بسم الله الرحمن الرحیم

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته زیست شناسی- میکروبیولوژی

عنوان:

ایمنی زایی، حساسیت و اختصاصیت پروتئین گیرنده کمپلکس سیدروفور-فریک (BauA) در اسینتوباکتر بومانی

استاد راهنما:

دکتر ایرج رسولی

استاد مشاور:

دکتر شهرام نظریان

دانشجو:

حمید اسماعیل خانی

(دی ماه ۹۲)

تقدیم به

مادر فداکار و پدر مهربانم

و تقدیم به

تمامی صاحبان نیات پاک

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. و سلام و درود بر محمّد و خاندان پاک او، طاهران معصوم، هم آنان که وجودمان ولدار وجودشان است. . .

بدون شک جایگاه و منزلت معلم، اجلّ از آن است که در مقام قدردانی از زحمات بی شائبه ی او، با زبان قاصر و دست ناتوان، چیزی بنگاریم.
اما از آنجایی که تجلیل از معلم، سپاس از انسانی است که هدف و غایت آفرینش را تامین می کند و سلامت امانت هایی را که به دستش سپرده اند، تضمین؛ بر حسب وظیفه و از باب "من لم یشکر المنعم من المخلوقین لم یشکر الله عزّ و جلّ":

از پدر و مادر عزیزم. . . این دو معلم بزرگوارم. . . که همواره بر کوتاهی و درشتی من، قلم عفو کشیده و کریمانه از کنار غفلت هایم گذشته اند و در تمام عرصه های زندگی یار و یاوری بی چشم داشت برای من بوده اند؛

از استاد با کمالات و شایسته؛ جناب آقای دکتر رسولی که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛

از استاد صبور و باتقوا، جناب آقای دکتر نظریان که زحمت مشاوره این رساله را متقبل شدند؛

از استاد فرزانه و دلسوز؛ جناب آقای دکتر موسوی که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند؛

از دوستان عزیزتر از جانم، آقایان غیبی حیات، معظمی و رشیدی که حضور و کمکشان در آزمایشگاه باعث دلگرمی بود؛

از هم کلاسی هایم خانم ها، هاشمی و بزم آرا؛

از مسئول محترم آزمایشگاه، خانم دکتر علیپور که با راهنمایی های بی دریغشان کمک شایانی در پیشبرد مراحل آزمایشگاهی کار داشتند

و همچنین از خانم دکتر حسینقلی و خانم دکتر عتابی نیز برای راهنمایی هایشان کمال تشکر و قدردانی را دارم

باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

چکیده

جنس *Acinetobacter* در خانواده *Moraxellaceae* طبقه بندی می‌شود. در این جنس کوکوباسیل هایی شدیدا هوازی، گرم منفی، غیرمتحرک، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و غیرتخمیری قرار می‌گیرند. بیش از ۳۰ گونه ی ژنومی در این جنس شناسایی شده که از این بین ۱۷ تای آن‌ها نام‌های شناخته شده و معتبری دارند. *Acinetobacter baumannii* یک پاتوژن مهم است که هم اکنون بعنوان عامل عفونت‌های بیمارستانی مثل عفونت‌های جریان خون، پنومونی وابسته به دستگاه تهویه و عفونت‌های زخمی، بخصوص در بیماران بحرانی که در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) بستری شده اند شناخته می‌شود. این باکتری برای ایجاد عفونت در میزبان پرسلولی نیاز به آهن دارد که به شدت به وسیله میزبان محدود می-شود. در شرایط هوازی باکتری برای غلبه بر این مشکل، انواع لیگاندهای آهن با وزن ملکولی کم به نام سیدروفور تولید و به محیط خارج سلولی ترشح می کنند که با گرایش زیاد به آهن فریک متصل می‌شوند و تشکیل کمپلکس فریک–سیدروفور را می دهند. BauA (Baumannii Acinetobactin Utilization) با وزن ملکولی در طیف ۸۸–۷۵ کیلودالتون یکی از مهم ترین پروتئین‌های غشای خارجی این باکتری برای جذب آهن است. آنتی بادی مونوکلونال علیه پروتئین‌های غشای خارجی تنظیم شونده به‌وسیله آهن (IROMPs) مانع از جذب آهن توسط این پاتوژن شده و باکتریسیدال می‌باشد. در صورتی که بتوان مانع از جذب آهن توسط این باکتری شد، می‌توان میزبان را در برابر تهاجم این باکتری ایمن نمود. در این مطالعه تاثیر ایمنی‌زایی و نیز اختصاصیت و حساسیت پروتئین نوترکیب غشایی BauA علیه

باکتری *Acinetobacter baumannii* مورد بررسی قرار می‌گیرد.

به منظور تهیه پروتئین نوترکیب BauA، پس از کشت باکتری *Acinetobacter baumannii*، ژنوم آن تخلیص شد. با کمک واکنش زنجیرهٔ پلی‌مراز ژن *bauA* از اسینتوباکتر بومانی به طول ۲۰۸۳ جفت باز فراوان سازی و پس از ایجاد برش در دو انتهای آن بوسیله ی آنزیم‌های محدود کننده ی مناسب، روی ناقل بیانی $pET28^a$ کلون شد. پس از انتقال سازهٔ نوترکیب به میزبان اشرشیاکلی *Bl21DE3*، بیان پروتئین مورد نظر توسط غلظت‌های مختلف ایزوپروپیل تیو بتا- دی گالاکتوزید (IPTG) القاء و بهینه‌سازی آن انجام شد. نتایج بیان با SDS-PAGE بررسی و پروتئین نوترکیب از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی با کمک ستون Ni-NTA تخلیص شد. در نهایت پروتئین نوترکیب با وزن مولکولی ۷۵ کیلودالتون به موش-های Balb/C تزریق و پس از تکمیل دورهٔ ایمن‌سازی، تیتر آنتی‌بادی با سنجش الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت.

تزریق این پروتئین به موش‌های Balb/C نشان دهندهٔ توان بالای آن در تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی است. تست الایزا نشان داد که آنتی‌بادی تولید شده در شناسایی پروتین اتصالی فریک انتروباکتین قدرت بالایی دارد و موش‌های ایمن در مواجهه با $۱۰^{۱۰}$ باکتری زنده از خود مقاومت نشان دادند. لذا می‌توان از این پروتئین به عنوان کاندیدی مناسب برای تهیه واکسن علیه *Acinetobacter baumannii* استفاده کرد.

واژگان کلیدی: آهن، ایمنی‌زایی، سیدروفور، Acinetobacter baumannii، bauA، BauA

فهرست

فصل ۱ مقدمه ۱

۱-۱ معرفی جنس اسینتوباکتر ۲

۱-۲ مقاومت آنتی بیوتیکی ۳

۱-۳ اسینتوباکتر بومانی یک پاتوژن موفق ۵

۱-٤ اپیدمیولوژی باکتری ۷

۱-٥ اهمیت آهن ۹

۱-٦ اصول پایه ای هومئوستازی آهن ۱۱

۱-۷ سیدروفور ها ۱۲

۱-۸ گیرنده سیدروفور-Fe 3+ ۱۷

۱-۹ کمپلکس TonB-ExbB-ExbD ۲۱

۱-۱۰ انتقال از عرض پری پلاسم و غشای سیتوپلاسمی ۲۲

۲-۱۱ سرنوشت نهایی کمپلکس فریک-سیدروفور در سیتوپلاسم ۲٥

۱-۱۲ جذب آهن به وسیله سیدروفور ۲٦

۱-۱۳ اکتساب آهن به وسیله باکتری های بیماری زا ۲۹

۱-۱٤ سیستم اکتساب آهن بواسطه اسینتوباکتین در *Acinetobacter baumannii* ۳۰

۱-۱٥ مطالعه ساختاری Bau A ۳٥

۱-۱٦ - جذب هِم بوسیله باکتریهای بیماری زا ۳۸

فصل ۲ پیشینه تحقیق ٤۱

۲-۱ مروری بر مطالعات گذشته ٤۲

۲-۲ بیان مسأله و هدف تحقیق ٤٤

فصل ۳ مواد و روش ها..... ٤٦

۳-۱ مواد..... ٤٧

۳-۱-۱ محیط های کشت..... ٤٧

۳-۱-۲ آنتی بیوتیکها ٤٧

۳-۱-۳ آنزیمها ٤٧

۳-۱-٤ کیت های آزمایشگاهی ٤٨

۳-۱-٥ میزبان های باکتریایی Ecoli ٤٨

۳-۱-٦ وکتور های مورد استفاده برای کلون کردن ژن مربوط به پروتئین نوترکیب..... ٤٨

۳-۱-۷ مواد مورد استفاده ٤٨

۳-۱-۸ وسایل و دستگاه‌های مورد نیاز..... ٥٠

۳-۲ روشها..... ٥١

۳-۲-۱ طراحی پرایمر ٥١

۳-۲-۲ چگونگي طراحي پرايمر ٥١

۳-۲-۳ آماده سازی پرایمرها ٥٥

۳-۲-٤ استریل کردن محلولها و محیطهاي کشت ٥٥

۳-۲-٥ واکنش زنجيرهايي پليمراز (PCR) ٥٦

۳-۲-٥-۱ آنالیز محصول واکنش زنجیرهایی پلیمراز..... ٥٦

۳-۲-٦ تخليص محصول واکنش زنجيرهايي پليمراز..... ٥٧

۳-۲-۷ تخليص پلاسميد ٦٠

۳-۲-۸ هضم آنزيمي پلاسميدهاي استخراج شده و محصول واکنش زنجيرهايي پليمراز ٦٢

۳-۲-۹ - ترسيب نمکي پلاسميد و محصول واکنش زنجيرهايي پليمراز برش خورده ٦٣

۳-۲-۱۰ تأييد پلاسميدهاي استخراج شده توسط ژل آگاروز ٦٤

۳-۲-۱۱ تهیه استوک از سلول‌ها ٦٥

۳-۲-۱۲ - تهيه سلولهاي مستعد ٦٥
۳-۲-۱۳ تراریخت نمودن pET 28 a حاوی ژن مورد نظر به‌سلول‌های مستعد *E.coli*(DH5α) ٦٦
۳-۲-۱۴ بررسي و آناليز كلونهاي حاوي DNA نوتركيب ٦٨
۳-۲-۱۵ القاء بیان قطعهی همسانه سازی شده ٦٩
۳-۲-۱٦ بررسي پروتئين بيان شده روي ژل اكريل آميد ٧٠
۳-۲-۱۷ رنگآميزي ژل بهوسيلهی كوماسي بلو ٧٢
۳-۲-۱۸ بهينه سازي شرايط بيان پروتئينهاي BauA ٧٣
۳-۲-۱۹ بيان پروتئين نوتركيب در مقياس آزمايشگاهي..... ٧٣
۳-۲-۲۰ تخليص پروتئينهاي نوتركيب بهكمك كروماتوگرافي ميل تركيبي Ni-NTA ٧٤
۳-۲-۲۱ مراحل انجام تخليص پروتئينهاي نوتركيب..... ٧٥
۳-۲-۲۲ دياليز محلول حاوی پروتئين تخليص شده..... ٧٦
۳-۲-۲۳ تعيين غلظت پروتئين ٧٧
۳-۲-۲٤ بررسی صحت پروتئين نوتركيب بيان شده توسط آزمايش وسترن بلات..... ٧٨
۳-۲-۲۵ آماده سازی و تزريق نمونه پروتئينی به موش..... ٨١
۳-۲-۲٦ آماده سازی و تزريق نمونه پروتئينی به خرگوش..... ٨٢
۳-۲-۲۷ ارزيابي اوليه‌ی ايمني به‌وسيله تست الايزا (آنتی ژن الايزا) ٨٢
۳-۲-۲۸ خون گيری و تهيه سرم..... ٨٣
۳-۲-۲۹ تعيين توليد آنتی بادی به روش الايزای غيرمستقيم..... ٨٤
۳-۲-۳۰ مشخص كردن دُز كشنده ۵۰ درصد(LD_{50}) برای اسينتوباكتر بومانی..... ٨٦
۳-۲-۳۱ بررسی اختصاصيت و ميزان حساسيت آنتی بادي هاي توليدي ٨٧
۳-۲-۳۳ ارزيابی اوليه ی ايمنی به وسيله تست الايزا (آنتی ژن الايزا) ٩٠
۳-۲-۳٤ تزريق باكتری همراه با سرم خرگوش ايمن و غير ايمن به موش ٩٠

فصل ۴ نتایج ۹۱

۴-۱ ترادف قطعه و طراحی پرایمر ۹۲

۴-۱-۱ توالی نوکلئوتیدی پروتئین BauA ۹۲

۴-۲ تخلیص وکتور pET28a جهت همسانه سازی ژن *bauA* ۹۴

۴-۳ استخراج DNA کروموزومي باکتري *A.baumannii* ۹۵

۴-۴ - انجام واکنش زنجیرهايي پليمراز براي تکثير ژن *bauA* به طول ۲۰۸۳bp ۹۵

۴-۵ هضم آنزیمی پلاسمید و ژن *bauA* تکثیر شده ۹۶

۴-۶ همسانه سازي ژن *bauA* ۹۷

۴-۷ تخليص پلاسميد از کلونهاي بهدست آمده ۱۰۰

۴-۸ هضم آنزيمي پلاسميدهای همسانه هاي بهدست آمده ۱۰۱

۴-۹ تایید کلون با روش واکنش زنجيرهايي پليمراز ۱۰۲

۴-۱۰ بیان پروتئین نوترکیب هدف ۱۰۲

۴-۱۱ تخليص پروتئينهاي نوترکيب ۱۰۳

۴-۱۲ سنجش غلظت پروتئین ۱۰۴

۴-۱۳ آنالیز وسترن بلات ۱۰۶

۴-۱۴ تزریق پروتئین نوترکیب به موش به منظور تولید آنتی بادی ۱۰۷

۴-۱۵ بررسی تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین نوترکیب در سرم موشهاي ايمن و شاهد ۱۰۷

۴-۱۶ مشخص کردن دُز کشنده ۵۰ درصد برای باکتریهای مورد استفاده ۱۱۲

۴-۱۷ بررسی میزان مقاومت موش های ایمن و کنترل در برابر تزریق صفاقی باکتری زنده ۱۱۲

فصل ۵ بحث و نتیجه گیری ۱۱۵

فصل ۶ منابع ۱۲۵

فصل ۷ پیوست ها ۱۳۱

فصل اول

۱

کلیات

۱-۱ معرفی جنس اسینتوباکتر

اعضای جنس *Acinetobacter* بر پایه اطلاعات تاکسونومیک در خانواده جدیدی از موراکسلاسه‌ها، در رده گاماپروتوباکتر قرار می‌گیرد(۱). تاریخچه شناخت این جنس از باکتری به قرن ۲۰ برمی گردد. در سال ۱۹۱۱ Beijerinck، میکروبیولوژیست آلمانی، این میکروارگانیسم را از یک محیط معدنی که شامل کلسیم- استات است، از خاک غربال نمود. او میکروارگانیسم غربال شده را به نام Micrococcus calco-aceticus نام‌گذاری کرد(۲).

در این جنس کوکوباسیل‌هایی شدیدا هوازی، گرم منفی، غیرمتحرک، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و غیرتخمیری قرار می‌گیرند(۳) بیش از ۳۰ گونه ژنومی در این جنس شناسایی شده که از این بین ۱۷ تای آنها نام‌های شناخته شده و معتبری دارند. بجز *Acinetobacter baumannii*، دو گونه دیگر از جنس *Acinetobacter* به نام‌های *A.gen.sp3* و *A.gen.sp.13TU* نیز در شمار پاتوژن‌های فرصت طلب بیمارستانی دسته بندی می‌شوند. این سه گونه از نظر ژنتیکی بسیار به هم نزدیک و مرتبطند و نمی‌توان با روش‌های مرسوم فنوتیپی آنها را از یکدیگر متمایز کرد لذا نام *Acinetobacter baumannii* برای هر سه آن‌ها بکار می‌رود(۳).

Acinetobacter baumannii یک پاتوژن مهم است که هم اکنون بعنوان عامل عفونت‌های بیمارستانی مثل عفونت‌های جریان خون، پنومونی وابسته به دستگاه تهویه و عفونت‌های زخمی، بخصوص در بیماران بحرانی که در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) بستری شده اند شناخته می‌شود(۵).

شمار گزارش‌های ارائه شده از عفونت‌های *Acinetobacter baumannii* که از جامعه کسب

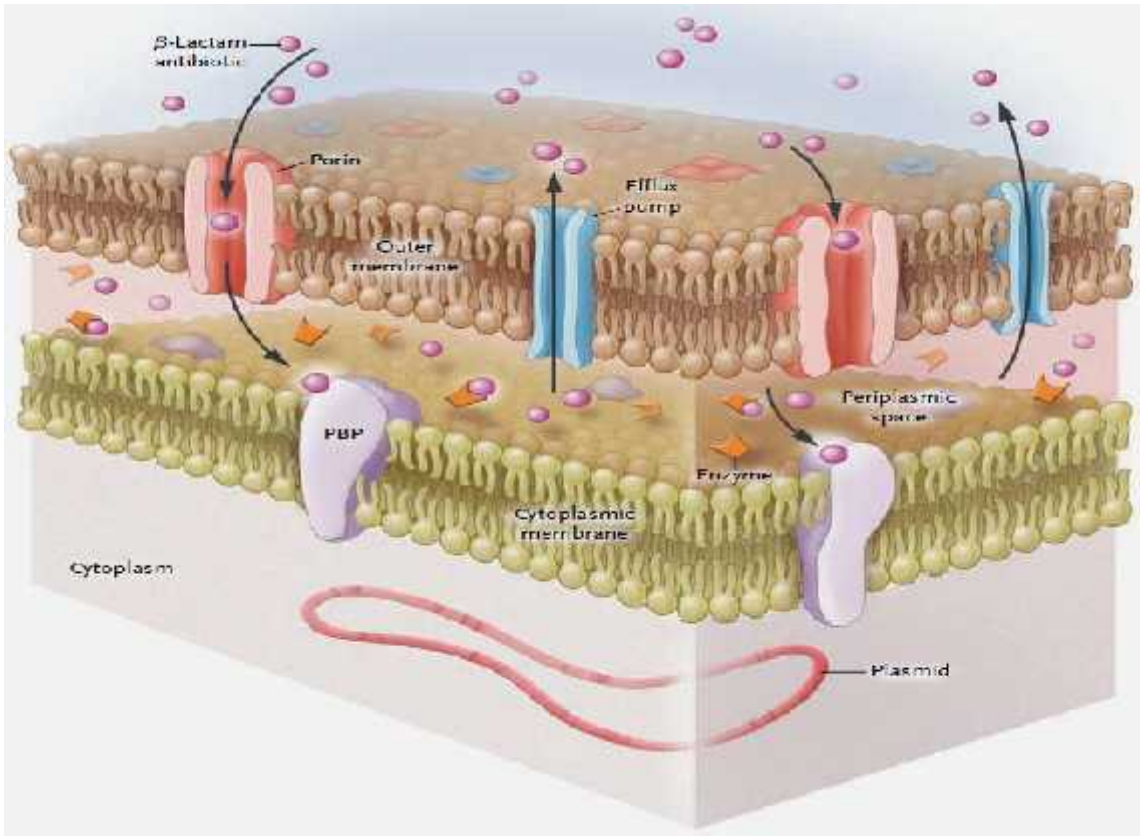
شده اند بطور پیوسته در حال افزایش است(٤). این باکتری همچنین عامل عفونت‌های اکتسابی از جامعه، عمدتا در جنوب شرقی آسیا و نواحی استوایی استرالیا می‌باشد که از این مورد می‌توان به پنومونی به‌عنوان رایج ترین سندروم کلینیکی اشاره کرد که به دنبال آن باکتریمی نیز بروز می‌کند(۳) .این پاتوژن مهم رایج ترین گونه باکتریایی جدا شده از زخم‌های سربازان مجروح شده در نواحی جنگ زده در عراق و افغانستان بوده است(۵).

۱-۲ مقاومت آنتی بیوتیکی

کسب مقاومت آنتی بیوتیکی طی سالیان اخیر، این میکروارگانیسم را به عنوان یکی از ارگانیسم های مشکل ساز در عصر آنتی بیوتیک‌ها مطرح کرده است. به عبارتی اسینتوباکتر بومانی به همه آنتی بیوتیک‌هایی که تاکنون شناخته شده است مقاومت کسب کرده است. نقش باکتری در مکانیسم‌های مقاومت به آنتی بیوتیک وتوانایی غیرطبیعی آن به سازش در برابر شرایط ناسازگار محیطی، باکتری را همچون سدی در برابر همه عوامل ضدباکتری حفظ کرده است و به گسترش و بقاء آن در محیط‌های بیمارستانی کمک می‌کند. بنابراین این باکتری به صورت یک پاتوژن نیرومند، به عنوان معزلی در مراکز درمانی در سطح بین المللی مطرح است. در گذشته نه‌چندان دور درمان رایج عفونت‌های اسینتوباکتر استفاده از بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و کینولون‌ها بوده گرچه مصرف بیش از اندازه این آنتی بیوتیک‌ها منجر به ظهور سویه‌های مقاوم به آنها در سطح جهانی شد. سپس کاراپنم‌ها بعنوان یک رده از بتا لاکتام‌ها با فعالیت آنتی باکتریال وسیع الطیف به شکل گسترده ای برای درمان عفونت-های حاصل از این سویه‌های مقاوم به کار رفت. متأسفانه سویه‌های اسینتوباکتر مقاوم به کاربـاپنم‌ها نیز به سرعت به شکل گسترده‌ای ظهور یافتند(۱).

مکانیسم‌های مقاومت به بتالاکتام‌ها در اسینتوباکتر شامل (۱)تولید بتالاکتامازها، (۲)تغییر در تمایل به پروتئین متصل شونده به پنی سیلین، (۳)کاهش نفوذپذیری غشا خارجی به‌دلیل تغییر در ساختار و یا تعداد پورین‌ها، و (٤)افزایش فعالیت پمپ‌های انتشار به خارج (Efflux pumps) می‌باشد(۶).

همچون سایر گرم منفی‌ها، اسینتوباکتر یک غشای خارجی و یک غشای سیتوپلاسمی دارد که بتالاکتام‌ها (کارباپنم‌ها، بتالاکتام‌های AmpC، و بتالاکتام‌های وسیع الطیف) در بین این دو غشا (فضای پری پلاسمی) قرار می‌گیرند. پروتئین‌های متصل شونده به پنی سیلین (PBPs) که در سطح غشای سیتوپلاسمی مستقر شده اند اهداف نهایی آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام می باشند. به منظور اتصال به این اهداف، آنتی بیوتیک‌ها باید از طریق کانال‌های پورینی (پروتئین‌های غشای خارجی) از غشای خارجی عبور کرده و به فضای سیتوپلاسمی وارد شوند. در درون فضای پری‌پلاسمی بتالاکتام‌ها به PBPها متصل می‌شوند ویا به شکل فعالی بوسیله پمپ‌های انتشار به خارج از ساختار باکتری رانده می‌شوند. اسینتوباکتر عناصر ژنتیکی از جمله اینتگرون‌ها و ترانسپوزون‌هایی روی کروموزوم اصلی و یا روی پلاسمیدهایش دارد که می‌توانند حاوی چندین کاست از ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی (برای مثال بتالاکتام‌های وسیع الطیف و متالوبتالاکتام‌ها) باشند(۷).

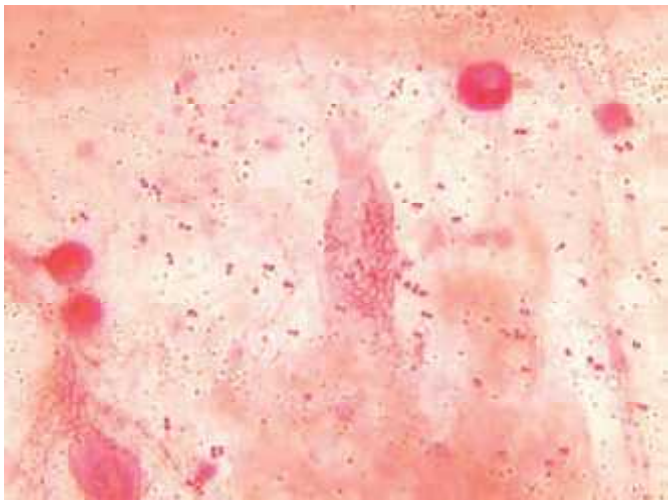


شکل ۱-۱

مکانیسم‌های مقاومت به بتالاکتام‌ها(۷)

۱-۳ اسینتوباکتر بومانی، یک پاتوژن موفق

این میکروارگانیسم، بیماران آسیب پذیر بیمارستانی به ویژه افراد دارای نقص در سیستم ایمنی را از طریق پوست ومجاری تنفسی مورد حمله قرار می‌دهد. به طوریکه به عنوان عامل عمده پنومونی ناشی از آلودگی‌های بیمارستانی این ارگانیسم مطرح است. به‌هر حال در سال‌های اخیر این میکروارگانیسم در آلودگی‌های ناشی از سیستم عصبی مرکزی، پوست وبافت‌های نرم و استخوان نیز نقش داشته است (۲).



شکل ۱-۲

نمونه رنگ امیزی گرم از بیماری مظنون به پنومونی وابسته به دستگاه تهویه (٦)

تلاش‌های گسترده‌ای برای شناخت عوامل جدید و استراتژی‌هایی برای درمان و یا جلوگیری از آلودگی آغاز شده است تا سبب بازداشتن میانکنش بین میزبان با میکروارگانیسم شود. در این بین باکتری‌ها استراژی‌هایی را اتخاذ می‌کنند تا مسیر بیان ژن‌ها را از حالت زندگی آزاد به حالت انگلی تغییر دهد. در حین انتقال یک سری پروتئین‌های خارج سلولی ومولکول‌های سطحی سلول تولید می‌شوند که اصطلاحا ویرولانس فاکتور نام گرفته است. با تولید این فاکتورها که بیشتر تحت تنظیم شرایط محیطی (دما، فلزات یونی، شرایط اسمزی محیط، متابولیت،pH) است، باکتری در برابر عوامل ضد باکتری از جمله آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان می‌دهد. اگرچه بیماری‌زایی در همه میکروارگانیسم‌ها وجود دارد ولی مکانیسم آن وابسته به میکروارگانیسم متفاوت است. بنابراین ویرولانس فاکتورها در باکتری‌ها می‌توانند درکنترل بیماری مورد هدف باشند (۸).

۱-٤ اپیدمیولوژی باکتری

در مورد زیستگاه طبیعی این جنس از باکتری هنوز اطلاع مشخصی در دسترس نیست. در بین این جنس باکتری، اسینتوباکتر بومانی در بسیاری از مراکز درمانی یافت شده ودر بیمارستان‌ها بر روی بدن انسان کلونیزه می‌شود. به طوری‌که انعطاف پذیری آن با شرایط محیطی ودامنه وسیع مکانیسم مقاومت در باکتری، آن را به صورت یک پاتوژن موفق در آورده است.

اسینتوباکتر بومانی به عنوان یک عامل مهم بیماری در تعدادی از اپیدمی‌ها مطرح است. در این بین سویه‌های مقاوم آنتی بیوتیکی به سرعت گسترش یافته است(۹).

امروزه سرعت مرگ و میر ناشی از اسینتوباکتر بومانی از ۱۹ درصد تا ٥٤ درصد در حال افزایش است. آلودگی‌های پوست و بافت‌های نرم نیز درحوادث طبیعی همچون زلزله و جنگ‌های عراق وافغانستان گزارش شده است. این پاتوژن در سال ۲۰۰٤ به عنوان یک پاتوژن عمده در سونامی آسیا مطرح شد. علاوه بر آن، این ارگانیسم سبب شیوع باکتری از طریق انتقال فردی و آلودگی‌های گسترده محیطی می‌شود. مطالعات نشان داده که در مناطقی با سطح بهداشت عمومی پایین، عده زیادی از افراد به صورت ناقل می مانند و اگر پیش‌گیری‌های موثر به عمل نیاید، حاملین در افزایش شیوع بیماری نقش موثری دارند. مسئله بعدی، برای مبتلایان به این بیماری، گسترش سریع سویه‌های مقاوم آنتی بیوتیکی، سویه‌های (MDR)، دردهه‌های اخیراست که نسبت به سویه‌های غیر (MDR) سبب مرگ ومیر بیشتری شده است. علی‌رغم شدت بیماری در سویه‌های MDR فاکتورهای ویرولانس آن هنوز به خوبی شناخته نشده ومکانیسم دقیق پاتوژنیسته بیماری کاملا مشخص نیست. زیرا برای این ارگانیسم توکسین و یا سیتولیزین شناخته نشده است(۲).

شکل ۱-۳

کشورهایی که شیوع اسینتوباکتربومانی مقاوم به کاربانپم‌ها را گزارش کرده اند. نقاط قرمز رنگ موارد گزارش شده قبل از سال ۲۰۰۶ و مناطق زرد رنگ گزارشات بعد از سال ۲۰۰۶ را در بر می‌گیرند(۱۰).

مقایسه بین سویه‌های حساس و مقاوم آنتی‌بیوتیکی وسویه *Acinetobacter baylyi* نشـان داده که ژن‌های موثر دربیوژنز پیلـی، سیسـتم جـذب آهـن، متابولیسـم وسیسـتم ترشـحی نـوع ۵ درایـن میکروارگانیسم به عنوان Virulome است. با استفاده ازمـدل‌هـای در پـاتوژنز بیمـاری و موتـان‌هـای ترانسپوزون در *Acinetobacter baumannii* به صورت بالقوه پاتوژن است (۲).

در قرن حاضر وجود این باکتری به دلیل پایداری آن نسبت به شرایط متغیر محیطی ومقاومت به آنتی بیوتیک‌های متفاوت، به عنوان زنگ خطری در مراکز درمانی است که میکروارگانیسم را به صورت پاتوژن نیرومندی نشان داده است. پس ضرورت وجود دیدگاهی نو برای مقابله با پاتوژنیسته میکرورگانیسم باید لحاظ شود (۸).

۱-۵ اهمیت آهن

آهن که مهم‌ترین عنصر مورد نیاز برای باکتری‌ها محسوب می‌شود. در بسیاری از پروسه‌های بیولوژیکی نقش کلیدی دارد. از آن جمله می‌توان به نقش آهن در فتوسنتز، تنفس، سیکل تری کربوکسیلیک اسید، تثبیت نیتروژن، انتقال اکسیژن، متانوژنز، تنظیم بیان ژن، سنتزDNAو...اشاره کرد(۱۱). آهن چهارمین عنصر فراوان پوسته کره زمین است اما به‌علت نامحلول بودن در شرایط فیزیولوژیک یعنی pH خنثی، قلیایی و حضور اکسیژن، بیشتر میکروارگانیسم‌ها نمی‌توانند از آن استفاده کنند و تحت این شرایط غلظت آهن در دسترس برابر با 10^{-18} M است. آهن در شرایط هوازی بصورت پلیمر هیدروکسید فریک وجود دارد و در محلول‌های آبی به شکل ضعیف حل می‌شود. لذا آهن به‌عنوان فاکتور محدود کننده‌ی رشد برای بیشتر میکروارگانیسم‌ها مطرح می‌باشد(۱۲).

درشرایط هوازی باکتری‌ها و قارچ‌ها برای غلبه بر این مشکل، انواع لیگاندهای آهن با وزن مولکولی کم به نام سیدروفور تولید و به محیط خارج سلول ترشح می‌کنند که با گرایش زیاد به آهن فریک متصل می‌شوند و تشکیل کمپلکس فریک–سیدروفور را می‌دهند.

استفاده از سیدروفور تنها راه به‌دست آوردن آهن نیست. برخی از باکتری‌ها با تولید پروتئینی به‌نام هموفور با وزن مولکولی حدود۲۰ کیلودالتون، آهن مورد نیاز خود را از طریق اتصال به گروه هِم آزاد و یا پروتئین‌های واجد هِم کسب می‌کنند که در نهایت هموفورهای واجد هِم به وسیله گیرنده‌های اختصاصی غشاء خارجی گرفته و به‌داخل سلول هدایت می‌شوند (۱۳).

برخی دیگر از باکتری‌ها، آهن فریک را مستقیماً از ترانسفرین یا لاکتوفرین به‌وسیله فرایند مشابه به‌دست می‌آورند (۱٤).

علاوه بر مسیرهای معمول انتقال آهن فریک، مسیر انتقال آهن فرو در شرایط بی‌هوازی توسط باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این انتقال از طریق سیستمی به‌نام Feo[1] صورت می‌گیرد که از سه پروتئین FeoA، FeoB و FeoC تشکیل شده است (۱۵).

همان‌گونه که گفته شد آهن مهم‌ترین عنصر محدود کننده‌ی رشد برای اکثر باکتری‌ها محسوب می**شود** اما لاکتوباسیل‌ها، بورلیا بورگدورفری و استرپتوکک‌ها از این قاعده مستثنی هستند. لاکتوباسیل‌ها هیچ نیازی به آهن ندارند و معمولاً در شرایط میکروآئروفیل رشد می‌کنند و فاقد پروتئین‌های واجد هِم می‌باشند (۱۱).

بورلیا بورگدورفری نیز به‌طور طبیعی در محیط فقر آهن رشد می‌کند و فاقد پروتئین‌های واجد آهن و همچنین ژن‌های تنظیم شونده به‌وسیله آن می‌باشد(۱۶). باکتری اشرشیاکلی و چندین گونه دیگر خانواده انتروباکتریاسه، سیدروفور انتروباکتین ترشح می‌کنند که پس از اتصال به آهن فریک و تشکیل کمپلکس فریک–سیدروفور به‌وسیله گیرنده‌ی غشاء خارجی به‌نام FepA[2] شناسایی و با عبور از غشاء خارجی در فضای پری‌پلاسمیک آزاد می‌شود.

پروتئین FepB به‌کمپلکس فریک- سیدروفور متصل شده و با عبور از فضای پری‌پلاسمیک آن‌را به انتقال دهنده‌ی ATP-binding cassette (ABC) موجود در غشاء سیتوپلاسمی تحویل می‌دهد (۱۷).

[1] Ferrous Iron Transport

[2] ferric enterobactin protein