بررسی فراوانی موتاسیون ژن PA3721 در سویه های سودوموناس آئروژینوزا تولیدکننده ESBL و فاقد ESBL با روش PCR

آذر ولی زاده[۱]، نورخدا صادقی فرد[۲*]، محمد رضا ذوالفقاری[۱]، عباس ملکی[۲]، سبحان غفوریان[۲]، پگاه شکیب[۱]

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم

۲) مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت:۸۹/۶/۲۱ **تاریخ پذیرش:۹۰/۱۰/۲۵**

چکیده

مقدمه: بعضی از سویه های سودوموناس آئروژینوزا، بتالاکتامازهای طیف وسیع را تولید می کنند که باعث مقاومت به سفالوسپورین های طیف وسیع مانند سفو تاکسیم، سفتریاکسیون، سفتازیدیم و هم چنین مونوباکتام هایی از قبیل آزترونام می شوند. یکی از عوامل ایجادکننده مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها در سویه های سودوموناس آئروژینوزا افزایش بیان پمپ های تراوشی است، که از مهم ترین این پمپ ها می توان پمپ MexAB-OprM را نام برد.

مواد و روش ها: به منظور تشخیص فراوانی موتاسیون ژنPA3721، ۵۰ سویه سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از عفونت های ادراری در بیمارستان های آموزشی درمانی شهر ایلام و بیمارستان میلاد تهران مورد مطالعه قرار گرفتند. باکتری ها با روش های بیوشیمیایی تایید شدند و با استفاده از دیسک دیفیوژن، حضور آنزیم های بتالاکتاماز غربالگری شدند. سپس با استفاده از دیسک های ترکیبی، وجود آنزیم های بتالاکتاماز با طیف وسیع تایید گردید، و در نهایت ژن های برخی از آنزیم های بتالاکتاماز طیف گسترده با روش PCR بررسی شدند. جهت بررسی فراوانی موتاسیون ژن PA3721 در سویه های تولید کننده ESBL و سویه های فاقد ESBL، نیز از روش PCR استفاده گردید.

یافته های پژوهش: در این مطالعه ۵۰ سویه مورد مطالعه قرار گرفت که ۱۸ سویه از بیمارستان میلاد تهران و ۳۲ سویه از بیمارستان های آموزشی درمانی ایلام تهیه گردید. در نمونه های جمع آوری شده از بیمارستان میلاد تهران، وجود ژن های PSE، VEB و PER، و در نمونه های جمع آوری شده از بیمارستان های ایلام، بررسی ژن های OXA10 قبلا مورد مطالعه قرار گرفته بود. در ۳۲ نمونه شهر ایلام که ۱۷ نمونه از آن ها تولید کننده بتالاکتاماز طیف وسیع بودند، همگی دارای ژن oxA-10 بودند و در بین آن ها موتاسیون ژن PA3721 در ۸ نمونه(۴۷/۰۵ درصد) مشاهده گردید.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج این بررسی در شرایط in vitro، مروپنم روی بیشتر سویه های سودوموناس آئروژینوزا مورد مطالعه اثر گذاشت. نتایج مطالعه نشان داد که موتاسیون ژن PA3721 بیشتر در میان سویه های تولیدکننده بتالاکتاماز طیف وسیع که واجد ژن oxA-10 هستند، دیده می شود.

واژه های کلیدی: بتالاکتاماز طیف وسیع ، MexAB-OprM ، PA3721 ، سودوموناس آئروژینوزا

* **نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

Email: sadeghifard-n@medilam.ac.ir

مقدمه

با مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها، سویه های سودوموناس آئروژینوزای دخیل در عفونت های بیمارستانی دارای مقـــاومت های چندگـــانه به آنتی بیوتیک های مختلف در تمام دنیا روز به روز در حال افزایش است. مقاومت سویه های سودوموناس آئروژینوزا به آنتی بیوتیک ها ناشی از علل مختلف همانند: تولید آنزیم هـــای غیر فعـــال کننـــده آنتی بیوتیک ها، تغییر ساختمان مولکول هـــدف آنتی بیوتیک ها مانند تغییر ساختمان پروتئین اتصالی به پنی سیلین که باعث کـــاهش میل ترکیـــبی آنتی بیوتیک می گردد، کاهش نفوذپذیری غشاءهای سلول باکتری نسبت به آنتی بیوتیک که منجر به کاهش یا ممانـــعت از ورود دارو به داخل ســـلول می گردد، و هم چنین برگشت دارو به خارج سلول از طریق پمپ های تراوشی می باشد،(۱). در این میان، تولید آنزیم های بتالاکتامازی و هم چنین افزایش بیان پمپ های تراوشی(Efflux pumps) نقش بیشتری در ایجاد مقاومت ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا به آنتی بیوتیک های بتالاکتام دارند.(۴-۱)

طبق بررسی هایی که PUT MAN و همکارانش در ســـال ۲۰۰۰ انجام دادند، ۵ کـــــلاس از این سیستم های تراوشی(Efflux Pumps) یا پخـــش به خـــارج، توصـــیف و در گـــروه هـــــای MF(Major facilitator)
ABC(ATP Binding Cassette)
RND(Resistance Nodulation Division)
SMR(Small Multidurg Resistance)
MATF(Multidrug and Toxi compound extrusion Family)
طبقه بنـــدی شده اند.(۵،۶)

از مهم ترین پمپ های تـــراوشی گروه RND، می توان به MexAB-OprM اشاره نمود،(۸،۷). این پمپ تراوشی در مقاومت اکتسابی باکتری ایفای نقش می کند. اعضای این خانواده، آنتی پورترهایی هستند که با بکارگیری نیروی محرکه پروتون غشاء در ازای ورود یون های پروتون درون سلول، ترکیبات دارویی را از سلول خارج می کنند. از عوامل تنظـــیم کننده، که در افزایش بیان اپرون mexAM-oprM نقـــش دارد، موتاسیون در ژن PA3721 معروف به nalC می باشد.

nalC در واقع ترانسپوژنی است که در نتیجه شکست از ژن PA3721 در سودوموناس آئروژینوزا تحت تاثیری ناشناخته بوجود می آید و در نهایت باعث افزایش اپرون mexAM-oprM می شود و در نتیجه باعث افزایش مقاومت سودوموناس آئروژینوزا به برخی از آنتی بیوتیک ها می گردد.(۹،۸)

با توجه به این که تاکنون در خصوص اهمیت پمپ های تراوشی در مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتامی مطالعات محدودی انجام گرفته است، در این مطالعه به بررسی نقش nalC در سویه های سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده ESBL و فاقد ESBL با روش PCR پرداخته شده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه، ۵۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا تهیه شده در بیمارستان امام خمینی(ره) و ۳۲ نمونه از آزمایشگاه مرکزی شهر ایلام، و ۱۸ نمونه از بیمارستان میلاد تهران مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از انجام تست های بیوشیمیایی، مقاومت سویه های سودومـــوناس آئروژینوزا جدا شده نســـــبت به آنتی بیوتیـــــک های اگزاســـــیلین، آزتـــرونام، کوتریموکسازول، آمیکاسین، سفتازیدیم، تیکارسیلین، سفوتاکسیم و مروپنم تهیه شده از شرکت Hi Media به روش انتشار در دیسک آگار(Kirby-BauLer) تعیین گردید.

DNA ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از کیت(شرکت bioner کشور انگلستان) استخراج گردید. جهت بررسی موتاسیون ژن PA3721، از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. جهت انجام واکنش PCR، یک میکرولیتر از DNA استخراج شده به PCR Master mix با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۰/۸ میلی مول Mgcl2، ۰/۲ میلی مول dNTP، ۵ پیکومول از هر پـــرایمر ویک واحد Taq polymerase اضافه گردید. پس از انجام PCR، الکتروفورز نمونه ها در ژل آگارز رنگ آمیزی شـــــده با اتیـــــدیوم بروماید انجام گرفت و نتـــــایج با Gel Document مشاهده و ذخیـــره

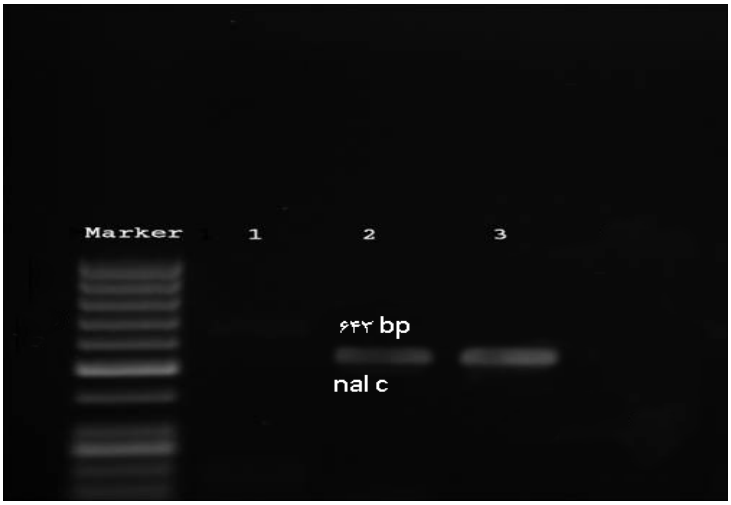
گردید. از مارکر 100 bp ladder و (Fermentase) جهت تایید وزن مولکولی محصولات تکثیر شده استفاده شد.

یافته های پژوهش

در بیمارستان میلاد تهران، از ۱۸ سویه مورد مطالعه، مقاومت ایزوله های جدا شده به آنتی بیوتیک های اگزاسیلین و آزترونام(۹۴/۴درصد)، سفوتاکسیم(۱۰۰ درصد)، سفتازیدیم(۱۰۰ درصد)، آمیکاسین(۱۰۰ درصد) و تیکارسیلین(۸۸/۸ درصد) مشاهده شد. از ۱۸ سویه بیمارستان میلاد، همگی بر اساس روش های فنوتیپی تولیدکننده بتالاکتامازهای طیف وسیع بودند، و در ۱۴ سویه هر دو ژن PER و VEB و در ۴ سویه فقط ژن PSE تشخیص داده شد. در نمونه های شهر ایلام، ۱۵ سویه بر اساس روش های فنوتیپی فاقد بتالاکتاماز که همگی مربوط به آزمایشگاه مرکزی بودند و ۱۷سویه جدا شده از بیمارستان امام خمینی شهر ایلام همگی بر اساس روش های فنوتیپی دارای بتالاکتاماز طیف گسترده و بر اساس PCR حمل کننده ژن oxA-10 بودند. از ۱۷ ایزوله جدا شده از عفونت ادراری در بیمارستان امام خمینی شهر ایلام، ۱۰۰ درصد آن ها به اگزاسیلین، آزترونام، سفوتاکسیم و کوتریموکسازول، ۹۴/۱۱ درصد به تیکارسیلین، سفتازیدیم و ۸۸/۲۳ درصد آن ها به آمیکاسین مقاومت نشان دادند. از ۱۵ ایزوله جدا شده از عفونت ادراری در آزمایشگاه مرکزی شهر ایلام، ۱۰۰ درصد آن ها به اگزاسیلین، آزترونام، کوتریموکسازول، آمیکاسین، سفتازیدیم، تیکارسیلین و سفوتاکسیم حساسیت نشان دادند. نتایج PCR نشان داد که از ۱۸ سویه بیمارستان میلاد تهران ۱۱/۱۱ درصد دارای موتاسیون در ژن PA3721 بودند. هم چنین تمامی این سویه ها حمل کننده ژن های VEB و PER بودند. در ۳۲ نمونه شهر ایلام که ۱۷ نمونه از آن ها تولید کننده بتالاکتاماز طیف گسترده بود، همگی دارای ژن oxA-10 بودند که در آن ها، موتاسیون ژن PA3721 در ۸ نمونه(۴۷/۰۵ درصد) مشاهده گردید، و در ۱۵ نمونه فاقد بتالاکتاماز طیف وسیع موتاسیون ژن، PA3721 در هیچ ایزوله ای مشاهده نگردید. در مجموع، از ۵۰ نمونه مورد بررسی، در ۱۰ ایزوله(۲۰ درصد) ژن nalC مشاهده گردید.(جدول شماره ۱ و تصویر شماره ۱)

جدول شماره ۱. فراوانی ژن nal C در سویه های کدکننده ژن های طیف گسترده

نام ژن		موارد مثبت nalC	موارد منفی nalC	جمع کل
OXA-10	موارد مثبت	۸	۹	۱۷
	موارد منفی	–	۳۳	۳۳
PER	موارد مثبت	۱	۹	۱۰
	موارد منفی	–	۴۰	۴۰
VEB	موارد مثبت	۱	۳	۴
	موارد منفی	–	۴۶	۴۶
PSE	موارد مثبت	–	۴	۴
	موارد منفی	–	۴۶	۴۶



شکل شماره ۱ . تصویر ژل الکتروفورز مربوط به محصول PCR ژن nalC
ردیف ۱: کنترل منفی، ردیف های ۳-۲: ایزوله های دارای ژن nalC، marker : مارکر ۱۰۰ جفت بازی

بحث و نتیجه گیری

سودوموناس آئروژینوزا، عامل رایج عفونت های بیمارستانی شامل: پنومونی، عفونت های مجاری ادراری، باکتریمی و عفونت های شدید در بیماران سوختگی می باشد،(۱۰،۱۱). مقاومت داروئی این باکتری به واسطه جلوگیری از ورود آنتی بیوتیک به داخل سلول باکتری، برگشت فعال دارو به بیرون سلول باکتری، غیر فعال شدن دارو به علت آنزیم های باکتریایی، تغییر جایگاه(هدف دارویی) و یا مجموعه ای از آن ها به وجود می آید. ژن های کدکننده مقاومت به آنتی بیوتیک ها نه تنها بر روی کروموزوم ها، بلکه توسط عناصر خارج کروموزومی(پلاسمیدها)(که عامل مقاومت R نیز خوانده می شوند) حمل می گردند.(۱۲،۱۳)

برگشت دارو به بیرون سلول از مهم ترین مکانیزم های مقاومت در میان ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا است که به واسطه پمپ های تراوشی انجام می گیرد. یکی از مهم ترین پمپ های تراوشی سیستم MexAB-OprM می باشد که نقشی مهم در مقاومت آنتی بیوتیکی به فلوروکینولون ها، بتالاکتام ها، تتراسیکلین، ماکرولیدها، کلرامفنیکل، نوبیوسین، لینکومایسین، تریمتوپریم و سولفونامیدها دارد. MexR نقش رپرسور کنترل کننده منفی اپرون mexAB-oprm دارد و بیان mexR توسط محصول ژن دیگری به نام armR که اثر رپرسوری روی بیان mexR دارد کنترل می شود. بیان ژن armR توسط محصول ژن PA3721 کنترل می شود و محصول این ژن روی armR اثر مهاری دارد. بنا بر این، هنگامی که در ژن PA3721 موتاسیون ایجاد شود، محصولی به نام nalC به دست می آید که دیگر اثر مهاری بر ژن armR ندارد و در مرحله بعد بیان ژن armR افزایش می یابد. افزایش این محصول به اثر رپرسوری بیشتر بر روی ژن mexR منجر می گردد که در نهایت MexR تولید نشده و اثر رپرسوری آن روی اپرون mexAB-oprM از بین رفته و بیان این اپرون افزایش می یابد که نتیجه آن افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک ها می باشد،(۱۴-۱۶).

بر اساس نتایج به دست آمده، مشخص گردید که بیشتر ایزوله هایی که تولیدکننده بتالاکتاماز طیف وسیع از نوع OxA-10 بودند در ژن PA3721 دچار موتاسیون شده بودند. بنا بر این، ممکن است این نوع موتاسیون بیشتر در مقاومت به بتالاکتام هایی از جمله اگزاسیلین نقش داشته باشد. هم چنین، ممکن است این موتاسیون روی بیان بیشتر ژن OxA-10 نیز اثر داشته باشد که به مطالعه بیشتری نیاز دارد.

با توجه به نتایج این بررسی در شرایط in vitro، مروپنم موثرترین دارو در مقابل سویه های سودوموناس آئروژینوزای مورد مطالعه بود و در میان سویه های واجد، یک یا چند ژن بتالاکتاماز طیف گسترده بیشترین

میزان nalC مربوط به سویه های واجد بتالاکتاماز OXA-10 بود. پیشنهاد می شود مطالعه ای در زمینه سکونسینگ ژن PA3721 در سویه های تولید کننده و فاقد بتالاکتاماز انجام شود تا امکان بررسی تنوع موتاسیون به لحاظ کیفی نیز محقق گردد.

References

1-Adewoye L, Sutherland A, Srikumar R, Poole K. The mexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in Pseudomonas aeruginosa: characterization of mutations compromising activity. J Bacteriol 2002;184:4308-12.

2-Ahmed M, Borsch CM, Taylor SS, Vázquez-Laslop N, Neyfakh AA. A protein that activates expression of a multidrug efflux transporter upon binding the transporter substrates. J Biol Chem 1994;269: 28506-13.

3-Akama H, Kanemaki M, Yoshimura M, Tsukihara T, Kashiwagi T, Yoneyama H , et al. Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of Pseudomonas aeruginosa: dual modes of membranee anchoring and occluded cavity end. J Biol Chem 2004;279: 52816-19.

4-Akama H, Matsuura T, Kashiwagi S, Yoneyama H, Narita S, Tsukihara T, et al. Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in Pseudomonas aeruginosa. J Biol Chem 2004;279:25939-42.

5-Ball PR, Shales SW, Chopra I. Plasmid-mediated tetracycline resistance in Escherichia coli involves increased efflux of the antibiotic. Biochem Biophys Res Commun 1980;93:74-81.

6-Becher A, Schweizer HP. Integration-proficient pseudomonas aeruginosa vectors for isolation of single-copy chromosomal lacZ and lux gene fusions. Biotechniques 2000;29:948-50,952.

7-de Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, Timmis KN. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. J Bacteriol 1990;172:6568-72.

8-Dmitrova M, Younès-Cauet G, Oertel-Buchheit P, Porte D, Schnarr M, Granger-Schnarr M. A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in Escherichia coli. Mol Gen Genet 1998;257:205-12.

9-Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. Drugs 2007;67:351-68.

10-Jeannot K, Sobel ML, El Garch F, Poole K, Plésiat P. Induction of the MexXY efflux pump in Pseudomonas aeruginosa is dependent on drug-ribosome interaction. J Bacteriol 2005;187:5341-6.

11-Kaatz GW, McAleese F, Seo SM. Multidrug resistance in Staphylococcus aureus due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:1857-64.

12-Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked Pseudomonas aeruginosa mutants. Gene 1998;212:77-86.

13-Hoang TT, Kutchma AJ, Becher A, Schweizer HP. Integration-proficient plasmids for Pseudomonas aeruginosa: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. Plasmid 2000;43:59-72.

14-Ghosha S, Cremersb CM, Jakobb U, Lovea NG. Chlorinated phenols control the expression of the multi-drug resistance efflux pump MexAB-OprM in Pseudomonas aeruginosa by activating NalC. Mol Microbiol 2011;79:547-56.

15-Starr LM, Fruci M, Poole K. Pentachlorophenol induction of the Pseudomonas aeruginosa mexAB-oprM efflux operon: involvement of repressors NalC and mexR and the antirepressor armR. PLoS ONE 2012;7:1-9.

16- Cao L, Srikumar R, Poole K. MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug resistant Pseudomonas aerugin-osa: identification and
characterization of the nalC gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. Mol Microbiol 2004;53:1423-36.

Study of Mutation Frequency in PA3721 Gene among Producing and Non-producing ESBLs Pseudomonas aeruginosa Strains by PCR method

*Valizadeh A[1], Sadeghifard N[*2], Zolfaghary M.R[1], Maleki A[2], Ghafourian S[1], Shakib P[1]*

(Received: 12 Sep. 2010 Accepted: 15 Jan. 2012)

Abstract

Introduction: Some Pseudomonas aeruginosa strains produce Extended Spectrum Beta Lactamase which causes resistance to cephalosporins such as cefteriaxon, cefotaxim, ceftazidim and also monobactams such as azteronam. Over expression of efflux pumps including MexAB-OPRM is a factors which play an important role in resistance of Pseudomonas aeruginosa strains to antibiotics.

Materials & Methods: In order to detect the mutation frequency in PA3721 gene, 50 isolates of Pseudomonas aeruginosa isolated from urinary tract infection in Emam Khomeini Hospital of Ilam and Milad Hospital in Tehran were studied. The isolates were confirmed by biochemical methods and the Extended Spectrum Beta Lactamase were screened by disk diffusion method. Phenotypic confirmatory test by combined disk was utilized for confirmation of ESBLs. In next step, ESBLs genes as well as mutation in frequency PA3721 gene in producing and non producing ESBLs Pseudomonas aeruginosa strains were identified by PCR method.

Findings: In this study, 50 isolates were studied, including 18 isolates from Milad Hospital and the rest from Ilam Hospitals. In Milad Hospital, ESBLs genes for PER, PSE and VEB and in Ilam Hospitals ESBL gene for OxA-10 were detected. In Ilam samples including 32 isolates of which 17 samples produced ESBLs, all carried oxA-10 gene and 8 isolates (47/05%) were positive for mutation in PA3721 gene.

Discussion & Conclusion: According to the results, Meropenem was more effective against Pseudomonas aeruginosa isolates in in vitro condition. The results also showed that nearly half of oxA-10 producing Pseudomonas aeruginosa isolates carry nalC gene.

Keywords: ESBLs, Mex AB-OPRM, pseudomonas aeruginosa

---

1. Dept of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

2. Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
**(corresponding author)*