



## Evaluation of the effect of Myristic acid and iron nanoparticles on the expression of *Proteus Mirabilis* pathogenic genes

Zeinab Ashenagar<sup>1</sup>, Kumarss Amini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Biology Science, Falavarjan Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

### Abstract

**Background & Objectives:** The present study aimed to investigate the effect of myristic acid and iron nanoparticles on the expression of pathogenic genes of *Proteus mirabilis* isolated from urine samples.

**Materials & Methods:** In this cross-sectional study, 20,000 urine samples were collected from patients referred to hospitals and clinics for 6 months. After detecting *Proteus mirabilis* using standard methods, they were tested for antibiotic resistance. After determining the bacteria with target gene, iron nanoparticles and myristic acid were treated and the expression of *flaA* and *ureA* genes in these bacteria was examined by real time PCR.

**Results:** Finally, 6219 positive samples were collected for urinary tract infections, of which 3937 (63.3%) were female and 2282 (36.7%) were male (mean age  $69 \pm 16$  years). 60 isolates of *Proteus mirabilis* were isolated, out of 60 clinical samples, *flaA* gene in 100% and *UreA* gene in 91.65% of isolated bacteria. The expression level of *flaA* gene in isolates treated with a mixture of myristic acid and iron nanoparticles was reduced by a quarter of normal in the isolates ( $p = 0.002$ ).

**Conclusion:** The data showed that iron oxide and meristic acid nanoparticles have strong antibacterial activity against *Proteus mirabilis* strains containing *flaA* gene and reduced flagellate gene expression. Therefore, these two substances can be considered as a basis for further studies in the field of infection control.

**Keywords:** Myristic acid, iron nanoparticles, *Proteus mirabilis*, *flaA*.

Received: 28 February 2021

Revised: 19 May 2021

Accepted: 16 August 2021

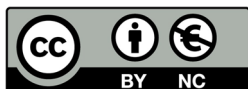
Correspondence to: Kumarss Amini

Tel: +98 9125454074

E-mail: [Dr\\_kumarss\\_amini@yahoo.com](mailto:Dr_kumarss_amini@yahoo.com)

Journal of Microbial World 2021, 14(2): 58-68

DOI: 10.30495/jmw.2021.690454



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



## بررسی تاثیر اسید میریستیک و نانوذرات آهن بر بیان ژن‌های بیماری‌زای پروتئوس میرابیلیس جدا شده از نمونه‌های ادراری

زینب آشناگر<sup>۱</sup>، کیومرث امینی<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران.

<sup>۲</sup> گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** مطالعه حاضر بر آن بوده است تا به بررسی تاثیر اسید میریستیک و نانوذرات آهن بر بیان ژن‌های بیماری‌زای پروتئوس میرابیلیس جدا شده از نمونه‌های ادراری بپردازد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مقطعی در طی ۶ ماه ۲۰۰۰۰ نمونه ادرار از مراجعه کنندگان به بیمارستان‌ها و درمانگاه‌ها جمع‌آوری شد. پس از شناسایی پروتئوس میرابیلیس با استفاده از روش‌های استاندارد، آن‌ها تحت بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی قرار گرفتند. پس از تعیین باکتری‌های دارای ژن هدف، تیمار با نانوذرات آهن و اسید میریستیک صورت گرفت و بیان ژن‌های *flaA* و *ureA* در این باکتری‌ها به روش Real time PCR بررسی گردید.

**یافته‌ها:** در نهایت تعداد ۶۲۱۹ نمونه مثبت از لحاظ عفونت ادراری جمع‌آوری شد که ۳۹۳۷ مورد (۶۳/۳٪) زن و ۲۲۸۲ مورد (۳۶/۷٪) مرد (میانگین سن ۱۶±۶۹ سال) بودند. ۶۰ جدایه پروتئوس میرابیلیس جداسازی شد که از مجموع ۶۰ نمونه بالینی، ژن *flaA* در ۱۰۰٪ و ژن *UreA* در ۶۵/۹۱٪ باکتری‌های جداسازی شده وجود داشت. سطح بیان ژن *flaA* در جدایه‌های تیمار شده با مخلوط اسید میریستیک و نانوذره آهن به میزان یک چهارم حالت عادی در جدایه‌ها کاهش یافته بود ( $p=0.002$ ).

**نتیجه‌گیری:** داده‌ها اثبات نمود که نانوذرات اکسید آهن و اسید میریستیک دارای فعالیت ضد باکتری قوی در برابر سویه‌های پروتئوس میرابیلیس واجد ژن *flaA* هستند و باعث کاهش بیان ژن تاژک شدند. بنابراین این دو ماده می‌توانند به عنوان زمینه‌ای برای مطالعات بیشتر در زمینه کنترل عفونت‌ها در نظر گرفته شوند.

**واژگان کلیدی:** اسید میریستیک، نانوذرات آهن، پروتئوس میرابیلیس، *flaA*.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۵/۲۵

ویرایش مقاله: ۱۴۰۰/۲/۲۹

دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۱۲/۱۰

### مقدمه

یکی از دلایل اصلی مرگ و همچنین افزایش دوران نقاهت می‌باشد (۲۱). یکی از مهم‌ترین عفونت‌های بیمارستانی، عفونت دستگاه ادراری است. عفونت دستگاه ادراری (Urinary tract infection)، نوعی عفونت باکتریایی است که بر بخشی از دستگاه ادراری تأثیر می‌گذارد. (۴ و ۳) هنگامی که عفونت، دستگاه ادراری تحتانی را مبتلا می‌کند سیستم ساده

عفونت بیمارستانی به عفونتی اطلاق می‌شود که طی حداقل ۴۸ تا ۷۲ ساعت بعد از پذیرش و بستری در بیمارستان اتفاق بیفتد. امروزه به علت بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عفونت بیمارستانی

\* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران.  
تلفن: ۰۹۱۲۵۵۵۰۷۴  
پست الکترونیک: Dr\_kumarss\_aminini@yahoo.com



جهان حاکی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی پروتئوس میرابیلیس و بروز سویه‌های مقاوم به چند دارو است که با ایجاد بیوفیلیم بر روی کاترها و مسدود کردن آن‌ها بیماران بستری را آلوده می‌سازد. این اطلاعات علاوه بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سایر گونه‌ها موجب شده است تا دانشمندان و شرکت‌های دارویی با تمرکز بر فلزات سنگین و فراورده‌های طبیعی به دنبال داروهای جایگزین باشند (۱۱ و ۹).

نانوذرات و متابولیت‌ها از مهم‌ترین فراورده‌های طبیعی به شمار می‌روند. توانایی خزیدن پروتئوس میرابیلیس روی آگار و تشکیل کلنی‌های بسیار منظم و لبه‌دار در نتیجه تمایزهای دوره‌ای سلول‌های رویشی به سلول‌های خزننده رخ می‌دهد و ویژگی برجسته این باکتری است (۱۲ و ۱۳). داده‌ها نشان داده که ممکن است ترکیباتی مانند پلی ساکاریدها و اسیدهای چرب یا ترکیبات ماتریکس خارج سلولی بر خزیدن پروتئوس میرابیلیس اثر بگذارند (۱۴).

اسید میریستیک (Myristic acid) اسیدی چرب و هیدروفوب است که در بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیک به عنوان یک سیگنال خارجی برای تحریک به خزیدن در این باکتری به کار رفته است (۱۵ و ۱۶). از سوی دیگر نانوذره به ذراتی اطلاق می‌شود که ابعاد آن کمتر از ۱۰۰ نانومتر باشد.

نانو ذرات اکسید آهن ( $Fe_2O_3$ ) به دلیل خواص منحصر به فرد و خاصیت سازگاری زیستی و مغناطیسی، سهم بسیاری در تحقیقات اخیر داشته است. نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن به دلیل پایداری شیمیایی بالا، زیست سازگاری مطلوب و نیز فرآیند تولید نسبتاً ساده، در زمینه پزشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته اند (۱۷). نقش نانوذرات آهن در تثبیت آنزیم‌ها، جداسازی پروتئین‌ها، صنایع غذایی، سیستم‌های دارورسانی و اثرات ضد باکتریایی آن در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است (۱۸ و ۱۹).

مطالعه حاضر بر آن بوده است تا به بررسی تاثیر اسید میریستیک و نانو ذرات آهن بر بیان ژن‌های بیماری‌زای پروتئوس میرابیلیس جدا شده از نمونه‌های ادراری در جمعیت ایرانی بپردازد.

(عفونت مثانه) نامیده می‌شود و هنگامی که بر دستگاه ادراری فوقانی تأثیر می‌گذارد، به آن پیلونفریت (عفونت کلیه) گفته می‌شود. بررسی‌های آماری نشان داده است که بیش از ۸۰ درصد عفونت‌های دستگاه ادراری ناشی از عفونت با خانواده انتروباکتریاسه به خصوص /شیشیا کلی، پروتئوس‌ها و کلبسیلا پنومونیه است. استافیلوکوکوس‌ها به خصوص گونه ساپروفیتیکوس علت ۵ تا ۱۰ درصد از موارد دیگر را تشکیل می‌دهند (۶ و ۴).

در این بین پروتئوس میرابیلیس به عنوان عامل عفونت‌های ادراری بدون علامت، به خصوص در افراد مسن یا مبتلا به دیابت نوع ۲ شناخته می‌شود. این عفونت‌ها می‌توانند در شرایط خاص به باکتری می و یا سپتی‌سمی نیز تبدیل شوند که به شدت مرگ آور هستند (۷). علاوه بر این، عفونت‌های پروتئوسی به علت قابلیت تخمیر اوره در این باکتری توانایی قلیائی کردن ادرار و ایجاد سنگ مجاری ادراری را نیز دارا هستند که گاهی موجب انسداد مجاری ادراری می‌شوند و با پنهان شدن باکتری درون آن نقش محافظتی نیز پیدا می‌کنند.

از مهمترین عواملی که در بیماری‌زایی این باکتری موثرند، می‌توان به تاژک و آنزیم اوره‌آز باکتری اشاره کرد که در کنار خزیدن در سطح محیط جامد از ویژگی‌های پروتئوس‌ها به شمار می‌روند (۷ و ۸). اوره‌آز باکتری یک متالو آنزیم سیتوپلاسمی است که به عنوان هیدرولیز کننده اوره به آمونیاک و دی اکسید کربن عمل می‌کند. آمونیاک حاصل به عنوان منبع ازت مناسب برای اکثر باکتری‌ها قابل استفاده است، که شرایط را برای زیست سایر باکتری‌های فرصت طلب فراهم می‌سازد. این نکته باعث می‌شود که پروتئوس میرابیلیس به عنوان نقطه کانونی مهم برای سایر باکتری فرصت طلب عمل کند که در عفونت‌های ادراری دخیل هستند در پروتئوس میرابیلیس، آنزیم اوره آز به وسیله اوپران UreDABCEFG (PMI3682-88) کد می‌شود (۹).

تاژک عامل مهم بیماری‌زایی پروتئوس میرابیلیس است که تنظیم بیان ژن‌های آن، به ژن اصلی تنظیم کننده کلاس ۱ تاژکی (flhDC) وابسته است. گزارشات مختلف در مکان‌های مختلف

## مواد و روش‌ها

در محیط مولر هیتون آگار ارزیابی شد. آنتی‌بیوتیک‌های آزمون شده شامل: دیسک جنتامیسین (۱۵ میکروگرم/ دیسک)، سیپروفلوکساسین (۳۰ میکروگرم/ دیسک)، نیتروفورانتوین (۱۵ میکروگرم/ دیسک) و دیسک سفوتاکسیم، اسید کلاوونیک (۱۰ میکروگرم/ دیسک) بودند. در این روش سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند بر روی محیط مولر هیتون آگار تلقیح شد. پس از گذاشتن دیسک‌ها در محیط کشت و ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله عدم رشد برای هر آنتی‌بیوتیک مطابق با دستورالعمل مربوطه به عنوان حساس، حساسیت نسبی و مقاوم ثبت شد.

ج) بررسی مولکولی: در نهایت تعداد ۱۲ نمونه پروتئوس میرابیلیس مقاوم به چند دارو انتخاب شده و مورد بررسی‌های مولکولی قرار گرفتند. جهت رشد مجدد باکتری‌ها از محیط Brain Heart Infusion (BHI) Broth استفاده شد و سپس کلنی‌ها برای استخراج DNA در محیط LB Broth کشت گردیدند. در نهایت از کیت اختصاصی استخراج DNA (CinnaGen, Iran) و طبق دستورالعمل سازنده، استخراج ژنوم باکتری صورت گرفت. سپس به منظور بررسی کمی و کیفی DNA جدا شده روش‌های اسپکتروفتومتری با نانودراپ و الکتروفورز در ژل انجام شده که تایید کننده کمیت و کیفیت ژنوم جدا شده در همه نمونه‌ها بود. پرایمرهای استفاده شده (ماکوژن، ایران) برای ردیابی ژن‌های *flaA*, *ureA* در باکتری‌های پروتئوس میرابیلیس شامل جدول ۱ می‌شود که توسط نرم‌افزار Gene runner طراحی شده و در سایت NCBI بلاست گردیده بود.

د) آزمون مولتی‌پلکس *PCR*: آزمون مولتی‌پلکس *PCR* با

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه.

ژن هدف	جفت باز	توالی پرایمر
<i>flaA</i>	417 bp	F=5'-ATAATCGGCGACAGGATAGC-3' R=5'-CAGTATCGGTGAGTGGCTGT-3'
<i>ureA</i>	362bp	F=5'-CTAGGAATTCACGCCAAGGACGCCAAC-3' R=5'-CTAGGGAGAGAATGGCAGAAAGTC-3'

الف) نمونه‌گیری و جداسازی باکتری: این تحقیق مطالعه‌ای توصیفی - مقطعی (Cross-Sectional) بود که به روش توصیفی تحلیلی، طراحی و اجرا گردید. در این مطالعه به مدت یک سال ۲۰۰۰۰ نمونه ادرار از مراجعه کنندگان سرپایی و بیماران بستری در بیمارستان‌های امام حسین، شهید لبافی نژاد، بیمارستان فیروزگر، بیمارستان الغدیر، بیمارستان رسالت، بیمارستان مطهری شهر تهران و مراجعین به آزمایشگاه شهرداری منطقه ۱۳، ۱۴، ۸، ۲۱ و ۱۲ این شهر، جمع آوری شد. پس از تشخیص اولیه عفونت، کشت روی محیط بلادآگار و EMB (Mirmedia, Iran) و رنگ آمیزی گرم، از این مراکز با حفظ نکات ایمنی و پوشش پلیت‌ها با پارافیلیم جمع‌آوری گردید. نمونه‌های دارای مقادیر ۱۰۰۰۰۰ یا بیشتر از باکتری به عنوان عفونت ادراری در نظر گرفته شد و مجدد در آزمایشگاه درمانگاه شهرداری منطقه ۱۳ روی محیط بلادآگار و EMB کشت داده شد تا برای مراحل بعدی آماده گردد. پس از بررسی‌های میکروسکوپی و تایید خالص بودن کشت باکتری‌های گرم منفی، تست‌های تشخیصی افتراقی از جمله تست حرکت، MRVP، SIM، TSI و سیمون سیترات برای باکتری‌ها انجام شد.

برای بررسی تاثیر نانوذرات آهن (۲۰ نانوگرمی) و اسید میریستیک بر روی حرکت باکتری‌ها از اسید میریستیک تجاری با خلوص ۹۹ درصد و غلظت‌های ۱۴، ۲۸، ۵۶ و ۱۱۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات Fe2O3 تهیه شده به صورت تجاری در محیط LB (Luria Bertani Broth)، به صورتی که در مقاله دیگری توضیح داده شده است، استفاده شد (۱۳ و ۱۵). در نهایت بعد از نمونه‌گیری از ادرار میانی، کشت و استفاده از روش‌های استاندارد تعیین هویت، ۶۰ سویه پروتئوس میرابیلیس از این نمونه‌ها جداسازی گردید.

ب) آزمون تعیین حساسیت جدا به نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها: مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی ساخت شرکت پادتن طب، ایران، بر اساس دستورالعمل CLSI 2018 و با استفاده از روش انتشار دیسک

حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت شرکت Genet bio CAT. NO: Q9210) کره جنوبی به صورت زیر انجام شد: ۱۰ میکرولیتر از Prime Qmaster mix (2x) دارای سایبرگرین، ۵ میکرولیتر از diethylpyrocarbonate (DEPC) water، یک میکرولیتر از پرایمر فوروارد، یک میکرولیتر از پرایمر ریورس، یک میکرولیتر از Rox dye و ۲ میکرولیتر از CDNA استفاده شد.

تکثیر قطعه‌های مورد نظر در دستگاه Corbet (Corbet, Australia) با برنامه دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، تکثیر شامل ۹۵ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سلسیوس برای مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن خانگی بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد.

#### یافته‌ها

الف) جداسازی باکتری و مقاومت آنتی‌بیوتیکی: در این مطالعه از ۲۰۰۰۰ بیمار مراجعه کننده، تعداد ۶۲۱۹ نمونه مثبت از لحاظ عفونت ادراری جمع‌آوری شد که از آن میان، ۳۹۳۷ مورد (۶۳/۳٪) زن و ۲۲۸۲ مورد (۳۶/۷٪) مرد بودند. میانگین سنی بیماران از  $16 \pm 69$  سال بود که بیشترین میانگین سنی بین ۳۸-۲۵ سال بود.

در این مطالعه پس از انجام تست‌های میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی روتین و استاندارد بر روی ۶۲۱۹ نمونه مثبت جمع‌آوری شده، ۶۰ جدایه (۹۶/۰٪) پروتئوس میرابیلیس بدست آمد.

تمامی مبتلایان به عفونت پروتئوس ادراری مسن تر از ۴۸ سال بودند و از طرفی ۸۶ درصد این افراد از سوند ادراری استفاده می‌کردند. نمودار ۱ توزیع فراوانی سویه‌های باکتریایی بدست آمده از نمونه‌های مثبت از لحاظ عفونت ادراری را نمایش می‌دهد.

باکتری‌های با تست حرکت مثبت، تولید H<sub>2</sub>S مثبت، اوره‌آز مثبت، تخمیر گلوکز مثبت، و تست‌های تخمیر لاکتوز و ایندول منفی به عنوان پروتئوس میرابیلیس در نظر گرفته می‌شوند.

مقادیر مواد ۱۰ میکرولیتر (PCR Master Mix 2x (Amplicon)، ۰/۸ میکرولیتر از هر کدام یک از پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر و ۴ میکرولیتر از DNA الگو (۱۵۰ نانوگرم) برای هر واکنش در مراحل دمایی، دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، و پس از ۳۵ چرخه مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت.

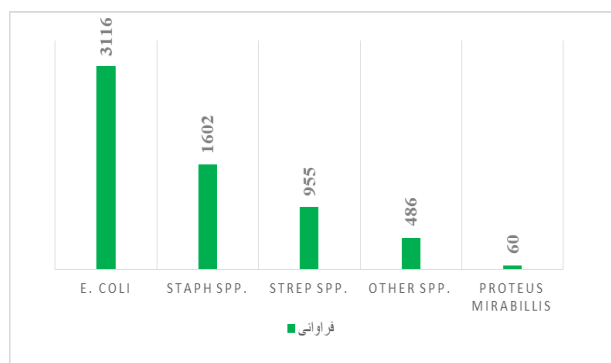
برای تکثیر قطعات ژنی مورد مطالعه از دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) استفاده شد. به منظور ردیابی قطعه ژنی تکثیر یافته در PCR از الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگاروز استفاده شد. در این مرحله ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR مربوط به هر مرحله از آزمایش در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (سیناژن، ایران) روی ژل ۱/۵ درصد آگاروز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۷۶ ولت به مدت در حدود ۳۲ دقیقه الکتروفورز و پس از مشاهده ژل به دست آمده با دستگاه ژل داگ از آن عکسبرداری شد.

ه) تعیین میزان بیان ژن *flaA* در حضور نانوذرات آهن و اسید مریستیک: قبل از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به میزان ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌گرم از نانوذره آهن و اسید مریستیک تهیه شده به صورت تجاری، در حجم ۲۰ میلی‌لیتر از BHI برات ریخته و معادل نیم مک فارلند به آن باکتری پروتئوس میرابیلیس *flaA* مثبت اضافه شد.

پس از ۱۵ ساعت نگهداری (Late lag phase) که بهترین مرحله برای استخراج RNA است، استخراج RNA توسط کیت اختصاصی (IAamp RNA Mini Kit, Germany) با توجه به دستورالعمل آن انجام شد. با تایید کیفیت RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ، سنتز cDNA با استفاده از آنزیم Avian Myeloblastosis Virus (AMV) Reverse Transcriptase با غلظت 25 μl/unit توسط کیت اختصاصی آن (Roche, Germany) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در

نتایج تست حرکت باکتری در حضور نانوذره آهن و اسید میریستیک در محیط کشت در جدول ۲ آمده است.

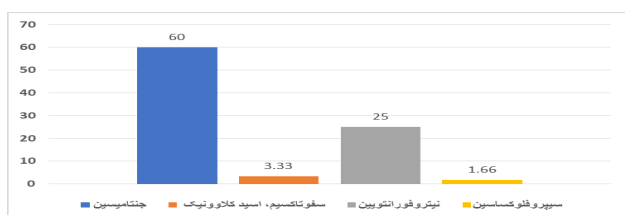
در داده‌ها نشان داده شده که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (Gentamicin) رخ داده است همچنین ذرات نانو آهن با قطر کمتر از ۲۰ نانومتر در دوزهای ۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خواص ضد میکروبی نسبتاً خوبی دارد و تقریباً از رشد اکثر نمونه‌ها جلوگیری به عمل آورد.



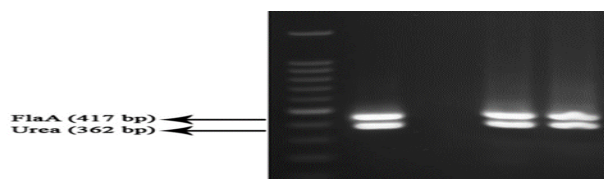
نمودار ۱: نمودار فراوانی باکتری‌ها در کشت‌های مثبت.

جدول ۲: نتایج بررسی توانایی خزیدن باکتری پروتئوس میرابیلیس در حضور رقت‌های نانوذره آهن و اسید میریستیک در محیط کشت.

شماره نمونه	پلیت فاقد اسید میریستیک + نانوذره آهن	پلیت حاوی رقت ۲۰ میکرولیتر اسید میریستیک + نانوذره آهن	پلیت حاوی رقت ۴۰ میکرولیتر اسید میریستیک + نانوذره آهن	پلیت حاوی رقت ۶۰ میکرولیتر اسید میریستیک + نانوذره آهن
۴۵	دارای رشد	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر از رقت ۴۰ میکرولیتر
۱	دارای رشد	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر از رقت ۴۰ میکرولیتر
۳۹	دارای رشد	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر از رقت ۴۰ میکرولیتر
۴۴	دارای رشد	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر از رقت ۴۰ میکرولیتر
۴۲	دارای رشد	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر از رقت ۴۰ میکرولیتر
۱۳	دارای رشد	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر از رقت ۴۰ میکرولیتر
۲۱	دارای رشد	بدون رشد	بدون رشد	بدون رشد
۳۱	دارای رشد	دارای رشد	دارای رشد	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر
۱۹	دارای رشد	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر از رقت ۴۰ میکرولیتر
۱۷	دارای رشد	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر از رقت ۴۰ میکرولیتر
۳۰	دارای رشد	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر از رقت ۴۰ میکرولیتر
۲۲	دارای رشد	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر از رقت ۴۰ میکرولیتر
۳۷	دارای رشد	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر از رقت ۴۰ میکرولیتر
۳۵	دارای رشد	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر از رقت ۴۰ میکرولیتر
۵۰	دارای رشد	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر از رقت ۴۰ میکرولیتر
۲۰	دارای رشد	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر	دارای رشد و تعداد حلقه کمتر از رقت ۴۰ میکرولیتر



نمودار ۲: درصد فراوانی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در این مطالعه.



شکل ۱: آزمایش M-PCR پروتئوس میرابیلیس، به ترتیب از چپ به راست: ستون مارکر DNA plus 100 bp، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه شماره ۱۳، نمونه شماره ۱۴.

ب) نتایج بررسی‌های مولکولی: محصولات استخراج ژنوم تمامی سویه‌ها به منظور تایید محصول DNA بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد. با توجه به نتایج به دست آمده از مجموع ۶۰ نمونه بالینی، ژن flaA در ۱۰۰٪ و ژن UreA در ۶۵/۹۱٪ باکتری‌های جداسازی شده وجود داشت. نتایج حاصل از تکثیر برخی از این نمونه‌ها در تصویر ۳ نشان داده شده‌اند.

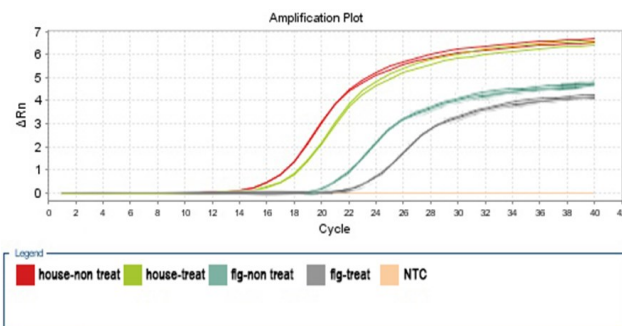
نتایج آنالیز Real-Time-PCR نشان داد که بهترین دمای منحنی ذوب (Melting curve)، ۸۵/۳۴ درجه سلسیوس بود. همچنین نتایج نشان داد که سطح بیان ژن flaA در جدایه‌های تیمار شده با مخلوط اسید میریستیک و نانوذره آهن نسبت به جدایه‌های تیمار نشده، پایین‌تر بوده است. که از نظر آماری نشان دهنده نقش مثبت تیمار در کاهش بیان ژن flaA به میزان یک چهارم

همکاران (۲۲) و حبیبی و همکارانش (۲۳) مطابقت دارد. بررسی‌ها در ایران و جهان نشان داده است که استفاده بیش از حد داروهای ضد میکروبی سولفانامیدها و تری‌متوپریم برای درمان عفونت ادراری باعث ایجاد مقاومت و عدم موفقیت درمان می‌شود. از طرفی بروز سنگ‌های ادراری رو به افزایش است. بررسی الگوی مقاومت دارویی باکتری پروتئوس میرابیلیس در این مطالعه نیز موید این موضوع است. علاوه بر این در مطالعه حاضر، pH ادرار ۲۰ درصد نمونه‌های حاوی پروتئوس میرابیلیس اسیدی گزارش شد که بعداً در تست‌های تکمیلی تست اوره‌آز ۳/۳ درصد پروتئوس‌های جدا شده نیز منفی بود که به نظر می‌رسد این اتفاق نتیجه موتانت‌های فاقد عملکرد اوره‌آزی باشد. تحقیقات برجی و همکارانش تحت عنوان پروتئوس میرابیلیس و رابطه آن با سنگ‌های کلیوی در ایران و تحقیق Smith و همکارانش (۲۴) در سال ۲۰۱۹، در جهت یافته‌های پیرامون pH ادرار در این پژوهش می‌باشد. در این تحقیقات ذکر شده است که pH گروه بیماران دچار سنگ کلیه و حاوی پروتئوس میرابیلیس به میزان قابل توجهی قلیایی‌تر از گروه شاهد (سالم و فاقد عفونت ادراری) بوده است که در جهت مطالعه حاضر است.

یافته‌های شگری و همکاران (۲۵) تحت عنوان جداسازی و شناسایی انتروباکتریاسه‌ها و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها که در سال ۲۰۱۳ انجام شده نشان می‌دهد ۰/۸۳ درصد کشت‌های مثبت متعلق به پروتئوس میرابیلیس بوده که این فراوانی در پژوهش حاضر ۰/۹۶ درصد است. علاوه بر این حرکت خزیدن در باکتری‌های پروتئوس میرابیلیس جدا شده در پژوهش حاضر به میزان قابل توجهی در غلظت‌های ۶۰ میکرولیتر از اسید میریستیک و نانو ذرات آهن کاهش یافت. این موضوع با کمتر شدن تعداد حلقه‌های رشد ثبت گردید.

در این پژوهش نشان داده شده ذرات نانو آهن با قطر کمتر از ۲۰ نانومتر در دوزهای ۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خواص ضد میکروبی نسبتاً خوبی دارد و تقریباً از رشد اکثر نمونه‌ها جلوگیری به عمل آورد ( $p < 0.05$ ) امجدی و همکارانش (۲۶) در مطالعه‌ای مشابه در سال ۲۰۱۶ خواص ضد باکتری نانوذرات

حالت عادی در جدایه‌ها بوده است ( $p = 0.002$ ). سطح بیان ژن ureA در نمونه‌ها نسبت به گروه کنترل و ژن خانه دار تفاوت معنی داری نداشت.



نمودار ۳: منحنی تکثیر Real Time PCR ژن Fla در این مطالعه.

## بحث

پروتئوس‌ها باسیل‌های گرم منفی از گروه پروتئوباکتیریا، پلی‌مورف و دارای تاژک، متحرک، هوازی و بی‌هوازی اختیاری هستند. در برخی مواقع پروتئوس در انسان موجب عفونت ادراری و عفونت زخم می‌شود که در ۹۰٪ موارد علت آن عفونت با پروتئوس میرابیلیس است. همچنین آنزیم اوره‌آز این باکتری در تشکیل سنگ‌های کلیوی از جنس استروویت مؤثر است. در این بین، سه گونه پروتئوس ولگاریس، پروتئوس میرابیلیس و پروتئوس پیری پاتوژن‌های فرصت طلب انسانی هستند (۲۱ و ۲۷). در این پژوهش اثر اسید میریستیک و نانوذرات آهن بر بیان ژن‌های تاژک و اوره‌آز در پروتئوس میرابیلیس‌های جدا شده از نمونه‌های ادراری بررسی گردید.

برای این کار نمونه گیری از ۲۰۰۰۰ مراجع به بیمارستان‌های عمومی و آزمایشگاه‌های شهرداری در طی مدت ۶ ماه انجام شد. این تعداد نمونه در قیاس با پژوهش‌های پیشین در ایران، مقدار قابل توجهی محسوب می‌گردد، علاوه بر این‌ها، تعداد ۶۰ نمونه پروتئوس جدا شده از میان ۶۲۱۹ نمونه مثبت از نظر میکروبی با حداقل 50000 CFU به دست آمد. درصد زن به مرد در عفونت ادراری به طور کلی ۶۳/۳ به ۳۶/۷ بر آورد گردید که تقریباً برابر نسبتی معادل ۱/۷۲ می‌باشد. اما نسبت عفونت ادراری با پروتئوس میرابیلیس در زنان نسبت به مردان ۸/۳ به ۹۷/۸ می‌باشد که این نتایج با مطالعه بردسیری و

اینکه در این تحقیق باکتری‌های در حال رشد و همانندسازی با نانوذرات اکسید آهن و اسید میریستیک تیمار شده‌اند، می‌توان چنین استدلال کرد که احتمالاً در حین همانندسازی و همچنین در مکانیسم‌های ترمیمی که توسط آنزیم‌های مرتبط انجام می‌گیرد اختلال ایجاد می‌کند تا موجب جهش‌های متعدد در توالی بازی DNA شود.

### نتیجه گیری

با توجه به کاهش حرکت باکتری‌ها و سایر داده‌های به دست آمده در این مطالعه به نظر می‌رسد که نانوذرات آهن و میریستیک اسید با ایجاد جهش روی توالی ژن‌های درگیر در کنترل چرخه سلولی موجب کاهش بیان آن‌ها شده و در نتیجه چرخه سلولی را متوقف می‌نمایند. نتایج به دست آمده می‌تواند به عنوان شاخصه‌ای ضد باکتریایی موثر بر علیه پروتئوس میرابیلیس در این دو ماده به شمار رود.

### ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از تمامی مسئولان و کارکنان آزمایشگاه پاسارگاد کمال تشکر و قدردانی را دارند.

### تعارض منافع

وجود ندارد.

مس با قطر کمتر از ۲۰ نانومتر در دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم را بررسی کردند که معلوم شد در این نسبت‌ها رشد باکتری‌ها کاملاً متوقف گردیده است. علاوه بر این مطالعه مقایسه‌ای Agarwala و همکارانش در بررسی اثرات نانوذرات اکسید مس و آهن بر علیه پروتئوس میرابیلیس (۲۷) و مطالعه Raghunath و همکارانش (۲۸) در سال ۲۰۱۷ در توافق با نتایج مطالعه حاضر بوده است.

احمدی آبادی و همکاران در سال ۲۰۱۳ با بررسی ۱۰۰ نمونه پروتئوس میرابیلیس جدا شده از ادار، حضور باند ژن rsbA و تاثیر اسید میریستیک به روی خزیدن و تشکیل بیوفیلم نشان دادند ۷۰ درصد نمونه پروتئوس دارای ژن rsbA است و اسید میریستیک خزیدن پروتئوس میرابیلیس را در غلظت ۴۰ تا ۸۰ میکرولیتر کاهش می‌دهد (۲۹) که در توافق با نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده‌ی وجود سیستم تنظیمی پاسخ دهنده به سیگنال خارجی است.

Ali و همکارانش با بررسی ژن‌های فاکتور بیماری‌زایی به روش PCR در ۱۷۰ نمونه ادار جمع آوری شده، نشان دادند که ۳۰ جدایه (۶۴/۱۷٪) نمونه‌ها متعلق به پروتئوس میرابیلیس است، میزان ژن UreA (100%) و ژن flaA (%88.66) بوده است (۳۰). با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه ما، از مجموع ۶۰ نمونه بالینی فراوانی ژن flaA، ۱۰۰٪ و فراوانی ژن ureA، ۹۱/۶۵٪ می‌باشد. نتایج تحقیق ما با مطالعه Ali و همکاران در خصوص فراوانی ژن ureA و flaA همخوانی ندارد اما بالا بودن میزان فراوانی ژن flaA در مطالعه فعلی در مقایسه نتایج این محققین می‌تواند به اختلاف جغرافیایی و سال اجرای مطالعه نسبت داده شود.

نتایج آزمون Real Time PCR برای بررسی سطح بیان ژن‌های هدف در این مطالعه، در جهت یافته‌های Nahar و همکارانش (۲۱) و McCall و همکارانش (۳۱) نشان داد که بیان ژن flaA در جدایه‌های تیمار شده با نانوذرات آهن و میریستیک اسید نسبت به جدایه‌های تیمار نشده پایین‌تر بوده است که نشان دهنده نقش مثبت تیمار در کاهش بیان ژن‌های تازک در جدایه‌ها بوده است. با توجه به مطالعات قبلی در این زمینه و



## References

1. Herman-Bausier P, Dufrêne YF. Force matters in hospital-acquired infections. *Science*. 2018;359(6383):1464-5.
2. Ohannessian R, Gustin M-P, Bénet T, Gerbier-Colomban S, Girard R, Argaud L, et al. Estimation of extra length of stay attributable to hospital-acquired infections in adult ICUs using a time-dependent multistate model. *Crit Care Med*. 2018;46(7):1093-8.
3. Watson D, Spaulding AB, Dreyfus J. Risk-set matching to assess the impact of hospital-acquired bloodstream infections. *Am J Epidemiol*. 2019;188(2):461-6.
4. Redder J, Leth R, Møller JK. Analysing risk factors for urinary tract infection based on automated monitoring of hospital-acquired infection. *J Hosp Infect*. 2016;92(4):397-400.
5. Koksai I, Yilmaz G, Unal S, Zarakolu P, Korten V, Mulazimoglu L, et al. Epidemiology and susceptibility of pathogens from SMART 2011–12 Turkey: evaluation of hospital-acquired versus community-acquired urinary tract infections and ICU-versus non-ICU-associated intra-abdominal infections. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(5):1364-72.
6. Tandogdu Z, Wagenlehner FM. Global epidemiology of urinary tract infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2016;29(1):73-9.
7. Schaffer JN, Pearson MM. *Proteus mirabilis* and urinary tract infections. *Microbiology spectrum*. 2015;3(5).
8. Norsworthy AN, Pearson MM. From catheter to kidney stone: the uropathogenic lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Trends Microbiol*. 2017;25(4):304-15.
9. Rather PN. Methods for Transposon Mutagenesis in *Proteus mirabilis*. *Microbial Transposon Mutagenesis*: Springer; 2019. p. 81-5.
10. Jones B, Nzakizwanayo J. Genomic and Ecogenomic Characterization of *Proteus mirabilis* Bacteriophages. *Front Microbiol*. 2019;10:1-14.
11. Armbruster CE, Mobley HL, Pearson MM. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection. *EcoSal Plus*. 2018;8(1).
12. Saif S, Tahir A, Chen Y. Green synthesis of iron nanoparticles and their environmental applications and implications. *Nanomaterials*. 2016;6(11):209.
13. Siddiqi KS, ur Rahman A, Husen A. Biogenic fabrication of iron/iron oxide nanoparticles and their application. *Nanoscale research letters*. 2016;11(1):498.
14. Zhao X, Liu W, Cai Z, Han B, Qian T, Zhao D. An overview of preparation and applications of stabilized zero-valent iron nanoparticles for soil and groundwater remediation. *Water Res*. 2016;100:245-66.
15. Luo Z, Xie X, Qi Y, Wu Y. Hemolytic *Escherichia coli* Inhibits Swarming and Differentiation of *Proteus mirabilis*. *Curr Microbiol*. 2018;75(4):471-5.

16. Younis KM, Usup G, Ahmad A. Secondary metabolites produced by marine streptomyces as antibiofilm and quorum-sensing inhibitor of uropathogen *Proteus mirabilis*. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016;23(5):4756-67.
17. Tavakkoli M, Kallio T, Reynaud O, Nasibulin AG, Johans C, Sainio J, et al. Single-shell carbon-encapsulated iron nanoparticles: synthesis and high electrocatalytic activity for hydrogen evolution reaction. *Angewandte Chemie International Edition*. 2015;54(15):4535-8.
18. Varnell JA, Edmund C, Schulz CE, Fister TT, Haasch RT, Timoshenko J, et al. Identification of carbon-encapsulated iron nanoparticles as active species in non-precious metal oxygen reduction catalysts. *Nature communications*. 2016;7:12582.
19. Stefaniuk M, Oleszczuk P, Ok YS. Review on nano zerovalent iron (nZVI): from synthesis to environmental applications. *Chem Eng J*. 2016;287:618-32.
20. Córdova-Espinoza MG, Arana EDH, Giono-Cerezo S, Atanacio EGS, Tapia EC, Vázquez LIC, et al. First report of New Clonal groups ST706 and ST1088 from MDR *Klebsiella pneumoniae* Mexican strains. *bioRxiv*. 2019:616334.
21. Nahar A, Siddiquee M, Nahar S, Anwar KS, Islam S. Multidrug resistant-*Proteus mirabilis* isolated from chicken droppings in commercial poultry farms: bio-security concern and emerging public health threat in Bangladesh. *Journal of Biosafety & Health Education*. 2014.
22. Sheykh-Bardsiri H, Shakibaie M, Amini Kafiabad 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).
23. 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. *Yafteh*. 2018;20(3):28-38.
24. Smith SN, Himpl SD, Mobley HL. Vaccination to Protect Against *Proteus mirabilis* Challenge Utilizing the Ascending Model of Urinary Tract Infection. *Proteus mirabilis*: Springer; 2019. p. 201-15.
25. Shokri D, Mobasherizadeh S, Norouzi M, Yaran M. Isolation and Identification of Carbapenemase KPC Producing Strains of Enterobacteriaceae and Determination of Their Antibiotic Susceptibility Patterns. *Journal Of Isfahan Medical School*. 2013;31(248):1247-.
26. AMJADY F, GOLESTANI EB, KARIMI F. An investigation of the effect of copper nanoparticles on *E. coli* genome by RAPD molecular markers. 2015.
27. Agarwala M, Choudhury B, Yadav R. Comparative study of antibiofilm activity of copper oxide and iron oxide nanoparticles against multidrug resistant biofilm forming uropathogens. *Indian J Microbiol*. 2014;54(3):365-8.
28. Raghunath A, Perumal E. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49(2):137-52.

29. Ahmadi Badi S, Norouzi J, Akavan Sepahi A. Detection rsbA gene's band and amp effect of miristic acid in virulence of Proteus mirabilis isolated from urinary tract infrcion. Research in Medicine. 2014;38(3):162-6.
30. Ali HH, Yousif MG. Detection of some virulence factors genes of Proteus mirabilis that isolated from urinary tract infection. IJAR. 2015;3(1):156-63.
31. McCall J, Hidalgo G, Asadishad B, Tufenkji N. Cranberry impairs selected behaviors essential for virulence in Proteus mirabilis HI4320. Can J Microbiol. 2013;59(6):430-6.