Original Article

Immunogenicity of Amino Acid Region 7601-8140 in Biofilm Associated Protein of *Acinetobacter baumannii*

Marziyeh Jalali[1], Iraj Rasooli[2*], Kobra Ahmadi Zanoos[1], Abolfazl Jahangiri[3], Mohammadreza Jalali Nadooshan[4], Shakiba Darvish Alipour Astaneh[5]

1- M.Sc. Student, Department of Biology, Shahed University, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Biology, Molecular Microbiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
3- Ph.D. Candidate, Department of Biology, Shahed University, Tehran, Iran
4- Professor, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Molecular Microbiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
5- Ph.D. Candidate, Department of Microbiology, Shahed University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 3319118651, Department of Biology, Molecular Microbiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran*
Email: rasooli@shahed.ac.ir

Received: 07/Dec/2013, Accepted: 13/Jan/2014

Abstract

Objective: *Acinetobacter baumannii (A. baumannii)* is a major hospital pathogen with a high capacity to resist most common anti-microbial agents. *A. baumannii* is the etiologic agent for various illnesses including pneumonia, meningitis, and bloodstream infections. Biofilm associated proteins (Bap) are specific cell surface proteins essential for the formation of biofilm and play a main role in its pathogenicity. Previously, we have studied various regions of this protein. Considering different criteria, some regions were introduced as conserved and immunogenic. The immunogenicity of one of those regions pertaining to amino acids 706-1076 previously examined has shown that its expression triggers high antibody levels when injected to mice thereby protecting the animals against the bacterium. The present study examines region 4 of the Bap protein in order to validate the previous bioinformatics studies and its immunogenicity.

Methods: In order to obtain immunity against this pathogen, a 1620 bp gene from Bap was amplified and cloned in pET32a. This region from Bap was cloned, expressed and verified by monoclonal antibodies. BALB/c mice were immunized by subcutaneous injection of the pure recombinant protein. Mice immune response was determined by ELISA.

Results: High titer of raised antibodies implied that the recombinant protein was a strong antigen and immunogen.

Conclusion: The results indicate that this protein can be a suitable choice for developing a new recombinant vaccine against *A. baumannii*.

Keywords: *Acinetobacter baumannii,* Biofilm associated protein, Immunogenicity

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 4, Winter 2014, Pages: 15-26

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

مقاله اصیل

ایمنی‌زایی ناحیه‌ای اسیدهای آمینهٔ ۷۶۰۱ تا ۸۱۴۰ از پروتئین Bap اسینتوباکتر بومانی

مرضیه جلالی[۱]، ایرج رسولی[۲*]، کبری احمدی زانوس[۱]، ابوالفضل جهانگیری[۳]، محمدرضا جلالی ندوشن[۴]، شکیبا درویش علیپور آستانه[۵]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲- استاد، گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۴- استاد، گروه آسیب‌شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۵- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۳۳۱۹۱۱۸۶۵۱، دانشگاه شاهد. بزرگراه تهران- قم روبروی حرم مطهر امام خمینی (ره)، دانشکده علوم پایه و مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مولکولی، گروه زیست‌شناسی
Email: rasooli@shahed.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۲/۰۹/۱۶ پذیرش مقاله: ۹۲/۱۰/۲۳

چکیده

هدف: اسینتوباکتر بومانی یکی از پاتوژن‌های اصلی بیمارستانی است و ظرفیت بالایی برای مقاومت به انواع مواد ضد میکروبی موجود دارد. اسینتوباکتر بومانی انواع متفاوتی از عفونت‌ها شامل پنومونی، مننژیت و عفونت‌های مرتبط با خون را ایجاد می‌کند. پروتئین‌های مربوط به بیوفیلم (Bap) پروتئینی اختصاصی در سطح سلول است که مستقیماً در تشکیل بیوفیلم در اسینتوباکتر بومانی مورد نیاز است و نقش اصلی را در عفونت‌زایی باکتری بازی می‌کند. در مطالعه قبلی محققان حاضر نواحی متعددی از این پروتئین بررسی شد و با در نظر گرفتن معیارهای مختلف، چند ناحیه به عنوان نواحی حفاظت شده و ایمنی‌زا معرفی و ایمنی‌زایی یکی از این نواحی مطالعه شد. این ناحیه به اسیدهای آمینهٔ شمارهٔ ۷۰۶- ۱۰۷۶ از پروتئین بالغ مربوط می‌شود که طی بیان این ناحیه و تزریق آن به موش میزان بالایی آنتی‌بادی تولید شد که از موش در برابر این باکتری محافظت می‌کرد. در مطالعهٔ پیش‌رو، ایمنی‌زایی ناحیهٔ معرفی شدهٔ دیگری (ناحیهٔ ٤) از پروتئین Bap بررسی می‌شود تا ضمن تأیید مطالعات بیوانفورماتیکی قبلی میزان ایمنی‌زایی آن ارزیابی شود.

مواد و روش‌ها: در مطالعهٔ حاضر ژن ناحیه‌ای از پروتئینBap با ۱٦۲۰ جفت باز به وسیلهٔ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر و در pET32a کلون شد. این ناحیه از پروتئین بزرگ Bap با موفقیت بیان و توسط آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تأیید شد. در این پژوهش موش‌های BALB/c به وسیلهٔ تزریق زیرپوستی پروتئین نوترکیب خالص، ایمن شده و ایجاد آنتی‌بادی در بدن موش با استفاده از الایزا ارزیابی شد.

نتایج: تیتر آنتی‌بادی تولید شده در سرم موش بالا بود که این امر بیانگر آنتی‌ژنسیته و ایمنی‌زایی بالای این پروتئین نوترکیب است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که این پروتئین می‌تواند گزینهٔ مناسبی برای تولید یک واکسن جدید نوترکیب باشد.

کلیدواژگان: اسینتوباکتر بومانی، پروتئین بیوفیلمی، ایمنی‌زایی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲، صفحات: ۱۵-۲۶

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

مقدمه

جنس اسینتوباکتر (*Acinetobacter*) اولین بار در سال ۱۹۱۱ توسط بایرینک (Beijerinck) معرفی شد [۱]. اسینتوباکترها، باکتری‌های میله‌ای گرم منفی ضخیمی هستند که در فاز سکون (Stationary Phase) بیشتر به ریخت کوکوباسیل در می‌آیند [۲]. گونه‌های مهم اسینتوباکتر به عنوان فلور طبیعی پوست انسان از مناطق مرطوب پوست نظیر کشاله ران، زیر بغل و انگشتان پا جدا می‌شوند. مخازن دیگر اسینتوباکتر شامل انواع لوازم بیمارستانی، مناطق مرطوب و خشک بیمارستان، کارکنان بیمارستان و بیماران است [۳، ٤]. هر چند دست کم ۲۵ درصد افراد سالم حامل این باکتری هستند [۳]. گزارش‌های بسیاری از دخالت این میکروارگانیسم در عفونت‌های مختلف بیمارستانی وجود دارد [۵]. تعدادی از گونه‌های اسینتوباکتر به طور مستقیم در عفونت‌های انسانی دخیلند؛ از جمله این گونه‌ها اسینتوباکتر بومانی (*A. baumannii*) است که به عنوان یک بیماری‌زای مهم شناخته می‌شود. این باکتری عامل عفونت تنفسی (Respiratory Infection)، باکتریمی (Bacteraemia)، مننژیت (Meningitis) و عفونت دستگاه ادراری (Urinary Tract Infection) است [۳، ٦، ۷]. درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری به دلیل مقاومت قابل توجه آن به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها، بسیار دشوار است و میزان مرگ و میر بیماران آلوده در برخی از کشورها به ۷۵ درصد می‌رسد [۸]. اسینتوباکتر بومانی بیشتر در محیط‌های بیمارستانی یافت می‌شود و به علت توانایی قابل توجه آن در زنده ماندن در این محیط، امروزه بیش از پیش مورد توجه است [۹]. این بیماری‌زا رتبهٔ دوم را بعد از سودوموناس آئروجینوزا (*Pseudomonas aeruginusa*)، در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی (Nosocomial Infections) دارد [۱۰]. مکانیسم(های) بیماری‌زایی اسینتوباکتر بومانی به‌طور دقیق مشخص نیست [۱۱]. با این حال مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها یک صفت عادی و رو به گسترش در اسینتوباکتر بومانی است. عامل مهم و مؤثر دیگر در بقای این جاندار در محیط زنده و غیر زنده تشکیل بیوفیلم (Biofilm) است؛ این باکتری به آسانی به سطوح زنده یا غیر زنده متصل می‌شود و روی آن‌ها بیوفیلم تشکیل می‌دهد [۱۲-۱٤]. گزارش‌های محدودی درباره تولید بیوفیلم در اسینتوباکتر بومانی و رابطه آن با مقاومت دارویی این میکروارگانیسم وجود دارد [۱۵]؛ همچنین نقش سیستم ترشحی با واسطه چپرون (Chaperone) که در بروز پیلی در سطح سلول دخیل است، در تشکیل بیوفیلم این باکتری نشان داده شده است [۱۵]. پروتئینی در این بیماری‌زای فرصت‌طلب شناخته شده [۱٦] که تمامی معیارهای عضویت در خانوادهٔ Bap (Biofilm Associated Protein) را دارا است؛ این پروتئین با وزن مولکولی ۸۵٤ کیلودالتون که دارای تکرارهای متعددی از هفت الگوی مشابه است، در سطح سلول بروز یافته و نقشی کلیدی در تولید بیوفیلم توسط این باکتری دارد [۱٦]. به دنبال کشف Bap در استافیلوکوکوس اورئوس (*Stapylococcus aureus*)، همولوگ‌های (Homologue) این پروتئین در دست کم سیزده بیماریزای دیگر شناسایی شد [۱۷-۲۰]. این پروتئین‌ها با وجود عدم تشابه توالی اولیه، شباهت‌های ساختاری و عملکردی زیادی دارند. در مقایسه با پروتئین Bap در استافیلوکوکوس اورئوس، به نظر می‌رسد هومولوگ آن در اسینتوباکتر بومانی در اتصال اولیه باکتری به سطوح غیر زنده نقش مهمی ندارد، و نقش پروتئین Bap استینوباکتر بومانی در بقا و استحکام بیوفیلم بالغ دارای اهمیت است [۱٦]. بیوفیلم‌ها جوامع سازمان یافته باکتریایی هستند که به سطوح مختلف زنده یا غیر زنده متصل می‌شوند [۲۱] و به عنوان دلیلی بر توانایی عفونت‌زایی باکتری‌ها شناخته می‌شوند [۲۲] به طوری که بیش از ۸۰ درصد عفونت‌های باکتریایی در بدن انسان در رابطه مستقیم با بیوفیلم‌ها است [۲۳]. گزارش‌ها نشانگر افزایش مقاومت باکتری‌ها به انواعی از مواد شیمیایی ضد میکروبی در بیوفیلم، نسبت به فرم تک‌زی است [۲۰]. گروهی از پروتئین‌های سطحی وجود دارد که ویژگی‌های ساختاری و عملکردی متعددی را نشان می‌دهد و نقش مهمی در فرآیند تشکیل بیوفیلم در گونه‌های مختلف باکتری‌ها دارد [۲٤]. اولین عضو این گروه از پروتئین‌ها، با عنوان Bap در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شد [۱۷]. برخی از

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

ویژگی‌های ساختاری این پروتئین‌ها شامل حضور آن‌ها در سطح خارجی باکتری‌ها، وزن مولکولی بالا و وجود هستهٔ مرکزی (Core Domain) متشکل از تکرارهای متوالی از توالی‌های مشابه است. این پروتئین‌ها به باکتری قابلیت تشکیل بیوفیلم می‌دهد و به این ترتیب نقش مهمی در عفونت‌زایی بیماری‌زاها دارد [٢٤]. پروتئین وابسته به بیوفیلم اسینتوباکتر بومانی، Bap با ٨٦٢٠ اسید آمینه، pI (pH ایزوالکتریک) پیش‌بینی شدهٔ حدود ٣ و وزن مولکولی حدود ٨٥٤ کیلودالتون یکی از بزرگ‌ترین و اسیدی‌ترین پروتئین‌های پروکاریوتی است [١٦]. این پروتئین شامل تکرارهای متوالی از هفت الگوی مختلف است. این الگوها از A تا G نام گذاری شده‌است؛ در این پروتئین پنج رونوشت از واحد A (٥٤ تا ٩٩ درصد)، ٢٢ رونوشت از تکرار B (٧٢ تا ١٠٠ درصد)، ٢١ رونوشت از تکرار C (٧٣ تا ١٠٠ درصد)، ٢٨ رونوشت از تکرار D (٧٨ تا ١٠٠ درصد)، ٢ رونوشت از تکرار E (٦٢ درصد)، ٢ رونوشت از تکرار F (٦٧ درصد) و ٣ رونوشت از تکرار G (٣٦ تا ٥١ درصد) وجود دارد (اعداد داخل پرانتزها نشان دهندهٔ درصد یکسانی اسیدهای آمینه در بین خود تکرارهاست) [٢٥]. بیشتر تلاش‌ها معطوف به شناسایی ساختار، عملکرد و نقش این پروتئین‌ها در بیماری‌زایی استافیلوکوکوس اورئوس بوده است [١٧، ٢٤]. تنها پژوهش مشابه در اسینتوباکتر بومانی، توسط لوفلم (Loehfelm) انجام شده که منجر به کشف همولوگ دیگری از Bap، در این میکروارگانیسم شده است [١٦]. در مطالعه‌ای که توسط آقای رهبر و همکاران صورت گرفته است، نواحی متعددی از این پروتئین بررسی شده و با در نظر گرفتن معیارهای مختلف، ٤ ناحیه به عنوان نواحی حفاظت شده و ایمنی‌زا معرفی شده است [٢٥]. ایمنی‌زایی یکی از این نواحی (ناحیه ٢) پروتئین توسط آقای فتاحیان و همکاران بررسی شد. این ناحیه به اسیدهای آمینهٔ شمارهٔ ٧٠٦- ١٠٧٦ از پروتئین بالغ مربوط می‌شود که طی بیان این ناحیه و تزریق آن به موش میزان بالایی آنتی‌بادی تولید شد که از موش در برابر این باکتری محافظت می‌کرد [٢٦]. در مطالعهٔ پیش‌رو، ایمنی‌زایی ناحیهٔ معرفی شدهٔ دیگری (ناحیهٔ ٤) از پروتئین Bap بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد نیاز

بسیاری از مواد شیمیایی مورد استفاده شامل EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid)، ترا متیل دی آمین (Tetra Methyl Diamin: TEMED)، بیس آکریل آمید، کلروفرم، فنل، اتیدیوم بروماید، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، سدیم دی هیدروژن فسفات، دی سدیم هیدروژن فسفات، بی کربنات سدیم، توین-٢٠، اسید فسفریک، SDS (Sodium Dodecylsulfate)، اوره، اسید کلریدریک، کلرید سدیم، ایزوپروپانل، ٢- مرکاپتو اتانول، بروموفنل بلو (Bromophenol Blue) کوماسی بلو R250، کوماسی بلو G250، هیدروکسید سدیم، هیدروکسید آمونیوم، اسید استیک گلاسیال، متانول، استون و اتانول از شرکت Merck (آلمان) تهیه شد. اسید بوریک، تریس بازیک (Tris Base)، IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside)، پودر ژل آگارز معمولی و آگارز با نقطه ذوب پایین (Low Melting Point Agarose) و آمونیوم پرسولفات (APS)، پلی اکریل آمید از شرکت Merck (آلمان) تهیه شد. آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کانامایسین از شرکت Roche (آلمان) و ناقل بیانی pET32a از شرکت Novagen (آمریکا) خریداری شد. آنزیم‌های محدودالاثر *Hind*III، *Eco*RI و آنزیم‌های T4 DNA Ligase، آنزیم‌های DNA پلیمراز Taq از شرکت سیناژن (ایران، نماینده Fermentas لیتوانی) تهیه و بر اساس دستورالعمل‌های ارایه شده از سوی شرکت استفاده شد. کیت تخلیص DNA پلاسمیدی و کیت استخراج و تخلیص DNA از ژل آگارز از شرکت Bioneer (کره) تهیه شد. برای تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون Ni-NTA agarose resin استفاده شد که از شرکت QIAGEN (آلمان) خریداری شد. سویهٔ *E. coli* Bl21-DE3 برای تهیه سلول‌های مستعد استفاده شد. ادجوانت ناقص و کامل فروند (Freund's Adjuvant) از مؤسسهٔ رازی تهیه شد. از آنتی‌بادی پلی‌کلونال Anti IgG موشی کونژوگه با آنزیم پروکسیداز (HRP) به عنوان آنتی‌بادی اختصاصی برای انجام الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay:

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

ELISA) استفاده شد. DAB (Diaminobenzidine) و TMB از شرکت Sigma (آمریکا) تهیه شد و در نهایت موش آزمایشگاهی سوری نژاد BALB/C از مؤسسه پاستور تهیه شد.

روش‌ها

باکتری‌های مورد استفاده

در این تحقیق از باکتری‌های اسینتوباکتر بومانی (ATCC 19606) و *E. coli* strain BL21(DE3) استفاده شد که برای کشت این باکتری‌ها از محیط مایع یا جامد LB (Lauria -Bertani) استفاده شد.

استخراج ژنوم از باکتری اسینتوباکتر بومانی ATCC 19606

برای استخراج ژنوم باکتری اسینتوباکتر بومانی که یک باکتری گرم منفی است از روش زیر استفاده شد:

۱/۵ میلی‌لیتر از کشت مایع به مدت ۲-۵ دقیقه در ۵۰۰۰-۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی (Supernatant) دور ریخته شد و رسوب (Pellet) حاصل در ۵۶۷ میکرولیتر بافر TE با تکان های شدید حل شد. به این مخلوط ۳۰ میکرولیتر از بافر SDS ۱۰ درصد و سپس ۳ میکرولیتر از آنزیم پروتئیناز K (Proteinase K) (۲۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) اضافه شد و مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و به مدت ۱-۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به مخلوط حاصل ۱۰۰ میکرولیتر نمک NaCl ۵ مولار اضافه شد و مخلوط به آرامی تکان داده شد. به مخلوط حاصل ۸۰ میکرولیتر محلول CTAB/ NaCl (Hexadecyl-trimethyl-ammonium Bromide) اضافه شد و به آرامی تکان داده شد و مخلوط به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرمادهی شد. به مخلوط حاصل به اندازه حجم آن (۷۸۰ میکرولیتر)، مخلوط کلروفرم- ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ کلروفرم و ۱ ایزوآمیل الکل) اضافه شد. مخلوط حاصل به آرامی تکان داده شد تا دو فاز با هم ترکیب شود. سپس مخلوط حاصل در ٤ درجه سانتی‌گراد و در ۲۰۰۰-۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰- ۲۵ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی به تیوپ دیگری منتقل شد و هم حجم آن مخلوط فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل اضافه شد. مخلوط به آرامی تکان داده شد (۱۵-۳۰ ثانیه) تا دو فاز با هم ترکیب شود. سپس به مدت ۲۰- ۲۵ دقیقه در ۲۰۰۰-۲۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. محلول رویی به تیوپ دیگری منتقل شد و هم حجم آن (حدود ۵۰۰ میکرولیتر) ایزوپروپانول که در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می شد، اضافه و محلول به آرامی تکان داده شد. به منظور افزایش کارآیی عمل رسوب کردن DNA، محلول به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و ایزوپروپانول آن خارج شده و به رسوب حاصل حدود ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه شد و مجدداً محلول در ۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. الکل دور ریخته شده و رسوب حاصل در محیط آزمایشگاه یا ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک شد. به رسوب حاصل ۵۰ میکرولیتر بافر TE اضافه شد و سپس برای حذف RNA احتمالی موجود در آن ۳- ۵ میکرولیتر آنزیم RNase A به محلول اضافه شد و به مدت ۱۲- ۱٦ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

طراحی آغازگر (Primer)

برای تکثیر ناحیهٔ مورد نظر که ۱٦۲۰ جفت باز طول دارد، یک جفت آغازگر با استفاده از نرم‌افزار Oligo طراحی شد. با استفاده از نرم‌افزار CLC آنزیم‌های محدود کنندهٔ مؤثر بر قطعهٔ مورد نظر بررسی شد (جدول ۱).

تکثیر قطعهٔ مورد نظر

قطعهٔ ژنی مورد نظر با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر شد و در ژل آگارز ۱ درصد و به کمک رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید مشاهده شد و برای تأیید محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از آنزیم محدود کنندهٔ *Pst*I استفاده شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

جدول ۱ توالی آغازگرهای رفت و برگشت برای تکثیر قطعه ٤ از ژن Bap

آغازگر	توالی	آنزیم	طول (جفت باز)	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)
رفت	TATATGAATTCATGGTTGTAGCAGATGGCACGAGCAT	*Eco*RI	۳۷	٦۸/۳
برگشت	TATCTACTCGAGTTAATTACCATTTTCAGCTGTAACAGC	*Hind*III	۳۹	٦٥/۳

ساخت سازوارهٔ نوترکیب

محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، با استفاده از روش ژل آگارز با نقطه ذوب پایین، بازیابی شد. سپس به کمک آنزیم‌های *Eco*RI و *Hind*III محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و حامل ژنی (PET-32a) که برای کلون نمودن این قطعه در نظر گرفته شده بود، به صورت جداگانه هضم شد.

آن‌گاه به منظور تهیه سازواره‌های نوترکیب، با استفاده از آنزیمT4 DNA Ligase واکنش الحاق قطعه مورد نظر و حامل برش خورده صورت گرفت. محصول این واکنش، با استفاده از روش شوک حرارتی به سلول‌های میزبان (*E.coli* B121-DE3) مستعد تراریخت شد.

بیان قطعهٔ همسانه‌سازی شده

ابتدا تک کلونی باکتری حاوی سازهٔ نوترکیب انتخاب شد و در محیط‌های LB مایع حاوی ۸۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر آمپی‌سیلین به مدت ۱۵ ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و با ۱۵۰ دور در دقیقه کشت داده شد. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از کشت به صورت جداگانه در دو لوله حاوی ۵ میلی‌لیتری محیط LB دارای ۸۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر آمپی‌سیلین اضافه و مانند بالا انکوبه شد. پس از رسیدن جذب نوری لوله‌ها به ۰/۵ در طول موج ٦۰۰ نانومتر به یکی از لوله‌ها IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار در شرایط استریل اضافه و لوله دوم به عنوان شاهد انتخاب شد. لوله‌های آزمون و شاهد هم به مدت ۵ ساعت و هم به مدت ١٦ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با ۱۵۰ دور در دقیقه در شیکر انکوباتور انکوبه شد. پس از اتمام زمان فوق، مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از هرکدام از محیط‌های کشت آزمون و شاهد با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و سلول‌ها جمع‌آوری شدند. محلول رویی نیز به منظور بررسی حضور پروتئین به صورت محلول نگهداری شد. سلول‌های جمع‌آوری شده به مدت یک شب در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرارداده شدند. سپس به آن‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر اوره ۸ مولار اضافه شد و طی چهار مرحله سلول‌ها با استفاده از امواج فراصوت شکسته شدند. سلول‌های خرد شده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با دور ١٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی جدا گشته و به آن بافر نمونه با رقت ۱۰X اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد.

بررسی پروتئین بیان شده به وسیله SDS-PAGE

با توجه به این‌که وزن تئوری پروتئین نوترکیب بیان شده حدود ۷۰ کیلودالتون محاسبه شد، بنابراین از ژل ۱۲ درصد برای بررسی بیان آن استفاده شد. پس از اتمام الکتروفورز، ژل SDS-PAGE مورد نظر با استفاده از کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد. با استفاده از این روش می‌توان تا ۰/۱ میکروگرم پروتئین را روی ژل تشخیص داد.

لکه‌گذاری وسترن به منظور تأیید پروتئین بیان شده

به منظور انجام لکه‌گذاری وسترن مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه‌های قبل و بعد از بیان در ژل SDS-PAGE الکتروفورز شد. سپس از طریق الکتروبلاتینگ (Electroblotting)، به کاغذ نیتروسلولز منتقل و با محلول Ponceau S رنگ‌آمیزی شد تا از عمل انتقال اطمینان حاصل شود. کاغذ نیتروسلولز به مدت ۲ ساعت در داخل بافر تثبیت کننده شناور شد. برای انجام بهتر عمل تثبیت، تانک روی شیکر قرارداده شد. پس از

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

اتمام زمان، کاغذها با بافر PBST (Phosphate Buffered Saline Tween-20) شستشو شد. محلول آنتی‌بادی ضد هیستیدین با رقت ۱:۸۰۰۰ در بافر PBST به منظور وسترن بلاتینگ (Western Blotting) و تأیید پروتئین تهیه و روی کاغذ نیتروسلولز ریخته شد و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار گرفت. سپس کاغذ نیتروسلولز به مدت ۲ ساعت در محلول آنتی‌بادی ثانویه که با رقت ۱:۱۰۰۰ در داخل بافر PBST تهیه شده بود در دمای اتاق روی شیکر قرار گرفت و پس از آن با بافر PBST سه بار و هربار به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شد. پس از این مرحله، کاغذ در معرض محلول DAB (3,3'-Diaminobenzidine) که به صورت تازه تهیه شده بود و H_2O_2 به عنوان سوبسترا به آن افزوده شده بود قرار گرفت. پس از ظهور باندها واکنش PBS مهار شد.

بیان پروتئین نوترکیب در مقیاس آزمایشگاهی

پس از اطمینان از بیان پروتئین و تأیید آن با روش‌های فوق، به منظور تخلیص پروتئین‌های نوترکیب اقدام به بیان در حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر شد. عمل تلقیح از کشت‌های شبانه انجام گرفت. بعد از این‌که محیط کشت به جذب نوری ۰/۵ در طول موج ٦۰۰ نانومتر رسید، عمل القا با افزودن IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار انجام شد. پس از القا به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه، سلول‌ها به کمک سانتریفوژ در مدت زمان ۱۵ دقیقه و با ۵۰۰۰ دور در دقیقه در فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری، جمع‌آوری شد و محیط رویی دور ریخته شد. سپس سلول‌های هر فالکون در ۳ میلی‌لیتر اوره ۸ مولار حل شدند. در ادامه با کمک سونیکاتور با قدرت رزونانس ۷۵ درصد و تکثیر ۰/۵ در ٤ چرخه ۲۰ ثانیه‌ای سلول‌ها شکسته شدند، پس از هر دور به سلول‌ها ۱۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه استراحت داده شد. محلول رویی پس از جمع‌آوری به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و با ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تخلیص پروتئین نوترکیب به کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA

به دلیل قرار گرفتن برچسب هیستیدین در ابتدای پروتئین نوترکیب مورد نظر، این پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبیNi-NTA ، تخلیص شد. مجدداً این پروتئین در ژل SDS-PAGE مشاهده و خلوص آن بررسی شد.

ایمن‌سازی موش‌های آزمایشگاهی با پروتئین نوترکیب

به منظور تولید آنتی‌بادی، ۳ بار عمل تزریق به صورت زیر پوستی صورت گرفت. در تزریق اول مقدار ۲۰ میکروگرم از پروتئین نوترکیب بعد از این‌که با حجم مناسبی از بافر PBS و ادجوانت فروند کامل مخلوط شد، به هر موش تزریق شد. به موش‌های که به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شده‌اند حجم برابری بافر PBS به همراه ادجوانت تزریق شد. بعد از ۱۵ روز تزریق دوم انجام شد که در این تزریق مقدار ۱۵ میکروگرم از پروتئین نوترکیب همراه با ادجوانت فروند ناقص به هر موش تزریق شد. تزریق سوم نیز به فاصله ۱۵ روز بعد از تزریق دوم انجام شد که ۱۰ میکروگرم از پروتئین به موش‌ها تزریق شد. در تزریقات دوم و سوم مانند تزریق اول به هر موش کنترل حجم برابری از PBS و ادجوانت نیز تزریق شد. در این تحقیق تعداد ۱۵ موش به عنوان آزمون بررسی شد. همچنین برای تأیید پاسخ و جلوگیری از بررسی جواب کاذب، ۵ موش به عنوان شاهد انتخاب شد. برای تأیید تولید آنتی‌بادی و ایجاد پاسخ ایمنی، ۷ روز پس از دومین تزریق، همچنین ۷ روز پس از سومین تزریق از ۱۵ موش آزمون و ۵ موش کنترل خون‌گیری به عمل آمد. سپس سرم هر موش جدا شد و هر سرم به صورت جداگانه برای قابلیت شناسایی و اتصال با پروتئین نوترکیب Bap، توسط روش ELISA بررسی شد.

تعیین میزان تولید آنتی‌بادی توسط آزمون ELISA

به منظور تأیید ایمن‌سازی موش‌ها و همچنین مشاهده تیتر آنتی‌بادی در پی هر تزریق، سنجش ELISA غیر مستقیم در

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

پلیت‌های ۹۶ چاهکی که بـا پـروتئین نوترکیـب Bap (در هـر چاهک ۲ میکروگرم) پوشش داده شده بود، انجام شـد. پـس از انجام بلاکینگ با افزودن ۱۰۰ میکرولیتـر از رقـت ۱/۱۰۰ سـرم موش‌های ایمن شده و کنترل به چاهـک‌هـای اول، رقـت‌هـای متوالی تهیه شد.

پـس از شستـشو بـا PBS-T (PBS + 0.05 Tween)، کونژوگـهٔ ضـد آنتـی‌بـادی IgG موشـی بـا رقـت ۱/۳۰۰۰ بـه چاهـک‌هـا اضـافه و سـپس سوبـسترای TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) به چاهک‌ها افزوده شـد و بعـد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، واکنش با اسـید سـولفوریک مهـار و در طـول موج ۴۵۰ نانومتر، شدت رنگ با قرائت‌گـر ELISA (ELISA Reader) خوانده شد.

نتایج

استخراج DNA کروموزومی باکتری اسینتوباکتر بومانی

پس از کشت باکتری و نگهداری بـه مـدت یـک شـب در محیط کشتLB مایع، DNA کرومـوزومی آن بـا روش اشـاره شده استخراج و کیفیـت و کمیـت آن بـا الکتروفـورز روی ژل آگارز ۰/۵ درصد بررسی شد. این ژنوم بـه عنـوان منبـع ژنـوم برای مراحل بعدی استفاده شد.

آغازگرها و آنزیم محدود کنندهٔ مؤثر

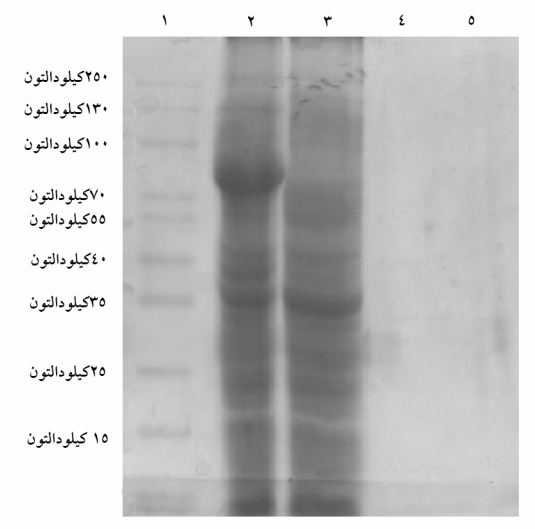
آنزیم محدودکنندهٔ *Pst*I ژن Bap را در محل نوکلئوتید ۲۱۹ برش داد به گونه‌ای که ژن بـه دو قـسمت بـا طـول‌هـای ۲۱۹ و ۱۴۰۱ جفت باز تبدیل شد.

تجزیه و تحلیل محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آنزیم*Taq* پلیمراز با آغازگرهای طراحـی شـده بـرای قـسمت انتخـابی ژن Bap، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به منظـور بررسـی روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. در نتیجهٔ هضم آنزیمی با آنزیم *Pst*I قطعاتی به طول ۲۱۹ جفت باز و ۱۴۰۱ جفت باز به‌دست آمد. اندازهٔ قطعات به‌دست آمده از هضم آنزیمـی بـا تجزیـه و تحلیل نرم‌افزاری منطبـق بـوده و دلیلـی بـر درسـتی محـصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است.

سازوارهٔ نوترکیب

پلاسمید و قطعه تکثیرشده بعد از بـرش آنزیمـی روی ژل آگارز ۱ درصد، الکتروفورز شدند. غربال‌گری سلول‌های میزبان *E. coli* BL21(DE3) حاوی پلاسمید روی محـیط LB آگـار حاوی آمپی‌سیلین انجام شد. کلونی‌های به‌دست آمده به وسـیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با اسـتفاده از آغازگرهـای طراحـی شده برای قطعهٔ مورد نظـر تأییـد شـد. همچنـین پلاسـمیدهای کلونی‌های تأیید شده استخراج شد و با آنـزیم‌هـایی کـه بـرای همسانه‌سازی استفاده شـده بـود، هـضم شـد. محـصول هـضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری و مشاهده شد.

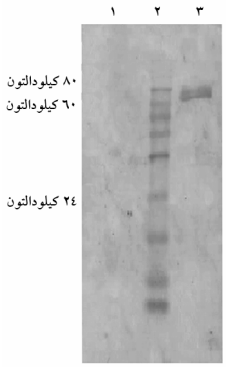


شکل ۱ بررسی بیان ژن نوترکیب به کمـک SDS-PAGE؛ سـتون ۱) نـشانهٔ اندازه مولکولی پروتئین، ستون ۲) حاوی محـصول لیـز سـلولی بعـد از القـا، ستون ۳) محصول لیز سلولی بدون القا وکنترل منفی، سـتون ۴ و ۵) پـروتئین محلول در سوپ رویی قبل از لیز سلولی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

بیان و تأیید پروتئین نوترکیب

برای مشخص کردن وضعیت پروتئین، پس از بیان پروتئین در همسانه انتخاب شده و بـه دنبـال آن شکـستن سـلول هـای باکتری با استفاده از سونیکاسیون، بقایای سلولی و سایر اجـزای نامحلول با سانتریفوژ از عـصاره شـفاف سـلولی جـدا شـد. در ادامه عصاره محلول و این رسوب، در بافر نمونه پروتئینی حـل شـده و بـا SDS-PAGE بررسـی شـد. شـکل ۱ نتیجـهٔ بیـان سازوارهٔ نوترکیـب را در *E.coli* BL21DE3 نـشان مـی‌دهـد. تصویر ژل نشان دهنـده بیـان پـروتئین نوترکیـب بـه صـورت مجتمع‌های نامحلول است.



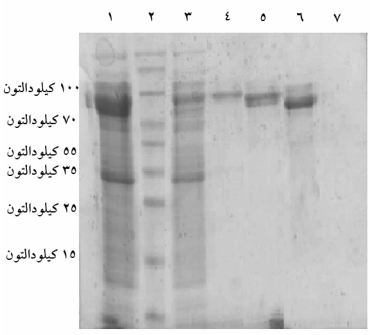
شکل ۲ روش لکه‌گذاری وسترن پروتئین نوترکیب Bap با آنتی‌هیستیدین؛ ۱) سوپ حاوی لیز سلولی القا نـشده، ۲) نـشانه انـدازه مولکـولی پـروتئین، ۳) سوپ حاوی لیز سلولی القا شده

تأیید پروتئین به روش لکه‌گذاری وسترن

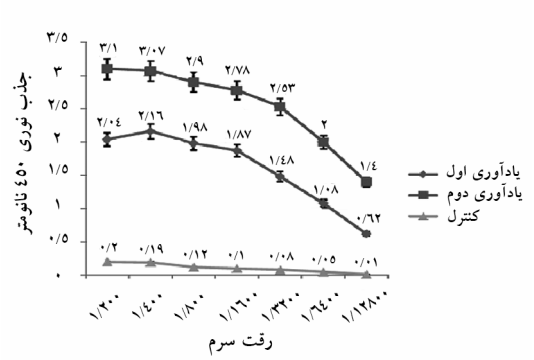
از آن‌جا که روش SDS-PAGE تنهـا تولیـد پروتئینـی بـا وزن مولکولی معین را نشان می‌دهد، بـرای اطمینـان از درسـتی ماهیت پروتئین تولید شده، از روش لکه‌گذاری وسترن اسـتفاده شد. برای انجام لکه‌گذاری وسترن سوپ سلولی حاوی پروتئین نوترکیب چاهک بـارگیری شـدند. پـس از انجـام لکـه‌گـذاری وسترن به کمک آنتی‌هیستیدین باندی در حدود ۷۰ کیلودالتـون روی کاغذ نیتروسلولز مشخص شد که این بانـد در نمونـهٔ القـا نشده وجود نداشت (شکل ۲).

تخلیص پروتئین

پروتئین نوترکیب هدف با کمک ستون میل ترکیبی Ni-NTA پس از شستشو با بافرهای شستشو دهندهٔ C بـا pH= ۶/۳ و D بـا pH= ۵/۹ و بافر فروشویی E با pH= ۴/۵ (ترکیب همهٔ بافرهـای ذکر شده شبیه به بافر B بوده و تنها pH آن‌ها تنظیم شـده اسـت) تخلیص شد و نتایج بـا SDS-PAGE بررسـی شـد. در شـکل ۳ نتیجهٔ تخلیص قطعهٔ نوترکیب Bap را مشاهده می‌کنید.



شکل ۳ بررسی تخلیص پروتئین نوترکیب Bap با ستون میل ترکیبی Ni-NTA روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد؛ ستون ۱) بیان پروتئین نوترکیب، ستون ۲) نشانهٔ انـدازه مولکـولی پـروتئین، سـتون ۳) نمونـهٔ خروجـی سـتون پـس از بارگذاری محلول حاوی پروتئین نوترکیب، ستون ٤ و ٥) نمونه‌های خروجی ستون پس از شستشو با بافرهای شستشو دهنـده، سـتون ٦) نمونـهٔ خروجـی ستون پس از فروشویی با بافر E، ستون ۷) نمونه خروجی پس از شستشو بـا ایمیدازول (Imidazole)



شکل ٤ تیتراسیون سرم موش‌های ایمن شده بعد از یادآورهـای اول و دوم و موش‌های کنترل به وسیله ELISA غیر مستقیم؛ ایـن نمـودار نتـایج ELISA رقت‌های مختلف از سرم موش‌های ایمن شده با Bap را علیـه ایـن پـروتئین نشان می‌دهد. انحراف از معیار در این نمودار به ازای هر عدد به وسـیله یـک بازه در اطراف نقطه نشان داده شده است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

بررسی تیتر آنتی بادی علیه پروتئین نوترکیب در سرم موش

در شکل ٤ نمودار مقادیر میانگین جذب نوری به‌دست آمده به همراه انحراف معیار و برای رقت‌های مختلف نشان داده شده است. از آن‌جایی که برای واکنش ELISA از آنتی‌بادی ضد IgG استفاده شد، تیتر آنتی‌بادی نشان داده شده در سرم مربوط به IgG است.

بحث

اسینتوباکتر بومانی بیشتر در محیط‌های بیمارستانی یافت می‌شود و به علت توانایی قابل توجه آن در زنده ماندن در این محیط، امروزه بیش از پیش به آن توجه می‌شود [۹]. رتبهٔ دوم این بیماری‌زا بعد از سودوموناس آئروجینوزا، در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی [۱۰] اهمیت توجه و مطالعهٔ آن را نشان می‌دهد. اخیراً مطالعه‌ای در مورد پروتئین Bap این بیماری‌زا توسط آقای رهبر و همکاران در فضای مجازی صورت گرفته که ٤ قطعهٔ آنتی‌ژنیک در آن معرفی شده است. بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داده است که این ٤ ناحیه توانایی القای تولید آنتی‌بادی را دارد و می‌تواند به عنوان آنتی‌ژن عمل کند [۲۵]. از آن‌جایی که نواحی معرفی شده حاصل مطالعهٔ بیوانفورماتیکی است، بررسی عملی ایمنی‌زایی این نواحی به منظور اعتبار بخشی نتایج حاصل از مطالعهٔ بیوانفورماتیکی کاری ارزشمند است. از طرفی بیان پروتئینی با وزن بیش از ۸۰۰ کیلودالتون (Bap) در میزبان بیانی اشریشیا کلی (*E. coli*) و با سیستم‌های بیانی معمول نظیر pET غیر ممکن به نظر می‌رسد؛ بنابراین بررسی بیان و ایمنی‌زایی نواحی معرفی شده امری منطقی است. ایمنی‌زایی قطعهٔ ۲ این پروتئین توسط فتاحیان و همکاران تأیید شد. در این مطالعه قطعهٔ ٤ از پروتئین Bap استینوباکتر بومانی که ۱٦۲۰ جفت باز (٥٤۰ اسید آمینه) دارد و در موقعیت ۷٦۰۱ تا ۸۱٤۰ قرار دارد [۲۵]، بیان شد و تولید آنتی‌بادی آن در موش BALB/c بررسی شد. در بین ٤ ناحیهٔ معرفی شده توسط رهبر و همکاران ناحیهٔ ٤ تنها ناحیه‌ای است که به پایانهٔ C پروتئین مربوط می‌شود. به منظور تهیه پروتئین مذکور به شکل نوترکیب، از سیستم بیانی pET استفاده شد که امکان دستیابی به بیان بالای پروتئین در میزبان اشریشیا کلی را فراهم می‌سازد. همچنین این سیستم به دلیل افزودن نشان هیستیدین به پروتئین مورد نظر تخلیص تک مرحله‌ای با روش کروماتوگرافی میل ترکیبی را امکان‌پذیر می‌کند. پس از ایمن‌سازی موش‌ها با پروتین نوترکیب تخلیص شده، ELISA غیر مستقیم نشان داد که تیتر آنتی‌بادی تولید شده نسبتاً بالاست، زیرا در رقت ۱/۱۲۸۰۰ نیز غلظت آنتی‌بادی برای اتصال به آنتی ژن کفایت کرده و هنوز به رقت حداقل نرسیده است. این میزان تیتر آنتی‌بادی بیانگر تحریک مطلوب سیستم ایمنی از سوی آنتی‌ژن است؛ بنابراین این ناحیه را می‌توان به عنوان یک ایمنی‌زای قوی معرفی کرد. همچنین نتایج ELISA بیانگر این است که آنتی‌بادی‌های ایجاد شده شده علیه قطعهٔ پروتئینی نوترکیب Bap قادر به شناسایی اپی‌توپ‌های موجود در این ناحیه است. باید در نظر داشت که هر آنتی‌ژن الزاماً یک ایمنی‌زا نیست. آنتی‌ژنسیته به میانکنش بین آنتی‌بادی و مولکول هدف اطلاق می‌شود و یک پدیدهٔ شیمیایی است در حالی‌که ایمنی‌زایی یک پدیدهٔ زیستی است و به توانایی تحریک سیستم ایمنی باز می‌گردد. در این پژوهش نشان داده شد که این ناحیه از پروتئین Bap باکتری اسینتوباکتر بومانی قادر به القای پاسخ ایمنی هومورال است؛ بنابراین علاوه بر آنتی‌ژنسیته، ایمنی‌زایی آن نیز اثبات شد. حفظ شده بودن (Conserve) این زیر واحد از پروتئین در بین سوش‌های مختلف دارای اهمیت است. به این ترتیب این ناحیه می‌تواند هدف مناسبی برای تولید واکسن باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشگاه شاهد و معاونت محترم پژوهشی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی ایران برای حمایت‌های مالی اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

منابع

[1] Beijerinck M. Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. Versl Koninklijke Akad Wetensch Amsterdam 1911; 19: 1092-103.

[2] Towner K. The genus *Acinetobacter*. In: Dworkin M, Falkow S, Scheifer KH, Rosenberg E, Stackebrandt E. Prokaryotes, Volume 6, New York: Springer, 2006; p: 746-58.

[3] Chaari A, Mnif B, Bahloul M, Mahjoubi F, Chtara K, Turki O, Gharbi N, Chelly H, Hammami A, Bouaziz M. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiology, clinical characteristics, and prognosis factors. Int J Infect Dis 2013; 17(12): e1225-8.

[4] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008; 21(3): 538-82.

[5] Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. J Hosp Infect 2009; 73(4): 355-63.

[6] Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. J Clin Microbiol 2005; 43(4): 1632-9.

[7] van den Broek PJ, Arends J, Bernards AT, De Brauwer E, Mascini EM, van der Reijden TJ, Spanjaard L, Thewessen EA, van der Zee A, van Zeijl JH, Dijkshoorn L. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001. Clin Microbiol Infect 2006; 12(9): 837-43.

[8] Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol 2007; 5(12): 939-51.

[9] Espinal P, Martí S, Vila J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. J Hosp Infect 2012; 80(1): 56-60.

[10] Jeong SH, Bae IK, Park KO, An YJ, Sohn SG, Jang SJ, Sung KH, Yang KS, Lee K, Young D, Lee SH. Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. J Microbiol 2006; 44(4): 423-31.

[11] Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. Int J Antimicrob Agents 2010; 35(3): 219-26.

[12] Cevahir N, Demir M, Kaleli I, Gurbuz M, Tikvesli S. Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose-resistant hemagglutination in *Acinetobacter baumannii* strains. J Microbiol Immunol Infect 2008; 41(6): 513-8.

[13] Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Kim J. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. Clin Microbiol Infect 2008; 14(1): 49-54.

[14] Milletli Sezgin F, Coban AY, Gunaydin M. Investigation of biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* isolates and their colistin susceptibilities in biofilm. Int J

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

Antimicrob Agents 2013; 41(2): 199.

[15] Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. Microbiology 2003; 149(Pt 12): 3473-84.

[16] Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. J Bacteriol 2008; 190(3): 1036-44.

[17] Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. J Bacteriol 2001; 183(9): 2888-96.

[18] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15(2): 167-93.

[19] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol 2004; 2(2): 95-108.

[20] Luppens SB, Reij MW, van der Heijden RW, Rombouts FM, Abee T. Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. Appl Environ Microbiol 2002; 68(9): 4194-200.

[21] Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. Annu Rev Microbiol 2002; 56: 187-209.

[22] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999; 284(5418): 1318-22.

[23] Blackwell HE. Bacterial crowd control with iron. Chem Biol 2005; 12(7): 721-3.

[24] Lasa I, Penadés JR. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. Res Microbiol 2006; 157(2): 99-107.

[25] Rahbar MR, Rasooli I, Mousavi Gargari SL, Amani J, Fattahian Y. In silico analysis of antibody triggering biofilm associated protein in *Acinetobacter baumannii*. J Theor Biol 2010; 266(2): 275-90.

[26] Fattahian Y, Rasooli I, Mousavi Gargari SL, Rahbar MR, Darvish Alipour Astaneh S, Amani J. Protection against *Acinetobacter baumannii* infection via its functional deprivation of biofilm associated protein (Bap). Microb Pathog 2011; 51(6): 402-6.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]