# بررسی تنوع ژنتیکی پروتئوس میرابیلیس جدا شده از نمونه های ادراری توسط روش Box PCR

سهیلا رضوان[۱]، کیومرث امینی[۲*]

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران

۲) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

**تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۵**

**چکیده**

***مقدمه:*** پروتئوس میرابیلیس یکی از عوامل شایع در عفونت های مجرا ادراری(UTI) می باشد. روش های متعدد مولکولی جهت ژنوتایپینگ باکتری ها به کار می رود. روش واکنش زنجیره ای پلیمراز مبتنی بر توالی های تکرار شونده با استفاده از مجموعه پرایمرهای BOXA1R جهت افتراق و تفکیک باکتری های استفاده شده است. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی تنوع ژنتیکی ایزوله های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از نمونه ادراری می باشد.

***مواد و روش ها:*** در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۶۰ ایزوله پروتئوس میرابیلیس از نمونه ادرار با استفاده از تست های بیوشیمیایی شناسایی شد. DNA نمونه ها استخراج و آزمایش BOX-PCR صورت گرفت.

***یافته های پژوهش:*** نمودار درختی یا دندوگرام آزمون BOX-PCR ترسیم شد و نتایج نشان داده شد که تمامی سویه ها در سطح تشابه ۵۷ درصد به ۷ کلاستر مجزا تفکیک شدند. در گروه اول سه ایزوله، ۹ ایزوه در گروه دوم، در گروه سوم ۱۸ ایزوله، ۲ ایزوله در گروه چهارم، ۱۱ ایزوله در گروه پنجم، یک ایزوله در گروه ششم و ۱۶ ایزوله در گروه هفتم قرار گرفتند. آنالیز دندوگرام مشخص نمود که سویه های متعلق به یک سروار از یکدیگر قابل تفریق هستند.

***بحث و نتیجه گیری:*** این روش نشان داد که انگشت نگاری مولکولی با پرایمر BOXA1R جهت تایپینگ جدایه های باکتری ها از منشاء متفاوت و مختلف مفید می باشد. هم چنین دارای قدرت تفریق و تمایز بسیار مناسب، استفاده مطلوب در مطالعات اپیدمیولوژی و ردیابی منبع عفونت و تاکسونومی هستند.

**واژه های کلیدی:** پروتئوس میرابیلیس، BOX-PCR، ژنوتایپینگ

* نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

*Email:dr_kumarss_amini@yahoo.com*

*Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.*

## مقدمه

پروتئوس متعلق به راسته انتروباکتریالس و خانواده انتروباکتریاسه، میله ای شکل و گرم منفی بوده که توسط تعداد زیادی تاژک های متحرک قابلیت حرکت دارد(۲،۱). پروتئوس باکتری فرصت طلب دستگاه گوارش، آب و خاک است که دارای ۳ گونه مهم پروتئوس میرابیلیس، ولگاریس و پنری است. باکتری پروتئوس معمولاً باعث عفونت ادراری و تشکیل سنگ کلیه شده و گونه پروتئوس میرابیلیس دومین عامل ایجاد عفونت های دستگاه ادراری به خصوص در کودکان می باشد. این باکتری موجب بروز پیلونفریت و یا سنگ های کلیوی خصوصاً در افراد دارای سوند و یا افراد دارای ناهنجاری های دستگاه ادراری گردد(۳). پروتئوس میرابیلیس حساس به آمپی سیلین و سفالوسپورین بوده که با استفاده بیش از حد داروهای ضدمیکروبی سولفانامیدها و تری متوپریم برای درمان عفونت ادراری باعث ایجاد مقاومت و عدم موفقیت درمان می شود(۲). استفاده از روش های مولکولی برای تحقیقات در خصوص عوامل بیماریزا در دهه اخیر متداول و مرسوم شده است و روش های مولکولی تفریقی مختلفی امروزه استفاده می شود. روش های مولکولی بر اساس مقایسه DNA ژنومی، DNA پلاسمیدی یا اهداف ژنتیکی اختصاصی هستند و شامل PFGE، پلاسمید پروفایلینگ، ریبوتایپینگ، AFLP, RAPD, VNTR, MLVA, rep، مولتی لوکوس آنزیم الکتروفورز(MEE) و سایر روش ها هستند(۴). بسیاری از روش های ساب تایپینگ همانند خصوصیات شیمیایی و سرولوژی زمان بر، خسته کننده و پرهزینه بوده و از لحاظ اپیدمیولوژیک دارای ارزش محدود می باشند و قدرت افتراق دهی بین سویه هایی که ارتباط بسیار نزدیکی با هم دارند را نداشته بنا بر این مطالعات ژنوتیپی با قدرت تمایز بالا از اهمیت بیشتری برای تفریق سویه ای برخوردار است(۵). خانواده های عناصر متحرک در یوباکتری ها توصیف شده و شامل عناصر REP و ERIC و BOX می باشند که تعدادی از روش های تایپینگ برای پروتئوس به کار برده می شود که از این میان روش ERIC PCR و BOX-PCR سریع تر بوده و دارای قدرت تمایزی مناسبی است و در هر آزمایشگاهی که دارای قابلیت انجام PCR است قابل انجام می باشد. توالی های ERIC در واقع توالی های bp ۱۲۷-۱۲۴ و سکانس BOX به طول ۱۵۴ جفت باز هستند که واجد یک ناحیه معکوس تکرار شونده مرکزی حفاظت شده بوده که به شکل خارج ژنی در ژنوم باکتری های روده ای وجود دارند. پرایمرهای مورد استفاده در ERIC PCR مکمل این توالی ها هستند و برای ژنوتایپینگ باکتری های گرم منفی روده ای به کار می رود(۶). با استفاده از این روش دو الگوی ژنتیکی و دو کلون متفاوت در میان سویه ها شناسایی می شود. هم چنین سروتیپ های غالب در در طی زمان تغییر نموده و بر این اساس در مناطق جغرافیایی مختلف سروتیپ های متفاوتی به عنوان سروتیپ های غالب وجود دارند زیرا سویه های غالب اندمیک در مناطق مختلف دنیا از کلون های متفاوتی نشات گرفته اند و وجود کلون های متفاوت امکان پیدایش سویه های جدید و چرخش آن ها بین انسان، محیط و حیوانات را فراهم می آورد(۷). عناصر BOX در طبیعت متشکل از بخش های کوچک تر هستند و مشتمل بر تحت توالی های محافظت شده متفاوت هستند و اولین عناصر تکرار شونده پراکنده یافت شده و شناخته شده در یک باکتری گرم مثبت (استرپتوکوکوس پنومونیه) هستند. سه نوع تحت واحد مختلف در عناصر BOX معین شده اند شامل box A (۵۷ جفت باز) و box B (۴۳ جفت باز) و box C (۵۰ جفت باز). الیگونوکلئوتیدهای کاوشگر(پروب) مکمل این تحت واحدها اثبات کرد که تنها توالی های مشابه تحت واحد box A به شدت محافظت شده در میان انواع باکتری های گوناگون وجود دارند. توالی های مشابه با box B و box C تنها در استرپتوکوک پنومونیه یافت شده اند. تحت واحد box A با تعداد بسیار و به صورت پراکنده و منتشر در استرپتوکوک پنومونیه وجود دارد ولی در سایر باکتری های استرپتوکوکی نظیر استرپتوکوکوس پیوژنز و استرپتوکوکوس آگالاکتیه مشاهده نشده است با این وجود ارگانیسم های گرم منفی غیر خویشاوند نظیر اشریشیاکلی، سالمونلا، پروتئوس دارای رونوشت های متعدد از توالی های مشابه تحت واحد

box A است که در سراسر ژنوم آن ها پراکنده هستند(۸). لذا لازم است که بررسی های مستمر، برنامه های نظارتی و غربالگری انجام شود و نوع پروتئوس غالب یا ژنوتایپ غالب آن جامعه مشخص گردد. تشخیص سروتایپ غالب در نمونه های بالینی افراد واجد گاستروانتریت در یک جامعه کمک بزرگی به حفظ و کنترل شیوع بیماری می کند. به ویژه در کشورهای در حال توسعه از جمله کشور ما که عفونت پروتئوس هم چنان از اهمیت ویژه ای برخوردار است(۹). با این روش به علت قدرت تفریق پذیری بالا و قدرت تکرارپذیری بالا به عنوان روشی مناسب جهت مطالعات اپیدمیولوژیک اکثر باکتری های دارای اهمیت در کشاورزی و دام پروری، پزشکی و محیط زیستی و اکولوژی استفاده می شود. هم چنین با استفاده از طبقه بندی کامپیوتری جهت مطالعه درجه وابستگی سویه های متفاوت استفاده می شوند. به علت تکرارپذیری بالا به عنوان روشی مناسب در مطالعات کتابخانه ای ژنوم باکتری ها دارد. اطلاعات کافی در مورد میزان قرابت سویه های متفاوت را فراهم می کند. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی تنوع ژنتیکی ایزوله های پروتئوس میرابیلیس جدا شده از نمونه ادراری بوده است.

## مواد و روش ها

*جمع آوری نمونه:* این مطالعه توصیفی-مقطعی در طی یک بازه زمانی شش ماهه(مرداد ۱۳۹۵ تا بهمن ۱۳۹۵) صورت گرفت. تعداد ۴۰۰ نمونه ادراری از آزمایشگاه های بخش خصوصی و برخی از مراکز درمانی جمع آوری و در نهایت تعداد ۶۰ ایزوله پروتئوس میرابیلیس تایید نهایی شد. نمونه ها بر روی محیط بلاد آگار(مرک، آلمان)، مک کانکی آگار(مرک، آلمان)، کشت داده و با انجام تست های بیوشیمیایی، احیای نیترات، سیمون سیترات، واکنش TSI، اوره آز، اندول، حرکت، MR/VP و فنیل‌آلانین دآمیناسیون آگار (مرک، آلمان) تعیین جنس و گونه شدند(۳).

*واکنش زنجیره ای پلیمراز BOX PCR:* استخراج DNA توسط کیت استخراج ژنومیک باکتریایی گرم منفی(cat no. MBK0041) مرکز ذخایر ژنتیکی ایران انجام شد. واکنش BOX PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۴ میکرولیتر DNA الگو(۲۰۰ نانوگرم)، ۲۰ پیکو مول از پرایمر BOX (۲ میکرولیتر)، ۴ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰ میکرولیتر مستر میکس Amplicon 2x انجام شد. شرایط دمایی PCR شامل مرحله دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ سیکل با مرحله دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در پایان قطعات تکثیر یافته با استفاده ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید مشاهده گردید. پرایمرهای به کار رفته در این پژوهش در جدول شماره ۱ ذکر شده است(۶).

**جدول شماره ۱. پرایمرهای BOX-PCR برای شناسایی تنوع ژنتیکی ایزوله های پروتئوس میرابیلیس(۶)**

| نام پرایمر | توالی |
|---|---|
| BOX-A1R | (5'-CTACGGCAAGGCGACGCT-3') |

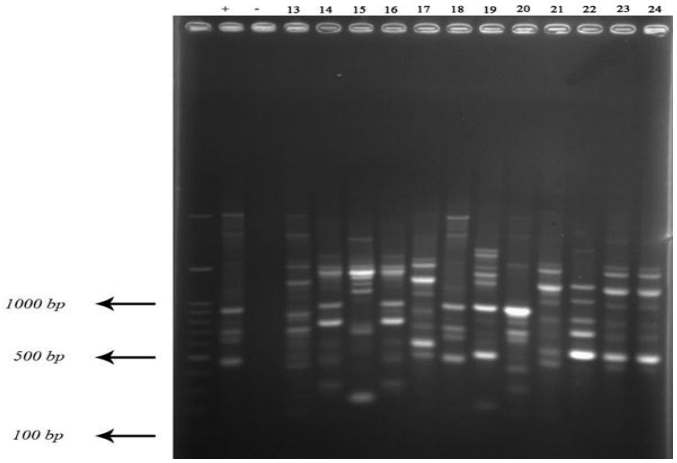
نقوش انگشت نگاری ژنومی BOX-PCR بر اساس وجود یا عدم وجود باند به صورت رمزهای صفر و یک نمره دهی شدند. و سپس با استفاده از نرم افزار NTsys درخت فیلوژنی ترسیم گردید. قابل ذکر است که برای تعیین تشابه سویه ها و ترسیم درخت فیلوژنی از ضریب تشابه جاکارد و روش میانگین های حسابی بی وزن(UPGMA) استفاده شد. قدرت تمایزی روش BOX-PCR نیز توسط معادله Simpon's Index Diversity بر طبق فرمول زیر انجام گرفت:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{S} n_j(n_{j-1}):$$

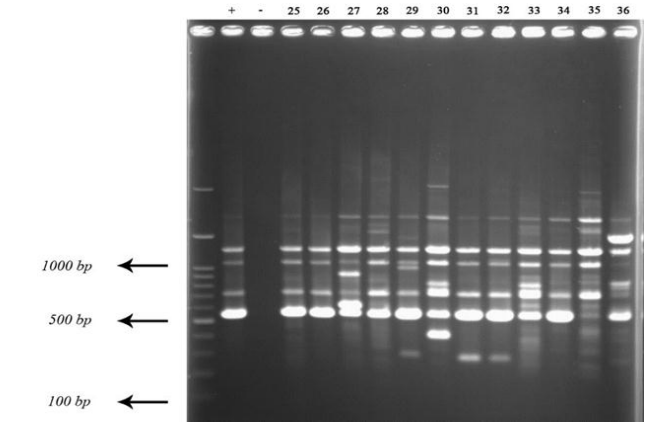
که N تعداد کل سویه های مورد مطالعه جهت روش BOX-PCR، S تعداد تیپ های ژنتیکی محاسبه شده، nj تعداد سویه های متعلق به تیپ j است. قدرت تفریق روش های تایپینگ (Discriminatory powers) بر اساس فرمول اندیکس تنوع یا شاخص تنوع سیمپسون( Simpson's Index of Diversity) محاسبه شد که در بالا نشان داده شده است. به طور کلی اندیکس ۹۰ درصد و بیشتر یک خصوصیت مطلوب برای روش های تایپینگ است. اولین بار این اندیکس یا شاخص تنوع توسط ادوارد هاف سیمپسون( Edward Hugh Simpson) آمار شناس بریتانیایی در سال ۱۹۴۹ میلادی تعریف شد. این شاخص در میکروبیولوژی به شاخص هانتر–گاستون(Hunter–Gaston index) نیز شهرت دارد(۶).

## یافته های پژوهش

نتایج آزمون BOX-PCR در شکل شماره ۱ و ۲ مشاهده می شود. آنالیز شکل ها و دندوگرام حاصل، تمامی سویه ها در سطح تشابه ۵۷ درصد به ۷ کلاستر مجزا قابل تمایز شدند(شکل شماره ۳) به طوری که در گروه اول سه ایزوله، ۹ ایزوه در گروه دوم، در گروه سوم ۱۸ ایزوله، ۲ ایزوله در گروه چهارم، ۱۱ ایزوله در گروه پنجم، یک ایزوله در گروه ششم و ۱۶ ایزوله در گروه هفتم قرار گرفتند(جدول شماره ۲). با توجه به اطلاعات مندرج در جدول شماره ۲ و تعداد تیپ های ژنتیکی به دست آمده، قدرت تمایزی روش BOX-PCR، ۰/۷۹ محاسبه شد.



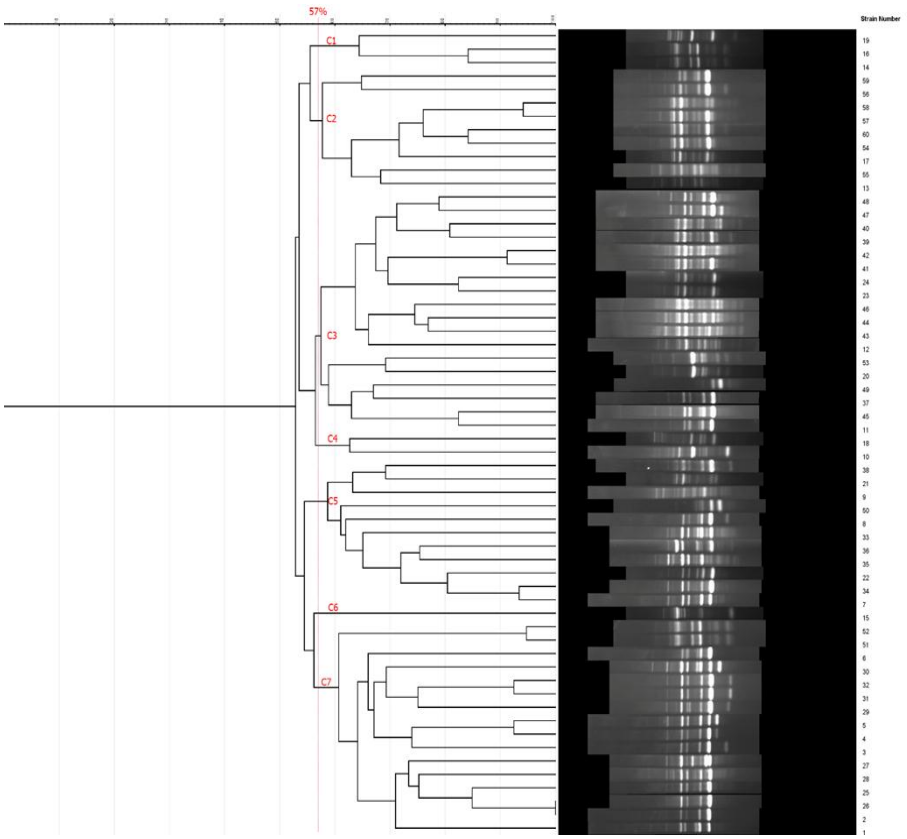

**شکل شماره ۱. نتایج الکتروفورز محصول BOX-PCR در برخی نمونه ها از شماره ۲۴-۱۳**




**شکل شماره ۲. نتایج الکتروفورز محصول BOX-PCR در برخی نمونه ها از شماره ۳۶-۲۵**

**جدول شماره ۲. مشخصات ایزوله های پروتئوس و گروه بندی آن ها با روش BOX-PCR**

| شماره سویه | کلاستر | شماره سویه | کلاستر | شماره سویه | کلاستر |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۷ | ۲۹ | ۷ | ۵۷ | ۲ |
| ۲ | ۷ | ۳۰ | ۷ | ۵۸ | ۲ |
| ۳ | ۷ | ۳۱ | ۷ | ۵۹ | ۲ |
| ۴ | ۷ | ۳۲ | ۷ | ۶۰ | ۲ |
| ۵ | ۷ | ۳۳ | ۵ | | |
| ۶ | ۷ | ۳۴ | ۵ | | |
| ۷ | ۵ | ۳۵ | ۵ | | |
| ۸ | ۵ | ۳۶ | ۵ | | |
| ۹ | ۵ | ۳۷ | ۳ | | |
| ۱۰ | ۴ | ۳۸ | ۵ | | |
| ۱۱ | ۳ | ۳۹ | ۳ | | |
| ۱۲ | ۳ | ۴۰ | ۳ | | |
| ۱۳ | ۲ | ۴۱ | ۳ | | |
| ۱۴ | ۱ | ۴۲ | ۳ | | |
| ۱۵ | ۶ | ۴۳ | ۳ | | |
| ۱۶ | ۱ | ۴۴ | ۳ | | |
| ۱۷ | ۲ | ۴۵ | ۳ | | |
| ۱۸ | ۴ | ۴۶ | ۳ | | |
| ۱۹ | ۱ | ۴۷ | ۳ | | |
| ۲۰ | ۳ | ۴۸ | ۳ | | |
| ۲۱ | ۵ | ۴۹ | ۳ | | |
| ۲۲ | ۵ | ۵۰ | ۵ | | |
| ۲۳ | ۳ | ۵۱ | ۷ | | |
| ۲۴ | ۳ | ۵۲ | ۷ | | |
| ۲۵ | ۷ | ۵۳ | ۳ | | |
| ۲۶ | ۷ | ۵۴ | ۲ | | |
| ۲۷ | ۷ | ۵۵ | ۲ | | |
| ۲۸ | ۷ | ۵۶ | ۲ | | |




**شکل شماره ۳. دندوگرام حاصل از آزمایش BOX-PCR با ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA و Cut off ۵۷ درصد**

## بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، بعد از کشت نمونه‌های اخذ شده، در نهایت از مجموع ۴۰۰ نمونه ادراری جمع آوری شده تعداد ۶۰ سویه پروتئوس میرابیلیس شناسایی گردید. نتایج این پژوهش نشان دهنده قدرت روش BOX-PCR در تایپ بندی سویه های پروتئوس می باشد، به طوری که این روش سویه ها را به ۷ الگوی ژنتیکی متفاوت بر پایه BOX-PCR تقسیم بندی نمود. با وجود قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک در جنس پروتئوس ها، تغییرات گسترده ای در بروز بیماری، حدت و توزیع جغرافیایی وجود دارد. کسب یا از دست دادن برخی از ژن ها و جهش ها، نقش مهمی در تکامل تایپ های مختلف پروتئوس ها ایفا می کند. ردیابی و بررسی این تغییرات ژنتیکی در جامعه نقش بسیار مهم و حائز اهمیتی و اطلاعات زیادی در مورد اپیدمیولوژی و شناسایی منابع عفونت به منظور کنترل عفونت و نظارت اپیدمیولوژیک در اختیار قرار می دهد(۱۰). عناصر ژنتیکی موجودات در طول زمان تغییر می یابند و یکی از علل اصلی آن نیز جهش و نوترکیبی است. بر اساس شواهد موجود، سرعت این تغییرات در بین موجودات مختلف یکسان نیست. البته سرعت ایجاد ژن های جدید با سرعت پخش شدن آن ها در جامعه یکسان نیست، زیرا بسیاری از ژن های جهش یافته باعث مرگ موجود می شوند و امکان اشاعه آن ها در جامعه وجود ندارد. اما نکته جالب و مهم آن است که سرعت متوسط ایجاد شکل های جدید یک ژن در سطح جامعه تقریباً ثابت و قابل محاسبه است و از آن به عنوان ساعت مولکولی (Molecular Clock) نام برده می شود(۱۱). بر این اساس می توان عنوان کرد که هر ژن در هر موجود یک ساعت مولکولی نسبتاً دقیق و منحصر به فرد دارد. تیپ بندی سویه های میکروبی جزء لاینفک بررسی های اپیدمیولوژیک بیماری های عفونی می باشد. در مباحث اپیدمیولوژی، اهمیت تیپ بندی سویه های میکروبی در بررسی کانون مشترک بیماری، بررسی انتشار عفونت از یک بیمار به بیمار دیگر، بررسی عفونت اسپورادیک، تعیین هویت تیپ های بیماری زای عوامل میکروبی، افتراق سویه های

اندمیک از سویه های اپیدمی دهنده عوامل میکروبی، تمایز سویه های میکـــروبی به کار گرفته شده در همه گیری های عمدی از سویه های اندمیک جامعه، مونیتورینگ اقدامات درمانی، تعیین الگوی مقاومت و حساسیت آنتی بیـــوتیکی و بررسی شکست درمان دارویی می باشد(۱۰). گروه های متـــفاوت در BOX می تواند به معنای منشاء های متفاوت سویه ها و یا الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی متفاوت باشد. هم چنین اگر بر اساس نتایج BOX مشخص شود که سویه ها منشاء متفاوتی داشته اند می توان این نتیجه را برداشت کرد که به علت رعایت نکردن شرایط بهداشتی، مصرف خود سرانه آنتی بیوتیک ها و یا سایر عوامل موثر در رفتارهای ژنتیکی باکتری ها، موجب ایجاد سویه ها با منشاء متفاوت شده است. بر این اساس باید یک جامعه را به طور مدام از نظر تغییر رفتارهای ژنتیکی باکتری ها زیر نظر داشت تا بتوان بهترین تصمیمات را در زمان مناسب گرفت تا از بروز خطرات و تهدیدات بهداشتی جلوگیری شود(۱۰،۱۱). لذا این فرآیند از نظر اپیدمیولوژیکی جهت شنـــاســـایی همه گیری ها، تشخیص منبع عفونت ها، ردیابی و شناسایی سویه های بیماری زا، بررسی پاتوژن های کسب شده بیمارستانی و ارزیابی روش های کنترل عفونت از اهمیت بالایی برخودار است(۱۱). یافته های این پژوهش نشان داد که BOX-PCR می تواند ایزوله های پروتئوس میرابیلیس را به خوبی تمیز دهد، چرا که تمامی ایزوله ها با این روش قابل تایپ بندی بودند. روش BOX-PCR در پژوهش های قبلی در سراسر دنیا از جمله ایران برای تایپـــنگ مولکولی ایزوله باکتری های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است، Van Belkum و همکاران(۲۰۰۱) به بررسی تغییرات ژنـــتیکی باکتـــری اســـترپتوکوکوس پنومونیه با روش BOX-PCR پرداختند. در این مطالعه مشخص شد که آغازگرهای boxA1R و box A بیشترین موفقیت را برای تایـــپ کردن مولکولی پنوموکک برخوردار بود(۶). هم چنین Michelim و همکاران در سال ۲۰۰۸ روش های مختلف تایپینگ مولکولی را برای باکتری پروتئوس میرابیلیس انجام دادند و در نهایت به این نتیجه رسیدند که روش های RAPD، BOX-PCR و ERIC-PCR قادر خواهند بود که به خوبی بین سویه های مختلف پروتئوس میرابیلیس تفکیک ایجاد کنند(۵). Kowalczyk و همکاران در سال ۲۰۰۲ به منظور ژنوتایپینگ ۶۸ سویه پروتئوس از سه روش Rep-PCR، BOX-PCR و ERIC-PCR استفاده نمودند. نتیجه بدین صورت بود که بهترین نتیجه ژنوتایپینگ با روش BOX-PCR به دست آمد، بدین شکل که بیشترین تعداد باندها و وضوح را در روش BOX-PCR به دست آوردند(۱۲). Oliveira و هـــمـــکاران(۲۰۰۷) تعداد ۱۱۱ جدایه سالمونلا انتریتیدیس(جداســـازی شده از نمونه های انسان و غذا و لاشه جوجه گوشتی و خـــوک را با rep-PCR و پرایمرهای BOX و ERIC و REP و فاژتایپینگ و مقاومت آنتی بیوتیکی بررسی کردند. در فاژتایپینگ ۸ فاژتایپ مشخص شدند و اندیکس سیمپسون جـــهت تنـــوع( Simpson's index of diversity) یا D مقدار ۰/۶ بوده است. در روش BOX-PCR نیز سه پروفایل مولکولی و ۸–۹ باند به اندازه ۱۴۰ تا ۱۲۳۰ جفت باز مشاهده شد و مقدار D در این روش ۰/۰۴ بوده است که احتمالاً اکثریت جدایه ها مربوط به یک کلون بوده اند(۱۳). در مطالعه Suh و همکاران(۲۰۰۶) ۲۲ جدایه سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از انسان و جوجه با انگشت نگاری مولکولی با پرایمرهای BOX و ERIC هوموژنیسیتی بالایی نشان دادند به جز یک سویه که از جوجه جدا شده و الگوی جداگانه ای تشکیل می دهد و در ERIC-PCR تعداد باند ۹–۱۰ باند و اندازه آن ها ۲۳۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز و در BOX-PCR تعداد باندها ۱۴–۱۵ و اندازه آن ها ۴۵۰ تا دها ۲۵۰۰ جفت باز بوده است. با استفاده از پلاسمید پروفایلینگ ۸ نوع پروفایل مولکولی مشاهده شد و اندازه پلاسمیدها از ۱/۹ کیلوباز تا ۲۱ کیلوباز بوده است و باند ۱۵ کیلوباز در تمام موارد دیده شد(۱۴). با توجه به مطالعات این پژوهشگران در مطالعه حاضر نیز به از پرایمر BOXA1R استفاده گردید. نتایج پژوهش حاضر نیز نشان دهنده این بود که علاوه بر روش هایی مانند ERIC-PCR با روش روش BOX-PCR نیز می توان سویه های پروتئوس را دسته بندی نمود.

Passari و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی تنوع

ژنتیکی باکتری های جدا شده دریاچه آب شیرین به همراه حساسیت آنتی بیوتیکی و وابستگی فیلوژنتیکی با روش BOX-PCR پرداختند. تجزیه و تحلیل توالی ژن 16srDNA نشان داد ۸ ایزوله به عنوان ایزوله پروتئوس شناسایی شد. اندازه باندهای مشاهده شده در محدوده بین ۱۰۰ bp تا ۳ kb بود. دندروگرام حاصل از تجزیه و تحلیل BOX-PCR متشکل از دو گروه اصلی A و B بود. استافیلوکوکوس اورئوس در گروه A1 قرار گرفت(۳). که در این پژوهش نیز مانند پژوهش حاضر شاهد قدرت تفکیک روش BOX-PCR بودیم.

در مطالعه حاضر سویه های پروتئوس میرابیلیس دارای الگوهای BOX متفاوتی بودند که نشان دهنده تنوع ژنتیکی سویه های پروتئوس می باشد و احتمالاً این سویه ها منشاء متفاوتی داشته که در حال چرخش بین حیوانات و انسان است. بنا بر این پیـــدایش سویه های جدید و شناسایی کلون های کم شیوع در مطالعات مولـــکولار اپیدمیـــــولوژی به لـــحاظ پیش بینی روش های کنترل بهداشتی به منظور محدود کردن آن ها از دیگر رویکردهای مفید این مطـــــالعه است. روش BOX-PCR روش مناسبی جهت تایپینگ مولکولی سویه های باکتریایی و تعیین کانون های شیوع عفونت می باشد، که می توان از آن جهت مطالعات اپیدمیولوژیک و تعیین راهبردهای کنترل عفونت استفاده نـــمود. به طور کلی این شواهد نشان می دهد که سویه های پروتئوس از نظر ژنوتایپینگ دارای تنوع قابل توجهی می باشد که بایستی مورد توجه بیشتر قرار گیرد. این نتایج در تعیین روش های بررسی اپیدمیولوژیـــــک و تنوع ژنتیکی پروتئوس میرابیلیس جهت ارائه راهکارهای پیشگیری و درمان موثر می‌باشد.

## سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از گروه میکروبیولوژی پاسارگاد تقدیر و تشکر نمایند. در ضمن مقاله مذکور با کد اخلاقی IR.IAUSB.1398.41 به ثبت رسیده است.

*تضاد و تعارض:* تمامی نویسندگان اعلام می دارند که در بین نویسندگان تضاد و تعارضی( conflict of interest) وجود ندارد.

*References*

1.Jones SM, Yerly J, Hu Y, Ceri H, Martinuzzi R. Structure of Proteus mirabilis biofilms grown in artificial urine and standard laboratory media. FEMS2007;268:16-21.
doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00587.x

2.Pandey JK, Narayan A, Tyagi S. Prevalence of Proteus species in clinical samples antibiotic sensitivity pattern and ESBL production. Int J Curr Microbiol Appl Sci 2013;2:253-61.

3.Passari AK, Gupta VK, Singh BP. Detection of antibiotic resistant bacteria endowed with antimicrobial activity from a freshwater lake and their phylogenetic affiliation. Peer J 2016;4: 2103.doi.org/10.7717/peerj.2103

4.Sabbuba N, Mahenthiralingam E, Stickler D. Molecular epidemiology of Proteus mirabilis infections of the catheterized urinary tract. J Clin Microbiol2003;41:4961-5.
doi.org/10.1128/JCM.41.11.4961-4965.2003

5.Michelim L, Muller G, Zacaria J, Delamare APL, Costa SOP, Echeverrigaray S. Comparison of PCR based molecular markers for the characterization of Proteus mirabilis clinical isolates. Brazilian J Inf Dis 2008;12:423-9. doi.org/10.1590/S1413-86702008000500014

6.Vanbelkum A, Hermans PW. Box PCR fingerprinting for molecular typing of Streptococcus pneumoniae. Meth Prot 2001;3.159-68.

7.Ahmadibadi S, Norouzi J, Akavansepahi A. [Detection rsbA genes band and amp effect of miristic acid in virulence of Proteus mirabilis isolated from urinary tract infrction]. Res Med 2014;38:162-6. (Persian)

8.Sheykhbardsiri H, Shakibaie M.R, Amini Kafiabad S. [Plasmid pattern of biofilm producing Proteus mirabilis and proteus vulgaris among clinical isolates in Kerman University hospitals during 2011-12]. J

Kerman Uni Med Sci 2013;20:146-57.(Persian)

9.Borji A, Shahraki Zahedi S, Etemadi M. [Proteus mirabilis and its relationship with the formation of urinary infectious stones]. J Zanjan Uni Med Sci 2002; 10: 7-11.(Persian)

10.Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections a review for healthcare epidemiologists. Infect Control Hosp Epidemiol 1997;18:426-39.

11.Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. Lancet 2005;366:941-51. doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67322-9

12.Kowalczyk M, Sidorczyk Z. Determination of genetic diversity of Proteus penneri strains using Rep-PCR. Genes Prote Microb Urin Trac Virul 2002; 2:315-20.

13.Oliveira SD, Bessa MC, Santos LR, Cardoso MR, Brandelli A, Canal CW. Phenotypic and genotypic characterization of Salmonella enteritidis isolates. Braz J Microbiol 2007;38:720-8. doi.org/10.1590/S1517-83822007000400025

14.Suh DK, Song JC. Analysis of Salmonella enterica serotype Enteritidis isolated from human and chickens by repetitive sequence PCR fingerprinting antibiotic resistance and plasmid profiles. J Vet Sci 2006;7:37-41. doi.org/10.4142/jvs.2006.7.1.37

# from Urine Specimens by Box PCR

*Rezvan S[1], Amini K[2*]*

**(Received: January 6, 2018 Accepted: August 27, 2018)**

**Abstract**

*Introduction:* Proteus mirabilis is one of the common causes of UTI.Multiple molecular methods are used to genotype bacteria.The polymerase chain reaction method is based on repeated sequences using BOXA1R primers for differentiation of bacteria. This study aimed to evaluate the genetic diversity of protease mirabilis isolated from urine specimens.

*Materials & Methods:* In this descriptive cross-sectional study, 60 isolates protease mirabilis were identified from urine specimens using biochemical tests. DNA samples were extracted and tested for BOX-PCR.

*Findings:* The tree diagram or dendrogram of BOX-PCR was drawn and the results showed that all strains were segregated into 7 separate clusters at a similarity level of 57%. There were three isolates in the first group, nine in the second group, 18 in the third group, two in the fourth group, 11 in the fifth group, one in the sixth group, and 16 isolates in the seventh group. Dandrogram analysis revealed that the strains belonging to a serovar are subtracted from each other. *Ethics code:* IR.IAUSB.1398.41

*Discussion & Conclusions:* This method demonstrated that molecular fingerprinting with BOXA1R primers is useful for typing bacterial isolates from different origins. Moreover, it has a really efficient differentiation power, it can be used effectively in epidemiological studies, and trace source of infection and taxonomy.

*Keywords:* Proteus mirabilis, BOX-PCR, Genotyping

*1. Dept of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran*
*2. Dept of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran*
** Corresponding author Email:dr_kumarss_amini@yahoo.com*