مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره نوزدهم، شماره ۴، فروردین ۱۳۹۶، صفحه ۵۳-۴۶

شناسایی مولکولی ژن های کروم سنسینگ در سویه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

زهرا صالحی (MSc)[۱]، کیومرث امینی (PhD)[۲*]، بابک خیرخواه (PhD)[۳]

۱-گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی
۲-گروه میکروبیولوژی، دانشکده کشاورزی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی
۳-گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی

دریافت: ۹۵/۶/۱۲، اصلاح: ۹۵/۹/۶، پذیرش: ۹۵/۱۲/۴

خلاصه

سابقه و هدف: بیان اکثر ژن های تولید کننده فاکتورهای بیماریزای *سودوموناس آئروژینوزا* به وسیله یک سیستم ژنی به نام سیستم Quorum Sensing (QS) کنترل و تنظیم می گردند. کروم سنسینگ سیستم ارتباطی سلول به سلول با استفاده از مولکول های سیگنالینگ کوچک در ارگانیسم های تک سلولی است. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن های *lasB, rhlR, rhlI, lasR, lasI, apr* و *rhlAB* *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه های بالینی با استفاده از روش multiplex-PCR و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، ۶۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی شهر تهران جمع آوری گردید. حساسیت آنتی بیوتیکی این ایزوله ها نسبت به سفتازیدیم، سفوتاکسیم، آموکسی سیلین، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، جنتامایسین، ایمی پنم، سفپیم، تیکارسیلین و پیپراسیلین با روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. پس از کشت و تایید نهایی با استفاده از تست های بیوشیمیایی و اختصاصی واکنش زنجیره ای پلیمراز Multiplex PCR برای ردیابی ژن های مورد نظر انجام گرفت.

یافته‌ها: بیشترین حساسیت به سیپروفلوکساسین (۸۱/۶۶٪) و سفتازیدیم (۶۵٪) مشاهده شد. Multiplex PCR نشان داد که میزان فراوانی ژن های *rhlR* ، *lasR* و *lasI* به ترتیب برابر ۵٪، ۴۸/۳٪ و ۶۰٪ بود، در صورتی که ژن های *lasB* ، *apr*، *rhlAB* و *rhlI* در هیچ یک از سویه ها شناسایی نگردیدند.

نتیجه گیری: مقاومت به آنتی بیوتیک ها در سودوموناس آئروژینوزا رو به افزایش است و نظارت مستمر الزامی می باشد. سیستم QS نقش مهمی در پاتوژنیسیته *سودوموناس آئروژینوزا* دارد. شناسایی این ژن ها در ردیابی و شناسای سریع این باکتری موثر می باشند.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، کروم سنسینگ، مقاومت آنتی بیوتیکی.

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی غیر تخمیری است که در خاک، آب و دیگر محیط های مرطوب و حتی روی سطح بدن انسان یافت می‌شود (۱). این ارگانیسم یک پاتوژن فرصت طلب است و به ندرت در میزبان سالم عامل بیماری می باشد اما می تواند به عنوان عاملی برای عفونت های مجاری ادراری، سیستم تنفسی، التهاب و آماس پوست، عفونت های بافت نرم، باکتریمی (وجود باکتری در خون)، عفونت های استخوان و مفاصل، عفونت های معدی-روده ای و عفونت های سیستمیک به ویژه در بیماران با سوختگی های شدید، بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس، سرطان و ایدز که سیستم ایمنی آنها سرکوب شده است، باشند(۴-۲). این باکتری دارای فاکتورهای پاتوژنی متعددی از جمله اگزو توکسینA، آلژینات، لیپو پلی ساکارید، پیلی، فسفو لیپاز C، الاستاز و الکالن پروتئاز می باشد. مطالعات نشان داده است بیان اکثر ژن های تولید کننده فاکتورهای بیماریزای باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به وسیله یک سیستم ژنی به نام سیستم Quorum Sensing (QS) کنترل و تنظیم می گردند. کروم سنسینگ سیستم ارتباطی سلول به سلول با استفاده از مولکول‌های کوچک SMs در ارگانیسم های تک سلولی است که از طریق ترشح مولکولهای ارتباطی به داخل محیط و سپس اتصال آن ها به پروتئین های گیرنده عمل میکند و بنابراین بطور مستقیم یا غیرمستقیم رونویسی و ترجمه را تحت تاثیر قرار داده و اطلاعات را مبادله می کنند(۷-۵). در این باکتری سیستم QS از ۲ سیستم ژنی *LasR-LasI* و *RhlR-RhlI* تشکیل شده است، ژن های *LasI* و *RhlI* بیان کننده دو آنزیم acyl-hemoserine lactone (acyl-HSL) سنتتاز می باشند، در حالی که ژن های *LasR* و *RhlR* تولیدکننده پروتئین های تنظیم کننده رونویسی می باشند که با اتصال به سیگنال اختصاصی خود سبب فعال سازی ژن های هدف (بیماریزا) می شوند(۹و۸). سیستم QS در دیگر گونه های *سودوموناس* نیز وجود دارد، اما تعداد و توالی ژن های تشکیل دهنده آنها متفاوت می باشد. ژنهای زیادی در *سودوموناس آئروژینوزا* توسط کروم سنسینگ کنترل و بیان می شوند که حتی در بیماری زائی این باکتری نقش دارند که می توان به

این مقاله حاصل پایان نامه زهرا صالحی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر کیومرث امینی
آدرس: ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، دانشکده کشاورزی، گروه میکروبیولوژی. تلفن:۰۸۶-۴۲۴۳۳۳۴۲
E-mail: kamini@iau-saveh.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.4.6.3]
[DOI: 10.22088/jbums.19.4.46]

ژنهای *lasI, lasR, rhlI, rhlR* و ژن‌های کنترل شده ای به نام های *lasB*، *apr* و *rhlAB* در ایزوله های بالینی توسط واکنش زنجیره پلی مراز (PCR) اشاره کرد (۱۱و۱۰). از نقش های مهم کروم سنسینگ تولید بیوفیلم است که یک پلی ساکارید خارج سلولی بوده و به مزمن شدن بیماری کمک می‌کنند. همچنین سبب عود عفونت، مزمن شدن، عدم نفوذ دارو به درون ماتریکس خارج سلولی، طول مدت بستری شدن بیماران، هزینه طولانی مدت و شکست درمانی می شود(۱۲). عفونت های زخم ناشی از ارگانیسم های مولد بیوفیلم منبع مناسبی برای گسترش ژن های مقاومتی و ورود ارگانیسم به خون و ایجاد عفونت خونی (BSI) می باشند. در مطالعه GhanbarzadehCorehtash و همکاران از میان تمامی ۱۴۴ سویه تحت مطالعه ۷۵٪ ژن *exoA* و ۱۱/۵٪ دارای ژن *nan1* بودند. آنها دریافتند که میزان بالای مقاومت آنتی بیوتیکی در *سودوموناس آئروژینوزا* (MDRPA) و توانایی تشکیل بیوفیلم بعنوان یک زنگ هشدار در سیستم سلامت می باشد(۱۳). بنابراین با توجه به اهمیت سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* در بالین و مقاومت بالای این ارگانیسم ها، این مطالعه به منظور شناسایی مولکولی ژن های کروم سنسینگ در سویه های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* و تعیین پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی این سویه ها انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری سویه های باکتریایی: در این مطالعه مقطعی که به فاصله ۶ ماه در سال ۱۳۹۵ انجام گردید (از ابتدای خرداد تا انتهای آبان) تعداد ۶۰ نمونه غیرتکراری *سودوموناس آئروژینوزا* از نمونه های مختلف شامل خون، ادرار، ترشحات تنفسی، تراشه، لاواژ برونکوآلوئولار (BAL)، خلط و زخم سوختگی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان حضرت امام خمینی شهر تهران جمع آوری گردید و به آزمایشگاه میکروب شناسی انتقال داده شد. به منظور شناسایی ارگانیسم از آزمون های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی نظیر رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، تست سیمون سیترات، تولید H_2S، رشد در ۴۴ درجه سلسیوس، تولید پیگمان، Triple Sugar Iron(TSI)، دکربوکسیلاسیون اورنیتین، DNase و تست اکسیداسیون–تخمیر (OF) استفاده شد. در این مطالعه از سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی: آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش انتشار از دیسک و مطابق با استاندارد انستیتو آزمایشگاه و بالین (CLSI) بر روی محیط مولر هینتون آگار (شرکت Merck، Germany) انجام گردید. از کشت چمنی سوسپانسیون باکتریایی معادل ۰/۵ مک فارلند بر روی محیط مولر هینتون آگار و دیسک های آنتی بیوتیکی محصول شرکت MAST انگلستان و شامل؛ سفتازیدیم، سفوتاکسیم، آموکسی سیلین، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، جنتامایسین، ایمی پنم، سفپیم، تیکارسیلین و پیپراسیلین استفاده شد. پس از گرمخانه گذاری به مدت ۲۴–۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قطر هاله عدم رشد به وسیله کولیس اندازه گیری شد و نتایج آن با توجه به استانداردهای CLSI و به صورت مقاوم (Resistant (R))، نیمه حساس ((I) Intermediate) و حساس (Sensitive (S)) گزارش شد (۱۴).

واکنش زنجیره ای پلیمراز: استخراج DNA با استفاده از روش جوشاندن (Boiling) انجام شد(۱۵). در این روش یک لوپ باکتری را در محلول TE (۱۰ میلی مولار تریس به همراه ۱ میلی مولار EDTA با PH=7/5) به صورت سوسپانسیون در آورده و این سوسپانسیون را به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و در مرحله بعد بقایای سلولی و باکتریایی (Debris) توسط عمل سانتریفوژ رسوب داده شد. مایع رویی حاوی DNA به ویال دیگری منتقل گردید. غلظت میزان خلوص DNA توسط اسپکتروفتومتر (۲–۱/۸=$OD_{260/280}$) اندازه گیری شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۵ میکرولیتر $Mgcl_2$ با غلظت ۱۰۰mm، ۰/۵ میکرولیتر dNTP با غلظت ۲۰ mm، ۱ میکرولیتر از غلظت ۱۰ pmol از هر یک از آغازگرها (جدول۱)، یک واحد آنزیم Taq polymerase و یک میکرولیتر از DNA ژنومی که با آب مقطر دو بار تقطیر (Nuclease Free) به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. واکنش زنجیره ای پلیمراز در دستگاه ترمال سایکلر (اپندورف، آلمان) در دمای واسرشت اولیه (دناتوراسیون اولیه) ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، مرحله باز شدن دو رشته ۹۴°C به مدت ۱دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای اتصال ۵۲ °C به مدت ۱ دقیقه و پلیمریزاسیون در۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت مرحله طویل شدن نهایی در ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه تکثیر یافت. پس از انجام PCR، ژل آگارز ۱/۲٪ جهت الکتروفورز محصولات PCR مورد استفاده قرار گرفت و قطعات ژنی با استفاده از ۱۰۰bp DNA size marker (سیناکلون، ایران) ارزیابی شد (۱۰).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای بررسی ژن های کروم سنسینگ در *سودوموناس آئروژینوزا*

نام ژن	سکانس	طول پرایمر	دمای اتصال پرایمر	اندازه محصول PCR	رفرنس
lasB-F	5′ -TTCTACCCGAAGGACTGATAC- 3′	۲۱	۵۲ °C	۱۵۳	(۱۰و۱۶)
lasB-R	5′ -AACACCCATGATCGCAAC - 3′	۱۸			
aprA-F	5′ -ACCCTGTCCTATTCGTTCC - 3′	۱۹	۵۲ °C	۱۴۰	
aprA-R	5′ -GATTGCAGCGACAACTTGG - 3′	۱۹			
rhlAB-F	5′ -TCATGGAATTGTCACAACCGC - 3′	۲۱	۵۲ °C	۱۵۱	
rhlAB-R	5′ -ATACGGCAAAATCATGGCAAC - 3′	۲۱			
lasI-F	5′ -CGTGCTCAAGTGTTCAAGG - 3′	۱۹	۵۲ °C	۶۰۷	
lasI-R	5′ -TACAGTCGGAAAAGCCCAG- 3′	۱۹			
lasR-F	5′ -AAGTGGAAAATTGGAGTGGAG - 3′	۲۱	۵۲ °C	۷۲۶	
lasR-R	5′ -GTAGTTGCCGACGACGATGAAG - 3′	۱۹			
rhlI-F	5′ -TTCATCCTCCTTTAGTCTTCCC - 3′	۲۲	۵۲ °C	۱۵۵	
rhlI-R	5′ -TTCCAGCGATTCAGAGAGC - 3′	۱۹			
rhlR-F	5′ -TGCATTTTATCGATCAGGGC - 3′	۲۰	۵۲ °C	۱۶۶۱	
rhlR-R	5′ -CACTTCCTTTTCCAGGACG- 3′	۱۹			

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.4.6.3]
[DOI: 10.22088/jbums.19.4.46]

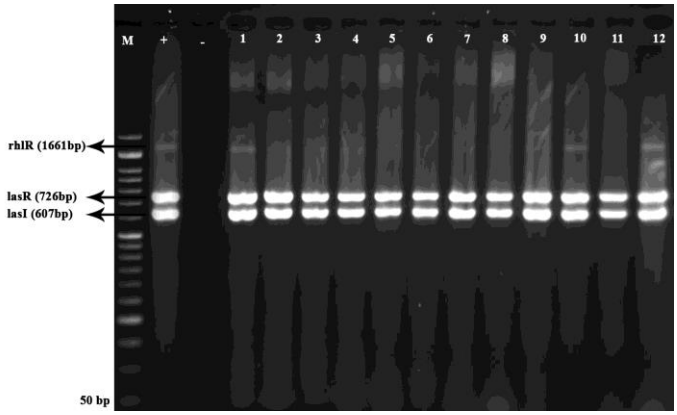
یافته ها

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به دست آمده از روش دیسک دیفیوژن سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد که بیشترین درصد مقاومت، مربوط به آموکسی سیلین، آمیکاسین و سفپیم با میزان ۱۰۰٪ و کمترین آن متعلق به سیپروفلوکساسین ۱۳/۳۴٪ و سفتازیدیم ۳۵ ٪ می باشد (جدول ۲).

جدول ۲. الگوی حساسیتی سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* به روش دیسک دیفیوژن

آنتی بیوتیک	حساس تعداد(درصد)	بینابینی تعداد(درصد)	مقاوم تعداد(درصد)
سفوتاکسیم	۷(۱۱/۶)	-(-)	۵۳(۸۸/۳۴)
سفتازیدیم	۳۹(۶۵)	-(-)	۲۱(۳۵)
آموکسی سیلین	-(-)	-(-)	۶۰(۱۰۰)
سیپروفلوکساسین	۴۹(۸۱/۶۶)	۳(۵)	۸(۱۳/۳۴)
آمیکاسین	-(-)	-(-)	۶۰(۱۰۰)
جنتامایسین	۲۷(۴۵)	۴(۶/۶۶)	۲۹(۴۸/۳۴)
ایمی پنم	۶(۱۰)	۱۱(۱۸/۳۴)	۴۳(۷۱/۶۶)
سفپیم	-(-)	-(-)	۶۰(۱۰۰)
تیکارسیلین	۵(۶/۶۶)	۲(۳/۳۴)	۵۴(۹۰)
پیپراسیلین	۶(۱۰)	۲(۳/۳۴)	۵۲(۸۶/۶۶)

بررسی این الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی نشان دهنده میزان بالای مقاومت سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده در مورد همه آنتی بیوتیک ها بود. همچنین مشاهده شد که از ۶۰ سویه مورد بررسی، ۳۹ سویه (۶۵٪) هم زمان به بیش از چهار آنتی بیوتیک مقاوم بودند. تنها ۸ سویه (۱۳/۳۳٪) به تمام آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی حساسیت و ۷ سویه (۱۱/۶۶٪) مقاومت را نشان دادند. بیشترین مقاومت بینابینی نسبت به آنتی بیوتیک های ایمی پنم ۱۱ (۱۸/۳۴٪) و سفپیم ۸ (۱۳/۳۴٪) مشاهده شد. نتایج مولکولی نشان داد از میان ژن های مورد بررسی تنها ۳ ژن *lasI*، *rhlR* و *LasR* در ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا* مثبت بوده است. طول باند ناحیه تکثیری ژن های *lasI*، *LasR* و *rhlR* به ترتیب ۶۰۷ bp، ۷۲۶bp و ۱۶۶۱ bp بوده است (شکل ۱).



شکل۱. نتایج واکنش PCR برای شناسایی ژن های کروم سنسینگ، ردیف ۱-مارکر ۵۰ bp، ردیف ۲- کنترل مثبت، ردیف ۳ -کنترل منفی، ردیف های ۱۲-۱ نمونه های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* واجد ژن های *lasI* و *LasR* با طول باند ۶۰۷ bp و ۷۲۶ bp، ردیف های ۱ تا ۱۰ و ۱۲ واجد ژن *rhlR* با طول باند ۱۶۶۱ bp

بیشترین فراوانی ژنی متعلق به ژن *lasI* در ۳۶ سویه (۶۰٪) مشاهده شده است. سپس در ژن LasR، ۲۹ سویه (۴۸/۳٪) و rhlR در ۳ سویه (۵٪) مشاهده شد. بقیه موارد ژنی مشاهده نشد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی ۶۰ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه های بالینی مطالعه حاضر نشان داد که میزان مقاومت نسبت به آمیکاسین، آموکسی سیلین و سفپیم (۱۰۰٪)، تیکارسیلین (۹۰٪)، سفوتاکسیم (۸۸/۳۴٪)،پیپراسیلین (۸۶/۶۶٪)، ایمی پنم (۷۱/۶۶٪)، جنتامایسین (۴۸/۳۴٪)، سفتازیدیم (۳۵٪)، و سیپروفلوکساسین (۱۳/۳۴٪) بوده است. بررسی نتایج الگوی مقاومت سویه های *سودوموناس آئروژینوزای* به دست آمده از بیماران مطالعه حاضر، نشان دهنده میزان مقاومت بالای سویه ها در مقابل آنتی بیوتیک های درمانی می باشد. در مورد مقاومت دارویی این باکتری، تاکنون مطالعات زیادی انجام گرفته است. تمامی سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* مطالعه حاضر نسبت به سه آنتی بیوتیک آمیکاسین، آموکسی سیلین و سفپیم مقاوم بودند که در مورد آنتی بیوتیک سفپیم با مطالعه Moradian Kouchaksaraei و همکارانشان (۱۷) و در مورد آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین و آمیکاسین با مطالعه Anitha و همکارانشان (۱۸) و Hoque و همکارانشان (۱۹) مطابقت داشته است. این در حالیست که مطالعه انجام شده در ترکیه میزان حساسیت سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* را نسبت به آمیکاسین ۷۳٪ گزارش نمودند (۲۰). مطالعات انجام گرفته میزان مقاومت به تیکارسیلین را در عربستان ۲۲/۳٪ و در ترکیه ۹۳٪ نشان می دهد (۲۱). مقاومت گزارش شده نسبت به سفتازیدیم در فرانسه ۹٪، برزیل ۱۲/۳٪، ترکیه ۲۶٪، ژاپن ۴/۶٪، روسیه ۳۵٪، کانادا ۱۲٪، آمریکا ۱۱/۱٪ و اسپانیا ۱۵٪ گزارش شده است (۲۶-۲۲). میزان مقاومت به تیکارسیلین (۹۰٪) و سفتازیدیم (۵۰٪) در کرمانشاه گزارش شده است (۲۷) که نتایج آن ها با مطالعه حاضر مطابقت دارد.

در مطالعه ای که توسط Nahaei و همکاران انجام شد، میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های سفتازیدیم، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین و ایمی پنم به ترتیب ۶۹٪، ۵۱٪، ۲۲٪، ۱۵٪ و ۲٪ گزارش شده است(۲۸). Taghvaee و همکاران در بین ۱۰۸ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا*، مقاومت به سفتازیدیم (۳۳/۳٪)، ایمی‌پنم(۲۲/۲٪)، آمیکاسین (۲۰/۳٪)، سیپروفلوکساسین (۱۵/۷٪) و جنتامایسین (۱۹/۴٪) به گزارش نمود (۲۹). مطالعه مشابه دیگری که توسط Ranjbar و همکاران انجام شد، میزان مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی شامل سفتازیدیم ۵۷/۵٪، آمیکاسین ۹۰٪، سیپروفلوکساسین ۶۵٪، جنتامایسین ۶۷/۵٪ و ایمیپنم ۹۷/۵٪ بوده است(۳۰).

همچنین در مطالعه ای که توسط Kianpour و همکاران مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفتریاکسون، آمیکاسین، سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین و ایمیپنم به ترتیب به میزان ۸۲/۱۴٪، ۵۷/۱۴٪، ۵۳/۵۷٪، ۴۲/۸۵٪ و ۱۴/۲۸٪ بیان شده است (۳۱). Nakhaei Moghadam و همکاران‌شان، میزان مقاومت پیپراسیلین را ۴۳/۷۵ درصد گزارش نمودند (۳۲) که نتایج آنها با مطالعه حاضر همخوانی نداشت. Doosti و همکاران میزان مقاومت به پیپراسیلین و سفوتاکسیم را به ترتیب ۴۴/۹٪ و ۹۱/۷٪ گزارش نمودند (۳۳). با توجه به مطالعات گذشته می‌توان نتیجه گرفت که میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.4.6.3]
[DOI: 10.22088/jbums.19.4.46]

متفاوت در مورد سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* نسبتاً بالاست؛ که، نتایج آنها بر حسب زمان و مکان جداسازی سویه ها متفاوت است. از طرف دیگر این الگوهای مقاومتی دائماً در حال تغییر می باشند که باید مورد توجه قرار گیرند. علاوه براین، در مطالعه حاضر فراوانی ژن‌های کروم سنسینگ *lasI*، *lasR*، *rhlI*، *rhlR*، *lasB*، *apr* و *rhlAB* در سویه های سودوموناس آئروژینوزا مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. فاکتورهای بیماریزای باکتری سودوموناس آئروژینوزا تحت کنترل یک سیستم ژنی به نام سیستم Quorum Sensing (QS) می باشد.

این سیستم از دو دسته ژن LasR-LasI و RhlR-RhlI تشکیل شده است، ژن های LasI و RhlI بیان کننده دوآنزیم acyl-hemoserine lactone (acyl-HSL) سنتتاز می باشند، در حالی که ژن‌های LasR و RhlR تولیدکننده پروتئین های تنظیم کننده رونویسی می باشند که با اتصال به سیگنال اختصاصی خود سبب فعال سازی ژن‌های هدف (بیماریزا) می شوند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد بیشترین و کم ترین فراوانی ژن به ترتیب متعلق به بوده است. فراوانی ژن‌های مثبت در تمامی سویه‌های مطالعه حاضر *rhlR* (۵٪)، *LasR* (۴۸/۳٪) و *lasI* (۶۰٪) بوده است. از ۳۹ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* واجد مقاومت همزمان به سه آنتی بیوتیک، ۳۶ سویه واجد ژن کروم سنسینگ *lasI* بودند. که از لحاظ آماری ارتباط بین سویه های مقاوم به سه آنتی بیوتیک و بیان ژن *lasI* معنی‌دار بود. در مطالعه ای فراوانی ژن های کروم سنسینگ *lasR*، *lasI*، *rhlR*، *lasII* به ترتیب ۵٪، ۷۸/۳ ٪، ۶۵ ٪ و ۴۳/۳٪ گزارش شد (۳۴). Aghamollaei و همکارانشان فراوانی ژن کروم سنسینگ *lasI* را ۴۸/۵٪ گزارش نمودند (۳۵). در مطالعه Senturk و همکارانشان، ۴ ایزوله واجد ژن های *lasR*، *lasI*، *rhlR* و *rhlI* بودند. یکی از ایزوله ها فاقد ژن *lasR* و یک ایزوله برای سه ژن *lasR*، *lasI* و *rhlR* منفی گزارش شده است (۳۶). نقص در تولید ژن‌های کروم سنسینگ می تواند به دلیل تولید آنزیم های خارج سلولی باشد که منجر به تجزیه ژن های کد کننده کروم سنسینگ باشد(۳۶). یکی دیگر از دلایل تفاوت در بیان ژن های کروم سنسینگ ممکن است بدلیل وقایع موتاسیون نقطه ای در ژنهای کدکننده سیستم کروم سنسینگ باشد. Bjarnsholt و همکاران شان دریافتند که افزایش موتاسیون در ژن های کروم سنسینگ منجر به نقص عملکردی ژن های *lasR* و *rhlR* شده است (۳۷). حضور چندین سویه از *سودوموناس آئروژینوزا* در محل عفونت ممکن است منجر به نقص در بیان ژن‌های سیستم کروم سنسینگ شود (۳۶). علت این تفاوت در بیان ژن های کروم سنسینگ و تعیین ارتباط آن با مقاومت دارویی در ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا* نیازمند تحقیقات بیشتری در آینده می باشد.

به دلیل حضور ژن های مختلف بیماریزا در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و به دلیل نقش اصلی و مهم ژن های کروم سنسینگ، فراوانی این ژن ها به خوبی مشخص نشده و در مطالعات مختلف از سراسر دنیا متفاوت گزارش شده است. در تحقیق حاضر نیز بیشترین فراوانی مربوط به ژن *lasI* با ۶۰ درصد و *lasR* با ۴۸/۳ درصد گزارش شد. می توان نتیجه گرفت که سیستم QS نقش مهمی در پاتوژنیسیته باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* داشته است. از طرفی فراوانی این ژن‌ها بیشتر در ایزوله های بالینی همزمان مقاوم به سه آنتی بیوتیک مشاهده شده است. تعیین ارتباط میان این ژن ها و مقاومت دارویی نیازمند تحقیقات بیشتری می‌باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مسئولین و کارکنان گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان و آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد جهت همکاری در این تحقیق، تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.4.6.3]
[DOI: 10.22088/jbums.19.4.46]

Molecular Identification of Quorum Sensing Genes in Clinical Strains of Pseudomonas aeruginosa and Antibiotic Resistance Profile

Z. Salehi (MSc)[1], K. Amini (PhD)*[2], B. Kheirkhah (PhD)[3]

1.Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, I.R.Iran
2.Department of Microbiology, Faculty of Agriculture, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I.R.Iran
3.Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(4); Apr 2017; PP: 46-53
Received: Sep 2th 2016, Revised: Nov 26th 2016, Accepted: Feb 22th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: The expression of most genes that produce Pseudomonas aeruginosa virulence factors is controlled and regulated by a gene system called quorum sensing (QS) system. Quorum sensing is a cell to cell communication system through small signaling molecules in single-celled organisms. This study aims to investigate the frequency of *Pseudomonas aeruginosa lasB, rhlR, rhlI, lasR, lasI, apr* and *rhlAB* genes isolated from clinical samples using multiplex-PCR method and determining the antibiotic resistance profile.

METHODS: In this cross-sectional study, 60 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were collected from patients admitted to Imam Khomeini hospital in Tehran. The antibiotic susceptibility of these isolates against ceftazidime, cefotaxime, amoxicillin, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, imipenem, cefepime, ticarcillin and piperacillin was determined using disk diffusion method. After culturing and final confirmation using biochemical and specific tests, multiplex polymerase chain reaction (Multiplex PCR) was performed to track the intended genes.

FINDINGS: In this study, highest susceptibility was observed to be against ciprofloxacin (81.66%) and ceftazidime (65%). Multiplex PCR demonstrated that the frequency of *rhlR, lasR* and *lasI* genes was 5%, 48.3% and 60%, respectively, while *rhlI, lasB, apr* and *rhlAB* genes could not be identified in any of the strains.

CONCLUSION: Resistance to antibiotics is increasing in *Pseudomonas aeruginosa*, which requires continuous monitoring. QS System plays a key role in pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. Identification of these genes enables us to track and identify this bacterium quickly.

KEY WORDS: *Pseudomonas aeruginosa, Quorum sensing, Antibiotic resistance*.

Please cite this article as follows:
Salehi Z, Amini K, Kheirkhah B. Molecular Identification of Quorum Sensing Genes in Clinical Strains of Pseudomonas aeruginosa and Antibiotic Resistance Profile. J Babol Univ Med Sci. 2017; 19(4):46-53.

***Corresponding author: K. Amini (PhD)**
Address: Department of Microbiology, Faculty of Agriculture, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
Tel: +98 86 42433342
E-mail: kamini@iau-saveh.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.4.6.3]
[DOI: 10.22088/jbums.19.4.46]

References

1.Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of pseudomonas aeruginosa to antimicrobials. Low-dose antibiotics: current status and outlook for the future. 2014:30. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00422/full

2.Mogayzel PJ, Naureckas ET, Robinson KA, Mueller G, Hadjiliadis D, Hoag JB, et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. Am J Resp Crit Care Med. 2013;187(7):680-9.

3.Workentine ML, Sibley CD, Glezerson B, Purighalla S, Norgaard-Gron JC, Parkins MD, et al. Phenotypic heterogeneity of Pseudomonas aeruginosa populations in a cystic fibrosis patient. PloS One. 2013;8(4):60225.

4.Behrends V, Ryall B, Zlosnik J, Speert D, Bundy J, Williams H. Metabolic adaptations of Pseudomonas aeruginosa during cystic fibrosis chronic lung infections. Environ Microbiol. 2013;15(2):398-408.

5.Cornforth DM, Popat R, McNally L, Gurney J, Scott-Phillips TC, Ivens A, et al. Combinatorial quorum sensing allows bacteria to resolve their social and physical environment. Proc Nat Acad Sci. 2014;111(11):4280-4.

6.Lu C, Maurer CK, Kirsch B, Steinbach A, Hartmann RW. Overcoming the unexpected functional inversion of a PqsR antagonist in pseudomonas aeruginosa: an in vivo potent antivirulence agent targeting pqs quorum sensing. Angew Chem Int Ed Engl. 2014;126(4):1127-30.

7.Rampioni G, Schuster M, Greenberg EP, Bertani I, Grasso M, Venturi V, et al. RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in pseudomonas aeruginosa. Mol Microbiol. 2007;66(6):1557-65.

8.Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg E. Identification, timing, and signal specificity of Pseudomonas aeruginosa quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. J Bacteriol. 2003;185(7):2066-79.

9.Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R. Pseudomonas aeruginosa biofilm: potential therapeutic targets. Biologicals. 2014;42(1):1-7.

10.Zhu H, Bandara R, Conibear TC, Thuruthyil SJ, Rice SA, Kjelleberg S, et al. Pseudomonas aeruginosa with lasI quorum-sensing deficiency during corneal infection. Inves Ophthalmol Visual Sci. 2004;45(6):1897-903.

11.Smith RS, Harris SG, Phipps R, Iglewski B. The Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. J Bacteriol. 2002;184(4):1132-9.

12.Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. Ann Rev Microbiol. 2001;55(1):165-99.

13.Corehtash ZG, Ahmad Khorshidi FF, Akbari H, Aznaveh AM. Biofilm Formation and Virulence Factors Among Pseudomonas aeruginosa Isolated From Burn Patients. Jundishapur J Microbiol. 2015;8(10):22345.

14.Varaiya A, Kulkarni N, Kulkarni M, Bhalekar P, Dogra J. Incidence of metallo beta lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in ICU patients. India J Med Res. 2008;127(4):398.

15.Holmes DS, Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Ana Biochem. 1981;114(1):193-7.

16.Perez LRR, Machado ABMP, Barth AL. The presence of quorum-sensing genes in Pseudomonas isolates infecting cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. Curr Microbiol. 2013;66(4):418-20.

17.Moradian KF, Ferdosi SE, Molana Z, Moradian KM, Asgharpour F, Mojtahedi A, et al. Molecular detection of integron genes and pattern of antibiotic resistance in pseudomonas aeruginosa strains isolated from intensive care unit, shahid beheshti hospital, north of iran. Inter J Molecul Cellul Med. 2011;1(4):209-17.[In Persian].

18.Anitha M, Monisha D, Sulthan AM, Pratikshia K, Swathy S. The Frequency of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates in a tertiary care hospital. Int J Pure App Biosci. 2016;4(3):154-9.

19.Hoque MM, Ahmad M, Khisa S, Uddin MN, Jesmine R. Antibiotic Resistance Pattern in Pseudomonas Aeruginosa Isolated from Different Clinical Specimens. J Arm Force Med College Bangladesh. 2016;11(1):45-9.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.4.6.3]
[DOI: 10.22088/jbums.19.4.46]

20.Gençer S, Ak Ö, Benzonana N, Batırel A, Özer S. Susceptibility patterns and cross resistances of antibiotics against Pseudomonas aeruginosa in a teaching hospital of Turkey. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2002;1(1):2.

21.Dash M, Padhi S, Narasimham MV, Pattnaik S. Antimicrobial resistance pattern of Pseudomonas aeruginosa isolated from various clinical samples in a tertiary care hospital, South Odisha, India. Saudi J Health Sci. 2014;3(1):15-9.

22.Shawar RM, MacLeod DL, Garber RL, Burns JL, Stapp JR, Clausen CR, et al. Activities of tobramycin and six other antibiotics against Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis. Antimicrob Agent Chemother. 1999;43(12):2877-80.

23.Karakoç B, Gerçeker AA. In-vitro activities of various antibiotics, alone and in combination with amikacin against Pseudomonas aeruginosa. Inter J Antimicrob Agent. 2001;18(6):567-70.

24.Lari AR, Honar HB, Alaghehbandan R. Pseudomonas infections in tohid burn center, Iran. Burns. 1998; 24(7):637-41.

25.Kato K, Iwai S, Kumasaka K, Horikoshi A, Inada S, Inamatsu T, et al. Survey of antibiotic resistance in pseudomonas aeruginosa by the tokyo johoku association of pseudomonas studies. J Infect Chemoth. 2001;7(4):258-62.

26.Niitsuma K, Saitoh M, Kojimabara M, Kashiwabara N, Aoki T, Tomizawa M, et al. Antimicrobial susceptibility of pseudomonas aeruginosa isolated in fukushima prefecture. Japan J Antibio. 2001;54(2):79-87.

27.Mohajeri P. Determine the sensitivity and antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from different clinical specimens in patients admitted to hospital in Kermanshah. J Kermanshah Univ Med Sci. 2004;7(4):11-20. [In Persian].Available from: http://fa.journals.sid.ir/ViewPaper.aspx?ID=6375

28.Nahaei M, Bohloli Khiavi R, Asgarzadeh M, Hasani A, Sadeghi J, Akbari Dibavar M. Antibiotic resistance and plasmid profiles of pseudomonas aeruginosa strains isolated from in-patients of Sina Hospital-Tabriz. J Ardabil Uni Med Sci. 2007;7(1):90-8.[In Persian].

29.Taghvaee R, Shojapour M, Sadeghi A, Pourbabaie AA. The Study of Antibiotic Resistance Pattern and the Frequency of Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) in Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Medical Centers in Arak City, Iran. Qom Univ Med Sci J. 2013;7(4):36-41. [In Persian].

30.Ranjbar R, Owlia P, Saderi H, Mansouri S, Jonaidi-Jafari N, Izadi M, et al. Characterization of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burned patients hospitalized in a major burn center in Tehran, Iran. Acta Medica Iranica. 2011;49(10):675.

31.Kianpour F, Havaei SA, Hosseini MM. Evaluation of Pseudomonas Aeroginosa Isolated from Cutaneous Infections and Determination of Drug Resistance Pattern in Patients of Alzahra Hospital in Esfahan. J Isfahan Med School. 2010;28(110):503-9.[In Persian].

32.Nakhaei Moghaddam M, Hosseini Hasanabady M, Mobaiyen H. Evaluation of Antibiotic Resistance and Detection of CTX-M Type Extended Spectrum Beta-lactamase in Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa in Mashhad. J Ilam Univ Med Sci. 2014;22(5):70-7.[In Persian].

33.Doosti M, Ramazani A, Hajojagh Faghihi M. Isolation and assessment of phenotypic and genotypic characteristics of metallo-β-lactamase genes in Pseudomonas aueroginosa strains isolated from clinical samples at Vali-e-Asr Hospital in Zanjan province. Sci J Kurdistan Univ Med Sci. 2013;18(2):97-105.[In Persian].

34.Kadhim D, Ali MiR. Prevalence study of quorum sensing groups among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Int J Curr Microbiol App Sci. 2014;3(11):204-15.

35.Aghamollaei H, Azizi Barjini K, Moosazadeh Mogaddam M. Rapid detection of pseudomonas aeruginosa by PCR method using specific primers of quorum sensing LasI gene. Armaghane Danesh. 2013;18(9):723-35. [In Persian].

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.4.6.3]
[DOI: 10.22088/jbums.19.4.46]

36.Senturk S, Ulusoy S, Bosgelmez-Tinaz G, Yagci A. Quorum sensing and virulence of Pseudomonas aeruginosa during urinary tract infections. J Infec Dev Cou. 2012;6(06):501-7.
37.Bjarnsholt T, Jensen PØ, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, et al. Pseudomonas aeruginosa biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. Pediat Pulmonol. 2009;44(6):547-58.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.4.6.3]
[DOI: 10.22088/jbums.19.4.46]