باند ژن های qacE/qacEΔ1 در سودوموناس آئروجینوزا های جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی

جمیله نوروزی[1]، رباب رفیعی طباطبایی[2]، کیمیا حمیری[3*]، محبوبه ستارزاده تبریزی[4]

1. دکترای میکروبیولوژی، استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
2. دکترای میکروبیولوژی، دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
3. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
4. کارشناس میکروبیولوژی، کارشناس آزمایشگاه بیمارستان مطهری

*** نشانی برای مکاتبه:** تهران، خیابان شریعتی، خیابان یخچال(دروس)، خیابان هدایت، کوچه کمال الملک غفاری، پلاک 20، تلفن: 09122955292 /22586679 ، k_hemyari@yahoo.com

دریافت مقاله: اردیبهشت نود و یک پذیرش برای چاپ: تیر نود و یک

چکیده

سابقه و هدف: *سودوموناس آئروجینوزا یکی از مهمترین عوامل عفونت در بیماران مبتلا به سوختگی است. مصرف گسترده و بی رویه دزانفکتانت ها و آنتی سپتیک ها همانند ترکیبات چهارتایی آمونیوم در مراکز کلینیکی اغلب باعث پیدایش مقاومت میکروارگانیسم ها به این ترکیبات شده است. هدف از این مطالعه، تعیین حضور ژن های مقاومت به مواد بیوسایدی مانند ژن های qacE/ qacEΔ1 در میان سودوموناس آئروجینوزا های جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی بوده است.*

مواد و روش ها: *85 سویه سودوموناس آئروجینوزا از منابع کلینیکی جمع آوری شد. حساسیت این سویه ها نسبت به ماده بیوسایدی دی دسیل دی متیل آمونیوم کلراید با نام تجاری دکونکس به روش ماکرودیلوشن و میکرودیلوشن براث سنجیده شد. برای یافتن ژن های qacE و qacEΔ1 ، واکنش های زنجیره ای پلیمرازی (PCR) انجام شد.*

نتایج: *در میان 85 سویه جدا شده، 37 % سویه ها، حساسیت کمتر و 63 % سویه ها حساسیت بیشتری به ماده بیوسایدی نشان دادند. ژن qacEΔ1 در 49/9 % سویه های مقاوم مشاهده شد. اما ژن qacE در هیچ یک از سویه ها مشاهده نشد.*

نتیجه گیری: *استفاده زیاد از ترکیبات بیوسایدی برای افزایش سطح بهداشت، باعث القاء هر چه بیشتر ژن های مقاوم به مواد بیوسایدی در باکتری ها و ایجاد مقاومت در آنها شده است. بنابراین با توجه به مقاومت زیاد سودوموناس آئروجینوزا به بسیاری از آنتی بیوتیک ها و همچنین افزایش مقاومت به مواد بیوسایدی در آنها، درمان عفونت های ناشی از این باکتری امروزه با مشکل جدی مواجه شده است. از این رو استفاده صحیح از بیوسایدها و اجتناب از مصرف بی رویه آنها برای از بین بردن کامل باکتری ها ضروری بنظر می رسد.*

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروجینوزا، ترکیب چهارتایی آمونیوم (دکونکس)، ژن های qacE/ qacEΔ1

مقدمه

مقاومت به آنتی بیوتیک ها تا به حال موضوع بسیاری از مطالعات بوده است. اما در مقابل، مقاومت در برابر مواد بیوسایدی به دلیل استفاده بیشتر از این ترکیبات برای از بین بردن میکروارگانیسم ها، موضوعی است که به تازگی شکل گرفته است. در این میان وجود میکروارگانیسم های مقاوم مثل سودوموناس آئروجینوزا، نگرانی جدی را در زمینه بهداشت و جلوگیری از بیماری های عفونی بوجود آورده است (1).

سودوموناس آئروجینوزا، یک پاتوژن رایج گرم منفی و فرصت طلب انسانی است که بطور معمول افراد با سیستم ایمنی ضعیف را مورد حمله قرار می دهد. این باکتری به ترکیبات ضدمیکروبی متعددی مقاومت نشان می دهد.(2). سودوموناس آئروجینوزا سبب عفونت های ادراری، عفونت سیستم تنفسی، عفونت های بافت نرم، باکتریمی، عفونت های استخوان و مفاصل و بسیاری از عفونت های سیستمیک دیگر به ویژه در افراد مبتلا به سوختگی شدید و افراد مبتلا به بیماری ایدز به علت اختلال ایمنی می شود(3). عفونت های ناشی از سودوموناس آئروجینوزا به علت مقاومت ذاتی و اکتسابی و محدودیت در انتخاب ترکیبات ضدمیکروبی موثر معمولا به سختی درمان می شوند(4). سودوموناس آئروجینوزا به عنوان میکروارگانیسم مقاوم به ترکیبات ضد میکروبی شناخته شده است. نفوذپذیری کم غشاء خارجی این باکتری مانع رسیدن این ترکیبات به جایگاه فعالشان در درون سلول می شود(5).

وجود سیستم دفع کننده ترکیبات بیوسایدی از درون به خارج سلول، یکی از مکانیزم های مقاومت این باکتری به این ترکیبات است. سودوموناس آئروجینوزا نیز مانند سایر باکتری های گرم منفی ممکن است سیستم های دفع چند دارویی، مانند پروتئین های QacE و QacEΔ1 را حمل کند(6). ژن qacEΔ1 قسمتی از انتهای حفاظت شده انتگرون های کلاس 1 است(7). این انتگرون ها بطور معمول از سویه های کلینیکی مقاوم به آنتی بیوتیک جزو خانواده های انتروباکتریاسه ها و سودوموناس ها جدا شده اند. ژن qacEΔ1، شکل موثر و فعال تری از ژن qacE است. این ژن، مقاومت به بیوسایدهایی مانند ترکیبات چهارتایی آمونیوم (QACs) و رنگ هایی مانند اتیدیوم برماید را کد می کند. ژن qacE نیز به عنوان قسمتی از انتهای این قطعات ژنتیکی در بعضی از باکتری های گرم منفی یافت می شود(8). هدف از انجام این تحقیق، تعیین مقاومت سودوموناس آئروجینوزا به ترکیبات چهارتایی آمونیوم و همچنین تعیین وجود ژن های مقاومت از جمله qacE و qacEΔ1 در این باکتری بوده است.

روش کار

برای انجام این تحقیق، تعداد 100 نمونه از خون و ترشحات زخم بیماران مبتلا به سوختگی از مرکز سوانح و سوختگی شهر تهران جمع آوری گردید. نمونه ها در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس به لوله های حاوی محیط کشت BHI براث انتقال و در دمای 37 درجه سلسیوس نگهداری شدند.

برای بررسی ویژگی های ریخت شناسی و فیزیولوژیک کلیه آزمایش ها بر روی باکتری ها در مرحله لگاریتمی انجام گرفت. نمونه ها رنگ آمیزی گرم شدند و بر روی محیط نیمه جامد SIM به منظور تعیین حرکت، کشت داده شدند. تست کاتالاز بوسیله آب اکسیژنه و تست اکسیداز بوسیله کیت های مخصوص این تست از شرکت پادتن طب انجام شد. نمونه ها در نهایت بر روی محیط های MRVP ، TSI ، SIM، به منظور تولید اندول و H_2S ، سیمون- سیترات، اوره، اورنیتین دکربوکسیلاز و آرژنین دکربوکسیلاز کشت داده شدند.

برای بررسی مقاومت سویه های جدا شده به ماده بیوسایدیاز ماده بیوسایدی دی دسیل دی متیل آمونیوم کلراید که نوعی ترکیب چهارتایی آمونیوم است با نام تجاری دکونکس محصول شرکت Borer chemic استفاده شد. به منظور سنجش مقاومت سویه ها نسبت به ماده بیوسایدی از روش های زیر استفاده شد:

ماکرودیلوشن براث: برای سنجش مقاومت سویه ها به این روش، در 11 لوله حاوی 1 میکرولیتر محیط مولر هینتون براث، رقت های دو برابر از ماده بیوسایدی با رقت نهایی 1% تهیه گردید و لوله های 12 و 13 به عنوان شاهدهای منفی و مثبت در نظر گرفته شد. از کلیه سویه های جمع آوری شده، سوسپانسیون میکروبی معادل 0/5 مک فارلند تهیه گردید و به رقت های مذکور اضافه شد.

میکرودیلوشن براث: در این روش از میکروپلیت های 96 خانه ای تهیه شده از شرکت SPL Life Sciences برای سنجش حساسیت سویه ها نسبت به ماده بیوسایدی استفاده گردید. ابتدا در 11 چاهک میکروپلیت، رقت های دو برابر از ماده بیوسایدی با رقت نهایی 1% تهیه گردید و به همه چاهک ها، سوسپانسیون میکروبی معادل 0/5 مک فارلند از همه سویه ها اضافه شد و در نهایت به منظور مشاهده رشد به همه چاهک ها، ماده تترازولیوم کلراید اضافه شد. چاهک های جداگانه ای به عنوان کنترل های مثبت، منفی و شاهد (تترازولیوم کلراید همراه با محیط کشت) در نظر گرفته شد. میکروپلیت به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس نگهداری شد.

از سویه سودوموناس آئروجینوزا ATCC27853 به عنوان سویه کنترل استاندارد برای سنجش حساسیت نسبت به ماده بیوسایدی استفاده گردید.

با استفاده از کیت استخراج ژنوم شرکت MBST ، ژنوم سویه ها جداسازی شد. سپس با انجام الکتروفورز بوسیله دستگاه الکتروفورز (BioRad) از استخراج و خالص بودن ژن های مورد نظر اطمینان حاصل گردید. شناسایی ژن های qacE و qacEΔ1 با پرایمر های نشان داده شده در جدول 2-1 انجام شد. مراحل مختلف PCR بر طبق برنامه جدول 2- 2 انجام شد. سپس محصول PCR به منظور مشاهده باند ژن های مورد نظر به داخل ژل الکتروفورز تلقیح شد و ژل به دستگاه الکتروفورز (BioRad) انتقال یافت. بعد ازگذشت 40 دقیقه، ژل به منظور مشاهده باند ژن های مورد نظر با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و در دستگاه ترانس ایلومینیتور عکس برداری و مشاهده گردید.

جدول2-1: توالی پرایمر ژن هایqacE و qacEΔ1

پرایمر	Forward	Reverse
qacE	TAA GCC CTA CAC AAA TTG GGA GAT AT	**TTA GTG GGC ACT TTG CTT TGG AAA G**
qacEΔ1	TAA GCC CTA CAC AAA TTG GGA GAT AT	**GCC TCC GCA GCG ACT TCC ACG**

جدول 2-2: مراحل واکنش PCR

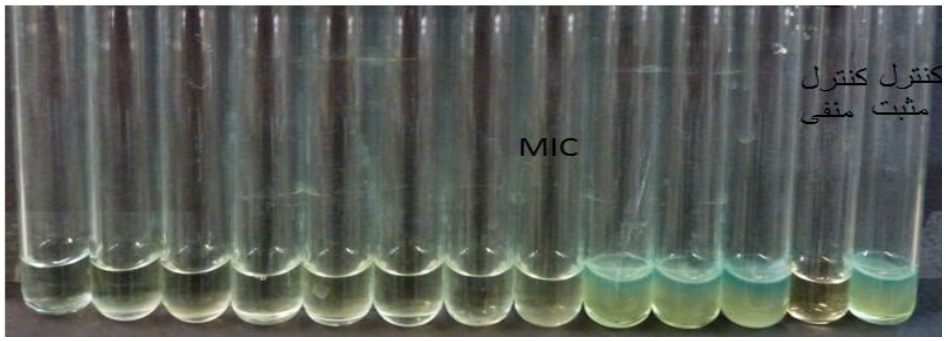
مراحل واکنش		حرارت(درجه سلسیوس)	زمان(ثانیه)
Denaturation	qacE Δ1	95	**300**
		95	**45**
	qacE	95	**300**
		95	**45**
Annealing	qacE Δ1	67/5	**45**
	qacE	62	**45**
Extention	qacE Δ1	72	**30**
	qacE	72	**30**
Final extention	qacE Δ1	72	**600**
	qacE	72	**600**

یافته ها

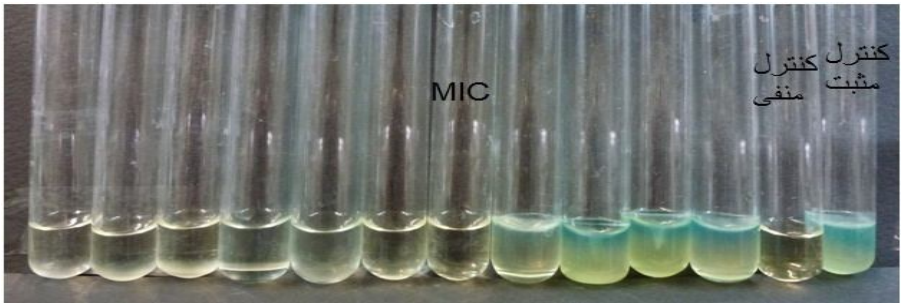
پس از انجام تست های ماکروسکوپی و میکروسکوپی، 85 سویه سودوموناس آئروجینوزا شناسایی شد. این سویه ها در زیر میکروسکوپ باسیل گرم منفی، کاتالاز و اکسیداز مثبت بودند ولی قادر به تخمیر قندها در محیط TSI نبودند. دارای حرکت در محیط SIM و فاقد قدرت تولید اندول و H_2S بودند. واکنش سیمون- سیترات آنها مثبت، تست اوره مثبت، واکنش MRVP آنها منفی، اورنتین دکربوکسیلاز منفی و آرژنین دکربوکسیلاز آنها مثبت بود.

نتایج بدست آمده از ماکرودیلوشن براث نشان داد که 63% از سویه ها دارای MIC بین $70\mu g/ml$-30 و 37% سویه ها MIC بالاتر و بین $312\mu g/ml$-156 داشتند. در شکل های 3-1 و 3-2 سنجش مقاومت سویه های سودوموناس آئروجینوزا به ماده بیوسایدی به روش ماکرودیلوشن براث نشان داده شده است.

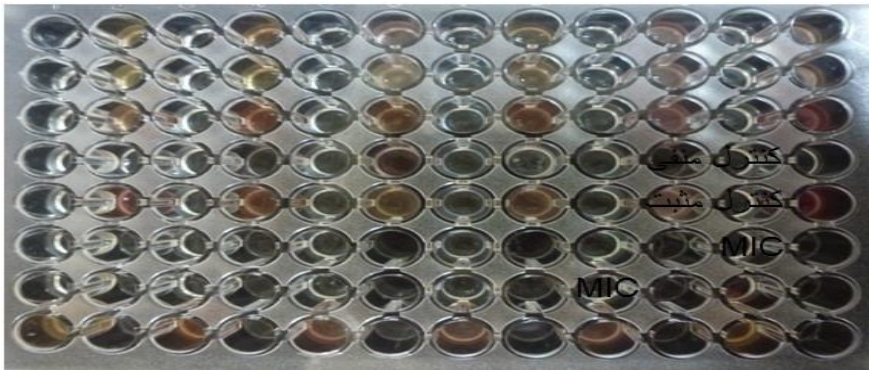
نتایج بدست آمده از روش میکرودیلوشن براث نیز نشان داد که 63 % سویه ها حساس و دارای MIC، $70\mu g/ml$ و37% سویه ها مقاوم و دارای MIC، $156\ \mu g/ml$هستند. بین نتایج بدست آمده از این دو روش تشابه معنی داری وجود داشت. در شکل3-3 سنجش مقاومت سویه های سودوموناس آئروجینوزا به ماده بیوسایدی به روش میکرودیلوشن براث نشان داده شده است. نتایج بدست آمده برای سویه استاندارد سودوموناس آئروجینوزا ATCC27853 نشان داد که این سویه دارای MIC در حدود $70\mu g/ml$ می باشد که مشابه MIC تعیین شده برای 63% از باکتری های جداسازی شده بودند.



شکل 3- 1: سنجش حساسیت سویه سودوموناس آئروجینوزا با حساسیت بیشتر به ماده بیوسایدی (دکونکس) به روش ماکرودیلوشن براث

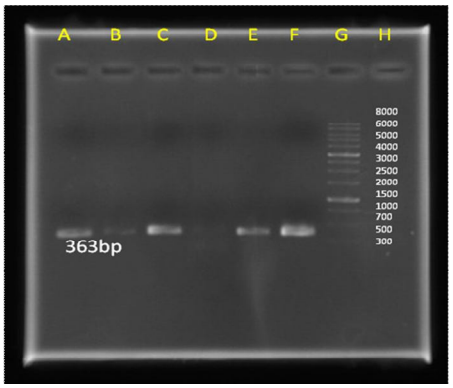


شکل 3-2: سنجش حساسیت سویه سودوموناس آئروجینوزا مقاوم به ماده بیوسایدی (دکونکس) به روش ماکرودیلوشن براث



شکل 3-3: سنجش حساسیت باکتری سودوموناس آئروجینوزا به ماده بیوسایدی (دکونکس) به روش میکرودیلوشن براث در حضور ماده رنگزا TTC

عمل PCR، که برای بررسی فراوانی ژن های qacE/ qacEΔ1 مقاوم به بیوسایدها، برای 85 سویه جدا سازی شده انجام شد نشان داد که 63 % از سویه های سودوموناس آئروجینوزا که نسبت به ماده بیوسایدی حساس بودند فاقد این دو ژن و 49/9 % سویه های سودوموناس آئروجینوزا که نسبت به ماده بیوسایدی مقاومت نشان دادند حامل ژن qacEΔ1(363bp) هستند. ژن qacE در هیچ یک از سویه های سودوموناس آئروجینوزای جداسازی شده مشاهده نشد. تصویر الکتروفورز باند ژن qacEΔ1 در شکل 3-4 نشان داده شده است.



شکل 3-4: تصویر الکتروفورز باند ژن qacEΔ1

بحث

سودوموناس آئروجینوزا، پاتوژن فرصت طلب انسانی است. این باکتری معمولاً افراد با سیستم ایمنی طبیعی را مورد حمله قرار نمی دهد اما در بیمارانی که نقصی در سیستم ایمنی دارند مانند افرادی که از بیماری هایی مانند سیستیک فیبروزیس ریوی، سرطان و یا ایدز رنج می برند ایجاد بیماری می کند. این باکتری، پاتوژن بسیار مهمی است زیرا اغلب به بیماران بستری در بیمارستان ها حمله کرده و باعث بیماری های خطرناکی در آنها می شود. 40 تا 60 درصد از عفونت های ناشی از سودوموناس آئروجینوزا به مرگ منجر می شود. مهمترین نکته در مورد این باکتری مقاومت بالای آن به مواد ضد میکروبی است (9).

در این بررسی، مقاومت سودوموناس آئروجینوزاهای جمع آوری شده نسبت به ماده بیوسایدی سنجیده و برای سنجش مقاومت از ماده بیوسایدی دکونکس که نوعی ترکیب چهارتایی آمونیوم است استفاده شد. به این منظور MIC سویه ها نسبت به این ترکیب اندازه گیری شد. در این بررسی مشاهده شد که 63 % سویه ها، دارای MIC در حدود 156-312$\mu g/ml$ ،MIC 37% سویه ها حدود 30- 70$\mu g/ml$ بود که MIC نسبتاً بالایی است.

در سال 2000 ، Detmar kucken و همکارانش به بررسی مقاومت سویه های سودوموناس آئروجینوزا نسبت به ترکیبات چهارتایی آمونیوم پرداختند. MIC 89% سویه های آنها ،70$\mu g/ml$ و MIC 11% سویه ها، بیش از 100$\mu g/ml$بود. نتایج بدست آمده توسط این محقق با نتایج بدست آمده در این مطالعه تا حدودی مطابقت دارد (8).

در سال 2007 ، Rungtip Chuanchuen و همکارانش MIC، برخی از باکتری های گرم منفی از جمله سالمونلا را نسبت به ترکیبات چهارتایی آمونیوم تعیین کردند. آنها از سودوموناس آئروجینوزا به عنوان سویه کنترل استفاده نمودند. MIC که آنها برای سالمونلا ها گزارش کردند بین 128-256 $\mu g/ml$ بود (10) که از MIC حاصل از بررسی حاضر (156-312 $\mu g/ml$) کمتر بود. اختلاف جزئی بین نتایج بدست آمده از این تحقیق با نتایج بدست آمده توسط Rungtip Chuanchuen می تواند بدلیل تفاوت در نوع باکتری ها و همچنین تفاوت در نوع ماده بیوسایدی مورد استفاده باشد.

نتایج حاصل از PCR نشان داد که ژن qacEΔ1 در 49/9% سویه ها وجود دارد اما ژن qacE در هیچ یک از سویه ها مشاهده نشد. با اینکه این ژن (qacE) در میان باکتری های گرم منفی دیده شده است و یکی از عوامل مقاومت به ترکیبات چهارتایی آمونیوم بشمار می آید اما سودوموناس آئروجینوزا های بررسی شده ژن qacE را بصورت ژن qacEΔ1 حمل می کنند.

در سال 2000 ، Detmar Kucken و همکارانش به بررسی فراوانی ژن های qacE/qacEΔ1 در میان باکتری های گرم منفی مانند Enterobacter cloacae ، Citrobacter freundii ، Pseudomonas aeruginosa و Stenotrophomonas maltophila پرداختند. نتایج تحقیق آنها حضور ژن qacEΔ1 را با فراوانی 13/5 % در P. aeruginosa ، 9/4% در C. freundii و 8/4% در E. cloacae نشان داد. آنها ژن qacE را تنها در یک سویه از سودوموناس آئروجینوزا مشاهده کردند(8) در صورتی که حضور این ژن در مطالعه انجام شده مشاهده نشد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نتایج بدست آمده توسط این پژوهشگران در سال 2000 مطابقت نسبی داشت.

در سال 2007 ، Rungtip Chuanchuen و همکارانش به مطالعه و بررسی ژنهای qacE/qacEΔ1 در باکتری گرم منفی سالمونلا پرداختند. آنها از سودوموناس آئروجینوزا به عنوان شاهد مثبت برای این ژن ها استفاده کردند. آنها ژن qacEΔ1 را در 27% سویه های سالمونلا مشاهده کردند و ژن qacE را در هیچ یک از سویه ها مشاهده نکردند(10). نتایج بدست آمده از مطالعه انجام شده با مطالعه انجام شده توسط این محققان تا حدودی مطابقت داشت.

در سال 2009 ، Zhenbo Xu و همکارانش به مطالعه و بررسی حضور ژن های qacE/qacEΔ1 در 118 سویه سودوموناس آئروجینوزا پرداختند. آنها در 45/8% سویه ها، وجود ژن qacEΔ1 را مشاهده کردند (11).

نتایج بدست آمده توسط این محققان با نتایج بدست آمده در بررسی انجام شده مطابقت داشت.

در سال 2011 ، Romaoc و همکارانش به مطالعه ژن qacEΔ1 در بین سویه های سودوموناس آئروجینوزا پرداختند. آنها در 46 % سویه ها، مقاومت به ماده ضد میکروبی را مشاهده کردند. آنها همچنین مشاهده کردند که 48% سویه های مقاوم حامل ژن qacEΔ1 هستند. نتایجی که در سال 2011 توسط Romaoc بدست آمد با نتایج بدست آمده در این بررسی همخوانی داشت(1).

افزایش در میزان سودوموناس آئروجینوزا های حامل ژن های qacE و qacEΔ1 در مطالعات انجام شده توسط Detmar kucken (13/5%)، Rungtip Chuanchuen (27%)، Zenbo xu (45/8%) و Romaoc (48%) و بررسی حاضر (49/9%) می تواند به دلیل استفاده بیشتر از ترکیبات بیوسایدی برای افزایش سطح بهداشت و القاء هر چه بیشتر این ژن ها در باکتری ها و ایجاد مقاومت در آنها در طی این سالها باشد.

نتیجه گیری

با توجه به مقاومت زیاد این باکتری به بسیاری از آنتی بیوتیک ها و همچنین افزایش مقاومت به مواد بیوسایدی درمان عفونت های ناشی از سودوموناس آئروجینوزا امروزه با مشکل جدی مواجه شده است. از این رو استفاده از ترکیبات بیوسایدی بطور صحیح و در غلظت های توصیه شده توسط شرکت های تولید کننده و همچنین خودداری از مصرف بی رویه از این ترکیبات ضروری بنظر می رسد.

REFERENCES

1. Celia Romao, Catia Aparecida Miranda, Jaqueline Silva, Maysa Mandetta Clementino, Ivano de Flippis, Marise Asenis, Presence of qacEΔ1 gene and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa resistant to antibiotics, Curr Microbiol, 2011 April; 63(1): 16-21.

2. He Yan, Lei Shi, Shinji Yamasaki, Xinhui Li, Yicheng Cao, Lin li, A plasmidic class 1 integron from five Pseudomonas aeruginosa clinical strains harbored aacA4 and nonsense- mutated cmlA1 genes cassettes, Journal of health science, 2007 October; 53(6): 750-755.

3.Adel K. K., Sabiha S. S., Genetic site determination of antibiotic resistance genes in Pseudomonas aeruginosa by genetic transformation, British journal of pharmacology and toxicology, 2010 November; 1(2): 85-89.

4.Celia Maria Carvalho Pereira Araujo Romao, Yaisa Naziozeno de Faria, Luciana Roberto Pereira, Marise Dutra Asensi, Susceptibility of clinical isolates of multiresistance Pseudomonas aeruginosa to a hospital disinfectant and molecular typing, Mem inst Oswaldo cruz, 2005 Agust; 100(5): 541-548.

5.Loughlin M. F., Jones M. V., Lambert, P. A. Pseudomonas aeruginosa cells adaption to benzalkonium choloride show resistance to other memberance active agents but to clinically relevant antibiotics, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2002; 49: 631-639.

6. Poole k., Mechanism of bacterial biocide and antibiotic resistance, Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement, 2002; 92: 55-64.

7.Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA, Proton- dependent multidrug efflux systems, Microbiological, 1996 December; 60(4): 575- 608.

8. Detmar Kucken, Heinz Feuct, Paul-mMicheal Kaulfers, Assocation of qacE and qacEΔ1 with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria, Elsivier science, 2000 December; 183: 95-98.

9. Jeffrey B. Lyczak, Carolyn L. Cannon, Gerald B. Pier, Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lesson from a versatile opportunist, Microbes and Infection, 2000; 2(9): 1051-1060.

10. Rungtip Chuanchuen, sirintip Khemtong, Pawin Padungtod, Occurrence of qacE/qacEΔ1 genes and their correlation with class 1 integrons in Salmonella enteric isolates from poultry and swine, Southeast Asian J trop med public health, 2007 september; 38(5): 855-862.

11. Zhenbo Xu, Lin Li, Mark E. Shirtliff, Alam M. J., Shinji Yamasaki, Lei Shi, Occurrence and characteristics of class 1 and class 2 Integrons in Pseudomons aeruginosa isolates from patients in southern China, Journal of clinical Microbiology, 2009 January; 47(1): 230-234