

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

حسین گودرزی<sup>۱\*</sup>، الناز السادات میرصمدی<sup>۲</sup>، پریسا فرنی<sup>۳</sup>، سمیه جهانی شرافت<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> بخش میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

<sup>۲</sup> بخش میکروب شناسی و مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

<sup>۳</sup> 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 را تشکیل 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، ۱۷ نمونه (۹/۴ درصد) برای *plcA*، ۱۸ نمونه (۹/۹ درصد) برای *plcB* و ۱۸ نمونه (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 احتمالاً 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 از جمله ارتباط با مقاومت چندارویی، 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 ایزونیاژید 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

اسپولیگوتایپینگ روشی است که به بررسی پلی مرفیسم لوکوس کروموزومی Direct repeat (توالی تکراری مستقیم) که شامل ۳۶ جفت باز می باشد می پردازد 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 می گیرد. براساس وجود یا فقدان این توالی می توان سوبه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس را از هم تمایز داد. در این روش ابتدا تکثیر منطقه DR با استفاده از PCR با دو پرایمر زیر انجام می شود.

DRa: 5'(Biotin) – GGTTTGGGTCTGACGAC 3'  
DRb: 5' – CCGAGAGGGGACGGAAAC 3'

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

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در PCR

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

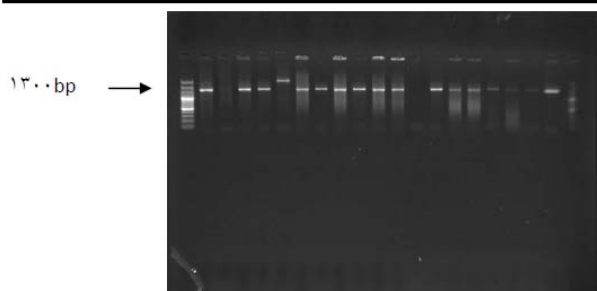
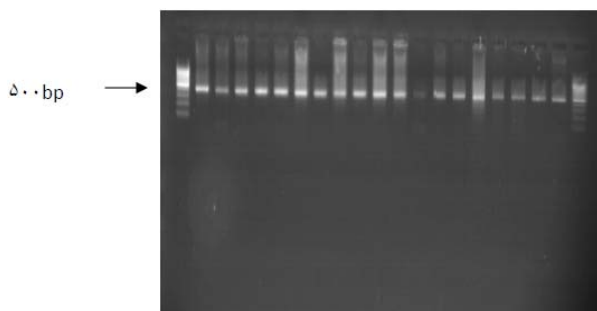
رایج است و بیش از ۱/۴ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در سراسر جهان را تشکیل می دهند. همچنین این سوبه ها در ایران هم گزارش شده است (۳،۲).

فسفولیپاز C بعنوان یک عامل کلیدی در پاتوژن باکتری های نظیر کلستری دیوم پرفرنژنس، لیستریا منوسیتوژنز، پسودوموناس آئروجینوزا، باسیلوس سرئوس، سوبه های 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 آسید گلیسرول می شود که در سیگنالینگ سلولی مؤثر بوده و در فعال کردن (ERK) یا Extracellular Signal regulated Kinases نقش داشته که منجر به فعال شدن ماکروفاژ می شود. بنابراین با توجه به اهمیت فسفولیپاز C در پاتوژن مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می توان از تکنیک PCR جهت بررسی حضور ژن های فسفولیپاز C در نمونه های بیجینگ و غیربیجینگ استفاده کرد و از این طریق پاتوژنیسته این سوبه ها را با هم مقایسه کرد (۵، ۶). لذا به منظور تعیین فراوانی ژن های فسفولیپاز C با پاتوژنیسته مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سوبه بیجینگ و سوبه 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 سوبه ها از تست های بیوشیمیایی از قبیل نیاسین، فعالیت کاتالاز و احیاء نترات استفاده شد. سپس حساسیت دارویی در برابر ایزونیاژید (۰/۲ میکروگرم در میلی لیتر)، ریفامپین (۴۰ میکروگرم در میلی لیتر)، استرپتوماکسین (۱۰ میکروگرم در میلی لیتر) و اتامبوتول (۲ میکروگرم در میلی لیتر) به روش تناسبی انجام و سوبه ها به سه گروه حساس، MDR (مقاومت دو دارویی ایزونیاژید و ریفامپین) و سایر (مقاومت تک دارویی یا دو دارویی غیر از ایزونیاژید و ریفامپین) تقسیم بندی شدند. استخراج DNA از کلنی های مثبت با روش N-N، N-استیل، تری متیل آمونیوم بر مایند استخراج گردید. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ژنوتایپ بیجینگ با روش اسپولیگوتایپینگ جداسازی گردید.

شکل ۲- 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 ویروالانس ضروری و لازم است. فسفولیپاز C عامل کلیدی در پاتوژنز باکتری‌هایی نظیر کلسترییدیوم پرفرنزئس، لیستریا منوسیتوژنز، پسودوموناس آئروجینوزا، باسیلوس سرئوس، سویه‌هایی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم مارینوم، مایکوباکتریوم بوویس و مایکوباکتریوم اولسرانس است.

در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تجزیه فسفولیپدها توسط فسفولیپاز C منجر به تولید دی‌آسیل 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. می‌توان از تکنیک PCR جهت شناسایی وجود ژن‌های فسفولیپاز C استفاده کرد (۵، ۶). بعضی از انواع فسفاتیدیل کولین را به فسفوریل کولین و دی‌آسیل گلیسرول می‌شکند و بعضی دیگر فسفاتیدیل اینوزیتول و اسفنگومیلین را می‌شکند. تولید دی‌آسیل گلیسرول (DAG) در پاتوژنز مؤثر است. DAG و متابولیت‌های آن مثل اسید آراشیدونیک در پدیده سیگنالینگ یوکاریوت‌ها همانند فرآیند التهابی مشارکت دارند.

حتی بعضی مانند فسفولیپاز C (آلفاتوکسین کلسترییدیوم پرفرنزئس) و فسفولیپاز H (پسودوموناس آئروجینوزا)

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 ۱-۲ درصد الکتروفورز شدند.

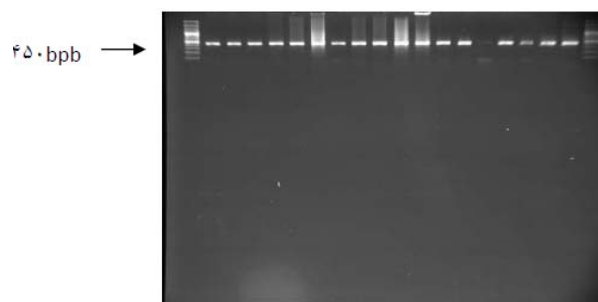
داده‌ها با کمک نرم افزار SPSS (version 11.5) تحلیل شدند. به منظور تحلیل داده‌های کیفی از آزمون آماری کای دو استفاده شد. P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### 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 ( $P < 0/001$ ) (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 ( $P < 0/001$ ) (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 ( $P < 0/001$ ) (شکل ۳).

شکل ۱- نتایج PCR ژن *plcA*

اکثر سویه‌های بیجینگ وجود داشته و می‌تواند در پاتوژن‌مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نقش کلیدی و مهمی داشته باشد. در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تجزیه فسفولیپدها 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 پاتوژن‌مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مؤثر 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 پاتوژن‌های آنها مؤثر واقع شود.

### قدردانی و تشکر

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

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 دهنده 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 کننده 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 ویرولانسی 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

### REFERENCES

1. Kam KM, Yip CW, Tse LW, Leung 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- associated genetic diversity of mycobacterium tuberculosis phospholipase C- encoding gene among 106 clinical isolates from turkey. *J Clin Microb* 2004; 43: 533-38.
3. Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, Lan NT, van Gorkom T, 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. Korbssrisate S, Ptomas 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 its 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 its 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.