



Presence pattern of genes related to ergosterol biosynthesis in colonizing *Candida albicans* isolates from patients with multiple sclerosis

Hajar Mahmoudi¹, Fahimeh Alizadeh², Alireza Khodavandi², Maryam Rahimi Foroudi³
Elham Pishgar³

¹MSc Student, Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

²Associate Professor, Department of Biology, Gachsaran Branch, Islamic Azad University, Gachsaran, Iran.

³PhD Student, Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Multiple sclerosis is a chronic autoimmune and inflammatory disease of the central nervous system that can make patients more susceptible to fungal infections such as candidiasis, which can potentially exacerbate neuroinflammation. Candidiasis is typically treated with azole antifungals like fluconazole. However, the increasing resistance to antifungal agents presents a therapeutic challenge. This study aimed to assess fluconazole resistance and identify associated resistance genes in *Candida albicans* isolates from multiple sclerosis patients.

Materials and methods: A cross-sectional study of 30 *C. albicans* isolates from multiple sclerosis patients was conducted. The isolates were identified using phenotypic and molecular methods. Antifungal susceptibility to fluconazole was assessed using disk diffusion and broth microdilution methods following CLSI guidelines. The presence of *ERG1*, *ERG3*, and *ERG11* genes was determined through PCR.

Results: Among the *C. albicans* isolates, 10 (33.33%) were resistant, 2 (6.67%) were intermediate, and 18 (60%) were sensitive to fluconazole. The *ERG1* gene was present in all isolates, while the *ERG3* and *ERG11* genes were only found in resistant and intermediate isolates. In resistant isolates, both *ERG3* and *ERG11* genes were present at a frequency of 100%, whereas only *ERG3* was detected in intermediate isolates. A significant association was observed between the presence of these genes and antifungal resistance.

Conclusion: The presence of *ERG3* and *ERG11* genes may contribute to the development of fluconazole resistance in *C. albicans*. Further studies on gene mutations and protein alterations may aid in the development of targeted therapeutic strategies to combat drug resistance.

Key words: Multiple sclerosis, *Candida albicans*, ergosterol biosynthesis, drug resistance, *ERG* genes.

Received: 27 November 2024

Revised: 4 January 2025

Accepted: 29 November 2025

Correspondence to: Alireza Khodavandi

Tel: +98 74332331101

E-mail: khodavandi@iaug.ac.ir

Journal of Microbial World 2025, 17 (4): 248 - 259



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



الگوی حضور ژن‌های مرتبط با بیوسنتز ارگوسترول در جدایه‌های کلونیزه شده کاندید/آلبیکانوس در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروز

هاجر محمودی^۱، فهیمه علیزاده^۲، علیرضا خداوندی^{۲*}، مریم رحیمی فردی^۳، الهام پیشگر^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران. ^۲ دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد گچساران، دانشگاه آزاد اسلامی، گچساران، ایران. ^۳ دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: مولتیپل اسکلروز بیماری مزمن خودایمنی و التهابی دستگاه عصبی مرکزی است که ممکن است بیماران را مستعد عفونت‌های قارچی از جمله کاندیدیازیس کند و باعث تشدید التهاب عصبی شوند. معمولاً کاندیدیازیس با داروهای ضدقارچی آزول مانند فلوکونازول درمان می‌شود، اما افزایش مقاومت به این داروها چالش درمانی مهمی به‌شمار می‌رود. این پژوهش با هدف بررسی مقاومت به فلوکونازول و شناسایی ژن‌های مرتبط با این مقاومت در جدایه‌های کاندید/آلبیکانوس از بیماران مولتیپل اسکلروز انجام شد. **مواد و روش‌ها:** در این پژوهش مقطعی از ۳۰ جدایه کاندید/آلبیکانوس از بیماران مولتیپل اسکلروز انجام شد. شناسایی جدایه‌ها با استفاده از روش‌های فنوتیپی و مولکولی صورت گرفت. حساسیت ضدقارچی به فلوکونازول با روش‌های دیسک دیفیوژن و میکروداپلوشن براساس دستورالعمل‌های CLSI ارزیابی شد. الگوی حضور ژن‌های *ERG1*، *ERG3* و *ERG11* با روش PCR بررسی شد.

یافته‌ها: از جدایه‌های کاندید/آلبیکانوس، ۱۰ جدایه (۳۳/۳۳٪) مقاوم، ۲ جدایه (۶/۷۷٪) حدواسط و ۱۸ جدایه (۶۰٪) حساس به فلوکونازول بودند. ژن *ERG1* در تمام جدایه‌ها وجود داشت، در حالی که ژن‌های *ERG3* و *ERG11* تنها در جدایه‌های مقاوم و حدواسط شناسایی شدند. در جدایه‌های مقاوم، هر دو ژن *ERG3* و *ERG11* با فراوانی ۱۰۰٪ حضور داشتند، در حالی که در جدایه‌های حدواسط تنها *ERG3* یافت شد. ارتباط معنی‌دار بین حضور این ژن‌ها و مقاومت دارویی وجود داشت. **نتیجه‌گیری:** حضور ژن‌های *ERG3* و *ERG11* ممکن است در ایجاد مقاومت به فلوکونازول در کاندید/آلبیکانوس نقش داشته باشد. بررسی‌های بیشتر بر روی جهش‌های ژنی و تغییرات پروتئینی می‌تواند به توسعه راهکارهای درمانی هدفمند برای مقابله با مقاومت دارویی کمک کند.

کلمات کلیدی: مولتیپل اسکلروز، کاندید/آلبیکانوس، بیوسنتز ارگوسترول، مقاومت دارویی، ژن‌های *ERG*.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۱۱/۱۰

ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۱۰/۱۵

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۹/۷

مقدمه

انتقال پیام‌های عصبی و بروز علائم عصبی پیشرونده همراه است. این بیماری می‌تواند طیف گسترده‌ای از علائم مانند خستگی، بی‌حسی و عدم تعادل را ایجاد کند (۱ و ۲). شیوع مولتیپل اسکلروز در سراسر جهان رو به افزایش بوده و یکی از شایع‌ترین علل ناتوانی در جوانان محسوب می‌شود. بروز این

مولتیپل اسکلروز یک بیماری التهابی مزمن و خودایمنی سیستم عصبی مرکزی است که با تخریب غلاف میلین، اختلال در

(* آدرس برای مکاتبه: گروه زیست شناسی، واحد گچساران، دانشگاه آزاد اسلامی، گچساران، ایران.

پست الکترونیک: khodavandi@iaug.ac.ir

تلفن: ۰۷۴۳۳۳۳۳۱۱۰۱



ژن‌های مرتبط با بیوسنتز ارگوسترول *ERG1*، *ERG3* و *ERG11* در جدایه‌های کلونیزه شده *کاندیدا آلبیکانس* مقاوم و حساس به فلوکونازول، جمع‌آوری شده از بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروز، به‌منظور درک بهتر مکانیسم‌های مقاومت دارویی و ارائه راهکارهای درمانی مؤثرتر است.

مواد و روش‌ها

الف) کاندیدا آلبیکانس: در این پژوهش مقطعی از نمونه‌های آرشیوی مربوط به پژوهش پاکباز و خداوندی (۱۲)، استفاده شد. در آن پژوهش، ۳۰ جدایه *کاندیدا آلبیکانس* از نمونه‌های بزاق و واژن ۱۰۰ بیمار مبتلا به مولتیپل اسکلروز جمع‌آوری، شناسایی و در آزمایشگاه میکروب‌شناسی ویدا آزما شیراز به‌صورت آرشیوی نگهداری شده بودند. سویه مرجع حساس به فلوکونازول *کاندیدا آلبیکانس* PTCC 5027 از مرکز ذخایر ملی ژنتیک ایران تهیه شد.

ب) احیای جدایه‌های کاندیدا آلبیکانس آرشیوی: نمونه‌های آرشیوی ابتدا در محیط کشت سابرو دکستروز برات حاوی کلرامفنیکل (SDB, Merck, Germany) کشت داده شدند. کشت‌های *کاندیدا* به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و با بهم زدن ۱۵۰ rpm انکوبه شدند.

ج) شناسایی فنوتیپی جدایه‌های کاندیدا آلبیکانس: جدایه‌های کلونیزه شده *کاندیدا آلبیکانس* رشد کرده در محیط کشت SDB، به محیط کشت سابرو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (SDA, Merck) منتقل شد و با روش سه قسمتی کشت، گرمخانه‌گذاری و مرفولوژی ماکروسکوپی کلنی‌های تشکیل شده، بررسی شد. برای شناسایی اولیه کلنی‌ها از محیط کشت کروم آگار *کاندیدا* (Merck) استفاده شد. ساختار میکروسکوپی قارچ، با مشاهده تشکیل لوله زایا در سرم انسانی بررسی شد (۱۳و۱۴).

د) شناسایی مولکولی جدایه‌های کاندیدا آلبیکانس: به‌منظور شناسایی دقیق‌تر *کاندیدا آلبیکانس*، شناسایی مولکولی با روش PCR انجام شد. به‌طور خلاصه، جدایه‌های *کاندیدا آلبیکانس* روی SDB به مدت ۲۴-۴۸ ساعت کشت شدند، تا اطمینان

بیماری به تعامل پیچیده بین عوامل ژنتیکی و فاکتورهای محیطی متعددی وابسته است (۲و۳).

یکی از عوامل محیطی مؤثر بر بروز و پیشرفت مولتیپل اسکلروز، عفونت‌های میکروبی از جمله ویروسی، باکتریایی، تک‌یاخته‌ای و قارچی است که می‌توانند با تحریک سیستم ایمنی، موجب القای پاسخ‌های خودایمنی شوند (۳و۴). در این میان، عفونت‌های ناشی از *کاندیدا آلبیکانس* به دلیل نقش بالقوه آن در تشدید التهاب عصبی، مورد توجه قرار گرفته‌اند. این قارچ فرصت‌طلب در شرایط ضعف سیستم ایمنی، مانند بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروز، قادر به ایجاد عفونت‌های مخاطی و منتشره شود (۴و۵). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که عفونت‌های کاندیدیایی می‌توانند بر شدت بیماری‌های خودایمنی تأثیر گذاشته و التهاب عصبی را تشدید کنند (۴).

درمان عفونت‌های کاندیدیایی اغلب با داروهای ضدقارچی آزولی مانند فلوکونازول انجام می‌شود. این دارو با مهار آنزیم وابسته به سیتوکروم P-450، در بیوسنتز ارگوسترول اختلال ایجاد کرده و منجر به مرگ سلول قارچی می‌شود (۶-۹). با این حال، افزایش موارد مقاومت به فلوکونازول در میان گونه‌های *کاندیدا*، به‌ویژه در بیماران دارای نقص ایمنی، یک چالش مهم درمانی محسوب می‌شود (۶).

مکانیسم‌های مقاومت به فلوکونازول شامل افزایش بیان ژن‌های پمپ‌های خروجی *CDR1*، *CDR2* و *MDR1* و جهش در ژن‌های *ERG* از قبیل *ERG1*، *ERG3* و *ERG11* و تغییر در مسیرهای بیوسنتزی ارگوسترول است (۶و۱۰و۱۱). با توجه به شیوع بالای مقاومت به فلوکونازول در جدایه‌های *کاندیدا آلبیکانس* و نقش کلیدی ژن‌های مشارکت‌کننده در بیوسنتز ارگوسترول در این مقاومت، بررسی الگوی حضور ژن‌های مرتبط با بیوسنتز ارگوسترول در جدایه‌های کلونیزه شده *کاندیدا آلبیکانس* مقاوم و حساس به فلوکونازول از بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروز ضروری است. این بیماران به دلیل نقص سیستم ایمنی، مستعد ابتلا به عفونت‌های قارچی هستند و درک مکانیسم‌های مقاومت دارویی می‌تواند به بهبود راهکارهای درمانی کمک کند. هدف از این پژوهش، تعیین الگوی حضور

کاندیدا/آلبیکاناس در فاز رشد لگاریتمی در رقت $10^3 \times 2/5 - 0/5$ سلول مخمر/ میلی‌لیتر تهیه شده و در محیط کشت استریل RPMI-1640 حاوی ۲٪ گلوکز، اسید آمینه آل-گلوتامین و فنل رد، فاقد بی‌کربنات سدیم (Sigma-Aldrich) در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی (SPL Life Sciences Co., Ltd., Pocheon-si, Korea آماده شد. رقت‌های سریالی فلوکونازول از $0/3125$ تا 64 میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. سپس، میکروپلیت‌ها در دمای 35 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. کنترل مثبت شامل کاندیدا/آلبیکاناس بدون فلوکونازول و کنترل منفی شامل چاهک‌های حاوی محیط کشت بدون قارچ در نظر گرفته شد. برای تعیین MIC_{90} ، میزان جذب نوری در میکروپلیت ریدر (DA3200, DANA Co., Iran) در طول موج 530 نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج MIC فلوکونازول با استفاده از نرم‌افزار WHONET 2024 و بر اساس معیارهای CLSI تفسیر شدند. پس از تعیین MIC_{90} ، از چاهک‌ها 100 میکرولیتر روی محیط کشت SDA به روش کشت چمنی منتقل شده و به مدت 24 ساعت در انکوباتور با دمای 37 درجه سلسیوس قرار داده شدند. کمترین غلظت فلوکونازول که موجب از بین رفتن $99/9$ ٪ از سلول‌های مخمر شود، حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) شناخته می‌شود (۱۳).

و) تعیین الگوی حضور ژن‌های *ERG* در جدایه‌های کاندیدا/آلبیکاناس: به‌منظور تعیین الگوی حضور ژن‌های *ERG* در جدایه‌های حساس و مقاوم به فلوکونازول، DNA جدایه‌ها استخراج و PCR برای ژن‌های هدف انجام شد. از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) برای استخراج DNA استفاده شد. واکنش PCR با استفاده مستر میکس PCR سیناکلون (سیناکلون، شرکت تهران کاوش کلون، ایران) و پرایمرهای ژن‌های *ERG* (جدول ۱) انجام شد. برنامه PCR به شرح زیر بود: 95 درجه سلسیوس به مدت 5 دقیقه، به دنبال آن 35 تکرار 95 درجه سلسیوس به مدت 30 ثانیه، $59/2$ درجه سلسیوس به مدت 30 ثانیه و 72 درجه سلسیوس به مدت 45 ثانیه (۱۶). محصولات PCR روی ژل آگاروز 2 ٪ الکتروفورز شده و فراوانی ژن‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

حاصل شود که در فاز لگاریتمی رشد قرار دارند. پس از سانتریفوژ کردن جدایه‌ها در محیط کشت SDB (دور 10000 rpm به مدت $5-7$ دقیقه)، با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، DNA استخراج و کیفیت و کمیت این DNA با روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بررسی شد. واکنش PCR با مستر میکس PCR سیناکلون (سیناکلون، شرکت تهران کاوش کلون، ایران) و پرایمرهای یونیورسال قارچی (*ITS1-ITS4*) انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگاروز 2 ٪ الکتروفورز شد. سه نمونه تصادفی جهت توالی‌یابی و شناسایی دقیق گونه کاندیدا/آلبیکاناس به شرکت زیست فناوری پیشگام ارسال شد (۱۳).

ه) بررسی حساسیت و مقاومت جدایه‌های کاندیدا/آلبیکاناس به فلوکونازول: برای بررسی حساسیت و مقاومت دارویی جدایه‌های کاندیدا/آلبیکاناس، روش دیسک دیفیوژن و میکرودايلوشن براث بر اساس دستورالعمل‌های مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاه (CLSI, M27 M44S, 2022) انجام شد (۱۵). در روش دیسک دیفیوژن برای اطمینان از فاز لگاریتمی رشد، کشت مجدد جدایه‌های کاندیدا/آلبیکاناس بر روی محیط کشت SDA انجام شد. سوسپانسیون مخمري معادل نیم مک فارلند (رقت $10^6 \times 1 - 2$ سلول مخمر/ میلی‌لیتر) در طول موج 530 نانومتر تهیه شد و با روش Viable count تأیید شد. سوسپانسیون مخمري روی پلیت 9 سانتی‌متری محیط کشت SDA حاوی کلرامفنیکل کشت چمنی داده شد. دیسک فلوکونازول 25 میکروگرم (Himedia, Mumbai India) به فاصله $2/5$ تا 3 سانتی‌متر روی سطح آگار قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. قطر هاله عدم رشد با خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد. دیسک استریل بلانک به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. نتایج قطر هاله عدم رشد تیمار فلوکونازول با استفاده از نرم‌افزار WHONET 2024 و بر اساس معیارهای CLSI تفسیر شدند. حداقل غلظت بازدارنده (MIC) با استفاده از روش میکرودايلوشن براث تعیین شد. برای تعیین MIC فلوکونازول،

جدول ۱: پرایمرهای ژن‌های *ERG*.

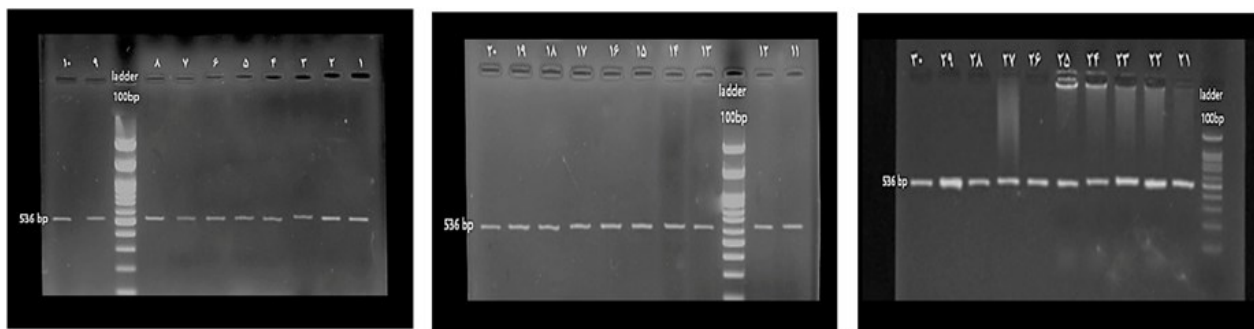
اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر (5' → 3')	ژن
84	ACTAATGTTCCACCATTGGCTCT	<i>ERG1</i> Forward
	CACATGACCTTTGCCCTTAGCT	<i>ERG1</i> Reverse
179	TCCAGTTGATGGGTTCTTCC	<i>ERG3</i> Forward
	GGACAGTGTGACAAGCGGTA	<i>ERG3</i> Reverse
163	TTGGTGGTGGTAGACATA	<i>ERG11</i> Forward
	TCTGCTGGTTCAGTAGGT	<i>ERG11</i> Reverse

فراوانی ژن‌ها استفاده شد. سطح معنی‌داری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شده است. تمامی آزمایش‌ها حداقل در سه تکرار انجام شد. GraphPad Prism (نسخه ۱۰) برای تمام تحلیل‌های آماری استفاده شد.

یافته‌ها

شناسایی فنوتیپی بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی انجام شد که شامل تولید کلنی‌های کرم‌رنگ ماهواره‌ای بر روی محیط کشت SDA، تشکیل کلنی‌های سبزرنگ در محیط کروم آگار کاندیدا/ و تولید لوله زایا بود. تأیید نهایی گونه‌ها از طریق تکنیک PCR و با استفاده از پرایمرهای یونیورسال قارچی ITS1 و ITS4 انجام شد که منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول ۵۳۶ جفت‌باز شد (شکل ۱). تحلیل BLAST توالی‌های به‌دست‌آمده در پایگاه NCBI نشان داد که این جدایه‌ها به کاندیدا/آلبیکاناس تعلق دارند و توالی‌های مربوطه تحت شماره‌های دسترسی PV235044 و PV235045 در بانک جهانی ژن ثبت شدند.

ز) تحلیل آماری: نرمال بودن داده‌ها با آزمون‌های داگوستینو، اندرسون-دارلینگ و کولموگروف-اسمیرنوف ارزیابی شد. داده‌های ناپارامتریک با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه کروسکال-والیس و آزمون مقایسه چندگانه دان تجزیه و تحلیل شدند. تحلیل بلاند-آلتن برای ارزیابی توافق بین دو روش حساسیت‌سنجی دیسک دیفیوژن و میکرودايلوشن براث بکار گرفته شد. آزمون کای-اسکور برای محاسبه تفاوت معناداری



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR با پرایمرهای یونیورسال قارچی ITS1 و ITS4 در ۳۰ جدایه کاندیدا/آلبیکاناس و تکثیر قطعه ۵۳۶ جفت‌بازی.

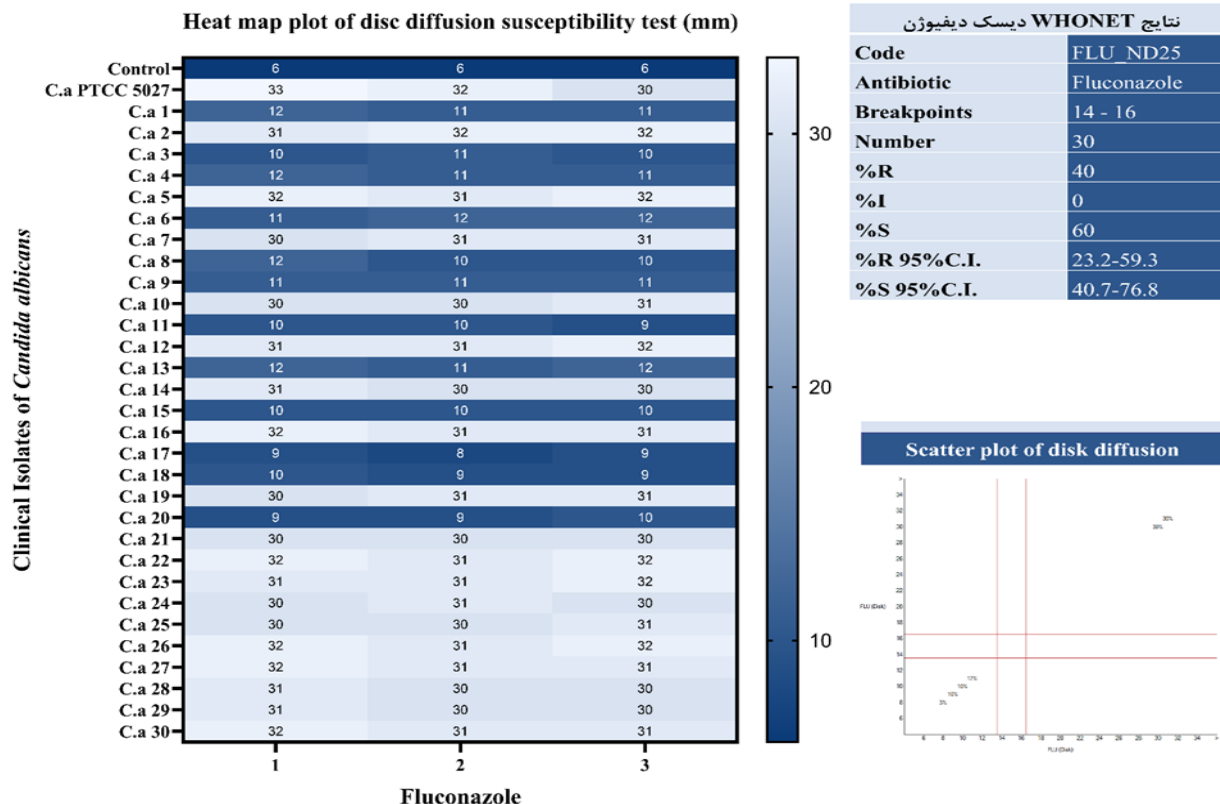
تیره‌تر و جدایه‌های حساس رنگ آبی روشن‌تری داشتند. به‌منظور بررسی دقیق‌تر حساسیت به فلوکونازول، آزمایش میکرودايلوشن براث طبق دستورالعمل‌های CLSI نیز انجام شد. نتایج این روش نشان داد که ۱۰ جدایه (۳۳/۳۳٪) مقاوم، ۲ جدایه (۶/۷۷٪) حدواسط و ۱۸ جدایه (۶۰٪) حساس بودند. دامنه MIC فلوکونازول در این جدایه‌ها بین ۰/۱۲۵ تا ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود. آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه در شکل ۳ نشان داد که تفاوت معناداری بین میزان

بررسی حساسیت ضد میکروبی با روش دیسک دیفیوژن نشان داد که حساسیت جدایه‌های کاندیدا/آلبیکاناس به فلوکونازول متغیر بوده و از ۳۰ جدایه، ۱۲ جدایه (۴۰٪) مقاوم و ۱۸ جدایه (۶۰٪) حساس بودند. تجزیه و تحلیل نرم‌افزار WHONET نشان داد که فاصله اطمینان ۹۵٪ برای جدایه‌های مقاوم ۲۳/۲ تا ۵۹/۳٪ و برای جدایه‌های حساس ۴۰/۷ تا ۷۶/۸٪ بود. نقشه حرارتی اثر فلوکونازول (شکل ۲) تفاوت‌های مشخصی را در الگوی مقاومت نشان داد، به‌طوری‌که جدایه‌های مقاوم رنگ آبی

می‌شود، چراکه کاهش اثربخشی این دارو ممکن است منجر به مزمن شدن عفونت، افزایش شدت بیماری و در نهایت، شکست درمانی شود (۴-۶).

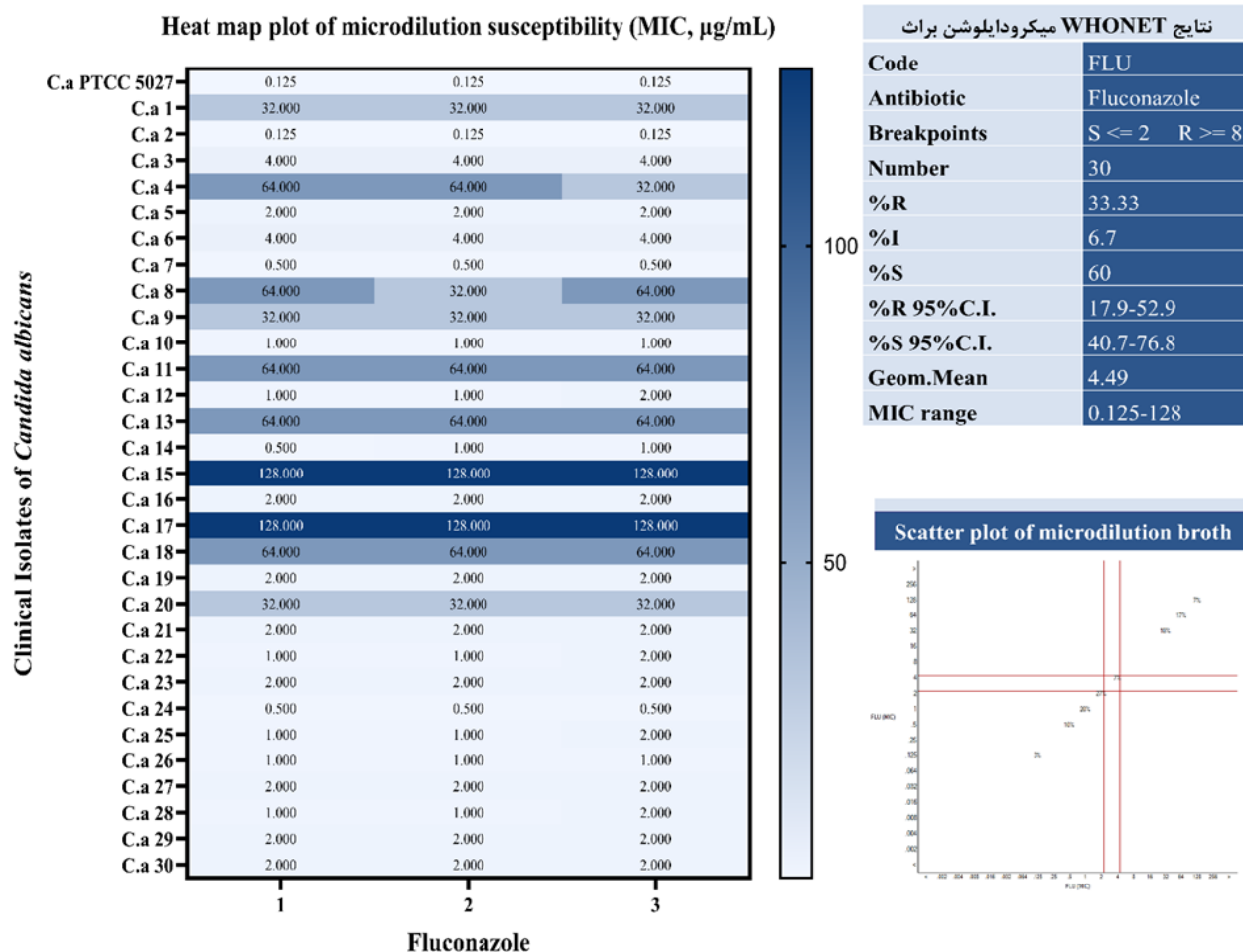
بررسی حضور ژن‌های *ERG1*، *ERG3* و *ERG11* از طریق آزمون PCR انجام شد. نتایج الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز، باندهایی با اندازه ۸۴، ۱۷۹ و ۱۶۳ جفت‌باز را برای ژن‌های *ERG1*، *ERG3* و *ERG11* نشان داد (شکل ۵). آنالیز نتایج نشان داد که ژن *ERG1* در تمامی جدایه‌های کاندیدا/آلبیکانوس (۱۰۰٪) حضور داشت. در حالی که ژن‌های *ERG3* و *ERG11* تنها در جدایه‌های مقاوم و حدواسط مشاهده شدند. تحلیل کای-اسکوئر نشان داد که تفاوت معنی‌داری در حضور این ژن‌ها در میان جدایه‌های مقاوم و حساس وجود دارد ($p < 0.0001$). در جدایه‌های مقاوم، هر دو ژن *ERG3* و *ERG11* با میزان ۱۰۰٪ حضور داشتند. در جدایه‌های حدواسط، تنها ژن *ERG3* شناسایی شد.

MIC در جدایه‌های مقاوم، حدواسط و حساس به فلوکونازول وجود دارد ($p < 0.0001$). علاوه بر این، آزمون حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) نیز نتایج MIC را تأیید کرد (شکل ۴). دامنه MFC در جدایه‌های کاندیدا/آلبیکانوس مورد بررسی بین ۲ تا ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود ($p < 0.0001$). این یافته‌ها نشان داد که جدایه‌های مقاوم، علاوه بر داشتن مقادیر MIC بالا، دارای MFC بالاتری نیز بودند که نشان‌دهنده کاهش اثربخشی فلوکونازول در این نمونه‌ها است. به منظور ارزیابی میزان همخوانی بین دو روش دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن براث، از تحلیل بلاند-آلتمن استفاده شد. این تحلیل نشان داد که میزان توافق بین این دو روش پایین است و میکرودایلوشن براث دقت بیشتری در شناسایی مقاومت دارویی دارد. علت این اختلاف ممکن است به حساسیت کمتر روش دیسک دیفیوژن در شناسایی جدایه‌های دارای مقاومت حدواسط نسبت داده شود.



شکل ۲: نقشه حرارتی تاثیر فلوکونازول بر جدایه‌های کاندیدا/آلبیکانوس به روش دیسک دیفیوژن. رنگ آبی تیره نشان‌دهنده مقاومت و آبی روشن نشان‌دهنده حساسیت به فلوکونازول است.

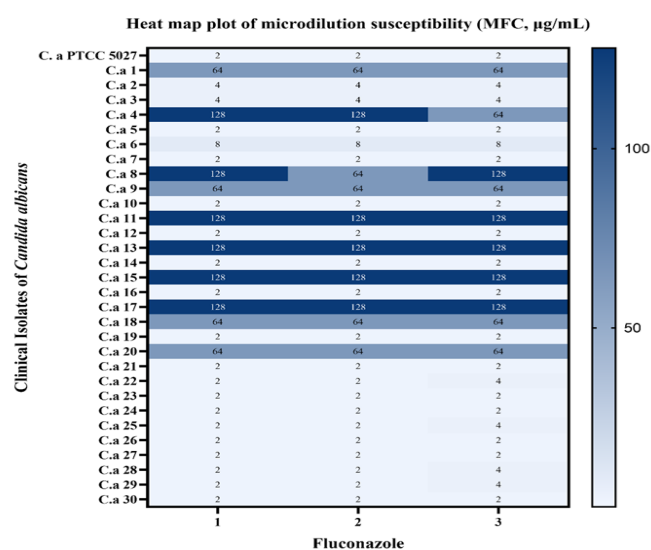
دنیای میکروب‌ها، سال هفدهم شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۳. بیوستز ارگوسترول در کاندیدا/آلبیکانس جدا شده از بیماران مولتیپل اسکلروز. فهیمه علیزاده و همکاران.



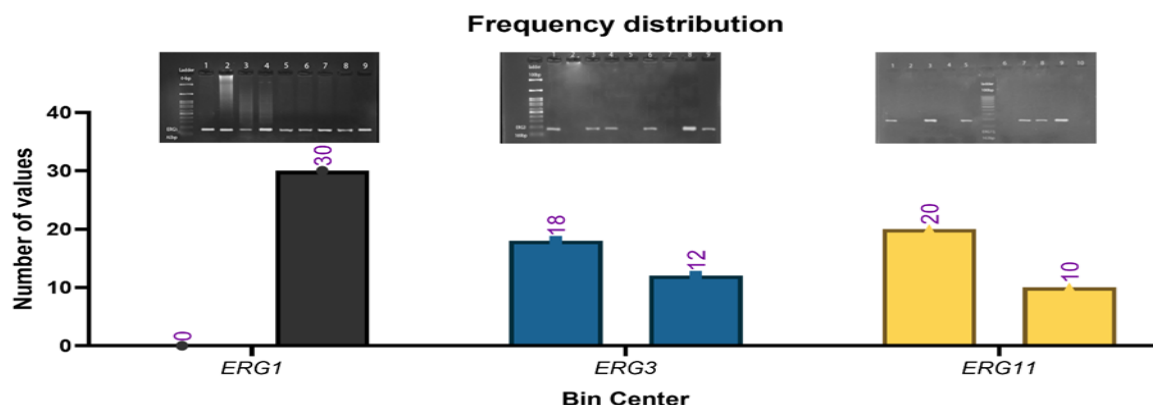
شکل ۳: نقشه حرارتی تاثیر فلوکونازول بر جدایه‌های کاندیدا/آلبیکانس به روش میکرودايلوشن برات. رنگ آبی تیره نشان‌دهنده مقاومت و آبی روشن نشان‌دهنده حساسیت به فلوکونازول است.

بحث

مخمر کاندیدا/آلبیکانس یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های قارچی فرصت‌طلب در افراد دارای نقص ایمنی محسوب می‌شود. شیوع این عفونت‌ها در سال‌های اخیر به دلیل افزایش استفاده از داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی، افزایش بیماران مبتلا به بیماری‌های خودایمنی و استفاده گسترده از داروهای ضدقارچی، به‌ویژه در بیماران بستری در بیمارستان‌ها، به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است. در این میان، فلوکونازول به‌عنوان یکی از پرکاربردترین داروهای ضدقارچی در درمان عفونت‌های کانیدیایی، نقش کلیدی ایفا می‌کند. بااین‌حال، ظهور و گسترش سویه‌های مقاوم به فلوکونازول، چالش‌های بزرگی را در کنترل این عفونت‌ها ایجاد کرده است.



شکل ۴: نقشه حرارتی تاثیر فلوکونازول بر جدایه‌های کاندیدا/آلبیکانس بر اساس حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC).



شکل ۵: الگوی حضور و توزیع فراوانی ژن‌های مرتبط با بیوسنتر ارگوسترول *ERG1*، *ERG3* و *ERG11* در جدایه‌های کلونیزه شده کاندیدا/آلبیکانوس از بیماران مبتلا به مولتیپل اسکروز.

ERG3 ممکن است در تنظیم مسیرهای جایگزین بیوسنتز استرول و افزایش مقاومت نقش داشته باشد (۱۹ و ۲۰). پژوهش Hoseinnejad و همکاران نشان داده است که قرارگیری کاندیدا/آلبیکانوس در معرض آزل‌ها منجر به افزایش بیان ژن‌های *ERG2* و *ERG11* می‌شود که این افزایش بیان، با کاهش حساسیت به فلوکونازول همراه بوده است (۲۰).

در پژوهش حاضر، ۳۰ جدایه کلونیزه شده کاندیدا/آلبیکانوس که از بیماران مبتلا به مولتیپل اسکروز جمع‌آوری شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج آن با پژوهش‌های قبلی نیز هم‌خوانی دارد. پژوهش Zarinnezhad و همکاران نشان داد که بیماران مبتلا به مولتیپل اسکروز در مقایسه با افراد سالم، شیوع بالاتری از کلونیزاسیون قارچی در سرم خود دارند (۲۱). این یافته‌ها احتمال ارتباط ضعف سیستم ایمنی و مصرف داروهای سرکوب‌کننده ایمنی را با افزایش حساسیت این بیماران به عفونت‌های قارچی تأیید می‌کند.

با استفاده از روش‌های استاندارد حساسیت‌سنجی ضدقارچی، مشخص شد که ۴۰٪ از جدایه‌های کلونیزه شده کاندیدا/آلبیکانوس نسبت به فلوکونازول مقاوم بودند. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که مقاومت دارویی به فلوکونازول در میان جدایه‌های کاندیدا/آلبیکانوس، به‌ویژه در بیماران مولتیپل اسکروز، در حال افزایش است. با توجه به این موضوع، پایش مستمر مقاومت ضدقارچی و بررسی مکانیسم‌های مولکولی

مقاومت دارویی به فلوکونازول یکی از مهم‌ترین مشکلات مدیریت عفونت‌های قارچی است، به‌ویژه در بیماران با نقص ایمنی مانند مبتلایان به مولتیپل اسکروز که به دلیل مصرف طولانی‌مدت داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی، مستعد عفونت‌های قارچی هستند (۴ و ۱۷). مطالعات نشان داده‌اند که بیماران مبتلا به مولتیپل اسکروز دارای اختلال در تنظیم سیستم ایمنی بوده و این امر می‌تواند منجر به افزایش کلونیزاسیون و عفونت‌های فرصت‌طلب ناشی از گونه‌های کاندیدا شود. از طرفی، مقاومت دارویی کاندیدا/آلبیکانوس در برابر فلوکونازول چالش درمانی جدی در این بیماران محسوب می‌شود، چراکه کاهش اثربخشی این دارو ممکن است منجر به مزمن شدن عفونت، افزایش شدت بیماری و در نهایت، شکست درمانی شود (۴-۶).

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که مقاومت به فلوکونازول در کاندیدا/آلبیکانوس می‌تواند به دلایل مختلفی از جمله جهش‌های ژنتیکی، تغییرات در میزان بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز ارگوسترول و افزایش فعالیت پمپ‌های افلاکس باشد. بررسی‌ها نشان داده‌اند که ژن‌های *ERG*، که در مسیر بیوسنتز ارگوسترول نقش دارند، تأثیر مهمی در مقاومت دارویی دارند (۱۸). جهش یا افزایش بیان ژن *ERG11* که مسئول کدگذاری آنزیم لانسترول ۱۴-دمتیل‌لاز است، می‌تواند منجر به کاهش حساسیت به فلوکونازول شود. همچنین، تغییر در بیان ژن

علاوه بر این، نتایج نشان می‌دهد که *ERG11* نقش مهم‌تری در مقاومت به فلوکونازول دارد. ژن *ERG11* که مسئول کدگذاری آنزیم لانسترول ۱۴-دمتیلاز است، هدف اصلی فلوکونازول محسوب می‌شود، و جهش‌ها یا افزایش بیان *ERG11* می‌توانند منجر به کاهش حساسیت قارچ به دارو شوند (۱۰). پژوهش‌های قبلی نیز جهش‌های خاصی را در این ژن گزارش کرده‌اند که منجر به کاهش حساسیت قارچ به فلوکونازول شده است (۲۵ و ۲۶).

نتیجه‌گیری

با توجه به شیوع مقاومت دارویی در کاندیدا/آلبیکاناس و تأثیر آن بر بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروز، بررسی مکانیسم‌های مولکولی مقاومت و شناسایی ژن‌های درگیر اهمیت ویژه‌ای دارد. یافته‌های این پژوهش نشان داد که مقاومت به فلوکونازول در بیماران مولتیپل اسکلروز، به‌ویژه ارتباط آن با حضور ژن *ERG11*، قابل توجه است. این موضوع بر ضرورت توسعه راهکارهای درمانی جدید، پایش دقیق مقاومت دارویی و بررسی سایر ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی در این بیماران تأکید دارد. نتایج این پژوهش نشان داد که تعیین الگوی حضور ژن‌های مرتبط با بیوستز ارگوسترول می‌تواند به توسعه راهکارهای درمانی مؤثرتر منجر شود. علاوه بر این، درک بهتری از مکانیسم‌های مقاومت به فلوکونازول ایجاد کرده و به طراحی درمان‌های هدفمند در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروز که مستعد عفونت‌های قارچی هستند، کمک کند.

تأییدیه اخلاقی

این پژوهش با رعایت اصول مندرج در بیانیه هلسینکی ۲۰۲۱ انجام شد و تأییدیه اخلاقی از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز (IR.IAU.SHIRAZ.REC.1399.032) اخذ شد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

مقاومت به داروها برای انتخاب درمان‌های مؤثرتر، ضروری به نظر می‌رسد (۲۲). علاوه بر بررسی حساسیت دارویی، توزیع ژن‌های *ERG1*، *ERG3* و *ERG11* در جدایه‌های مقاوم و حساس تحلیل شد. نتایج نشان داد که در جدایه‌های مقاوم، هر سه ژن *ERG1*، *ERG3* و *ERG11* حضور داشتند، درحالی‌که در جدایه‌های حساس، تنها ژن *ERG1* شناسایی شد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ژن‌های *ERG3* و *ERG11* در جدایه‌های مقاوم فعال بوده و احتمالاً نقش کلیدی در افزایش مقاومت به فلوکونازول دارند. پژوهش‌های زیادی ارتباط بین ژن *ERG11* و مقاومت به فلوکونازول را نشان داده‌اند (۱۸ و ۲۳). پژوهش‌های مشابهی نیز افزایش مقاومت کاندیدا/آلبیکاناس به فلوکونازول را گزارش کرده‌اند. پژوهش Pfaller و همکاران (۲۰۲۲) نشان داد که مقاومت گونه‌های کاندیدا به فلوکونازول در سال‌های اخیر به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است، به‌طوری‌که میزان مقاومت در برخی مناطق تا ۴۵٪ گزارش شده است. این افزایش مقاومت احتمالاً نتیجه جهش‌های ژنی و یا بیان بیش از حد *ERG11* است که در نهایت موجب کاهش اثربخشی درمان‌های آزولی می‌شود (۱۸). بررسی‌های ژنتیکی نشان داده‌اند که جهش در ژن *ERG11* می‌تواند از اتصال فلوکونازول به آنزیم ۱۴-دمتیلاز جلوگیری کند. این امر موجب حفظ بیوستز ارگوسترول و افزایش مقاومت قارچ به دارو می‌شود. پژوهش Fattouh و همکاران نشان داد که جهش‌های ژنی در *ERG11* می‌تواند باعث افزایش تولید ارگوسترول در غشای پلاسمایی شوند. در پژوهش آن‌ها، جدایه‌های مقاوم به فلوکونازول میزان ارگوسترول بیشتری داشتند که این افزایش، با کاهش حساسیت به داروهای آزولی همراه بود (۲۳). علاوه بر این، جهش‌ها و تنظیمات متفاوت در مسیرهای بیوشیمیایی قارچ‌ها ممکن است امکان ایجاد مکانیسم‌های جایگزین سنتز استرول‌ها را فراهم کنند که به مقاومت در برابر آزول‌ها منجر می‌شود (۲۴). افزایش توزیع فراوانی ژن‌های *ERG3* و *ERG11* در این مطالعه نشان می‌دهد که این ژن‌ها می‌توانند هدف مهمی برای شناسایی و پایش مقاومت دارویی در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروز باشند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز و آزمایشگاه میکروپوشناسی ویدا آزما شیراز انجام شده است. بدین وسیله از مسئولین این مراکز تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Belousov AN, Belousova EY, Mysyk AV. Exploring the clinical impact of magnetite nanoparticles in a multifaceted approach to treating multiple sclerosis. Arch Immunol Res Ther. 2024; 3(1).
2. Mok N, Knox NC, Zhu F, Arnold DL, Bar-Or A, Bernstein CN, Bonner C, Forbes JD, Graham M, Marrie RA, O'Mahony J. The fungal gut microbiota in pediatric-onset multiple sclerosis. Front Microbiol. 2024; 15: 1258978.
3. Kapel-Reguła A, Duś-Ilnicka I, Radwan-Oczko M. Relevance of saliva analyses in terms of etiological factors, biomarkers, and indicators of disease course in patients with multiple sclerosis—a review. Int J Mol Sci. 2024; 25(23): 12559.
4. Kettunen P, Koistinaho J, Rolova T. Contribution of CNS and extra-CNS infections to neurodegeneration: a narrative review. J Neuroinflammation. 2024; 21(1): 152.
5. Nezam Zadeh F, Esmaeilkhani A, Sedighi M, Amirmozafari N, Rahbar M, Soleiman-Meigooni S, Zahedi Bialvaei A. Latent microbial infections leading to myelin and axonal damage in multiple sclerosis: a narrative review. Curr J Neurol. 2024.
6. Seyedjavadi S, Hatami F, Jahanshiri Z. Antifungal resistance in *Candida albicans*. In: *Candida albicans* - Epidemiology and Treatment. IntechOpen; 2024.
7. Singh SK, Pancholi SS. Current updates on pathogenesis, systemic therapy, and treatment of invasive fungal infections. Curr Drug Targets. 2025; 26(3): 203–220.
8. Faghih Nasiri Y, Momeni Z, Talebi S. *In vitro* comparative survey of the effect of aqueous and alcoholic extracts of Rosa canina hips on *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans*. J Microb World. 2024; 17(2): 84–95.
9. Khademi P, Ranji N, Rahnamay Roodposhti F. Mutations in hotspot regions of *ERG11* gene in fluconazole resistant isolates of *Candida albicans* in Guilan province, northern Iran. Mol Genet Microbiol Virol. 2017; 32: 241–245.
10. Eliaš D, Tóth Hervay N, Gbelská Y. Ergosterol biosynthesis and regulation impact the antifungal resistance and virulence of *Candida* spp. Stresses. 2024; 4(4).
11. Majdi M, Khazaei Koohpar Z, Nasrolahi Omran A. Investigation of mutations in hotspot regions of *ERG11* gene in fluconazole-resistant isolates of *Candida albicans* in the west of Mazandaran. J Microb World. 2018; 11(3): 258–268.
12. Pakbaz Parasto. 2019 Frequency of genes involved on hyphae formation of *Candida albicans* in patients with multiple sclerosis. Islamic Azad University of Shiraz.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. 3rd ed. CLSI document M27M44S; 2022.
14. Khodavandi A, Alizadeh F, Shahinipor M. Relative quantitation of hyphae-specific gene *HWP1* expression in inhibition of *Candida albicans* biofilm. J Microb World. 2016; 9(26): 22–23.

15. Esfahani MB, Khodavandi A, Alizadeh F, Bahador N. Possible molecular targeting of biofilm-associated genes by nano-Ag in *Candida albicans*. Appl Biochem Biotechnol. 2024; 196(7): 4205–4233.
16. Khodavandi A, Alizadeh F, Vanda NA, Karimi G, Chong PP. Possible mechanisms of the antifungal activity of fluconazole in combination with terbinafine against *Candida albicans*. Pharm Biol. 2014; 52(12): 1505–1509.
17. Klimas F, Zatlóka-Mazur D, Rusiński K, Zajac P, Pawłowski B, Sienkiewicz M, Potoczek A, Zięba Z, Pudełko I. Fungal infections: epidemiology, clinical challenges, and advances in diagnosis and treatment—a review. Qual Sport. 2025; 38: 57928.
18. Pfaller MA, Carvalhaes CG, DeVries S, Huband MD, Castanheira M. Elderly versus nonelderly patients with invasive fungal infections: species distribution and antifungal resistance, SENTRY antifungal surveillance program 2017–2019. Diagn Microbiol Infect Dis. 2022; 102(4): 115627.
19. Yu P, Zhou M, Yu D, Zhang Z, Ye S, Yu Y, Sun X, Li S, Hu C. Targeted regulation of sterol biosynthesis genes according to perturbations in ergosterol biosynthesis in fungi. J Adv Res. 2025.
20. Hoseinnejad A, Mahdizade AH, Erfaninejad M, Kermani F, Ghazanfari M, Arbabi A, Bahreiny SS, Bozorgomid A, Moradi M, Haghani I, Abastabar M. Insights into the structure, function, and impact of *Candida albicans* *UPC2* gene on azole resistance; a mini-review. Curr Med Mycol. 2025; 10(Continuous): 1–7.
21. Zarinnezhad A, Shahhoseini MH, Piri Gharaghie T. Evaluating the relative frequency of fungal infections in the serum of patients with multiple sclerosis and healthy subjects using PCR. J Microb Biol. 2021; 10(37): 37–50.
22. Kermani F, Taghizadeh-Armaki M, Hosseini SA, Amirrajab N, Javidnia J, Zaghrami MF, Shokohi T. Antifungal resistance of clinical *Candida albicans* isolates in Iran: a systematic review and meta-analysis. Iran J Public Health. 2023; 52(2): 290.
23. Fattouh N, Hdayed D, Geukgeuzian G, Tokajian S, Khalaf RA. Molecular mechanism of fluconazole resistance and pathogenicity attributes of Lebanese *Candida albicans* hospital isolates. Fungal Genet Biol. 2021; 153: 103575.
24. Zhu Q, Wijnants S, Feil R, Van Genechten W, Vergauwen R, Van Goethem O, Lunn JE, Van Ende M, Van Dijck P. The stress-protectant molecule trehalose mediates fluconazole tolerance in *Candida glabrata*. Antimicrob Agents Chemother. 2025; e01349-24.
25. Balabandi S, Khazaei-Koohpar Z, Ranji N. Correlation between *ERG11* gene mutations and fluconazole resistance in *Candida albicans* strains isolated from Rasht in 2015–2016 years. J Arak Univ Med Sci. 2017; 20(7): 13–22.
26. Farahbakhsh E, Yadegari MH, Rajabi Bazl M, Taghizadeh Armaki M, Katiraei F. Identification of fluconazole resistance gene *ERG11* in clinical *Candida albicans* samples isolated from HIV-infected patients by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). Daneshvar Med. 2020; 19(5): 19–28.