Journal of Gorgan University of Medical Sciences

e-ISSN: 2008-4080 p-ISSN: 1562-4765

2022 / Vol 24 / No 2

OPEN ACCESS

Original Paper

Isolation, Cloning, and Expression of *Streptococcus dysgalactiae* Subspecies Superantigen by SDS-PAGE in Psoriasis Patients

Kumarss Amini (Ph.D)*[1], Ali Habbadi (M.Sc)[2]

1 Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

2 M.Sc in Microbiology, Faculty of Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

Abstract

Background and Objective: Streptococci are Gram-positive and anaerobic bacteria that are isolated from different sources. These bacteria are capable of producing superantigens, toxins, and biologically-active substances and are therefore very important in the field of infectious disease. Streptococcal pyrogenic exotoxins A (*speA*) is produced by various bacteria, including *Streptococcus dysgalactiae*. This study aimed at the isolation, cloning, and production of *speA* from streptococci from the skin of psoriasis patients.

Methods: In this descriptive-laboratory study, samples were taken from 60 psoriasis patients. *S. dysgalactiae* isolated were identified by different tests. The *speA* gene was cloned by the TA cloning method using PTG-19 vector into the Escherichia coli X11 blue as host. Expression of the cloned gene in recombinant colonies was evaluated by SDS-PAGE.

Results: Screening of white recombinant colonies confirmed the presence of *speA* genes. Expression of the *speA* gene in E. coli X11 blue was confirmed by SDS-PAGE.

Conclusion: Streptococcus superantigens can be considered as a rich source of vaccine production for different infections caused by these bacteria. By utilizing different cloning hosts and investigating optimal production conditions, *S. dysgalactiae* could be a candidate for future studies on vaccine production.

Keywords: *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *speA* gene, Cloning, Superantigens, SDS-PAGE

***Corresponding Author:** Kumarss Amini (Ph.D), E-mail: dr_kumarss_amini@yahoo.com

Received 17 Mar 2021
Final Revised 12 Jun 2022
Accepted 19 Jul 2022
Published Online 17 Oct 2022

Cite this article as: Amini K, Habbadi A. [Isolation, Cloning, and Expression of *Streptococcus dysgalactiae* Subspecies Superantigen by SDS-PAGE in Psoriasis Patients]. J Gorgan Univ Med Sci. 2022; 24(2): 89-96. [Article in Persian]

© The author(s)

Owned: Golestan University of Medical Sciences **Publisher:** Deputy of Research and Technology

مجله دانشگاه علوم پزشکی گرگان

تابستان ۱۴۰۱ / دوره ۲۴ / شماره ۲ (پی در پی ۸۲)

دارای رتبه علمی -پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

e-ISSN: ۲۰۰۸-۴۰۸۰ p-ISSN: ۱۵۶۲-۴۷۶۵

با دسترسی آزاد

تحقیقی

جداسازی، کلونینگ و بیان سوپر آنتی ژن *SPE* استرپتوکوک دیس گالاکتیه با روش SDS page در بیماران مبتلا به پسوریازیس

دکتر کیومرث امینی*[۱]، علی حبادی[۲]

[۱] دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران. [۱] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: *استرپتوکوک‌ها باکتری‌های گرم مثبت و بی‌هوازی هستند که به صورت زنجیره به دنبال هم قرار گرفته و از منابع متفاوت جدا می‌شوند. پروتئین speA یکی از فراورده‌های میکروبی است که از منابع مختلفی از جمله استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه قابل استخراج است. پسوریازیس یک بیماری شایع، مزمن و عود کننده است که به خصوص در مراحل پیشرفته می‌تواند باعث عوارض متعدد جسمی و روحی در فرد بیمار گردد. این مطالعه به منظور جداسازی، کلونینگ و بیان سوپر آنتی ژن SPE استرپتوکوک دیس گالاکتیه با روش SDS page در بیماران مبتلا به پسوریازیس انجام شد.*

روش بررسی: *این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی روی ۶۰ نفر (۲۶ مرد و ۳۴ زن) مراجعه کننده به آزمایشگاه تشخیص طبی (۲۷ نفر دارای پسوریازیس ناشی از عامل استرپتوکوک دیس گالاکتیه و ۳۳ نفر غیرمبتلا) طی سال ۱۴۰۰ انجام شد. استرپتوکوک دیس گالاکتیه توسط آزمون‌های مختلف، تعیین هویت و جداسازی گردید. ژن speA توسط روش کلونینگ T-A با استفاده از وکتور PTG-19 در درون میزبان اشریشیاکلی Xl1 blue کلون گردید. بیان ژن کلون شده در کلونی‌های نوترکیب توسط روش SDS-PAGE بررسی شد.*

یافته‌ها: *بررسی کلونی‌های نوترکیب وجود ژن speA را به اثبات رساند. بیان ژن speA در اشریشیاکلی X11 blue توسط روش SDS-PAGE به اثبات رسید.*

نتیجه‌گیری: *سوپرآنتی‌ژن speA باکتری استرپتوکوک دیس گالاکتیه می‌تواند توسط روش T-A کلونینگ با استفاده از وکتور PTG-19 در درون میزبان اشریشیاکلی Xl1 blue به خوبی بیان و تخلیص شده و به عنوان کاندید واکسن بیماری پسوریازیس مورد کارآزمایی‌های مناسب قرار گیرد. روش‌های مبتنی بر میکروب و تولید باکتری‌های نوترکیب روش‌هایی مقرون به صرفه برای تولید پروتئین‌ها با رویکرد اهداف درمانی و واکسیناسیون هستند.*

واژه‌های کلیدی: *استرپتوکوک دیس گالاکتیه ، اشریشیاکلی ، ژن speA ، کلونینگ ، سوپر آنتی‌ژن ، SDS-PAGE*

* نویسنده مسؤول: دکتر کیومرث امینی ، پست الکترونیکی dr_kumarss_amini@yahoo.com

نشانی: ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، گروه میکروبیولوژی، تلفن ۰۸۷-۳۴۴۵۸۰۱۱

وصول ۱۳۹۹/۱۲/۲۷ اصلاح نهایی ۱۴۰۱/۳/۲۲ پذیرش ۱۴۰۱/۴/۲۸ انتشار ۱۴۰۱/۷/۲۵

مقدمه

استرپتوکوک جنس مهمی از باکتری‌های کوکسی بی‌هوازی، گرم مثبت، کاتالاز منفی و اسیدلاکتیکی است. این جنس پاتوژن انسان بوده، بیش از ۶۰۰ میلیون عفونت در سراسر جهان ایجاد می‌نماید و عامل بیش از ۵۰۰ هزار مرگ و میر در سال است.[۱] عفونت‌های خفیف پوست و مخاط، بیماری‌های فارنژیت *استرپتوکوکی* (گلودرد چرکی)، منتژیت، پنومونی، اندوکاردیت و نکروزان (قانقاریا) توسط این باکتری ایجاد می‌گردد. *استرپتوکوک دیس گالاکتیه* که از *استرپتوکوک‌های* گروه C است؛ عامل پنومونی و منتژیت در نوزادان و گاهی اوقات باکتریمی (عفونت خون) در افراد سالخورده است.[۲] به نظر می‌رسد سوپر آنتی‌ژن‌ها و توکسین‌های پروتئولایتیک، با ایجاد آسیب فیزیکی مستقیم در سد حفاظتی پوست و هم از طریق تحریک مستقیم لنفوسیت‌های فعال شده ساکن پوست، می‌توانند سبب القای التهاب پوستی و بیماری پسوریازیس شوند.[۳]

سوپرآنتی‌ژن‌های اگزوتوکسینی استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه که توسط ژن‌های *spe* تولید می‌شوند؛ عوارض زیادی را در بدن فرد ایجاد می‌نمایند. اگزوتوکسین تب‌زای استرپتوکوکی محصول ژن *speA*، قادر به تحریک لنفوسیت T از طریق اتصال به زنجیره بتا رسپتورهای این سلول‌ها بوده و باعث القاء بیان رسپتورهای مورد نیاز سلول‌های T جهت ورود این سلول‌ها به سلول‌های پوست می‌شود.[۴و۵]

پسوریازیس یک بیماری شایع، مزمن و عود کننده است که با پلاک‌های مدور، اریتماتو و پوسته‌دار مشخص می‌شود. این بیماری علاوه بر آن که بر ظاهر بیمار تاثیر داشته و بیمار را دچار ناراحتی و اختلالات روحی می‌کند؛ در مراحل پیشرفته منجر به درد مفاصل و تورم آنها خواهد گردید. ژنتیک در ابتلا به پسوریازیس پیچیده است و فرد حتی در صورت عدم وجود سابقه فامیلی، ممکن است به این بیماری دچار شود. یک رویداد محرک ممکن است باعث تغییر در سیستم ایمنی بدن و در نتیجه شروع علایم پسوریازیس شود. محرک‌های رایج پسوریازیس عبارت از استرس، بیماری (به ویژه عفونت‌های استرپتوکوکی)، آسیب به پوست و برخی داروها هستند. سوپرآنتی‌ژن‌ها و توکسین‌های پروتئولایتیک می‌توانند سبب القای التهاب پوستی و بیماری پسوریازیس شوند. سوپرآنتی‌ژن‌های اگزوتوکسینی استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه که توسط ژن‌های *spe* تولید می‌شوند؛ قادر به تحریک لنفوسیت‌های T بوده و حضور این باکتری‌ها در پوست ایجاد بیماری می‌کنند.[۶-۸]

در پسوریازیس سلول‌های پوست هر ۵–۳ روز به جای معمول ۳۰–۲۸ روز جایگزین می‌شوند. این تغییرات از رشد سریع کراتینوسیت ناشی از التهاب پی‌درپی در لایه درم توسط سلول‌های دندریتیک، ماکروفاژها و لنفوسیت‌های T به وجود می‌آید. این سلول‌های ایمنی با ترشح هورمون‌های ایجادکننده التهاب (سایتوکاین) مانند عامل نکروز توموری آلفا، اینترلوکین بتا، اینترلوکین ۶ و اینترلوکین ۲۲ منجر به حرکت سلول‌های درم به اپیدرم شده و نیز سلول‌های کراتینوسیت را به تکثیر تحریک می‌کنند. یک فرضیه این است که پسوریازیس، نقص در گلبول‌های سفید T و در سایتوکین نظارتی اینترلوکین ۱۰ است.[۹و۱۰]

نقش عفونت‌ها و میکروب‌ها در پسوریازیس اینگونه است که می‌تواند سیستم ایمنی بدن را تحت تأثیر خود قرار دهد و در فرآیند تشدید بیماری پسوریازیس تأثیر گذارد. به‌طور خاص، عفونت استرپتوکوکی (گلودرد) با پسوریازیس خالدار در کودکان همراه است. شعله‌ور شدن پسوریازیس بعد از یک گوش درد، برونشیت، التهاب لوزه‌ها یا عفونت‌های تنفسی بیش از حد تجربه می‌شود. پسوریازیس ممکن است با احاطه و تسلط پوست یا روده توسط استافیلوکوکوس اورئوس، مالاسزیا و کاندیدا آلبیکنس بدتر شود. نرخ ابتلا پسوریازیس در افراد HIV مثبت مانند افراد HIV منفی است. با این حال پسوریازیس در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی گرایش به شدت بیشتر دارد. تحقیقات اولیه نشان داده است که آنتی‌اکسیدان‌ها مانند پلی‌فنول‌ها ممکن است اثرات مفیدی در مشخصه التهاب داشته باشند.[۱۱]

با توجه به ماهیت چندعاملی بیماری پسوریازیس، بهترین رویکردهای درمانی برای این بیماران، حذف موثرترین عوامل دخیل در بیماری است. بنابراین ایجاد مقاومت در ابتلا به عفونت از طریق تولید واکسن نیز می‌تواند یکی از عوامل خطر بیماری را حذف نماید. پروتئین تولید شده توسط ژن *spe* می‌تواند در تولید واکسن به‌کار رود. این مطالعه به منظور جداسازی، کلونینگ و بیان سوپر آنتی ژن *SPE/استرپتوکوک دیس گالاکتیه* با روش SDS page در بیماران مبتلا به پسوریازیس انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی روی ۶۰ نفر (۲۶ مرد و ۳۴ زن) مراجعه کننده به آزمایشگاه تشخیص طبی (۲۷ نفر دارای پسوریازیس ناشی از عامل *استرپتوکوک دیس گالاکتیه* و ۳۳ نفر غیرمبتلا) طی سال ۱۴۰۰ انجام شد. بیماران پس از معاینه توسط متخصص پوست وارد مطالعه شدند.

مطالعه مورد تایید دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه قرار گرفت. از بیماران رضایت‌نامه کتبی آگاهانه شرکت در مطالعه اخذ شد. انتخاب نمونه‌ها به صورت تصادفی و تنها مشروط به عدم مصرف آنتی‌بیوتیک طی دو هفته منتهی به مطالعه حاضر انجام گردید. نمونه‌برداری از محل ضایعات موجود در سطح پوست بیماران انجام شد. از تست‌های CAMP و هیدرولیز هیپورات سدیم برای تشخیص *استرپتوکوک دیس گالاکتیه* استفاده شد.[۱۲]

درجه شدت بیماری برحسب سیستم امتیازدهی PASI (اندکس شدت سطح درگیری پسوریازیس) تعیین شد. به طوری که کمتر از ۷/۵ خفیف، بین ۷/۵ تا ۱۲/۵ متوسط و بیش از ۱۲/۵ شدید در نظر گرفته شد.

تعیین هویت جدایه‌های باکتریایی مشکوک به استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه: تست‌های تکمیلی بیوشیمیایی از جمله تست کاتالاز و رنگ گرم و نیز تست‌های CAMP و هیدرولیز هیپورات سدیم و تاثیر صفرا بر باکتری برای تشخیص *استرپتوکوک دیس گالاکتیه* استفاده شد (جدول یک).

کلون کردن ژن *speA* در باکتری *اشریشیاکلی*

واکنش PCR: استخراج DNA باکتری توسط کیت استخراج ذخایر مرکز ژنتیک ایران انجام گردید. محصولات استخراج بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شده سپس واکنش زنجیره پلیمراز با استفاده از پرایمرهای ژن *speA* (جدول ۲) انجام گردید. واکنش از ترکیب ۱۰ میکرولیتر مستر میکس (Amplicon)، ۴ میکرولیتر DNA، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای F و R و در حجم ۲۰ میکرولیتر و طبق برنامه دمایی دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ دور تکثیر در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به انجام رسید. محصول PCR یک قطعه ۵۷۶ جفت بازی است که بر روی آگارز ۲ درصد مشاهده

جدول ۱ : تست‌های بیوشیمیایی تفریقی مورد استفاده برای تشخیص استرپتوکوک دیس گالاکتیه

نام باکتری	گروه لانسفیلد	اینولین	لاکتوز	مانیتول	سالیسین	ترهالوز	سدیم هیپورات	هیدرولیز اسکوالین	CAMP
اس. آگالاکتیه	B	–	+	–	(+)	+	+	–	+
اس.دیس گالاکتیه	C	–	+	–	–	+	–	–	–

جدول ۲ : پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر ژن *speA*

نام پرایمر	Primer Sequence	طول باند (نوکلئوتید)
speA F	5'-AGGTAGACTTCAATTTGGCTTGTGT-3'	۵۷۶
speA R	5'-GGGTGACCCTGTTACTCACG-3'	
M13	5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'	

جدول ۳ : میزان Ct نمونه‌های قابل قبول در انجام تست

speA –treat S2 = ۱۹/۱۴	*speA* –treat S1 = ۱۸/۲۶	*speA* –non treat S1 = ۱۷/۸۹	۱۶ S –treat 1 = ۱۵/۲۲	۱۶ S-non treat 1 = ۱۴/۹۸
speA –treat S2 = ۱۹/۱۸	*speA* –treat S1 = ۱۷/۲۹	*speA* –non treat S1 = ۱۶/۹۴	۱۶ S –treat 2 = ۱۴/۲۸	۱۶ S-non treat 2 = ۱۵/۰۲

گردید. یکی از محصولات PCR جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer ارسال شد.

TA Cloning : محصولات PCR حاصل از مرحله قبل توسط کیت تخلیص محصول PCR (Bioneer, Korea) جدا و خالص شده، سپس به منظور انجام کلونینگ از کیت PCR TA-Cloning شرکت سیناژن استفاده گردید. وکتور PTG19-T (سیناکلون) به عنوان ناقل، BamH1 به عنوان آنزیم محدودگر و باکتری *E.Coli* سویه *Xl1 blue* به عنوان میزبان به کار گرفته شد. غربالگری ورود وکتور به میزبان توسط محیط دارای آمپی‌سیلین و شناسایی باکتری‌های نوترکیب توسط غربالگری سفید-آبی در محیط IPTG-XGAL انجام شد. SDS-PAGE یک روش کم هزینه، سریع و تکرارپذیر در مطالعه پروتئین‌ها است. این روش برای بررسی مراحل خالص‌سازی، محاسبه مقدار نسبی و تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها و پپتیدها به‌کار می‌رود. با انجام روش بلاتینگ بعد از آن، امکان بررسی آنتی‌ژنسیته یا تعیین توالی پروتئین‌ها و پلی‌پپتیدها فراهم شد. قابلیت تفکیک کنندگی بسیار بالای روش SDS-PAGE عمدتاً ناشی از وجود سدیم دودسیل سولفات (SDS) و ویژگی مناسب ژل پلی آکریلامید در غربال پروتئین‌های مختلف است. SDS با اتصال به پروتئین‌ها بار طبیعی آنها را می‌پوشاند و بار منفی با تراکم تقریباً مشابهی در این مولکول ظاهر می‌نماید. جداسازی پروتئین‌های در این شرایط وابسته به اندازه منافذ ژل حرکت پروتئین‌های کوچک‌تر با مزاحمت کمتر و حرکت پروتئین‌ها در پایان الکتروفورز با وزن مولکولی آنها تناسب دارد. تایید حضور ژن *speA* درون کلونی‌های سفید توسط تعیین توالی ناحیه با پرایمرهای ژن *speA* و نیز پرایمر T7 و نیز هضم آنزیمی به انجام رسید. پس از فراهم سازی شرایط بیان ژن ترانسفورم شده، بیان آن توسط روش SDS page مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین کمی بیان ژن *speA* قبل و بعد از مجاورت با غلظت‌های موردنظر نانولیپونیوزوم با استفاده از روش Real-time PCR انجام شد. کمیت سنجی، با استفاده از آنالیز نتایج با روش ΔΔCT و گرفتن Folding change انجام شد.

میزان Ct نمونه‌های قابل قبول در انجام تست، در جدول ۳ آمده است.

یافته‌ها

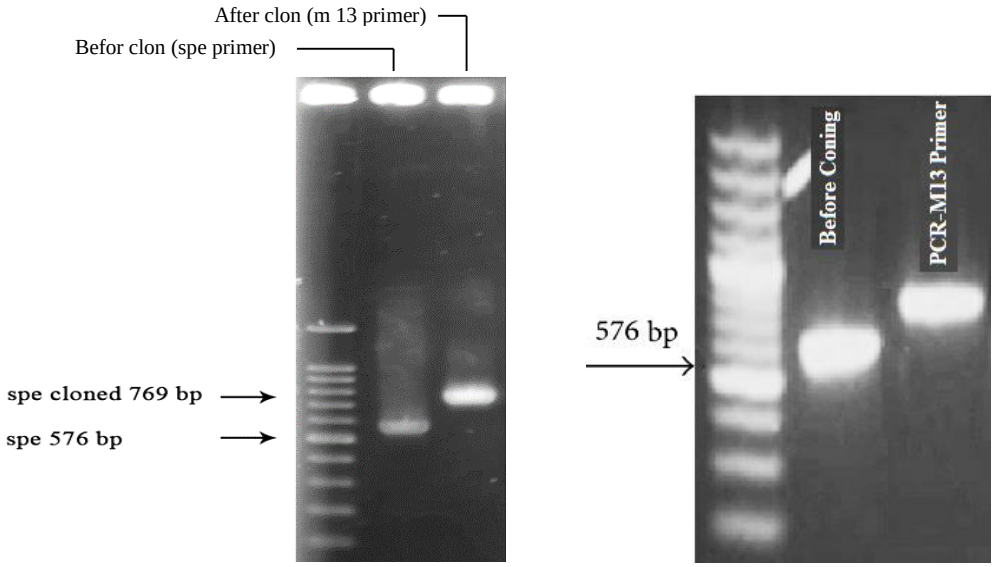
۷۲ درصد از گروه مبتلا به پسوریازیس (گروه خفیف ۶۳درصد، متوسط ۲۲ درصد، شدید ۱۵ درصد) دارای سابقه خانوادگی بیماری پسوریازیس بودند. میانگین درجه شدت بیماری برحسب سیستم امتیازدهی PASI در بیماران مورد مطالعه ۱۴/۰۶۴ تعیین شد. فراوانی بیماران مبتلا به پسوریازیس در جدول ۴ آمده است.

جدول ۴ : میزان فراوانی بیماران مبتلا به پسوریازیس

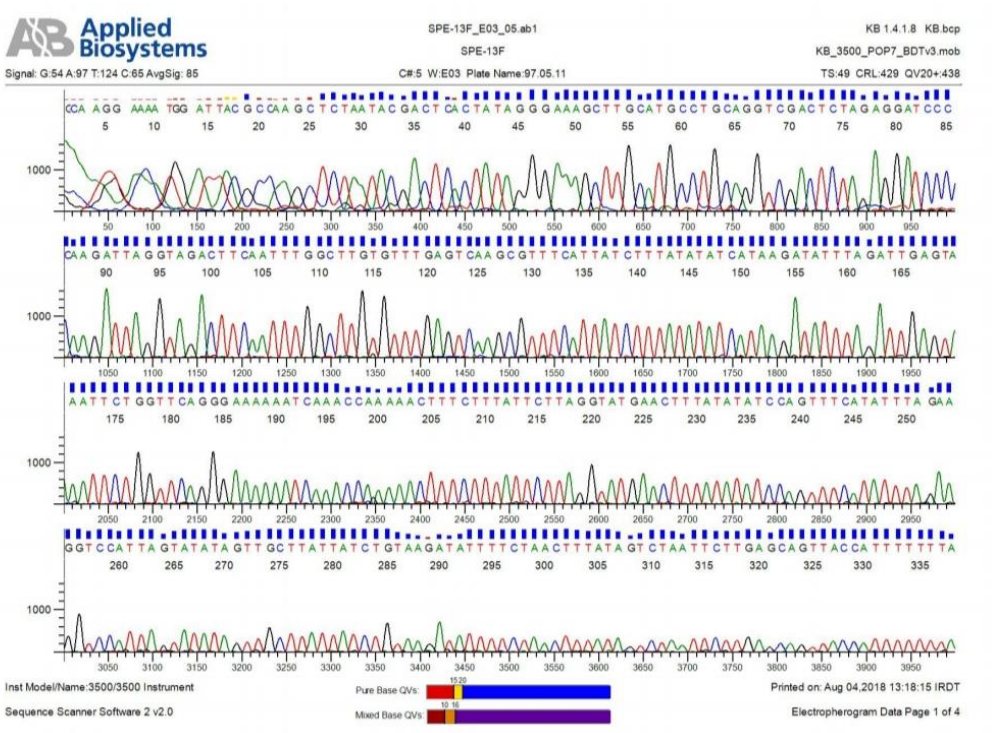
شدت بیماری	تعداد بیماران (درصد)	درصد تجمعی
خفیف	۱۷ (۶۳)	۶۳
متوسط	۶ (۲۲)	۸۵
شدید	۴ (۱۵)	۱۰۰
جمع کل	۲۷ (۱۰۰)	–

جداسازی و تعیین هویت استرپتوکوکوس دیس آگالاکتیه: از تعداد ۶۰ نمونه اخذ شده، ۵۴ مورد گونه دیس آگالاکتیه جدا گردید. این باکتری گرم مثبت، کاتالاز و اکسیداز منفی که تست‌های CAMP در آنها منفی و هیدرولیز هیپورات سدیم نیز در آنها منفی بود؛ توسط تاثیر صفرا هیدرولیز شدند و به عنوان باکتری‌های استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه انتخاب شدند.

واکنش PCR: نتیجه الکتروفورز محصولات PCR ژن *speA* در شکل یک و نتیجه تعیین توالی این قطعات در شکل ۲ آمده است.



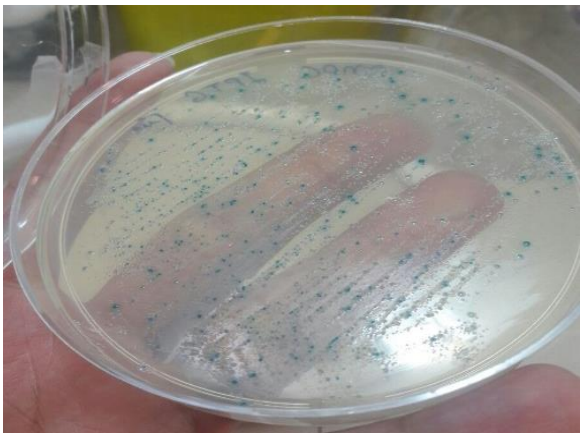
شکل ۱ : الکتروفورز محصول PCR قبل از انجام کلونینگ (چاهک اول چپ)، محصول PCR با پرایمر M13 بعد از انجام کلونینگ(چاهک دوم چپ)، محصولات PCR



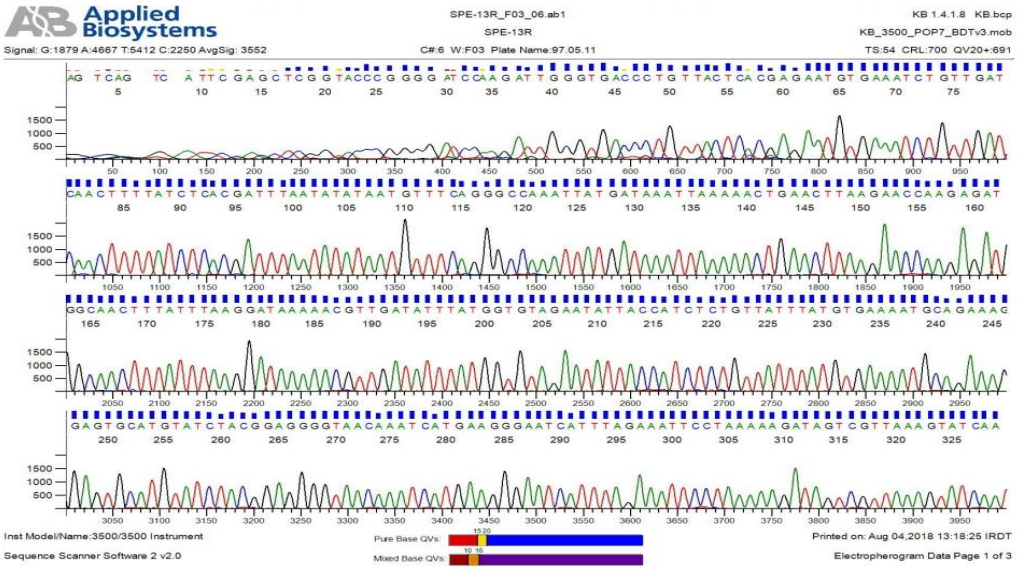
شکل ۲ : توالی تایید شده برای محصول PCR ژن *speA*

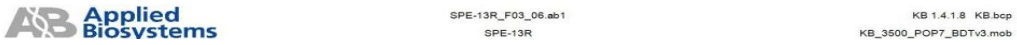
تولید کلون‌های نوترکیب در T-A Cloning: محیط کشت دارای کلونی‌های سفید و آبی در شکل ۳ نشان داده شده است. کلونی‌های نوترکیب سفید برای مراحل بعد جمع‌آوری شدند. همچنین توسط پرایمرهای M13، PCR انجام شد و اختلاف اندازه محصول PCR قبل و بعد از کلونینگ معین گردید (شکل یک). همان‌طور که در شکل ۴ مشخص است؛ قطعه ژنی *speA* در وکتور وارد شده است. بررسی داده‌های حاصل از توالی‌یابی قطعه کلون شده در وکتور و قیاس آن با توالی مرجع به دست آمده از بانک اطلاعاتی NCBI موفقیت آمیز بودن کلون این ژن و توالی صحیح آن را تایید نمود (شکل ۴).

بررسی بیان ژن *speA*: محصولات پروتئینی حاصل از بیان ژن *speA* بر روی ژل SDS- PAGE با غلظت ۱۲ درصد در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۳ : کلونی‌های آبی و سفید حاصل از کلون سازی ژن *speA*



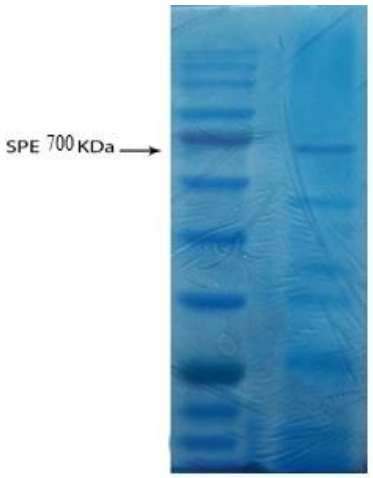


شکل ۴ : توالی تایید شده برای قطعه کلون شده ژن *spe*

بحث

در این مطالعه از ۶۰ نمونه اخذ شده ۵۴ مورد گونه دیس‌آگالاکتیه جدا شد. محصولات پروتئینی حاصل از بیان ژن speA بر روی ژل SDS- PAGE با غلظت ۱۲ درصد به‌دست آمد.

با درنظر گرفتن شیوع نسبتاً زیاد و نبود درمان قطعی برای بیماران پسوریازیس ارزیابی و شناسایی شاخص بیولوژیک برای فعالیت و عوامل پیش‌آگهی دهنده موثر و کم‌هزینه از اولویت‌های این بیماری است. شیوع بیماری پسوریازیس در جهان بسته به منطقه زندگی فرد بین ۰/۸ تا ۸ درصد متغیر است. از عوامل محیطی که در ایجاد یا پیشرفت پسوریازیس نقش دارند؛ می‌توان به عفونت با میکروارگانیسم‌ها اشاره نمود. نقش عوامل میکروبی در شروع پسوریازیس حدود یک قرن پیش مطرح شد.[۱۳و۱۴] از جمله عوامل



شکل ۵ : ارزیابی بیان پروتئین *spe* در ژل ۱۲٪ SDS-PAGE رنگ آمیزی با کماسی بلو

میکروبی متعدد عامل این بیماری، استرپتوکوکوس‌ها هستند. شواهد قوی مبنی بر القای پسوریازیس قطره‌ای به دنبال عفونت گلو با استرپتوکوکوس وجود دارد. باکتری‌ها در پوست، وضعیت‌های بالینی مشخصی را سبب می‌شوند که امروزه با درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب به سادگی قابل کنترل هستند.[۱۵]

نقش سوپر آنتی‌ژن‌ها حداقل در دو مورد در بیماری پسوریازیس مشخص شده است. توکسین‌های اریتروژنیک استرپتوکوکی A، B و C که تحت عنوان اگزوتوکسین‌های استرپتوکوکوس پایوژنزیک هم شناخته می‌شوند؛ دسته‌ای از محصولات خارج سلولی هستند که توسط باکتری‌های استرپتوکوکی ساخته شده و ممکن است درجات شدیدی از عفونت را القاء کنند.[۱۶] سوپر آنتی‌ژن‌ها و توکسین‌های مترشحه از استرپتوکوکوس از طریق اتصال به زنجیره بتا رسپتورهای سلول‌های T می‌توانند باعث القاء بیان رسپتورهای مورد نیاز سلول‌های T برای سکنی گزیدن این سلول در سلول‌های پوست شوند. سوپر آنتی‌ژن‌های رها شده توسط استرپتوکوکوس پایوژنز در لوزه‌ها می‌تواند سلول‌های T درون غدد لنفاوی گلو را تحریک کنند. در نتیجه سلول‌های T می‌توانند در پوست یعنی جایی که فعالیت بیشتری دارند؛ ساکن شوند.[۱۷و۱۸]

در مطالعه Raychaudhury از ۶۰ بیمار مبتلا به پسوریازیس ۸۴ نمونه باکتری استرپتوکوکوس جدا شد و فراوانی انواع متفاوت پروتئین‌های *SPE* در باکتری‌های جداسازی شده بررسی گردید.[۱۹]

در مطالعه Liang و همکاران که روی ۱۱۷ نفر مبتلا به سوریازیس طی سال‌های ۹۶-۱۹۹۴انجام شد؛ عفونت استرپتوکوکی در ۴۹ بیمار (۷۶ درصد) گزارش گردید. عفونت در ۳۳ بیمار (۲۴ درصد) توسط یک عامل پاتوژن و در ۸۶ بیمار (۸۴ درصد) توسط چند عامل پاتوژن ایجاد شده بود. طبق این گزارش، در۴۰ بیمار (۶۴ درصد) عفونت توسط استرپتوکوکوس‌های گروه A یا استافیلوکوکوس‌ها ایجاد شده بود که در این بین ۸۲/۶ درصد عفونت‌ها مربوط به استرپتوکوکوس‌های گروه A بود.[۲۰] با توجه به نتایج مطالعات انجام شده، می‌توان گفت که عفونت‌های میکروبی در بیماران مبتلا به پسوریازیس نقش مهمی دارند. این نتایج این فرض ایمونولوژیکی را که عفونت باکتریایی یک عامل مهم در بروز پسوریازیس است؛ تقویت می‌نماید. محققین احتمال سازمان یافتن یک کمپلکس ایمنی در بافت را در پاسخ به آنتی‌ژن‌های میکروبی مطرح می‌کنند. همچنین در سال‌های اخیر دانشمندان زیادی به نقش سوپر آنتی‌ژن‌ها به عنوان یکی از عوامل مهم در بروز پسوریازیس اشاره کرده‌اند[۲۰] که مطالعه حاضر با نتایج این مطالعات انطباق دارد.

Passàli و همکاران در بررسی ۱۱۲ بیمار پسوریازیس مبتلا به پلاک‌های نکروزه و سندرم شوک سمی، در مجموع ۱۱۷ استرپتوکوکوس پایوژنز را جداسازی و سپس وجود ژن های *speA* و *speC* را مورد مطالعه قرار دادند. آنها فراوانی ژن‌های مذکور را به ترتیب ۸۸ درصد و ۳۸ درصد گزارش نمودند. سپس کلونینگ و بیان ژن‌های مذکور توسط روش SDS-PAGE انجام گردید.[۲۱] دستاورد و روش مطالعه با مطالعه حاضر انطباق دارد.

McCormick و همکاران ۳۸ گونه استرپتوکوکوس را از مبتلایان به سندرم TSLS جدا کرده و درصد وجود ژن‌های مختلف *spe* را در این باکتری‌ها مورد بررسی قرار دادند. همچنین ارتباط این ژن‌ها با افزایش قدرت نفوذ سلول‌های T و ورود آنها به درون پوست را آزمودند.[۲۲] نتایج این بررسی‌ها مؤید نقش عوامل میکروبی در بیماری‌های مختلف پوستی بوده و نیز پیشنهاد می‌کند که اگزوتوکسین‌های باکتریایی جدا شده از استرپتوکوکوس پایوژنز می‌تواند به عنوان سوپر آنتی‌ژن عمل کرده و به افزایش قدرت نفوذ سلول‌های T و مونوسیت‌ها در مبتلایان به پسوریازیس کمک نماید. نتایج این مطالعات[۱۷] با دستاوردهای مطالعه حاضر انطباق دارد.

Norgren و همکاران پس از کلون و بیان کردن ژن *speA*، پروتئین تولید شده را تخلیص کرده و کیفیت آن را بررسی نمودند. این پروتئین‌ها قادرند که برای تولید واکسن مورد استفاده قرار گیرند.[۲۳] در مطالعه حاضر نیز امکان تولید پروتئین *speA* با هدف تولید واکسن مورد بررسی قرار گرفت.

پروتئین *speA*، بیش از دیگر آنتی‌ژن‌های تولید شده توسط باکتری‌های *استرپتوکوک* می‌تواند در مدیریت بیماری و سنجش حساسیت به آلودگی باکتریایی به بیماری مورد استفاده قرار گیرد. همچنین ممکن است هدفی بالقوه برای توسعه واکسن‌ها باشد. روش‌های مبتنی بر میکروب و تولید باکتری‌های نوترکیب روش‌هایی مقرون به صرفه برای تولید پروتئین‌ها برای اهداف درمانی و واکسیناسیون هستند. این طرح برای بیان و جداسازی سوپرآنتی‌ژن موردنظر موفقیت‌آمیز بود. در تحقیقات آینده می‌توان تولید این پروتئین را در مقیاس وسیع‌تر انجام داد. همچنین سایر سوپرآنتی‌ژن‌های *استرپتوکوک* و سایر باکتری‌ها نقش موثر و مستقیمی در پتانسیل ارزیابی و بررسی داشته و می‌توان میزبان‌هایی با توان تولیدی بیشتر به منظور تولید پروتئین و عامل حفاظتی واکسن به کار برد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که سوپرآنتی‌ژن *speA* باکتری *استرپتوکوک دیس گالاکتیه* می‌تواند توسط روش T-A کلونینگ با استفاده از وکتور PTG-19 در درون میزبان *اشریشیاکلی* Xl1 blue به خوبی بیان و تخلیص گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه آقای علی حبادی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته میکربیولوژی (شماره ۱۸۲۳۶۹۵) از

دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه بود. بدین‌وسیله از زحمات کارشناسان و متخصصین آزمایشگاه میکروب‌شناسی پاسارگاد به‌ویژه آقای مهندس مجید صادق‌پور که با راهنمایی‌های ارزنده و گرانقدر خود در پیشبرد این پژوهش با نویسندگان همکاری نمودند؛ نهایت سپاس خود را اعلام می‌داریم. تضاد منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

References

1. Masters EA, Hao SP, Kenney HM, Morita Y, Galloway CA, de Mesy Bentley KL, et al. Distinct vasculotropic versus osteotropic features of S. agalactiae versus S. aureus implant-associated bone infection in mice. J Orthop Res. 2021 Feb; 39(2): 389-401. DOI: 10.1002/jor.24962

2. Tavares GC, de Queiroz GA, Assis GBN, Leibowitz MP, Teixeira JP, Figueiredo HCP, et al. Disease outbreaks in farmed Amazon catfish (Leiarius marmoratus x Pseudoplatystoma corruscans) caused by Streptococcus agalactiae, S. iniae, and S. dysgalactiae. Aquaculture. 2018; 495: 384-92. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.06.027

3. Groot J, Blegvad C, Nybo Andersen AM, Zachariae C, Jarløv JO, Skov L. Presence of streptococci and frequent tonsillitis among adolescents with psoriasis. Br J Dermatol. 2021 Apr; 184(4): 758-59. DOI: 10.1111/bjd.19672

4. Cavaillon JM. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. Toxicon. 2018 Jul; 149: 45-53. DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.10.016

5. González-Abad MJ, Sanz MA. Invasive Streptococcus pyogenes infections (2011–2018): EMM-type and clinical presentation. An Pediatr (Barc). 2020; 92(6): 351-58. DOI: 10.1016/j.anpede.2019.10.006

6. Armstrong AW, Read C. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. JAMA. 2020 May; 323(19): 1945-60. DOI: 10.1001/jama.2020.4006

7. De Jesús-Gil C, Sans-de San Nicolás L, Ruiz-Romeu E, Ferran M, Soria-Martinez L, Chiriac A, et al. Specific IgA and CLA+ T-Cell IL-17 Response to Streptococcus pyogenes in Psoriasis. J Invest Dermatol. 2020 Jul; 140(7): 1364-70.e1. DOI: 10.1016/j.jid.2019.12.022

8. Okada K, Matsushima Y, Mizutani K, Yamanaka K. The Role of Gut Microbiome in Psoriasis: Oral Administration of Staphylococcus aureus and Streptococcus danieliae Exacerbates Skin Inflammation of Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Dermatitis. Int J Mol Sci. 2020 May; 21(9): 3303. DOI: 10.3390/ijms21093303

9. Blauvelt A. IL-6 differs from TNF-α: unpredicted clinical effects caused by IL-6 blockade in psoriasis. Journal of Investigative Dermatology. 2017; 137(3): 541-42. DOI: 10.1016/j.jid.2016.11.022

10. Singh S, Dogra S, Shafiq N, Bhansali A, Malhotra S. Prevalence of Metabolic Syndrome in Psoriasis and Levels of Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor-α in Psoriasis Patients with Metabolic Syndrome: Indian Tertiary Care Hospital Study. Int J Appl Basic Med Res. 2017 Jul-Sep; 7(3): 169-75. DOI: 10.4103/ijabmr.IJABMR_330_16

11. Al-Shibly IK, Al-Sultany HA. Streptococcalsuper antigens and LL-37 antimicrobial peptide as an immune mediatoramong psoriasis patients in Iraq. Annals of Tropical Medicine and Public Health. 2020; 23: 231-811. DOI: 10.36295/ASRO.2020.231811

12. Nazari A, Khalili M B, Astani A, Vakili M, Sadeh M, Mojibiyan M, et al. Determination of Genotypes of Streptococcus Agalactiae Isolated from both Urine and Vagina of Pregnant Women Referred to Gynecology Clinics of Yazd, Iran -2015. International Journal of Medical Laboratory. 2017; 4(3): 180-88.

13. Yamamoto M, Ferretti JJ. High level expression of Streptococcus pyogenes erythrogenic toxin A (SPE A) in Escherichia coli and its rapid purification by HPLC. FEMS Microbiol Lett. 1995 Oct; 132(3): 209-13. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07835.x

14. Molinari G, Chhatwal GS. Streptococcal invasion. Curr Opin Microbiol. 1999 Feb; 2(1): 56-61. DOI: 10.1016/s1369-5274(99)80010-1

15. Hauser AR, Stevens DL, Kaplan EL, Schlievert PM. Molecular analysis of pyrogenic exotoxins from Streptococcus pyogenes isolates associated with toxic shock-like syndrome. J Clin Microbiol. 1991 Aug; 29(8): 1562-67. DOI: 10.1128/jcm.29.8.1562-1567.1991

16. Hung CH, Tsao N, Zeng YF, Lu SL, Chuan CN, Lin YS, et al. Synergistic effects of streptolysin S and streptococcal pyrogenic exotoxin B on the mouse model of group A streptococcal infection. Med Microbiol Immunol. 2012 Aug; 201(3): 357-69. DOI: 10.1007/s00430-012-0241-6

17. Munz OH, Sela S, Baker BS, Griffiths CE, Powles AV, Fry L. Evidence for the presence of bacteria in the blood of psoriasis patients. Arch Dermatol Res. 2010 Sep; 302(7): 495-98. DOI: 10.1007/s00403-010-1065-0

18. Krueger GG. Psoriasis therapy--observational or rational? N Engl J Med. 1993 Jun; 328(25): 1845-46. DOI: 10.1056/NEJM199306243282511

19. Raychaudhury SP. Recent advances in psoriasis: bench to bedside. Indian J Dermatol. 2010 Apr-Jun; 55(2): 150. DOI: 10.4103/0019-5154.62749

20. Liang YS, Wen HQ, Xiao R. [Serum levels of antibodies for IgG, IgA, and IgM against the fungi antigen in psoriasis vulgaris]. Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2003 Dec; 28(6): 638-40. [Article in Chinese]

21. Passàli D, Lauriello M, Passàli GC, Passàli FM, Bellussi L. Group A streptococcus and its antibiotic resistance. Acta Otorhinolaryngol Ital. 2007 Feb; 27(1): 27-32.

22. McCormick JK, Pragman AA, Stolpa JC, Leung DY, Schlievert PM. Functional characterization of streptococcal pyrogenic exotoxin J, a novel superantigen. Infect Immun. 2001 Mar; 69(3): 1381-88. DOI: 10.1128/IAI.69.3.1381-1388.2001

23. Norgren M, Norrby A, Holm SE. Genetic diversity in T1M1 group A streptococci in relation to clinical outcome of infection. J Infect Dis. 1992 Nov; 166(5): 1014-20. DOI: 10.1093/infdis/166.5.1014