مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۳، شماره۵، آذر و دی ۱۳۹۷(شماره پی در پی ۱۳۰)

بررسی فراوانی نسبی جهش در ژن فریدوکسین در ایزوله‌های *تریکوموناس واژینالیس* جدا شده از زنان مبتلا به واژینیت در زنان مراجعه کننده به کلینیک زنان یاسوج در سال ۱۳۹۶

عبدالعلی مشفع[۱*]، پروین غفاری[۲]، سید سجاد خرم روز[۱]، طاهره باب[۱]، اشکان اکبرزاده[۳]، مارال قرقانی[۴]

[۱]مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، [۲]گروه زنان، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، [۳]پزشک عمومی، [۴]گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۴/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۱۲

چکیده:

زمینه و هدف: تریکومونیازیس شایع‌ترین عفونت غیر ویروسی منتقله از راه جنسی در سراسر جهان می‌باشد. در مطالعه‌های قبلی در زنان مراجعه کننده به کلینیک زنان شهر یاسوج، آلودگی به انگل تریکوموناس واژینالیس، با روش‌های مختلف تشخیص بالینی ۱۹/۰٤ درصد و ۲۸ درصد، با روش میکروسکوپی ٤۲/۹ درصد و ٤۱ درصد و با روش ملکولی ۱۱ درصد گزارش شده است. مقاومت انگل به مترونیدازول مشکل درمانی موجود می‌باشد که در این مقاومت، جهش در ژن فریدوکسین انگل نقش مهمی دارد. هدف از این مطالعه فراوانی جهش و تعیین نقطه جهش در این ژن در انگل‌های جدا شده از بیماران مراجعه کننده به کلینیک زنان یاسوج در سال ۱۳۹٦بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی که در سال ۱۳۹۶ انجام شد، تعداد ۴۶ نفر بیمار دارای علایم بالینی واژینیت انتخاب و پس از ثبت اطلاعات فردی به همراه علایم بالینی در پرسشنامه، از هر بیمار دو نمونه سواب واژینال تهیه شد. یک نمونه در لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی برای بررسی میکروسکوپی و نمونه دیگر در محیط کشت دورسه برای رشد انگل قرار داده شد. در نهایت دی ان آی تروفوزوئیت‌های به دست آمده با استفاده از کیت استخراج و با دو بار انجام آزمایش PCR مختلف وجود تریکوموناس واژینالیس و ژن فریدوکسین تأیید گردید. باندهای حاصل از پی‌سی‌آر ژن فریدوکسین به وسیله کمپانی بیونر کره جنوبی تعیین توالی گردید و در پایگاه NCBI به منظور یافتن محل جهش، بلاست شدند. نتایج با استفاده از تعیین درصد و روش‌های آماری توصیفی تحلیل گردید.

یافته‌ها: بر اساس یافته‌های این پژوهش، ۲۰ نمونه(۴۳/۴۷ درصد) در مطالعه‌های میکروسکوپی و محیط کشت از نظر تریکوموناس واژینالیس مثبت بودند و ۱۲ نمونه(۲۰/۰۸ درصد) در PCR، مثبت شدند. ژن فریدوکسین در این ۱۲ نمونه، تکثیر و توالی یابی شد. در هیچ‌کدام از نمونه‌های بررسی شده جهش در ژن فریدوکسین دیده نشد.

نتیجه‌گیری: تغییرات در ژن فریدوکسین باعث مقاوت به مترونیدازول در درمان تریکومونیازیس می‌گردد، که در این مطالعه از نمونه‌های مورد بررسی چنین تغییری دیده نشد و این بدان معنا می‌باشد که در این نمونه‌ها هیچ مقاومت درمانی مرتبط با ژن فریدوکسین وجود نداشته است.

واژه‌های کلیدی: تریکوموناس واژینالیس، ژن فریدوکسین، واژینیت، جهش

***نویسنده مسئول: عبدالعلی مشفع**، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی

Email: amoshfea@yahoo.com

مقدمه

تریکومونـــاس واژینـــالیس عامـــل بیمـــاری تریکومونیازیس، تک یاخته‌ای گلابی شکل، متحرک، بـا ۵ تاژک (۴تاژک آزاد در قسـمت قـدامی و یـک غشـای مواج) و یک هسته قدامی می‌باشد(۱). تریکومونیازیس شایع‌ترین بیماری غیر ویروسی منتقلـه از راه جنسـی در جهان است. راه انتقال این بیماری معمـولاً از طریـق تماس جنسی است. سازمان بهداشت جهانی بروز ایـن بیماری را ۲۷۶ میلیون مورد جدید در هر سال و شیوع آن را ۱۸۷ میلیـون فـرد آلـوده، تخمـین زده اسـت(۲). شـیوع کلـی تریکومونیـازیس در ایـران ۸ درصـد می‌باشد(ماکزیمم و مینـیمم بـه ترتیـب؛ ۳۸/۸ و ۰/۰۰۹ درصد). شیوع این بیماری در استان‌های مرکزی بالاتر از سـایر اسـتان‌هاسـت و میـانگین سـنی بیمـاران ۲۴/۵سال(مـاکزیمم ۴۵ و مینـیمم ۲۲/۵) مـی‌باشـد(۳). نشانه‌های مشخصه تریکومونیازیس شامل؛ یک ترشح واژینال فراوان، زرد و بدبو و اغلب با تحریک نامطلوب وولو مـی‌باشـد. تریکومونـاس واژینـالیس در۳ تـا ۱۵ درصد زنان بدون علامت و در ۲۰ درصد زنانی که به کلینیک به علـت عفونـت منتقلـه از راه جنسـی مراجعـه مـی‌کننـد، وجـود دارد(۴). در بررسـی میکروسـکوپی ترشح‌های تریکوموناس‌های متحرک و افـزایش تعـداد لکوسیت‌ها دیده می‌شود(۵).

در مطالعه انجام شده در یاسوج از بین ۶۳ نفر زن مبـتلا بـه واژینیـت،۱۲ نفـر(درصـد۱۹/۰۴) در تشـخیص بـالینی و ۲۷ نفـر(۴۲/۹) در تشـخیص آزمایشگاهی از نظـر تریکومونـاس واژینـالیس مثبـت بودند(۶). در مطالعه دیگر در سال ۲۰۱۶ در یاسوج از ۱۰۰ زن مبتلا بـه واژینیـت ،۴۱ مـورد(۴۱ درصـد) در آزمـایش مسـتقیم و ۱۱ نفـر(۱۱ درصـد) در روش مولکولی و ۲۸ نفر(۲۸ درصد) در معاینه بالینی از نظر تریکوموناس واژینالیس مثبت بودند(۷).

در درمـــــــــان تریکومونیـــــــــازیس از نیتروایمیـدازول‌ها(مثـل مترونیـدازول و تینیـدازول) اسـتفاده مـی‌شـود کـه داروی انتخـابی مترونیـدازول می‌باشد. شریک جنسی بیمار نیز باید درمان شود(۵).

مترونیـدازول بـه فـرم غیـر فعال(اکسـید) بـه صورت انتشار وارد تریکومونـاس واژینـالیس شـده و سپس درون هیدروژنوزم که یک ارگانل غیر معمول در تریکومونادهاست، به فرم سیتوتوکسـیک خـود تبـدیل می‌شـود. دو پـروتئین هیـدروژنوزم شـامل پیـرووات فریدوکسین اکسیدوردوکتاز(PFOR) و فریدوکسین در فعالیت احیاء مترونیدازول نقـش حیـاتی ایفـا مـی‌کننـد. انتقال یک الکترون از فریدوکسین بـه گـروه نیتـروژن دارو منجر به تولید رادیکـال‌هـای آزاد نیتـروژن و در نتیجه فعـال شـدن مترونیـدازول مـی‌شـود. اثـر ضـد میکروبی مترونیدازول به واکنش‌پذیری و عـدم جهـش در این رادیکال آزاد بسـتگی دارد(۸). ژن فریدوکسـین تریکوموناس واژینالیس(TvFd) یکی از ژن‌های موجود در هیدروژنوزوم است. عقیده بر این است که مولکول بیولوژیکی است که داروی مترونیدازول را در درمـان تریکومونیازیس، فعال می‌کنـد. از نظـر سـاختاری، ژن

فریدوکسین تریکوموناس واژینالیس یک پروتئین منومر با ۹۳ دامنه پروتئینی را کد می‌کند که مشابه با سایر فریدوکسین‌های شناخته شده است که شامل ۹ پیوند هیدروژنی متصل به اتم‌های گوگرد می‌باشد(۹).

مطالعه کوآن و همکاران، با استفاده از مطالعه‌های ملکولی نشان داد که رونویسی ژن فریدوکسین در نمونه‌های مقاوم چهل تا شصت و پنج درصد کاهش یافته است. با مقایسه توالی ناحیه ۵ ژن فریدوکسین در میان نمونه‌های مقاوم و حساس به درمان، در نمونه‌های مقاوم جهش در دو نقطه، در نوکلئوتیدهای ۱۷۸ و ۲۳۹ نسبت به محل شروع رونویسی، مشخص گردید. این یافته‌ها به شدت مقاومت دارویی را با تغییر در رو نویسی ژن فریدوکسین مرتبط می‌کند. کاهش رونویسی ژن فریدوکسین منجر به کاهش سطح داخل سلولی فریدوکسین می‌شود و این ممکن است در مقاومت به مترونیدازول، از طریق کاهش توانایی سلول برای فعال کردن دارو، نقش داشته باشد(۸).

هم‌چنین مطالعه جان استون و همکاران، با شرح مکانیسم‌های مقاومت به مترونیدازول در تریکوموناس واژینالیس، نشان می‌دهد که حداقل ۵ درصد از موارد بالینی تریکومونیازیس با انگل مقاوم به داروها ایجاد می‌شود. مقاومت تریکوموناس واژینالیس به مترونیدازول به صورت هوازی و بی‌هوازی طبقه‌بندی شده و نشان می‌دهد که کاهش نسخه‌برداری ممکن است منجر به جهش نقطه‌ای در ناحیه ۵ ژن فریدوکسین شود که در موقعیت ۲۳۹ از محل شروع قرار دارد. این جهش باعث کاهش فعالیت مترونیدازول و کاهش تجمع دارو در سلول می‌شود. در مقاومت بی‌هوازی، کاهش یا توقف فعالیت PFOR مشاهده شده است. هم‌چنین فعالیت هیدروژناز، که جلوگیری از ساخت هیدروژن مولکولی می‌باشد، دچار نقص یا توقف می‌گردد(۱۰).

٤٦ ایزوله بالینی تریکوموناس واژینالیس از ترشحات واژینال و سدیمان ادراری، از استان تهران به وسیله حیدری و همکاران بررسی گردید که در ٤ ایزوله(۸/٦۹ درصد) موتاسیون نقطه‌ای دیده شد. در این ایزوله‌ها، جایگاه نوکلئوتیدی ۲۳۹(کدون آغاز ترجمه) از ژن فریدوکسین، آدنوزیون به تیمین تبدیل شده بود. موتاسیون در نوکلئوتید ۲۳۹ ژن فریدوکسین تمایل اتصال پروتئین‌های تنظیمی را کاهش می‌دهد که باعث کاهش بیان ژن فریدوکسین می‌شود و به علت این کاهش، در فعالیت و میزان مترونیدازول که به سلول‌ها می‌رسد، کاهش رخ می‌دهد. محققین معتقدند که موتاسیون در این ٤ ایزوله ممکن است موجب مقاومت آنها به مترونیدازول شده باشد(۱۱).

با توجه به مشکلات درمانی تریکومونیازیس و مقاومت انگل به مترونیدازول و هم‌چنین نقش جهش

در ژن فریدوکسین در این موضوع، هدف از این مطالعه فراوانی جهش و تعیین نقطه جهش در این ژن در انگل‌های جدا شده از بیماران مراجعه کننده به کلینیک زنان یاسوج در سال ۱۳۹۶ بود.

روش بررسی

این مطالعه از نوع توصیفی می‌باشد که در آن، بیماران مبتلا به واژینیت مراجعه کننده به کلینیک زنان شهر یاسوج در سال ۱۳۹۶ جامعه مورد مطالعه را تشکیل داده و بر اساس مطالعه‌های مشابه قبلی تعداد ٤٦ نمونه برای بررسی در نظر گرفته شد(۱۱). در درمانگاه زنان از تمام زنانی که دارای علایم بالینی واژینیت بودند و به وسیله متخصص بالینی تشخیص داده می‌شدند، پرسشنامه‌ای حاوی سوالاتی در مورد سن، علایم بالینی و نوع ترشح‌ها تکمیل می‌گردید. سپس با استفاده از سواب استریل از هر بیمار ۲ نمونه گرفته می‌شد. یکی از نمونه‌ها درون لوله آزمایش حاوی ۲ سی‌سی سرم فیزیولوژی قرار داده می‌شد و درب لوله با پنبه پوشانده می‌شد و نمونه دیگر در لوله حاوی محیط کشت دورسه(۱۲) که تا لبه مورب آن سرم اضافه شده بود، قرار داده می‌شد تا ترشح‌ها با سرم مخلوط شوند سپس سواب دور انداخته و درب لوله بسته می‌شد. لوله آزمایش حاوی ۲ سی‌سی سرم فیزیولوژی و سواب آغشته به ترشحات درون آن، ظرف مدت ۳۰ دقیقه به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده پزشکی منتقل می‌شد. این نمونه با مطالعه میکروسکوپی از نظر تروفوزوئیت‌های تریکوموناس بررسی گردید. باقیمانده مایع درون لوله در دستگاه سانتریفیوژ قرار داده می‌شد و با سرعت ۲۰۰۰ گرم سانتریفیوژ شده و رسوب آن تهیه و در یخچال نگهداری می‌شد تا در صورت نیاز جهت انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

محیط کشت حاوی ترشحات واژینال پس از انتقال به دانشکده پزشکی در انکوباتور با دمای ۳۵/۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد و به مدت یک ماه از نظر رشد و تکثیر تریکوموناس واژینالیس بررسی می‌شد و نمونه‌هایی که در محیط کشت رشد می‌کردند برای انجام آزمایش مولکولی PCR مورد استفاده قرار می‌گرفتند.

دی‌ان‌آی تروفوزوئیت‌های حاصل از محیط کشت و یا رسوبات باقیمانده در لوله‌های اولیه، با استفاده از کیت(Cinna gene) استخراج گردید. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای زیر جهت شناسایی اولیه ایزوله های تریکوموناس واژینالیس استفاده شد(۳).

TVK3: 5`AT TGT CGA ACA TTG GTC TTA CCC TC3`TVK7: 5`TCT GTG CCG TCT TCA AGT ATG C3`

پس از تأیید وجود دی‌ان‌آی تریکوموناس در محصولات پی‌سی‌آر، این محصولات جهت تکثیر ژن فریدوکسین، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی زیر، مجدداً PCR شدند(۱۱).

TV Fer F: 5`CGACAGATAATAATTTTTTTGAAAA 3`

TV Fer R: 5`TGCAGATGCACTTGCCGC 3`

محصولات PCR روی ژل آگاروز۱/۵ درصد الکتروفورز شده و با نمونه استاندارد مقایسه گردیدند. محصولات PCR دوم جهت تعیین توالی و یافتن محل احتمالی جهش نقطه‌ای در ژن فریدوکسین تریکوموناس واژینالیس به کمپانی بیونر کره جنوبی ارسال گردید.

برای تجزیه و تحلیل نتایج مطالعه از تعیین درصد و روش‌های آمار توصیفی استفاده گردید. قطعه ژنی به وسیله کمپانی بیونر کره جنوبی تعیین توالی گردید. برای اطمینان از تکثیر قطعه ژنی، توالی نوکلئوتیدی در پایگاه NCBI، بررسی شد. ژن مورد نظر تأیید شد و در نهایت در برنامه Mega6 مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

۴۶ بیمار مورد مطالعه از نظر گروه سنی به ترتیب زیر بودند؛ ۵ نفر(۱۰/۸ درصد) زیر ۲۰ سال، ۱۳ نفر(۲۸/۲ درصد) در محدوده سنی ۲۹ـ۲۰ سال، ۱۷ نفر (۳۷ درصد) در محدوده سنی ۳۹ـ۳۰ سال و ۱۱ نفر (۲۴ درصد) بالای ۴۰ سال.

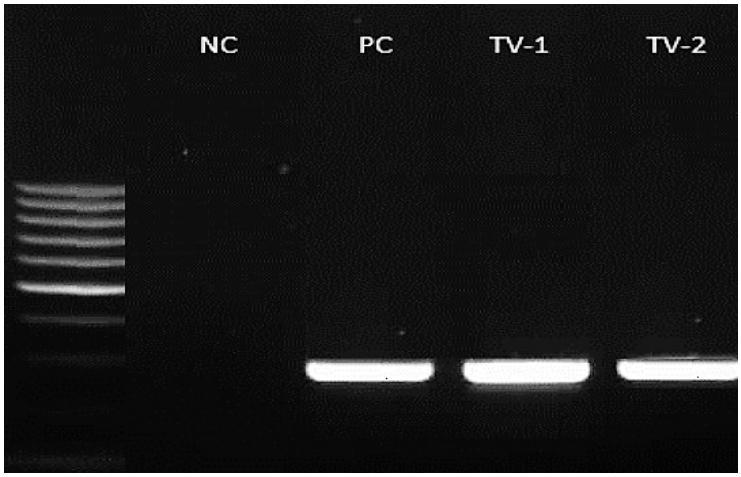
از نظر علایم بالینی، در بیمارانی که با تشخیص PCR تریکوموناس مثبت بودند، وجود ترشح‌های واژینال بدبو ۱۰۰ درصد، خارش ۷۵ درصد، تکرر ادرار ۵۸/۳ درصد و سوزش ادرار ۴۱/۶ درصد و سایر علایم از جمله مقاربت دردناک و درد زیر شکم شایع‌ترین علایم بودند.

در بیمارانی که به وسیله تشخیص میکروسکوپی تریکوموناس مثبت بودند، شایع‌ترین علایم به ترتیب عبارتند از؛ ترشحات واژینال بدبو۷۰ درصد، خارش ۶۵ درصد، تکرر ادرار ۵۰درصد، سوزش ادرار۴۰ درصد و علایمی هم‌چون مقاربت دردناک و درد زیر شکم.

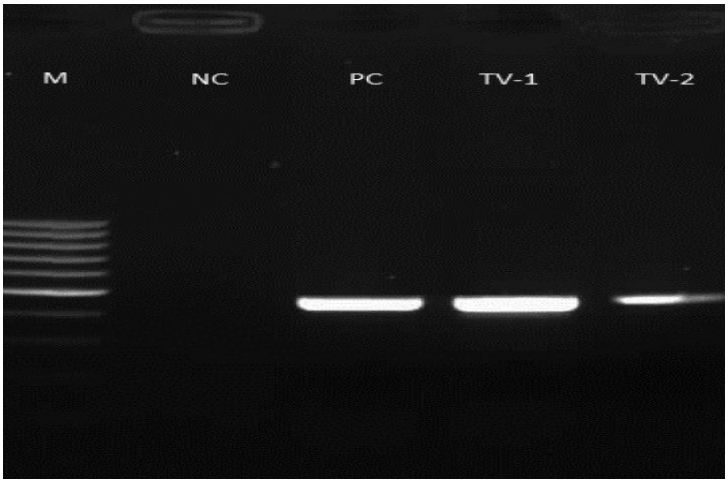
میانگین سنی بیمارانی که از نظر وجود عفونت تریکوموناس واژینالیس در مطالعه‌های میکروسکوپی و کشت و PCR مثبت بودند به ترتیب ۳۳/۸ و ۳۴/۶ سال بود.

شایع‌ترین سن ابتلا به عفونت تریکوموناس واژینالیس طبق هر دو روش میکروسکوپی و PCR در گروه سنی ۳۹ـ۳۰ سال بوده است.

از ۴۶ نمونه مورد بررسی، ۲۰ مورد(۴۳/۴۷ درصد) در مطالعه‌های میکروسکوپی و محیط کشت از نظر تریکوموناس واژینالیس مثبت بودند و ۱۲ نمونه(۲۰/۰۸ درصد) در PCR، مثبت شدند. ژن فریدوکسین در این ۱۲ نمونه، تکثیر و توالی یابی شدند. در هیچ‌کدام از نمونه‌های بررسی شده جهش در ژن فریدوکسین دیده نشد.



تصویر ۱: تصویر ژل آگارز محصولات PCR حاوی ژن تریکوموناس با باند bp۲۳۶، NC: کنترل منفی، PC: کنترل مثبت، TV1,TV2: دو نمونه مثبت تریکوموناس واژینالیس



تصویر ۲: تصویر ژل آگارز محصولات PCR حاوی ژن فریدوکسین با باند bp۴۳۶، M: مارکر، PC: نمونه کنترل مثبت، TV1, TV2: ژن فریدوکسین تکثیر شده در دو نمونه مثبت از نظر تریکوموناس واژینالیس

بحث

بیماری تریکومونیازیس از مهم‌ترین بیماری‌های منتقله از راه تماس جنسی است که برای درمان آن، از داروی مترونیدازول استفاده می‌شود. با توجه به گزارش‌های متعدد از موارد مقاومت به این دارو و برای جلوگیری از گسترش مقاومت‌های دارویی نیاز است ژن‌های مقاومت شناسایی و بررسی گردند. یکی از ژن‌های مسئول در مقاومت دارویی در تریکوموناس واژینالیس ژن فریدوکسین می‌باشد که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته است(۲ و ۹). لذا هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی نسبی جهش در ژن فریدوکسین در ایزوله‌های تریکوموناس واژینالیس جدا شده از ۴۶ بیمار مبتلا به واژینیت مراجعه کننده به کلینیک زنان شهر یاسوج بود. قبل از

معرفی مترونیدازول، درمان واژینال موضعی تنها راه درمان تریکومونیازیس بود. پس از توسعه مشتقات نیترو ایمیدازول، ۱ــ بتا ــ هیدروکسی اتیل ـ ۲ـ متیل ـ ۵ ـ نیترو ایمیدازول، افق جدیدی در درمان تریکومونیاز ایجاد گردید و درمان عفونت شدید واژینال، بسیار مؤثر بود. خیلی زود، موارد شکست درمانی گزارش شد(۱۳). مکانیسم مقاومت تریکوموناس واژینالیس به مترونیدازول، به دو گروه هوازی و بی هوازی تقسیم می‌شود(۱۳و۱۰). فریدوکسین، یک پروتئین آهن ـ گوگرد، که به عنوان یک حامل الکترون در واکنش‌های بیوشیمیایی عمل می‌کند، در مکانیسم مقاومت هوازی دخیل است، به طوری که تولید فریدوکسین به وسیله تریکومونادهای مقاوم، کاهش می‌یابد(۱۳).

مطالعه‌های قبلی نشان داده بود که کاهش رونویسی ژن فریدوکسین منجر به کاهش سطح داخل سلولی فریدوکسین می‌شود و این ممکن است در مقاومت به مترونیدازول، از طریق کاهش توانایی سلول برای فعال کردن دارو، نقش داشته باشد(۸).

کاهش میزان رونویسی ژن فریدوکسین و mRNA در سویه‌های مقاوم و حساس(۸) این تئوری را تقویت کرد که مقاومت دارویی با کاهش توانایی سلول برای تبدیل مترونیدازول به فرم سیتوتوکسیک، رخ می‌دهد. کاهش رونویسی ژن ممکن است به علت جهش در نوکلئوتید ۲۳۹ باشد که منجر به کاهش تمایل اتصال پروتئین تنظیمی۲۳ کیلودالتونی و کاهش بیان ژن فریدوکسین می‌شود(۱۱).

وجود جهش‌های ناشناخته در ژن فریدوکسین و هم‌چنین وجود جهش در فاکتورهای فعال کننده رونویسی، می‌توانند علل دیگری برای کاهش ترجمه ژن فریدوکسین در سایر موارد مقاوم باشند(۸).

بادپروا و همکاران اظهار داشتند که کاهش بیان ژن فریدوکسن به علت جهش نقطه‌ای در موقعیت ۲۳۹ در ژن فریدوکسین بود(۱۴).

فریدوکسین در تریکوموناس واژینالیس مقاوم به مترونیدازول، عملکرد قطعی ندارد. برخی مطالعه‌ها نقش فریدوکسین در حساسیت به نیترو ایمیدازول‌ها مطرح کردند(۱۵) در حالی که یافته‌های دیگر نشان داده‌اند که مهار ژن فریدوکسین در محیط آزمایشگاهی، منجر به مقاومت نسبت به مترونیدازول نمی‌شود(۱۰).

علاوه بر فریدوکسین، عوامل دیگری نیز در مقاومت تریکوموناس واژینالیس به مترونیدازول دخالت دارند. مقاومت بالینی(هوازی) عموماً در حضور اکسیژن دیده می‌شود. اکسیژن، سمیت مترونیدازول را با اکسید کردن مجدد آنیون‌های رادیکال نیترو، قبل از این که بتوانند به انگل آسیب برسانند، کاهش می‌دهد. موارد مقاوم بالینی دچار اختلال در فعالیت oxygen scavenging و دارای سطوح افزایش یافته اکسیژن درون سلولی هستند(۱۶).

PFOR و هیدروژناز(دو پروتئین هیدروژنوزم) در مکانیسم مقاومت بی‌هوازی دخیل می‌باشند. در این نوع مقاومت، فعالیت این دو پروتئین کاهش یافته یا کاملاً متوقف می‌شود. در گذشته فرض بر این بوده است که مرگ سلولی به واسطه مترونیدازول، با ممانعت از فعالیت هیدروژناز و تولید هیدروژن صورت می‌گیرد. با این حال، از آنجایی که فعالیت هیدروژناز در مقاومت بی‌هوازی دچار اختلال شده است، روشن است که عوامل متعددی در اثرات ضد تریکوموناسی مترونیدازول مؤثر هستند و همه این عوامل باید در برخورد با مقاومت دارویی مورد توجه قرار گیرد(۱۰).

چنین فرض شده است که مقاومت بالینی نسبت به مترونیدازول، می‌تواند در طی درمان معمول تریکومونیازیس، در انگل ایجاد شود(۱۳). با توجه به این که مترونیدازول یکی از شایع‌ترین داروهای مورد استفاده در درمان مبتلایان به تریکومونیازیس با اثر درمانی بیش از ۹۵ درصد می‌باشد(۱۷) و نتایج حاصل از مطالعه‌های دیگران در خصوص موتاسیون ژن مقاوم به مترونیدازول گزارش گردیده است، مصرف بی رویه و غیر استاندارد مترونیدازول در بیماران موجب افزایش مقاومت دارویی در جامعه می‌گردد.

در مطالعه حیدری و همکاران از ۴۶ مورد تریکوموناس واژینالیس ۴ مورد دارای جهش بودند که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی ندارد. در این مطالعه، جهشی در ژن فریدوکسین هیچ یک از نمونه‌ها یافت نشد. تغییرات در ژن فریدوکسین می‌تواند باعث مقاوت به مترونیدازول در درمان تریکومونیازیس گردد که در این مطالعه در نمونه‌های مورد بررسی چنین تغییری دیده نشد و این بدان معناست که در این نمونه‌ها هیچ مقاومت درمانی مرتبط با ژن فریدوکسین وجود نخواهد داشت. در مقاومت دارویی ممکن است ژن‌های دیگر نیز دخیل باشند. در صورت گزارش موارد مقاوم می‌توان آنها را از نظر ژن‌های متعدد بررسی نمود.

در مطالعه‌ای که به وسیله حیدری و همکاران انجام شد، میانگین سنی بیماران مبتلا به عفونت تریکوموناس واژینالیس با و بدون جهش در ژن فریدوکسین، به ترتیب ۵۰/۷۵ و ۴۰/۶۰ سال گزارش گردید(۱۱). در مطالعه‌ای که به وسیله هزارجریبی و همکاران انجام شد، میانگین سنی مبتلایان به تریکومونیازیس ۲۴/۵ سال گزارش گردید(۳). در این مطالعه میانگین سنی بیماران مبتلا به واژینیت تریکومونایی که در مطالعه‌های میکروسکوپی و PCR مثبت گزارش شدند، به ترتیب ۳۳/۸ و ۳۴/۶ سال بود. اختلاف میانگین سنی در مطالعه‌های مختلف می‌تواند مربوط به فرهنگ و رسوم، سن ازدواج و زادآوری و همچنین اختلاف در استفاده از وسایل پیشگیری از بارداری در سنین مختلف(استفاده کمتر از کاندوم در سنین بالاتر) و حتی وضعیت اقتصادی در جوامع مختلف باشد(۱۸).

در مطالعه‌ای که به وسیله مشفع و همکاران انجام شد شایع‌ترین علایم در موارد مثبت تریکوموناس در هر دو روش مطالعه‌های میکروسکوپی و PCR به ترتیب؛ ترشحات(۷۳/۲ و ۱۰۰ درصد)، خارش(۶۱ و ۷۲/۷ درصد) و سوزش ادرار(۳۴/۱ و ۴۵/۵ درصد) بوده است(۷). علایم بالینی دیده شده و هم‌چنین شیوع آنها در این مطالعه، مشابه دیگر مطالعه‌های صورت گرفته در یاسوج می‌باشد. شایع‌ترین علایم در افراد تریکوموناس مثبت که به روش‌های میکروسکوپی و PCR تشخیص داده شدند، به ترتیب ترشح‌های واژینال بدبو(۷۰ و ۱۰۰ درصد)، خارش(۶۵ و ۷۵ درصد)، سوزش ادرار(۵۰ و ۵۸/۳ درصد) و تکرر ادرار(۴۰ و ۴۱/۶ درصد) بوده است. علایم دیگر همانند مقاربت دردناک و درد زیر شکم نیز از دیگر شکایت‌های بیماران بوده است.

پیشنهاد می‌شود اگرچه در این مطالعه جهشی در ژن فریدوکسین یافت نشد، ولی با توجه به نقش احتمالی این ژن در مقاومت به مترونیدازول(با توجه به مطالعه‌های صورت گرفته) و این مساله که مطالعه‌های اندکی راجع به فراوانی جهش در ژن فریدوکسین در ایران صورت گرفته است توصیه می‌شود برای ارزیابی ارتباط میان جهش در ژن فریدوکسین و مقاومت به مترونیدازول در ایزوله‌های بالینی تریکوموناس واژینالیس مطالعه‌های بیشتری در محیط آزمایشگاه و روی بیماران انجام شود. هم‌چنین پیشنهاد می‌شود علاوه بر ژن فریدوکسین، روی PFOR که یکی از عوامل احیاء مترونیدازول می‌باشد نیز مطالعه‌هایی صورت گیرد. توصیه می‌شود مطالعه‌ای در کل بر روی موارد تریکومونیازیس مقاوم به درمان با مترونیدازول، انجام شود. هم‌چنین پیشنهاد می‌گردد روی مسیر مقاومت بی هوازی و نقش هیدروژناز به عنوان یکی از عوامل مؤثر در این مسیر، مطالعه‌هایی صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

تغییرات در ژن فریدوکسین باعث مقاوت به مترونیدازول در درمان تریکومونیازیس می‌گردد، که در این مطالعه از نمونه‌های مورد بررسی چنین تغییری دیده نشد و این بدان معنا می‌باشد که در این نمونه‌ها هیچ مقاومت درمانی مرتبط با ژن فریدوکسین وجود نداشته است.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکترای عمومی طاهره باب و طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی یاسوج می‌باشد، که با حمایت مالی این دانشگاه انجام گرفته است.

REFERENCES

1.Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and Microbiological Aspect of Trichomonas vaginalis. Clinical Microbiology Review 1998; 11(2): 300-17.
2.Menezes CB, Frasson AP, Tasca T. Trichomoniasis-are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease world wide?. Microb Cell 2016; 3(9): 404-19.
3.Hezarjaribi HZ, Fakhar M, Shokri A, Teshnizi SH, Sadough A, Taghavi M. Trichomonas vaginalis infection among Iranian general population of women: a systemic review and meta-analysis. Parasitol Res 2015; 114(4): 1291-300.
4.Novak E. Berek & Novak's gynecology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007; 553-6.
5.Danforth DN. Danforth's obstetrics and gynecology. United State: Lippincott Williams & Wilkins; 2008; 252-4.
6.Moshfe AA, Hosseini S. Comparison of clinical and microscopic diagnosis of Trichomoniasis referred to the Yasuj women clinic. Armaghane-danesh, Journal of Yasuj University of Medical Sciences 2004; 33(9): 71-82.
7.Moshfe A, Khozouei Ashkzari Z, Aramesh SH, Ghaffari P, Jamshidi A. Comparison of three methods of clinical diagnosis, microscopic and pcr techniques for detection of trichomoniasis in women in Yasuj city. Science Journal of Clinical Medicine 2016; 5(1): 12-5.
8.Quon DV, d`Oliveira CE, Johnson PJ. Reduced transcription of ferredoxin gene in metronidazole-resistant Trichomonas vaginalis. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89(10): 4402-6.
9.Saebi E. Textbook of clinical parasitology protozoal diseases in Iran. Tehran: Ayezh Publication; 2010; 141-52.
10.Johnston VJ, Mabey DC. Global Epidemiology and Control of Trichomonas Vaginalis. Curr Opin Infect Dis 2008; 21(1): 56-64.
11.Crossnoe CR, Germanas JP, LeMagueres P, Mustata G, Krause KL. The crystal structure of Trichomonas vaginalis Ferredoxin provides insight into metronidazole, J Mol Biol 2002; 318(2): 503-8.
12.Sarah L. Cudmore, Kiera L. Delgaty, Shannon F. Hayward-McClelland, Dino P. Petrin, Gary E. Garber. Treatment of infections caused by Metronidazole-resistant Trichomonas vaginalis. Clinical Microbiology Review OCT 2004; 17(4): 783-93.
13.Heidari S, Bandehpour M, Seyyed-Tabaei SJ, Valadkhani Z, Haghighi A, Abodi A, et al. Ferredoxin gene mutation in Iranian Trichomonas vaginalis isolates. Iran J Parasitol 2013; 8(3): 402-7.
14.Badparva E, Papi OA, Kheirandish F, Pornia Y, Azizi M. Sensitivity assessment of direct method for diagnosis of Trichomonas vaginalis in comparison with Dorset Culture media. Yafte 2010; 12(1): 25-30.
15.Matini M, Maghsood AH, Mohebali M, Rabiee S, Fallah M, Rezaie S, Rezaeian M. In Vitro Susceptibility of Iranian Isolates of Trichomonas vaginalis to Metronidazole. Iran J Parasitol 2016;11(1): 46-51.
16.Vidakovic M, Crossnoe CR, Neidre C, Kim K, Krause KI, Germanas JP. Reactivity of reduced 2Fe-2S ferredoxins parallels host susceptibility to nitroimidazoles. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 302-8.
17.Bradic M, Warring SD, Tooley GE, Scheid P, Secor WE,et al. Genetic indicator of drug resistance in the highly repetitive genome of tricgomonas vaginalis. Genome Biol Evol 2017; 9(6): 1658-72.
18.Jacqueline A. Upcroft, Linda A. Dunn, Janelle M. Wright, Kamel Benakli, Peter Upcroft, Patrice Vanelle. 5-nitroimidazole drug effective against metronidazole-resistant trichomonas vaginalis and giardia duodenalis. Antimicrob Agent Chemoter 2006; 92(1): 196-9.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Frequency of Mutations in Friedoxin Gene in Trichomonas Vaginalis Isolated From Women With Vaginitis Referred to Yasuj Gynecologic Clinic in 2017

Moshfe A[1*], Ghaffari P[2], Khoramrooz SS[1], Bab T[1], Akbarzadeh A[3], Ghareghani M[4]

[1]Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [2]Department of Gynecology, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [3]General Physician, [4]Department of Medical Mycology, School of Medicine, Jondi Shapoor University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Received: 24 June 2018 Accepted: 3 Nov 2018

Abstract

Background & aim: Trichomoniasis is the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide. In previous studies in women referred to the Yasuj gynecologic clinic, *Trichomonas vaginalis* infection was reported by three methods: clinical diagnosis (19/04% - 28%), microscopic (42/9% - 41%) and polymerase chain reaction (11%). Parasite resistance to metronidazole is a therapeutic problem. In this resistance, mutation in the parasite ferredoxin gene plays an important role. In the present study, frequency of mutation and determination point of the mutation in this gene, in isolated parasites from patients referring to Yasuj women's clinic in 2017 were investigated.

Methods: In the present descriptive study, forty-six patients with clinical signs of vaginitis were selected. Then, they were asked to fill out a questionnaire. Two swabs of each vaginal sample were taken from each patient. One specimen in a test tube containing physiological serum for microscopic examination and another sample was placed in Dorset medium for growth of the parasite. DNA extraction were extracted using a kit and PCR experiments were performed to confirm the presence of trichomonas vaginalis and fiducoxin genes two times. The sequences of fibridoxin gene pseudo-bands were sequenced by South Korean bioresorpants and blast in the NCBI database to find the location of the mutation. The results were analyzed using descriptive statistics and statistical methods.

Results: Out of forty-six samples, twenty samples (43.44%) were positive for *Trichomonas vaginalis* in microscopic and culture media and twelve samples (20.08%) were positive in PCR. The ferredoxin gene was reproduced and sequenced in these 12 samples. No mutation in ferredoxin gene was detected in any of the studied samples.

Conclusion: Changes in the ferredoxin gene resulted in metronidazole discontinuation in the treatment of trichomoniasis, which was not seen in the present study samples. It meant that there was no therapeutic resistance associated with ferredoxin gene in these specimens.

Keyword: *Trichomonas vaginalis*, Ferredoxin gene, Vaginitis, Mutation

[*]**Corresponding author**: **Moshfe A,** Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
Email: amoshfea@yahoo.com

Please cite this article as follows:
Moshfe A, Ghaffari P, Khoramrooz SS, Bab T, Akbarzadeh A, Ghareghani M. Frequency of Mutations in Friedoxin Gene in Trichomonas Vaginalis Isolated From Women With Vaginitis Referred to Yasuj Gynecologic Clinic in 2017. Armaghane-danesh 2018; 23(5): 608-618