پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳، صفحات ۱۶۲ تا ۱۶۶

مقاله اصلی
(Original Article)

بررسی وجود باند ژن rsbA و تاثیر اسید میریستیک در بیماری‌زایی پروتئوس میرابیلیس جدا شده از عفونت‌های ادراری

سارا احمدی بادی[1*]، دکتر جمیله نوروزی[2]، دکتر عباس اخوان سپهی[2]

[1] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
[2] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

چکیده

سابقه و هدف: *با توجه به اهمیت فرآیند کروم سنسینگ و نقش بارز آن در بیماری‌زایی باکتری‌ها و با توجه به شایع بودن عفونت‌های ادراری و عوارض شناخته شده این بیماری‌ها و نقش سیگنال‌های خارجی در تنظیم بیان ژن‌های بیماری زایی باکتری ها، در این مطالعه باند ژن های luxS و rsbA در باکتری های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری و هم چنین تاثیر اسید میریستیک به عنوان نوعی سیگنال خارجی در این باکتری‌ها بررسی شد.*

روش بررسی: *تحقیق در مرحله اول با طراحی توصیفی و در مرحله دوم با طراحی تجربی انجام گرفت. تعداد ۱۰۰ نمونه ادراری در این مطالعه جمع‌آوری شدند. با استفاده از روش‌های باکتریولوژی، باکتری پروتئوس میرابیلیس از این نمونه‌ها جدا سازی شد و سپس با استخراج ژنوم، حضور باند ژن های rsbA و luxS در باکتری پروتئوس میرابیلیس مورد بررسی قرار گرفت. سپس تاثیر اسید میریستیک به عنوان نوعی سیگنال خارجی بر روی خزیدن و توانایی تشکیل بیوفیلم پروتئوس میرابیلیس مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *از ۱۰۰ نمونه ادراری مورد بررسی، ۱۰ درصد دارای باکتری پروتئوس میرابیلیس بودند. در ۷۰ درصد ازاین باکتری‌ها باند ژنهای luxS و rsbA دیده شد. اسید میریستیک خزیدن پروتئوس میرابیلیس را در غلظت های ۴۰ تا۸۰ میکرو لیتر در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت LB، کاهش داد و توانایی این باکتری در تشکیل بیوفیلم در تمام غلظت های اضافه شده به محیط کشت LBافزایش یافت.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد وجود باند ژن‌های مذکور در این باکتری عامل عفونت های ادراری شایع است. همچنین تاثیر اسید میریستیک بر روی خزیدن و توانایی تشکیل بیوفیلم پروتئوس میرابیلیس دارای ژن rsbA، نشان دهنده وجود سیستم‌های تنظیمی پاسخ دهنده به سیگنال‌های خارجی است. بنابراین با درک بیشتر از این سیستم‌های ارتباطی و تنظیمی، می‌توان به کنترل عفونت‌ها و پیدایش داروهای جدید امیدوار بود.*

واژگان کلیدی: *عفونت‌های دستگاه ادراری، کروم سنسینگ، ژن rsbA، ژن luxS، پروتئوس میرابیلیس، اسید میریستیک.*

مقدمه

عفونت‌های دستگاه ادراری (UTIs) از عفونت‌های تکرار شونده باکتریایی در انسان هستند و حدود ۲۰٪ از عفونت‌های خارج از بیمارستان را شامل می‌شوند. تقریبا ۹۰٪ از عفونت‌های دستگاه ادراری پیشرونده می‌باشند، به این معنی که باکتری‌ها از طریق مثانه به بخش‌های فوقانی مجاری ادراری دسترسی می‌یابند (۱). *پروتئوس میرابیلیس* (*Proteus mirabilis*) عامل ۱۰٪ از عفونتهای دستگاه ادراری به حساب می‌آید و پنجمین عامل شایع عفونت‌های دستگاه ادراری بیمارستانی است. این باکتری بر روی کاتتر های ادراری قرار می‌گیرد و با ایجاد بیوفیلم، باعث تشکیل

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گ دانشکده علوم پایه، سارا احمدی بادی (**e-mail:** Sarahmadi@gmail.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۹/۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۱/۱۲

پوسته‌ای روی کاتتر و مسدود شدن آن در طول عفونت‌های ادراری می‌شود و تعداد زیادی از بیماران دارای کاتتر در بیمارستان‌ها را آلوده می‌کند و نگرانی ویژه‌ای به عنوان عامل عفونت‌های بیمارستانی به ویژه با ظهور سویه‌های مقاوم چند دارویی (MDR) محسوب می‌گردد (۲). یکی از ویژگی‌های برجسته *پروتئوس میرابیلیس* توانایی خزیدن روی آگار وتشکیل کلنی‌های بسیار منظم و تراس (لبه) دار است که ظاهر bulls-eye را دارند. خزیدن این باکتری در نتیجه تمایزهای دوره‌ای سلول های رویشی به سلول‌های خزنده است (۳). ممکن است ترکیباتی مانند پلی‌ساکاریدها (مانند لیپوپلی‌ساکارید LPS)، ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و اسید های چرب نیز در خزیدن *پروتئوس میرابیلیس* تاثیر بگذارند (۴).

با درک سیستم‌های کروم سنسینگ که عبارت از برقراری ارتباط باکتری‌ها با یکدیگر (بین گونه‌ها و درون گونه‌های باکتریایی) از طریق تولید و تشخیص سیگنال‌های مولکولی شیمیایی است (۵)، در این تحقیق وجود باند ژن *luxS* که یکی از ژن‌های دخیل در ارتباط بین گونه‌ای می‌باشد که باعث تولید آنزیم سنتز کننده سیگنال AI-2(خود القا گر-۲) می‌گردد (۶) و همچنین باند ژن *rsbA* که در باکتری *پروتئوس میرابیلیس*، پروتئین‌های حسگر این سیگنال و سیگنال‌های محیطی دیگر را کد می‌کنند (۷)، مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، در نمونه‌های افراد مبتلا به عفونت‌های ادراری ابتدا باکتری پروتئوس میرابیلیس شناسایی و سپس وجود باند ژن‌های مذکور و تاثیر اسید میریستیک به عنوان نوعی سیگنال خارجی در آزمایشگاه محمودیه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال درسال ۱۳۹۲ بررسی شد.

مواد و روشها

تحقیق در مرحله اول با طراحی توصیفی و در مرحله دوم با طراحی تجربی انجام گرفت. تعداد ۱۰۰ نمونه ادراری از چندین آزمایشگاه تشخیص طبی در سطح شهر تهران جمع آوری گردید. ابتدا نمونه‌های ادراری به منظور جداسازی باکتری *پروتئوس میرابیلیس* بر روی محیط های کشت مک کانکی و EMB کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلیسیوس نگهداری شدند. سپس از تک کلنی‌های ایجاد شده در محیط های مذکور برای رنگ آمیزی گرم استفاده شد. پس از بررسی‌های میکروسکوپی و تایید خالص بودن کشت باکتری های گرم منفی، تست‌های تشخیصی افتراقی از جمله تست حرکت، TSI، SIM، MRVP، سیمون سیترات برای باکتری‌ها انجام شد. پس از کشت باکتری‌ها در محیط‌های کشت افتراقی و نگهداری آنها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلیسیوس، نتیجه تست‌ها بررسی و باکتری‌های مورد نظر جداسازی شدند.

با استفاده از کیت استخراج MBST، ژنوم باکتری‌های جداسازی و استخراج گردید و سپس با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز صحت استخراج ژنوم مورد تایید قرار گرفت.

به منظور بررسی وجود باند ژن‌های *luxS* و*rsbA* واکنش PCR با استفاده از پرایمرها و برنامه حرارتی و زمانی جدول‌های ۱ و ۲ انجام شد. در مورد ژن *luxS* از پرایمر های طراحی شده توسط Dorotastan kowska و همکارانش در سال ۲۰۱۲ استفاده شد. از آنجایی که مطالعه مشابهی برای PCR ژن *rsbA* موجود نبود، پرایمرهای مربوط به آن از سایت NCBI، طراحی شد. برای بررسی وجود باند ژن های مذکور با استفاده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز، فراوانی باند ژن‌ها در باکتری‌های مورد مطالعه، بررسی گردید.

جدول ۱- توالی پرایمر های استفاده شده برای ژن های *luxS*،*rsbA* و *qseC*

ارگانیسم هدف	پرایمر	توالی	طول محصول bp
پروتئوس میرابیلیس	*luxS*F	GTATGTCTGCACCTGCGGTA	۴۶۴
پروتئوس میرابیلیس	*luxS*R	TTTGAGTTTGTCTTCTGGTAGTGC	467
	*rsbA*F	TTGAAGGACGCGATCAGACC	
	*rsbA*R	ACTCTGCTGTCCTGTGGGTA	

جدول ۲- برنامه حرارتی و زمانی PCR

مراحل واکنش PCR	حرارت (درجه سلسیوس)	زمان (ثانیه)
Pre-denaturation	۹۴	۳۰۰
Denaturation	۹۴	۶۰
Annealing	۵۸	۴۵
Extention	۷۲	۶۰
FinalExtention	۷۲	۴۲۰

برای بررسی تاثیر اسید میریستیک بر روی خزیدن و توانایی تشکیل بیوفیلم، از اسید میریستیک با خلوص ۹۹٪ شرکت سیگما- آلدریش استفاده شد و برای محلول شدن آن ۱ میلی گرم از آن در ۱۰۰ میلی لیتر کلروفرم حل شد. در این مطالعه به منظور بررسی حرکت پروتئوس از محیط LB آگار استفاده شد. به این منظور ۱۴ گرم آگار به همراه ۱۰ گرم پپتون، ۵ گرم عصاره مخمر و ۱۰ گرم کلرید سدیم در یک لیتر آب مقطر حل و سپس اتوکلاو و در کنار شعله در پلیت پخش گردید.

برای اضافه کردن اسید چرب به این محیط پس از اتوکلاو کردن و کمی خنک شدن آن در کنار شعله، اسید میرستیک با غلظت های مشخص اضافه گردید. غلظت‌های بررسی شده اسید چرب، ۱، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ میکرو لیتر بود. باکتری‌های پروتئوس جدا شده از نمونه‌های ادرار در محیط کشت LB براث کشت داده شدند و پس از نگهداری در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت توسط لوپ حلقوی در مرکز محیط‌های کشت LB آگار با و بدون اسید میریستیک تلقیح شدند و پس از گرما گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۶ و ۱۲ ساعت از نظر فواصل جبهه های خزیدن بررسی شدند.

برای تشکیل بیوفیلم، ابتدا لام‌ها در محلول‌های اسید هیدروکلریک، هیدروکسید سدیم 8M و اتانول قرار داده شدند. لام ها در هر محلول به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و بین هر مرحله با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و در نهایت برای ۲ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شدند. پس از آماده سازی لام‌ها، از کشت تازه باکتری (۱۸-۲۰ ساعته) که کدورتی معادل با ۰/۵ مک فارلند دارد، حدود ۲۰۰ میکرولیتر برداشته و به ۲۰ میلی لیتر محیط LB براث اضافه شد. به منظور بررسی تاثیر اسید میریستیک بر روی تشکیل بیوفیلم باکتریایی، این ماده را با غلظت های مشخص به محیط کشت اضافه شد. سپس محیط ها را در داخل یک پلیت شیشه ای حاوی لام شیشه‌ای می ریزیم و در ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد.

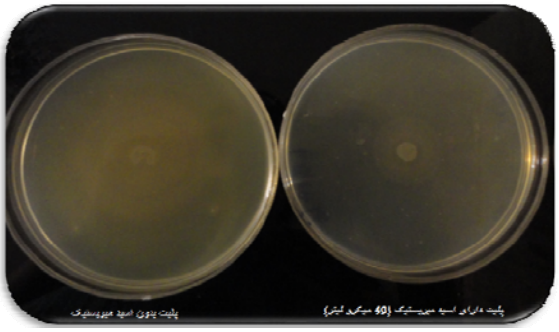
در این مطالعه لام‌ها پس از گذشت ۶ و ۷۲ ساعت بررسی شدند. به این ترتیب که لام‌ها با آب مقطر استریل شسته شدند و برای حداقل ۳۰ دقیقه در دمای اتاق خشک شدند. سپس لام‌ها رنگ آمیزی گرم شدند و با میکروسکوپ نوری، فاز متضاد و زمینه تاریک بررسی شدند.

یافته‌ها

از مجموع ۱۰۰ نمونه ادراری که مورد بررسی قرار گرفتند، ۱۰ درصد نمونه‌ها دارای باکتری *پروتئوس میرابیلیس* بودند. پس از انجام PCR برای ژن های *luxS* و *rsbA* نتایج زیر به دست آمد.

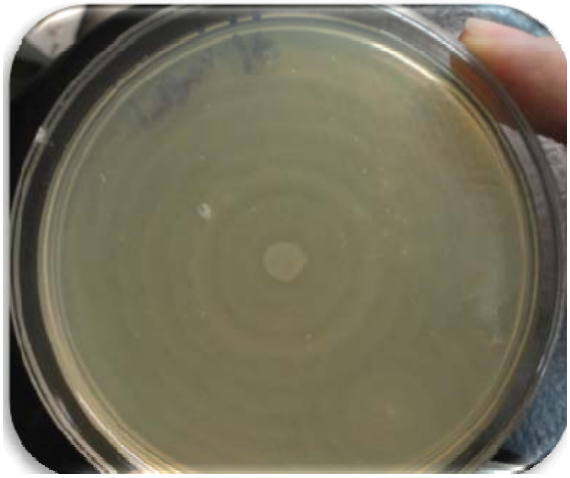
از ۱۰ نمونه ژنوم باکتری *پروتئوس میرابیلیس* ایزوله شده از عفونت‌های ادراری، ۷۰ درصد آنها دارای باند ژن‌های *luxS* (۴۶۴ bp)، ژن *rsbA* (467 bp) بودند. اسید چرب در غلظت-های ۸۰- ۶۰ - ۴۰ میکرولیترخزیدن این باکتری را کاهش دادند.

هم چنین مشخص شد که این ماده در تمام غلظت ها منجر به افزایش تشکیل بیوفیلم می شود (شکل‌های ۱ تا ۶).

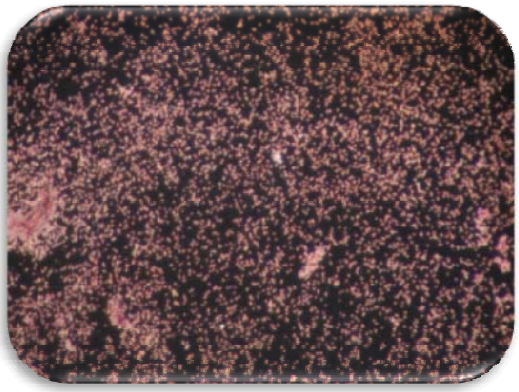


شکل ۱. خزیدن *پروتئوس میرابیلیس* در LB فاقد اسید میریستیک پس از ۲۴ ساعت

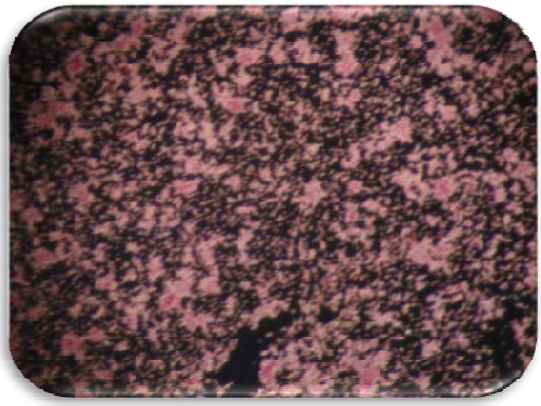
شکل ۲. خزیدن *پروتئوس میرابیلیس* در LB دارای ۴۰ میکرولیتر اسید میریستیک پس از ۲۴ ساعت.



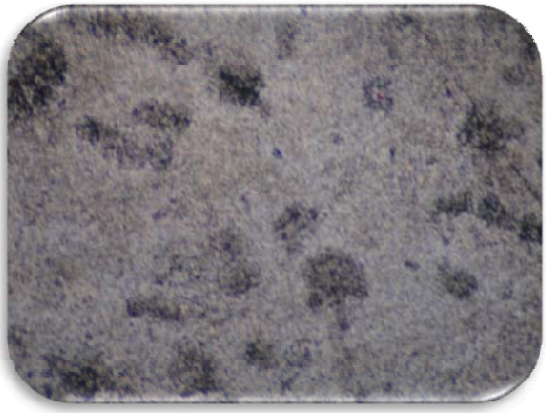
شکل ۳. بیوفیلم ۶ ساعته از *پروتئوس میرابیلیس* در محیط کشت LB بدون اسید چرب (میکروسکوپ زمینه تاریک)



شکل ۴. بیوفیلم ۶ ساعته از پروتئوس میرابیلیس در محیط کشت LB بدون اسید چرب (میکروسکوپ زمینه تاریک)



شکل ۵. بیوفیلم ۶ ساعته از *پروتئوس میرابیلیس* در محیط کشت LB با ۲۰ میکرو لیتر اسید چرب (میکروسکوپ زمینه تاریک)



شکل ۶. بیوفیلم ۷۲ ساعته از *پروتئوس میرابیلیس* در محیط کشت LB دارای ۲۰ میکرولیتر اسید چرب با میکروسکوپ زمینه تاریک.

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که ۱۰ درصد نمونه‌های ادراری دارای باکتری پروتئوس میرابیلیس است و در ۷۰ درصد این باکتری-ها باند ژن‌های luxS و rsbA دیده شد. در این مطالعه، برای بررسی وجود باند ژن *luxS* در باکتری *پروتئوس میرابیلیس*، این باکتری از نمونه‌های ادراری جدا گردید و از پرایمرهایی که Dorota Stankowsko و همکارانش در سال ۲۰۱۲ با استفاده از بلاست با توالی ژنی سویه استاندارد HI4320 *پروتئوس میرابیلیس*، طراحی کردند (۱)، استفاده شد و در بررسی حاضر باند 464 bp این ژن مطابق با بررسی‌های این محققین مشاهده شد. در مطالعه حاضر می‌توان کلینیکی بودن نمونه های *پروتئوس میرابیلیس* را دلیلی بر عدم مشاهده ۱۰۰٪ این ژن دانست.

برای انجام PCR ژن *rsbA از آنجایی که* مطالعه مشابهی وجود نداشت، پرایمرهای مربوط به آن از سایت NCBI طراحی و استفاده شد و باند 467bp مربوط به ژن *rsbA* مشاهده شد. در نتیجه در بررسی حاضر نیز مطابق با مطالعات انجام شده توسط jen Liaw Shwu- و همکارانش در سال ۲۰۰۴، وجود باند ژن *rsbA* در *پروتئوس میرابیلیس* اثبات شد. این محققین وجود و نقش ژن *rsbA* را در تنظیم خزیدن و بیان فاکتورهای بیماری‌زایی دیگر را در سویه وحشی P19 *پروتئوس میرابیلیس* و موتانت‌های این ژن را ثابت کردند (۸).

پروتئین RsbA در باکتری *پروتئوس میرابیلیس* نوعی پروتئین حسگر است که توانایی احساس سیگنال های خارجی را دارد و با تنظیم بیان ژن، به این سیگنال‌ها پاسخ می‌دهد (۹). به این منظور، در این مطالعه نقش اسید چرب اشباع شده اسید میریستیک را در خزیدن و توانایی تشکیل بیوفیلم *پروتئوس میرابیلیس* مورد ارزیابی قرار گرفت. در تحقیق حاضر مطابق با بررسی‌های صورت گرفته توسط Shwu-jen Liaw و همکارانش در سال ۲۰۰۴ اسید میریستیک خزیدن *پروتئوس میرابیلیس* را کاهش داد. البته این محققین از اسید های چرب اسید میریستیک، اسید پالمیتیک، اسید استئاریک و اسید اولئیک با غلظت‌های ۰/۰۱٪ میکرو لیتر استفاده کردند و از سویه های استاندارد P19 *پروتئوس میرابیلیس* و موتانت‌های فاقد *rsbA* استفاده کردند. همچنین این محققین نشان دادند که اسیدهای چرب باعث افزایش توانایی باکتری برای تشکیل بیوفیلم می‌شود. به این منظور، آنها از روش تشکیل بیوفیلم در میکرو تیتر استفاده کردند و تاثیر اسید چرب را پس از ۱۰ ساعت نگهداری میکروتیتر در ۳۷ درجه سلسیوس بررسی کردند (۸).

در مطالعه حاضر، بر خلاف تحقیق Shwu-jen Liaw و همکارانش، از *پروتئوس میرابیلیس*های جدا شده ازعفونت‌های دستگاه ادراری استفاده شد و همسو با نتایج این محققین اسید میریستیک نیز خزیدن *پروتئوس میرابیلس* را بر روی

محیط LB آگار کاهش داد، ولی تفاوت در غلظت به کار رفته بود، به طوری که Shwu-jen Liaw و همکارانش در غلظت های ۰/۰۱٪ میکرولیتر اسیدهای چرب خاصیت کاهندگی خزیدن را مشاهده کردند. ولی در بررسی انجام شده بر روی پروتئوس‌های جدا شده از عفونت های دستگاه ادراری، اسید میریستیک در غلظت‌های ۴۰ میکرو لیتر و بیشتر اثر کاهندگی را نشان داد که این تفاوت در غلظت بازدارندگی اسید میریستیک می‌تواند به دلیل کلینیکی بودن باکتری‌های جدا شده در این تحقیق و شرایط جغرافیایی و سویه‌های مختلف *پروتئوس میرابیلیس* باشد.

در این مطالعه، همسو با تحقیقات Shwu-jen Liaw و همکارانش، اسید میرستیک اثر افزاینده بر روی توانایی تشکیل بیوفیلم *پروتئوس میرابیلیس* داشت. از این مطالعه می‌توان چنین استنباط کرد که پروتئین RsbA نوعی تنظیم کننده منفی خزیدن است، در حالی که توانایی بیوفیلم را در برخورد با سیگنال‌های محیطی افزایش می‌دهد (تنظیم کننده مثبت تشکیل بیوفیلم). شاید به دلیل اینکه، باکتری تمایل دارد که ابتدا در محیط شرایط را بررسی و سپس فاکتورهای بیماری-زایی دیگر را بیان کند، پروتئین RsbA دارای چنین عملکرد دو گانه‌ای در تنظیم خزیدن و تشکیل بیوفیلم است (۸).

باکتری‌ها با استفاده از سیگنال‌های مولکولی شیمیایی که خود القاگر نامیده می‌شوند با یکدیگر ارتباط برقرار می‌کنند. این فرآیند، یعنی استفاده از سیگنال‌ها (خودالقاگر)، برای برقراری ارتباط در باکتری‌ها و در نتیجه تنظیم بیان هماهنگ ژن‌ها، کروم سنسینگ نامیده می‌شود (۵). ژن *luxS* آنزیم سازنده AI-2 تولید می‌کند. باکتری‌ها از AI-2 برای ارتباط بین گونه‌ها استفاده می‌کنند (۶).

پروتئین RsbA در *پروتئوس میرابیلیس* با پروتئین‌های حسگر AI-2 مشابه هستند. این پروتئین‌ها سیگنال‌های محیطی را دریافت و با تنظیم بیان ژن‌ها به آنها پاسخ می‌دهند (۸).

در بررسی حاضر باند ژن‌های مذکور در تمامی باکتری‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. با توجه به اینکه PCR روشی بسیار دقیق است و تغییر یک نوکلئوتید (جهش نقطه‌ای) را تشخیص می‌دهد، می‌توان این عدم مشاهده را به بروز جهشهای نقطه‌ای در ژن‌ها نسبت داد که درنتیجه وجود باند ژن با یک نوع پرایمر قابل تشخیص نمی‌باشد.

به نظر می‌رسد وجود سیستم‌های کروم سنسینگ در این آلودگی‌ها مطرح است. با توجه به کاستی‌های تحقیق و مطالب گفته شده انجام مطالعات مشابه به ویژه ساخت سویه های موتانت و اثر آنها در کاهش بیماری‌زایی باکتری‌ها و استفاده از چندین پرایمر برای ژن‌ها و نیز بررسی تاثیرات سیگنال‌های دیگر بر روی بیماری‌زایی باکتری‌ها توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

در خاتمه، از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و مجتمع آزمایشگاهی محمودیه کمال تشکر و قدردانی را می‌نماییم.

REFERENCES

1. Hryniewicz K, Szczypa K, Sulikowska A, Jankowski K, Betlejewska K, Hryniewicz W. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from urinary tract infections in Poland. J Antimicrob Chemother 2001;47:773–80.
2. O'Fallon E, Gautam S, D'Agata S EM. Colonization with multidrug-resistant gram-negative bacteria: prolonged duration and frequent cocolonization. Clin, Infect Dis 2009; 48:1375–81.
3. Kearns DB, Losick R. Swarming motility inundomesticated Bacillussubtilis. Mol Microbiol 2003; 49: 581–90.
4. Belas R, Erskine D, Flaherty D. Proteus mirabilis mutants defective in swarmer cell differentiation and multicellular behavior. J Bacteriol 1991; 173:6279–88.
5. Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu Rev Cell Dev Biol 2005;21:319-46.
6. Xavier KB, Bassler BL. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. Curr Opin Microbiol 2003; 6:191–97.
7. Rasko DA, Moreira CG, Li de R, Reading NC, Ritchie JM, Waldor MK, et al. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. Science 2008; 321:1078–80.
8. Liaw SJ, Lai HC, Wang WB. Modulation of swarming and virulence by fatty acids through the RsbA Protein in Proteus mirabilis. Infect Immun 2001; 72:6836–45.
9. Cybulski LE, Albanesi D, Mansilla MC, Altabe S, Aguilar PS, de Mendoza D. Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the Bacillussubtilis acyl-lipid desaturase. Mol Microbiol 2002; 45:1379–88.