

بررسی مولکولی ژن *oapA* در سویه‌های هموفیلوس آنفلوانزا ایزوله شده از ایران، به‌عنوان کاندید در طراحی واکسن بومی علیه این باکتری

پریسا رحیمی^۱، پریچهر حناچی^{۲*}، سعید بوذری^۳، سید داوود سیادت^۴

چکیده

زمینه و هدف: باکتری هموفیلوس آنفلوانزا می‌تواند به‌عنوان پاتوژن بخش تنفسی انسان عمل کند. عفونت ناشی از این باکتری به‌طور سنتی به‌وسیله آنتی‌بیوتیک‌ها درمان می‌شود. استفاده از واکسن‌های کونژوگه در مهار بیماری‌های ناشی از این باکتری نیز بسیار موفقیت‌آمیز بوده است. در طراحی این واکسن‌ها از کپسول پلی‌ساکاریدی هموفیلوس آنفلوانزا و پروتئین‌های ایمونوژن استفاده می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی مولکولی ژن *oapA* به‌عنوان ژن پروتئین ایمونوژنیک حفاظت‌شده و کاندید در طراحی واکسن انجام شد.

روش بررسی: تعدادی سویه بالینی هموفیلوس آنفلوانزا از بیمارستان میلاد در تهران تهیه و پس از انجام تست‌های تشخیصی موجود، تست‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص بیوتایپ سویه‌ها انجام گرفت. در ادامه، DNA از طریق جوشاندن، استخراج و واکنش PCR اختصاصی جهت آنالیز مولکولی ژن *oapA* طراحی گردید. در نهایت، تعیین توالی محصولات PCR، به‌منظور تأیید نتایج صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج واکنش PCR نشان داد ۷۹٪ از سویه‌های مورد بررسی، حدود ۹۹-۹۵٪ به توالی‌های نوکلئوتیدی ژن *oapA* هموفیلوس آنفلوانزا در NCBI شباهت دارند و ۲۱٪ باقیمانده از سویه‌ها دارای یک حذف حدود ۱۲۵ نوکلئوتیدی بوده و ۹۶-۹۴٪ شبیه به توالی‌های موجود در NCBI هستند. در همه سویه‌هایی که این حذف ۱۲۵ نوکلئوتیدی را نشان دادند (سویه‌های non-typeable و سویه‌های تیپ b) شباهت ۹۹-۹۵٪ برقرار بود. نتایج تعیین بیوتایپ نشان داد سویه‌های مورد مطالعه، مربوط به بیوتایپ‌های مختلف می‌باشد.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌شود استفاده از پروتئین ژن حفاظت‌شده *oapA* در تولید واکسن علیه تیپ b این باکتری بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: هموفیلوس آنفلوانزا؛ ژن *oapA*؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

^۱ کارشناس ارشد بیوشیمی، بخش بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران.

^۲ دانشیار بیوشیمی، بخش بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران.

^۳ استاد میکروبی‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

^۴ دانشیار باکتری‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

پریچهر حناچی، بخش بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

hanachi_wrc@yahoo.com

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Rahimi P, Hanachi P, Bouzari S, Siadat SD. Molecular analysis of *oapA* gene in *Haemophilus influenzae* strains isolated from Iran: As a domestic vaccine candidate. Qom Univ Med Sci J 2014;8(6):17-25. [Full Text in Persian]

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲

تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۱۴

مقدمه

هموفیلوس آنفلوانزا، یک γ -Proteobacterium سازگار شده با میزبان انسانی است (۱)، که در اتمسفر مرطوب (۱۰-۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد) رشد می‌کند. این باکتری، اکسیداز مثبت و کاتالاز مثبت بوده (۲) و به محیط کشتی نیاز دارد که با دو فاکتور محرک رشد موجود در خون شامل: Hemin (X Factor) و NAD (V Factor)، تکمیل شده باشد (۲). Hemin نسبت به دما پایدار بوده و برای سنتز آنزیم‌های تنفسی مانند سیتوکروم اکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز مورد نیاز است، اما NAD حساس به دما بوده و برای سیستم اکسیداسیون-احیا مورد نیاز است (۳). هموفیلوس آنفلوانزا از سویه‌های کپسول‌دار (Typeable) و سویه‌های بدون کپسول (non-typeable) تشکیل شده است. سویه‌های کپسول‌دار بر مبنای تمایز آنتی‌ژن کپسولی در ۶ سروتیپ a-f طبقه‌بندی می‌شوند (۲، ۴، ۵) و سویه‌های کپسول‌دار تیپ b اغلب کودکان را درگیر می‌کنند. همچنین تیپ b دارای مهاجم‌ترین سویه‌های کپسول‌دار می‌باشد (۵). هموفیلوس آنفلوانزا بر اساس سه تست ایندول، اوره‌آز و دکربوکسیلاسیون اسید آمینه اورنیتین، به ۸ بیوتایپ تقسیم می‌شود (۹-۶). در مطالعه‌ای که توسط Albritton و همکاران (سال ۱۹۷۸) انجام شد برای هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b، ایزوله‌های مهاجم، تقریباً متعلق به بیوتایپ I، II و از ایزوله‌های مهاجم *H. influenzae* non-typeable مورد مطالعه، تنها یک سوم متعلق به بیوتایپ I و حدود یک‌چهارم متعلق به بیوتایپ V بودند (۱۰). واکسن Hib در دسترس شامل کپسول پلی‌ساکاریدی تیپ b کونژوگه شده به یک پروتئین حامل ایمونوژنیک می‌باشد (۲). قبل از معرفی واکسن‌های کونژوگه، میانگین بروز سالانه ترکیبی بیماری هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b مهاجم در کودکان ۵ ساله؛ ۴۰/۱۰۰۰۰۰ در آسیا، ۴۱/۱۰۰۰۰۰ در اروپا، ۶۱/۱۰۰۰۰۰ در آمریکای لاتین و ۸۸/۱۰۰۰۰۰ در ایالات متحده تخمین زده شده است (۱۱). همچنین بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، میزان بروز مننژیت هموفیلوس آنفلوانزا در ایران ۳/۵-۴/۷ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال می‌باشد (۱۲). پاتوژن بیماری با کلونیزه شدن باکتری به نازوفارنکس شروع می‌شود (۱۳). هموفیلوس آنفلوانزا، شماری از ساختارهای سطحی را بیان می‌کند که پروسه اتصال و

کلونیزه شدن را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲). Prasadarao و همکاران (سال ۱۹۹۹)، ژن کدکننده یک پروتئین پوشش سلولی را معرفی کرده و آن را *oapA* (Opacity Associated Protein A) نامیدند، که مسئول ایجاد فنوتیپ کلونی شفاف (Transparent) در هموفیلوس آنفلوانزا بوده و برای کلونیزاسیون مؤثر به نازوفارنکس، در یک مدل موشی حامل هموفیلوس آنفلوانزا مورد نیاز است (۱۵). این پروتئین ۴۷ KDa وزن دارد (۱۴). در مطالعه Prasadarao و همکاران نشان داده شد *OapA* با مقایسه توالی‌های آمینواسیدی کاهش یافته، در میان سویه‌های هموفیلوس آنفلوانزا حفاظت می‌شود (۱۵).

هموفیلوس آنفلوانزا، دستخوش تغییر فاز خودبه‌خودی در مورفولوژی کلونی می‌گردد (۱۶). در سویه‌های هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b، سه واریانت کلونی شامل مات (Opaque)، حدواسط (Intermediate) و شفاف یافت می‌شود که در ویژگی‌های ویروالانس مهم، شبیه کلونیزاسیون به نازوفارنکس و مقاومت سرمی متفاوت هستند (۱۷، ۱۸). ثابت شده است ارگانسیم‌هایی از کلونی‌های شفاف در کلونیزه شدن به نازوفارنکس، کارآمدتر بوده، اما در شرایط لوله آزمایش به سرم حساس‌ترند، در صورتی که ارگانسیم‌هایی با کلونی مات در کلونیزاسیون به نازوفارنکس ناکارآمدتر بوده و مقاومت سرمی بیشتری را نشان می‌دهند (۱۹). این مطالعه با هدف تعیین حفاظت‌شدگی این ژن در سویه‌های بالینی جدا شده از ایران انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه، ۱۴ سویه بالینی هموفیلوس آنفلوانزا (۱۰ سویه مربوط به non-typeable و ۴ سویه مربوط به Type b) از بخش میکروب‌شناسی بیمارستان میلاد تهیه گردید. ایزوله‌ها مربوط به بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه و بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان بود که از قسمت‌های مختلفی مانند چشم (۲۲٪)، نازوفارنکس (۳۶٪)، خون (۲۱٪)، مایع مغزی نخاعی (۱۴٪) و BAL (Bronchoalveolar Lavage) (۷٪)، جداسازی شده بود.

این آنزیم با میزبان انسانی اینترکشن داده و به عنوان یک فاکتور ویروانس با چندین مکانیسم شامل: فعال‌سازی ماکروفاژها، القای میانجیگرهای التهابی، آپوپتوزیس، فعال‌سازی پلاکت‌ها، افزایش بقا در ماکروفاژها و موارد دیگر عمل می‌کند (۲۲). برای بررسی دکربوکسیلاسیون اسیدآمینه اورنیتین؛ محیط مایع مول رد کربوکسیلاز حاوی ۱٪ اورنیتین با سوسپانسیون غلیظ باکتری تلقیح داده شد، سپس سطح آن با روغن معدنی استریل پوشانده و همزمان نیز از یک محیط کشت داده‌نشده به عنوان کنترل استفاده گردید. دکربوکسیلاسیون اسیدآمینه اورنیتین، با ایجاد رنگ ارغوانی پررنگ مشخص می‌شود (۶). آنزیم‌های دکربوکسیلاز اسیدهای آمینه در محیط کشت دکربوکسیله شده و آمین تولید می‌کنند. آمین‌های تولید شده باعث واکنش قلیایی می‌شوند که ابتدا تعدادی از اسیدهای آمینه دهیدروله شده و بعد دکربوکسیله می‌شوند. استخراج و تخلیص DNA در زیر هود میکروبی، با ایده گرفتن از پژوهش Falla و همکاران (سال ۱۹۹۴) با روش جوشاندن به صورت زیر انجام گرفت. جوشاندن پلیت باکتری در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۷-۱۰ دقیقه انجام شد و سپس در دور ۱۴۰۰۰rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد، در ادامه سوپرناتانت حاصل حاوی DNA برداشته شد و پس از خواندن غلظت آن با دستگاه اسپکتروفتومتر (ساخت شرکت Eppendorf)، جهت واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت (۲۳). طول کل ژن حدود ۱۲۹۶ جفت باز بوده و در محدوده نوکلئوتید ۱۴۹۵-۲۰۰ از لوکوس U17037.1 قرار دارد. (شماره‌های به کار برده شده براساس شماره‌های به کار برده شده برای لوکوس U17037.1 در NCBI می‌باشد).

همچنین تعدادی سویه استاندارد هموفیلوس آنفلوانزا
H. influenzae ATCC 9006 Type a
H. influenzae 10211 ATCC Type b
H. influenzae 9007 ATCC Type c

از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در مراحل مختلف آزمایشها، برای کنترل‌های اولیه واکنش PCR و به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. کشت باکتری‌ها بر روی شکلات آگار، در زیر هود میکروبی انجام شد و پس از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در انکوباتور همراه با CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، از کلونی‌های خالص رشد یافته، برای انجام رنگ آمیزی گرم و سایر تست‌های تشخیصی موجود [شامل تست نیازمندی به فاکتورهای رشد X و V، تست اکسیداز، تست کاتالاز، بررسی رشد بر روی محیط بلادآگار و بررسی پدیده ساتیلیتسم حاصل از کشت دادن این باکتری در کنار باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۰، ۲۱)]، جهت شناسایی صحیح باکتری هموفیلوس آنفلوانزا استفاده گردید. بیوتایپ هموفیلوس آنفلوانزا، با بررسی نتایج سه تست ایندول، آنزیم اوره‌آز و دکربوکسیلاسیون اورنیتین و با استفاده از جداول مرجع مشخص می‌شود (۶).

برای تعیین بیوتایپ، کشت خالص ۴۸-۲۴ ساعته‌ای از باکتری بر روی تریپتوفان استریل یا براث پیتون تهیه گردید، سپس در پی تلقیح، ۵ قطره از معرف کواکس (شامل: ایزوآمیل الکل پارادی متیل آمینو بنزآلدئید هیدروکلرید اسید غلیظ شده) به کشت براث افزوده شد که در این حالت تولید ایندول با مشاهده رنگ قرمز مشخص گردید. همچنین می‌توان در سطح محیط کریستنس اوره‌آگار، سوسپانسیون غلیظی از باکتری را کشت داده و بعد از انکوباسیون ۲۴ ساعته، تولید آنزیم اوره‌آز را با ایجاد رنگ ارغوانی بررسی نمود.

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

نام پرایمر	توالی پرایمر	پرایمر Tm	طول محصول PCR
Forward 1	5'CAGAGGCAATCCAGTGAATTCTATGG-3'	۶۶/۳°C	طول محصول: 805bp
Reverse 1	5'TTCCGCTTGAGCTGGTTCATAG-3'	۶۴/۷°C	
Forward 2	5'-TATGCAACCAGCTCAAGCGGAAC-3'	۶۴/۷°C	طول محصول: 634bp
Reverse 2	5'-ACAGCCAGTCATTA AAAAGTGCGG-3'	۶۲/۹°C	

با توجه به اینکه طول ژن بلند بود، لذا برای سهولت در انجام واکنش، از دو واکنش یکی برای ناحیه N - ترمینال و دیگری برای ناحیه C - ترمینال طراحی شده استفاده گردید (منظور از ناحیه N - ترمینال، ناحیه‌ای است که از ابتدای ژن تا نیمه‌های ژن را شامل می‌شود و ناحیه C - ترمینال، ناحیه‌ای است که از این نیمه تا پایان ژن ادامه می‌یابد).

DNA سویه‌های بالینی هموفیلوس آنفلوانزا که از طریق جوشاندن استخراج شدند حاوی غلظت‌های ۱۰۰۰-۲۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بودند. حجم نهایی واکنش PCR، ۲۰ میکرولیتر بود شامل: ۱۰ میکرولیتر از ماستر میکس PCR (ساخت شرکت فرمتاز USA)، یک میکرولیتر از هریک از پرایمرهای جلویی و عقبی (غلظت پرایمرها ۳۰ میکرومول می‌باشد)، ۶ میکرولیتر از آب دیونیزه شده استریل و ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده و در نهایت، به میزان ۱۵ میکرولیتر روغن معدنی بر روی آنها جهت جلوگیری از تبخیرشان در دستگاه PCR ریخته شد. در ویال کنترل نیز به جای حجم DNA از آب دیونیزه شده استریل استفاده گردید. برنامه زمانی و دمای طراحی شده برای این واکنش PCR بدین صورت بود:

۱. دمای دناتوراسیون اولیه: دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه؛
۲. دمای دناتوراسیون سیکلی: دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه؛
۳. دمای اتصال پرایمر سیکلی: دمای ۵۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه؛
۴. دمای سیکلی گسترش تکثیر محصول PCR: دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه؛
۵. دمای گسترش محصول PCR نهایی: دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و تعداد سیکل‌ها، ۴۵ سیکل بود. سپس جهت بررسی نتایج واکنش PCR، ۸ میکرولیتر از محصولات حاصل از PCR، به همراه مارکر DNA (ساخت شرکت فرمتاز USA)، به منظور الکتروفورز بر روی ژل آگار ۱٪ برده شد.

DNA سویه‌های بالینی هموفیلوس آنفلوانزا که از طریق جوشاندن استخراج شده بودند، طبق تجارب کسب شده تا رسیدن به غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میکرولیتر رقیق شدند. حجم نهایی واکنش PCR، ۱۵ میکرولیتر بود شامل: ۷/۵ میکرولیتر از ماستر میکس PCR (ساخت شرکت سیناژن کرج)، ۰/۷۵ میکرولیتر از هریک

از پرایمرهای جلویی و عقبی (غلظت پرایمرها ۱/۲۵ میکرومول می‌باشد)، ۴/۸ میکرولیتر از آب دیونیزه شده استریل و ۱/۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده و در نهایت، به میزان ۱۵ میکرولیتر روغن معدنی بر روی آنها به منظور جلوگیری از تبخیر در دستگاه PCR ریخته شد. در ویال کنترل نیز به جای حجم DNA از آب دیونیزه شده استریل استفاده گردید. برنامه زمانی و دمایی طراحی شده برای این واکنش PCR بدین صورت بود:

۱. دمای دناتوراسیون اولیه: دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه؛
۲. دمای دناتوراسیون سیکلی: دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه؛
۳. دمای اتصال پرایمر سیکلی: دمای ۶۳ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه؛
۴. دمای سیکلی گسترش تکثیر محصول PCR: دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه؛
۵. دمای گسترش محصول PCR نهایی: دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و تعداد سیکل‌ها ۴۵ سیکل بود. سپس به منظور بررسی نتایج واکنش PCR، ۵ میکرولیتر از محصولات حاصل از PCR، به همراه لدر مارکر DNA (شرکت کیاژن) بر روی ژل الکتروفورز ۱٪ (که درون بافر TBE 1 X قرار داده شده بود) ران شد.

به منظور تأیید نتایج حاصل از PCR، تعیین توالی محصولات PCR مربوط به ۶ سویه که به طور تصادفی انتخاب شده بودند، توسط شرکت‌های Bioscience Sequencing of Cambridge UK، پیشگام بیوتک و انستیتو پاستور ایران انجام شد.

یافته‌ها

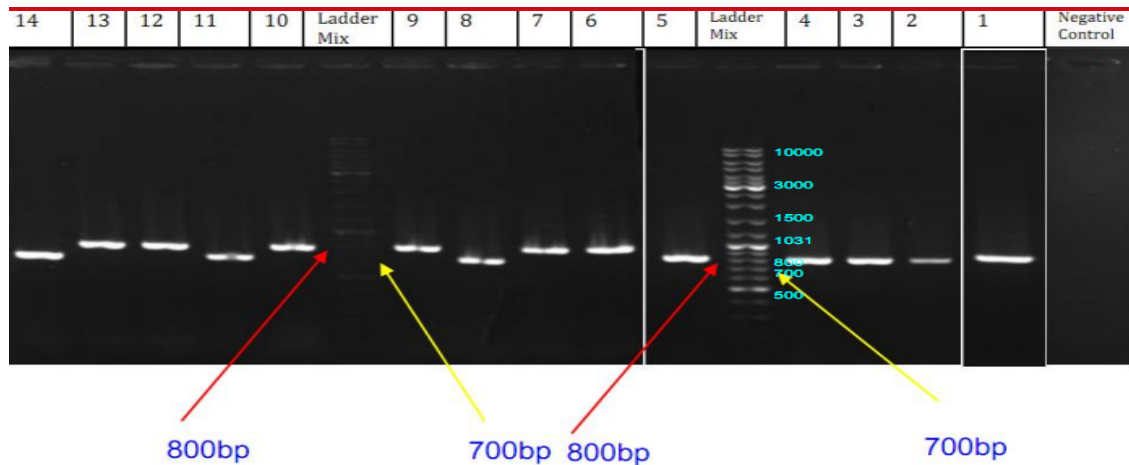
نتایج بررسی تست‌های تشخیصی برای تمامی سویه‌ها؛ وجود کوکوباسیل‌ها و پلی‌مورف‌های صورتی‌رنگ، اکسیداز و کاتالاز مثبت بودن، عدم رشد روی محیط بلادآگار و ایجاد پدیده ساتیلیتسم حاصل از رشد هموفیلوس آنفلوانزا در کنار استافیلوکوکوس اورئوس را نشان دادند. همچنین نتایج مطلوب حاصل از چندین تست مولکولی PCR مربوط به ژن‌های ویرولانس حفاظت شده این باکتری که توسط افراد دیگری در انستیتو پاستور تهران انجام شد، تأکیدی بر هموفیلوس آنفلوانزا بودن این باکتری بود. نتیجه تعیین بیوتایپ سویه‌ها نیز در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

جدول شماره ۲: نتایج حاصل از آزمایشها، تعیین نوع بیوتاایپ سویه‌ها

نوع بیوتاایپ	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
تست اوره‌آز	+	+	+	+	-	-	-	-
تست ایندول	+	+	-	-	+	-	+	-
تست اورنیتین دکربوکسیلاز	+	-	-	+	+	+	-	-
درصد سویه‌ها	٪۲۸/۵۷	٪۲۸/۵۷	٪۲۱/۴۳	٪۷/۱۴	٪۷/۱۴	٪۰	٪۷/۱۴	٪۰

۷۹۲-۱ از این ژن (یا نوکلئوتیدهای ۹۹۲-۲۰۰ از لوکوس حاوی این ژن) را شامل می‌شود، در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.

نتیجه ژل الکتروفورز آگارز حاصل از ران کردن محصولات حاصل از PCR ژن *oapA* که با جفت پرایمرهای F_1R_1 و برای ناحیه N-ترمینال این ژن، که محدوده نوکلئوتیدهای شماره



شکل شماره ۱: ژل الکتروفورز محصولات PCR ناحیه N-ترمینال سویه‌های مورد مطالعه.

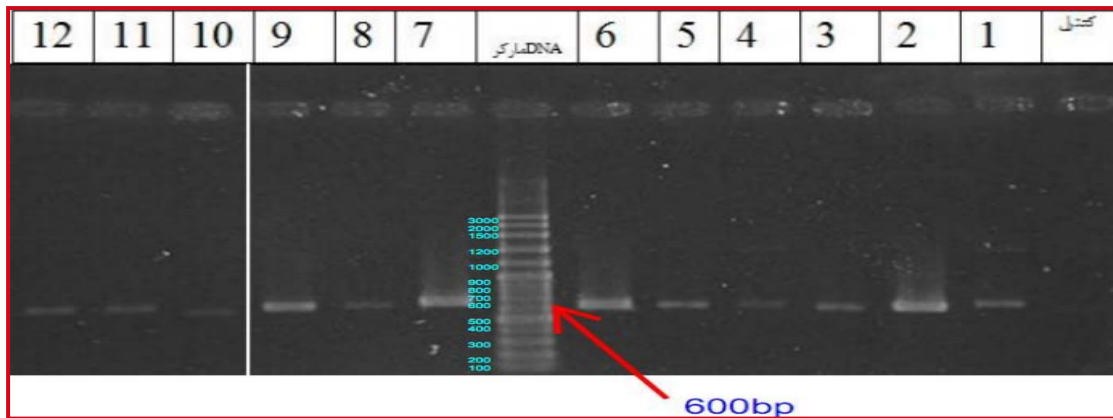
شماره ۱-۱۴: الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ناحیه N-ترمینال ژن *oapA* در سویه‌های بالینی مورد آزمایش، Negative Control: کنترل منفی (نتیجه الکتروفورز محصول PCR تمامی مواد مورد استفاده در PCR بجز DNA Ladder Mix: مارکر 100-10000bp DNA

سویه‌ها دارای درصد تشابه ۹۶-۹۴٪ با توالی‌های NCBI بودند (%Query Cover=97-99%). توالی نوکلئوتیدی به دست آمده برای این ژن، به وسیله BLAST X به توالی آمینواسیدی تبدیل و با توالی‌های پروتئینی موجود در NCBI مقایسه گردید. همانطور که مشاهده می‌شود توالی آمینواسیدی مربوط به توالی نوکلئوتیدی این سویه‌های ایرانی، دارای شباهت بسیار با پروتئین *OapA* (LOCUS WP_005656321.397 aa, linear, BCT, 08-MAY-2013) NCBI می‌باشد.

همچنین نتیجه ژل الکتروفورز آگارز حاصل از ران کردن محصولات حاصل از PCR ژن *oapA* که با جفت پرایمرهای F_2R_2 و برای ناحیه C-ترمینال این ژن و ابتدای ژن بعدی آن، که محدوده نوکلئوتیدهای شماره ۱۲۹۵-۷۷۰ از این ژن و نوکلئوتیدهای شماره ۱۴۰۳-۱۲۹۵ از ژن بعدی آن (و یا نوکلئوتیدهای ۱۶۰۳-۹۷۰ از لوکوس حاوی این ژن) را

همان‌طور که مشاهده می‌شود ۱۱ سویه بالینی دارای باند در محدوده ۸۰۵ جفت باز و ۳ سویه بالینی دارای باند در محدوده ۶۸۰ جفت باز قرار دارند. بررسی این توالی در NCBI نشان داد توالی هر ۱۱ نمونه، بسیار شبیه به توالی‌های موجود در NCBI برای این ژن از هموفیلوس آنفلوانزا می‌باشد و به غیر از جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی حذفی، درجی و بدمعنی موجود، درصد شباهت‌ها بین ۹۹-۹۵٪ می‌باشد (%Query Cover=100%). از طرفی، بررسی‌ها نشان داد در هر سه نمونه‌ای که متفاوت از بقیه ظاهر شده بودند، به غیر از جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی حذفی، درجی و بدمعنی موجود، یک ناحیه حدود ۱۲۵ نوکلئوتیدی که مابین نوکلئوتیدهای شماره ۸۰۵ و شماره ۹۳۱ بوده، حذف شده است، لذا وجود باندی با حدود ۱۰۰ جفت باز کوتاه‌تر از حد مورد نظر در بررسی PCR ناحیه N-ترمینال، بدین صورت توجیه گشت و در کل، این

شامل می‌شود، در شکل شماره ۲ نشان داده شده است، همه این سویه‌های بالینی دارای باند در محدوده ۶۳۴ جفت باز می‌باشند (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲: ژل الکتروفورز محصولات PCR ناحیه C-ترمینال سویه‌های مورد مطالعه.

شماره ۱۲-۱: الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ناحیه C-ترمینال ژن *oapA* در سویه‌های بالینی مورد آزمایش، کنترل منفی (نتیجه الکتروفورز محصول PCR تمامی مواد مورد استفاده در PCR بجز DNA)، DNA مارکر: مارکر DNA 100-3000bp

بحث

طبق مطالعات گزارش شده عفونت‌های هموفیلوس آنفلوانزا، به طور سنتی با آنتی‌بیوتیک قابل درمان هستند، اما سویه‌های پاتوژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک نیز گزارش شده است. بنابراین، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های ایجاد شده با هموفیلوس آنفلوانزا همواره مورد سؤال می‌باشد. استفاده از واکسن‌های باکتریایی و ویروسی در پیشگیری از بیماری‌های عفونی در انسانها و دیگر پستانداران بسیار موفقیت آمیز گزارش شده است (۲۴). در آسیا، پرسشهای مربوط به مشکلات حاصل از بیماری هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b، تصمیم‌گیری در مورد معرفی واکسن هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b را به تعویق انداخت. اما در دهه گذشته، مطالعات بسیاری در زمینه مشکلات این باکتری در آسیا منتشر گردید (۲۵) و با کشف واکسن، بیماری‌های مهاجمی که با هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b ایجاد می‌شد، به طور چشمگیری کاهش یافت (۲). مطالعه شاگریان و همکاران (سال ۱۳۸۹) نشان داد واکسیناسیون هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b سبب پیشگیری از بیماری و مرگ تا ۸۴٪ می‌شود. بنابراین، استفاده از این واکسن در کودکان، در صورت به صرفه بودن از نظر اقتصادی، منطقی به نظر می‌رسد (۲۶). در مطالعه‌ای که توسط Prasadarao و همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام شد، آنالیز وسترن بلات، حضور *OapA* را در سویه‌های کپسول‌دار، سویه‌های بدون کپسول و در سویه‌های non-typeable

تأیید نمود. همچنین مقایسه توالی آمینواسیدی *OapA* در چندین سویه نشان داد این توالی بسیار حفاظت شده و به غیر از جانشینی‌های تک آمینو اسیدی، تنها تفاوت قابل توجه، یک ادغام ۱۲ آمینو اسیدی در سویه Eagan (type b)، و یک توالی تکرار معکوس ۱۶ آمینواسیدی در سویه H142 (non-typeable) می‌باشد (۱۵). همچنین تفاوت در مهاجرت پروتئین *OapA* در رنجی بین ۷۸kDa و ۸۴kDa، مطابق با تغییر در توالی آمینواسیدی کاهش یافته می‌باشد (۱۵). از طرفی، آنالیز وسترن بلات نشان داد پروتئینی که با آنتی‌سرم *OapA* واکنش می‌دهد؛ دارای جرم مولکولی ۶۸kDa می‌باشد، در صورتی که جرم مولکولی مورد انتظار *OapA*، ۴۷kDa است. این تفاوت در وزن مولکولی مشتق شده از توالی آمینواسیدی کاهش یافته و از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید - SDS می‌تواند به دلیل حضور مقادیر زیاد پرولین باشد (۱۵). در مطالعه‌ای دیگری که توسط Marti'-Literas (سال ۲۰۱۱) صورت گرفت، با وجود اینکه در میان سویه‌های NTHi یک تنوع ژنتیکی قابل توجه وجود داشت، اما ایزوله‌های کلینیکی NTHi یک ویژگی مولکولی شایع را نشان دادند. الگوی ($lgtF^+$, $lic2A^+$, $lic1D^+$, $lic3A^+$, $lic3B^+$, $siaA2^-$, $oapA^+$, $ompP5^+$, $lic2C^+$) در ۹۴/۶٪ از ایزوله‌ها مشاهده شد. چنین مشخصات ژنتیکی که مرتبط با یک مقاومت باکتریایی بیشتر به سرم است، کشته شدن و اتصال افزایش یافته به سلول‌های

در مجموع، این مطالعه نشان داد در تمام سویه‌های مورد بررسی، این ژن حضور داشته و دو الگوی کلی در توالی نوکلئوتیدی، خود نشان می‌دهد که الگوی حدود ۷۹٪ از سویه‌ها با الگوی نوکلئوتیدی موجود در NCBI مشابه بوده و تنها در حد جهش‌های تک یا دو نوکلئوتیدی متفاوت می‌باشند، اما حدود ۲۱٪ از سویه‌ها، یک حذف ۱۲۵ نوکلئوتیدی را در توالی خود نشان دادند که با وجود این حذف بزرگ، بقیه قسمت‌های ژن دارای توالی با درصد شباهت بالا (۹۶-۹۴٪) به توالی‌های NCBI بوده و تنها در حد جهش‌های تک یا دو نوکلئوتیدی متفاوت هستند. همچنین توالی نوکلئوتیدی به دست آمده برای این ژن، به وسیله BLAST X به توالی آمینواسیدی تبدیل شد که نشان داد توالی پروتئینی WP_005656321، تنها توالی پروتئینی موجود در NCBI بوده که همانند توالی این پروتئین در این سویه‌ها می‌باشد و بجز جایگزینی‌های یک و دو آمینواسیدی، بیشترین تفاوت را در جایگزینی ۱۶ آمینواسیدی مابین آمینواسیدهای شماره ۲۴۱-۲۲۶ داراست. لذا می‌توان از این پروتئین به عنوان پروتئینی حفاظت شده و ایمونوژن، در طراحی واکسن استفاده کرد. همچنین با طراحی تست‌های مولکولی برای ناحیه C- ترینال ژن آن، می‌توان گامی مؤثر در جهت تشخیص مولکولی این باکتری برداشت.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد به دلیل حفاظت‌شدگی بسیار ژن *OapA* در میان سویه‌های هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b، این ژن می‌تواند به عنوان کاندید بالقوه در طراحی واکسن علیه سویه‌های بالینی هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b ایرانی مطرح باشد. همچنین به دلیل حفاظت‌شده بودن بعضی از قسمت‌های این ژن در سویه‌های موجود در NCBI و نیز در میان سویه‌های بالینی ایرانی مورد بررسی در این مطالعه پیشنهاد می‌گردد بررسی بیشتری بر روی مناطق حفاظت‌شده که بیشتر متعلق به C- ترینال این ژن می‌باشد، برای اهداف تشخیصی، در طراحی پروب‌های اختصاصی و نیز PCR اختصاصی صورت گیرد.

ایلیال تنفسی را میانجی‌گری می‌کند (۱۹). همچنین *OapA* در بین سویه‌ها، تنوع توالی را نشان داد که می‌تواند خواص اتصال یا ایمونوژنیک بودن آنها را تعدیل کند. اما همه ایزوله‌ها محتوی این ژن بودند و ۶ توالی مختلف یافت شد؛ ۶۱/۱٪ از ایزوله‌ها، توالی شبیه Rd KW20-like و ۵/۶٪ توالی شبیه *H. influenzae* Eagan (type b)-like را دارا بودند که شامل یک درج ۱۲ آمینواسیدی می‌باشد و ایزوله‌های دیگر، ۴ توالی درجی اضافی را نشان دادند.

با توجه به یک منبع، طولانی‌ترین توالی *OapA*، مشتمل بر دو تکرار توالی *H. influenzae* 1622 (non-typeable, QAEQP) می‌باشد. ۶۱/۱٪ از سویه‌ها با یک حذف ۱۲ آمینواسیدی، ۵/۶٪ از سویه‌ها با یک حذف ۳۲ آمینواسیدی، ۵/۶٪ از سویه‌ها با یک حذف ۴۴ آمینواسیدی و ۱۱/۱٪ از سویه‌ها با یک حذف ۴۸ آمینواسیدی یافت شدند (۱۹). فهم در مورد ارتباط بین آدهزین‌های مختلف برای کلونیزه شدن هموفیلوس آنفلوانزا، ممکن است استراتژی برای مهار بیماری‌های ایجادشده توسط این پاتوژن فراهم کند (۱۵). در بررسی Weiser و همکاران (سال ۱۹۹۸)، استفاده از *OapA* به عنوان ایمونوژن در طراحی واکسن علیه هموفیلوس آنفلوانزا مطرح شد. این پروتئین‌ها و پپتیدها به عنوان ایمونوژن در ساختار واکسن برای ایجاد ایمنی فعال و نیز برای تولید آنتی‌بادی در ایمنی‌زایی غیرفعال، مورد استفاده قرار گرفت و سلول‌های نو ترکیب ترانسفورم شده با DNA کدکننده *OapA* و وکتورهای کدکننده آن نیز فراهم شدند که می‌توانند در طراحی واکسن علیه هموفیلوس آنفلوانزا به کار روند. علاوه بر آن، Weiser و همکاران توالی‌های نوکلئوتیدی جدیدی از این پروتئین‌ها را که می‌تواند در طراحی پروب، برای استفاده در سنجش‌های هیبریدزاسیون نوکلئیک اسیدی برای تشخیص هموفیلوس آنفلوانزا در مایعات بدن بیمار شامل نه تنها خون؛ بلکه مایع نخاعی، ادرار و مخاط مورد استفاده قرار گیرد، مطرح کردند که این پروب‌های طراحی شده می‌توانند از ۲۰۰-۱۰ نوکلئوتید طول داشته باشند (۱۶).

References:

1. Kidd SP, Jiang D, Tikhomirova A, Jennings MP, McEwan AG. A glutathione-based system for defense against carbonyl stress in *Haemophilus influenzae*. *BMC Microbiol* 2012 Jul 31;12:159.
2. Hallström T. Survival strategies of the human respiratory pathogen *Haemophilus influenzae*. Lund: Medical Microbiology, Lund University, 2007.
3. Prasadarao NV, Lysenko E, Wass CA, Kim KS, Weiser JN. Opacity associated protein A contributes to the binding of *Haemophilus influenzae* to Chang epithelial cells, *Weiser Infection and Immunity*. *Infect Immun* 1999 Aug; 67(8):4153-60.
4. Roier S, Leitner DR, Iwashkiw J, Schild-Prüfert K, Feldman MF, Krohne G, et al. Intranasal immunization with nontypeable *Haemophilus influenzae* outer membrane vesicles induces cross-protective immunity in mice. *PLoS One* 2012;7(8):e42664.
5. Theodore MJ, Anderson RD, Wang X, Katz LS, Vuong JT, Bell ME, et al. Evaluation of new biomarker genes for differentiating *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. *J Clin Microbiol* 2012 Apr; 50(4):1422-4.
6. Foruhesh Tehrani H, Abdollahi A, Asadi Asadabab A, Makarinejad R, Nobahar F, Oshaghi M, et al. Biotyping of *Haemophilus influenzae* prevalence, clinical importance and its relationship to disease. *Qom Univ Med Sci J* 2007;1(1):7-12. [Full Text in Persian]
7. Sottnek FO, Albritton WL. *Haemophilus influenzae* biotype VIII. *J Clin Microbiol* 1984 Oct; 20(4):815-6.
8. Shehata AI, Al-Hazani AA, Al-Aglaan H, Al Shammari HO. Biochemical and molecular characterization of *Haemophilus influenzae* isolated from Riyadh, Kingdom of Saudi Arabia. *J Bacteriol Res* 2011;3(7):117-28.
9. Munson EL, Doern GV. Comparison of three Commercial Test System for Biotyping *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*. *J Clin Microbiol* 2007 Dec; 45(12):4051-3.
10. Albritton WL, Penner S, Slaney L, Brunton J. Biochemical characteristics of *haemophilus influenzae* in relationship to source of isolation and antibiotic resistance. *J Clin Microbiol* 1978 Jun; 7(6):519-23.
11. Ladhani SN. Who decades of experience with the *Haemophilus influenzae* serotype b conjugate vaccine in the United Kingdom. *Clin Ther* 2012 Feb; 34(2):385-99.
12. Sasan MS, Naderi Nasab M, Kafi M, Hamedi A, Kharazmi A. *Haemophilus influenzae* meningitis in infants and children. *Med J Mashhad Univ Med Sci* 2009;52(3):141-6. [Full Text in Persian]
13. Rao VK, Krasan GP, Hendrixson DR, Dawid S, St Geme JW. Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol Rev* 1999 Apr; 23(2):99-129.
14. Niazi A. Comparison of virulence determinants of different strains of *Haemophilus influenzae*. Australia: Curtine University of Technology, Perth WA; 2009.
15. Prasadarao NV, Lysenko E, Wass CA, Kim KS, Weiser JN. Opacity associated protein A contributes to the binding of *Haemophilus influenzae* to Chang epithelial cells. *Infect Immun* 1999 Aug; 67(8):4153-60.
16. Weiser JN, Chong ST, Greenberg D, Fong W. Identification and characterization of a cell envelope protein of *Haemophilus influenzae* contributing to phase variation in colony opacity and nasopharyngeal colonization. *Mol Microbiol* 1995 Aug; 17(3):555-64.
17. Roche RJ, Moxon ER. Phenotype variation in *Haemophilus influenzae*: The Interrelationship of colony opacity, capsule and lipopolysaccharide. *Microb Pathog* 1995 Feb; 18(2):129-40.
18. van der Woude MW, Bäumlér AJ. Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2004 Jul; 17(3):581-611.

19. Martí-Lliteras P, López-Gómez A, Mauro S, Hood DW, Viadas C, Calatayud L, et al. Nontypable *Haemophilus influenzae* displays a prevalent surface structure molecular pattern in clinical isolates. *PLoS One* 2011;6(6):e21133.
20. Perilla MJ, Ajello G, Elliott J, Facklam R, Popovic T, Dowell S F, et al. Manual for the laboratory identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of Public Health Importance in the Developing World. Geneva: WHO/ CDS/EPH/.15, 2002. p. 27-42.
21. Castill O. Division of bacterial diseases, laboratory methods for the diagnosis of meningitis. Identification and characterization of *Haemophilus influenzae*. Chapter 9. USA: National Center for Immunization and Respiratory Diseases; 2012. Available From: <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt09-id-characterization-hi.html>. Accessed April 1, 2014.
22. Murphy TF, Brauer AL. Expression of urease by *Haemophilus influenzae* during human respiratory tract infection and role in survival in an acid environment. *BMC Microbiol* 2011 Aug 16;11:183.
23. Falla TJ, Crook DW, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, Moxon ER. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1994 Oct; 32(10):2382-6.
24. Weiser JN, Merion Pa. Opacity associated proteins, DNA encoding the same, and methods of use there of. Philadelphia: Children's Hospital of Philadelphia; 1998. p. 105.
25. Shetty S, Cohen AL, Edmond K, Ojo L, Loo J, O'Loughlin R. Systematic review and critical evaluation of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease burden studies in Asia from the last decade: Lessons learned for invasive bacterial disease surveillance. *Pediatr Infect Dis J* 2010 Jul; 29(7):653-61.
26. Shakerian-Rostami S, Moradi-Lakeh M, Esteghamati A. Vaccine efficacy against *Haemophilus influenzae* type b in Under-5 children: Systematic review and meta-analysis. *J Isfahan Med School* 2010;28(109):437-48. [Full Text in Persian]