DOI: 10.22122/jims.v38i603.13784 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هشتم/شماره‌ی ۶۰۳/هفته‌ی سوم بهمن ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۱ تاریخ چاپ: ۱۳۹۹/۱۱/۲۱

شناسایی مولکولی و ارزیابی قدرت تولید پروتئیناز و فسفولیپاز ایزوله‌های محیطی Aspergillus به دست آمده از فضای بیمارستان

فائزه محمدی[۱]، نیما همت[۲]، بهناز فامیل ستاریان[۲]، آسیه مقامی مهر[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: یکی از دلایل عفونت‌های بیمارستانی، پراکندگی اسپورهای Aspergillus در محیط می‌باشد. ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک به عنوان یک عامل ویرولانس در گونه‌های Aspergillus در نظر گرفته می‌شود. این مطالعه، با هدف شناسایی گونه‌های Aspergillus محیطی با تعیین توالی ژن بتا توبولین و ارزیابی قدرت تولید آنزیم پروتئیناز و فسفولیپاز در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

روش‌ها: ۹۳ کلنی Aspergillus از فضای بخش اورژانس، جراحی، مراقبت‌های ویژه و اتاق عمل دو بیمارستان آموزشی استان قزوین جمع‌آوری شد. ناحیه‌ی ژنی بتا توبولین به روش Polymerase chain reaction (PCR) تکثیر شد و ۴۰ ایزوله تعیین توالی شدند. جهت ارزیابی قدرت تولید آنزیم پروتئیناز و فسفولیپاز به ترتیب از محیط Yeast carbon base (YCB) و آلبومین سرم گاوی و محیط Egg yolk agar استفاده شد.

یافته‌ها: بر اساس توالی بتا توبولین، Aspergillus flavus (۳ درصد)، Aspergillus tubingensis (۲۵ درصد)، Aspergillus fumigatus (۲۰ درصد) Aspergillus niger (۱۰ درصد)، Aspergillus sydowii (۷/۵ درصد)، Aspergillus terreus (۵ درصد) و Aspergillus nidulans (۲/۵ درصد) شناسایی گردید. ارزیابی آنزیم‌های خارج سلولی نشان داد که ۸۲/۵ درصد از ایزوله‌ها توانایی پروتئیناز با میانگین پروتئیناز ۰/۱۳ ± ۰/۷۳ و ۵۲/۵ درصد از ایزوله‌های Aspergillus مورد بررسی دارای فعالیت فسفولیپازی با میانگین ۰/۱۷ ± ۰/۸۱ می‌باشند.

نتیجه‌گیری: مطالعه‌ی حاضر نشان داد که سویه‌های محیطی دارای تولید بالای پروتئیناز می‌باشند. بنابراین، به نظر می‌رسد که درک بهتر ارتباط عوامل ویرولانس با عفونت Aspergillus در مطالعات آینده، ضروری می‌باشد.

واژگان کلیدی: Aspergillus؛ بتا توبولین؛ پروتئیناز؛ فسفولیپاز

ارجاع: محمدی فائزه، همت نیما، فامیل ستاریان بهناز، مقامی مهر آسیه. **شناسایی مولکولی و ارزیابی قدرت تولید پروتئیناز و فسفولیپاز ایزوله‌های محیطی Aspergillus به دست آمده از فضای بیمارستان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۹؛ ۳۸ (۶۰۳): ۹۳۵-۹۲۹.

مقدمه

عوامل قارچی، یکی از دلایل عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد که توسط گونه‌های مختلف قارچی مانند Aspergillus ایجاد می‌گردد. به دلیل اسپورزایی بالای Aspergillus و حضور آن‌ها در محیط زیست، این ذهنیت را ایجاد می‌کند که اغلب عفونت Aspergillus در بیماران بستری شده در بیمارستان‌ها از محیط کسب شده است (۲-۱).

در سال‌های اخیر، به دلیل افزایش شمار بیماران نقص ایمنی، میزان بروز Aspergillus به بالاترین حد خود رسیده و به یکی از عفونت‌های قارچی فرصت طلب و مهاجم تبدیل شده است. عواملی چون پایین بودن کیفیت سیستم‌های تهویه‌ی هوا، عدم کنترل دما و رطوبت نسبی و نیز فعالیت‌های ساختمان‌سازی در مکان‌های مجاور با محل نگهداری بیماران پرمخاطره، در انتشار عوامل بیماری‌زا نقش مهمی دارند (۳).

Aspergillus، اغلب توسط گونه‌های مختلف نظیر Aspergillus fumigatus، Aspergillus flavus و Aspergillus niger ایجاد می‌گردد (۴). بررسی خصوصیات فنوتیپی گونه‌ها بر پایه‌ی روش‌های ریخت‌شناسی (Morphology) تحت شرایط محیطی دستخوش تغییراتی است؛ در حالی که استفاده از نشانگرهای مولکولی در تشخیص میکروارگانیسم در سطح گونه کمک کننده می‌باشد. مطالعات

۱- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده‌ی بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

۲- مرکز تحقیقات میکروبیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

۳- گروه آمار، دانشگاه پیام نور شیراز، شیراز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: فائزه محمدی؛ استادیار قارچ‌شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده‌ی بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
Email: esf.mohamadi@gmail.com

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

نشان می دهند که اطلاعات تکاملی موجود در ژن بتا توبولین از پایداری و تنوع کافی برای افتراق گونه‌های Aspergillus برخوردار می‌باشد (۵).

دو عامل مهم که در مرگ و میر بالای Aspergillus نقش دارد، شامل تشخیص دیر هنگام و اطلاعات کم در ارتباط با ویرولانس و پاتوژنیسیتی قارچ می‌باشد. تحمل حرارتی، چسبندگی، تولید رنگدانه، متابولیت‌های سمی و ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک به عنوان عوامل ویرولانسی به پاتوژنز Aspergillus کمک می‌نمایند (۶). پاتوژنز Aspergillus، به عوامل میزبان و عوامل ویرولانس بستگی دارد. هیدرولازهای خارج سلولی مانند پروتئیناز، فسفولیپاز، همولایزین و استراز، از جمله عوامل اصلی ویرولانس می‌باشند که نقش کلیدی در فرایند تخریب غشای سلولی و کلونیزاسیون گسترده‌ی Aspergillus در ریه را نشان می‌دهند (۸-۷).

هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، شناسایی دقیق گونه‌های Aspergillus با استفاده از تعیین توالی ژن بتا توبولین و ارزیابی قدرت تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک فسفولیپاز و پروتئیناز بود.

روش‌ها:

جهت جمع‌آوری نمونه‌های Aspergillus محیطی از بخش‌های اورژانس، جراحی، اتاق عمل و واحدهای مراقبت ویژه (Intensive care unit یا ICU) دو بیمارستان آموزشی شهر قزوین، روش پلیت گذاری انجام گردید. جهت انجام کار، پلیت‌های حاوی Sabouraud dextrose agar (SDA) به مدت ۲۰ دقیقه به صورت درب باز در مکان‌های مورد نظر قرار داده شد. سپس، پلیت‌ها به آزمایشگاه منتقل گردید و در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰-۷ روز نگهداری شد. پس از این مدت، خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها بررسی گردیدند. تمامی ایزوله‌های جدا شده در گلیسرول ۱۰ درصد در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شناسایی مولکولی: استخراج DNA: جهت استخراج DNA به میکروتیوپ حاوی ۷۰۰ میکرولیتر بافر لیز (Tris 100mM, EDTA 20mM, Nacl 100mM SDS 2%) یک لوپ کلنی قارچ اضافه و توسط گریندر دستی الکتریکی خرد گردید. سپس، ۳۰۰ میکرولیتر فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲۵:۲۴:۱) اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه با شتاب ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، حجم مساوی از کلروفرم به مایع رویی اضافه و بار دیگر سانتریفیوژ گردید. در مرحله ی بعدی، حجم مساوی از محلول ایزوپروپانول به مایع رویی اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس، سانتریفیوژ شده و به رسوب به دست آمده الکل ۷۰ درصد اضافه گردید و بعد از ۵ دقیقه، سانتریفیوژ و خشک نمودن میکروتیوب‌ها در هوای آزاد، ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اضافه شد و به عنوان DNA خالص در فریزر نگهداری گردید (۹).

Polymerase chain reaction (PCR) و تقویت ژن بتا توبولین: جهت تکثیر ژن بتا توبولین، از توالی‌های آغازگر Bt2a (5’GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC 3’) و برگشت Bt2b (5’ ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3’) استفاده گردید (۱۰). جهت انجام آزمایش، ۱۲/۵ میکرولیتر Taq Mix Red 2X، ۲۵ پیکومول از هر کدام از پرایمرها و ۱ میکرولیتر از DNA قارچی استخراج شده مخلوط گردید و جهت رسیدن به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، آب مقطر دیونیزه استریل اضافه شد. چرخه‌ی گرمایی به صورت حرارت ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه‌ی حرارت ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و یک چرخه‌ی ۷۲ درجه به مدت ۶ دقیقه بهینه‌سازی گردید.

تعیین توالی: جهت انجام کار، محصولات PCR ایزوله های انتخابی تخلیص و با استفاده از (Applied biosystems) ABI13130X تعیین توالی شدند. پس از دریافت نتایج توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 3.6.5 واکاوی شدند و جهت مقایسه‌ی توالی ها با توالی های موجود در بانک جهانی ژن، از نرم‌افزار BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) استفاده گردید. شناسایی ایزوله ها با استفاده از تشابه توالی بالا ۱۰۰-۹۹ درصد در پایگاه داده‌های National Center for Biotechnology Information (NCBI) انجام شد.

تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک: فعالیت آنزیم خارج سلولی فسفولیپاز بر روی محیط کشت حاوی SDA، کلرید سدیم (NaCl) یک مولار، کلرید کلسیم (CaCl2) همراه با زرده‌ی تخم‌مرغ بررسی گردید. جهت انجام آزمایش، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی تهیه شده (۱۰۶ سلول/میلی‌لیتر)، به پلیت های کشت اضافه شد و به مدت ۵ روز در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید.

فعالیت آنزیم پروتئیناز با استفاده از محیط آلبومین سرم گاوی Bovine albumin serum (BSA) با pH = ۵ انجام گردید. این محیط، حاوی MgSO4.7H2O، NaCl، K2HPO4، Yeast extract، BSA و گلوکز می باشدکه به آگار مذاب اضافه گردید. برای هر ایزوله، سوسپانسون قارچی (۱۰۶ سلول/میلی‌لیتر) تهیه شد و سپس، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون بر سطح محیط کشت تلقیح گردید و همه ی پلیت ها به مدت ۵ روز در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید (۱۱).

شاخص فعالیت آنزیم (Emulsifying activity index یا EAI) پروتئیناز و فسفولیپاز با استفاده از نسبت قطر کلنی به قطر کلنی به علاوه ی منطقه‌ی شفاف (میلی‌تر) محاسبه شد. جهت صحت آزمون، آزمایش هر نمونه ۲ بار تکرار شد و میانگین نتایج یادداشت گردید. شاخص فعالیت آنزیم به صورت EAI = ۱ معادل عدم فعالیت، EAI = ۰/۹۹-۰/۶۴ معادل فعالیت مثبت آنزیمی و EAI ≤ ۰/۶۳ معادل فعالیت قوی در نظر گرفته شد (۱۲).

یافته‌ها:

نتایج تعیین توالی ۴۰ ایزوله‌ی انتخابی بعد از تطبیق با توالی‌های موجود در بانک ژنی با کمک نرم‌افزار BLAST، بر اساس Coverage Query و Max identity به وضوح گونه‌های Aspergillus را مشخص نمود. توالی بتاتوبولین این جدایه‌ها، در پایگاه داده‌ی NCBI با شماره‌های دسترسی MN614456-70 و MN623250-75 ثبت شد.

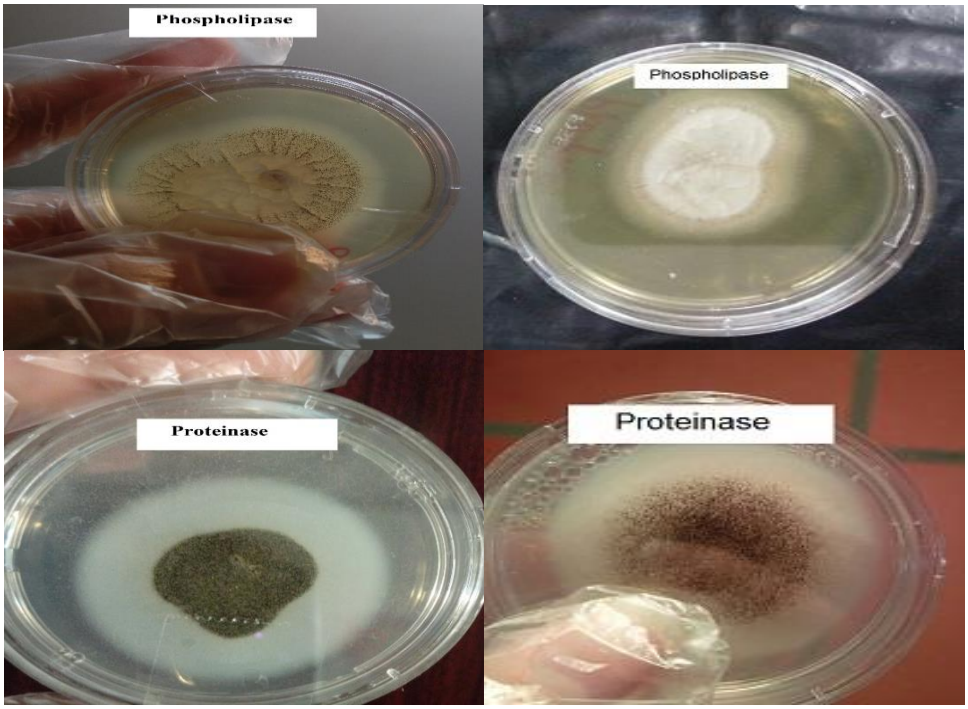
بر اساس تعیین توالی بتا توبولین، Aspergillus flavus (۳۰/۰ درصد)، Aspergillus tubingensis (۲۵/۰ درصد)، Aspergillus fumigatus (۲۰/۰ درصد)، Aspergillus niger (۱۰/۰ درصد)، Aspergillus sydowii (۷/۵ درصد)، Aspergillus terreus (۵/۰ درصد) و Aspergillus nidulans (۲/۵ درصد) شناسایی گردید.

ارزیابی آنزیم‌های خارج سلولی نشان داد که از ۴۰ ایزوله‌ی محیطی مورد مطالعه، ۸۲/۵ درصد از ایزوله‌ها، توانایی پروتئیناز با میانگین پروتئیناز ۰/۱۳ ± ۰/۷۳ را نشان دادند. در بین ایزوله ها، بیشترین فعالیت پروتئیناز مربوط به بخش نایجری (۱۰۰ درصد) و به دنبال آن Aspergillus flavus (۸۳/۳ درصد)، Aspergillus fumigatus (۷۵/۰ درصد)، Aspergillus sydowii (۶۶/۷ درصد) و Aspergillus terreus (۵۰/۰ درصد) بودند (جدول ۱). همچنین، تولید پروتئیناز در سطوح قوی در Aspergillus niger (۷۵/۰ درصد) و Aspergillus tubingensis (۴۰/۰ درصد) مشاهده شد (شکل ۱).

سنجش تولید فسفولیپاز نشان داد که ۵۲/۵ درصد از ایزوله‌های Aspergillus مورد بررسی، دارای فعالیت فسفولیپازی با میانگین ۰/۱۷ ± ۰/۸۱ بودند. در بین ایزوله ها، بیشترین میزان فعالیت مربوط به بخش نایجری (۶۴/۳ درصد) می باشد (جدول ۲). تولید فسفولیپاز در سطوح قوی در بخش نایجری (۴۳/۰ درصد) و Aspergillus flavus (۱۶/۷ درصد) مشاهده شد (شکل ۱).

جدول ۱. توزیع فعالیت آنزیمی پروتئیناز در نمونه‌های Aspergillus جدا شده از فضای بیمارستان

ایزوله	تولید آنزیم پروتئیناز	میانگین ± انحراف معیار	محدوده
Aspergillus flavus	۱۰ (۸۳/۳)	۰/۷۶ ± ۰/۱۲	۰/۶۶–۱/۰۰
Aspergillus fumigatus	۶ (۷۵/۰)	۰/۷۸ ± ۰/۱۳	۰/۶۸–۱/۰۰
Aspergillus niger	۴ (۱۰۰)	۰/۶۱ ± ۰/۰۵	۰/۵۶–۰/۶۹
Aspergillus tubingensis	۱۰ (۱۰۰)	۰/۶۴ ± ۰/۰۴	۰/۵۸–۰/۷۲
Aspergillus sydowii	۲ (۶۶/۷)	۰/۸۶ ± ۰/۱۲	۰/۷۶–۱/۰۰
Aspergillus terreus	۱ (۵۰/۰)	۰/۸۴ ± ۰/۲۱	۰/۶۹–۱/۰۰
Aspergillus nidulans	–	۱/۰۰ ± ۰/۰۰	۱
کل	۳۳ (۸۲/۵)	۰/۷۳ ± ۰/۱۳	



شکل ۱. A و B: هاله‌ی اطراف کلنی Aspergillus جهت ارزیابی فعالیت پروتئیناز، C و D: هاله‌ی اطراف کلنی Aspergillus جهت ارزیابی فعالیت فسفولیپاز

جدول ۲. توزیع فعالیت آنزیمی فسفولیپاز در نمونه‌های Aspergillus جدا شده از فضای بیمارستان

ایزوله	تولید آنزیم فسفولیپاز	میانگین ± انحراف معیار	محدوده
Aspergillus flavus	۶ (۵۰/۰)	۰/۸۶ ± ۰/۱۶	۰/۵۶-۱/۰۰
Aspergillus fumigatus	۴ (۵۰/۰)	۰/۸۸ ± ۰/۱۴	۰/۶۷-۱/۰۰
Aspergillus niger	۳ (۷۵/۰)	۰/۶۹ ± ۰/۲۱	۰/۵۳-۱/۰۰
Aspergillus tubingensis	۶ (۶۰/۰)	۰/۷۰ ± ۰/۱۶	۰/۵۸-۱/۰۰
Aspergillus sydowii	۱ (۳۳/۳)	۰/۹۲ ± ۰/۱۳	۰/۷۶-۱/۰۰
Aspergillus terreus	۱ (۵۰/۰)	۰/۸۶ ± ۰/۱۹	۰/۷۳-۱/۰۰
Aspergillus nidulans	–	۱/۰۰ ± ۰/۰۰	
کل	۲۱ (۵۲/۵)	۰/۸۱ ± ۰/۱۷	

بحث:

یکی از دلایل پراکندگی اسپورهای قارچی در فضای بیمارستان‌ها، مربوط به تعداد پرسنل بیمارستان، حضور ملاقات کنندگان، تعداد بیماران بستری در هر اتاق، کمبود سیستم تهویه با کیفیت بالا و بستری طولانی مدت در بیماران بود. اسپور گونه های مختلف Aspergillus در همه جا پراکنده است و عفونت به دنبال استنشاق یا تلقیح اسپور به عوامل زمینه‌ای بیمار بستگی دارد (۱۳). از طرفی، گونه‌های غیر قابل تفکیک در هر بخش Aspergillus، می‌توانند از لحاظ بیماری‌زایی متفاوت باشند. این گونه ها، از نظر ریخت‌شناسی مشابه هم می‌باشند؛ به طوری که از نظر فنوتیپیک قابل تفکیک نمی‌باشند، اما از نظر ژنوتیپی متفاوت‌اند. بنابراین، شناسایی این گونه‌ها در هر بخش، قابل اهمیت می‌باشد (۱۴). در مطالعه‌ی حاضر، نتایج واکاوی تعیین توالی ژن بتا توبولین نمونه های Aspergillus سیاه، نشان داد که ۷۱/۴ درصد مربوط به Aspergillus tubingensis و ۲۸/۵ درصد آن مربوط به Aspergillus niger بود که هر دو، متعلق به بخش نایجری می‌باشند.

Iatta و همکاران، با استفاده از ژن بتا توبولین و کالمودولین بر روی ایزوله‌های بخش نایجری، Aspergillus tubingensis (۷۶/۲ درصد) را به عنوان ایزوله ی غالب گزارش نمودند (۱۵). مطالعات نشان می دهند که مقاومت سویه های Aspergillus در بخش نایجری به ترکیبات آزول، بیشتر مربوط به Aspergillus tubingensis می‌باشد (۱۶). مقاومت به ایتراکونازول در برخی از گونه های نایجری نشان می دهد که شناسایی گونه ها ممکن است به انتخاب درمان ضد قارچی کمک نماید (۱۷).

با توجه به حضور گونه‌های نزدیک در بخش فلاوی مثل Aspergillus oryzae و نیز تفاوت این گونه‌ها در حساسیت به ضد قارچ‌ها، عوامل ویرولانسی و تولید مایکوتوکسین، لزوم تشخیص صحیح آن‌ها اهمیت پیدا می‌کند. در مطالعه‌ی حاضر، در بخش فلاووی، همه‌ی ایزوله‌های شناسایی شده Aspergillus flavus بودند. Monteiro و همکاران نشان دادند که ۳/۶ درصد جدایه‌های Aspergillus به دست آمده از هوای بیمارستان پرتغال مربوط به Aspergillus oryzae از بخش فلاووی می‌باشد (۱۸). Tam و همکاران در هنگ‌کنگ نشان دادند که ۷۲/۷ درصد از نمونه‌های Aspergillus بخش فلاووی مربوط به Aspergillus flavus و به دنبال آن، ۱۸/۰ درصد مربوط به Aspergillus nomius و ۹/۰ درصد مربوط به Aspergillus tamarii می‌باشد (۱۹). عواملی نظیر تفاوت در حجم نمونه و شرایط آب و هوایی و منطقه‌ای می‌تواند تأثیرگذار باشد.

مشابه یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، Sabino و همکاران در کالیفرنیا گزارش نمودند که همه‌ی ۷۷ جدایه‌ی بالینی و محیطی جمع‌آوری شده از پرندگان مبتلا به Aspergillus، متعلق به Aspergillus fumigatus بود و هیچ گونه ی دیگر از بخش فومیگاتی شناسایی نگردید (۲۰). Balajee و همکاران، با تقویت ناحیه‌ی ژنی بتا توبولین و Internal transcribed spacer (ITS) نشان دادند که در بخش فومیگاتی بیشترین گونه‌ها مربوط به Aspergillus fumigatus (۹۴/۰ درصد) می‌باشد (۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر، هویت ۳ جدایه بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی در سطح جنس تشخیص داده شد؛ در حالی که واکاوی تعیین توالی ژن بتا توبولین، آن‌ها را Aspergillus sydowii (۴/۰ درصد) از کمپلکس Aspergillus versicolor شناسایی نمود. شناسایی Aspergillus sydowii بر اساس الگوی کلنی و ریخت‌شناسی میکروسکوپی بسیار چالش برانگیز است. Fernandez و همکاران، میزان بالایی از Aspergillus sydowii را از محیط بیمارستان کودکان جدا نمودند (۲۲). کلونیزاسیون Aspergillus sydowii در مجاری تنفسی در بیماران پیوند ریه بدون تظاهرات Aspergillus به دلیل آلودگی قارچی در بخش مراقبت های ویژه‌ی جراحی و واحد پیوند ریه‌ی محیط بیمارستان از پاریس گزارش شده است (۲۳). گزارش دیگر از ایالات متحده‌ی آمریکا، حاکی از حضور ۱۰/۰ درصد اسپور Aspergillus sydowii در بخش مراقبت‌های ویژه‌ی بیمارستان می‌باشد (۲۴).

نتایج ارزیابی آنزیم‌های هیدرولیتیک مطالعه‌ی حاضر نشان داد که فعالیت پروتئیناز (۶۲/۵ درصد) بالاتر از فعالیت فسفولیپاز (۵۲/۵ درصد) در ایزوله های مورد بررسی می‌باشد. در میان ایزوله‌ها، بالاترین فعالیت پروتئیناز و فسفولیپاز مربوط به Aspergillus tubingensis می‌باشد. در

مطالعه‌ی Raksha و همکاران در هند، گزارش شد که فعالیت پروتئولیتیک Aspergillusهای محیطی، بالاتر از فعالیت فسفولیپاز می‌باشد (۲۵).

در مطالعه‌ی Mezher و همکاران، نشان داده شد که همه‌ی Aspergillus nigerهای جدا شده از نمونه‌ی انسانی قدرت تولید فسفولیپاز را دارا می‌باشند؛ در حالی که هیچ یک از ایزوله‌های Aspergillus flavus فعالیت پروتئولیتیک و فسفولیپازی را نشان ندادند (۲۶). Birinci و همکاران، نشان دادند که Aspergillus fumigatus دارای فعالیت فسولیپازی ۹۳/۳ درصد و فعالیت پروتئینازی ۷۶/۷ درصد می‌باشند. در این مطالعه، ایزوله‌های Aspergillus flavus فاقد فعالیت پروتئیازی و فسفولیپازی بودند (۲۷).

Ghorbel و همکاران نشان دادند که همه‌ی Aspergillus flavusهای جدا شده از انسان و پرندگان، دارای فعالیت فسفولیپازی و پروتئینازی می‌باشند (۲۸). Birch و همکاران، در بررسی تولید فسفولیپاز خارج سلولی توسط ایزوله های محیطی و بالینی Aspergillus fumigatus نشان دادند که فعالیت فسفولیپاز C خارج سلولی در بیماری‌زایی Aspergillus مهم می‌باشد (۲۹).

نتیجه‌گیری

به طور کلی، شناخت عوامل قارچی شایع، نظیر گونه‌های Aspergillus در هر بیمارستان در شناسایی منبع عفونت بیمارستانی و روش‌های پیش‌گیری مؤثر می‌باشد. از طرفی، پاتوژنز Aspergillus به شرایط سیستم ایمنی میزبان و عوامل ویرولانسی بیماری‌زا بستگی دارد. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که ایزوله‌های محیطی Aspergillus به ویژه نمونه‌های Aspergillus بخش نایجری، دارای قدرت تولید پروتئیناز بالایی می‌باشند. بنابراین، به نظر می‌رسد جهت رسیدن به یک درمان مؤثر و جهت‌دهی به تحقیقات آینده، درک ارتباط عوامل ویرولانس با مشخصات عفونت Aspergillus و بررسی مکانیسم‌های بیماری‌زایی، ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی:

تحقیق حاضر حاصل از طرح تحقیقاتی با کد اخلاق IR.QUMS.REC.1396.274 مصوب در دانشگاه علوم پزشکی قزوین می‌باشد. از تمام پرسنل محترم بیمارستان که صمیمانه و با صبر و حوصله ما را یاری رساندند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Choubdar M, Mohammadi F, Safari Varyani A, Hasani K, Nikpey A. Investigating of relationship between biological and non-biological airborne particles in the internal section of two educational hospitals in Qazvin city. Iran Occup Health 2019; 15(6): 60-71. [In Persian].
2. Perdelli F, Cristina ML, Sartini M, Spagnolo AM, Dallera M, Ottria G, et al. Fungal contamination in hospital environments. Infect Control Hosp Epidemiol 2006; 27(1): 44-7.
3. Latge JP, Chamilos G. Aspergillus fumigatus and Aspergillosis in 2019. Clin Microbiol Rev 2019; 33(1): e00140-18.
4. Martinez-Herrera EO, Frias De-Leon MG, Duarte-Escalante E, Calderon-Ezquerro MC, Jimenez-Martinez MC, Acosta-Altamirano G, et al. Fungal diversity and Aspergillus species in hospital environments. Ann Agric Environ Med 2016; 23(2): 264-9.
5. Chein SH, Sadiq MB, Datta A, Anal AK. Prevalence and identification of Aspergillus and Penicillium species isolated from peanut kernels in central Myanmar. J Food Saf 2019; 39(6): e12686.
6. Tekaia F, Latge JP. Aspergillus fumigatus: saprophyte or pathogen? Curr Opin Microbiol 2005; 8(4): 385-92.
7. Miramon P, Lorenz MC. A feast for Candida: Metabolic plasticity confers an edge for virulence. PLoS Pathog 2017; 13(2): e1006144.
8. O'Donnell LE, Robertson D, Ramage G. Candida virulence factors. In: Ribeiro Rosa EA, editor. Oral Candidosis. New York, NY: Springer, 2015. p. 7-19.
9. Verweij PE, Meis JF, Sarfati J, Hoogkamp-Korstanje JA, Latge JP, Melchers WJ. Genotypic characterization of sequential Aspergillus fumigatus isolates from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1996; 34(10): 2595-7.
10. Mohammadi F, Hashemi SJ, Seyedmousavi SM, Akbarzade D. Isolation and characterization of clinical triazole resistance Aspergillus fumigatus in Iran. Iran J Public Health 2018; 47(7): 994-1000.
11. Mohammadi F, Ghasemi Z, Familsatarian B, Salehi E, Sharifynia S, Barikani A, et al. Relationship between antifungal susceptibility profile and virulence factors in Candida albicans isolated from nail specimens. Rev Soc Bras Med Trop 2020; 53: e20190214.
12. Federici F. Extracellular enzymatic activities in Aureobasidium pullulans. Mycologia 1982; 74(5): 738-43.
13. Nivoix Y, Velten M, Letscher-Bru V, Moghaddam A, Natarajan-Ame S, Fohrer C, et al. Factors associated with overall and attributable mortality in invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 2008; 47(9): 1176-84.
14. Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA. The current status of species recognition and identification in Aspergillus. Stud Mycol 2007; 59: 1-10.
15. Iatta R, Nuccio F, Immediato D, Mosca A, De CC, Miragliotta G, et al. Species distribution and in vitro azole susceptibility of Aspergillus section Nigri isolates from clinical and environmental settings. J Clin Microbiol 2016; 54(9): 2365-72.

16. Hashimoto A, Hagiwara D, Watanabe A, Yahiro M, Yikelamu A, Yaguchi T, et al. Drug sensitivity and resistance mechanism in Aspergillus section Nigri strains from Japan. Antimicrob Agents Chemother 2017; 61(8): e02583-16.
17. Hendrickx M, Beguin H, Detandt M. Genetic re-identification and antifungal susceptibility testing of Aspergillus section Nigri strains of the BCCM/IHEM collection. Mycoses 2012; 55(2): 148-55.
18. Monteiro C, Pinheiro D, Maia M, Faria MA, Lameiras C, Pinto E. Aspergillus species collected from environmental air samples in Portugal-molecular identification, antifungal susceptibility and sequencing of cyp51A gene on A. fumigatus sensu stricto itraconazole resistant. J Appl Microbiol 2019; 126(4): 1140-8.
19. Tam EW, Chen JH, Lau EC, Ngan AH, Fung KS, Lee KC, et al. Misidentification of Aspergillus nomius and Aspergillus tamarii as Aspergillus flavus: characterization by internal transcribed spacer, beta-Tubulin, and calmodulin gene sequencing, metabolic fingerprinting, and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2014; 52(4): 1153-60.
20. Sabino R, Burco J, Valente J, Verissimo C, Clemons KV, Stevens DA, et al. Molecular identification of clinical and environmental avian Aspergillus isolates. Arch Microbiol 2019; 201(2): 253-7.
21. Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, et al. Molecular identification of Aspergillus species collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. J Clin Microbiol 2009; 47(10): 3138-41.
22. Fernandez M, Cattana M, Rojas F, Sosa ML, Aguirre C, Vergara M, et al. Aspergillus species in hospital environments with pediatric patients in critical condition. Rev Iberoam Micol 2014; 31(3): 176-81. [In Spanish].
23. Bonnal C, Leleu C, Brugiere O, Chochillon C, Porcher R, Boelle PY, et al. Relationship between Fungal Colonisation of the Respiratory Tract in Lung Transplant Recipients and Fungal Contamination of the Hospital Environment. PLoS One 2015; 10(12): e0144044.
24. Herman LG. Aspergillus in patient care areas. Ann N Y Acad Sci 1980; 353: 140-6.
25. Raksha, Singh G, Urhekar AD. Virulence factors detection in aspergillus isolates from clinical and environmental samples. J Clin Diagn Res 2017; 11(7): DC13-DC18.
26. Mezher MA, Ra oWaM, Bandar KI. Identification study some virulence factors of invasive mold infections isolated from patients undergoing chemotherapy in Tikrit teaching Hospital. Egypt Acad J Biol Sci, G Microbiol 2015; 7(1): 1-11.
27. Birinci A, Bilgin K, Tanriverdi CY. Investigation of acid proteinase and phospholipase activity as virulence factors in clinical Aspergillus spp. isolates. Mikrobiyol Bul 2014; 48(3): 491-4. [In Turkish].
28. Ghorbel D, Hadrich I, Neji S, Trabelsi H, Belaaj H, Sellami H, et al. Detection of virulence factors and antifungal susceptibility of human and avian Aspergillusflavus isolates. J Mycol Med 2019; 29(4): 292-302.
29. Birch M, Denning DW, Robson GD. Comparison of extracellular phospholipase activities in clinical and environmental Aspergillus fumigatus isolates. Med Mycol 2004; 42(1): 81-6.

DOI: *10.22122/jims.v38i603.13784* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 38, No. 603, 3rd Week, February 2021**

Received: 26.12.2020 Accepted: 10.01.2021 Published: 19.02.2021

Molecular Identification and Evaluation of the Ability to Produce Phospholipase and Proteinase by Aspergillus Environmental Isolates Obtained from Hospital

Faezeh Mohammadi[1], Nima Hemmat[2], Behnaz Familsatarian[2], Asieh Maghami-Mehr[3]

Original Article

Abstract

Background: One of the causes of nosocomial infections is the dispersion of Aspergillus spores in the environment. The secretion of hydrolytic enzymes is considered as a virulence factor in Aspergillus species. The aim of this study was to identify environmental Aspergillus isolates via sequencing the beta-tubulin gene and evaluating the ability to produce phospholipase and proteinase in vitro.

Methods: 93 Aspergillus colonies were collected from the emergency, surgical wards, intensive care unit, and operation theatres of two teaching hospitals in Qazvin Province, Iran. The β-tubulin gene region was amplified using polymerase chain reaction (PCR) method, and 40 isolates were sequenced. Evaluation of proteinase and phospholipase production was performed using yeast carbon base (YCB) with bovine serum albumin and egg yolk agar medium, respectively.

Findings: Based on β-tubulin sequence, Aspergillus (A.) flavus (30%), A. tuberculosis (25%), A. fumigatus (20%), A. niger (10%), A. sydowii (7.5%), A. terreus (5%), and A. nidulans (2.5%) were identified. Evaluation of extracellular enzymes showed that 82.5% of the isolates had proteinase ability with a mean proteinase of 0.73 ± 0.13, and 52.5% of the studied Aspergillus isolates had phospholipase activity with a mean of 0.81 ± 0.17.

Conclusion: Our study showed that environmental strains have high proteinase production. Therefore, it seems necessary to better understand the association of virulence factors with aspergillosis infection in future studies.

Keywords: Aspergillus; Tubulin; Peptide hydrolases; Phospholipase

Citation: Mohammadi F, Hemmat N, Familsatarian B, Maghami-Mehr A. **Molecular Identification and Evaluation of the Ability to Produce Phospholipase and Proteinase by Aspergillus Environmental Isolates Obtained from Hospital.** J Isfahan Med Sch 2021; 38(603): 929-35.

1- Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Non-Communicable Disease, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
2- Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Science, Qazvin, Iran
3- Department of Statistics, Shiraz Payame Noor University, Shiraz, Iran
Corresponding Author: Faezeh Mohammadi, Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Non-Communicable Disease, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran; Email: esf.mohamadi@gmail.com