بررسی فراوانی و توالی نوکلئوتیدی ژنهای کد کننده فاکتورهای جذب آهن در ایزوله های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از بیماران با عفونت ادراری در ایران

مهری حبیبی[1]، محمدرضا اسدی کرم[1*]

۱- استادیار، بخش بیولوژی ملکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

یافته / دوره بیستم / شماره ۳ / پاییز ۹۷ / مسلسل ۷۷

چکیده

دریافت مقاله: ۹۷/۶/۱۰ پذیرش مقاله: ۹۷/۷/۷

مقدمه: فاکتورهای جذب آهن به عنوان یکی از عوامل بیماریزای اصلی سویه های پروتئوس میرابیلیس عامل عفونت ادراری می باشند. هدف از این مطالعه بررسی شیوع ژنهای جذب آهن و نیز ارزیابی توالی نوکلئوتیدی آنها در ایزوله های پروتئوس میرابیلیس جمع آوری شده از بیماران با عفونت دستگاه ادراری بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۰۰ ایزوله پروتئوس میرابیلیس از نمونه ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری جمع آوری شد. تکثیر ژنهای جذب آهن ***PMI1945***، ***PMI2596***، ***PMI0409***، ***PMI1426***، ***PMI0842*** و ***PMI1425*** در این ایزوله ها با روش **PCR** انجام شد. جهت تعیین توالی ژنهای تکثیر یافته، محصول **PCR** آنها با کیت تخلیص محصول **PCR** از روی ژل تخلیص گردید و سپس برای تعیین توالی ارسال شدند. پس از تعیین توالی، توالی این ژنها با توالی ژنهای موجود در بانک ژن و **Expasy** مقایسه شد.

یافته‌ها: بررسی شیوع این ژنها نشان داد که به ترتیب ۹۰٪، ۲۵٪، ۳۵٪، ۸۵٪، ۷۵٪ و ۵۵ درصد از این ایزوله ها دارای ژنهای ***PMI1945***، ***PMI2596***، ***PMI0409***، ***PMI1426***، ***PMI0842*** و ***PMI1425*** بودند. مقایسه توالی نوکلئوتیدی این ژنها با استفاده از برنامه های آنالیز نشان داد که توالی ژنهای جذب آهن شباهت بالای ۸۰ درصد با ژنهای مشابه ثبت شده در بانک های ژنی دارند.

بحث و نتیجه‌گیری: در این مطالعه مشاهده شد که ژنهای جذب آهن ***PMI1945*** و ***PMI1426*** با داشتن شیوع زیاد در بین ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس و نیز توالی حفظ شده می توانند به عنوان کاندید واکسن جدید علیه عفونتهای ادراری مطرح شوند.

واژه‌های کلیدی: پروتئوس میرابیلیس، فاکتورهای جذب آهن، تعیین توالی.

*آدرس مکاتبه: تهران، میدان پاستور، خیابان ۱۲ فروردین، انستیتو پاستور ایران، بخش بیولوژی ملکولی.

پست الکترونیک: m_asadi12@yahoo.com

مقدمه

عفونت‌های ادراری به عنوان یکی از شایعترین عفونت‌ها در انسان محسوب می‌شوند، به طوری که این عفونت‌ها بعد از عفونت‌های تنفسی در جایگاه دوم قرار دارند. حضور باکتری در دستگاه ادراری سبب عفونت در مثانه شده و در صورت عدم درمان مناسب می تواند منجر به عفونت‌های خطرناکی از جمله درگیری کلیه‌ها شده که آسیب‌های شدید کلیوی و حتی مرگ بیمار را در پی دارد (۳-۱). درمان روتین عفونت‌های ادراری با استفاده از تجویز آنتی بیوتیک‌های مناسب صورت می‌گیرد. افزایش روبه افزون مقاومت به این آنتی بیوتیک‌ها در بین سویه های باکتریایی عامل عفونت ادراری، سبب نگرانی درمان عفونت ادراری در آینده شده است (۴).

پروتئوس میرابیلیس به عنوان یکی از عوامل اصلی عفونت ادراری به ویژه در افراد با نقص ساختاری و عملکردی در دستگاه ادراری محسوب می‌شود. این باکتری همچنین در ایجاد عفونت‌های ادراری وابسته به کاتتر که درصد زیادی از عفونت‌های ادراری بیمارستانی را شامل می شوند نیز نقش مهمی دارد (۶،۵). از خصوصیات اصلی عفونت ادراری ناشی از پروتئوس میرابیلیس تشکیل سنگ‌های ادراری در مثانه و کلیه است که در اثر فعالیت آنزیم اوره از این سویه‌ها تشکیل می‌شود (۷). با توجه به شیوع قابل توجه عفونت ادراری توسط سویه‌های پروتئوس میرابیلیس به خصوص در بین افراد بستری در بیمارستان‌ها و اینکه سویه‌های پروتئوس میرابیلیس مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها در حال افزایش هستند، نیاز به روش‌های درمانی جدید برای پیشگیری و یا درمان عفونت‌های ادراری ناشی از پروتئوس میرابیلیس احساس می‌شود (۹،۸). در سال‌های اخیر محققین تلاش‌هایی را برای ساخت واکسن علیه عفونت‌های ادراری ناشی از پروتئوس میرابیلیس انجام داده‌اند که تاکنون به نتایج قابل توجهی دست نیافته‌اند. بنابراین با توجه به اینکه تاکنون واکسن موثری علیه عفونت ادراری ناشی از پروتئوس میرابیلیس برای استفاده در انسان به بازار وارد نشده است، تحقیقات در زمینه آنتی ژن‌ها و ادجوانت‌های جدید برای دستیابی به موثرترین و سالم‌ترین ترکیبات واکسنی ملزم به نظر می‌رسد (۱۰،۹).

پروتئوس میرابیلیس برای بیماریزایی از فاکتورهای بیماریزای متعددی استفاده می‌نماید که از مهمترین آنها می‌توان به فاکتورهای جذب آهن اشاره کرد (۹،۷). مطالعات نشان داده که محیط ادراری محدودیت زیادی از لحاظ آهن برای باکتری‌های عامل عفونت ادراری داشته و این سویه‌ها برای جذب آهن دارای ژنهای جذب آهن متعددی می‌باشند. در مطالعات مختلف اهمیت این فاکتورهای جذب آهن در بیماریزایی سویه‌های پروتئوس میرابیلیس نشان داده شده است (۱۲،۱۱). بررسی‌های انجام شده نشان داده که بیان ژنهای جذب آهن به خصوص ژنهای *PMI1945*، *PMI2596* و *PMI0842* در طول عفونت ادراری با پروتئوس میرابلیس در زنان بسیار بالا بوده و در ضمن نقش مهمی در ایجاد عفونت ادراری داشته‌اند. از طرف دیگر فاکتورهای جذب آهن در سطح باکتری عرضه می‌شوند و شیوع آنها در بین سویه‌های با قدرت بیماریزایی بالا به اثبات رسیده است (۱۱). بنابراین این عوامل می‌توانند به عنوان اهداف جدیدی برای طراحی واکسن علیه سویه‌های پروتئوس میرابیلیس مطرح شوند.

با توجه به اینکه تاکنون مطالعات جامعی در ارتباط با بررسی ژنوتیپی فاکتورهای جذب آهن PMI1945، PMI2596، PMI0409، PMI1426، PMI0842 و PMI1425 در سویه‌های پروتئوس میرابیلیس انجام نشده است ما در اولین گام از این پروژه، شیوع و توالی نوکلئوتیدی این ژنهای جذب آهن را در ۱۰۰ ایزوله پروتئوس میرابیلیس جدا شده از بیماران با عفونت ادراری در ایران بررسی کرده و سپس در مراحل بعدی ارزیابی کارایی آنها به عنوان کاندیدای واکسن انجام شود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه کشت ادراری از بیماران مبتلا به عفونت ادراری از چندین بیمارستان شهر تهران در فاصله زمانی تیرماه تا مهرماه ۱۳۹۶جمع آوری شد. نمونه ادرار این بیماران در آزمایشگاه‌های مربوطه به عنوان عفونت ادراری با عاملیت پروتئوس میرابیلیس گزارش شده بود. تشخیص این عفونت‌ها بر مبنای معیارهای بالینی و آزمایشگاهی مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (CDC) صورت گرفت که برخی از این معیارها شامل دمای بالای ۳۸°C، نیاز به دفع شدید ادرار، تکرر ادرار، ادرار همراه با سوزش، تخلیه ناکامل ادرار، درد ناحیه سوپراپوبیک و درد پهلوها، حضور لکوسیت و یا خون در ادرار و در نهایت یک کشت مثبت با تعداد کلنی≤ ۱۰^{5}cfu/ml بود. اگر چه ایزوله‌های جمع‌آوری شده به عنوان پروتئوس میرابیلیس تشخیص داده شده بودند ولی برای اطمینان و تأیید آنها، مجدداً تست‌های تشخیصی مربوط به پروتئوس میرابیلیس شامل کشت در محیط‌های افتراقی، رنگ‌آمیزی گرم، انجام تست‌های بیوشیمیایی افتراقی مانند رشد در محیط TSI، رشد در محیط Motility، تولید گاز و H_2S، تولید اندول، رشد در محیط MR/VP، تست سیمون سیترات و احیای اسیدهای آمینه انجام شد تا حضور پروتئوس میرابیلیس در این نمونه‌ها تایید شود.

برای تخلیص ژنوم ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس تایید شده از روش فنل- کلروفرم استفاده شد. به طور خلاصه رسوب گرفته شده از کشت باکتری در لیزوزیم (۵ mg/ml) حل گردید و سپس EDTA نیم مولار و محلول SDS 10% به آن اضافه گردید. سپس RNase (۲۰ mg/ml) به آن افزوده و به آرامی مخلوط و در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. در مرحله بعد به آن محلول پروتییناز K (۲۰ mg/ml) افزوده و به مدت یک شبانه روز انکوبه گردید. سپس مخلوط فنل و کلروفرم به آن افزوده و بعد از تکان دادن در دور بالا سانتریفوژ و محلول رویی به آرامی جمع آوری شد. سپس اتانول سرد ۹۶٪ به آن افزوده و بعد از سانتریفوژ کردن، رسوب با اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد خشک و در بافر TE 1x حل گردید. در نهایت غلظت و کیفیت تخلیص انجام شده توسط الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱٪ و نیز اندازه‌گیری با استفاده از دستگاه نانو دراپ مورد بررسی قرار گرفت.

برای تکثیر ژنهای *PMI1945*، *PMI2596*، *PMI0409*، *PMI1426*، *PMI0842* و *PMI1425* در ژنوم تخلیص شده پروتئوس میرابیلیس، در ابتدا پرایمرهای مورد نظر برای تکثیر آنها توسط نرم افزارهایی مانند Vector NTI، Gene Runner و CLC در این مطالعه طراحی شد (جدول ۱).

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژنهای مختلف جذب آهن

شماره	نام پرایمر	توالی پرایمر (۵′ به ۳′)
۱	PMI1426-For	ATGTCTCAATCATCGCGATG
۲	PMI1426-Rev	CCATTGATAACTCACCAG
۳	PMI1425-For	ATGGATATTAATGGTATGTC
۴	PMI1425-Rev	CCAGCGATAACTGACAGAC
۵	PMI0409-For	ATGATAATAATTATCATTAACATG
۶	PMI0409-Rev	AAAACTTTTAACCACAG
۷	PMI0842-For	ATGGTAGTGTTAAAGAAA
۸	PMI0842-Rev	GAAGTTGTAGTTTAATCCG
۹	PMI2596-For	ATGGAAAATAAAGGAAC
۱۰	PMI2596-Rev	AAAGTTAATACTTCCCTG
۱۱	PMI1945-For	ATGAAATTTAAAATAAGTGC
۱۲	PMI1945-Rev	AAAACTATATTTGATATTTGC

سپس تکثیر این ژنها با تهیه مخلوط PCR مختلف (جدول ۲) و بر اساس برنامه‌های بهینه شده از جمله بهینه سازی واکنش PCR در دماهای اتصال مختلف انجام شد.

جدول ۲. تهیه مخلوط PCR جهت تکثیر ژنهای جذب آهن

مواد واکنش	مقدار بر حسب میکرولیتر	غلظت
10x PCR Buffer	۵	-
dNTP	۲	25 mM/ µl
For. Primer	۲	10 pmol/ µl
Rev. Primer	۲	10 pmol/ µl
Mgso4	۱	50 mM/ µl
Template	۲	50 ng/ µl
Pfu enzyme	۱	1 u/ µl
DDW	به اندازه ۵۰ میکرولیتر	-

برنامه بهینه شده مورد استفاده در جدول ۳ آمده است که در آن تکثیر ژنها با استفاده از آنزیم *pfu* DNA Polymerase انجام و مراحل دناچوره تا گسترش در ۳۰ سیکل انجام گرفت.

جدول ۳. برنامه بهینه شده جهت تکثیر ژنهای جذب آهن با روش PCR

مراحل	دما (درجه سانتی گراد)	زمان (دقیقه)
دناچوره اولیه	۹۴	۵ دقیقه
دناچوره	۹۴	۱ دقیقه
اتصال	۵۵ تا ۵۹	۱ دقیقه
گسترش	۷۲	۱ دقیقه
گسترش نهایی	۷۲	۵ دقیقه

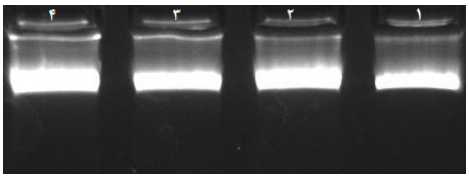
در تمامی واکنش‌های PCR، پروتئوس میرابیلیس HI4320 به عنوان کنترل مثبت و *E. coli* K12 به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. بعد از انجام مراحل PCR، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR در کنار مارکر 1kb روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید و سپس بررسی باندهای مربوط به هر کدام از ژنها در دستگاه ژل داک انجام گرفت.

جهت تعیین توالی ژنهای تکثیر یافته، محصول PCR آنها با کیت تخلیص محصول PCR (CoreBio™ Gel extraction kit) (Fermentas) از روی ژل تخلیص گردید و سپس برای تعیین توالی به شرکت ژن فن آوران ایران ارسال شد تا با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده تعیین توالی آنها انجام شود. پس از تعیین ژنهای *PMI1945*، *PMI2596*، *PMI0409*، *PMI1426*، *PMI0842* و *PMI1425* در ۵ تا از ایزوله‌های مورد مطالعه، توالی این ژنها با توالی ژنهای جذب آهن موجود در بانک ژن (GenBank) و Expasy با استفاده از برنامه‌های آنلاین BLAST (www.ncbi.nih.gov) و ClastalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2) مقایسه شد.

یافته‌ها

پس از مشاهده سوارمینگ در بلاد آگار و کلنی‌های لاکتوز منفی در مک کانکی و در نهایت با استفاده از تست‌های تکمیلی بیوشیمیایی (Indol-،MR+،VP-، Citrate+، motility+، H_2S+ و Alk/Acid) ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس تایید شده و به عنوان نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه انتخاب گردیدند.

تخلیص ژنومی ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس با روش فنل کلروفرم انجام شد و نتایج الکتروفورز آنها بر روی ژل آگارز ۱٪ نشان داد که نمونه‌ها از غلظت و کیفیت مناسبی برخوردار هستند. نتایج الکتروفورز چندین نمونه تخلیص ژنومی روی ژل آگاروز ۱٪ در شکل ۱ نشان داده شده است.



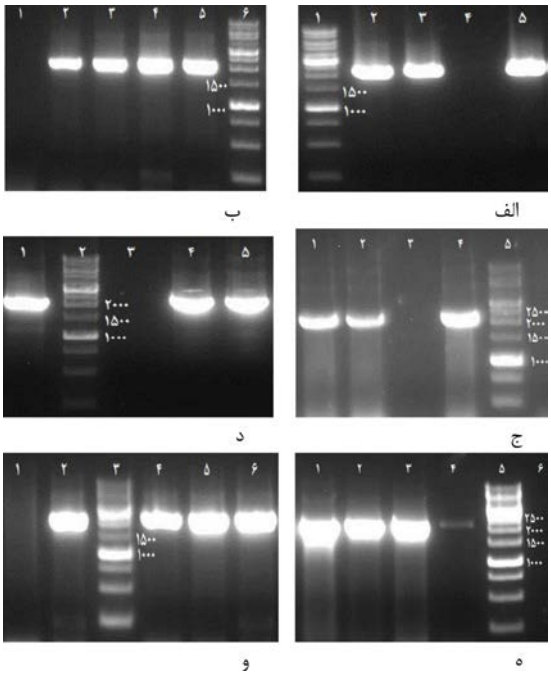
شکل ۱. تصویر تخلیص ژنهای جذب آهن. در این شکل تخلیص چندین نمونه تخلیص ژنوم با روش فنل کلروفرم آمده است که شماره‌های ۱ تا ۴ مربوط به تخلیص انجام شده با کیفیت و خلوص بالا می باشد.

همچنین با استفاده از اسپکتروفتومتری ماوراء بنفش، درجه خلوص و غلظت DNA موجود در ایزوله‌ها تعیین گردید که همگی از درجه خلوص و غلظت مناسبی برخوردار بوده (OD260/OD280~1.8) و برای مرحله PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

تکثیر ژنهای *PMI1945*، *PMI2596*، *PMI0409*، *PMI1426*، *PMI0842* و *PMI1425* در ایزوله‌های

پروتئوس میرابیلیس با پرایمرهای طراحی شده برای ابتدا و انتهای این ژنها با برنامه PCR بهینه شده انجام گرفت که در نهایت تکثیر ژنهای *PMI1945*، *PMI2596*، *PMI0409*، *PMI1426*، *PMI0842* و *PMI1425* در دماهای اتصال ۵۵، ۵۹، ۵۷، ۶۱، ۵۷ و ۶۲ درجه سانتی-گراد انجام گرفت.

بررسی میزان شیوع این ژنها در بین ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس نشان داد که به ترتیب ۹۰٪، ۲۵٪، ۳۵٪، ۸۵٪، ۷۵٪ و ۵۵ درصد از این ایزوله‌ها دارای ژنهای *PMI1945*، *PMI2596*، *PMI0409*، *PMI1426*، *PMI0842* و *PMI1425* بودند. نتایج تکثیر این ژنها در ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس در شکل ۲ آمده است.



شکل ۲. تصاویر الکتروفورز ژنها روی ژل آگاروز. الف) ژن PMI1945 (شماره ۱ مارکر 1kb، شماره ۲ کنترل مثبت پروتئوس میرابیلیس HI4320 ، شماره ۳ و ۵ نمونه مثبت و شماره ۴ کنترل منفی *E. coli* K12. ب) ژن PMI2596 (شماره ۱ کنترل منفی *E. coli* K12، شماره ۵ کنترل مثبت پروتئوس میرابیلیس HI4320، شماره ۲ تا ۴ نمونه مثبت و شماره ۶ مارکر 1kb. ج) ژن PMI0409 (شماره ۱ و ۲ نمونه مثبت، شماره ۴ کنترل مثبت پروتئوس میرابیلیس HI4320، شماره ۳ کنترل منفی *E. coli* K12 و شماره ۵ مارکر 1kb. د) ژن PMI1426 (شماره ۱ کنترل مثبت پروتئوس میرابیلیس HI4320، شماره ۴ و ۵ نمونه مثبت، شماره ۳ کنترل منفی *E. coli* K12 و شماره ۲ مارکر 1kb. ه) ژن PMI0842 (شماره ۱تا ۳ نمونه مثبت، شماره ۴ کنترل مثبت پروتئوس میرابیلیس HI4320، شماره ۶ کنترل منفی *E. coli* K12 و شماره ۵ مارکر 1kb. و) ژن PMI1425 (شماره ۴ تا ۶ نمونه مثبت، شماره ۲ کنترل مثبت پروتئوس میرابیلیس HI4320، شماره ۱ کنترل منفی *E. coli* K12 و شماره ۳ مارکر 1kb.

همانگونه که در این شکل مشاهده می شود ژنهای *PMI1945*، *PMI2596*، *PMI0409*، *PMI1426*، *PMI0842* و *PMI1425* به ترتیب باندی معادل ۲۰۳۵، ۱۹۸۵، ۲۳۹۰، ۲۰۴۰، ۱۹۸۰ و ۲۲۳۰ جفت باز را در روی ژل آگاروز نشان دادند.

پس از تکثیر ژنهای مورد نظر در ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس و با توجه به بودجه محدود در این مطالعه، تعداد ۵ نمونه از هر ژن تکثیر یافته برای تعیین توالی در نظر گرفته شد. بنابراین پس از تکثیر مجدد این ژنها با روش PCR، تخلیص محصول آنها با موفقیت از روی ژل آگاروز صورت گرفت که در نتیجه محصول تخلیص شده آنها برای تعیین توالی با پرایمرهای اختصاصی هر ژن ارسال شد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی این ژنها با توالیهای نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژنهای مشابه موجود در NCBI و Expasy با استفاده از Blast و ClustalW نشان داد که این توالیها همگی شباهت قابل توجهی با ژنهای موجود در NCBI و Expasy داشته‌اند. در این بررسی مشاهده شد که با توجه به میانگین گرفته شده از درصد شباهت ۵ نمونه ارسال شده برای هر کدام از ژنهای جذب آهن، توالی ژنهای *PMI1945*، *PMI1426*، *PMI0842*، *PMI0409*، *PMI1425* و *PMI2596* به ترتیب شباهتی در حدود ۹۸٪، ۹۷٪، ۹۵٪، ۹۲٪، ۹۰٪ و ۸۵٪ با ژنهای مشابه ثبت شده در بانک‌های ژن داشته‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

علی رغم پیشرفت دانش و بهبود یافتن تجهیزات امنیتی بهداشتی، عفونت‌های بیمارستانی از جمله عفونت-های ادراری هنوز مشکل عمده اپیدمیولوژی و درمانی در بسیاری از کشورها محسوب می‌شوند (۱۳). مطالعات مختلف شیوع بالای عفونت ادراری را در جوامع نشان داده است که در بین آنها اغلب اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک و

پروتئوس میرابیلیس به عنوان شایعترین پاتوژنهای جدا شده از این بیماران بوده است (۱۴-۱،۲،۷،۱۶).

اکثر موارد عفونت‌های ادراری وابسته به کاتتر به صورت پلی‌میکروبی هستند و پروتئوس میرابیلیس موجود در این سیستم پلی‌میکروبی، ورود سایر گونه‌های باکتری به سیستم ادراری را نیز تسهیل می‌کند (۱۸،۱۷). همچنین وجود سویه‌های پروتئوس میرابیلیس دارای مقاومت چندگانه در محیط بیمارستانی این عفونت‌ها را پیچیده‌تر می‌کند (۱۹،۴). این موارد اهمیت مطالعات در جهت توسعه راهکارهای جدید درمانی از جمله توسعه واکسنهای مفید علیه عفونت ادراری را در جوامع مختلف نشان می‌دهد. با توجه به نبود واکسن ایده‌آل، برای ایجاد یک واکسن موثر علیه این عفونت‌ها نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه است که این مطالعات می‌تواند روی ارزیابی آنتی‌ژن‌های جدید یوروپاتوژن‌ها، بررسی ادجوانت-های مختلف و ارزیابی مسیرهای مختلف ایمنی‌زایی باشد.

در طراحی واکسن موثر علیه عفونت ادراری، آنتی‌ژنهای انتخاب شده بایستی دارای یکسری ویژگی‌هایی باشند. آنتی‌ژن انتخاب شده باید ایمنوژن قوی باشد، در بیماریزایی یوروپاتوژن‌های عامل عفونت ادراری نقش داشته باشد، بهتر است در سطح باکتری عرضه شود که توسط سیستم ایمنی و به خصوص آنتی بادی‌های خنثی کننده شناسایی شود، اختصاصی یوروپاتوژن مورد نظر باشد و در سویه‌های کومنسال موجود نباشد، ساختار و توالی اسید آمینه‌ای آن در بین جمعیت یوروپاتوژن مربوطه حفاظت شده باشد تا بتواند تمام این سویه‌های پاتوژن را پوشش دهد (۲،۱۰،۲۰،۲۱). از بین فاکتورهای سویه‌های پروتئوس میرابیلیس که با داشتن این خصوصیات به عنوان کاندیدای واکسن در مطالعات قبلی مورد ارزیابی قرار گرفته اند می توان به فاکتورهای اتصالی MrpH، MrpA، UcaA و PmfA و فاکتور توکسینی Pta اشاره کرد که در فاز حیوانی برخی از آنها نتایج قابل ملاحظه ای از خود نشان داده اند (۶،۹،۱۰،۲۲،۲۳). برای مثال در مطالعات قبلی که توسط دکتر اسدی‌کرم و همکارانش انجام شده است از پروتیین‌های متفاوت پروتئوس میرابیلیس به عنوان کاندیدای واکسن استفاده شده است که از جمله آنها می توان به پروتیین ادهسین MrpH، پروتیین هیبرید ساخته شده از فاکتورهای MrpA، UcaA و Pta (۹)، پروتیین هیبرید MrpH.FliC (۲۴) و پروتیین هیبرید MrpA.FliC (۷) از سویه‌های پروتئوس میرابیلیس اشاره کرد که توانستند در فاز حیوانی به عنوان کاندیدای واکسن پاسخ‌های ایمنی مناسب و محافظت قابل توجهی علیه پروتئوس میرابیلیس در مدل‌های موشی ایجاد کنند.

بر خلاف فاکتورهای جذب آهن در سویه‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک تا کنون مطالعات اندکی در مورد فاکتورهای جذب آهن در سویه‌های پروتئوس میرابیلیس جمع‌آوری شده از عفونت‌های دستگاه ادراری صورت گرفته است که البته در هیچکدام از این مطالعات، به طور همزمان بررسی جامع فاکتورهای مختلف جذب آهن در سویه‌های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری انجام نشده است.

مطالعات محدود انجام شده نشان داده است که فاکتورهای جذب آهن در سویه‌های پروتئوس میرابیلیس شباهت زیادی از لحاظ توالی نوکلئوتیدی و خصوصیات به فاکتورهای جذب آهن در سویه‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک دارند (۱۱). برای مثال در مطالعه رودریگز و همکارانش بر روی ۲۰۰ سویه اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک نشان داده شد که ژن جذب آهن متعلق به خانواده یرسینیاباکتین *fyuA* در بیش از ۸۰ درصد سویه‌ها حضور دارد و این نشان دهنده نقش این پروتئین در بیماریزایی سویه‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک بود (۲۵). در مطالعه جانسون و همکارانش بر روی ۷۵ سویه اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک عامل سپتی سمی ناشی از عفونت ادراری

مشاهده شده که ژن *fyuA* در مقایسه با ژن آئروباکتین *iutA* شیوع بالاتری داشته و در بیش از ۹۳٪ سویه‌ها مشاهده شد (۲۶). همچنین در مطالعه دیگر جانسون و همکارانش مشاهده شده که ژن *fyuA* در ۵۹ تا از ۶۳ سویه اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک حضور دارد (۲۷). همچنین در مطالعه‌ای که اخیراً توسط دکتر اسدی‌کرم و همکارانش انجام شده است مشاهده شد که ژن جذب آهن *fyuA* در حدود ۷۷ درصد از ایزوله‌های اشریشیاکلی پاتوژنیک جدا شده از نمونه‌های عفونت ادراری در بیمارستان‌های ایران وجود دارد که این مطلب نشان دهنده حضور بالای این ژن جذب آهن در سویه‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک در ایران نیز است (۲۸) و بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مشابه این ژن جذب آهن در ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس نیز شیوع بالایی دارد. در دیگر مطالعه‌ای که توسط دکتر اسدی‌کرم و همکاران انجام شده و نتایج آن در دست چاپ است مشاهده شد که فاکتورهای جذب آهن مانند هم رسپتور ChuA و سیستم آئروباکتین IutA به ترتیب در ۸۵ و ۶۷ درصد از ایزوله‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک حضور داشتند. البته در این مطالعه مشاهده شد که فاکتور جذب آهن به نام IreA تنها در حدود ۲۲ درصد در ایزوله‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک حضور داشته، در حالیکه مطالعه حاضر نشان داد که فاکتور جذب آهن PMI1945 در ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس که آن هم به نام IreA در این سویه‌ها شناخته می شود در ۹۰ درصد از این ایزوله‌ها حضور دارد و این مطلب نشان داد که شاید برخی از فاکتورهای جذب آهن مانند IreA در سویه‌های پروتئوس میرابیلیس نقش بسیار مهمتری در جذب آهن نسبت به عملکرد مشابه در سویه‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک داشته باشند.

همچنین طبق بررسی‌های انجام شده تاکنون هیچ مطالعه منتشر شده‌ای در مورد مقایسه توالی ژنهای جذب آهن در سویه‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک و یا پروتئوس میرابیلیس جمع‌آوری شده از عفونت‌های دستگاه ادراری انجام نشده است و این مطالعه را می‌توان از این جهت به عنوان اولین مطالعه در این زمینه معرفی کرد که نشان می‌دهد توالی ژنهای جذب آهن در ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از کشور ایران شباهت بالایی با توالی ژنهای جذب آهن ثبت شده در بانک‌های ژن دارد. توالی حفظ شده (Conserved) این ژنها در بین این ایزوله‌ها نشان می‌دهد که احتمالاً این فاکتورها در بیماریزایی سویه‌های پروتئوس میرابیلیس نقش مهم و حیاتی دارند که در طول تکامل این باکتری نیاز به حفظ توالی این ژنها داشته است.

در مجموع می‌توان گفت که در این مطالعه برای اولین مرتبه حضور و بررسی توالی نوکلئوتیدی فاکتورهای مهم جذب آهن در ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس جمع‌آوری شده از نمونه‌های ادراری بیماران مبتلا به عفونت ادراری در ایران انجام شد که برخی از آنها از جمله ژنهای *PMI1945* و *PMI0842* و *PMI1426* شیوع بالایی را در بین این ایزوله‌ها نشان داده و توالی این ژنها نیز در بین این ایزوله‌ها حفظ شده بود. بنابراین در فاز اول این مطالعه، ژنهای مذکور به عنوان کاندیدای اولیه و احتمالی واکسن علیه عفونت ادراری ناشی از سویه‌های پروتئوس میرابیلیس مطرح شده که ارزیابی کارایی این کاندید واکسنها علیه عفونت ادراری ناشی از سویه‌های پروتئوس میرابیلیس با استفاده از تست‌های *in vitro* و *in vivo* در حال انجام است.

تشکر و قدردانی

از انستیتو پاستور ایران جهت تامین بودجه انجام این پروژه کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. McLellan LK, Hunstad DA. Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. Trends Mol Med. 2016; 22(11): 946-957.
2. Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. UroPathogenic Escherichia coli (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. Front Microbiol. 2017; 8: 1566.
3. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 2015; 13(5): 269-284.
4. Shahbazi S, Asadi Karam MR, Habibi M, Talebi A, Bouzari S. Distribution of Extended-Spectrum beta-Lactam, Quinolone, and Carbapenem Resistance Genes, and Genetic Diversity among Uropathogenic Escherichia coli isolates in Tehran, Iran. J Glob Antimicrob Resist. 2018 23: 1-12.
5. Warren JW. Catheter-associated urinary tract infections. Int J Antimicrob Agents. 2001; 17(4): 299-303.
6. Habibi M, Asadi Karam MR, Bouzari S. Evaluation of the effect of MPL and delivery route on immunogenicity and protectivity of different formulations of FimH and MrpH from uropathogenic Escherichia coli and Proteus mirabilis in a UTI mouse model. Int Immunopharmacol. 2015; 28(1): 70-78.
7. Habibi M, Asadi Karam MR, Bouzari S. Construction and evaluation of the immune protection of a recombinant divalent protein composed of the MrpA from MR/P fimbriae and flagellin of Proteus mirabilis strain against urinary tract infection. Microb Pathog. 2018; 117: 348-355.
8. Wieser A, Romann E, Magistro G, Hoffmann C, Norenberg D, Weinert K, et al. A multiepitope subunit vaccine conveys protection against extraintestinal pathogenic Escherichia coli in mice. Infect Immun. 2010; 78(8): 3432-3442.
9. Choubini E, Habibi M, Khorshidi A, Ghasemi A, Asadi Karam MR, Bouzari S. A novel multi-peptide subunit vaccine admixed with AddaVax adjuvant produces significant immunogenicity and protection against Proteus mirabilis urinary tract infection in mice model. Mol Immunol. 2018; 96: 88-97.
10. Asadi Karam MR, Shirzad AM, Habibi M, Bouzari S. A heterologous prime-boost route of vaccination based on the truncated MrpH adhesin and adjuvant properties of the flagellin from Proteus mirabilis against urinary tract infections. Int Immunopharmacol. 2018; 58: 40-47.
11. Pearson MM, Sebaihia M, Churcher C, Quail MA, Seshasayee AS, Luscombe NM, et al. Complete genome sequence of uropathogenic Proteus mirabilis, a master of both adherence and motility. J Bacteriol. 2008; 190(11): 4027-4028.
12. Himpsl SD, Pearson MM, Arewång CJ, Nusca TD, Sherman DH, Mobley HL. Proteobactin and a yersiniabactin-related siderophore mediate iron acquisition in Proteus mirabilis. Mol Microbiol. 2010; 78(1): 138-157.

13. Mann R, Mediati DG, Duggin IG, Harry EJ, Bottomley AL. Metabolic Adaptations of Uropathogenic E. coli in the Urinary Tract. Front Cell Infect Microbiol. 2017; 7: 241.
14. Tabasi M, Asadi Karam MR, Habibi M, Yekaninejad MS, Bouzari S. Phenotypic Assays to Determine Virulence Factors of Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) Isolates and their Correlation with Antibiotic Resistance Pattern. Osong Public Health Res Perspect. 2015; 6(4): 261-268.
15. Tessema B, Kassu A, Mulu A, Yismaw G. Pridominant isolates of urinary tract pathogens and their antimicrobial susceptiblity patterns in Gondar University Teaching Hospital, nothwest Ethiopia. Ethiop Med J. 2007; 45(1): 61-67.
16. Adjei O, Opoku C. Urinary tract infections in African infants. Int J Antimicrob Agents. 2004; 24 Suppl 1: S32-4.
17. Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, Colgan R, Geerlings SE, Rice JC, et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2010; 50(5): 625-663.
18. Nicolle LE. Catheter associated urinary tract infections. Antimicrob Resist Infect Control. 2014; 3: 23.
19. Cohen-Nahum K, Saidel-Odes L, Riesenberg K, Schlaeffer F, Borer A. Urinary tract infections caused by multi-drug resistant Proteus mirabilis: risk factors and clinical outcomes. Infection. 2010; 38(1): 41-46.
20. Habibi M, Asadi Karam MR, Shokrgozar MA, Oloomi M, Jafari A, Bouzari S. Intranasal immunization with fusion protein MrpH.FimH and MPL adjuvant confers protection against urinary tract infections caused by uropathogenic Escherichia coli and Proteus mirabilis. Mol Immunol. 2015; 64(2): 285-294.
21. Karam MR, Oloomi M, Mahdavi M, Habibi M, Bouzari S. Assessment of immune responses of the flagellin (FliC) fused to FimH adhesin of Uropathogenic Escherichia coli. Mol Immunol. 2013; 54(1): 32-39.
22. Li X, Lockatell CV, Johnson DE, Lane MC, Warren JW, Mobley HL. Development of an intranasal vaccine to prevent urinary tract infection by Proteus mirabilis. Infect Immun. 2004; 72(1): 66-75.
23. Scavone P, Sosa V, Pellegrino R, Galvalisi U, Zunino P. Mucosal vaccination of mice with recombinant Proteus mirabilis structural fimbrial proteins. Microbes Infect. 2004; 6(9): 853-860.
24. Karam MRA, Shirzad AM, Habibi M, Bouzari S. A heterologous prime-boost route of vaccination based on the truncated MrpH adhesin and adjuvant properties of the flagellin from Proteus mirabilis against urinary tract infections. Int Immunopharmacol. 2018; 58: 40-47.
25. Rodriguez-Siek KE ,Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Fakhr MK, Nolan LK. Comparison of Escherichia coli isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. Microbiol. 2005; 151(Pt 6): 2097-2110.

26. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J Infect Dis. 2000;181(1):261-272.
27. Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Soto S, Horcajada JP, Jimenez de Anta MT, et al. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of Escherichia coli isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. J Infect Dis. 2005; 191(1): 46-50.
28. Habibi M, Asadi Karam MR, Bouzari S. Evaluation of prevalence, immunogenicity and efficacy of FyuA iron receptor in uropathogenic Escherichia coli isolates as a vaccine target against urinary tract infection. Microb Pathog. 2017; 110: 477-483.

The frequency and nucleotide sequence of genes encoding the iron adsorption receptors in *Proteus mirabilis* isolated from patients with urinary tract infections in Iran

***Habibi M*[1], *Asadi Karam MR*[*1]**
1. Assistant professor, Department of Molecular biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran, m_asadi12@yahoo.com.

Received: *1 Sep 2018* Accepted: *29 Sep 2018*

Abstract

Background: Iron adsorption factors are among the most important virulence factors of *P. mirabilis* causing urinary tract infections. The aim of the present study was the evaluation of the frequency and nucleotide sequence of genes encoding the iron adsorption genes in *Proteus mirabilis* isolated from patients with urinary tract infections.

Materials and Methods: In total, 100 *P. mirabilis* isolates were obtained from urine samples of patients with urinary tract infections. Amplification of the iron adsorption genes in the isolates was performed by PCR. For sequencing of the amplified genes, their PCR products were purified from agarose gel using a PCR purification kit and sent for sequencing. After sequencing, the sequences of these genes were compared with the genes deposited in GenBank and Expasy.

Results: The frequency of *PMI1945, PMI2596, PMI0409, PMI1426, PMI0842* and *PMI1425* genes in the isolates was 90%, 25%, 35%, 85%, 75% and 55%. Comparison of the nucleotide sequences of these genes using analysis software showed similarity higher than 80% between the sequences of the iron adsorption genes with the iron sequences deposited in Genbank and Expasy.

Conclusion: In this study, it was observed that the iron adsorption genes *PMI1945* and *PMI1426* with high frequency and conserved sequences among *P. mirabilis* could be presented as novel vaccine candidates against urinary tract infections.

Keywords: *Proteus mirabilis*, Iron adsorption receptors, Sequencing

Citation: Habibi M, Asadi Karam MR. The frequency and nucleotide sequence of genes encoding the iron adsorption receptors in *Proteus mirabilis* isolated from patients with urinary tract infections in Iran. Yafte. 2018; 20(3):28-38.