Archive of SID

پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۴، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۹، صفحات ۱۲۸ تا ۱۳۱

مقاله اصلی
(Original Article)

بررسی رابطه ژن‌های فسفولیپاز C با پاتوژنیسیته مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه بیجینگ وسویه غیربیجینگ

حسین گودرزی[*1]، النازالسادات میرصمدی[2]، پریسا فرنیا[3]، سمیه جهانی شرافت[2]

[1] بخش میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[2] بخش میکروب شناسی و مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[3] مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *سویه بیجینگ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بیشتر از ۱/۴ موارد توبرکلوزیس در سرتاسر جهان راتشکیل می‌دهد و از طرفی فسفولیپاز باکتری به عنوان یکی از عوامل بیماریزا گزارش شده است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی وجود ژن‌های فسفولیپاز C در سویه‌های بیجینگ و غیربیجینگ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مقایسه پاتوژنز آنها بود.*

روش بررسی: *تحقیق به روش توصیفی انجام گرفت. کشت مثبت ۲۰۰ مسلول ریوی با استفاده از روش اسپولیگوتایپینگ تعیین سویه گردید. سپس سویه‌های بیجینگ و غیربیجینگ جدا شده به روش PCR از نظر وجود ژن‌های فسفولیپاز C مقایسه شدند.*

یافته‌ها: *از ۲۰۰ نمونه اسپولیگوتایپینگ، ۱۹ نمونه (۹/۵ درصد) ژنوتایپ بیجینگ و ۱۸۱ نمونه (۹۰/۵ درصد) غیربیجینگ بودند. با استفاده از روش PCR در نمونه‌های بیجینگ، ۱۶ نمونه (۸۴/۲ درصد) برای plcA، ۱۷ نمونه (۸۹/۵ درصد) برای plcB و ۱۷ نمونه (۸۹/۵ درصد) برای plcC مثبت شد. در نمونه‌های غیربیجینگ، ۱۷نمونه (۹/۴ درصد) برای plcA، ۱۸ نمونه (۹/۹ درصد) برای plcB و ۱۸نمونه (۹/۹ درصد) برای plcC مثبت شد. این قطعات با سوش استاندارد مقایسه شده و دارای اندازه مشابهی با آن بودند.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد در اکثریت نمونه‌های بیجینگ، ژن‌های فسفولیپاز C وجود داشته و احتمالا می‌تواند در پاتوژنز مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نقش داشته باشد.*

واژگان کلیدی: *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ژنوتایپ بیجینگ، اسپولیگوتایپینگ، فسفولیپاز C، PCR.*

مقدمه

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عامل بیماری سل یک سوم جمعیت جهان را آلوده کرده و هر سال ۳ میلیون نفر جان خود را به علت این بیماری از دست می‌دهند (۱). مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پس از انتقال از طریق ریوی، می‌تواند استخوان، سیستم اعصاب مرکزی و بسیاری از اعضا را درگیر کند. سویه‌هایی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تحت عنوان بیجینگ برای اولین بار در بیماران دچار توبرکلوزیس در ناحیه بیجینگ یا پکن چین شناسایی شدند. سویه‌های بیجینگ، سویه‌هایی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بوده که ویژگی‌های پاتوژنیک مهمی ازجمله ارتباط با مقاومت چندداروییی، عدم پاسخ به درمان، قدرت سریع انتشار و انتقال در جوامع و قدرت تکثیر بالا در ماکروفاژهای انسانی را دارا می‌باشند. مقاومت دارویی وقتی اتفاق می‌افتد که باکتری حداقل به دو داروی ریفامپین و ایزونیازید مقاوم باشد. این سویه‌ها به میزان فراوانی در آسیا و کشورهای آمریکای شمالی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دکتر حسین گودرزی
(**e-mail:** hgod100@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۲/۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۳/۱۰

www.SID.ir

Archive of SID

رایج است وبیش از ۱/۴ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در سراسر جهان را تشکیل می‌دهند. هم‌چنین این سویه‌ها در ایران هم گزارش شده است (۳،۲).

فسفولیپاز C بعنوان یک عامل کلیدی در پاتوژنز باکتری‌هایی نظیر کلستریدیوم پرفرنژنس، لیستریا منوسیتوژنز، پسودوموناس آئروجینوزا، باسیلوس سرئوس، سویه هایی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم مارینوم، مایکوباکتریوم بوویس و مایکوباکتریوم اولسرانس وجود دارند (۴).

در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تجزیه فسفولیپیدها توسط فسفولیپاز C منجر به تولید دی آسیل گلیسرول می‌شود که در سیگنالینگ سلولی مؤثر بوده و در فعال کردن (ERK) یا Extracellular Signal regulated Kinases نقش داشته که منجر به فعال شدن ماکروفاژ می‌شود. بنابراین با توجه به اهمیت فسفولیپاز C در پاتوژنز مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌توان از تکنیک PCR جهت بررسی حضور ژن‌های فسفولیپاز C در نمونه‌های بیجینگ و غیربیجینگ استفاده کرد و از این طریق پاتوژنیسیته این سویه‌ها را با هم مقایسه کرد (۵، ۶). لذا به منظور تعیین فراوانی ژن‌های فسفولیپاز C با پاتوژنیسیته مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه بیجینگ و سویه غیربیجینگ این تحقیق انجام گرفت.

مواد و روشها

تحقیق به روش توصیفی روی ۲۰۰ بیمار مسلول مراجعه کننده به مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی انجام گرفت. کشت وجداسازی اولیه به روش پتروف ۴ درصد و با استفاده از محیط لوین اشتاین جانسون (LJ) انجام شد و جهت شناسایی سویه‌ها از تست‌های بیوشیمیایی از قبیل نیاسین، فعالیت کاتالاز و احیاء نیترات استفاده شد. سپس حساسیت دارویی در برابر ایزونیازید (۰/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر)، ریفامپین (۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و اتامبوتول (۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) به روش تناسبی انجام و سویه‌ها به سه گروه حساس، MDR (مقاومت دو دارویی ایزونیازید و ریفامپین) و سایر (مقاومت تک دارویی یا دو دارویی غیر از ایزونیازید و ریفامپین) تقسیم‌بندی شدند. استخراج DNA از کلنی‌های مثبت با روش N–استیل,N, N, N–تری متیل آمونیوم برماید استخراج گردید. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ژنوتایپ بیجینگ با روش اسپولیگوتایپینگ جداسازی گردید.

اسپولیگوتایپینگ روشی است که به بررسی پلی‌مرفیسم لوکوس کروموزومی Direct repeat (توالی تکراری مستقیم) که شامل۳۶ جفت بازمی‌باشد می‌پردازد که به یک یا دو توالی فاصله انداز ۳۵ تا ۴۱ جفت بازی متصل است. ۹۴ توالی فاصله انداز مختلف بین DR شناسایی شده که تنها ۴۳ توالی فاصله انداز به صورت معمول مورد استفاده قرار می‌گیرد. براساس وجود یا فقدان این توالی می‌توان سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس را از هم تمایز داد. دراین روش ابتدا تکثیر منطقه DR با استفاده از PCR با دو پرایمر زیر انجام می‌شود.

$$\text{DRa: } 5'(Biotin)-GGTTTTGGGTCTGACGAC\,3'$$
$$\text{DRb: } 5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC3'$$

سپس دناتوره کردن محصول PCR در دمای ۹۹درجه و هیبریداسیون محصول PCR دناتوره شده با الیگونوکلئوتیدهای غشاء نیتروسلولز به روش Reverse Line Blot انجام شد. انکوبه کردن غشاء نیتروسلولز با آنزیم استرپتاویدین و اضافه کردن سوبسترای کمی لومینسانس (ECL) برای ردیابی سیگنال‌های هیبریداسیون صورت گرفت و در نهایت غشاء با صفحه ترانس پارنت پوشانده و در معرض فیلم X-ray قرار داده شد. داده‌های اسپولیگوتایپینگ پس‌از مقایسه با اطلاعات موجود در بانک جهانی اسپولیگوتایپینگ (SPOLDB 4) آنالیز شدند و بر حسب وجود یا عدم وجود سیگنال و تعداد آن‌ها سویه‌های بیجینگ از غیربیجینگ جداسازی شدند. سپس با استفاده از روش PCR وجود ژن‌های فسفولیپاز C درسویه‌های بیجینگ و غیربیجینگ بررسی شد. در این مطالعه از سه جفت پرایمر استفاده شد که توالی آنها مطابق جدول ۱ می‌باشد (۲).

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در PCR

نام پرایمر	توالی پرایمرها	
plcA-PCR	*plcA*-F	5'TCG AAC GCC GGG AGA TTA CC 3'
	plcA-R	5'GCA GGA AGG CAG GGC AAG TG3'
plcB-PCR	*plcB*-F	5'-TCC GGC GAA TGC ACC TTG GCT CAC-3'
	plcB-R	5'-CGG CAG GCA GGC GGA ATC AGA ACA-3'
plcC-PCR	*plcC*-F	5'-GGG CGG CAA AGG CGG ACC AAG AG-3'
	plcC -R	5'-AAG CCG AAA TAC ACG AGG GAG AGC-3'

www.SID.ir

Archive of SID

سیکل PCR مورد استفاده برای همه لوکوس‌های *plcA-B-C* به صورت زیر بود:

مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۲۶ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۷-۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ ثانیه و مرحله نهایی آن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و محصولات PCR بدست آمده روی ژل آگارز ۲-۱ درصد الکتروفورز شدند.

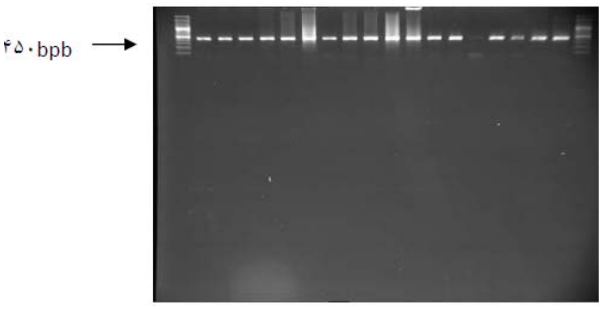
داده‌ها با کمک نرم افزار SPSS (version 11.5) تحلیل شدند. به منظور تحلیل داده‌های کیفی از آزمون آماری کای‌دو استفاده شد. P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

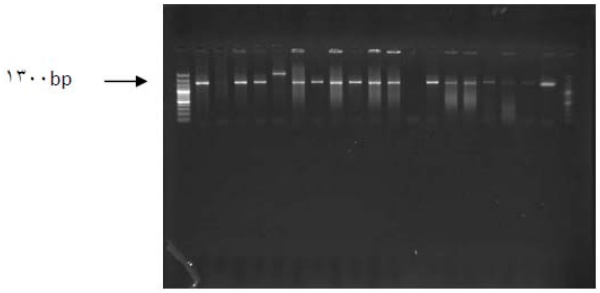
تحقیق روی ۲۰۰ بیمار مسلول مراجعه کننده به مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی انجام گرفت. در تست‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، فراوانی MDR در نمونه‌های بیجینگ ۵۳ درصد و در نمونه‌های غیربیجینگ ۱۰ درصد بود.

در روش اسپولیگوتایپینگ، از ۲۰۰ نمونه مورد بررسی، ۱۹ (۹/۵ درصد) مورد ژنوتایپ بیجینگ و ۱۸۱ (۹۰/۵ درصد) مورد ژنوتایپ غیربیجینگ بودند.

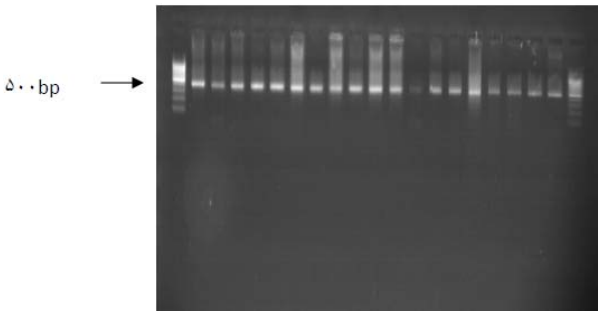
از ۱۹ نمونه بیجینگ، ۱۶ نمونه (۸۴/۲ درصد) از نظر ژن *plcA* مثبت بودند، در حالی که از ۱۸۱ سویه غیربیجینگ، تنها ۱۷ نمونه (۹/۴ درصد) از نظر ژن مذکور مثبت بودند (P<۰/۰۰۱) (شکل ۱). از ۱۹ نمونه بیجینگ، ۱۷ نمونه (۸۹/۵ درصد) از نظر ژن *plcB* مثبت بودند، در حالی که از ۱۸۱ سویه غیربیجینگ، تنها ۱۸ نمونه (۹/۹ درصد) این ژن را داشتند (P<۰/۰۰۱) (شکل ۲). از ۱۹ نمونه بیجینگ، ۱۷ نمونه (۸۹/۵ درصد) و از ۱۸۱ سویه غیربیجینگ، تنها ۱۸ نمونه (۹/۹ درصد) دارای ژن *plcC* بودند و این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱) (شکل ۳).



شکل۱- نتایج PCR ژن *plcA*



شکل۲- نتایج PCR ژن *plcB*



شکل ۳- نتایج PCR ژن *plcC*

بحث

به منظور پیشرفت در جهت کنترل و پیشگیری از سل، درک درست از پاتوژنز و عملکرد فاکتورهای ویرولانس ضروری و لازم است. فسفولیپاز C عامل کلیدی در پاتوژنز باکتری‌هایی نظیر کلستریدیوم پرفرنژنس، لیستریا منوسیتوژنز، پسودوموناس آئروجینوزا، باسیلوس سرئوس، سویه‌هایی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم مارینوم، مایکوباکتریوم بوویس و مایکوباکتریوم اولسرانس است.

درمایکوباکتریوم توبرکلوزیس تجزیه فسفولیپیدها توسط فسفولیپاز C منجر به تولید دی‌آسیل‌گلیسرول می‌شود که در سیگنالینگ سلولی مؤثر بوده و در فعال کردن ERK یا Extracellular Signal regulated Kinases نقش داشته که منجر به فعال شدن ماکروفاژ می‌شود. می‌توان از تکنیک PCR جهت شناسایی وجود ژن‌های فسفولیپاز C استفاده کرد (۵،۶). بعضی از انواع فسفاتیدیل کولین را به فسفوریل کولین و دی آسیل گلیسرول می‌شکنند و بعضی دیگر فسفاتیدیل اینوزیتول و اسفنگومیلین را می‌شکنند. تولید دی آسیل گلیسرول (DAG) در پاتوژنز مؤثر است. DAG و متابولیت‌های آن مثل اسید آراشیدونیک در پدیدهٔ سیگنالینگ یوکاریوت‌ها همانند فرآیند التهابی مشارکت دارند.

حتی بعضی مانند فسفولیپاز C (آلفاتوکسین کلستریدیوم پرفرنژنس) و فسفولیپاز H (پسودوموناس آئروجینوزا)

www.SID.ir

Archive of SID

اسفنگومیلین را به سرامید هیدرولیز می‌کنند که قادر است آپوپتوز را در سلولهای یوکاریوتی القاء کند (۸).

اگرچه فسفولیپاز C در باکتریها نقش کلیدی در بیماری‌زایی و پیدایش عفونت‌ها دارد، ولی مکانیسم آنها بسیار متنوع است. برای مثال، فسفولیپاز C یا آلفاتوکسین کلستریدیوم پرفرنژنس فعالیت همولیتیک، درمونکروتیک کشنده و تجمع دهندهٔ پلاکت دارد (۱۱). در حالی که در لیستریامنوسیتوژنز به فرار باکتری از فاگولیزوزوم‌های درون سلولی کمک می‌کند (۷).

فسفولیپاز H در پسودوموناس آئروجینوزا سیتوتوکسیک بوده و زمانی که به موش تزریق شود عامل هپاتونکروز و نکروز لوله‌های کلیوی می‌شود (۹). فسفولیپاز H مهار کنندهٔ انفجار تنفسی نوتروفیل بوده که باعث تداخل با مسیرهای وابسته به پروتئین کیناز C و مسیرهای غیروابسته به آن است (۱۰).

در مطالعه حاضر، در ابتدا توسط روش اسپولیگوتایپینگ سویه‌های بیجینگ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از سویه‌های غیربیجینگ افتراق داده شد که به علت اهمیت سویه‌های بیجینگ در ایجاد مقاومت دارویی و ویرولانس بالا در مقایسه با سویه‌های غیربیجینگ بود. سپس با روش PCR میزان حضور ژن‌های فسفولیپاز C در سویه‌های بیجینگ و غیربیجینگ مقایسه شد و مشخص شد ژن آنزیم فسفولیپاز در اکثر سویه‌های بیجینگ وجود داشته ومی تواند در پاتوژنزمایکوباکتریوم توبرکلوزیس نقش کلیدی و مهمی داشته باشد. در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تجزیه فسفولیپیدها توسط فسفولیپاز C منجر به تولید دی‌آسیل‌گلیسرول می‌شود که در سیگنالینگ سلولی مؤثر بوده و در فعال کردن ERK یا Extracellular Signal regulated Kinases نقش داشته که منجر به فعال شدن ماکروفاژ می‌شود. با توجه به یافته‌های حاصل مشخص شد که ژن‌های فسفولیپاز C در اکثر موارد بیجینگ وجود داشته و در پاتوژنز مایکوباکتریوم توبرکلوزیس موثر و مهم است؛ بنابراین فسفولیپاز به عنوان فاکتور مهم بیماریزایی در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پیشنهاد می‌شود.

در یک جمع‌بندی به نظر می‌رسد که ژن‌های فسفولیپاز C در اکثر سویه‌های بیجینگ وجود داشته و احتمالا می‌تواند در پاتوژنز آنها موثر واقع شود.

قدردانی و تشکر

بدین وسیله از همکاری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بخش میکروب‌شناسی و مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی بیمارستان مسیح دانشوری تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Kam KM, Yip CW, Tse LW, Leug kl, Wong KL, Ko WM, et al. Optimization of variable number tandem repeat typing set for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* in the Beijing family. FEMS Microbiol Lett 2006; 256: 258-65.

2. Talarico S, Durmaz R, yang Z. Insertion and deletion- assoaiated genetic diversity of mycobacterium tuberculosis phospholipase C- encoding gene among 106 chinical isolates from turkey. J Clin Microb 2004; 43: 533-38.

3. Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, Lan NT, van GorkomT, Kremer K, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. J Emerg Infect Dis 2000; 6: 302-305.

4. Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, Vyazovaya A, Otten T, Vyshnevskiy B. Analysis of the allelic diversity of the mycobacterial interspersed repetitive units in *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations. J Clin Microbiol 2004; 42: 2438-44.

5. Korbsrisate S, Ptomaras A, Damnin S , CKumdee J, Srinon V, lengwehasatit I, et al. characterization of two distinct phospholipase C enzymes from *Burkholderia pseudomallei*. J Clin Microb 2007; 40:1907-15.

6. Taghrid I, Coloe P. Phospholipase A in gram negative bacteria and it's role in pathogenesis. J Med Microb 2006; 152: 1263-74.

7. Marquis H, Goldfine H, Portnoy D. Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. J Cell Biol 1997; 137: 1381-92.

8. Vasil M, Berka R, Gray G, Nakai H. Cloning of a phosphate-regulated hemolysin gene (phospholipase C) from *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 1982; 152: 431–40.

9. Gomez A, Mveobiung A, Vray B, Rudnicka W, Shamputa I, Portaels F, et al. Detection of phospholipase C in nontuberculosis mycobacteria and it's possible role in hemolytic activity. J Clin Microbiol 2001; 39: 1396-401.

10. Yang ZH, Yong D, Zhang LX, Marrs CF, Foxman B, Bates JH, et al. Clinical relevance of *Mycobacterium tuberculosis* plcD gene mutation. J Microbiol 2005; 39: 1436-42.

11. Issar S. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. J Clin Microbiol 2003; 16: 463–96.

www.SID.ir