شناسایی مورفولوژیک و مولکولی آسپرژیلوس‌های جداشده از بیماران بر اساس تعیین توالی ژن بتا توبولین (β-tubulin)

مهناز خیرخواه[1]، مصطفی چادگانی پور[2]، پروین دهقان[3]، رسول محمدی[*4]

۱- کارشناس ارشد قارچ شناسی پزشکی، گروه انگل و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۲- استاد، گروه انگل و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۳- استادیار، گروه انگل و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۴- استادیار، گروه انگل و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

یافته / دوره نوزدهم / شماره ۱ / بهار ۹۶ / مسلسل ۷۱

چکیده

دریافت مقاله: ۹۵/۱۱/۳ پذیرش مقاله: ۹۶/۱/۱۹

مقدمه: گونه‌های آسپرژیلوس عامل پاتوژن فرصت طلب در افراد دارای ضعف سیستم ایمنی می‌باشند. این قارچ‌ها از جنبه‌های مختلف بیماریزایی و توکسین زایی حائز اهمیت هستند. هدف مطالعه حاضر، ارزیابی ژن بتاتوبولین در تشخیص و تعیین گونه‌های بالینی آسپرژیلوس به روش تعیین توالی، در مقایسه با خصوصیات مورفولوژیک (مانند شکل کونیدی‌ها در آزمایش مستقیم، شکل کلنی در کشت و تست‌های فیزیولوژیک) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۴۶۵ بیمار مراجعه کننده به آزمایشگاه شفای اصفهان، مورد بررسی قرار گرفتند. شناسایی مورفولوژیک و مولکولی نمونه‌های بالینی، به ترتیب با استفاده از کشت بر روی محیط‌های سابورو آگار، مالت اکسترکت آگار و چاپکس آگار، مشاهده میکروسکوپی نمونه‌ها و تقویت ژن بتا توبولین و تعیین توالی ناحیه مذکور انجام گردید. سکانس‌ها از طریق مقایسه با اطلاعات موجود در بانک ژنی آنالیز شدند.

یافته‌ها: از ۴۶۵ مراجعه کننده مشکوک، ۳۹ مورد بیمار (۸٪) شناسایی شد. بیشترین جدایه‌ها مربوط به گونه فلاووس (۵۶٪)، اوریزآ (۲۰٪) و فومیگاتوس (۱۰٪) بودند. ۵۹٪ بیماران زن و ۴۱٪ مرد بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: در مقایسه با تست‌های فنوتیپیک، تعیین توالی ژن بتا توبولین برای شناسایی جدایه‌های بالینی آسپرژیلوس در سطح گونه بسیار با ارزش است. جایگزینی روش‌های مولکولی با روش‌های فنوتیپیک و تشخیص دقیق میکروارگانیسم به‌منظور درمان مؤثر به محققان این عرصه توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوس، بتا توبولین، تعیین توالی.

*آدرس مکاتبه : اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه انگل و قارچ شناسی.
پست الکترونیک: Dr.rasoul_mohammadi@yahoo.com

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-05]

مقدمه

آسپرژیلوزیس بیماری قارچی است که توسط گونه‌های مختلف جنس آسپرژیلوس ایجاد می‌شود. این قارچ‌ها در شاخه آسکومایکوتا رده Eurotiomycetes خانواده تریکوکوماسه‌آ و جنس آسپرژیلوس قرار دارند (۱،۲). جنس آسپرژیلوس متشکل از حدود ۱۸۰ گونه می‌باشد که تاکنون ۳۰ گونه از عفونت‌های قارچی جدا شده‌اند. شایع‌ترین آسپرژیلوس‌هایی که از عفونت‌های قارچی جدا شده‌اند شامل آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس و آسپرژیلوس نیدولانس می‌باشند (۳،۴).

علاوه بر این، گونه‌های آسپرژیلوس در شرایط ویژه مایکوتوکسین‌های مختلف شامل آفلاتوکسین، گلایوتوکسین، اکراتوکسین، پاتولین و سیترینین را تولید می‌کنند (۵،۶). با توجه به اهمیت پزشکی و بیولوژیک آسپرژیلوس‌ها و همچنین الگوهای حساسیت دارویی متفاوت در گونه‌های مختلف، شناسایی دقیق این گونه‌ها می‌تواند در درمان هدفمند آسپرژیلوزیس حائز اهمیت باشد (۷،۸).

شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس با روش‌های رایج و سنتی با توجه به تفاوت‌های بسیار جزئی و ظریف آنها وقت گیر بوده، مستلزم تجربه و مهارت زیادی می‌باشد. ویژگی‌های مورفولوژیک قارچها تحت تأثیر شرایط محیطی نظیر دما و رطوبت ممکن است دستخوش تغییر شوند (۹). در سال‌های اخیر با ورود تکنولوژی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و بررسی تشابه و اختلاف قطعات خاصی از مولکول DNA مثل ITS (۱۰)، Topoisomerease II (۱۱)، Chitin Synthase (۱۲)، Calmodulin Gene (۱۳)، Mitochondrial Cytochrome B (۱۴) و Beta Tubulin Gene (۱۵) و همچنین استفاده از تکنیک‌هایی بر پایه روش‌های مولکولی از جمله RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)، Nested PCR و تعیین توالی ژن‌های اختصاصی، موفقیت‌های چشمگیری در تشخیص و شناسایی دقیق میکروارگانیسم در سطح گونه حاصل شده است (۱۹-۱۶).

استفاده از روش تعیین توالی نوکلئوتیدها در بررسی تنوع درون گونه‌ای و بین گونه‌ای در آسپرژیلوس‌ها متداول است. این تکنیک بهترین روش برای شناسایی ارگانیسم بوده و در بسیاری از مطالعات به‌عنوان استاندارد طلایی تعیین گونه بکار می‌رود (۱۰). مطالعات اولیه نشان می‌دهد که ژن کد کننده‌ی پروتئینی موسوم به بتاتوبولین از پایداری و تنوع کافی برای افتراق گونه‌های مختلف قارچی از جمله آسپرژیلوس‌ها برخوردار است (۲۰). هدف از انجام مطالعه حاضر، شناسایی ایزوله‌های بالینی آسپرژیلوس با روش تعیین توالی ژن بتا توبولین بوده که با این روش می‌توان تا ۹۹٪ گونه‌های پاتوژن آسپرژیلوس را از یکدیگر تشخیص داد.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد مطالعه

این تحقیق یک مطالعهٔ مقطعی از نوع توصیفی بوده و هدف آن تعیین هویت ایزوله‌های آسپرژیلوس در حد گونه با استفاده از مقایسه توالی‌های ژن بتاتوبولین با همان توالی‌ها در نمونه‌های استاندارد می‌باشد.

جداسازی نمونه‌ها

نمونه‌ها در خلال سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۴ از آزمایشگاه شفا (سانتر قارچ شناسی بالینی شهر اصفهان) جمع آوری و بر روی محیط افتراقی چاپک داکس آگار (Czapekdox agar) و مالت اکسترکت آگار (به‌منظور افزایش کونیدی‌زایی قارچ) کشت داده شد. خصوصیات ماکروسکوپی مانند میزان رشد، رنگ سطح و پشت کلنی و توپوگرافی کلنی و خصوصیات میکروسکوپی از جمله اندازه و شکل اندام‌های زایشی مثل کونیدیوفور، وزیکول، فیالاید و کونیدیا مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس تفاوت

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-05]

و یا تشابه در مورفولوژی ماکروسکوپی و میکروسکوپی، کلنی‌ها گروه‌بندی شدند (۲). در مرحله بعد، نمونه‌ها برای تأیید یافته‌های فنوتیپیک، بر اساس تشابه ۱۰۰-۹۹ درصد تعیین توالی‌ها با نمونه‌های استاندارد موجود در پایگاه داده‌ای NCBI شناسایی شدند.

شناسایی مولکولی

استخراج DNA

جهت استخراج DNA از روش گریندر-فنل کلروفرم استفاده شد (۲۱). به‌طور خلاصه پس از خرد کردن قطعات میسلیوم در بافر لیز با آسیاب برقی، مایع رویی به لوله جدید منتقل شده و به میزان هم حجم، فنل کلروفرم افزوده و سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی به لوله جدید منتقل و به میزان دو برابر حجم از ۲-پروپانول و ۳/۱ حجم از استات سدیم به لوله افزوده و در دمای ۲۳- درجه سانتی‌گراد فریزر به مدت بیست دقیقه سرمادهی شد. سپس ده دقیقه رسوب‌گیری در میکروفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰g انجام شد. رسوب تشکیل شده در انتهای لوله قابل مشاهده بود. برای حذف نمک و الکل، یکبار شستشو با اتانول ۷۰ انجام شد و رسوب انتهایی با افزودن ۲۰ میکرولیتر از آب مقطر دو بار تقطیر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

PCR و تقویت ژن بتاتوبولین

جهت تقویت ژن بتاتوبولین در PCR از پرایمرهای یونیورسال جدول ۱ استفاده شد (۲۲).

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده جهت تقویت ژن بتاتوبولین

ژن	پرایمر
Bt2α	5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC 3'
Bt2b	5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3'

برای انجام PCR مقدار ۵ میکرولیتر از DNA ی استخراج شده، ۲۵ پیکومول از هر کدام از پرایمرها، ۴۰۰ میکرومولار مخلوط dNTP، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱/۵ میلی‌مولار کلرور منیزیم، ۲/۵ واحد آنزیم تک پلیمراز و مقدار لازم آب مقطر دیونیزه‌ی استریل تا رسیدن به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر افزوده و در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده شد. برنامه‌ی حرارتی به‌صورت ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل ۷۲ درجه به مدت ۶ دقیقه تنظیم شد.

جهت رؤیت نتیجه‌ی واکنش، ۷ میکرولیتر از محصول PCR با ۳ میکرولیتر از بافر بارگذاری مخلوط و روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و درون تانک حاوی بافر TBE (شامل EDTA، Boric Acid و Tris) الکتروفورز شد. ژل‌ها به دستگاه ترانس لومیناتور منتقل و از باندها عکسبرداری شد.

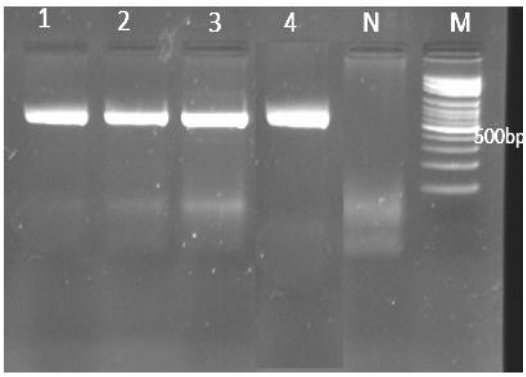
تعیین توالی

بعد از انجام PCR و تکثیر ناحیه‌ی بتاتوبولین، محصول به دست آمده با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR (AccuPrep PCR Purification Kit) به روش ستونی تخلیص و تعیین توالی جدایه‌ها به‌صورت یک طرفه انجام شد. توالی خام نوکلئوتیدی تک تک نمونه‌ها با نرم‌افزار MEGA 4 ویرایش شد و بدین ترتیب تعیین توالی نهایی بتاتوبولین هر جدایه به دست آمد. تعیین توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار BLAST با توالی مشابه در بانک ژن (GenBank) مورد مقایسه و آنالیز قرار گرفتند. شناسایی جدایه‌های مورد نظر با استفاده از تشابه توالی بالای ۱۰۰-۹۹ درصد در پایگاه داده‌های NCBI انجام شد (۱۵).

یافته‌ها

از ۴۶۵ نفر مراجعه کننده به آزمایشگاه، ۳۹ بیمار (۸/۴٪) مبتلا به آسپرژیلوزیس شناسایی شدند. با توجه به روش‌های فنوتیپیک، جدایه‌ها به چند گروه مورفولوژیک تقسیم شده، سپس جدایه‌ها با روش تعیین توالی ناحیه ژنی بتا توبولین، تأیید شدند. در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ناحیه بتا توبولین کلیه نمونه‌ها تقویت و الکتروفورز شدند که یک باند به اندازه تقریبی ۵۷۰-۵۴۰ جفت باز، مشاهده گردید (تصویر ۱).

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-05]

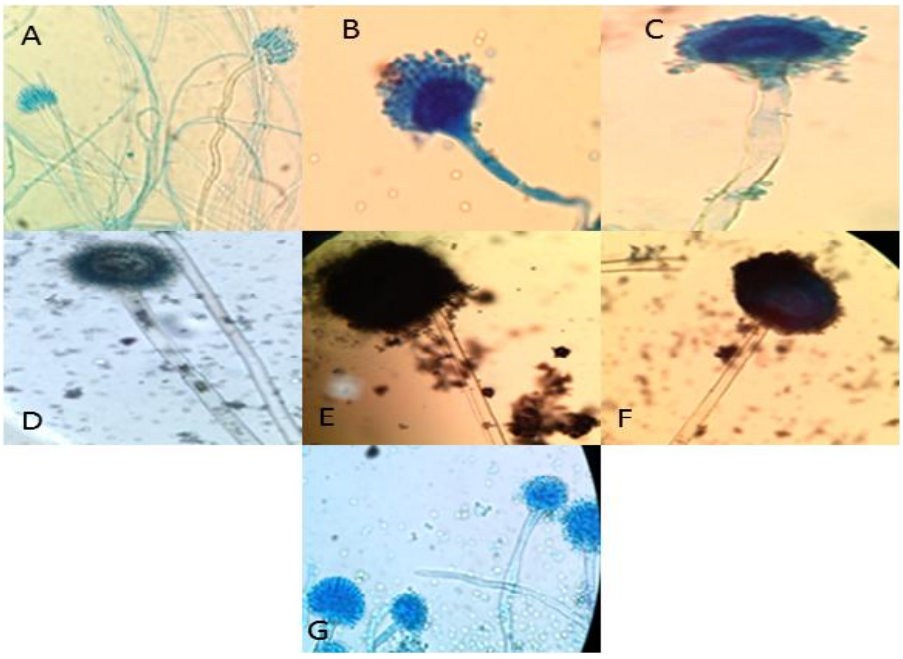


تصویر ۱. الکتروفورز محصول PCR ناحیه بتا توبولین چند نمونه آسپرژیلوس.

ردیف ۱ و ۲: آسپرژیلوس فلاووس، ردیف ۳: آسپرژیلوس اوریزه، ردیف ۴: آسپرژیلوس توبینجنسیس، ردیف N: کنترل منفی، ردیف M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی

ویژگی‌های میکروسکوپی مانند طول و قطر کونیدیوفور، شکل و اندازه وزیکول‌ها، شکل و اندازه فیالیدها، یک ردیفی یا دو ردیفی بودن فیالیدها و شکل و اندازه کونیدی‌ها در تصویر ۲ مشاهده می‌شود.

جدایه A که با روش مورفولوژی و تعیین توالی به‌عنوان آسپرژیلوس ترئوس شناسایی شد، دارای کونیدیوفور ختم شده به یک وزیکول تقریباً کشیده و گرد است که در نیمی از سطح وزیکول یک یا دو ردیف استریگما قرار دارد (تصویر ۲-A). جدایه B (آسپرژیلوس فلاووس) دارای کونیدیوفور بلند با دیواره ضخیم و خاردار، وزیکول کروی، فیالیدهای یک یا دو ردیفه بود (تصویر ۲-B). آسپرژیلوس فومیگاتوس دارای وزیکول کشیده و بطری شکل (تصویر ۲-C)، آسپرژیلوس نایجر با وزیکول کروی، فیالید دو ردیفه و کونیدی کروی سیاه رنگ (تصویر ۲-D)، آسپرژیلوس توبینجنسیس دارای وزیکول کروی، فیالید دو ردیفه و کونیدی کروی سیاه رنگ (تصویر ۲-E)، آسپرژیلوس آواموری با کونیدی‌های اشعه‌وار و ستونی بر روی فیالید (تصویر ۲-F) و آسپرژیلوس اوریزا با وزیکول گرد، گلابی شکل که فیلاید سطح کل وزیکول را می‌پوشاند، شناسایی شدند (تصویر ۲-G).



تصویر ۲. منظره میکروسکوپی تعدادی از جدایه‌های آسپرژیلوس که توسط تعیین توالی ژن بتا توبولین و روش مورفولوژی شناسایی گردید.

A: آسپرژیلوس ترئوس، B: آسپرژیلوس فلاووس، C: آسپرژیلوس فومیگاتوس، D: آسپرژیلوس نایجر، E: آسپرژیلوس توبینجنسیس، F: آسپرژیلوس آواموری، G: آسپرژیلوس اوریزا

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-05]

در مطالعه حاضر شناسایی گونه‌ها به روش مورفولوژی منجر به تشخیص ۴ گونه آسپرژیلوس فلاووس (۷۷٪)، آسپرژیلوس فومیگاتوس (۱۰٪)، آسپرژیلوس نایجر (۱۰٪)، آسپرژیلوس ترئوس (۲٪) گردید. میانگین سنی بیماران، ۲۱ تا ۷۳ سال بود (جدول ۲). بیست و سه نمونه بالینی مربوط به ناخن دست و پا (۵۹٪)، ۵ نمونه خلط (۱۳٪)، ۵ نمونه ریه (۱۳٪)، ۳ نمونه جلد (۸٪)،۲ نمونه گوش (۵٪) و ۱ نمونه پارانازال (۲٪) بودند. تقویت ناحیه ژن بتا توبولین و تعیین توالی این ناحیه منجر به شناسایی ۷ گونه از آسپرژیلوس گردید که به ترتیب شامل ۲۲ جدایه به‌عنوان آسپرژیلوس فلاووس (۵۶٪)، ۸ جدایه آسپرژیلوس اوریزآ (۲۰٪)، ۴ جدایه به‌عنوان آسپرژیلوس فومیگاتوس (۱۰٪)، ۲ جدایه آسپرژیلوس توبینجنسیس (۵٪)، ۱ جدایه آسپرژیلوس نایجر (۲٪)، ۱ جدایه آسپرژیلوس ترئوس (۲٪) و ۱ جدایه آسپرژیلوس آواموری (۲٪) شناسایی شدند. ۵۹٪ بیماران زن و ۴۱٪ مرد بودند (جدول ۲).

جدول ۲. مشخصات بیماران و تشخیص آسپرژیلوس های جدا شده با دو روش مورفولوژیک و مولکولی

نمونه	محل ضایعه	سن	جنس	تشخیص گونه با روش مولکولی	تشخیص گونه با روش مورفولوژی
۱	ناخن دست	۲۱	زن	آسپرژیلوس ترئوس	آسپرژیلوس ترئوس
۲	برنش	۷۲	زن	آسپرژیلوس فومیگاتوس	آسپرژیلوس فومیگاتوس
۳	ناخن پا	۳۲	مرد	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۴	پارانازال	۵۳	مرد	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۵	ناخن پا	۵۵	زن	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۶	ناخن پا	۵۱	زن	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۷	ریه	۶۷	مرد	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۸	ناخن پا	۵۹	مرد	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۹	پوست	۵۴	زن	آسپرژیلوس آواموری	آسپرژیلوس نایجر
۱۰	خلط	۴۲	مرد	آسپرژیلوس اوریزا	آسپرژیلوس فلاووس
۱۱	ناخن پا	۳۱	زن	آسپرژیلوس فومیگاتوس	آسپرژیلوس فومیگاتوس
۱۲	ناخن پا	۴۹	زن	آسپرژیلوس اوریزا	آسپرژیلوس فلاووس
۱۳	ناخن پا	۳۰	زن	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۱۴	ناخن پا	۴۸	زن	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۱۵	ناخن پا	۶۳	زن	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۱۶	خلط	۵۰	مرد	آسپرژیلوس اوریزا	آسپرژیلوس فلاووس
۱۷	خلط	۷۱	مرد	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۱۸	BAL	۶۶	زن	آسپرژیلوس فومیگاتوس	آسپرژیلوس فومیگاتوس
۱۹	ناخن پا	۷۱	مرد	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۲۰	ناخن پا	۷۳	زن	آسپرژیلوس اوریزا	آسپرژیلوس فلاووس
۲۱	ناخن دست	۳۷	زن	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۲۲	ریه	۷۰	مرد	آسپرژیلوس توبینجنسیس	آسپرژیلوس نایجر
۲۳	پوست	۷۰	مرد	آسپرژیلوس نایجر	آسپرژیلوس نایجر
۲۴	ناخن پا	۳۲	زن	آسپرژیلوس اوریزا	آسپرژیلوس فلاووس
۲۵	گوش	۴۳	مرد	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۲۶	گوش	۵۲	زن	آسپرژیلوس توبینجنسیس	آسپرژیلوس نایجر
۲۷	ناخن پا	۴۱	زن	آسپرژیلوس اوریزا	آسپرژیلوس فلاووس
۲۸	ناخن پا	۲۹	مرد	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۲۹	ناخن	۲۶	زن	آسپرژیلوس اوریزا	آسپرژیلوس فلاووس
۳۰	پوست	۳۱	زن	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۳۱	ریه	۶۲	مرد	آسپرژیلوس فومیگاتوس	آسپرژیلوس فومیگاتوس
۳۲	ناخن	۴۴	مرد	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۳۳	ناخن پا	۴۷	زن	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۳۴	ناخن پا	۳۲	زن	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۳۵	خلط	۲۲	مرد	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۳۶	خلط	۳۸	زن	آسپرژیلوس اوریزا	آسپرژیلوس فلاووس
۳۷	ناخن پا	۵۷	زن	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۳۸	ناخن دست	۲۹	مرد	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس
۳۹	ناخن پا	۶۳	زن	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس فلاووس

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-05]

بحث و نتیجه گیری

جنس آسپرژیلوس دارای گونه‌های متعددی می‌باشد که در افراد با ضعف سیستم ایمنی ایجاد بیماری می‌کنند. گونه‌های آسپرژیلوس عامل بیماری‌های برونکو پولمونری آلرژیک، کراتیت قارچی، عفونت قارچی گوش، سینوزیت‌های نازال و همچنین عفونت‌های مهاجم ریوی هستند. بیماری مهاجم قارچی بیشتر در افراد دارای نقص ایمنی یا کسانی که تحت تأثیر داروهای ایمنوساپرسیو هستند دیده می‌شود. بسیاری از گونه‌های آسپرژیلوس آلرژن می‌باشند، بنابراین از مهم‌ترین عوامل بیماری آسم با منشاء خارجی محسوب می‌شوند که با علائمی مانند ادم و اسپاسم برونش همراه می‌باشد (۱۸،۲۳). بر اساس تقسیم بندی جدید، جنس آسپرژیلوس به گروه‌های مختلف تقسیم شده است که هر بخش خود حاوی گونه‌ها و واریته‌های مختلفی مانند فلاوی، فومیگاتی، نیگری و غیره می‌باشند (۲۶-۲۴). روش‌های مورفولوژیک برای تعیین گونه‌های آسپرژیلوس کافی و معتبر نمی‌باشد بنابراین بکارگیری یک روش دقیق برای افتراق گونه‌های آسپرژیلوس ضروری به نظر می‌رسد. در سال‌های اخیر با ورود تکنولوژی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و بررسی تشابه و اختلاف قطعات خاصی از مولکول DNA، پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه تشخیص گونه حاصل شده است. مرور مقالات نشان می‌دهد که تقریباً تمامی روش‌های بکار رفته DNA-based که برای شناسایی آسپرژیلوس‌ها به کار رفته است (به‌استثنای تعیین توالی) تعداد معدودی از آسپرژیلوس‌ها را شناسایی کرده‌اند. بیشترین نمونه‌ها مربوط به ناخن دست و پا (۵۶/۴٪) بود که این موضوع با مطالعه شکوهی و همکاران تطابق داشت (۲۷). در مقایسه با روش مولکولی، از ۳۹ جدایه که به روش مورفولوژی شناسایی گردید، هویت ۱۱ گونه به‌صورت نادرست شناسایی شدند. جدایه‌هایی که اغلب بر اساس ریخت شناسی کلنی و میکروسکوپی، به‌عنوان آسپرژیلوس نایجر شناخته شده بودند در واقع متعلق به ۳ گونه مجزا و غیرقابل افتراق از لحاظ مورفولوژی به نام آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس توبینجنسیس و آسپرژیلوس آواموری بودند که هر سه متعلق به گونه نیگری از جنس آسپرژیلوس می‌باشد و این فقط با روش مولکولی قابل تمایز است. گونه دیگری که در این مطالعه جدا شد آسپرژیلوس اوریزا بود که دارای شباهت بسیار زیادی به آسپرژیلوس فلاووس می‌باشد. در این مطالعه درصد فراوانی آسپرژیلوس‌ها به ترتیب شامل آسپرژیلوس فلاووس (۵۶/۴٪)، آسپرژیلوس اوریزا (۲۰/۵٪)، آسپرژیلوس فومیگاتوس (۱۰/۲٪)، آسپرژیلوس ترئوس (۲/۵٪) و آسپرژیلوس آواموری (۲/۵٪) بود که مشابه با مطالعه میرهندی و همکاران، آسپرژیلوس فلاووس شایع‌ترین جدایه مورد شناسایی بود (۹). در مطالعه‌ای که نوری‌پور و همکاران بر روی نمونه‌های اونیکومایکوز انجام دادند، بیشترین فراوانی ساپروفیت‌ها مربوط به جنس آسپرژیلوس و گونه فلاووس بود که با مطالعه حاضر تطابق داشت (۲۸). در مطالعه اوهار و همکاران، سن متوسط بیماران ۷۱ سال بود و زن‌ها با شیوع ۵۸٪ بیشترین گروه درگیر بودند. گونه‌های فومیگاتوس (۴۸٪) و نیجر (۲۹٪) بیشترین جدایه‌ها در مبتلایان به کرونیک پلومونری آسپرژیلوس (CPA) بودند و بر خلاف مطالعه حاضر، عفونت در مردان بیش از زنان بود (۲۹). در مطالعه‌ای که توسط ویجه‌سوریا و همکاران بر روی افراد دیابتیک انجام شد، در تطابق با مطالعه حاضر، جمعیت غالب بیماران، با شیوع ۶۹٪ زنان بودند (۳۰). ازآنجاکه گونه‌های مختلف آسپرژیلوس در مقابل آنتی فانگال‌ها مقاومت‌های متفاوتی نشان می‌دهند، تعیین گونه به روش دقیق می‌تواند پزشک را در جهت درمان هدفمند هدایت کند. یافته‌های این مطالعه نشان داد که روش تعیین توالی ناحیه بتا توبولین در مقایسه با روش‌های مورفولوژی، از دقت بسیار بالاتر و

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-05]

زمان کوتاه‌تر برای تمایز گونه‌های آسپرژیلوس برخوردار می‌باشد.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر حاصل از طرح تحقیقاتی به شماره ۳۹۴۷۹۴ مصوب در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. از کلیه پرسنل محترم گروه انگل و قارچ شناسی که صمیمانه و با صبر و حوصله ما را یاری رساندند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-05]

References

1. Boekhout T, Gueidan C, deHoog S, Samson R,Varga J, Walther G. Fungal taxonomy: new developments in medically important fungi. Curr Fungal Infect Rep. 2009; 3: 170-178.
2. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus. Stud Mycol. 2014; 78: 141-173.
3. Khongkhunthian P, Reichart PA. Aspergillosis of the maxillary sinus as a complication of overfilling root canal material into the sinus: report of two cases. J Endod. 2001; 27: 476-478.
4. Hinrikson HP, Hurst SF, Lott TJ, Warnock DW, Mqrrison CJ. Assessment of ribosomal large-subunitD1-D2, internal transcribed spacer 1 and internal Transcribed Spacer 2 Regions as Targets for Molecular Identification of Medically Important Aspergillus Species. J Clin Microbiol. 2005; 43: 2092-3003.
5. Kamei K, Watanabe A. Aspergillus mycotoxins and their effect on the host. Med Mycol. 2005; 43: 95-99.
6. Nielsen KF, Mogensen JM, Johansen M, Larsen TO, Frisvad JC. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the Aspergillus niger group. Anal Bioanal Chem. 2009; 395: 1225-1242.
7. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. Clin Infect Dis. 2008; 46: 120-128.
8. Moore C, Sayers N, Mosquera J, Slaven J, Denning D. Antifungal Drug Resistance in Aspergillus. J Infect. 2000; 41: 203-220.
9. Mirhendi H, Diba K, Kordbacheh P, Jalalizand N, Makimura K. Identification of pathogenic Aspergillus species by a PCR-restriction enzyme method. J Med Microbiol. 2007; 56: 1568-1570.
10. Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of Aspergillus species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. J Clin Microbiol. 2000; 38: 1510-1515.
11. Kanbe T, Yamaki K, Kikuchi A. Identification of the pathogenic Aspergillus species by nested PCR using a mixture of specific primers to DNA topoisomerase II gene. Microbiol Immunol. 2002; 46: 841-848.
12. Mellado E, Aufauvre-Brown A, Specht CA, Robbins PW, Holden DW. A multigene family related to chitin synthase genes of yeast in the opportunistic pathogen Aspergillus fumigatus. Mol Gen Genet. 1995; 246: 353-359.
13. Susca A, Stea G, Mulè G, Perrone G. Polymerase chain reaction (PCR) identification of Aspergillus niger and Aspergillus tubingensis based on the calmodulin gene. Food additiv Contamin. 2007; 24: 1154-1160.
14. Kaniak-Golik A, Skoneczna A. Mitochondria- nucleus network for genome stability. Free Radic Biol Med. 2015; 82: 73-104.
15. Shokohi G, Mirhendi H, Kordbacheh P, Nikaeen M, Rezaie MA, Abastabar M. Morphological and genotypic identification

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-05]

of some environmental isolates of aspergillus in Iran based on beta-tubulin gene sequencing. J Isfahan Med Sch. 2012; 29: 1-5. (In Persian)
16. Reinwald M, Spiess B, Heinz W, Heussel C, Bertz H, Cornely O, et al. Aspergillus PCR-based investigation of fresh tissue and effusion samples in patients with suspected invasive aspergillosis enhances diagnostic capabilities. J Clin Microbiol. 2013; 51: 4178-4185.
17. García ME, Blanco JL, Kurup VP. Identification of Aspergillus fumigatus by PCR. Revista Iberoamericana de Micología. 1998; 15: 25-27.
18. Diba K, Mirhendi H, Kordbacheh P. Development of RFLP-PCR method for the identification of medically important Aspergillus species using single restriction enzyme MwoI. Braz J Microbiol. 2014; 45: 503-507.
19. Zhao J, Kong F, Li R, Wang X, Wan Z, Wang D. Identification of Aspergillus fumigatus and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. J Clin Microbiol. 2001; 39: 2261-2266.
20. Geiser D, Klich M, Frisvad JC, Peterson S, Varga J, Samson RA. The current status of species recognition and identification in Aspergillus. Stud Mycol. 2007; 59: 1-10.
21. Kochl S, Niederstatter H, Parson W. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. Forensic DNA Typing Protocols: Methods Mol Biol. 2005; 297: 13-30.
22. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl Environ Microbiol. 1995; 61: 1323-1330.
23. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of aspergillosis. Clin Infect Dis. 2016; 63: 433-442.
24. Priyanka S, Uppalapati S, Kingston J, Murali H, Batra H. Development of ISSR-derived SCAR marker-targeted PCR for identification of Aspergillus section Flavi members. Lett Appl Microbiol. 2014; 58: 414-422.
25. Frisvad JC, Larsen TO. Extrolites of Aspergillus fumigatus and other Pathogenic Species in Aspergillus Section Fumigati. Front Microbiol. 2015; 6: 1485.
26. Palumbo J, O'Keeffe T. Detection and discrimination of four Aspergillus section Nigri species by PCR. Lett Appl Microbiol. 2015; 60: 188-195.
27. Shokohi T, Heidari Z, Haqhani I, Khalilian A, Aghili R, Miahi S. Study 101 Case onychomycosis in patients refers to Boo ali sina hospital and toba clinic in Sari. J Mazandaran Univ Med Sci. 2009; 19: 33-43. (In Persian)
28. Nouripour-Sisakht S, Mirhendi H, Shidfar MR, Ahmadi B, Rezaei-Matehkolaei A, Geramishoar M, et al. Aspergillus species as emerging causative agents of onychomycosis. J Mycol Med. 2015; 55: 101-107.

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-05]

29. Ohare S, Tazawa Y, Tanai C, Tanaka Y, Noda H, Horiuchi H, et al. Clinical characteristics of patients with Aspergillus species isolation from respiratory samples: Comparison of chronic pulmonary aspergillosis and colonization. Resp Invest. 2016; 54: 92-97.

30. Wijesuriya TM, Kottahachchi J, Gunasekara TDPC, Bulugahapitiya U, Ranasinghe KNP, Neluka-Fernando SS, et al. Aspergillus species: An emerging pathogen in onychomycosis among diabetics. Indian J Endocrine Metabol. 2015; 19: 811-816.

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-05]

Identification of morphological and molecular Aspergillus species isolated from patients based on beta-tubulin gene sequencing

Kheirkhah M[1], Chadeganipour M[2], Dehghan P[3], Mohammadi R[*4]

1. MSc of Medical Mycology, Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
2. Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, Dr.rasoul_mohammadi@yahoo.com

Received: *22 Jan 2017* **Accepted:** *8 April 2017*

Abstract

Background: *Aspergillus* species are opportunistic pathogens among immunocompromised patients. In terms of pathogenesis and mycotoxin production, they are in great value. The aim of the this study was to evaluate of beta-tubulin gene for identification of clinical *Aspergillus* species by PCR-sequencing method compared to morphological features of clinical isolates (such as conidial shape in direct microscopic examination, colony shape in culture, and physiological tests).

Materials and Methods: In this study, 465 patients referred to the Shefa laboratory of Isfahan were evaluated. Morphological and molecular identification of clinical samples were performed using culture on sabouraud agar, malt extract agar, czapekdox agar, direct microscopy, and PCR-sequencing of beta tubulin gene, respectively. Sequences were analyzed in comparison with gene bank data.

Results: Thirty nine out of 465 suspected cases (8.4%) had aspergillosis. The most prevalent species were *Aspergillus flavus* (56.4%), *A. oryzae* (20.5%), and *A. fumigatus* (10.2%), respectively. Fifty nine percent of patients were females and 49% were males.

Conclusion: In comparison with phenotypic tests, sequencing of beta-tubulin gene for identification of *Aspergillus* species is at great value. Replacement of molecular techniques with conventional tests is recommended for precise identification of microorganism for better management of infection.

Keywords: *Aspergillus*, Beta tubulin, Sequencing

***Citation**: Kheirkhah M, Chadeganipour M, Dehghan P, Mohammadi R. Identification of morphological and molecular Aspergillus species isolated from patients based on beta-tubulin gene sequencing. Yafteh. 2017;19(1): 87-97.

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-05]