ارزیابی مقایسه ای فعالیت الاستازی ایزوله های قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* از موارد انسانی و حیوانی

دکتر سعید مهدوی عمران[1] دکتر عباس لطفی[2*] دکتر علیرضا خسروی[3] دکتر مژده صالح نیا[4]
دکتر احمد زواران حسینی[5] دکتر انوشیروان کاظم نژاد[6]

دریافت مقاله: ۶ بهمن ماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۱۲ خرداد ماه ۱۳۸۲

هدف: تعیین فعالیت الاستازی ایزوله های بیماریزای قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* درمحیط جامد و مایع.

نمونه ها: تعداد بیست و شش ایزوله قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* که از بیماران انسانی و حیوانی جدا شده بودند و یک سویه استاندارد از این گونه مورد مطالعه قرار گرفتند.

روش: پس از بررسی مرفولوژی ماکروسکوپی و میکروسکوپی قارچها، آنها در پلیت حاوی محیط الاستین کشت داده شدند و سپس با کشت آنها در محیط مایع حاوی الاستین، فعالیت الاستازی آنها بررسی شد.

تجزیه و تحلیل آماری: برای مقایسه گروه های انسانی و حیوانی از لحاظ تولید الاستاز از آزمونهای آماری"t" و مربع کای استفاده شد.

نتایج: مطالعه کشت ایزوله های قارچی در پلیت حاوی محیط الاستین نشان داد که ایزوله جدا شده از ریه انسان دارای بیشترین قطر هاله شفاف در اطراف کلنی بوده و۳ ایزوله دیگر که از ریه انسان و چشم جوجه جدا شده بودند، نیز به مقدار کمتری دارای هاله بودند. در محیط مایع پس از رشد قارچ و صاف کردن محیط، ایزوله ای که از ورم پستان گاو جدا شده بود، بیشترین مقدار آنزیم را در محیط ایجاد کرده بود و گونه جدا شده از چشم مرغ، کمترین میزان الاستازی را در محیط نشان داد.

نتیجه گیری: با توجه به یافته های موجود و نتایج آماری انجام گرفته، مشخص شده است ایزوله هایی که در انسان ایجاد بیماری کرده بودند دارای توانایی بیشتری در تولید الاستاز بوده که می تواند بیانگر این مسأله باشد که برای ایجاد بیماری در انسان، الزاماً باید توانایی قارچ در تولید سموم و دیگر شاخصهای بیماریزایی بیشتر از ایزوله هایی باشد که در حیوان ایجاد بیماری می کنند. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۲، ۱۹۶-۱۹۳.

واژه های کلیدی: *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، حدت، آنزیم، الاستاز، الاستین.

آسپرژیلوس ها یکی از قارچهای شایع در محیط و هوا بوده و عامل ایجاد بیماریهای مختلف انسانی و حیوانی (شامل جلدی، احشایی، ریوی و آلرژیک و...) هستند (۱،۲). از بین گونه های متعدد این جنس، گونه فومیگاتوس نقش بیشتری را در بیماریزایی داشته که تعدد و قدرت آنتی ژنیک، سموم، آنزیمها و اندازه کوچکتر کونیدی در این قارچ از دلایل این امر هستند. با اینکه نقش عمده سیستم دفاعی بدن در مقابله با این قارچ به عهده ایمنی غیر اختصاصی توسط ماکروفاژها و در مرحله بعدی نوتروفیل ها است، ولی ایمنی اختصاصی شامل ایمنی سلولی و همورال نیز در حذف این قارچ و سپس به دنبال آن در بیماریهای ناشی از این قارچ در بدن دخالت دارندکه می تواند دارای ارزش تشخیصی و یا پیشگویی باشد (۳،۴). آنزیمهای پروتئازی از جمله الاستاز به دلیل تجزیه پروتئینهایی مثل الاستین موجود در ریه و دیواره عروق خونی از فاکتورهای احتمالی حدت *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و دیگر گونه ها مثل *آسپرژیلوس فلاووس* می باشندکه بررسیهای مختلفی در زمینه شناخت اثرات آن صورت گرفته است. الاستاز *آسپرژیلوس فومیگاتوس* که یک آنزیم خارج سلولی می باشد، دارای وزن مولکولی ۳۲ کیلو دالتون بوده و اختصاصیترین سوبسترای آن الاستین است. فعالیت این آنزیم به وسیله بعضی از موادی همچون فنیل متیل سولفونیل فلوراید و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید مهار می گردد (۵،۶،۷). علاوه بر *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، قارچهای دیگری مثل *آسپرژیلوس فلاووس* و *سدوسپوریوم آپیوسپرموم* و نیز باکتریهایی نظیر *ویبریو کلرا*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* و *پسودوموناس آئروژینوزا*، قادر به تولید این آنزیم می باشند (۵،۸).

هر چند درباره ارتباط بین ایجاد بیماری در موش و سویه های دارای این آنزیم و نیز تخریب عروق، بررسیهای متعددی صورت گرفته است (۹،۱۰)، ولی هنوز نکات مبهمی در مورد نقش این آنزیم وجود دارد (۱۱). لذا به منظوربررسی ارتباط بین ایزوله های مختلف *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، تولید آنزیم الاستاز و ایجاد بیماری در انسان و حیوان، تحقیق حاضر صورت گرفت.

۱) گروه آموزشی قارچ شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران - ایران.
۲) گروه آموزشی بیوشیمی بالینی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران - ایران.
۳) گروه آموزشی قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۴) گروه آموزشی آناتومی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران - ایران.
۵) گروه آموزشی ایمنی شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران - ایران.
۶) گروه آموزشی آمار حیاتی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسئول Lotfi_ab@Modares.ac.ir

Evaluation of the elastase activity of different aspergillus fumigatus isolated from human and animal cases

Mahdavi O.S.,[1] Lotfi, A.,[2] Khosravi, A.R.,[3] Salehnia, M.,[4] Zavvaran Hosseini, A.,[5] Kazemnejad, A.[6]

[1]Department of Mycology, Faculty of Medical Sciences, University of Tarbiat Modarres Tehran, Tehran-Iran. [2]Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, University of Tarbiat Modarres, Tehran-Iran. [3]Department of Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. [4]Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, University of Tarbiat Modarres, Tehran-Iran. [5]Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, University of Tarbiat Modarres, Tehran-Iran. [6]Department of Bio Statistic, Faculty of Medical Sciences, University of Tarbiat Modarres, Tehran-Iran.

Objective: Identification of elastase activity of *A. fumigatus* from infected humans and animals.

Specimens: Twenty six *A. fumigatus* isolates and also 1 standard strain that were used for this study, were obtained from human and animal cases.

Procedure: Gross macroscopy and microscopy morphology of *A. fumigatus* were examined. Then were cultured on solid and broth medium containing elastin. The diameters of the clearing zones surrounding colonies were used to estimate elastase production by the different isolates. The culture broth was filtered and measured spectrophotometrically for the pruduce of extracellular elastase.

Statistical analysis: Student's "t" test and Chi-square were used for comparison and analysis of groups

Results: The results of fungal cultures on plates with elastin, showed that the fungus isolated from humans' lung had the most light halo diameter around colony, whereas 3 isolates from infected humans and animals appeared with small light halo diameter in broth medium. *A. fumigatus* isolated from bovine mastitis, produced the most amount of the enzyme on the medium. *A. fumigatus* isolated from avian keratomycosis had the lowest elastase activity.

Conclusion: The results showed that *A. fumigatus* isolated from humans were more potential than animal isolates to produce elastase. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 2: 193-196, 2003.***

Key words: Aspergillus fumigatus, Virulence, Enzyme, Elastase.

corresponding author email:Lotfi_ab@Modares.ac.ir

مواد و روش کار

نمونه های قارچی: تعداد ۲۶ ایزوله مختلف قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* جدا شده از موارد آسپرژیلوزیس انسانی (۱۲مورد) و حیوانی(۱۴مورد) در مرکز قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و نیز یک سویه استاندارد ASP25 (از مرکز قارچ شناسی لندن) در این بررسی مورد مطالعه قرار گرفت.

مشخصات مرفولوژی ایزوله ها: مطالعه منظره ماکروسکوپی ایزوله های قارچی، از کشت ۵ روزه آنها درمحیط چاپکس دکستروز آگار و در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد صورت گرفته و بررسی میکروسکوپی قارچها، با کشت روی لام انجام گرفت.

غربالگری برای تولید الاستاز

الف) تهیه کونیدی: ایزوله ها در محیط سابورو دکستروز آگار به همراه کلرامفنیکل کشت داده شدند و کونیدی های حاصله به وسیله غلظت ۰/۱ درصد توئین ۸۰ جمع آوری و در لوله های درپیچ دار نگهداری شدند.

ب) تهیه محیط کشت: محیط کشت تحریکی الاستین حاوی ۰/۲ درصد الاستین (سیگما)، ۰/۰۱ درصد عصاره مخمر(Yeast extract) ، ۰/۵ درصد تریتون ۱۰۰-X و ۱/۵ درصد آگار تهیه و پس از استریل کردن در پلیت ها تقسیم شد (۵).

ج) کشت: سوسپانسیون کونیدی ایزوله های قارچی به صورت نقطه ای در داخل پلیت و روی محیط کشت شده و در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز نگهداری شدند و سپس وجود هاله اطراف کلنی مورد مطالعه قرار گرفت(۵).

تعیین میزان الاستاز تولیدی

الف) تهیه کونیدی: کونیدی ایزوله ها مجدداً در محیط سابورو دکستروز آگار به همراه کلرامفنیکل کشت داده شد. محیطهای کشت به مدت ۵ روز در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری و پس از جمع آوری کونیدی با استفاده از غلظت ۰/۱ درصد توئین ۸۰، کونیدی ها شمارش و به تعداد 3×10^{7} عدد در هر میلی لیتر رسانده شد.

ب) کشت کونیدی در محیط مایع: محیط کشت مایع الاستین مشتمل بر۱/۱۷ درصد Yeast carbon base، ۰/۲ درصد الاستین و ۰/۳ درصد کربنات کلسیم تهیه و استریل گردید. آنگاه سوسپانسیون کونیدی به میزان ۱/۳۲ درصد به ۲۵۰ میلی لیتر از محیط کشت فوق اضافه گردید و به مدت ۴ روز در انکوباتور شیکردار با ۱۵۰ دور در دقیقه و حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

با توجه به خارج سلولی بودن الاستاز، پس از گذشت زمان فوق میسیلیوم ها با استفاده از کاغذ صافی از محیط کشت جدا و مایع حاصله به وسیله فیلتر با منفذ ۰/۴۵میکرومتر صاف گردید (۵).

ج) بررسی میزان الاستاز تولیدی: برای تعیین فعالیت آنزیمی، بافر فسفات سدیم با pH =۷ تهیه و ۱ گرم الاستین - کنگو رد (سیگما) به ۱۰۰ میلی لیتر بافر اضافه شده و بلافاصله برای جلوگیری از گلوله شدن با ورتکس مخلوط گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از الاستاز پانکراس خوکی (سیگما) با رقتهای ۰/۸۴۶-۰/۱۳۴ میکروگرم در هر میلی لیتر به ۲ میلی لیتر بافر اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور شیکر دار با۱۲۰ دور در دقیقه و حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. سپس نمونه ها با دور g ۱۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و فعالیت آنزیم الاستازی مایع رویی نمونه ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu,Uv-1601Pc) و طول موج ۴۹۵ نانومتر بررسی شد و پس از رسم منحنی استاندارد، فعالیت الاستازی در نمونه های قارچی اندازه گیری شد(۱۲).

جدول ۱- قطر هاله شفاف اطراف کلنی های قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در محیط جامد بقیه ایزوله ها بدون هاله بودند.

محل جداسازی	قطر کلنی به میلیمتر	قطر هاله به میلیمتر
انسان (ریه)	۴۷	۵۳
انسان (ریه)	۳۴	۳۹
انسان (ریه)	۱۱	۲۱
طیور (چشم)	۲۳	۲۹

جدول ۲- وضعیت الاستاز تولیدی توسط ایزوله های قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* باتوجه به نوع میزبان.

نوع میزبان	الاستاز مثبت	الاستاز منفی	جمع تعداد (درصد)
انسان	(۶۹/۲) ۹	(۳۰/۸) ۴	(۱۰۰) ۱۳
حیوان	(۳۵/۷) ۵	(۶۴/۳) ۹	(۱۰۰) ۱۴
جمع	(۵۱/۹) ۱۴	(۴۸/۱) ۱۳	(۱۰۰) ۲۷

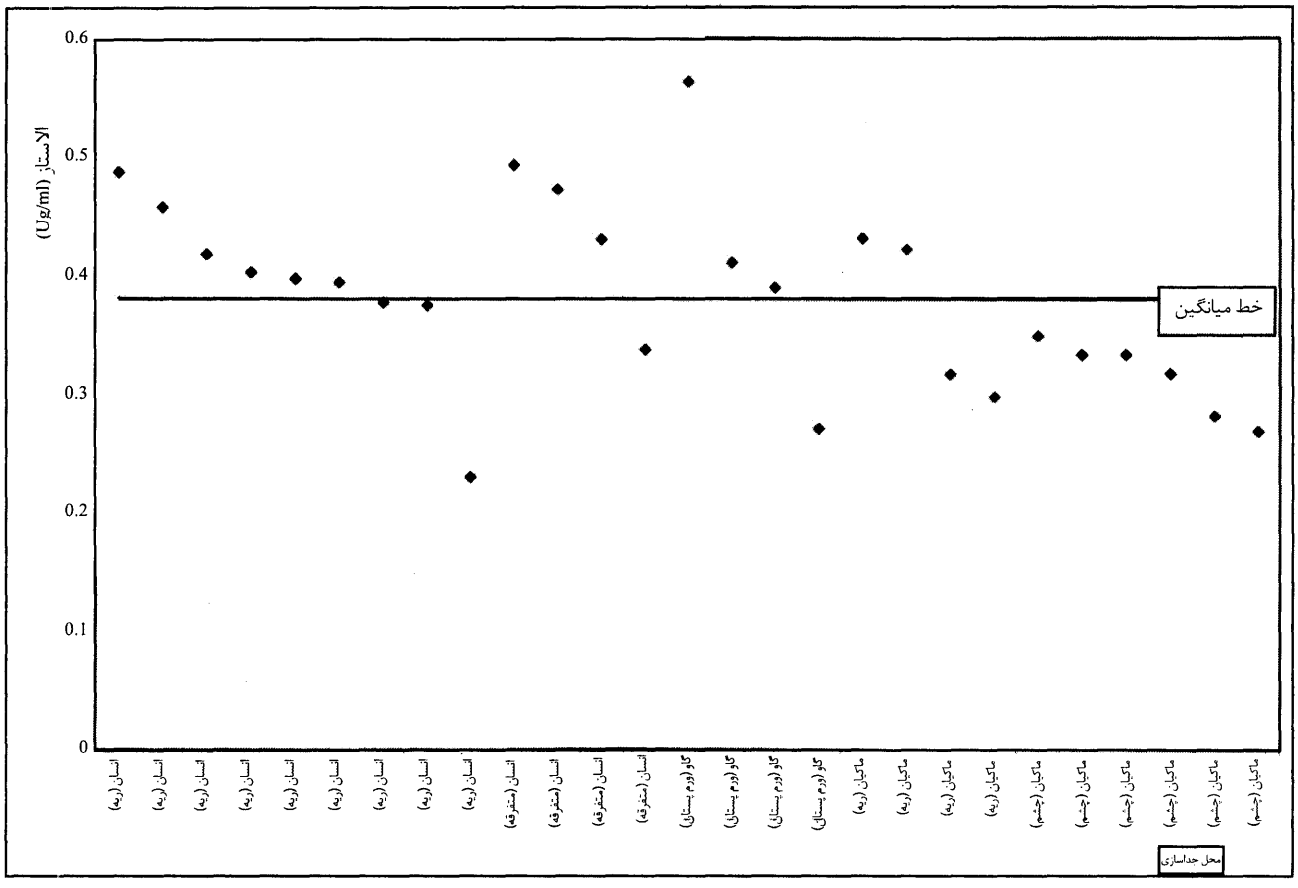
آزمون آماری: برای مقایسه گروه ها ازآزمونهای آماری "t" و مربع کای بهره برده شد. و با بکار گیری سیستم نرم افزاری Excel و SPSS داده ها پردازش و تحلیل گردید.

نتایج

غربالگری برای تولید الاستاز: مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی تأیید کننده قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در تمامی ایزوله ها بود. در غربالگری اولیه برای تولید الاستاز در محیط جامد، ایزوله ای که از ریه انسان جدا شده بود دارای بیشترین قطر هاله شفاف در اطراف کلنی بوده و در اطراف ۳ کلنی دیگری که از ریه انسان و چشم جوجه جدا شده بود، نیز مقدار کمی هاله دیده شد (جدول ۱). بقیه کلنی ها یا بدون هاله بوده و یا اینکه در بعضی از قسمتهای کلنی هاله داشتند.

تعیین فعالیت الاستازی: پس از جداسازی میسیلیوم ها با استفاده از کاغذ صافی، میزان پروتئین در مایع حاصله از محیط کشت به روش برادفورد اندازه گیری شد که بیشترین و کمترین میزان آن در واحد حجم به ترتیب در ایزوله های جدا شده از چشم جوجه (۰/۰۵۳ میلی گرم در هر میلی لیتر) و ورم پستان گاو (۰/۰۲۴ میلی گرم در هر میلی لیتر) دیده شد.

با عبور محیط کشت مایع از فیلتر با منفذ به قطر ۰/۴۵ میکرومتر و با استفاده از پمپ سارتریوس، مقدار الاستاز موجود در عصاره حاصله پس از رسم استاندارد با رقتهای مختلف الاستاز پانکراس خوکی، بیشترین میزان الاستازتولیدی با ۰/۴۱ میکرو گرم در هر میلی لیتر عصاره در ایزوله ای که از ورم پستان گاو جدا شده بود دیده شد و کمترین مقدار آنزیمی هم در ایزوله ای که از چشم مرغ جدا شده بود، با ۰/۳۵۷ میکرو گرم در هر میلی لیتر مشاهده گردید (نمودار ۱). نتایج نشان داد که ایزوله های انسانی در حد معنی دار$P<0/05$ آنزیم بیشتری (Mean =۰/۴۱۰ و SD=۰/۰۵۷) را نسبت به ایزوله های حیوانی تولید کرده بودند (Mean=۰/۳۵۷ و SD=۰/۰۸). باتوجه به میانگین آنزیم تولیدی در ایزوله های مورد بررسی(۰/۳۸۰ میکروگرم در هر میلی لیتر)، همه ایزوله ها به دو گروه الاستاز مثبت و الاستاز منفی تقسیم شدند. از مجموع ۲۷ ایزوله، ۵۱/۹ درصد از ایزوله ها الاستاز مثبت بودند که از این میان ۶۹/۲ درصد از ایزوله های انسانی و ۳۵/۷ درصد از ایزوله های حیوانی الاستاز مثبت بودند. از نظر آماری اختلاف بین این دو گروه با $P<0/08$ معنا دار بود (جدول ۲).



نمودار ۱- مقادیر الاستاز تولیدی توسط ایزوله های قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با توجه به محل جدا سازی.

میزان پروتئین عصاره حاصله نیز در ایزوله جدا شده از ریه جوجه (با ۰/۰۳۹میلی گرم در هر میلی لیتر) و ریه انسان (۰/۰۱۴ میلی گرم در میلی لیتر) به ترتیب دارای بیشترین و کمترین مقدار بود. آزمون آماری بین ایزوله های انسانی و حیوانی اختلاف معنا داری را نشان داد (P<۰/۰۱۲)، که بیانگر کم بودن میزان پروتئین در ایزوله های حیوانی است.

بحث

از آنجایی که بسیاری از مبتلایان به آسپرژیلوزیس خصوصاً در شکل مهاجم، به درمانهای ضد قارچی موجود پاسخ نمی دهند، بررسی جوانب مختلف این بیماری ضروری به نظر می رسد (۶). آنزیم الاستاز که در گونه های *فومیگاتوس و فلاووس* دیده می شود، از نکات مورد بحث در زمینه بیماریزایی این قارچ در اثر تخریب الاستین موجود در بافت ریه و دیواره رگهای خونی است (۳،۱۳).

نتایج حاصل از کشت ایزوله ها در محیط جامد حاوی الاستین، نشان داد که تنها ۴ ایزوله از ۲۷ ایزوله دارای هاله شفاف در اطراف کلنی بودند، در حالی که در بررسی Mahendra در سال ۱۹۸۴ از ۸ سویه آزمایش شده ۴ سویه ایجاد هاله کرده بود و قطر هاله های ایجاد شده با میانگین ۳۴ میلیمتر کمی کمتر از میانگین هاله های ایجاد شده در این مطالعه (۳۵میلیمتر) بود.

همه ایزوله های بررسی حاضر در محیط مایع دارای فعالیت الاستازی بودند که میانگین آن برای ایزوله های انسانی ۰/۰۵۷±۰/۴۱ و برای ایزوله های حیوانی ۰/۰۸± ۰/۳۵۷ بود، که بیانگر بالا بودن تولید این آنزیم در ایزوله های انسانی نسبت به ایزوله های حیوانی است.

همه محققینی که در این زمینه مطالعه نموده اند گزارش کرده اند که ایزوله های جدا شده از موارد بیماریهای انسانی همگی دارای فعالیت الاستازی بوده است، اما میزان الاستاز تولیدی در ایزوله های مورد آزمایش ما از لحاظ کمی نسبت به گزارشهای آنان پایینتر بود (۴،۶،۱۱). این امر شاید به دلیل تفاوت در شرایط محیطی و اختلاف ایزوله ها باشد. نکته مهم دیگر اینکه قطر هاله ایجاد شده در محیط جامد با مقدار الاستاز تولیدی در محیط مایع مرتبط نبود، که این مسأله در گزارش بعضی از محققین آمده است (۹).

از طرف دیگر با توجه به اینکه معیار الاستاز مثبت و الاستاز منفی را متوسط الاستاز تولیدی توسط این ایزوله های بیماریزا تعریف نموده ایم، بنابراین ۴۸/۱ درصد از ایزوله های ما الاستاز منفی بودند در عین اینکه این ایزوله ها همانند گروه الاستاز مثبت که ۵۱/۹ درصد موارد را شامل می شدند، ایجاد بیماری کرده بودند. لذا اینکه آیا در همه موارد، شدت بیماری با میزان الاستاز مرتبط است؟ احتیاج به مطالعه موارد بیشتر بیماری و پیگیری علایم سیر پیشرفت بیماری در بدن دارد، که در صورت تأیید موارد فوق شاید بتوان گفت میزان الاستاز تولیدی و یا فعالیت آن با مراحل پیشرفت بیماری ارتباط دارد.

قدردانی و تشکر

بدین وسیله از دانشگاه تربیت مدرس به دلیل پشتیبانی مالی و اداری و خانمها هاشمیان و جلیل پور کارشناسان آزمایشگاه قارچ شناسی و آقای افشین محسنی فر از گروه بیوشیمی به جهت همکاریهای آنها تقدیر و تشکر به عمل می آید.

References

1. Hwnn-Chong, K.J. and Bennett, J.E. (1992): Medical Mycology. Philadelphia USA, Lea & Febiger, PP: 201-247.
2. Manuel, R. J. and Kibler, C.C. (1998): The Epidemiology and perevention of invasive Aspergillosis. J .Hosp. Infect., 39, 2: 95-109.
3. Latge, J.P. (1999): *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. Clin. Microb. Rev., 12, 2: 310-350.
4. Iadarola, P., Lungarella, G., Martorana, P. A., Viglio, S., Guglielminetti, M., Korzus, E., Gorrini, M., Cavarra, E., Rossi, A., Travis, J. and Luisetti, M. (1998): Lung Injury and degradation of extracellular matrix components by *Aspergillus fumigatus* serine proteinase. Exp. Lung. Res., 24,3: 233-251.
5. Frosco, M., Chase, T. JR. and Mac Millan, J.D. (1992): Purification and properties of the elastase from Aspergillus fumigatus. Infect. Immun., 60, 3: 728-734.
6. Kolattukudy, P.E., Lee, J.D., Rogers, L., Zimmerman, P., Ceselski, S. Fox, B., Etin, B. and Copelan, E.A. (1993): Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in Aspergillosis. Infect. Immun., 61, 6 : 2357-2368.
7. Rhodes, J.C. and Amlung, T.W. (1991): The elastinolytic proteinase of *Aspergillus flavus* is not glycosylated. J. Med. Vet. Mycol., 29: 407-411.
8. Janda, J.M., Abbott, S.L. and Khashe, S. (1999): Identification and initial characterization of elastase activity associated with vibrio cholerae. Current Microb., 39:73-78.
9. Kothary, M.H., Chase, T.JR. and Mac Millan, J.D. (1984): Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive Aspergillosis in mice. Infect. Immun., 43, 1: 320-325.
10. Denning, D.W., Ward, P.N., Fenelon, L.E. and Benbow, E. W. (1992): Lack of vessel wall elastolysis in human invasive pulmonary Aspergillosis. Infect. Immun., 60, 12: 5153-5156.
11. Rhodes, J.C., Bode, R.B. and MacCuan-Kirsch, C.M. (1988): Elastase production in clinical isolates of Aspergillus. Diagn. Microb. Infect. Dis., 10, 3: 165-170.
12. Rust, L., Messing, C.R. and Iglewski, B.H. (1994): Elastase assay, Methods in Enzymology. 235: 554-563.
13. Zho, W.S., Wojdyla, K. Donlon, K., Thomas, P.A. and Eberle, H.I. (1990): Extra cellulare proteases of *Aspergillus flavus*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 13: 491-497.