

## بررسی رابطه ژن‌های فسفولیپاز C با پاتوژنیتیه مایکروبکتریوم توبرکلوزیس سویه بیجینگ و سویه غیربیجینگ

حسین گودرزی<sup>\*</sup>، النازالسادات میرصمدی<sup>۲</sup>، پریسا فرنیا<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 مایکروبکتریولوژی، بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

<sup>۳</sup> مرکز تحقیقات مایکروبکتریولوژی، بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

### چکیده

**سابقه و هدف:** سویه بیجینگ مایکروبکتریوم توبرکلوزیس بیشتر از ۱/۴ موارد توبرکلوزیس در سرتاسر جهان را تشکیل می‌دهد و از طرفی فسفولیپاز باکتری به عنوان یکی از عوامل بیماری‌گزارش شده است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی وجود ژن‌های فسفولیپاز C در سویه‌های بیجینگ و غیربیجینگ مایکروبکتریوم توبرکلوزیس و مقایسه پاتوژن 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 ۱۱۱ نمونه (۹۰/۵ درصد) غیربیجینگ بودند. با استفاده از روش PCR در نمونه‌های بیجینگ، ۱۶ نمونه (۱۴/۲ درصد) برای *plcA* ۱۷ نمونه (۱۹/۵ درصد) برای *plcB* و ۱۷ نمونه (۱۹/۵ درصد) برای *plcC* مثبت شد. در نمونه‌های غیربیجینگ، ۱۷ نمونه (۹/۴ درصد) برای *plcA* ۱۸ نمونه (۹/۹ درصد) برای *plcB* و ۱۱ 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 پاتوژن مایکروبکتریوم توبرکلوزیس نقش داشته باشد.

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

### مقدمه

در گیر کند. سویه‌هایی از مایکروبکتریوم توبرکلوزیس تحت عنوان بیجینگ برای اولین بار در بیماران دچار توبرکلوزیس در ناحیه بیجینگ یا پکن چین شناسایی شدند. سویه‌های بیجینگ، سویه‌هایی از مایکروبکتریوم توبرکلوزیس بوده که ویژگی‌های پاتوژنیک مهمی از جمله ارتباط با مقاومت چنددارویی، عدم پاسخ به درمان، قدرت سریع انتشار و انتقال در جوامع و قدرت تکثیر بالا در ماکروفازهای انسانی را دارا می‌باشند. مقاومت دارویی وقتی اتفاق می‌افتد که باکتری حداقل به دو داروی ریفارمپین و ایزونیازید مقاوم باشد. این سویه‌ها به میزان فراوانی در آسیا و کشورهای آمریکای شمالی

مایکروبکتریوم 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). مایکروبکتریوم توبرکلوزیس پس از انتقال از طریق ریوی، می‌تواند استخوان، سیستم اعصاب مرکزی و بسیاری از اعضاء را

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 پلیمرافیسم لوکوس کروموزومی Direct repeat (توالی تکراری مستقیم) که شامل ۳۶ 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 مایکروبکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس را از هم تمایز داد. در این روش ابتدا تکثیر منطقه DR با استفاده از PCR با دو پرایمر زیر انجام می‌شود.



سپس دناتوره کردن محصول PCR در دمای ۹۹ درجه و هیبریداسیون محصول PCR دناتوره شده با الیگونوکلئوتیدهای غشاء نیتروسلولز به روش Reverse Line Blot انجام شد. انکوبه کردن غشاء نیتروسلولز با آنزیم استریپتاویدین 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 پس از مقایسه با اطلاعات موجود در بانک جهانی اسپولیگوتایپینگ (SPOLDB ۴) 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 در سویه‌های 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

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

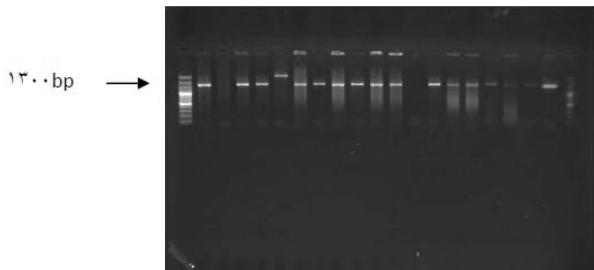
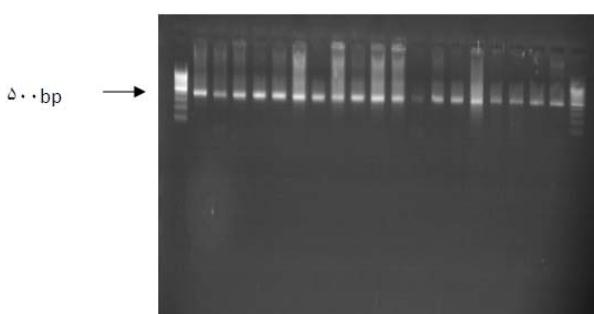
راجح است و بیش از ۱/۴ مایکروبکتریوم توبرکلوزیس در سراسر جهان را تشکیل می‌دهند. همچنین این سویه‌ها در ایران هم گزارش شده است (۳،۲).

فسفولیپاز C بعنوان یک عامل کلیدی در پاتوژن‌سازکتری‌هایی نظیر کلستریدیوم پرفرنژس، لیستریا منوسیتوژن، پسودوموناس آئروبیجنوزا، باسیلوس سرئوس، سویه‌هایی از مایکروبکتریوم توبرکلوزیس، مایکروبکتریوم مارینوم، مایکروبکتریوم بوویس و مایکروبکتریوم اولسرانس وجود دارند (۴).

در مایکروبکتریوم توبرکلوزیس تجزیه فسفولیپیدها توسط فسفولیپاز C منجر به تولید دی آسیل گلیسرول می‌شود که در سیگنانلینگ سلولی مؤثر بوده و در فعل کردن (ERK) یا Extracellular Signal regulated Kinases منجر به فعال شدن ماکروفاز می‌شود. بنابراین با توجه به اهمیت فسفولیپاز C در پاتوژن‌سازکتریوم توبرکلوزیس می‌توان از تکنیک PCR جهت بررسی حضور ژن‌های فسفولیپاز C در نمونه‌های بیجینگ و غیربیجینگ استفاده کرد و از این طریق پاتوژنیته این سویه‌ها را با هم مقایسه کرد (۵، ۶). لذا به منظور تعیین فراوانی ژن‌های فسفولیپاز C با پاتوژنیته مایکروبکتریوم 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 مایکروبکتریولوژی انجام گرفت. کشت و جداسازی 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 (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، ریفارمپین (۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، استرپтомایسین (۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و اتامبوتوول (۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) به روش تناسی انجام و سویه‌ها به سه گروه حساس، MDR (مقاومت دو دارویی ایزونیازید و ریفارمپین) و سایر (مقاومت تک دارویی یا دو دارویی غیر از ایزونیازید و ریفارمپین) تقسیم‌بندی شدند. استخراج DNA از کلیه‌های مثبت با روش N-N,N,N-استیل-استری متیل آمونیوم بر ماید استخراج گردید. مایکروبکتریوم 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 پاتوزن و عملکرد فاکتورهای ویرولاس ضروری و لازم است. فسفولیپاز C عامل کلیدی در پاتوزن باکتری‌های نظیر کلستریدیوم پرفرنژنس، لیستریا منوسیتوژن، پسودوموناس آتروجینوza، باسیلوس سرئوس، سویه‌هایی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم مارینوم، مایکوباکتریوم بوبویس و مایکوباکتریوم اوسرانس است. در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تجزیه فسفولیپیدها 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 ماکروفاز 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 پاتوزن مؤثر است. DAG و متابولیت‌های آن مثل اسید آرشیدونیک در پدیده سیگنالینگ یوکاریوت‌ها همانند فرآیند التهابی مشارکت دارند.

حتی بعضی مانند فسفولیپاز C (آلقاتوکسین کلستریدیوم پرفرنژنس) و فسفولیپاز H (پسودوموناس آتروجینوza)

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 ۶۲-۶۷ 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.

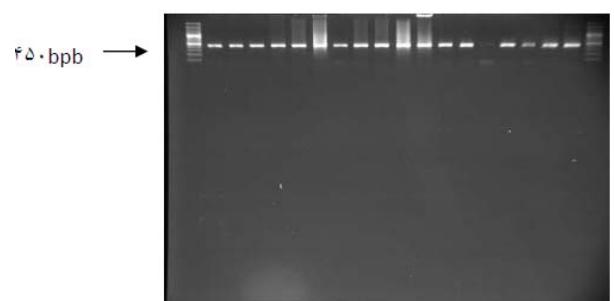
داده‌ها با کمک نرم افزار SPSS (version 11.5) تحلیل شدند. به منظور تحلیل داده‌های کیفی از آزمون آماری کایدو استفاده شد. P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

تحقیق روی ۲۰۰ بیمار مسلح مراجعه کننده به مرکز تحقیقات مایکوباکتریولژی 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 (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).

شکل ۱- نتایج PCR ژن *plcA*

اکثر سویه‌های بیجینگ وجود داشته و می‌تواند در پاتوژن‌زماکوباكتریوم توبرکلوزیس نقش کلیدی و مهمی داشته باشد. در مایکوباكتریوم توبرکلوزیس تجزیه فسفولیپیدها توسط فسفولیپاز C منجر به تولید دی‌آسیل گلیسرول می‌شود که در سیگنانالینگ سلولی مؤثر بوده و در فعل کردن ERK یا Extracellular Signal regulated Kinases منجر به فعل شدن ماکروفاژ می‌شود. با توجه به یافته‌های حاصل مشخص شد که ژن‌های فسفولیپاز C در اکثر موارد بیجینگ وجود داشته و در پاتوژن‌زماکوباكتریوم توبرکلوزیس موثر و مهم است؛ بنابراین فسفولیپاز به عنوان فاکتور مهم بیماری‌زایی در مایکوباكتریوم توبرکلوزیس پیشنهاد می‌شود. در یک جمع‌بندی به نظر می‌رسد که ژن‌های فسفولیپاز C در اکثر سویه‌های بیجینگ وجود داشته و احتمالاً می‌تواند در پاتوژن آنها موثر واقع شود.

### قدرتانی و تشکر

بدین وسیله از همکاری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بخش میکروب‌شناسی و مرکز تحقیقات مایکوباكتریولوزی 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- assoiated genetic diversity of mycobacterium tuberculosis phospholipase C- encoding gene among 106 chnical 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, Vyshevskiy 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, Ptomasas 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.

اسفنگومیلین را به سرامید هیدرولیز می‌کند 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، درمنکروتیک کشنده و تجمع دهنده پلاکت دارد (۱۱). در حالی که در لیستریامونوسیتوژنز به فرار باکتری از فاگولیزوزوم‌های درون سلولی کمک می‌کند (۷).

فسفولیپاز H در پسودوموناس آئروجینوزا سیتو توکسیک 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 مایکوباكتریوم توبرکلوزیس از سویه‌های غیربیجینگ افتراق داده شد که به علت اهمیت سویه‌های بیجینگ در ایجاد مقاومت دارویی و وبرولانس 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