

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^۳، آسیه مقامی مهر^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: یکی از دلایل عفونت‌های بیمارستانی، پراکندگی اسپوره‌های *Aspergillus* در محیط می‌باشد. ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک به عنوان یک عامل ویرولاز 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 0.13 ± 0.073 و $0.52/5$ درصد از ایزوله‌های *Aspergillus* مورد بررسی دارای فعالیت فسفولیپازی با میانگین 0.17 ± 0.081 می‌باشند.

نتیجه‌گیری: مطالعه‌ی حاضر نشان داد که سویه‌های محیطی دارای تولید بالای پروتئیناز می‌باشند. بنابراین، به نظر می‌رسد که درک بهتر ارتباط عوامل ویرولاز 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): ۹۳۵-۹۳۹.

مقدمه

کیفیت سیستم‌های تهویه‌ی هوا، عدم کنترل دما و رطوبت نسبی و نیز فعالیت‌های ساختمان‌سازی در مکان‌های مجاور با محل نگهداری بیماران پرخطر، در انتشار عوامل بیماری‌زا نقش مهمی دارند (۳).

Aspergillus، اغلب توسط گونه‌های مختلف نظیر *Aspergillus niger*، *Aspergillus flavus*، *Aspergillus fumigatus* 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 می‌باشند. مطالعات

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 (۱-۲).

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

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

Polymerase chain reaction (PCR) و تقویت ژن بتا توبولین:

جهت تکثیر ژن بتا توبولین، از توالی‌های آغازگر (5'GGTAACCAATCGGTGCTGCTTTC 3') Bt2a و (3' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 5') Bt2b 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 ایزوله‌های انتخابی تخلیص و با استفاده از ABI3130X (Applied biosystems) تعیین توالی شدند. پس از دریافت نتایج توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 3.6.5 واکاوی شدند و جهت مقایسه‌ی توالی‌ها با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن، از نرم‌افزار BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) استفاده گردید. شناسایی ایزوله‌ها با استفاده از تشابه توالی بالا ۹۹-۱۰۰ درصد در پایگاه داده‌های (NCBI) National Center for Biotechnology Information 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 تخم مرغ بررسی گردید. جهت انجام آزمایش، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی تهیه شده (۱۰۶ سلول/میلی‌لیتر)، به پلیت‌های 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 (BSA) Bovine albumin serum با pH = ۵ انجام گردید. این محیط، حاوی Yeast extract، K₂HPO₄، NaCl، MgSO₄·7H₂O و BSA، گلوکز می باشد که به آگار مذاب اضافه گردید. برای هر ایزوله، سوسپانسیون قارچی (۱۰۶ سلول/میلی‌لیتر) تهیه شد و سپس، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون بر سطح محیط کشت تلقیح گردید و همه‌ی پلیت‌ها 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 علاوه‌ی 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 $EAI = 1$ معادل عدم فعالیت، $EAI = 0.64 - 0.99$ معادل فعالیت مثبت آنزیمی و $EAI \leq 0.63$ معادل فعالیت قوی در نظر گرفته شد (۱۲).

نشان می‌دهد 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 ویروالانس و پاتوژنیستی قارچ می‌باشد. تحمل حرارتی، چسبندگی، تولید رنگدانه، متابولیت‌های سمی و ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک به عنوان عوامل ویروالانسی به پاتوژنز *Aspergillus* کمک می‌نمایند (۶). پاتوژنز *Aspergillus* به عوامل میزبان و عوامل ویروالانس بستگی دارد. هیدرولازهای خارج سلولی مانند پروتئیناز، فسفولیپاز، همولایزین و استراز، از جمله عوامل اصلی ویروالانس می‌باشند که نقش کلیدی در فرایند تخریب غشای سلولی و کلونیزاسیون گسترده‌ی *Aspergillus* در ریه را نشان می‌دهند (۷-۸). 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 پلیت‌گذاری 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 ۷-۱۰ 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 میکروتیوب 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 مرحله‌ی 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).

سنجش تولید فسفولیپاز نشان داد که ۵۲/۵ درصد از ایزوله‌های *Aspergillus* مورد بررسی، دارای فعالیت فسفولیپازی با میانگین 0.17 ± 0.81 بودند. در بین ایزوله‌ها، بیشترین میزان فعالیت مربوط به بخش نایجری (۶۴/۳ درصد) می‌باشد (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 پروتیناز در نمونه‌های *Aspergillus* جدا شده از فضای بیمارستان

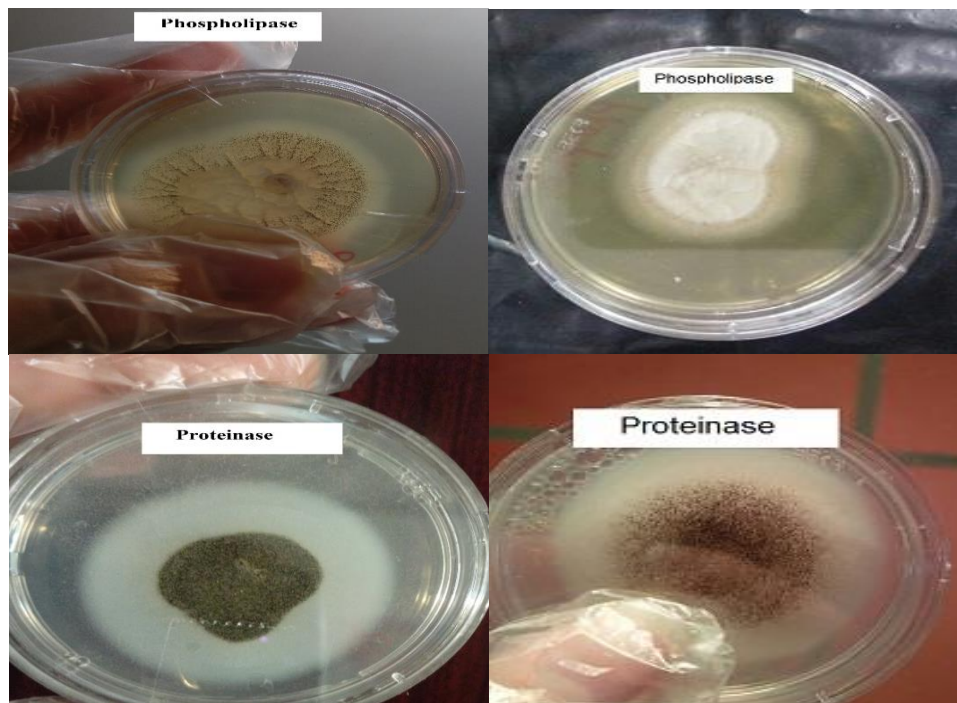
محدوده	میانگین \pm انحراف معیار	تولید آنزیم پروتیناز	ایزوله
۰/۶۶-۱/۰۰	0.12 ± 0.76	۱۰ (۸۳/۳)	<i>Aspergillus flavus</i>
۰/۶۸-۱/۰۰	0.13 ± 0.78	۶ (۷۵/۰)	<i>Aspergillus fumigatus</i>
۰/۵۶-۰/۶۹	0.05 ± 0.61	۴ (۱۰۰)	<i>Aspergillus niger</i>
۰/۵۸-۰/۷۲	0.04 ± 0.64	۱۰ (۱۰۰)	<i>Aspergillus tubingensis</i>
۰/۷۶-۱/۰۰	0.12 ± 0.86	۲ (۶۶/۷)	<i>Aspergillus sydowii</i>
۰/۶۹-۱/۰۰	0.21 ± 0.84	۱ (۵۰/۰)	<i>Aspergillus terreus</i>
۱	0.00 ± 1.00	-	<i>Aspergillus nidulans</i>
	0.13 ± 0.73	۳۳ (۸۲/۵)	کل

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) و *Aspergillus niger* (۱۰/۰ درصد)، *Aspergillus terreus* (۷/۵ درصد) و *Aspergillus sydowii* (۵/۰ درصد) شناسایی گردید.

ارزیابی آنزیم‌های خارج سلولی نشان داد که از ۴۰ ایزوله‌ی محیطی مورد مطالعه، ۸۲/۵ درصد از ایزوله‌ها، توانایی پروتیناز با میانگین پروتیناز 0.13 ± 0.73 را نشان دادند. در بین ایزوله‌ها، بیشترین فعالیت پروتیناز مربوط به بخش نایجری (۱۰۰ درصد) و به دنبال آن *Aspergillus flavus* (۸۳/۳ درصد)، *Aspergillus fumigatus* (۷۵/۰ درصد)، *Aspergillus terreus* و *Aspergillus sydowii* (۶۶/۷ درصد) و *Aspergillus tubingensis* (۵۰/۰ درصد) بودند (جدول ۱). همچنین، تولید پروتیناز در سطوح قوی در *Aspergillus niger* (۷۵/۰ درصد) و *Aspergillus tubingensis* (۴۰/۰ درصد) مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱. A و B: هاله‌ی اطراف کلنی *Aspergillus* جهت ارزیابی فعالیت پروتیناز، 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 \pm انحراف معیار	محدوده
<i>Aspergillus flavus</i>	۶ (۵۰/۰)	۰/۸۶ \pm ۰/۱۶	۰/۵۶-۱/۰۰
<i>Aspergillus fumigatus</i>	۴ (۵۰/۰)	۰/۸۸ \pm ۰/۱۴	۰/۶۷-۱/۰۰
<i>Aspergillus niger</i>	۳ (۷۵/۰)	۰/۶۹ \pm ۰/۲۱	۰/۵۳-۱/۰۰
<i>Aspergillus tubingensis</i>	۶ (۶۰/۰)	۰/۷۰ \pm ۰/۱۶	۰/۵۸-۱/۰۰
<i>Aspergillus sydowii</i>	۱ (۳۳/۳)	۰/۹۲ \pm ۰/۱۳	۰/۷۶-۱/۰۰
<i>Aspergillus terreus</i>	۱ (۵۰/۰)	۰/۸۶ \pm ۰/۱۹	۰/۷۳-۱/۰۰
<i>Aspergillus nidulans</i>	-	۱/۰۰ \pm ۰/۰۰	
کل	۲۱ (۵۲/۵)	۰/۸۱ \pm 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 گونه‌های 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* می‌تواند از لحاظ بیماری‌زایی متفاوت باشند. این گونه‌ها، 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 نمونه‌های *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 ایزوله‌ی غالب گزارش نمودند (۱۵). مطالعات نشان می‌دهند که مقاومت سویه‌های *Aspergillus* در بخش نایجری به ترکیبات آزل، بیشتر مربوط به *Aspergillus tubingensis* می‌باشد (۱۶). مقاومت به ایتراکونازول در برخی از گونه‌های نایجری نشان می‌دهد که شناسایی گونه‌ها 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 ویروالانسی 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 tamarini* 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 گونه‌ی 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 مراقبت‌های 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 پروتیناز (۶۲/۵ درصد) بالاتر از فعالیت فسفولیپاز (۵۲/۵ درصد) در ایزوله‌های مورد بررسی می‌باشد. در میان ایزوله‌ها، بالاترین فعالیت پروتیناز و فسفولیپاز مربوط به *Aspergillus tubingensis* می‌باشد. در

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 ویروالانسی 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 جهت دهی به تحقیقات آینده، درک ارتباط عوامل ویروالانس 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.

مطالعه‌ی Raksha و همکاران در هند، گزارش شد که فعالیت پروتولیتیک *Aspergillus*‌های محیطی، بالاتر از فعالیت فسفولپاز می‌باشد (۲۵).

در مطالعه‌ی Mezher و همکاران، نشان داده شد که همه‌ی *Aspergillus niger*‌های جدا شده از نمونه‌ی انسانی قدرت تولید فسفولپاز را دارا می‌باشند؛ در حالی که هیچ یک از ایزوله‌های *Aspergillus flavus* فعالیت پروتولیتیک و فسفولپازی را نشان ندادند (۲۶). Birinci و همکاران، نشان دادند که *Aspergillus fumigatus* دارای فعالیت فسولپازی ۹۳/۳ درصد و فعالیت پروتئینازی ۷۶/۷ درصد می‌باشند. در این مطالعه، ایزوله‌های *Aspergillus flavus* فاقد فعالیت پروتئینازی و فسفولپازی بودند (۲۷).

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

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, Dalleria 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 *Aspergillus flavus* 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.

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

Faezeh Mohammadi¹, Nima Hemmat², Behnaz Familsatarian², Asieh Maghami-Mehr³

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