مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۷، دی ۱۳۹۷، ۹۳۶-۹۲۵

بررسی ژن‌های بیماری‌زا سوبتیلیزین (۷-۱) درگونه ترایکوفایتون روبروم جدا شده از نمونه‌های بالینی پوست و ناخن در سال ۱۳۹۶: یک مطالعه توصیفی

آزاده کرمی رباطی[۱]، محمد خلیلی[۲]، سید جمال هاشمی هزاوه[۳]، منصور بیات[۴]

دریافت مقاله: ۹۷/۳/۱ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۷/۷/۹ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۷/۷/۲۱ پذیرش مقاله: ۹۷/۷/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: خانواده ژنومی سوبتیلیزین (Subtilisins; SUBs) ترایکوفایتون روبروم، نقش مهمی در تخریب بافت کراتین در جهت تولید یک منبع مغذی و حدت‌زایی، ایفاء می کند. این مطالعه با هدف تعیین ژن‌های سوبتیلیزین (۷-۱) در گونه ترایکوفایتون روبروم جدا شده از بیماران مبتلا به درماتوفیتوزیس ساکن شهر تهران در سال ۱۳۹۶ انجام شده است.

مواد و روش‌ها: مطالعه توصیفی حاضر، بر روی ۳۲ بیمار مبتلا به عفونت قارچی مراجعه کننده به دانشگاه علوم پزشکی تهران از تیر ماه تا شهریور ماه سال۱۳۹۶ انجام گرفت. بر اساس مشاهدات میکروسکوپی و ماکروسکوپی، گونه ترایکوفایتون روبروم جداسازی و شناسایی شد. DNA درماتوفیت استخراج و سپس ژن‌های SUB1، SUB2، SUB3، SUB4، SUB5، SUB6 و SUB7 با روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با پرایمرهای اختصاصی تکثیر گردیدند. درصد فراوانی نسبی هر یک از هفت توالی ژنومی نیز محاسبه گردید.

یافته‌ها: ۷ گونه ترایکوفایتون روبروم از نمونه بالینی پوست (۵ مورد) و ناخن (۲ مورد) جداسازی شدند. خانواده سوبتیلیزین (SUB1-7) با فراوانی ۵۷ درصد گزارش شد. در حالی‌که ژن SUB5 (۱۰۰ درصد) در تمام ایزوله‌ها مشاهده شد، ژن SUB6 با کم‌ترین فراوانی (۴ از ۷ مورد) و حضور هفت ژن سوبتیلیزین در گونه های جدا شده از بافت ناخن، گزارش شد.

نتیجه‌گیری: حضور و عدم حضور ژن‌های سوبتیلیزین در DNA ایزوله‌های ترایکوفایتون روبروم، احتمالاً حاکی از اهمیت هر یک از ژن‌ها در مراحل مختلف عفونت (اتصال، تهاجم و التهاب) درماتوفیت و نوع بافت ناخن و پوست می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ژن‌های سوبتیلیزین، درماتوفیتوزیس، ترایکوفایتون روبروم، پوست، ناخن، تهران

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم وتحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران
۳- (نویسنده مسئول) استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
تلفن: ۸۸۹۵۱۵۸۳(۰۲۱)، دورنگار: ۸۸۹۵۱۵۸۳(۰۲۱)، پست الکترونیکی: sj.hashemi33@yahoo.com
۴- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم وتحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مقدمه

ترایکوفایتون روبروم عامل اصلی درماتوفیتوزیس انسانی، عفونت‌های مزمن و عود کننده قارچی در جهان است [۱]. مکانیسم اتصال و تهاجم درماتوفیت‌ها عمدتاً با ترشح اندوپروتئازها و اگزوپروتئازها آغاز می‌شود [۲]. گونه ترایکوفایتون روبروم در طی روند عفونت با ترشح اندوپروتئازهایی مانند سوبتیلیزین‌ها و متالوپروتئازها، قادر به حلال سازی کراتین و پروتئین‌های فیبری موجود در ساختار پوست، مو و ناخن می‌شود [۴-۳]. در مطالعات مختلف مجموعه‌ای از پروتئازها که توسط ژن‌های سوبتیلیزین (Subtilisins; SUBs) ترایکوفایتون روبروم کدگذاری شده‌اند، با استفاده از روش پروتئولیز و طیف سنجی جرم شناسایی شدند [۶-۵].

مطالعه‌ای در خصوص حضور دو خانواده، متالوپروتئازها و سوبتلیزین‌ها با استفاده از روش PCR با کمک آغازگرهای اختصاصی در پرتغال انجام گرفت که حاکی از حضور این دو خانواده ژنومی در جنس ترایکوفایتون و عدم حضور برخی از توالی ژنومی در برخی از ایزوله‌های بالینی و هم‌چنین در جنس‌های میکروسپوروم و اپیدرموفایتون بود [۷]. مطالعه بر روی فعالیت آنزیمی و خصوصیات مولکولی پروتئین سوبتیلیزین در گونه میکروسپوروم ژیپسئوم و ترایکوفایتون وانبروزگمئی در ایران، جهت مطالعات پاتوژنیک و سایر اهداف کاربردی انجام گرفته است [۸]. مطالعات مختلف نشان دادند که ترشحات پروتئینازها (مانند خانواده SUB و Trichophyton rubrum 4 antigen; Tri r4) نه تنها می‌توانند پروتئین‌هایی مانند کراتین، الاستین و کلاژن برای تأمین مواد مغذی قارچ‌ها تجزیه کنند، بلکه می‌توانند مکانیسم-های دفاعی میزبان را کنترل و حساسیت نوع تأخیری را ایجاد کند [۹]. مطالعه برروی آلرژن Tri r2 (SUB6) آن را به عنوان یک مارکر جهت تشخیص کچلی ناخن با روش آنالیز پروتئین‌ها (پروتئومیکس) تولید شده توسط ترایکوفایتون روبروم برروی نمونه بالینی ناخن، معرفی کرد [۱۰].

سوبتیلیزین‌ها عمدتاً به خانواده سرین پروتئازهای خارج سلولی تعلق دارند [۱۱]. سرین پروتئاز ترشح شده توسط قارچ‌های بیماری‌زا متعلق به زیر خانواده سوبتیلیزین (S8A) است. جرم مولکولی این آنزیم‌ها ۲۸ الی ۳۰ کیلو دالتون و در محیط خنثی و برخی در محیط قلیایی با pH حدود ۸ تا ۹ فعالیت دارند، به همین دلیل آن‌ها پروتئازها قلیایی (Alkaline Proteases; Alp) نامیده می‌شوند [۱۲].

یک خانواده ژنومی هفت عضوی منحصر به فرد، سوبتیلیزین‌ها را در گونه ترایکوفایتون روبروم کدگذاری می‌کنند که به اختصار ژن‌ها را با SUB و پروتئین‌ها را با Sub نشان می‌دهند. SUB1، SUB2 و SUB3-7 به ترتیب دارای دو، چهار و سه اینترون هستند. در میان Subs ترایکوفایتون روبروم، تطابق بین توالی اسیدهای آمینه از ۲۹/۴٪ (بین Sub2 و Sub6) تا ۶۷/۴٪ (بین Sub3 و Sub4) وجود دارد [۱۳]. با توجه به این که حضور ژن‌های حدت‌زای سوبتیلیزین در درماتوفیت‌ها خطر ابتلاء به

درماتوفیتوزیس را افزایش می‌دهند [۳]، لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی نسبی هر یک از ژن‌های سوبتیلیزین در گونه تریکوفایتون روبروم جدا شده از بیماران مبتلا به کچلی بدن و ناخن انجام گردید.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر یک مطالعه توصیفی- مقطعی است که بر روی ۳۲ بیمار مبتلا به عفونت قارچی مراجعه کننده به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران از تیرماه تا شهریور ماه سال ۱۳۹۶ انجام گرفت. جمعیت مورد مطالعه شامل تمام گروه‌های سنی زن و مرد با مشاغل مختلف بودند. بعد از مشاهدات بالینی، ضایعات مشکوک به درماتوفیتوزیس وارد مطالعه گردیدند. در تمام مراحل ملاحظات اخلاقی رعایت گردید و ضمناً این مطالعه دارای کد اخلاقی از دانشگاه علوم پزشکی تهران (IR.TUMS.SPH.Rec1395.1339) می باشد.

محل ضایعه با استفاده از گاز آغشته به الکل ۷۰ درصد تمیز شد، سپس با اسکالپل استریل از کناره‌های تازه و فعال ضایعه، پوسته‌ها تراشیده و روی لام تمیزی جمع آوری شدند. در ضایعات مشکوک ناخن، بعد از تمیز کردن ناخن با الکل ۷۰ درصد، ابتدا قسمت انتهایی ناخن با استفاده از ناخن گیر استریل چیده و دور ریخته شد، پس از آن با استفاده از تیغه اسکالپل حد فاصل ناحیه مبتلا و سالم ناخن تراشیده شد و تراش اول دور ریخته شد [۱۴].

تراشه‌های پوست را با ۲۰KOH درصد و تراشه‌های ناخن را با KOH 10%+DMSO شفاف شدند که مشاهده هایف و آرتروکونیدی به عنوان موارد مستقیم مثبت در نظر گرفته شدند. جهت شناسایی گونه ترایکوفایتون روبروم از محیط انتخابی و افتراقی درماتوفیت‌ها از جمله محیط مایکوزیل آگار (مرک، آلمان) و محیط سابرودکستروزآگار با کلرآمفنیکل و سیکلوهگزامید (SCC) (Conda اسپانیا)، به صورت نقطه‌ای کشت داده شد.

کلنی‌های ترایکوفایتون روبروم رشد یافته با سطحی کرکی سفید و پیگمان پشتی آن قرمز و سیاه رنگ که در داخل محیط کشت انتشار یافته و تمام آگار موجود در پتری‌دیش را رنگی می کند. از پلیت‌های دارای ویژگی‌های فوق، کشت بر روی لام تهیه شد و طی بررسی‌های میکروسکوپی، مشاهده ماکروکونیدی، میکروکونیدی و هایف‌های سپتوم‌دار به شناسایی گونه درماتوفیت منجر شد.

برای تهیه محیط کشت مغذی، جهت کمک به تشخیص قطعی و سریع‌تر عامل قارچی، از دانه برنج عصاره‌گیری و برای جامد کردن آن میزان ۲ درصد آگار استفاده شد و سپس به محیط سابورودکستروز آگار اضافه شد. در محیط تهیه شده از عصاره برنج رشد سریع و واضح‌تر درماتوفیت نسبت به سابورودکستروز آگار معمولی مشاهده شد، اندازه کلنی‌ها نیز در آن‌ها بزرگ‌تر و رنگدانه قرمز پس از حدود ۶ روز از ایزوله‌ها ظاهر گشت. سپس جهت مشاهده عناصر قارچی (ماکروکونیدی و میکروکونیدی) اسمیر بر روی لام تهیه و با رنگ Lactophenol Cotton Blue به روش تیزمان رنگ آمیزی شد [۱۵].

به منظور تهیه توده کافی از میسلیوم‌ها جهت استخراج DNA درماتوفیت، مقداری از کلنی‌های مورد نظر به ۵

پلیت حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط سابورودکستروز مایع (مرک، آلمان)، انتقال داده شد. زمانی که توده میسلیومی به طور یکنواخت و قبل از تشکیل میسلیوم‌های هوایی در سطح پلیت‌ها قرار گیرند، جمع‌آوری و بر روی یک گاز استریل انتقال داده شد. سپس با PBS 1X شستشو و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا مراحل استخراج DNA بر روی آن‌ها انجام شود [۱۶].

حدود ۳-۱ گرم از توده میسلیوم در یک هاون چینی به همراه نیتروژن مایع به خوبی پودر شد و مقدار ۰/۱گرم از آن به لوله اپندرف ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و مراحل استخراج با توجه به پروتکل کیت استخراج DNA قارچ‌های رشته‌ای شرکت Denazist Asia، مشهد، انجام گردید.

بعد از پایان مراحل تخلیص، OD 260/ 280 نمونه‌ها خوانده شد تا غلظت DNA ژنومی به‌دست آید و سپس به کمک روش ژل الکتروفورز (Padideh nojen PNP-1000d pars، ساخت ایران) (ژل ۱ درصد) کیفیت DNA تخلیص شده نیز ارزیابی گردید [۱۷].

آغازگرها (پرایمرها) الیگونوکلئوتید مورد استفاده در مطالعه حاضر در جدول ۱ آورده شده است [۷]. پرایمرها بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن‌های SUB1-7 ترایکوفایتون روبروم از شرکت ژن فن‌آوران خریداری شد. تمام تکثیر PCR در یک دستگاه ترمال سایکلر (Applied Biosysems، ساخت آمریکا) انجام گردید.

برنامه اجرا شده برای PCR عبارت بود از مرحله اول ۹۴ درجه سانتی‌گراد با زمان ۵ دقیقه، یک چرخه واسرشت سازی اولیه، مرحله دوم ۹۴ درجه سانتی‌گراد با زمان ۳۰ ثانیه، مرحله سوم با توجه به نوع پرایمر دمای اتصال پرایمرها ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد، محاسبه شد. مرحله چهارم با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و زمان یک دقیقه و پانزده ثانیه که جمعاً ۳۵ چرخه برای تکثیر DNA و کل این فرآیند بیش‌تر از دو ساعت طول کشید [۷]. برای تفکیک قطعات DNA و آگاهی از محصول PCR و نیز قابل مشاهده نمودن آن‌ها، هر کدام از محصولات PCR روی ژل آگارز به مدت یک ساعت با ولتاژ ۹۰، الکتروفورز (PNP-1000d Padideh nojen pars، ساخت ایران) گردید.

جهت تشخیص قطعه DNA مشاهده شده هر یک از ژن‌های سوبتلیزین بر حسب واحد (جفت باز) از DNA Ladder استفاده شد و سپس با قطعه توالی ژن‌ها (Sequence ID) بر حسب واحد که در پایگاه داده GenBank در دسترس است، مقایسه شد. در این مطالعه، درصد فراوانی نسبی هر یک از ژن‌های سوبتیلیزین و توزیع فراوانی آن‌ها در بین ایزوله‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و با آزمون مجذور chi-square آنالیز گردید.

جدول ۱- آغازگرها الیگونوکلئوتید ژن‌های *SUB1-7* [۷]

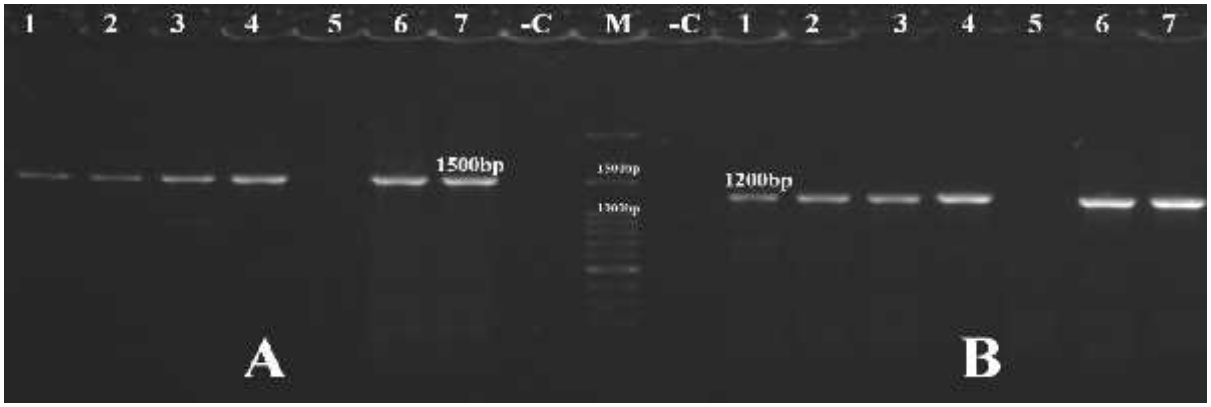
ترایکوفایتون روبروم			
ژن		آغازگرها (5´---> 3´)	Sequence ID
SUB1	For	ATCCTGTCTATGCCTCATG	**AY343499.1**
	Rev	AATCGAAGTCGAAGTTATC	
SUB2	For	ATATCTCGTCACACTGAAGG	**AY343500.1**
	Rev	CCTGGATGCCATTGTACAC	
SUB3	For	TTATCTCCGTCTTCCTAGC	**AY343501.1**
	Rev	AGCAACGCTAACACCCTG	
SUB4	For	AAGACTCAGGGCCACAAG	**AY344481.1**
	Rev	TTCCGATCATGTAGGCAC	
SUB5	For	GAAGTTGTGCCCAATGGC	**AY344482.1**
	Rev	CTCCAGGCCTAGCAGAAAG	
SUB6	For	CGATTCAGAACTGATTATGATG	**AF420485.1**
	Rev	GAGGTTTGGAGGCAGGTTC	
SUB7	For	CTTGCCTAGACACTTCAATG	**AF407184.1**
	Rev	ATGAGGTAGGCACCGAGAC	

SUB=Subtilisin gene

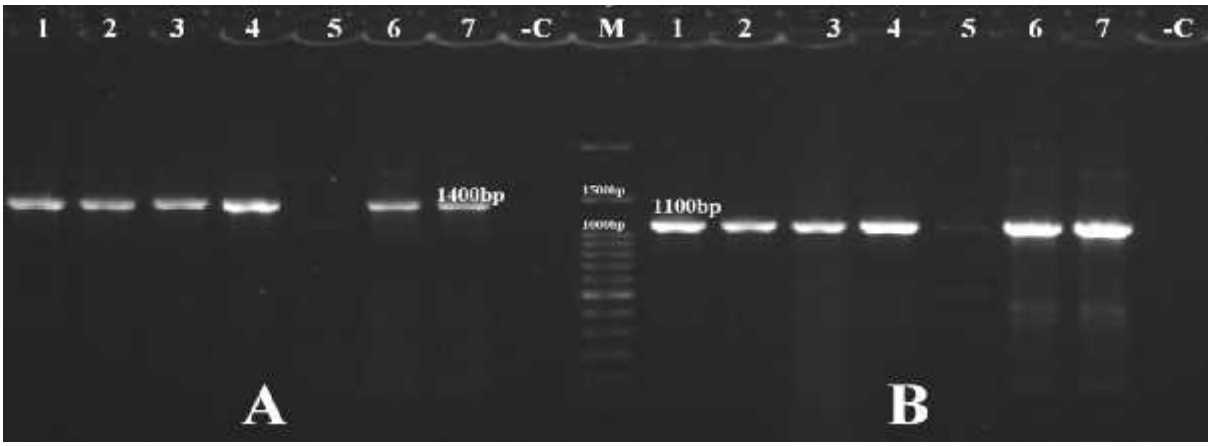
نتایج

در مدت ۲ ماه، ۷ ایزوله های ترایکوفایتون روبروم از ۵ نمونه پوست و ۲ نمونه ناخن بر اساس مشاهدات میکروسکوپی و ماکروسکوپی شناسایی شد. نتایج مثبت محصولات PCR با مشاهده قطعات مختلف ژن‌های SUB1 و SUB4 که در شکل ۱، SUB2 و SUB5 در شکل ۲، SUB7 و SUB6 در شکل ۳ و SUB3 در شکل ۴ آورده شده است، نشان دهنده حضور و عدم حضور هر یک از ژن‌های حدت‌زای سوبتلیزین در DNA ایزوله‌های ترایکوفایتون روبروم است.

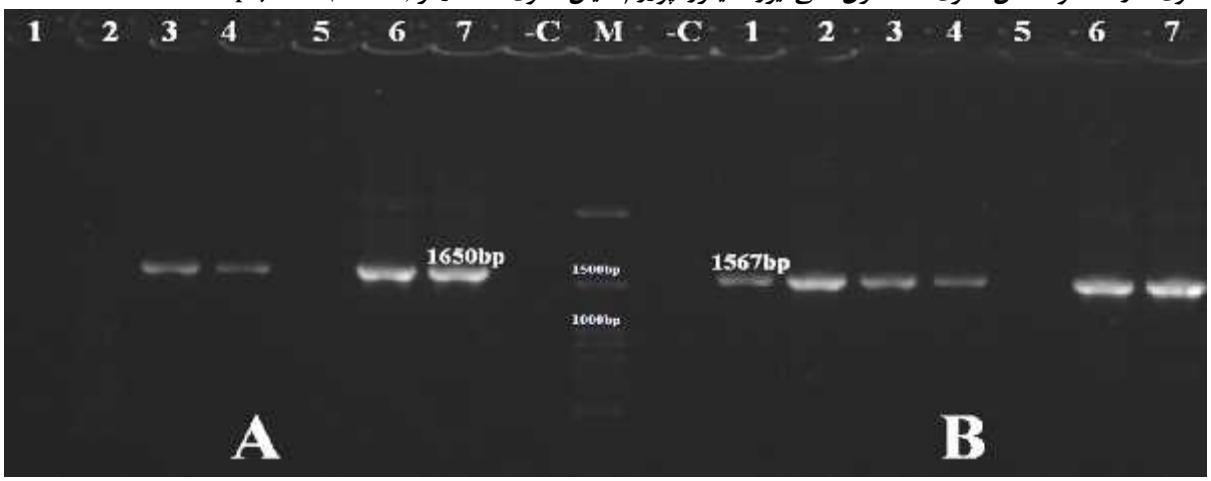
توزیع هر یک از ژن‌های SUB1-7 در بین نمونه‌های بالینی پوست و ناخن در جدول ۲ ذکر شده است. حضور خانواده سوبتیلیزین (SUB1-7) در ایزوله‌های ترایکوفایتون روبروم با فراوانی ۵۷ درصد (۴ از ۷ ایزوله) گزارش شد. در حالی‌که ژن SUB5 (۱۰۰ درصد) در تمام ایزوله‌ها مشاهده شد، ژن SUB6 در ۴ از ۷ ایزوله (۵۷ درصد) مشاهده شد و کم‌ترین حضور در بین توالی ژن های سوبتیلیزین را دارد. درصد فراوانی نسبی SUB1، SUB2، SUB3، SUB4 و SUB7، ۸۶ درصد (۶ از ۷ ایزوله) گزارش شد. حضور هر هفت توالی ژن سوبتیلیزین در گونه‌های جدا شده از نمونه‌های ناخن، به عنوان یک بافت کراتین سخت، نکته قابل توجه در این مطالعه است.



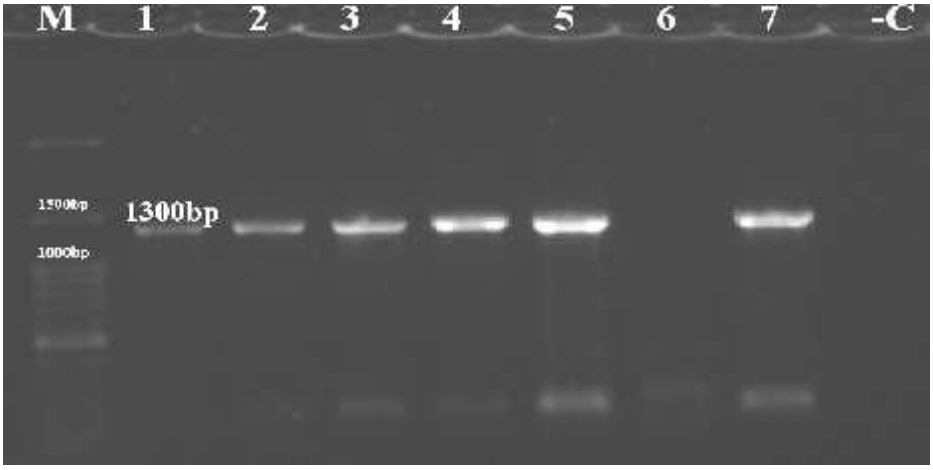
شکل ۱- بلوک A: نتایج مثبت با مشاهده باند ۱۵۰۰bp ژن SUB1 برای ۶ از ۷ ایزوله ترایکوفایتون روبروم؛ ستون ۱ تا ۵- نمونه پوست. ستون ۶ و ۷- نمونه ناخن. بلوک B: نتایج مثبت با مشاهده باند ۱۲۰۰bp ژن SUB4 برای ۶ از ۷ ایزوله ترایکوفایتون روبروم؛ ستون۱ تا ۵- نمونه پوست. ستون ۶ و ۷- نمونه ناخن. ستون C- کنترل منفی ایزوله میکروسپوروم کنیس. ستون M-مارکر DNA (Ladder) با ۳۰۰۰bp-۱۰۰



شکل ۲- بلوک A: نتایج مثبت با مشاهده باند ۱۴۰۰bp ژن SUB2 برای ۶ از ۷ ایزوله ترایکوفایتون روبروم؛ ستون ۱ تا ۵- نمونه پوست. ستون ۶ و ۷- نمونه ناخن. بلوک B: نتایج مثبت با مشاهده باند ۱۱۰۰bp ژن SUB5 برای ۷ از ۷ ایزوله ترایکوفایتون روبروم؛ ستون ۱تا ۵- نمونه پوست. ستون ۶ و ۷- نمونه ناخن. ستون C- کنترل منفی ایزوله میکروسپوروم کنیس. ستون M-مارکر DNA (Ladder) با ۳۰۰۰ bp-۱۰۰



شکل ۳- بلوک A: نتایج مثبت با مشاهده باند ۱۶۵۰bp ژن SUB6 برای ۴ از ۷ ایزوله ترایکوفایتون روبروم؛ ستون ۱ تا ۵- نمونه پوست. ستون ۶ و ۷- نمونه ناخن. بلوک B: نتایج مثبت با مشاهده باند ۱۵۶۷bp ژن SUB7 برای ۶ از ۷ ایزوله ترایکوفایتون روبروم؛ ستون ۱ تا ۵- نمونه پوست. ستون ۶ و ۷- نمونه ناخن. ستون C- کنترل منفی ایزوله میکروسپوروم کنیس. ستون M-مارکر DNA (Ladder) با ۳۰۰۰bp-۱۰۰



شکل ۴- نتایج مثبت با مشاهده باند ۱۳۰۰bp ژن SUB3 برای ۶ از ۷ ایزوله ترایکوفایتون روبروم؛ ستون ۱ و ۲- نمونه ناخن. ستون ۳ تا ۷- نمونه پوست. ستون C- کنترل منفی ایزوله میکروسپوروم کنیس. ستون M- مارکر (Ladder) DNA با ۳۰۰bp-۱۰۰.

جدول ۲ - توزیع فراوانی ژن‌های SUB1-7 ترایکوفایتون روبروم در بین نمونه‌های ناخن و پوست در سال ۱۳۹۶

نمونه‌های بالینی (درماتوفیتوزیس)	ژن‌های سوبتیلیزین							کل
	SUB1 (درصد) تعداد	SUB2 (درصد) تعداد	SUB3 (درصد) تعداد	SUB4 (درصد) تعداد	SUB5 (درصد) تعداد	SUB6 (درصد) تعداد	SUB7 (درصد) تعداد	(درصد)تعداد
نمونه پوست ۱	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۷ (٪۱۰۰)
نمونه پوست ۲	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۷ (٪۱۰۰)
نمونه پوست ۳	۱ (٪۱۶/۷)	۱ (٪۱۶/۷)	۱ (٪۱۶/۷)	۱ (٪۱۶/۷)	۱ (٪۱۶/۷)	۰ (٪۰)	۱ (٪۱۶/۷)	۶ (٪۱۰۰)
نمونه پوست ۴	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۱ (٪۵۰)	۰ (٪۰)	۱ (٪۵۰)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۲ (٪۱۰۰)
نمونه پوست ۵	۱ (٪۲۰)	۱ (٪۲۰)	۰ (٪۰)	۱ (٪۲۰)	۱ (٪۲۰)	۰ (٪۰)	۱ (٪۲۰)	۵ (٪۱۰۰)
نمونه ناخن ۱	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۷ (٪۱۰۰)
نمونه ناخن ۲	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۱ (٪۱۴/۳)	۷ (٪۱۰۰)
کل	۶ (٪۱۴/۶)	۶ (٪۱۴/۶)	۶ (٪۱۴/۶)	۶ (٪۱۴/۶)	۷ (٪۱۷/۱)	۴ (٪۹/۸)	۶ (٪۱۴/۶)	(٪۱۰۰ ۴۱)

**** تعداد (درصد)***

بحث

هدف از این مطالعه، تعیین فراوانی نسبی هر یک از هفت ژن سوبتلیزین ترایکوفایتون روبروم از نمونه‌های بالینی، جهت مشخص نمودن اهمیت برخی از توالی ژن‌ها نسبت به سایر ژن‌ها در روند عفونت درماتوفیت بود. درماتوفیت‌ها، قارچ‌های بیماری‌زا هستند که افراد سالم را نیز بیمار و با تولید آنزیم‌های سوبتیلیزین فقط در شرایط in vivo به عنوان شاخصی از اهمیت آن‌ها در حدت‌زای درماتوفیت‌ها شناخته شده است [۱۹-۱۸]. در این مطالعه، ژن SUB5 در گونه ترایکوفایتون روبروم با فراوانی ۱۰۰ درصد گزارش شد که Lemsaddek و همکاران، ژن SUB5 با فراوانی ۸۹ درصد برای گونه ترایکوفایتون روبروم

و با فراوانی ۱۰۰ درصد برای گونه‌های ترایکوفایتون مگنینی، سودانس، ویولاسئوم و وروکوزوم گزارش کردند [۷].

روند عفونت درماتوفیت‌ها در میزبان شامل ۳ مرحله اصلی است: اتصال به بافت میزبان، تهاجم و ایجاد پاسخ ایمنی میزبان است [۲۰]. نقش آنزیمی این خانواده ژنومی در مرحله اتصال و تهاجم اولیه درماتوفیت‌ها خواهد بود [۲۱]. مقایسه فراوانی حضور ژن SUB1، SUB2، SUB3، SUB4 و SUB7 (۸۶ درصد) با SUB6 (۵۷ درصد) و SUB5 (۱۰۰ درصد) در این مطالعه، احتمالاً نشان دهنده اهمیت هر یک از ژن‌ها در مراحل مختلف عفونت است. Staib و همکاران با بررسی نقش پروتئازهای ترشح شده منحصر به فرد در عفونت‌های شدید التهابی پوست در انسان و جوندگان با استفاده از روش میکرواری (Microarray) بر روی بیان حداقل ۲۳ ژن پروتئاز در شرایط in vivo در درماتوفیت‌ها، نشان دادند که بیان ژن SUB6 به عنوان یک آلرژن مهم مرتبط با گونه ترایکوفایتون روبروم در ارتباط با واکنش‌های التهابی میزبان، در طول عفونت به شدت افزایش یافته است [۲۲]. Lemsaddek و همکاران، ژن SUB6 با فراوانی ۵۰ درصد برای گونه ترایکوفایتون روبروم (۴۴ مورد) و سودانس و هم‌چنین با فراوانی ۴۳ درصد برای گونه ترایکوفایتون ویولاسئوم گزارش می‌کنند که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد [۷].

از ویژگی‌های متمایز بافت کراتین، پیوندهای دی‌سولفیدی نسبتاً بالای آن به علت حضور سولفور در آمینو اسیدها مانند سیستئین و متیونین است. متناسب با میزان این اسید آمینه‌ها در بافت کراتین، دو بافت سخت (ناخن و مو) و نرم (پوست) کراتین معرفی می‌شوند [۲۳]. انیکومیکوزیس ناشی از گونه ترایکوفایتون روبروم، بافت کراتین ناخن را تخریب و در صفحات ناخن کانال‌های بزرگ را ایجاد می‌کند که بزرگ‌تر از هایف درماتوفیت است که نشان دهنده فعالیت آنزیمی خارج سلولی است [۱۳]. حضور خانواده سوبتیلیزین در گونه‌های ترایکوفایتون روبروم جدا شده از نمونه‌های ناخن در مطالعه حاضر با نتایج Lemsaddek و همکاران از محاسبه خطر نسبی مرتبط با حضور ژن‌های SUB4-7 در جنس ترایکوفایتون با فاصله اطمینان ۹۵ درصد، نشان داد ابتلاء به کچلی ناخن نسبت به کچلی بدن در انسان افزایش می‌یابد، هم‌خوانی دارد [۷]. حداقل حضور دو توالی ژنی از خانواده سوبتلیزین در ایزوله‌ها بومی تهران، ایران گزارش شد، در حالی که در مطالعه مشابه هیچ یک از ۷ توالی ژنومی در ۴ ایزوله ترایکوفایتون روبروم بومی پرتغال، مشاهده نشد [۷].

در این مطالعه SUB6 با کم‌ترین فراوانی گزارش شد که علت عمده آن می‌تواند ناشی از نقش بیان این ژن به عنوان یک آلرژن در ایجاد پاسخ ایمنی میزبان در مرحله تهاجم و نفوذ درماتوفیت به لایه شاخی پوست است [۱۳] و هم‌چنین پروتئین Sub6 در مطالعه Méhul و همکاران از تمام نمونه‌های بستر ناخن آلوده (۱۰۵ مورد) به ترایکوفایتون روبروم، تشخیص داده شد [۱۰]، در مطالعه ما بیش‌تر نمونه پوست و بدون واکنش‌های ایمنی بوده است، بنابراین این ژن با کمترین فراوانی مشاهده گردید. از آن جایی‌که پژوهش حاضر حاصل طرح دانش‌جویی و

مشمول محدودیت زمانی بوده است، انجام طرحی مشابه در محدوده زمانی طولانی‌تر جهت ارائه آمار دقیق‌تر و گونه‌های بیش‌تر به همراه تشخیص مراحل درماتوفیتوزیس در نمونه‌های مختلف بالینی، پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر با گزارش فراوانی متفاوت از حضور ژن‌های سوبتلیزین در ایزوله‌های ترایکوفایتون روبروم از نمونه‌های بالینی، حاکی از اهمیت هر یک از ژن‌ها در مراحل مختلف عفونت و نوع بافت کراتین (پوست و ناخن) است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کارشناسان محترم آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده علوم پزشکی تهران در جمع‌آوری نمونه‌های بالینی همکاری نمودند، قدردانی می‌شود.

References

[1] Nenoff P, Kruger C, Ginter-Hanselmayer G, Tietz HJ, Nenoff P, Kruger C, et al. Mycology - an update. Part 1: Dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges* 2014; 12(3): 188–209.

[2] Baldo A, Monod M, Mathy A, Cambier L, Bagut ET, Defaweux V, et al. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. *Mycoses* 2012; 55(3): 218-23.

[3] Latka C, Dey SS, Mahajan S, Prabu R, Jangir PK, Gupta C, et al. Genome sequence of a clinical isolate of dermatophyte, *Trichophyton rubrum* from India. *FEMS Microbiol Lett* 2015; 362(8):1-4

[4] Peres NT, Maranhão FC, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatophytes: Host-pathogen interaction and antifungal resistance. *An Bras Dermatol* 2010; 85(5): 657-67.

[5] Maranhao FC, Paiao FG, Martinez-Rossi NM. Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. *Microb Pathogenesis* 2007; 43(4): 166–72.

[6] Leng W, Liu T, Wang J. Expression dynamics of secreted protease genes in Trichophyton rubrum induced by key host's proteinaceous components. *Med Mycol* 2009; 47(7): 759–65.

[7] Lemsaddek L, Chambel L, Tenreiro R. Incidence of fungalysin and subtilisin virulence genes in dermatophytes. Current Research,Technology and Education Topics in Applied Microbiology and

Microbial Biotechnology. *Microbiol Bo Ser* 2010; 1(13): 656-65.

[8] Moallaei H, Zaini F, Rezaie S, Nourbakhsh F, Larcher G. The Enzymatic Activity and Molecular Characterization of a Secreted Subtilisin-Like Protease in *Microsporum gypseum* and *Trichophyton vanbreuseghemii*. *Iranian J Publ Health* 2009; 38(1): 25-33.

[9] Hadadi F, Sabokbar A, Dezfulian M. Study of Relationship between Genetic Pattern and Susceptibility to Terbinafine in Clinical Isolated of *Trichophyton rubrum*. *J Ardab Univers Medic Scien* 2014; 14(2): 133- 46.

[10] Méhul B, Gu Z, Jomard A, Laffet G, Feuilhade M, Monod M. Sub6 (Tri r 2), an Onychomycosis Marker Revealed by Proteomics Analysis of *Trichophyton rubrum* Secreted Proteins in Patient Nail Samples. *J Invest Dermatol* 2016; 136(1): 331-3

[11] Monod M, Capoccia S, Léchenne B, Zaugg C, Holdom M, Jousson O. Secreted proteases from pathogenic fungi. *J Med Microbiol* 2002; 292(5-6): 405-19.

[12] Monod M. Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathol* 2008; 166(5-6): 285–94.

[13] Jousson O, Lechenne B, Bontems O, Mignon B, Reichard U, Barblan J. Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. *Gene* 2004; 339(2004): 79-88.

[14] Shokohi T, Hajheidari Z, Haghani E, Khalilian A, Aghili S, Miahi S. The study of 101 cases of onychomycosis and associate factors in patients referred to Boali Sina Hospital and Toba dermatology outpatient clinics in Sari. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2009; 19 (71): 33-43. [Farsi]

[15] Karami Robati A, Khalili M, Hashemi Hazaveh SJ, Bayat M. Assessment of the subtilisin genes in *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* from dermatophytosis. *Comp Clin Pathol* 2018; 27(5): 1343-47.

[16] Noorbakhsh F, Mirrahimi M, Rezaie S, Ajodanifar H. Characterization of squalene epoxidase encoding gene in dermatophyte pathogen *Trichophyton violaceum. J Microbial World* 2013; 6(3): 212-18. [Farsi]

[17] Ghafoori Harat S, Basirnia T, Moosavi MR. A simple method to extract filamentous fungal genomic DNA. *Rese PlanPathol* 2016; 5(4): 57-66. [Farsi]

[18] Peres NT, Sanches PR, Falcao JP. Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *BMC Microbiol* 2010; 10(1): 2-10.

[19] Achterman RR, White TC. Dermatophyte virulence factors: Identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. *Int J Microbiol* 2012; 2012(5): 1-8.

[20] Chinnapun D. Virulence Factors Involved in Pathogenicity of Dermatophytes. *Walailak J Sci & Tech* 2015; 12(7): 573-80.

[21] Mathy A, Baldo A, Schoofs L, Cambier L, Defaweux V, Tabart J, et al. Fungalysin and dipeptidyl-peptidase gene transcription in *Microsporum canis* strains isolated from symptomatic and asymptomatic cats. *Vet Microbiol* 2010; 146(1-2): 179–82.

[22] Staib P, Zaugg C, Mignon B, Weber J, Grumbt M, Pradervand S, et al. Differential gene expression in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae* in vitro versus during infection. *Microbiol* 2010; 156(Pt 3): 884-95

[23] Richa Sharma R. Effect of keratin substrates on the growth of keratinophilic fungi. *J Acad Indus Res* 2012; 1(4): 170-2.

Studying the Subtilisin Virulence Genes (1-7) in Trichophyton Rubrum Isolated from Clinical Samples of Skin and Nail in 2017: A Descriptive Study

A. Karami Robati[1], M. Khalili[2], S.J. Hashemi Hazaveh[3], M. Bayat[4].

Received: 22/05/2018 Sent for Revision: 01/10/2018 Received Revised Manuscript: 13/10/2018 Accepted: 14/10/2018

Background and Objectives: The subtilisin genes (SUBs) of *Trichophyton rubrum* play an important role in destroying the keratin to produce a nutritional source and virulence. This study was carried out to determine the presence of subtilisin genes in *T. rubrum* isolated from patients with dermatophytosis in Tehran in 2017.

Materials and Methods: This descriptive study was performed on 32 patients with fungal infections referring to Tehran University of Medical Sciences from July to September 2017. Based on microscopic and macroscopic observations, *T. rubrum* was isolated and identified. Dermatophyte DNA was extracted and SUB1, SUB2, SUB3, SUB4, SUB5, SUB6 and SUB7 genes of *T. rubrum* were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers. The relative frequency of the seven genomic sequences was also calculated.

Results: Seven species of *T. rubrum* were isolated from the clinical specimen of skin (5 cases) and nail (2 cases). The presence of subtilisin family (SUB1-7) was reported with a frequency of 57%. While SUB5 gene was observed in all isolates (100%), the SUB6 gene with the lowest frequency (4 out of 7 cases) and SUB1-7 genes presence in isolates from nail samples were reported.

Conclusion: The presence and absence of subtilisin genes in *T. rubrum* DNA may indicate the importance of genes in different stages of dermatophyte infection (adherence, invasion and inflammation) and the type of nail and skin structure.

Keywords: Subtilisin genes, Dermatophytosis, Trichophyton rubrum, Skin, Nail, Tehran

Funding: This was a self-funded study.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The study was approved by the Ethics Committee of Tehran University of Medical Sciences (IR.TUMS.SPH.Rec1395.1339).

How to cite this article: Karami Robati A, Khalili M, Hashemi Hazaveh S.J, Bayat M. Studying the Subtilisin Virulence Genes (1-7) in Trichophyton Rubrum Isolated from Clinical Samples of Skin and Nail in 2017: A Descriptive Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2019; 17 (10): 925-36. [Farsi]

1- Dept. of Pathobiology, School of Veterinary, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran ORCID: 0000-0002-5106-2880
2- Dept. of Pathobiology, School of Veterinary, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran, ORCID: 0000-0003-1641-8121
3- Dept. of Mycology and Parasitology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran ORCID: 0000-0001-9626-9335
(Corresponding Author) Tel: (021) 88951583, Fax: (021) 88951583, E-mail: sj.hashemi33@yahoo.com
4- Dept. of Pathobiology, School of Veterinary, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran ORCID: 0000-0002-6552-5559