فراوانی ژنهای مربوط به عوامل حدت در سویه های پروتئوس میرابیلیس اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در اصفهان در سال ۱۴۰۱

مهدی چوری[۱]، فاتح رحیمی[۲*]، علی قاسمی[۳]، محمد کتولی[۴]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۲- دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۳- دکتری تخصصی میکروبیولوژی، استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان
۴- دکتری تخصصی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشکده بهداشت و علوم ورزشی، دانشگاه سان شاین کوست استرالیا
*نشانی برای مکاتبه: f.rahimi@sci.ui.ac.ir

دریافت مقاله: دی ۱۴۰۲ پذیرش برای چاپ: اسفند ۱۴۰۲

چکیده

زمینه و هدف: *پروتئوس میرابیلیس به عنوان مهمترین باکتری بیماریزای عامل ایجاد عفونتهای ادراری پیچیده، به ویژه عفونتهای ادراری مرتبط با سوند شناخته می شود، که به طور مؤثر بیوفیلم کریستالی را بر روی سطوح مختلف مانند سوندهای مجرای ادرار تشکیل می دهد. بیماریزایی پروتئوس میرابیلیس ناشی از توانایی آن در تولید مجموعه ای از عوامل حدت مختلف، مانند بیوفیلم، مولکولهای چسبندگی، اوره آز، همولیزین، فعالیت سوارمینگ، پروتئازها و سیدروفورها می باشد. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی ژنهای مربوط به عوامل حدت مختلف در میان سویه های پروتئوس میرابیلیس اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در یک بیمارستان مرجع در اصفهان در طی اردیبهشت لغایت آذر سال ۱۴۰۱ بود.*

مواد و روشها: *در این مطالعه در مجموع ۵۰ ایزوله پروتئوس میرابیلیس از نمونه های ادراری ۵۰ بیمار مبتلا به عفونت ادراری در یک بیمارستان مرجع در شهر اصفهان جمع آوری گردید و با استفاده از آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با پرایمرهای اختصاصی ژنهای ureC و ureR مورد تأیید قرار گرفتند. تمامی سویه ها به منظور سنجش توانایی تشکیل بیوفیلم با استفاده از آزمون کمی میکروتیتر پلیت مورد بررسی قرار گرفتند و فراوانی ژنهای مرتبط با عوامل حدت (zapA، zapD، pta، hpmA، mrpA و hlyA) در میان سویه های مولد بیوفیلم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تعیین گردید.*

یافته ها: *تمامی جدایه های جمع آوری شده واجد ژنهای ureC و ureR مثبت بودند و به عنوان سویه های پروتئوس میرابیلیس مورد تأیید قرار گرفتند. همچنین، تمامی سویه ها قادر به تشکیل بیوفیلم بودند که در این میان ۵۲، ۴۴ و ۴ درصد از سویه ها به ترتیب مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف بودند. علاوه بر این، ژنهای zapA و zapD در ۱۰۰ درصد سویه های بیوفیلم مثبت شناسایی شدند و فراوانی ژنهای hpmA، pta و mrpA نیز به ترتیب محدود به ۹۶، ۹۴ و ۹۰ درصد سویه ها بود. از سوی دیگر، ژن hlyA در هیچکدام از سویه های پروتئوس میرابیلیس مورد بررسی شناسایی نشد.*

نتیجه‌گیری: *شیوع بالای سویه های پروتئوس میرابیلیس مولد بیوفیلم واجد طیف وسیعی از عوامل حدت در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در بیمارستان مورد مطالعه در اصفهان، نشان دهنده انتشار کلونال سویه های بیماریزای مولد بیوفیلم در اصفهان و همچنین اهمیت سویه های پروتئوس میرابیلیس به عنوان یک تهدید بالقوه برای سلامت بیماران است.*

واژگان کلیدی: پروتئوس میرابیلیس، عفونت ادراری پیچیده، بیوفیلم، عوامل حدت، اوره آز، همولیزین

مقدمه

عفونت دستگاه ادراری[۱] از جمله شایعترین مشکلات مرتبط با سلامت افراد محسوب می شود (۱) و تخمین زده می شود که سالانه حدود ۱۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان به این بیماری مبتلا می شوند؛ که هزینه های قابل توجهی را بر سیستمهای بهداشتی تحمیل می کند (۲). بر اساس یک گزارش، در ایالات متحده آمریکا حدود پنج میلیارد دلار برای درمان و مبارزه با این عفونت در سال هزینه می شود (۳). فراوانی این عفونت در زنان چهار برابر بیشتر از مردان است و ۶۰-۴۰ درصد زنان حداقل یک بار در طول زندگی خود به عفونت ادراری مبتلا می شوند (۴). به طور کلی، عفونتهای ادراری به دو گروه اصلی: عفونتهای پیچیده و عفونتهای غیرپیچیده و بدون عارضه تقسیم می شوند. عفونت پیچیده به شرایطی اطلاق می شود که در آن عوامل و ناهنجاریهای متعددی مانند احتباس ادرار در دستگاه ادراری باعث ایجاد عفونت می شود (۵). اگر هیچ ناهنجاری آناتومیکی و عملکردی در دستگاه ادراری وجود نداشته نباشد که به تشکیل عفونت کمک کند، عفونت به عنوان عفونت ادراری غیرپیچیده طبقه بندی می شود (۶, ۷). اورتریت (عفونت مجرا)[۲]، سیستیت[۳] (عفونت مثانه)، پیلونفریت[۴] (عفونت کلیه) و باکتریوری[۵] (وجود عفونت در ادرار) انواع مختلف عفونت دستگاه ادراری بر اساس محل عفونت هستند (۸). نارسایی کلیه، التهاب پروستات، التهاب کلیه، سیستیت و پیلونفریت از مهمترین عوارض عفونت دستگاه ادراری به شمار می روند (۹). عوامل باکتریایی نرمال میکروبیوتای روده به ویژه *اشرشیا کلی* و گونه های *انتروکوکوس* به عنوان عوامل اصلی ایجاد عفونت ادراری شناخته می شوند (۷). علاوه بر این، نقش سایر عوامل باکتریایی مانند *پروتئوس میرابیلیس*، *کلبسیلا نومونیه*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* و همچنین برخی از قارچها مانند *کاندیدا آلبیکنس* نیز در ایجاد عفونت ادراری به اثبات رسیده است (۱, ۱۰, ۱۱).

پروتئوس میرابیلیس یک باسیل گرم منفی متحرک از خانواده *انتروباکتریاسه* است که واجد حرکت مشخص سوارمینگ می باشد؛ که به عنوان نرمال میکروبیوتای دستگاه گوارش انسان و سایر حیوانات شناخته می شود و به طور گسترده در محیط زیست و عمدتا در آب و خاک پراکنده می باشد (۱۲). این باکتری به عنوان یک بیماریزای فرصت طلب و عامل شایع ایجاد عفونتهای ادراری پیچیده در بیماران مبتلا به ناهنجاریهای آناتومیک یا عملکردی دستگاه ادراری و به ویژه در بیماران واجد سوندهای طولانی مدت، شناخته می شود (۱۲, ۱۳). در ایالات متحده، *پروتئوس میرابیلیس* عامل ایجاد حدود ۳ درصد از تمامی عفونتهای بیمارستانی و ۴۴ درصد از عفونتهای ادراری مرتبط با سوند[۶] محسوب می شود (۱۲, ۱۴). این عفونتها، به دلیل توانایی منحصر به فرد *پروتئوس میرابیلیس* در تشکیل بیوفیلم، در نهایت منجر به انسداد سوند و در نهایت احتباس ادرار و رفلاکس ادرار و عوارض بالقوه کشنده مانند سپسیس و شوک سپتیک می شوند (۱۵). همچنین، اگر عفونت به قسمتهای فوقانی دستگاه ادراری سرایت کند منجر به سیستیت و پیلونفریت خواهد شد (۱۶). علاوه بر این، با توجه به تشکیل لایه های مختلف ناشی از چسبندگی سویه های *پروتئوس میرابیلیس* مولد بیوفیلم (به تنهایی یا با حضور سایر جنسها و گونه های باکتریایی) بر روی سوند، خروج سوند باعث آسیب رساندن به مجرای ادرار و مخاط مثانه می شود (۶, ۱۲). از طرف دیگر، این باکتری مولد آنزیم اوره آز قوی است که در نتیجه منجر به تشکیل آمونیاک و افزایش pH ادرار می شود (۱۷). افزایش pH باعث تشکیل کریستالهای کلسیم و منیزیم و رسوب آنها می شود که در نهایت باعث انسداد مجرای سوند و ایجاد باکتریوری خواهد شد (۱۸). علاوه بر این، همولیزین (یک سیتوتوکسین)، آگلوتینین سمی *پروتئوس*[۷]، فیمبریه MR/P[۸] و تاژک نیز نقش قابل توجهی در کلونیزاسیون موفقیت آمیز ایزوله های *پروتئوس میرابیلیس* در دستگاه ادراری ایفا می کنند (۱۹). مطالعه حاضر با هدف بررسی تشکیل بیوفیلم و فراوانی ژنهای مربوط به عوامل حدت در میان سویه های *پروتئوس میرابیلیس* جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در یک بیمارستان مرجع در اصفهان در سال ۱۴۰۱ به انجام رسیده است.

---

[۱] Urinary tract infections (UTIs)
[۲] Urethritis
[۳] Cystitis
[۴] Pyelonephritis
[۵] Bacteriuria
[۶] Catheter-associated UTI (CAUTI)
[۷] *Proteus* toxic agglutinin (Pta)
[۸] MR/P fimbriae

روش کار

جمع‌آوری و شناسایی ایزوله های باکتریایی

در بازه زمانی اردیبهشت لغایت آذر ۱۴۰۱، در مجموع ۵۰ ایزوله *پروتئوس میرابیلیس* از نمونه های ادراری مربوط به ۵۰ بیمار مبتلا به عفونت ادراری از آزمایشگاه یک بیمارستان مرجع در شهر اصفهان جمع آوری شدند. تمامی مراحل نمونه گیری از بیماران توسط آزمایشگاه بیمارستان انجام گرفت و پس از کشت هر نمونه ادراری در آزمایشگاه بیمارستان، پلیتها جمع آوری شده و به صورت هفتگی به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان ارسال شدند. همچنین، تمامی بیماران با علائم تکرر ادرار، سوزش در هنگام دفع، تب و گاها لرز، درد در ناحیه کمر و بعضا هماچوری به پزشک مراجعه کرده بودند که جهت بررسی بیشتر توسط پزشک به آزمایشگاه ارجاع داده شده بودند. در آزمایشگاه، تمامی ایزوله ها در ابتدا بر روی محیط مک کانکی آگار (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) کشت داده شده و پس از اطمینان از خالص بودن هر ایزوله، در محیط مغذی واجد ۵۰ درصد گلیسرول در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند. به منظور شناسایی و تأیید ایزوله هایی که در آزمایشگاه به عنوان *پروتئوس میرابیلیس* مورد شناسایی قرار گرفته بودند، از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنهای *ure*R و *ure*C استفاده شد (۲۰). همچنین، در این مطالعه ۳۱ ایزوله (۶۲ درصد) از نمونه های ادراری خانمها و ۱۹ ایزوله (۳۸ درصد) نیز از نمونه های ادراری آقایان جداسازی شدند.

بررسی فنوتیپی تولید بیوفیلم

در این مطالعه جهت سنجش توانایی تشکیل بیوفیلم ایزوله ها از روش کمی میکروتیتر پلیت بر اساس دستورالعمل پیشین استفاده شد (۲۱). برای این منظور، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی رقیق شده در محیط Luria-Bertani (LB, Scharlau, Spain) براث به صورت سه تایی در چاهکهای پلیت ۹۶ خانه U شکل تلقیح گردید و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، سوسپانسیون باکتریایی دور ریخته شد و چاهکها سه مرتبه با استفاده از بافر PBS شسته شدند. سپس، رنگ آمیزی هر چاهک با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۳ درصد (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط انجام گرفت. پس از این مرحله، رنگ اضافی خارج شد و چاهکها با آب مقطر شسته و در هوا خشک شدند. در نهایت، ۲۰۰ میکرولیتر محلول استون-اتانول به منظور رنگبری به هر چاهک اضافه شد و جذب نوری چاهکها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط خوانشگر پلیت Multimode (Tecan, Infinite M200 PRO) مورد سنجش قرار گرفت. سرانجام سویه ها به ترتیب به عنوان سویه های مولد بیوفیلم قوی ($4xODc < ODi$)، متوسط ($2xODc < ODi \leq 4xODc$) ، ضعیف ($ODc < ODi \leq 2xODc$) و بیوفیلم منفی ($ODi < ODc$) دسته بندی شدند (۲۲).

آزمونهای مولکولی

استخراج DNA

جهت استخراج DNA تمامی ایزوله ها از روش جوشاندن بر اساس دستورالعمل پیشین قاسمی و همکاران استفاده شد (۷). بر این اساس، یک کلنی تک و خالص از هر ایزوله باکتریایی در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل و به خوبی ورتکس گردید و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه ترموبلاک (HPN-24، پدیده نوژن پارس) در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از سانتریفیوژ در g × ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ یخچالدار (ARM-500، ارمغان طب ایرانیان) ، مایع رویی به عنوان DNA الگو در آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفت.

شناسایی ایزوله ها

به منظور شناسایی و تأیید ایزوله هایی که پیشتر در آزمایشگاه بیمارستان با استفاده از آزمونهای بیوشیمیایی و فنوتایپی به عنوان *پروتئوس میرابیلیس* مورد شناسایی قرار گرفته بودند، از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر ژنهای *ure*R و *ure*C (جدول ۱)، بر اساس دستورالعمل معرفی شده در مطالعات قبلی استفاده شد (۲۰).

بررسی ژنهای مرتبط با عوامل حدت

پس از شناسایی و تأیید سویه های *پروتئوس میرابیلیس* مولد بیوفیلم، حضور دو ژن مرتبط با بیوفیلم (*zap*A و *zap*D) و ژنهای مرتبط با عوامل حدت *mrp*A، *pta*، *hpm*A و *hly*A در میان سویه ها با استفاده از آزمون PCR و جفت پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) مطابق با شرایط ذکر شده در مطالعه قبلی (۱۹) و مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده و شرایط PCR انجام شده در مطالعه حاضر.

ژن هدف	توالی پرایمر (´۵ به ´۳)	شرایط PCR	طول قطعه (جفت باز)	منبع
*ure*R	F: GGTGAGATTTGTATTAATGG R: ATAATCTGGAAGATGACGAG	94 °C for 4 min, 30 cycles (94 °C for 40 s, 58 °C for 1 min and 72 °C for 20 s), 72 °C for 10 min	225	(۲۰)
*ure*C	F: CCGGAACAGAAGTTGTCGCTGGA R: GGGCTCTCCTACCGACTTGATC		533	
*zap*D	F: AGTTAACTTGTTGGCAGGAA R: CGAATAGCATAACGGTTTTT	95 °C for 5 min, 30 cycles (95 °C for 30 s, 52 °C for 30 s and 72 °C for 30 s), 72 °C for 5 min	217	مطالعه حاضر
*zap*A	F: ACCGCAGGAAAACATATAGCCC R: GCGACTATCTTCCGCATAATCA	95 °C for 5 min, 30 cycles (95 °C for 30 s, 59 °C for 30 s and 72 °C for 30 s), 72 °C for 5 min	540	(۱۹)
pta	F: CCACTGCGATTATCCGCTCT R: ATCGGCAGAAGTGACAAGCA	95 °C for 5 min, 30 cycles (95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, 72 °C for1 min), 72 °C for 7 min	686	
*mrp*A	F: GAGCCATTCAATTAGGAATAATCCA R: AGCTCTGTACTTCCTTGTACAGA	95 °C for 5 min, 30 cycles (95 °C for 1 min, 58 °C for 1 min, 72 °C for1 min), 72 °C for 7 min	648	
*hly*A	F: AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT R: ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	95 °C for 5 min, 30 cycles (95 °C for 1 min, 63 °C for 1 min, 72 °C for1 min), 72 °C for 7 min	1177	
*hpm*A	F: TGGCGCAAATACGACTACCA R: GTTGAGGGGCGTTATCAAGAGTC	95 °C for 5 min, 30 cycles (95 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for1 min), 72 °C for 7 min	709	

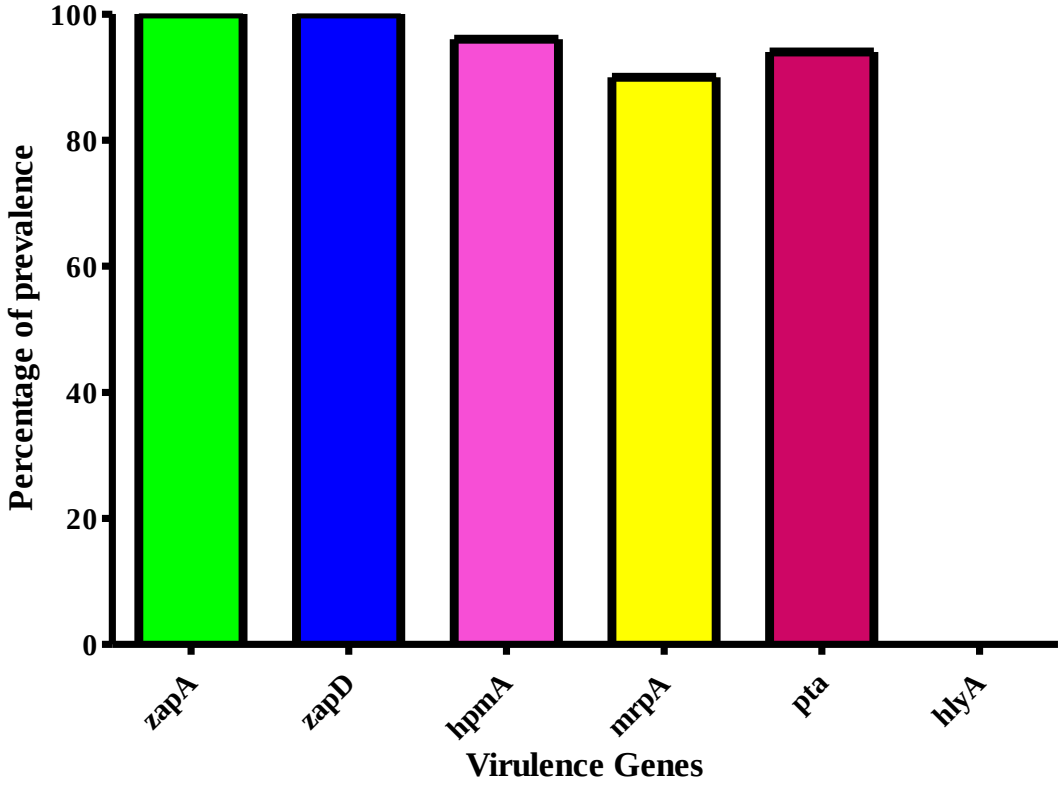
یافته ها

شناسایی ایزوله های باکتریایی مولد بیوفیلم

بر اساس نتایج حاصل از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنهای *ure*C و *ure*R تمامی ۵۰ ایزوله جمع آوری شده که پیشتر در آزمایشگاه مورد شناسایی قرار گرفته بودند، واجد هر دو ژن *ure*R و *ure*C بودند و به عنوان سویه های *پروتئوس میرابیلیس* تأیید شدند. همچنین، نتایج آزمون کمی میکروتیتر پلیت جهت سنجش توانایی تشکیل بیوفیلم در میان سویه ها نشان داد که ۱۰۰ درصد سویه ها قادر به تشکیل بیوفیلم بودند. بر این اساس، ۲۶ (۵۲ درصد)، ۲۲ (۴۴ درصد) و ۲ (۴ درصد) سویه به ترتیب مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف بودند.

فراوانی ژنهای مرتبط با عوامل حدت

نتایج حاصل از آزمونهای PCR جداگانه جهت شناسایی ژنهای مرتبط با عوامل حدت در سویه های *پروتئوس میرابیلیس* نشان داد که تمامی سویه ها واجد ژنهای *zap*A و *zap*D بودند و فراوانی ژنهای *hpm*A، *pta* و *mrp*A نیز محدود به ۹۶، ۹۰ و ۹۴ درصد سویه ها بود (شکل ۱). همچنین، ژن *hly*A در هیچکدام از سویه ها شناسایی نشد. علاوه بر این، تمامی سویه های مولد بیوفیلم ضعیف واجد ژنهای مورد مطالعه بودند و بیشترین فراوانی ژنها در میان سویه های مولد بیوفیلم قوی به ترتیب مربوط به *zap*A، *zap*D و *hpm*A و در سویه های مولد بیوفیلم متوسط نیز به ترتیب مربوط به ژنهای *zap*A، *zap*D، *hpm*A و *pta* بود (جدول ۲).



شکل ۱. فراوانی ژنهای مرتبط با عوامل حدت در سویه های *پروتئوس میرابیلیس* مولد بیوفیلم.

جدول ۲. ارتباط میان حضور ژنهای مرتبط با عوامل حدت و تشکیل بیوفیلم در سویه های *پروتئوس میرابیلیس*.

ژن	بیوفیلم			تعداد (درصد)
	بیوفیلم قوی (درصد)	بیوفیلم متوسط (درصد)	بیوفیلم ضعیف (درصد)	
zapA	۲۶ (۱۰۰)	۲۲ (۱۰۰)	۲ (۱۰۰)	۵۰ (۱۰۰)
zapD	۲۶ (۱۰۰)	۲۲ (۱۰۰)	۲ (۱۰۰)	۵۰ (۱۰۰)
mrpA	۲۴ (۹۲)	۱۹ (۸۷)	۲ (۱۰۰)	۴۵ (۹۰)
hpmA	۲۵ (۹۷)	۲۱ (۹۵)	۲ (۱۰۰)	۴۸ (۹۶)
pta	۲۴ (۹۲)	۲۱ (۹۵)	۲ (۱۰۰)	۴۷ (۹۴)
hlyA	۰	۰	۰	۰

بحث

پروتئوس میرابیلیس از جمله باکتریهایی است که باعث ایجاد عفونت ادراری می شود و بعضا این عفونت می تواند منجر به باکتریمی شود (۱۶). تشخیص و درمان عفونت ادراری همچنان یک چالش بسیار مهم به شمار می رود. علائم و نشانه های غیراختصاصی، فقدان استاندارد طلایی قطعی و میزان بالای آلودگی در طول جمع‌آوری ادرار، از موانع اصلی تشخیص صحیح عفونت محسوب می شوند (۸, ۲۳). علاوه بر این، درمان عفونت ادراری به دلایل متعددی از جمله عفونت چند میکروبی[۹]، مقاومت آنتی بیوتیکی و اختلال در پاسخهای ایمنی چالش برانگیز است (۶, ۲۴). نیتروفورانتوئین، کوتریموکسازول (تری متوپریم/سولفامتوکسازول) و فسفومایسین ترومتامول[۱۰] به عنوان داروهای خط اول درمان عفونت ادراری شناخته می شوند (۲۵). فلوروکینولونها و آنتی بیوتیکهای بتا-لاکتام نیز به عنوان آنتی بیوتیکهای خط دوم درمان عفونت ادراری مورد استفاده قرار می گیرند (۲۶). با این وجود، مقاومت آنتی بیوتیکی به طور قابل توجهی اثربخشی این درمانها را کاهش می دهد. بنابراین، تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی با استفاده از روشهای استاندارد مورد تأیید CLSI جهت انتخاب آنتی بیوتیک مناسب به منظور ریشه کنی و درمان عفونت بسیار ضروری و حائز اهمیت می باشد (۲۵).

بیماریزایی *پروتئوس میرابیلیس* در انسان ناشی از عوامل حدت مختلفی است، که از آن جمله می توان به فیمبریه مقاوم به مانوز شبه پروتئوس[۱۱] (MR/P)، فیمبریه *پروتئوس میرابیلیس*[۱۲] (PMF) و ادهسین سلولهای اورواپیتلیال که منجر به چسبندگی به سلولهای میزبان می شوند (۱۹)، پروتئازهای PtA و ZapA که به ترتیب باعث تخریب پروتئینهای ساختاری و سیستم ایمنی می شوند (۱۹) و همولیزینهای HpmA (واجد فعالیت همولیتیک و سایتوتوکسیک) و HlyA (پروتئین ایجاد کننده منفذ و واجد فعالیت همولیتیک)، به عنوان سم برای سلولهای میزبان محسوب می شوند و در کلنیزاسیون باکتری در دستگاه ادراری نقش دارند، اشاره کرد (۲۷). علاوه بر این، ظرفیت چسبندگی، تشکیل بیوفیلم و سمیت سلولی نیز در فرآیند ایجاد عفونت بسیار مهم هستند. تشکیل بیوفیلم به عنوان یک سازوکار مؤثر برای بیماریزایی موفقیت آمیز *پروتئوس میرابیلیس* پیشنهاد شده است (۱۵). بیوفیلمها به عنوان ساختارهای سازمان یافته جوامع میکروبی (تک یا چند گونه ای و حتی چند جنسی) شناخته می شوند که در آن سلولهای میکروبی به طور برگشت ناپذیری به یک بستر مناسب و به یکدیگر متصل می شوند. در داخل بیوفیلم، سلولها در یک ماتریکس از مواد پلیمری خارج سلولی (از قبیل پلی ساکاریدها، پروتئینها، لیپیدها و DNA خارج سلولی) که توسط باکتریهای چسبنده و مولد بیوفیلم تشکیل شده اند، محصور می شوند (۶, ۱۳). تشکیل بیوفیلم یک فرآیند چند مرحله ای است که با چسبندگی برگشت پذیر باکتریایی به سطوح زنده یا غیرزنده و به دنبال آن چسبندگی برگشت ناپذیر، تشکیل میکروکلنیها و در نهایت ایجاد یک بیوفیلم بالغ آغاز می‌شود. سپس سطح بیوفیلم بالغ شروع به رهاسازی باکتریها می کند و به انتشار بیشتر سویه های مولد بیوفیلم در موضع کمک می کند (۱۰, ۱۳). تشکیل بیوفیلم توسط برخی از گونه های میکروبی جهت زنده ماندن در شرایط سخت محیطی و افزایش مقاومت در برابر آنتی بیوتیکها و همچنین سیستم ایمنی میزبان مورد استفاده قرار می گیرد. مقاومت ضدمیکروبی میکروارگانیسمهای مرتبط با بیوفیلم ۱۰-۱۰۰۰ برابر بیشتر از همتایان پلانکتونیک آنها است (۲۸). این افزایش چشمگیر مقاومت ناشی از ماتریکس پلی ساکاریدی بیوفیلم است که علاوه بر نقشی که در چسبندگی به سطح و اتصال سلول به سلول دارد، به عنوان یک عامل حدت مهم فعالیت می نماید و از باکتریها در برابر سیستم ایمنی ذاتی میزبان مانند فاگوسیتوز و همچنین پپتیدهای ضدمیکروبی محافظت می کند (۲۹, ۳۰).

بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر مشخص گردید که تمام سویه های *پروتئوس میرابیلیس* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری قادر به تولید بیوفیلم بودند، که در این میان ۵۲، ۴۴ و ۴ درصد از سویه ها به ترتیب قادر به تولید بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف بودند. در مطالعه de Oliveira و همکاران در سال ۲۰۲۱ در برزیل، ۷۳/۲ درصد از سویه های *پروتئوس میرابیلیس* جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری قادر به تشکیل بیوفیلم بسیار قوی بودند و تنها ۱/۱ درصد از سویه ها مولد بیوفیلم متوسط بودند (۳۱). در مطالعه دیگری، Fusco و همکاران در ایتالیا در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که تنها ۱ سویه (۷ درصد) از ۱۵ سویه *پروتئوس میرابیلیس* جدا شده از نمونه های عفونت ادراری قادر به تولید بیوفیلم نبود و سایر سویه ها (۹۳ درصد) مولد بیوفیلم قوی و متوسط بودند

---

[۹] Polymicrobial infection
[۱۰] Fosfomycin trometamol
[۱۱] Fimbriae mannose-resistant Proteus-like (MR/P)
[۱۲] Proteus mirabilis fimbriae (PMF)

(۳۲). علاوه بر این، میرزایی و همکاران در سال ۲۰۱۹ اعلام کردند که تمامی ۱۱۰ سویه *پروتئوس میرابیلیس* جدا شده از بیماران در تهران از توانایی تولید بیوفیلم برخوردار بودند (۳۳). در مقابل، در مطالعه ای در سال ۲۰۱۳ در کرمان فراوانی سویه های *پروتئوس میرابیلیس* مولد بیوفیلم قوی، ۳۶ درصد بود (۳۴). وجود تفاوت در نتایج به دست آمده در این مطالعه در مقایسه با سایر مطالعات می تواند ناشی از فرکانس بالاتر انتقال سویه های دارای مشابهت ژنتیکی در یک منطقه جغرافیایی خاص، تفاوت در جمعیت مورد مطالعه و یا استفاده از پروتکلهای درمانی مختلف در بین کشورها، شهرها و بیمارستانهای مختلف باشد.

در این مطالعه تمامی سویه های *پروتئوس میرابیلیس* مولد بیوفیلم واجد ژنهای *zapA* و *zapD* بودند و همچنین شیوع بالایی از ژنهای *hpmA* (۹۶ درصد)، *pta* (۹۴ درصد) و *mrpA* (۹۰ درصد) نیز درمیان سویه ها مشاهده گردید. اما تمامی سویه ها فاقد ژن *hlyA* بودند. در سایر مطالعات آمار متفاوتی از فراوانی ژنهای مرتبط با عوامل حدت در ایزوله های *پروتئوس میرابیلیس* گزارش شده است (۳۳, ۳۵-۳۷). Pathirana و همکاران در سال ۲۰۱۸ فراوانی هر دو ژن *zapA* و *mrpA* را در میان سویه های پروتئوس *میرابیلیس* جداسازی شده از نمونه های انسانی و حیوانات خانگی ۴۵/۸ درصد گزارش دادند که اختلاف قابل توجهی با یافته های مطالعه حاضر نشان دادند (۳۸). در مطالعه طباطبایی و همکاران تمامی سویه ها واجد ژن *pta* بودند که بالاتر از این مطالعه بود، اما به ترتیب ۹۵ و ۹۰ درصد سویه ها واجد ژنهای *hpmA* و *mrpA* بودند و ضمنا ژن *hlyA* در هیچکدام از سویه های مورد مطالعه شناسایی نشد که کاملا منطبق بر یافته های مطالعه حاضر است (۳۵). میرزایی و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که تمامی سویه های *پروتئوس میرابیلیس* جداسازی شده از نمونه های ادراری واجد ژنهای *mrpA* و *hpmA* بودند و فراوانی ژنهای *zapA* و *pta* نیز محدود به ۹۸/۲ و ۹۵/۵ درصد سویه ها بود (۳۳). وجود ژنهای رمزکننده فیمبریه در یک سویه *پروتئوس میرابیلیس* نشان دهنده اهمیت این ژنها در کلنیزاسیون سویه ها می باشد. همچنین، به نظر می رسد که حضور ژن *mrpA* در کنار ژنهای *zapA* و *zapD* نقش مهمی در تشکیل بیوفیلم در سویه های *پروتئوس میرابیلیس* ایفا می نماید (۳۹). از طرف دیگر، در مطالعات دیگر حضور ژن *hpmA* و عدم حضور ژن *hlyA* در سویه های *پروتئوس میرابیلیس* نشان داده شده است (۲۷, ۳۳, ۳۵).

HpmA که به عنوان یک همولیزین شناخته می شود توسط باکتری جهت آسیب رساندن به بافت کلیه توسط *پروتئوس میرابیلیس* مورد استفاده قرار می گیرد. همچنین سویه های *پروتئوس میرابیلیس* می توانند واجد ژن *hlyA* نیز باشند که فرآورده حاصل مشابه همولیزین HlyA در باکتری *اشرشیا کلای* است (۱۹)، که با توجه به عدم حضور این ژن در بسیاری از سویه های *پروتئوس میرابیلیس* در مطالعات مختلف می توان اذعان داشت که پروتئین HpmA به عنوان همولیزین اصلی در *پروتئوس میرابیلیس* شناخته می شود و پروتئین HlyA می تواند به عنوان هولیزین کمکی در این سویه ها مورد استفاده قرار گیرد.

محدودیتهای مطالعه

بزرگترین محدودیت در این مطالعه ناشی از عدم همکاری بیمارستانهای مخلف در ارائه ایزوله های جداسازی شده از نمونه های ادراری بود که همین امر باعث محدود شدن زمان مطالعه و در نهایت کاهش تعداد ایزوله های مورد مطالعه گردید. طبیعتا انجام مطالعه در یک بازه زمانی گسترده تر و در اختیار داشتن تعداد ایزوله های بیشتر می تواند باعث افزایش کیفیت کار و نتیجه گیری با اطمینان بیشتر به دلیل بررسی ایزوله های بیشتر خواهد شد. از طرف دیگر، با توجه به معیارهای متفاوتی که در منابع مختلف به عنوان شاخص برای عفونت ادراری در نظر گرفته شده است، بنابراین به منظور جلوگیری از ایجاد ناهمگونی در مطالعه سعی شد که از معیارهای مختلف جهت ارزیابی بیماران استفاده شود. لذا تمامی بیماران واجد علائم ذکر شده در قسمت نمونه گیری به عنوان بیماران مشکوک به عفونت ادراری در نظر گرفته شدند.

نتیجه‌گیری

شیوع بالای سویه های *پروتئوس میرابیلیس* مولد بیوفیلم واجد طیف وسیعی از عوامل حدت در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در بیمارستان مورد مطالعه در اصفهان، نشان دهنده انتشار کلونال سویه های بیماریزای مولد بیوفیلم در اصفهان و همچنین اهمیت سویه های *پروتئوس میرابیلیس* به عنوان یک تهدید بالقوه برای سلامت بیماران است. بنابراین، اتخاذ تصمیمات پیشگیرانه و ارائه تمهیدات کنترل عفونت مؤثر جهت حذف و ممانعت از گسترش بیشتر این سویه ها در بیمارستانها و جامعه از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. با توجه به اینکه بسیاری از عفونتهای ادراری ایجاد شده توسط *پروتئوس*

میرابیلیس اوروپاتوژنتیک به صورت عودشونده بروز می کنند که این عفونتها نتیجه تشکیل بیوفیلم و مقاوم شدن باکتری به شرایط نامساعد محیطی از جمله آنتی بیوتیکها و عوامل ضد میکروبی است، بنابراین بررسی و ارزیابی توانایی تولید بیوفیلم توسط سویه ها، درمان صحیح و اصولی عفونتهای ادراری بر اساس تعیین الگوی مقامت آنتی بیوتیکی سویه ها با استفاده از دیسکهای آنتی بیوتیکی استاندارد و بر اساس دستورالعمل CLSI در آزمایشگاه ها و همچنین تایپینگ مولکولی سویه ها جهت تعیین انتشار کلونال آنها می تواند کمک شایانی به حذف و ریشه‌کنی عامل مولد عفونت و جلوگیری از تشکیل عفونتهای عودشونده کند.

تأییدیه اخلاقی

پژوهش حاضر توسط کارگروه/ کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه اصفهان (IR.UI.REC.1401.126) مورد ارزیابی و تأیید قرار گرفت.

منابع مالی

نتایج ارائه شده در این مقاله بخشی از پایان نامه دکترای تخصصی آقای مهدی چوری می باشد که با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان به انجام رسیده است.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافعی بین نویسندگان این مقاله وجود ندارد.

REFERENCE

1. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nature Reviews Microbiology. 2015;13(5):269-84.
2. Zagaglia C, Ammendolia MG, Maurizi L, Nicoletti M, Longhi C. Urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli* strains-new strategies for an old pathogen. Microorganisms. 2022;10(7):1425.
3. Foxman B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. Infectious Disease Clinics. 2014;28(1):1-13.
4. Alperin M, Burnett L, Lukacz E, Brubaker L. The mysteries of menopause and urogynecologic health: clinical and scientific gaps. Menopause (New York, NY). 2019;26(1):103.
5. Lichtenberger P, Hooton TM. Complicated urinary tract infections. Current Infectious Disease Reports. 2008;10(6):499-504.
6. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Genetic diversity and virulence characteristics of biofilm-producing uropathogenic *Escherichia coli*. International Microbiology. 2022;25(2):297-307.
7. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Clonal groups of extended-spectrum β-lactamase and biofilm producing uropathogenic *Escherichia coli* in Iran. Pathogens and Global Health. 2022;116(8):485-97.
8. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Frequency of biofilm producing *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infection in Isfahan, 2017. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2020;25(88):37-47.
9. Kalinderi K, Delkos D, Kalinderis M, Athanasiadis A, Kalogiannidis I. Urinary tract infection during pregnancy: current concepts on a common multifaceted problem. Journal of Obstetrics and Gynaecology. 2018;38(4):448-53.
10. Rahimi F, Katouli M, Karimi S. Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. Microbial Pathogenesis. 2016;98:69-76.
11. Rahimi F. Molecular characteristics of biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates causing urinary tract infections. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2018;13(6):e61704.
12. Yuan F, Huang Z, Yang T, Wang G, Li P, Yang B, et al. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* in catheter-associated urinary tract infections. Urologia Internationalis. 2021;105(5-6):354-61.
13. Wasfi R, Hamed SM, Amer MA, Fahmy LI. Proteus mirabilis biofilm: Development and therapeutic strategies. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2020;10:414.
14. Jacobsen S, Stickler DJ, Mobley HL, Shirtliff M. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. Clinical Microbiology Reviews. 2008;21(1):26-59.
15. Jones SM, Yerly J, Hu Y, Ceri H, Martinuzzi R. Structure of *Proteus mirabilis* biofilms grown in artificial urine and standard laboratory media. FEMS Microbiology Letters. 2007;268(1):16-21.
16. Chen C-Y, Chen Y-H, Lu P-L, Lin W-R, Chen T-C, Lin C-Y. *Proteus mirabilis* urinary tract infection and bacteremia: risk factors, clinical presentation, and outcomes. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2012;45(3):228-36.

17. Scavone P, Iribarnegaray V, González MJ, Navarro N, Caneles-Huerta N, Jara-Wilde J, et al. Role of *Proteus mirabilis* flagella in biofilm formation. Revista Argentina de Microbiología. 2023;55(3):226-34.
18. Grahl MV, Uberti AF, Broll V, Bacaicoa-Caruso P, Meirelles EF, Carlini CR. *Proteus mirabilis* urease: Unsuspected non-enzymatic properties relevant to pathogenicity. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(13):7205.
19. Sanches MS, Baptista AAS, de Souza M, Menck-Costa MF, Koga VL, Kobayashi RKT, et al. Genotypic and phenotypic profiles of virulence factors and antimicrobial resistance of *Proteus mirabilis* isolated from chicken carcasses: potential zoonotic risk. Brazilian Journal of Microbiology. 2019;50:685-94.
20. Zhang W, Niu Z, Yin K, Liu P, Chen L. Quick identification and quantification of *Proteus mirabilis* by polymerase chain reaction (PCR) assays. Annals of Microbiology. 2013;63(2):683-9.
21. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Biofilm formation and frequency of fimbrial genes among *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infection in Zahedan during 2017. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2020;25(91):1-14.
22. Stepanović S, Ćirković I, Ranin L, S✓ vabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and L*isteria monocytogenes* on plastic surface. Letters in Applied Microbiology. 2004;38(5):428-32.
23. Claeys KC, Blanco N, Morgan DJ, Leekha S, Sullivan KV. Advances and challenges in the diagnosis and treatment of urinary tract infections: the need for diagnostic stewardship. Current Infectious Disease Reports. 2019;21:1-9.
24. Marantidis J, Sussman RD. Unmet needs in complicated urinary tract infections: challenges, recommendations, and emerging treatment pathways. Infection and Drug Resistance. 2023:1391-405.
25. Chu CM, Lowder JL. Diagnosis and treatment of urinary tract infections across age groups. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2018;219(1):40-51.
26. Abdulla A, Ewoldt T, Hunfeld N, Muller A, Rietdijk W, Polinder S, et al. The effect of therapeutic drug monitoring of beta-lactam and fluoroquinolones on clinical outcome in critically ill patients: the DOLPHIN trial protocol of a multi-centre randomised controlled trial. BMC Infectious Diseases. 2020;20(1):1-9.
27. Cestari SE, Ludovico MS, Martins FH, da Rocha SPD, Elias WP, Pelayo JS. Molecular detection of HpmA and HlyA hemolysin of uropathogenic *Proteus mirabilis*. Current Microbiology. 2013;67(6):703-7.
28. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. International Journal of Antimicrobial Agents. 2010;35(4):322-32.
29. Tseng BS, Zhang W, Harrison JJ, Quach TP, Song JL, Penterman J, et al. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. Environmental Microbiology. 2013;15(10):2865-78.
30. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Association between biofilm production and antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary infection in Isfahan during 2017. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2023;28(102):39-53.
31. de Oliveira WD, Barboza MGL, Faustino G, Inagaki WTY, Sanches MS, Kobayashi RKT, et al. Virulence, resistance and clonality of *Proteus mirabilis* isolated from patients with community-acquired urinary tract infection (CA-UTI) in Brazil. Microbial Pathogenesis. 2021;152:104642.
32. Fusco A, Coretti L, Savio V, Buommino E, Lembo F, Donnarumma G. Biofilm formation and immunomodulatory activity of *Proteus mirabilis* clinically isolated strains. International Journal of Molecular Sciences. 2017;18(2):414.

33. Mirzaei A, Habibi M, Bouzari S, Asadi Karam MR. Characterization of antibiotic-susceptibility patterns, virulence factor profiles and clonal relatedness in *Proteus mirabilis* isolates from patients with urinary tract infection in Iran. Infection and Drug Resistance. 2019;27(12):3967-79.
34. Shikh Bardsiri H, Shekibaei M, Amini Kafiabadi S. Plasmid pattern of biofilm producing *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* among clinical isolates in Kerman university hospitals during 2011-2012. Journal of Kerman University of Medical Sciences. 2013;20(2):146-57.
35. Tabatabaei A, Ahmadi K, Shabestari AN, Khosravi N, Badamchi A. Virulence genes and antimicrobial resistance pattern in *Proteus mirabilis* strains isolated from patients attended with urinary infections to Tertiary Hospitals, in Iran. African Health Sciences. 2021;21(4):1677-84.
36. Sosa V, Schlapp G, Zunino P. *Proteus mirabilis* isolates of different origins do not show correlation with virulence attributes and can colonize the urinary tract of mice. Microbiology. 2006;152(7):2149-57.
37. Rocha SP, Elias WP, Cianciarullo AM, Menezes MA, Nara JM, Piazza RM, et al. Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2007;51(2):319-26.
38. Pathirana H, De Silva B, Wimalasena S, Hossain S, Heo G. Comparison of virulence genes in *Proteus* species isolated from human and pet turtle. Iranian Journal of Veterinary Research. 2018;19(1):48-52.
39. Chen H-H, Chang C-C, Yuan Y-H, Liaw S-J. A *cpx*R-regulated *zap*D gene involved in biofilm formation of uropathogenic proteus mirabilis. Infection and Immunity. 2020;88(7):e00207-20.