

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

آذر ولی زاده^۱، نورخدا صادقی فرد^{۲*}، محمد رضا ذوالفقاری^۱، عباس ملکی^۱، سبحان غفوریان^۱، پگاه شکیب^۱

(۱) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم

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

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۲۵

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۲۱

چکیده

مقدمه: بعضی از سویه های سودوموناس آئروژینوزا، بتالاکتمامزهای طیف وسیع را تولید می کنند که باعث مقاومت به سفالوسپورین های طیف وسیع مانند سفو تاکسیم، سفتراکسیون، سفتازیدیم و هم چنین مونوباتام 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 ژن PA3721، 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 بتالاکتمامز غربالگری شدند. سپس با استفاده از دیسک های ترکیبی، وجود آنزیم های بتالاکتمامز با طیف وسیع تایید گردید، و در نهایت ژن های برخی از آنزیم های بتالاکتمامز طیف گستردۀ با روش PCR بررسی شدند. جهت بررسی فراوانی موتاسیون ژن PA3721 در سویه های تولید کننده ESBL و سویه های قادر PCR استفاده نیز از روش PCR گردید.

یافته های پژوهش: در این مطالعه ۵۰ سویه مورد مطالعه 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 گرفته بود. در ۳۲ نمونه شهر ایلام که ۱۷ نمونه از آن ها تولید کننده بتالاکتمامز 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 بتالاکتمامز طیف وسیع که واجد ژن OXA-10 هستند، دیده می شود.

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

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

Email: sadeghfard-n@medilam.ac.ir

مقدمه

موتاسیون در ژن PA3721 معروف به nalC می باشد. nalC در واقع ترانسپوزنی 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 قادر 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 بیوشیمیابی، مقاومت سویه های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک های اگزاسیلین، آزترونام، کوتربیوسازول، آمیکاسین، سفتازیدیم، تیکارسیلین، Hi Media سفوتاکسیم و مروپنم تهیه شده از شرکت Kirby-BauLer (Kirby-BauLer) به روش انتشار در دیسک آگار(agar) تعیین گردید.

DNA ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از کیت شرکت bioneer کشور انگلستان استخراج گردید. جهت بررسی موتاسیون ژن PA3721، از پرایم های اختصاصی استفاده شد. جهت انجام واکنش PCR، یک میکرولیتر از DNA استخراج شده به PCR Master mix با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۰/۰ میلی مول MgCl₂، ۰/۲ میلی مول dNTP، ۵ پیکومول از هر پرایم و یک واحد PCR Taq polymerase اضافه گردید. پس از انجام الکتروفورز نمونه ها در ژل آگارز رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید انجام گرفت و نتایج با Gel Document مشاهده و ذخیره

با مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها، سویه های سودوموناس آئروژینوزای دخیل در عفونت های بیمارستانی دارای مقاومت های چندگانه 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 های غیرفعال کننده آنتی بیوتیک ها، تغییر ساختمان مولکول هدف آنتی بیوتیک ها مانند تغییر ساختمان پروتئین اتصالی به پنی سیلین که باعث کاهش میل ترکیبی آنتی بیوتیک می گردد، کاهش نفوذپذیری غشاء های سلول باکتری نسبت به آنتی بیوتیک که منجر به کاهش یا ممانعت از ورود دارو به داخل سلول می گردد، و هم چنین برگشت دارو به خارج سلول از طریق پمپ های تراوشی می باشد.(۱). در این میان، تولید آنزیم های بتالاکتامزی و هم چنین افزایش بیان پمپ های تراوشی(Efflux pumps) نقش بیشتری در ایجاد مقاومت ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا به آنتی بیوتیک های بتالاکتام داردند.(۴)

طبق بررسی هایی که PUT MAN و همکارانش در سال ۲۰۰۰ انجام دادند، ۵ کلاس از این سیستم های تراوشی(Efflux Pumps) یا پخش به خارج، توصیف و در گروه های MF(Major facilitator)

ABC(ATP Binding Cassette)

RND(Resistance Nodulation Division)

SMR(Small Multidrug Resistance)

MATF(Multidrug and Toxin compound extrusion Family)

طبقه بنده شده اند.(۶,۵)

از مهم ترین پمپ های تراوشی گروه RND می توان به MexAB-OprM اشاره نمود.(۷,۸). 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 تنظیم کننده، که در افزایش بیان اپرون mexAM oprM نقش دارد،

آزترونام، سفوتاکسیم و کوتريموکسازول، ۹۴/۱۱ درصد به تيكارسيلين، سفتازيديم و ۸۸/۲۳ درصد آن ها به آميکاسين مقاومت نشان دادند. از ۱۵ ايزوله جدا شده از عفونت ادراري در آزمایشگاه مرکزی شهر ايلام، ۱۰۰ درصد آن ها به اگزاسيلين، آزترونام، کوتريموکسازول، آميکاسين، سفتازيديم، تيكارسيلين و سفوتاکسیم حساسيت نشان دادند. نتایج PCR نشان داد که از ۱۸ سویه بيمارستان ميلاد تهران ۱۱/۱۱ درصد داراي موتاسيون در ژن PA3721 بودند. هم چنین تمامی اين سویه ها حمل كننده ژن هاي VEB و PER بودند. در ۳۲ نمونه شهر ايلام که نمونه از آن ها توليد كننده بتالاكتاماز طيف گستره بود، همگي داراي ژن oXA-10 بودند که در آن ها، موتاسيون ژن PA3721 در ۸ نمونه (۴۷/۰۵) درصد) مشاهده گردید، و در ۱۵ نمونه فاقد بتالاكتاماز طيف وسیع موتاسيون ژن، PA3721 در هیچ اي زوله اي مشاهده نگردید. در مجتمع، از ۵۰ نمونه مورد بررسی، در ۱۰ ايزوله (۲۰ درصد) ژن nalC مشاهده گردید. (جدول شماره ۱ و تصویر شماره ۱)

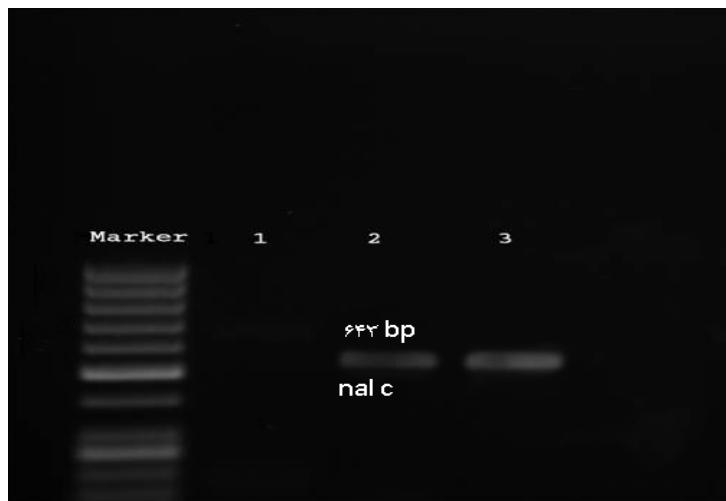
گرديد. از ماركر 100 bp ladder (Fermentase) جهت تاييد وزن مولکولي محصولات تكثير شده استفاده شد.

يافته هاي پژوهش

در بيمارستان ميلاد تهران، از ۱۸ سویه مورد مطالعه، مقاومت اي زوله هاي جدا شده به آنتي بيويتك هاي اگزاسيلين و آزترونام (۹۶/۴)، سفوتاکسیم (۱۰۰ درصد)، سفتازيديم (۸۸/۸ درصد)، آميکاسين (۱۰۰ درصد) و تيكارسيلين (۱۰۰ درصد) مشاهده شد. از ۱۸ سویه بيمارستان ميلاد، همگي بر اساس روش هاي فنوتيبی توليدكننده بتالاكتاماز هاي طيف وسیع بودند، و در ۱۴ سویه هر دو ژن PER و VEB و در ۴ سویه فقط ژن PSE تشخيص داده شد. در نمونه هاي شهر ايلام، ۱۵ سویه بر اساس روش هاي فنوتيبی فاقد بتالاكتاماز که همگي مربوط به آزمایشگاه مرکزی بودند و ۱۷ سویه جدا شده از بيمارستان امام خميني شهر ايلام همگي بر اساس روش هاي فنوتيبی داراي بتالاكتاماز طيف گستره و بر اساس PCR حمل كننده ژن oXA-10 بودند. از ۱۷ ايزوله جدا شده از عفونت ادراري در بيمارستان امام خميني شهر ايلام، ۱۰۰ درصد آن ها به اگزاسيلين،

جدول شماره ۱. فراوانی ژن C nal در سویه های کدکننده ژن های طيف گستره

نام ژن	موارد مثبت	موارد منفي	مجموع	مجموع کل
OXA-10	۸	۹	۱۷	۳۳
PER	۱	—	۴۰	۴۰
VEB	۱	۳	۴	۴۶
PSE	—	۴۶	۴	۴۶



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

بحث و نتیجه گیری

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 MexR روی ژن MexR منجر می گردد که در نهایت تولید نشده و اثر رپرسوری آن روی اپرون توسعه دارد. افزایش این اپرون افزایش 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 تولید کننده بتالاکتماز 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 بتالاکتم هایی از جمله اگراسیلین نقش داشته باشد. هم چنین، ممکن است این موتاسیون روی 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 موثر ترین دارو در مقابل سویه های سودوموناس آئروژینوزای مورد مطالعه بود و در میان سویه های واحد، یک یا چند ژن بتالاکتماز طیف گستردگی بیشترین

سودوموناس آئروژینوزا، عامل رایج عفونت های بیمارستانی شامل: پنومونی، عفونت های مجاری ادراری، باکتریمی و عفونت های شدید در بیماران سوختگی می باشد، (۱۱، ۱۰). 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 کد کننده 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، بتالاکتم ها، تتراسیکلین، ماکرولیدها، کلرامفینیکل، نووبیوسین، 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

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 membrane 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-Ghoshal 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 aeruginosa*: identification and characterization of the nalC gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. *Mol Microbiol* 2004;53:1423-36.

میزان nalC مربوط به سویه های واحد بتالاکتاماز OXA-10 بود. پیشنهاد می شود مطالعه ای در زمینه سکونسینگ ژن PA3721 در سویه های



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

Valizadeh A¹, Sadeghifard N^{*2}, Zolfaghary M.R¹, Maleki A², Ghafourian S¹, Shakib P¹

(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 ceftetraxon, 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)