(مقاله پژوهشی)

# جداسازی مولکولی و همسانه سازی ژن انتقالی پس زننده (*Efflux*) کاست ژنومی (*ABC*) از *تریکوفایتون روبروم*

نازیلا کامکار[۱]، کیومرث امینی[۲*]، منصور بیات[۳]، صدیقه مهرابیان[۴]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی.
۲-دانشیار گروه میکروبیولوژی.
۳-استاد گروه پاتوبیولوژی.
۴-استاد گروه بیولوژی.

۱-گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، داشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲-گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
۳-گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات ، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۴-گروه بیولوژی، واحد تهران شمال، داشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول:
کیومرث امینی؛ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
**تلفن:** ۰۰۹۸۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴
Email: Kamini@iau.saveh.ac.ir

**زمینه و هدف:** خانواده *ABC* ترانسپورترها در قارچ‌ها علاوه بر ایفای نقش در تقسیم سلولی و نگهداری حجم سلول در خروج متابولیت های طبیعی و مقاومت دارویی، نیز نقش مهمی دارد. هدف از انجام این تحقیق جداسازی مولکولی و همسانه سازی ژن انتقالی پس زننده *(Efflux)* کاست ژنومی *(ABC) تریکوفایتون* روبروم خواهد بود.
**روش بررسی:** در این مطالعه ۶۰ نمونه درماتوفیتوزیس از بیماران جداسازی و با روشهای میکروسکوپی، شیمیایی و مولکولی تایید گردیدند. پس از تایید *تریکوفیتون* در مرحله بعدی آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به *کاست ژنی ABC* صورت گرفت. قطعه ژنی *ABC* در وکتور PTG19 کلون و تایید گردید. بیان کاست *ژنومی ABC* با روش Real-Time PCR سنجیده شد.
**یافته‌ها:** از ۶۰ نمونه جداسازی شده در مجموع ۱۲ ایزوله *تریکوفیتون روبروم* جداسازی شد. از ۱۲سویه *تریکوفایتون* جدا شده، ۶ سویه حامل ژن *ABC* بودند.توسط آزمون Colony *PCR* حضور ژن مورد نظر تایید و در نهایت بیان و تکثیر ژن *ABC* کلون شده در باکتری *اشریشیاکلی* از طریق *Real time PCR* تایید شد.
**نتیجه گیری:** یکی از پایدار ترین راه های مقاومت به آنتی بیوتیک ها در میکروارگانیسم بیان افلوکس پمپ ها می باشد. در این راستا محققان ترکیبات مهارکننده افلوکس پمپ ها را تولید کردند و از ترکیب آن ها با آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت ها استفاده می کنند؛ اما به دلیل سمیت اکثر این ترکیبات در انسان استفاده گسترده از آن ها ممنوع می باشد از این رو چالش جدید،یافتن ترکیبات مهارکننده جدید با سمیت کمتر است.

**واژگان کلیدی:** تریکوفایتون روبروم، افلاکس پمپ( ABC)، مقاومت دارویی.

**دریافت مقاله:** ۱۳۹۸/۱۰/۱۴ **دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده:** ۱۳۹۹/۴/۳۰ **اعلام قبولی:** ۱۳۹۹/۵/۲۷

## مقدمه

درماتوفیت‌ها دسته ای از قارچ های کراتینوفیلیک می باشند که از نظر خصوصیات ساختمانی شباهت زیادی به یکدیگر دارند. تاکنون بیش از ۴۰ گونه درماتوفیت شناخته شده است که مجموعا در ۳ جنس طبقه‌بندی می‌شوند *میکروسپوروم، تریکوفیتون و اپیدرموفیتون. تریکوفیتون روبروم* شایعترین گونه‌های عامل درماتوفیتوزیس در سراسر جهان می‌باشند(۱). *تریکوفیتون روبروم* قارچ انسان دوست با انتشار جهانی است. این درماتوفیت یکی از عوامل مهم عفونت‌های انسان به شمار می‌رود(۲). *تریکوفیتون روبروم* عامل کچلی های بدن و به طور فراوان عامل کچلی پا و ناخن می باشد(۳). این قارچ به ندرت از عفونت های زیر جلدی و سیستمیک جدا شده است. تشخیص عفونت ناخن ناشی از ترایکوفیتون ها از جمله روبروم بسیار دشوار است و می‌تواند درمان را ماه‌ها به تأخیر بیاندازد یا در بعضی موارد، امکان دارد به صورت مزمن درآمده و به درمان مقاوم شود. برخلاف دیگر قارچ ها، درماتوفیت‌ها در کسانی که عملکرد ایمنی بدن آن ها مختل شده است نیز مشاهده می شوند. مطالعات نشان می دهد که ۱۰–۲۰ ٪ از جمعیت جهان دارای عفونت های درماتوفیتی هستند که ۸۰٪ آن ها ناشی از این قارچ می باشد(۴).

در حال حاضر درمان عفونت های قارچی پوست به دو شکل موضعی و سیستمیک می‌باشد، درمان‌های موضعی برای عفونت های پوستی بدون کرک و همچنین پا مناسب می‌باشد، اگر چه عود عفونت، همزمان با درمان به خصوص برای *ترایکوفایتون روبروم* شایع است. داروهای ضد قارچی سیستمیک برای عفونت های درماتوفیت شدید از جمله ناخن، پوست سر و پا که پاسخ به درمان موضعی به تنهایی موثر نمی باشد، تجویز می شود(۵). بهرحال هر دو مسیر درمانی در صد موفقیت پایینی دارند. با وجود فقدان راهبردهای تشخیصی و درمانی موثر، شیوع بالا عفونت های درماتوفیت، تبعات اقتصادی و کاستی‌هایی در امر پژوهش با هدف درک مکانیسم عفونت، بررسی های ژنومی این گروه بسیار شایع بیماری قارچی را برجسته می کند. *میکروسپوروم کنیس* از اهمیت خاصی در شناسایی و تعیین توالی ژنومی برخوردار هستند(۶).

سیستم‌های افلوکس پمپ علاوه بر باکتری‌ها در سلول های قارچی نیز وجود دارد. افلوکس پمپ ها نه تنها باعث افزایش میزان MIC آنتی بیوتیک ها می‌شود بلکه با کاهش غلظت دارو در داخل سلول منجر به ایجاد سویه های موتانت مقاوم در باکتری ها می‌گردند. در این راستا محققان ترکیبات مهارکننده افلوکس پمپ ها را تولید کردند و از ترکیب آنها با آنتی بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌ها باکتریایی استفاده می‌کنند؛ اما به دلیل سمیت اکثر این ترکیبات در انسان، استفاده گسترده از آنها ممنوع می باشد از این رو چالش جدید، یافتن ترکیبات مهارکننده با سمیت کمتر یا بدون سمیت است(۷, ۸).

پمپ افلاکس مقاومت چندگانه که وابسته به هیدرولیز ATP است سبب ایجاد مقاومت نسبت به طیف گسترده‌ای از ترکیبات از جمله عوامل شیمی درمانی مورد استفاده جهت درمان سرطان می‌شود. در دهه‌های اخیر به طور گسترده‌ای مقاومت به واسطه پمپ‌های افلاکس مقاومت چندگانه گزارش شده است(۷).

در تمامی این خانواده‌ها، سیستم افلاکس دارو وابسته به انرژی فعال بوده و از انرژی ATP و یا نیروی انتقال پروتون استفاده می‌کنند. سیستم افلاکس ABC وابسته به هیدرولیز ATP (انتقال فعال اولیه) می‌باشد (ATP-binding cassette (ABC) transporters). خانواده ABCترانسپورتر علاوه بر افلوکس متابولیت های طبیعی و مقاومت دارویی، در تقسیم سلولی و نگهداری حجم سلول نیز نقش دارد(۹).

پمپ‌های *ABC* در حضور داروهای مختلف، بیان های متفاوتی دارند. استفاده از ره یافت‌های جدید درمانی مانند نانوتکنولوژی، با تبدیل دارو به ابعادی کوچک در حد نانو جهت افزایش اثرات ضد قارچی آنها، و همچنین تأثیر بر روی بیان ژن مورد نظر، که بتواند حساسیت را بالا برده

و مقاومت دارویی را کاهش دهد، می‌توانند جایگزین مناسبی برای داروهای فعلی باشد(۷, ۱۰, ۱۱).

## روش بررسی

نمونه برداری:

از ۶۰ بیمار مبتلا به عفونت‌های قارچی جلدی مراجعه کننده به بیمارستان در شهر تهران، نمونه برداری از مو و ضایعات پوست، ناخن صورت گرفت. بیمار نبایستی از حدود یک هفته قبل از نمونه برداری حمام کرده یا از داروهای خوراکی یا موضعی استفاده کرده باشد.

تست های بیوشیمیایی جهت شناسایی و جداسازی تریکوفایتون روبروم

نمونه‌های مو و پوست بر روی محیط سابورود دکستروز آگار محتوی کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید طبق دستورالعمل کشت داده شد. پلیت‌ها در ۲۵ درجه سانتی گراد برای ۴ هفته انکوبه شدند. قارچ های جدا شده بر روی محیط کشت سابورود دکستروز جدید و محیط کورن میل آگار جهت کونیدی زایی آنها کشت مجدد شدند. و در صورت لزوم از هیدرولیز اوره و تست سوراخ کردن مو و ایجاد پیگمان برروی محیط کورن میل آگار هم استفاده گردید(۳۶).

بررسی مورفولوژیکی

به منظور بررسی شکل کلی و بررسی‌های مورفولوژیکی ماکروسکوپی شامل میزان رشد، رنگ کلنی سطح و پشت کلنی، (ظاهر کلنی اندازه و شکل) در محیط سابورود دکستروز آگار و محیط افتراقی و مغذی، سابورود دکستروز آثار حاوی عصاره ی برنج و همچنین محیط اختصاصی، سابورود دکستروز آگار با سیکلو هگزیمیل و کلرامفنیکل به صورت نشا کشت شدند و سپس در دماهای مختلف متناسب با گونه ی درماتوفیت مورد مطالعه در مدت زمان مشخص انکوبه گردید.

تهیه توده میسلیومی از درماتوفیت های مورد مطالعه

از کلنی ایزوله‌های جداسازی و شناسایی شده *ترایکوفایتون روبروم* بر روی محیط کشت های سابارو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید سابارو دکستروز آگار جهت تشکیل توده میسلیومی به طریق نقطه ای کشت شدند.

استخراج DNA

حضور میسلیوم‌های قارچی با لام رنگ‌آمیزی بررسی و تایید گردید و سپس جمع آوری توده میسلیومی و استخراج DNA با استفاده از کیت ستونی استخراج ژنومی اختصاصی قارچ صورت گرفت.

شناسایی مولکولی

جهت تایید نهایی قارچ تریکوفیتون شناسایی مولکولی نیز انجام گردید، بدین صورت که توسط پرایمر های اختصاصی(*ITS*) Internal transcribed spacer ذکر شده در جدول واکنش *PCR* انجام گردید. واکنش PCR با برنامه حرارتی واسرشت اولیه ۵ دقیقه ۹۵درجه، مرحله واسرشت ۳۵ سیکل تکراری ۳۰ ثانیه ۹۵ درجه، مرحله اتصال ۴۵ ثانیه ۵۵ درجه و مرحله طویل شدن ۱ دقیقه ۷۲ درجه و در نهایت مرحله طویل شدن نهایی ۵ دقیقه ۷۲ درجه انجام شد. سپس محصول *PCR* به منظور سکانس برای شرکت *Bioneer* ارسال گردید و نتیجه سکانس در دیتابیس *NCBI*، *BLAST* شد.

تکثیر قطعه ژن *ABC*

جهت بررسی حضور وتکثیر قطعه ژن ( *ABC* ) *درترایکوفایتون روبروم*، آزمونPCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ذکر شده در جدول ۱ انجام گردید. واکنش PCR با برنامه حرارتی واسرشت اولیه ۵ دقیقه ۹۵ درجه، مرحله واسرشت ۳۵ سیکل تکراری ۳۰ ثانیه ۹۵ درجه، مرحله اتصال ۴۰ ثانیه ۵۵ درجه و مرحله طویل شدن ۱ دقیقه ۷۲ درجه و در نهایت مرحله طویل شدن نهایی ۵ دقیقه ۷۲ درجه انجام شد. مشاهده باند ۲۳۰ جفت بازی نشان‌دهنده مثبت بودن آزمون PCR می‌باشد.

اتصال محصول PCR در **وکتور** خطی-T pTG19با انتهای3'-dT overhangs انجام گردید.

به منظور کلون کردن قطعه ژن *ABC* تکثیر شده با پرایمرهای اختصاصی، در پلاسمید (وکتور) pTG19-T

PCR cloning vector )(Vivantis, Malaysia)، واکنش لیگاسیون با آنزیم T4 لیگاز انجام گرفت. محصول لیگاسیون pTG19T-ABC نامیده شد. سپس مخلوط واکنش لیگاسیون جهت ترانسفورماسیون به سلول‌های مستعد شده XL1-Blue به کار رفت.

تایید اتصال محصول PCR در وکتور وکتور کلونینگ PTG19-T (Ligation)

پس از کلون کردن ژن های ABC توسط انتخاب کلنی (آبی/سفید) سویه های کلون شده جداسازی شدند. از بین تعداد زیادی از کلون های ترانسفورم شده ای که روی پلیت LBآگار حاوی آمپی سیلین، رشد کرده بودند، ۱ کلونی، جهت انجام واکنش Colony PCR جهت تایید حضور ژن *ABC* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی M13 انتخاب شدند.

تعیین میزان بیان ژن ABC transporter با روش Real time PCR

قبل از انجام واکنش Real Time PCR باکتری نوترکیب در انکوباتور نگهداری گردید. ۱۵ ساعت پس از انکوباسیون استخراج RNA با استفاده از میکروکیت RNeasy (شرکت Qiagen) انجام گردید. در مرحله بعد cDNA با استفاده از آنزیم Reverse AMV (شرکت Roche) سنتزگردید. جهت تکثیر ژن های*ABC* و ژن خانگی *srRNA* ۱۶( عنوان کنترل داخلی) از پرایمرهای ذکر شده در جدول ۱ استفاده گردید. واکنش Real- PCR Time با برنامه حرارتی ۹۵ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۵۹ درجه ۴۰ ثانیه، و ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه انجام شد. آنالیز میزان بیان با اندازه‌گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با سویه استاندارد انجام شد.

به منظور مقایسه داده ها از آزمون انالیز Student t- test و P Value کمتر از ۰/۰۵ بعنوان اختلاف معنی دار از نظر آماری در نظر گرفته شد.

رسم درخت فیلوژنی

تجزیه تحلیل نتایج حاصل از توالی یابی توالی های به دست آمده توسط نرم افزار *BioEdit* بررسی گردید. توالی های حاصله با جدایه های ثبت شده در *NCBI* مقایسه شدند. هر توالی بـه طور جداگانه توسط نرم افزار *n Blast* در بانک ژن جستجو شد و توالی‌های حاصل از *Blast* توسط نرم افزار *W Clustal*هم ردیف شدند (۱۲). آنالیز فیلوژنتیکی پس از همردیف نمودن توالی ها توسط نرم افزار *W Clustal*،با استفاده از برنامه های۱۰,۵ *MEGA* درخت های فیلوژنتیکی ترسیم شدند. درخت های تهیه شده با استفاده از روش الحاق ترسیم *MEGA 5.10* د برنامه در *Neighbor Joining* همسایه گردید. به منظور ترسیم هیستوگرام مربوط بـه نمایش نمودار فواصل درون گونه ای پس از تعیین فواصل نوکلوتیدی به دست آمده با استفاده از نرم افزار *Excel*، نمودار مربوطه رسم شد.

## یافته‌ها

جداسازی نمونه های بالینی قارچی

از غربالگری نمونه‌های بالینی ارسال شده به آزمایشگاه که براساس خصوصیات مورفولوژیک، میکروسکوپی و تست های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند در مجموع ۱۲ ایزوله *تریکوفیتون روبروم* جداسازی شد.

تعیین هویت بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، میکروسکوپی و شیمیایی

از کلنی های مشکوک به *تریکوفیتون* رنگ آمیزی گرم انجام گردید و از لحاظ وجود قارچ‌های رشته‌ای درماتوفیت مورد بررسی قرار گرفتند و تایید شدند. از لحاظ شیمیایی نیز جدایه ها تایید گردیدند..

تکثیر قطعه ژن *ABC*

واکنش *PCR* برای ژن های *ABC* با پرایمرهای ذکر شده انجام شد. از ۱۲ سویه *تریکوفیتون* جدا شده ۶ سویه (۵۰٪) حامل ژن *ABC* بودند(شکل ۱ ).

تایید اتصال محصول PCR در وکتور وکتور کلونینگ PTG19-T (Ligation)

تکثیر قطعه ۴۲۳bp با جفت پرایمر M13 تایید کننده کلون های دارای ژن *ABC* می باشد و یکی از کلون ها

تایید گردید و جهت بررسی بیان ژن ABC از این کلونی استفاده گردید.

تعیین بیان ژن ABC transporter با روش Real-time PCR

با استفاده از Real-time PCR بیان ژن ABC transport در مقایسه با سویه استاندارد Trichophyton rubrum ATCC MYA-4438 تاییدگردیدید.

شناسایی مولکولی

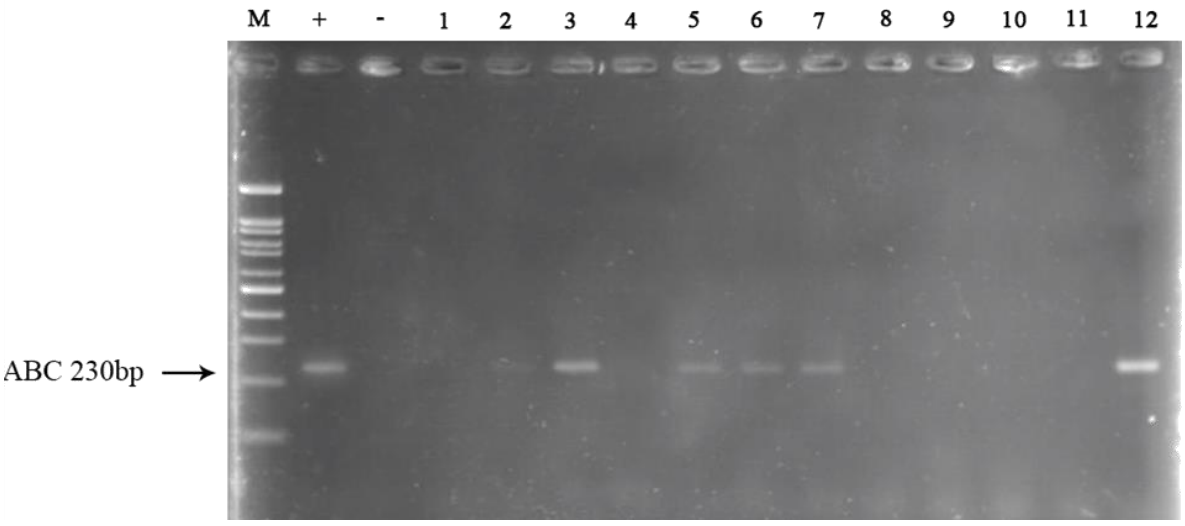
به منظور تعیین هویت مولکولی جنس تریکوفایتون از پرایمرهای عمومی *IT* استفاده گردید و گونه روبروم تایید گردید. در نهایت محصول *PCR* برای سکانس به شرکت *Bioneer* ارسال گردید و *BLAST* شد(نتیجه سکانس و بلاست در شکل ۲).

ترسیم درخت فیلوژنیک

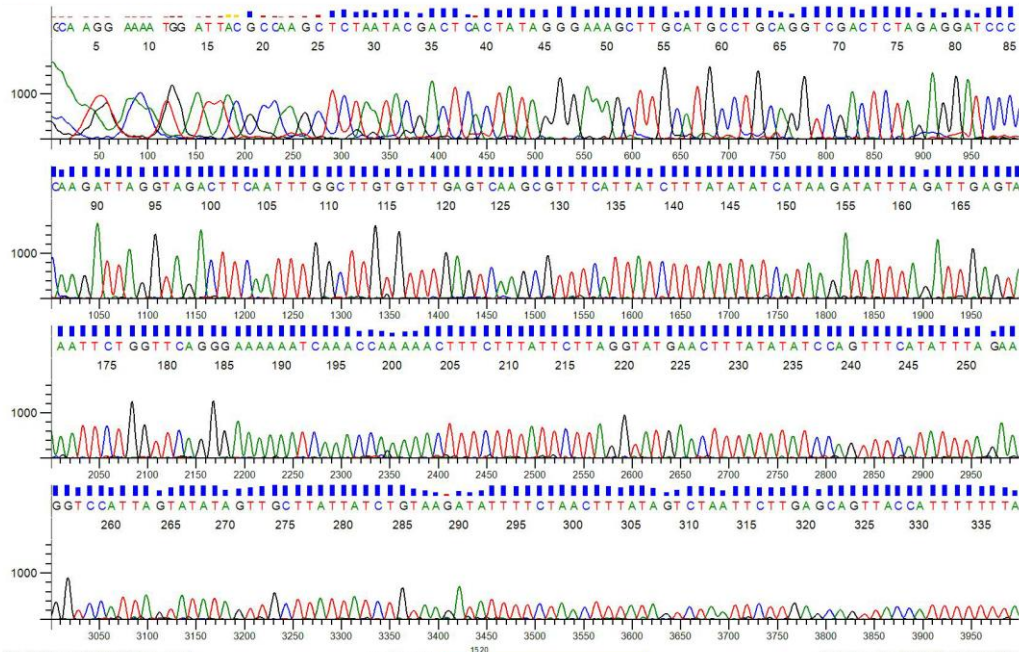
نتایج درخت فیلوژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) نشان می دهد کـه گونه های *تریکوفیتون* با بوت استرپ بالای ۹۹٪ و اپیدرموفیتون با بوت استرپ بالای ۹۹٪ یک کلاد (خوشه) قرار گرفتند که بیانگر رابطه خویشاوندی نزدیک آن ها با هم بود (شکل ۳)

**جدول۱: توالی پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر ژن *ABC* (۱۱)(۱۷)**

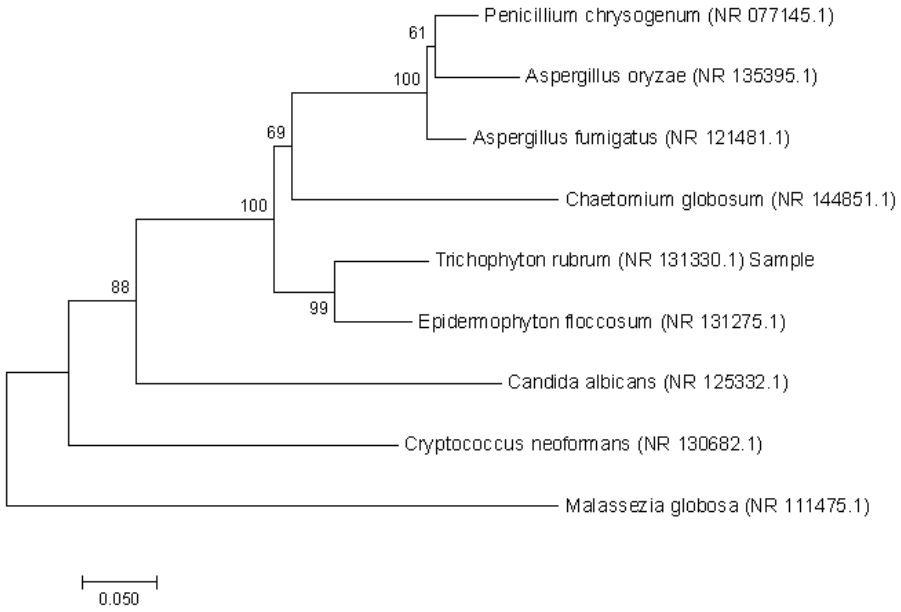
| نام پرایمر | توالی | سایز(bp) |
|---|---|---|
| ITS1 | 5’-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3’ | ۲۹۰ |
| ITS4 | 5’-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3’ | |
| *ABC transporter(F)* | 5’-GYTAYGTYARCAGCAGGATCT-3’ | ۲۳۰ |
| *ABC transporter(R)* | 5’-YTRYTCAACVCCAATGGT-3’ | |
| *M13(F)* | 5’- AGGGTTTTCCCAGTCACGA- 3’ | ۱۹۳ |
| *M13(R)* | 5’-GAGCGGATAACAATTTCACAC-3’ | |
| *16sRNA (F)* | 5’- AGGCCTTCGGGTTGTAAAGT-3’ | ۲۰۱ |
| *16sRNA(R)* | 5’- CGGGGATTTCACATCTCACT -3’ | |




**شکل۱: الکتروفورز محصول PCR ژن ABC. ستون ۱ :مارکر ستون ۲ و۳: کلونی های مثبت و منفی و کلون های مثبت قطعاتی با طول ۲۳۰bp ایجاد کردند.**



**شکل ۲: نتیجه سکانس و بلاست جهت تعیین هویت مولکولی گونه *تریکوفیتون روبروم***




**شکل ۳: درخت فیلوژنی به روش پیوند همجواری درماتوفیت ها**

## بحث

عفونت های قارچی بعنوان یک مسئله مهم بهداشتی در دنیا مورد بررسی قرار می‌گیرند. بیماری‌های سطحی قارچی در جمعیت دنیا در زمان حاضر در حال افزایش است و بیش از ۲۵-۲۰ درصد جمعیت دنیا به آن مبتلا هستند. زندگی اجتماعی، تماس با حیوانات، استفاده از آنتی بیوتیک‌ها کورتیکوستروئیدها، داروهای ضد سرطان، بعضی فاکتورهای دیگر کمک به زیاد شدن عفونت های قارچی بخصوص درماتوفیت‌ها می‌نمایند(۱۳). دلیل افزایش عفونت‌های قارچی پوستی همچنین بخاطر شرایط اقتصادی جامعه و فقر بهداشتی می باشد درماتوفیت ها گروهی از قارچ های کراتینوفیلیلک هستند که با تهاجم به مو، ناخن و لایه های شاخی پوست باعث عفونت قارچی تحت عنوان درماتوفیتوزیس می شوند. *تریکوفیتون روبروم* درماتوفیت انسان دوست است که از عوامل شایع کچلی کشاله ران، بدن، ناخن و دست می باشد (۳).

یکی از پایدارترین راه های مقاومت به آنتی بیوتیک ها بیان افلوکس پمپ‌ها در میکروارگانیسم ها است. افلوکس پمپ علاوه بر باکتری ها در قارچ ها نیز وجود دارد که باعث پمپ نمودن داروها به خارج از سلول می شوند که پیامد آن نه تنها باعث افزایش MIC آنتی بیوتیک ها بلکه با کاهش غلظت دارو در داخل سلول منجر به ایجاد سویه‌های موتانت مقاوم در قارچ‌ها می‌گردد و در ویرولانس و مقاومت یاخته در برابر عوامل ضد قارچ موثرند. اخیرا از ژن کد کننده این پمپ ها جهت استفاده در تهیه واکسن و ساخت دارو های ضد باکتری استفاده شد، به عنوان مثال واکسن ساب یونیت این افلوکس پمپ ها بر علیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و استرپتوکوکوس نومونیا ساخته شده و در مدل موشی ایمنی کافی را ایجاد کرده است(۱۴). گسترش اطلاعات درباره مکانیسم های مقاومت دارویی، می‌تواند در طراحی استراتژی های غلبه بر مقاومت دارویی یا طراحی و ساخت داروهایی جدید با مقاومت کمتر، مؤثر باشد. در این راستا محققان ترکیبات مهارکننده افلوکس پمپ‌ها را تولید کردند و از ترکیب آن ها با آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت ها استفاده می کنند. در تحقیق حاضر نیز همسانه‌سازی ژن انتقالی *ABC* قارچ تریکوفایتون روبروم صورت گرفت تا در ساخت داروهای ضد قارچی بتوان ازآن استفاده نمود(۱۵).

محبوبی و همکاران، در مطالعه ای تعداد ۴۰۲ مورد کلینیکی مشکوک به کچلی از نظر اشکال بالینی و عوامل قارچی آنها در سه مرکز پوست شهر بندرعباس مورد بررسی قرار که ۲۹۹ مورد کشت مثبت گردید. شایع ترین شکل بالینی کچلی سر نوع غیرالتهابی لکه خاکستری بود که شایع ترین عوامل درماتوفیتی جدا شده به ترتیب عبارت بودند از *تریکوفایتون متاگروفاتیس* (۳۵/۸٪) *تریکوفایتون روبروم*(۲۵/۱٪)، *اپیدرموفایتون فلوکوزوم* (۲۲/۴٪) عفونت های درماتوفیتی هنوز به عنوان یک موضوع مهم بهداشتی در منطقه محسوب می شود(۱۶).

در مطالعه ای در سال ۲۰۰۶ توسط Cervelatti و همکاران ژن کدگذاری کننده انتقالی *ABC* عامل درماتوفیت قارچ های *تریکوفیتون روبروم*، توسط *PCR* شناسایی و با استفاده از پرایمرهای مورد نظر کلون شد. افزایش میزان بیان در زمانی که قارچ در معرض اتیدیوم برماید، کتوکونازول، سیکلوهگزامید، فلوکونازول، ایتراکونازول حاکی از مشارکت موثر این ژن در جریان خروج دارو در این درماتوفیت می باشد. شناسایی ژن بالقوه در سم زدایی سلولی در یک قارچ بیماریزا اولین گام به سوی شناخت رویدادهای مولکولی مربوط به مقاومت ضد قارچی است (۷).

Fachin و همکاران یک ژن تک کپی، (TruMDR2) کدگذاری یک گیرنده ATP-binding cassette (ABC) را تکثیر کردند و تعیین توالی کردند. سطح افزایش رونویسی ژن *TruMDR2* نشان می دهد که این انتقال دهنده در مقاومت دارویی نقش مهمی دارد (۱۰).

## نتیجه گیری

در این پژوهش به بررسی حضور ژنهای انتقالی *ABC* و سطح بیان آن در قارچ *تریکوفایتون روبروم*

پرداخته شد. نتایج Real-Time PCR حاکی از بیان ژن *ABC* در ایزوله های جداسازی شده می‌باشد. مقاومت آنتی بیوتیکی ممکن است تنها به دلیل فعالیت پمپ های افلاکس چند دارویی نباشد اما با توجه به فعالیت حداکثری پمپ افلاکس در ۷۵٪ سویه های مورد مطالعه و ارتباط بیان پمپ های افلاکس و مقاومت آنتی بیوتیکی، اهمیت این پمپ‌ها نباید نادیده گرفته شوند و تحقیقات بیشتری در راستای عوامل ایجاد مقاومت نسبت به درمان‌های مختلف در قارچ بیماریزای تریکوفان روبروم انجام شود و در مراحل بعدی به بررسی و پیش‌گیری از روند ابتلا به بیماری‌های درماتوفیتی پرداخته شود و راه درمانی جدید، کم هزینه و با سمیت کم ارائه شود.

## قدردانی

این مطالعه با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال انجام پذیرفت. لذا از تمام کسانی که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند، نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

## منابع

1-White TC, Findley K, Dawson TL, Scheynius A, Boekhout T, Cuomo CA, et al. Fungi on the skin: dermatophytes and Malassezia. Cold spring harbor perspectives in medicine. 2014;4(8):a019802.
2-Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. Mycoses. 2008;51:2-15.
3-Nir-Paz R, Elinav H, Pierard GE, Walker D, Maly A, Shapiro M, et al. Deep infection by Trichophyton rubrum in an immunocompromised patient. Journal of clinical microbiology. 2003;41(11):5298-301.
4-Zhan P, Dukik K, Li D, Sun J, Stielow J, van den Ende BG, et al. Phylogeny of dermatophytes with genomic character evaluation of clinically distinct Trichophyton rubrum and T. áviolaceum. Studies in mycology. 2018;89:153-75.
5-Sahni K, Singh S, Dogra S. Newer topical treatments in skin and nail dermatophyte infections. Indian dermatology online journal. 2018;9(3):149.
6-Aneke CI, Otranto D, Cafarchia C. Therapy and Antifungal Susceptibility Profile of Microsporum canis. Journal of Fungi. 2018;4(3):107.
7-Cervelatti EP, Fachin A, Ferreira-Nozawa M, Martinez-Rossi N. Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen Trichophyton rubrum. Medical mycology. 2006;44(2):141-7.
8-Pohl PC, Klafke GM, Carvalho DD, Martins JR, Daffre S, da Silva Vaz Jr I, et al. ABC transporter efflux pumps: a defense mechanism against ivermectin in Rhipicephalus (Boophilus) microplus. International journal for parasitology. 2011;41(13-14):1323-33.
9-Gupta A, Singh J, Zaman M. Isolation and characterization of the antifungal resistance genes of trichophyton mentagrophytes. Journal of the American Academy of Dermatology. 2007;56(2.(
10-Fachin AL, Ferreira-Nozawa MS, Maccheroni Jr W, Martinez-Rossi NM. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in Trichophyton rubrum. Journal of Medical Microbiology. 2006;55(8):1093-9.
11-Maranhao FC, Paiao FG, Fachin AL, Martinez-Rossi NM. Membrane transporter proteins are involved in Trichophyton rubrum pathogenesis. Journal of Medical Microbiology. 2009;58(2):163-8.
12-White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. 1990;18(1):315-22.
13-Sahoo AK, Mahajan R. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. Indian dermatology online journal. 2016;7(2):77.
14-Garmory HS, Titball RW. ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. Infection and immunity. 2004;72(12):6757-63.
15-Soares LA, Sardi JdCO, Gullo FP, Pitangui NdS, Scorzoni L, Leite FS, et al. Anti dermatophytic therapy: prospects for the discovery of new drugs from natural products. Brazilian Journal of Microbiology. 2013;44(4):1035-41.
16-Dr. Abdolali M., Dr. Shahram B, Dr. Yaghoub H, Mehregan H, Mahshid and. Epidemiology of dermatophytosis in Bandar Abbas in 2003-2005. Hormozgan Medicine. 1384; Year 9 (4): 227.
17-Wen S, Chen X, Xu F, Sun H. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR (qPCR) analysis of Avibacterium paragallinarum. PloS one. 2016;11(12):e0167736.

# Molecular Separation and Cloning of the ATP-binding Cassette (*ABC*) from *Trichophyton Rubrum*

**Nazila Kamkar[1], Kumarss Amini[2*], Mansour Bayat[3], Sedigheh Mehrabian[4]**

*1-Master Student of Microbiology.*
*2-Associate Professor of Microbiology.*
*3-Professor of Pathobiology.*
*4-Professor of Biology.*

*1-Department of Microbiology, North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.*
*2-Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.*
*3-Department of Pathobiology, Science and research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.*
*4-Department of Biology, North Branch, Islamic Azad University, Tehran. Iran.*

*⁎Corresponding author:*
*Kumarss Amini; Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.*
*Tel: +989125454074*
*Email: Kamini@iau.saveh.ac.ir*

## Abstract

**Background and Objectives:** The ABC family of transporters, in addition to their role in cell division and storage of cell volume in fungi, are reported to play a role in natural metabolism and drug resistance. The purpose of this study was to investigate the molecular separation and cloning of the ATP-binding Cassette (ABC) from *Trichophyton rubrum.*

**Materials and Methods:** Sixty samples of *dermatophytosis* were isolated from patients. Isolates were identified by chemical and molecular tests. Afterward, PCR was performed using specific primers for the *ABC* gene. PCR product was cloned in the PTG19 vector. Real-Time PCR was performed to evaluate the expression level of *ABC* gene.

**Results:** A total of 12 isolates of *Trichophyton Rubrum* were identified. Six isolates were positive for *ABC* gene. The expression of the *ABC* gene cloned in *E. coli XL1blue* was confirmed by Real time PCR.

**Conclusion:** One of the most stable ways of resistance to antibiotics in microorganisms is the expression of efflux pumps. In this regard, researchers have developed compounds that inhibit the influx of pumps and use their combination with antibiotics to treat infections; However, due to the toxicity of most of these compounds in humans, their widespread use is prohibited, so the new challenge is to find new inhibitory compounds with less toxicity.

**Keywords***: Trichophyton Rubrum*, ATP-binding Cassette(ABC), Drug resistant.

►*Please cite this paper as:*
*Kamkar N, Amini K, Bayat M, Mehrabian S. Molecular Separation and Cloning of the ATP-binding Cassette (ABC) from Trichophyton Rubrum. Jundishapur Sci Med J 2020; 19(4):347-355*

**Received: Jan 4, 2020** **Revised: July 20, 2020** **Accepted: Aug 17, 2020**