیب پروتئین گونه‌های کاندیدا هنگامی که سویه‌ها با داروهای ضد قارچ مواجه می‌شوند، تغییر خواهد کرد که ممکن است بخشی از پاسخ جبرانی در پاسخ به محیط زیست باشد. در مطالعه Saracli و همکاران، ۳۵ سویه *کاندیدا آلبیکنس*، ۳۵ سویه *کاندیدا گلابراتا* و ۳۷ سویه *کاندیدا تروپیکالیس* با فلوکونازول، وریکونازول یا پسوکونازول با غلظت های مختلف (فلوکونازول ۶۴ µg/ml ، وریکونازول و پسوکونازول ۱۶ µg/ml)، همراه با یک کنترل فاقد دارو، مواجه کردند(۴۷). در این مطالعه از روش MALDI-TOF MS در این غلظت‌ها برای ایجاد ضریب همبستگی (CCI)، برای هر ایزوله مورد استفاده قرار گرفت و غلظت‌های میانی و بالایی CCI، پایین‌تر از غلظت‌های میانی و بالایی استرین‌هایی که به‌عنوان مقاوم طبقه‌بندی شده بودند. سپس این نتایج، با نتایج به دست آمده از نمونه‌هایی که MIC آن‌ها با تکنیک CLSI M27-A3 تست حساسیت ضد قارچ (AFST) به عنوان حساس یا مقاوم شناخته شده بودند، مقایسه شد. نتایج این مطالعه نشان داد که MALDI-TOF MS قادر به طبقه‌بندی حساسیت‌تری آزول در برابر همه سویه ها بود. تکرارپذیری سنجش MALDI-TOF MS بین ۵۴/۳ و ۸۲/۹ درصد متفاوت بود و بهترین نتیجه برای فلوکونازول علیه *کاندیدا آلبیکنس* و پسوکونازول علیه *کاندیدا گلابراتا* بود. این نتایج نشان می‌دهد که MALDI-TOF MS ممکن است برای بررسی همزمان گونه‌های کاندیدا و طبقه‌بندی آن‌ها به عنوان گونه‌های حساس و یا مقاوم در برابر داروی ضد قارچ‌تری آزول مورد استفاده قرار گیرد. هرچند که مطالعات بیش‌تری برای اصلاح و بهبود تکرارپذیری این روش مورد نیاز است(۴۷). در جدول شماره ۱ مزایا، نقایص و کمبودهای هرکدام از روش های شناسایی سریع

1. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight

موتاسیون های منجر به مقاومت آزولی به اختصار آمده است.

بحث

عفونت‌های قارچی مهاجم عامل اصلی مرگ و میر در بیماران سرطانی تحت شیمی درمانی‌های فشرده می‌باشد. با توجه به افزایش مرگ و میر به دلیل تاخیر درمان به خصوص در بیماران مستعد عفونت، شروع درمان ضد قارچی مناسب و سریع در این بیماران ضروری می‌باشد و باعث کاهش مرگ و میر می‌شود. با توجه به این که آزول ها از جمله داروهای حیاتی در درمان عفونت‌های قارچی هستند، پیدایش مقاومت به آن‌ها تاثیر به‌سزایی بر نتایج درمانی خواهد داشت. لذا درک مکانیسم‌های مقاومت در برابر این عوامل و هم‌چنین تشخیص سریع مقاومت برای مدیریت درمان بیمار ضروری است و مقاومت آزولی اغلب به دلیل ترکیبی از عوامل از جمله افزایش بیان پمپ‌های جریان و جهش ژنی ایجاد می‌شوند. موتاسیون‌های متفاوت می‌توانند منجر به پروفایل‌های حساسیتی متفاوت شوند. بنابراین، شناسایی سریع ایزوله‌های مقاوم به تری‌آزول و نیز شناسایی موتاسیون‌های زمینه‌ای در مدیریت بهینه بیمار و هم‌چنین بررسی‌های اپیدمیولوژیکال از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند. توانایی ردیابی مستقیم مقاومت با استفاده از روش‌های مولکولی، امکان درمان ایده آل برای تک‌تک بیماران را فراهم می‌آورد. بر این اساس نه تنها از درمان‌های غیر موثر جلوگیری می‌شود، بلکه استراتژی‌های جایگزین مانند درمان ترکیبی نیز به صورت مستقیم با شاخص‌های میکروبیولوژیک قابل بررسی می‌باشند که جایگزینی مناسب برای شاخص‌های نامناسب بالینی و یا بیومارکرهای جایگزینی هستند که در حال حاضر استفاده می‌شوند. شناسایی سریع مقاومت به آزول‌ها در نمونه‌های با کشت منفی توانایی بالای PCR در مقایسه با کشت را به منظور بررسی گونه‌های قارچی نمایان کرد. بنابراین ردیابی SNP کلیدی در شناسایی مقاومت کمک‌کننده بوده و نیز بسیار حساس‌تر از کشت می‌باشد، نتیجه منفی این بررسی برای SNP ها، وجود مقاومت را رد نمی‌کند. به کارگیری روش‌های سریع مولکولی به عنوان رابط اپیدمیولوژیکی و بالین برای تشخیص مقاومت در برابر آزول‌ها مطرح می‌شود که اجازه می‌دهد درمان ضد قارچی به‌طور قابل توجهی سریع‌تر در بیماران مبتلا به عفونت‌های قارچی کشنده صورت گیرد. علاوه بر این، تشخیص مستقیم و سریع مقاومت آزولی به دلیل تغییرات ژنی، اجازه تمایز بین مکانیسم‌های متنوع مقاومت آزولی را می‌دهد زیرا تمام موارد مقاومت آزولی ناشی از تغییرات در ژن نمی‌باشد. عمدتاً مطالعات صورت گرفته جهت شناسایی موتاسیون‌های منجر به مقاومت دارویی از نظر عملی

جدول شماره ۱: مزایا، نقایص و کمبودهای هرکدام از روش های شناسایی سریع موتاسیون های منجر به مقاومت آزولی در گونه های قارچی پاتوژن شایع

تکنیک های مولکولی	اساس روش	مزایا و معایب
تکثیر دایره ای چرخان (RCA)	تکثیر چرخان DNA تک رشته ای کوتاه حلقوی با DNA پلیمراز خاص در درجه حرارت ثابت	اختصاصیت فوق العاده بالا و عدم تکثیر توالی غیر اختصاصی، حساسیت و کارآیی بالا، کم هزینه وسریع، تکرار پذیری خوب
PCR-RFLP	مبتنی بر هضم الگو توسط اندونوکلئازهای اختصاصی که هریک جایگاه های شناسایی و برش خاص خود را دارند.	سرعت بالا، اجرای ساده و کم هزینه بودن، تکرار پذیری بالا، زمان بر بوده و دارای نتایج منفی کاذب می باشد.
ARMS-PCR	تشخیص موتاسیون های نقطه ای با استفاده از پرایمرهای جهش یافته و طبیعی در دو لوله جداگانه	از نظر اقتصادی مقرون به صرفه و عدم نیاز به تجهیزات فراوان، حساسیت نسبتا بالا
Real-Time PCR	تشخیص همزمان جهش های اختصاصی با کمک یک جفت پرایمر و پروب نشاندار شده با فلورسنت در ترکیب با DNA دو رشته ای	بررسی های کمی بیان در سطح ژن cyp51A
Nested PCR	استفاده از دو جفت پرایمر جهت به حداقل رساندن تکثیر غیر اختصاصی و محصولات کاذب	حساسیت بالا، اختصاصیت بالا
MALDI-TOF MS	متکی بر فینگرپرینت پروتئین یک میکروارگانیسم و مقایسه آن با طیف مرجع در پایگاه داده ای متشکل از ایزوله ها	تکرارپذیری متوسط

سخت بوده و نیازمند تجهیزات و پروب‌های گران قیمت می باشد. امروزه به منظور ارزیابی ژن‌های بالقوه‌ی دخیل در مقاومت دارویی، استفاده از روش‌های جدید از جمله آنالیزهای microarray برای *کاندیدا آلبیکنس* مطالعاتی در حال انجام است، هرچند که بررسی ارزش این روش‌ها نیازمند به مطالعات بیش‌تر و اطلاعات کامل‌تر در این زمینه می‌باشد. روش‌های مولکولی ساده تعریف شده در این مقاله می‌تواند در شناسایی سریع موتاسیون‌های منجر به مقاومت‌های آزولی ایزوله‌های بالینی به منظور مدیریت بهتر مبتلایان در کشورهای در حال توسعه کمک کننده باشد. پتانسیل بالای این تکنیک‌ها باعث می‌شود این روش‌ها به عنوان یک ابزار برای ردیابی گونه‌های خاص و شناسایی مارکرهای مقاومت آزول شناخته شود. بنابراین انتظار می رود این تکنولوژی به زودی روش‌های شناسایی بسیار حساس و کارآیی را برای محققین آزمایشگاهی و متخصصین بالینی به منظور تسریع و تسهیل سنجش آنالیت‌های مختلف فراهم آورد.

References

1. Baddley JW, Stroud TP, Salzman D, Pappas PG. Invasive mold infections in allogeneic bone marrow transplant recipients. Clin Infect Dis. 2001;32(9):1319-1324.
2. Badali H, Khodavaisy S, Davoudi MM, Biranvand E, Mardani M. Antifungal Therapy for Invasive Fungal Infections. J Mazandaran Univ Med Sci (JMUMS). 2014;24(11۴) :186-205.(persian).
3. Vaezi A, Haghani I, Davoudi MM, Mousavi B, Ansari S, Noshak MA, et al. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Isolates. J Mazandaran Univ Med Sci (JMUMS). 2013; 23(103): 120-137.(persian).
4. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2008; 46(3):327-360.
5. VandenBergh MF, Verweij PE, Voss A. Epidemiology of nosocomial fungal infections: invasive aspergillosis and the environment. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999; 34(3):221-227.
6. Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Meis JF. Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. PLoS Pathog. 2013; 9(10):e1003633. صحیح
7. Martinez M, Cloud G, Chen V, Stevens D. Itraconazole and amphotericin B resistance 1987–2009 in clinical *Aspergillus fumigatus* in northern California. 4th Advances Against Aspergillosis. Rome, Italy; 2010: February 4-6.(POSTER).
8. Krishnan-Natesan S, Swaminathan S, Cutright J, editors. Antifungal susceptibility pattern of *Aspergillus fumigatus* isolated from clinical specimens in Detroit Medical Center (DMC): rising frequency of high MIC of azoles (2003–2006). The 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC); Sep; 2010. صحیح
9. Abastabar M, Rahimi N, Meis JF, Aslani N, Khodavaisy S, Nabili M, et al. Potent Activities of Novel Imidazoles Lanoconazole and Luliconazole against a Collection of Azole-Resistant and-Susceptible *Aspergillus*

fumigatus Strains. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(11):6916-6919.

10. Khodavaisy S, Badali H, Hashemi S, Aala F, Nazeri M, Nouripour-Sisakht S, et al. *In vitro* activities of five antifungal agents against 199 clinical and environmental isolates of *Aspergillus flavus*, an opportunistic fungal pathogen. J Mycol Med . 2016;26(2):116-121.
11. Nabili M, Shokohi T, Moazeni M, Khodavaisy S, Aliyali M, Badiee P, et al. High prevalence of clinical and environmental triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Iran: is it a challenging issue? J Med Microbiol. 2016;65(6):468-475.
12. Howard SJ, Webster I, Moore CB, Gardiner RE, Park S, Perlin DS, et al. Multi-azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Int J Antimicrob Agents. 2006; 28(5):450-453.
13. Badali H, Vaezi A, Haghani I, Yazdanparast SA, Hedayati MT, Mousavi B, et al. Environmental study of azole resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in the cyp51A gene in Iran. Mycoses. 2013; 56(6):659-563.
14. Lockhart SR, Frade JP, Etienne KA, Pfaller MA, Diekema DJ, Balajee SA. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance is primarily due to the TR/L98H mutation in the cyp51A gene. Antimicrobial Agents Chemother. 2011; 55(9): 4465-4468.
15. Chowdhary A, Sharma C, Kathuria S, Hagen F, Meis JF. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with the environmental TR46/Y121F/T289A mutation in India. J Antimicrob Chemother. 2014; 69(2):555-557.
16. Perea S, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillán RA, Martínez M, et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in Candida albicans strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(10):2676-2684.
17. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(6):1704-1713.
18. Lee MK, Williams LE, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. J Antimicrob Chemother. 2004; 53(2):217-224.
19. Akins RA. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans.* Med Mycol. 2005; 43(4):285-318.
20. Hedayati MT, Khodavaisy S, Alialy M, Omran SM, Habibi MR. Invasive aspergillosis in intensive care unit patients in Iran. Acta Medica (Hradec Kralove). 2013;56(2):52-56.
21. Spiess B, Seifarth W, Merker N, Howard SJ, Reinwald M, Dietz A, et al. Development of novel PCR assays to detect azole resistance-mediating mutations of the *Aspergillus fumigatus* cyp51A gene in primary clinical samples from neutropenic patients. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(7):3905-3910.
22. Khodavaisy S, Rezaie S, Ahmadi M, Hassanpour Z, Roshan R, Falahatinejad M, et

al. A Review on Molecular Typing Methods for *Aspergillus* Species. J Mazandaran Univ Med Sci. 2015;25(129):165-180.

23. Demidov VV. Rolling-circle amplification (RCA). Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics. 2005:1175-1179.

24. Fire A, Xu SQ. Rolling replication of short DNA circles. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92(10):4641-4645.

25. Daubendiek SL, Ryan K, Kool ET. Rolling-circle RNA synthesis: circular oligonucleotides as efficient substrates for T7 RNA polymerase. J Am Chem Soc. 1995; 117(29):7818-7819.

26. Chau AS , Mendrick CA, Sabatelli FJ, Loebenberg D, McNicholas PM. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(6):2124-2131.

27. Lamb DC, Kelly DE, Schunck W-H, Shyadehi AZ, Akhtar M, Lowe DJ, et al. The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14α-demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity. J Biol Chem. 1997, 272, 5682-5688.`

28. Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14α-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in Candida albicans. Microbiology. 1999;145(10):2701-2713.

29. Nilsson M. Lock and roll: single-molecule genotyping in situ using padlock probes and rolling-circle amplification. Histochem Cell Biol . 2006; 126(2):159-164.

30. Hamzehei H, Yazdanparast SA, Davoudi MM, Khodavaisy S, Golehkheyli M, Ansari S, et all . Use of rolling circle amplification to rapidly identify species of *Cladophialophora* potentially causing human infection. Mycopathologia. 2013;175 (5-6):431-438.

31. Faruqi AF, Hosono S, Driscoll MD, Dean FB, Alsmadi O, Bandaru R, et al. High-throughput genotyping of single nucleotide polymorphisms with rolling circle amplification. BMC Genomics. 2001;2:4.

32. Ladner DP, Leamon JH, Hamann S, Tarafa G, Strugnell T, Dillon D, et al. Multiplex detection of hotspot mutations by rolling circle-enabled universal microarrays. Lab Invest. 2001;81(8):1079-1086.

33. 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;9: 167.

34. Mellado E, Garcia-Effron G, Buitrago M, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela J. Targeted gene disruption of the 14-α sterol demethylase (cyp51A) in *Aspergillus fumigatus* and its role in azole drug susceptibility. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(6):2536-2538.

35. Ahmad S, Khan Z, Hagen F, Meis JF. Simple, low-cost molecular assays for TR34/L98H mutations in cyp51A gene for rapid detection of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. J Clin Microbiol .2014 ; 52(6): 2223-2227.

36. Van der Linden JW, Camps SM, Kampinga GA, Arends JP, Debets-Ossenkopp

YJ, Haas PJ, et al. Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. Clin Infect Dis. 2013; 57(4): 513-520.

37. Medrano RF, de Oliveira CA. Guidelines for the tetra-primer ARMS–PCR technique development. Mol Biotechnol. 2014; 56(7):599-608.
38. Kwok PY. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2001;2(1):235-258.
39. Little S. Amplification Refractory Mutation System (ARMS) Analysis of Point Mutations. Curr Protoc Hum Genet. 2001:Chapter 9, Unit 9.8.
40. Klaassen CH, de Valk HA, Curfs-Breuker IM, Meis JF. Novel mixed-format real-time PCR assay to detect mutations conferring resistance to triazoles in *Aspergillus fumigatus* and prevalence of multi-triazole resistance among clinical isolates in the Netherlands. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(5): 901-905.
41. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Melchers W, Verweij P, Cuenca-Estrella M, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of cyp51A alterations. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(6):1897-1904.
42. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. J Clin Microbiol. 2011;49(4):1614-1616.
43. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β-lactam antibiotics. J Clin Microbiol. 2012; 50(3):927-937.
44. Marinach C, Alanio A, Palous M, Kwasek S, Fekkar A, Brossas JY, et al. MALDI TOF MS based drug susceptibility testing of pathogens: The example of *Candida albicans* and fluconazole. Proteomics. 2009;9(20):4627-4631.
45. Rogers PD, Vermitsky JP, Edlind TD, Hilliard GM. Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata.* J Antimicrob Chemother. 2006; 58(2):434-438.
46. Oviano M, Fernandez B, Fernández A, Barba M, Mourino C, Bou G. Rapid detection of enterobacteriaceae producing extended spectrum beta lactamases directly from positive blood cultures by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. Clin Microb Infect. 2014;20(11):1146-1157.
47. Saracli MA, Fothergill AW, Sutton DA, Wiederhold NP. Detection of triazole resistance among *Candida* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Med Mycol. 2015; 53(7): 736-742.
48. Khodavaisy, S., et al. (2016). Genotyping of clinical and environmental Aspergillus flavus isolates from Iran using microsatellites. Mycoses 59(4): 220-225.