

مطالعه بیان ژن‌های پمپ MexAB-OprM در ایزوله‌های بالینی سودوموناس اُروجینوزا با روش RT-PCR

راضیه پوراحمد^{۱*}، پلم تولکنز^۲، فرانسواسی ون بمبک^۳

تاریخ دریافت 1392/10/28 تاریخ پذیرش 1392/12/28

چکیده

پیش زمینه و هدف: سودوموناس اُروجینوزا یک باکتری فرصت طلب است که به صورت ذاتی به مواد ضد میکروبی مختلف مقاوم می‌باشد. یکی از علل مقاومت بیان پمپ‌های تخلیه مقاومت به چند دارو نظیر MexAB-OprM می‌باشد. آنالیز بیان ژن‌های کد کننده اجزای پمپ MexAB-OprM نظیر mexA با روش RT-PCR مخصوصاً با یک کیت تجاری می‌تواند کمک زیادی در انتخاب درمان مناسب آنتی‌بیوتیکی بنماید. بنابراین هدف این تحقیق مطالعه بیان ژن‌های کد کننده اجزای پمپ MexAB-OprM نظیر mexA و oprM با روش RT-PCR در ایزوله‌های بالینی بود.

روش بررسی: پس از استخراج RNA از ۱۷ ایزوله بالینی و ساختن cDNA بیان کمی نسبی ژن‌های mexA و oprM با روش RT-PCR به ترتیب با استفاده از کیت تجاری و بدون آن تعیین شد.

یافته‌ها: افزایش بیان هر دو ژن mexA و oprM که به ترتیب با استفاده از کیت و بدون آن تعیین شده بود در هشت ایزوله بالینی مشاهده شد. این افزایش بیان مطابق با افزایش MIC ۲-۴ برای کربنی سیلین بود.

نتیجه گیری: همگرایی میان نتایج حاصل از استفاده و عدم استفاده از کیت یافت شد. بعلاوه همگرایی فقط بین MIC کربنی سیلین از میان آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده در روش فنوتیپی و بیان پمپ MexAB-OprM در تمام ایزوله‌های بالینی یافت شد. بنابراین استفاده از روش فنوتیپی و آنالیز بیان ژن با روش RT-PCR با استفاده از کیت به علت سهولت کار با آن به صورت همزمان توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس اُروجینوزا، پمپ MexAB-OprM، پمپ‌های چند کاره تخلیه دارو، RT-PCR

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره دوم، ص ۹۶-۸۷، اردیبهشت ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: شهرکرد - کیلومتر دو جاده سامان - دانشگاه شهرکرد - دانشکده علوم - تلفاکس ۰۳۸۱۴۴۲۴۴۱۹

Email: Razieh_Jaktaji@yahoo.com

مقدمه

ویژگی چندگانه، مکانیسم‌های اصلی دفاعی در سودوموناس اُروژنزا بر علیه آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضد عفونی کننده می‌باشد (۱). تاکنون شش نوع از این پمپ‌ها در این باکتری شناخته شده است که متعلق به خانواده RND^۴ می‌باشند. این خانواده از انواع ترانسپورترهای غشایی سه جزئی تشکیل شده است. این انواع شامل: MexEF-MexCD-OprJ، MexAB-OprM، MexGH-OpmD و MexJK، MexXY-OprM، OprN (۲-۵). از این انواع MexAB-OprM و MexXY-OprM دارای نقش کلیدی در مقاومت طبیعی میکروارگانیسم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضد عفونی کننده هستند.

سودوموناس اُروجینوزا یک باکتری گرم منفی فرصت طلب و عامل عفونت‌های بیمارستانی است. عفونت‌های ایجاد شده توسط این باکتری به وسیله آنتی‌بیوتیک‌هایی که از لحاظ ساختمانی غیر مرتبط می‌باشند نظیر بتا لاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و کینولون‌ها درمان می‌شوند. سویه تیپ وحشی این باکتری دارای مقاومت ذاتی به انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌هاست. این خصوصیت در ارتباط با ناتراوایی غشاء خارجی و فعالیت پمپ‌های تخلیه می‌باشد. پمپ‌های تخلیه با

^۱ استادیار گروه ژنتیک، دانشگاه شهرکرد، ایران (نویسنده مسئول)

^۲ پرفسور، واحد فارماکولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه کاتولیک لوین، بلژیک

^۳ پرفسور، واحد فارماکولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه کاتولیک لوین، بلژیک

^۴ Resistance Nodulation Division

نیمه کمی و روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی^۲ برای تعیین مقدار RNA رونویسی شده از ژن به صورت کمی می‌باشند. در روش آخر میزان بیان ژن یا به صورت مطلق (تعداد نسخه‌ها) و یا به صورت نسبی در مقایسه با میزان بیان یک ژن ضروری^۳ سنجش می‌شود. استفاده از دو روش اول به صورت متداول در آزمایشگاه‌های بالینی به علت وقت گیر بودن و استفاده از مواد رادیو اکتیو مشکل می‌باشد و حساسیت این روش‌ها در مقایسه با روش RT-PCR پایین است (۱۴). همچنین در روش نورترن به لات باید مقدار RNA مورد استفاده زیاد باشد حال آنکه در روش‌های مبتنی بر PCR به علت تکثیر اسید نوکلئیک نیاز به تهیه مقادیر زیاد از آن نمی‌باشد.

روش RT-PCR به علت اختصاصی بودن و سرعت بالا به راحتی قابل استفاده در آزمایشگاه‌های بالینی می‌باشد (۱۴، ۱۵). البته در دسترس بودن نمونه‌های استاندارد و پرایمرهای اختصاصی این ژن‌ها سنجش کمی را آسان‌تر می‌کند. بنابراین استفاده از کیت‌های تجارتي حاوی این مواد برای آزمایشگاه‌های بالینی ارجحیت دارد (۱۶). برای سنجش میزان بیان ژن mexA یک کیت تجارتي به نام mexQ-Test موجود می‌باشد. برای اعتبار سنجی کیت شرکت سازنده، از آن برای بررسی بیان ژن mexA در ۱۲۴ ایزوله بالینی استفاده کرد و هم‌خوانی بین نتایج بیان و فنوتیپی به جز مواردی که سایر مکانیسم‌های مقاومت دخیل بودند مشاهده شد (۱۳). بنابراین در این تحقیق از روش RT-PCR و کیت فوق برای بررسی میزان بیان ژن mexA در ۱۷ ایزوله بالینی جدا شده از بیماران مبتلا به پنومونی و بستری در بیمارستان استفاده شد. البته مقاومت ایزوله‌های ذکر شده نسبت به بتالاکتام‌های مختلف نظیر مروپنم، پیپرسیلین-تازوباکتام، سفپیم و کربنی سیلین قبلاً تعیین شده بود (۱۷). جدول ۱ مقادیر MIC برای آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را نشان می‌دهد. کربنی سیلین آنتی‌بیوتیکی است متعلق به زیر گروه کربکسی پنی سیلین از گروه پنی‌سیلین‌ها که محرک بیان پمپ MexAB-OprM می‌باشد (۱۸). همچنین به علت اینکه افزایش بیان ژن oprM نیز برای افزایش فعالیت پمپ لازم می‌باشد بیان این ژن بدون استفاده از کیت برای مقایسه تعیین گردید.

مواد و روش کار

در یک مطالعه‌ی توصیفی-آزمایشگاهی از ۱۷ ایزوله بالینی مطابق جدول ۱ استفاده شد. PA07 سویه تیپ وحشی و کنترل بود (۴).

پمپ MexAB-OprM همان طوری که مشخص است از سه جزء: MexA که یک پروتئین متصل به غشاء است، MexB یک پروتئین درون غشایی که باعث انتقال فعال آنتی‌بیوتیک‌ها از عرض غشاء می‌شود و OprM یک کانال خروج خارج غشایی تشکیل شده است. این اجزا به ترتیب توسط ژن‌های mexA، mexB و oprM که در یک اپرون قرار گرفته‌اند کد می‌شوند (۶). این اپرون به صورت پیوسته بیان می‌شود (۷). بیان پمپ MexAB-OprM باعث مقاومت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها شامل بتا لاکتام‌ها (بستثنای ایمپنم)، کینولون‌ها، تتراسیکلین، ماکرولیدها، کلرامفنیکل، نوبیوسین، تریمتوپریم و سولفامتوکسازول می‌شود. البته همه‌ی پمپ‌های خانواده RND دارای سوبستراهی آنتی‌بیوتیکی مشترک هستند (۱). در مورد بتالاکتام‌ها علت مقاومت علاوه بر پمپ‌های خانواده فوق می‌تواند در ارتباط با تولید انواع بتالاکتام‌ها مخصوصاً متالوبتالاکتام‌ها باشد (۸-۱۱). افزایش بیان این پمپ که منجر به مقاومت قابل ملاحظه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود در برخی از ایزوله‌های بالینی سودوموناس اثر جینوزا دیده شده است (۱۲، ۱۳). بیش بیان این نوع پمپ‌ها باعث ناکارآمد شدن درمان آنتی‌بیوتیکی در بیماران مبتلا به عفونت سودوموناس می‌شود زیرا این نوع پمپ‌ها دارای خصوصیت القایی بوده (۱۳) و در حضور آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش فعالیت پیدا می‌کنند. بنابراین توسعه روش‌های سریع و قابل اعتماد برای بررسی بیان پمپ‌های تخلیه در ایزوله‌های بالینی کمک زیادی در انتخاب آنتی‌بیوتیک‌های مناسب برای درمان بیماران می‌کند.

در حال حاضر برای بررسی فعالیت پمپ‌های تخلیه از روش‌های فنوتیپی نظیر تعیین MIC^۱ ایزوله‌های بالینی برای آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و روش‌های ژنتیکی (مولکولی) استفاده می‌شود.

هر کدام از این نوع روش‌ها به تنهایی مؤید افزایش بیان پمپ نمی‌باشد. زیرا شناسایی مقاومت ناشی از پمپ‌های تخلیه توسط تعیین MIC به تنهایی به علت احتمال حضور سایر مکانیسم‌های مقاومت نظیر آنزیم‌های بتالاکتاماز مشکل می‌باشد و قابل اعتماد نیست (۸، ۱۴). در برخی از ایزوله‌های بالینی نتایج فنوتیپی و ژنوتیپی با هم هم‌خوانی ندارند (۱۴). بنابراین از هر دو نوع روش برای تایید فعالیت پمپ‌های تخلیه استفاده می‌شود.

روش‌های مولکولی که در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی برای تعیین میزان فعالیت پمپ استفاده می‌شوند شامل تکنیک وسترن به لات برای تعیین میزان اجزای پروتئینی پمپ، نورترن به لات برای تعیین حضور و میزان RNA رونویسی شده از ژن به صورت

^۲ Real time PCR

^۳ House keeping gene

^۱ Minimum Inhibitory Concentration

دستگاه ترموسایکلر بیو راد مدل ۱۰۰ استفاده شد. مراحل حرارتی طبق جدول ۲ انجام و سپس cDNA های حاصل از لحاظ کیفیت با روش PCR بررسی شدند.

از کیت mexQ-TesT شرکت Coris Bioconcept برای بررسی بیان mexA استفاده شد. این کیت دارای مخلوط پرایمرهای مخصوص ژن mexA و همچنین دو ژن خانه زاد به نامهای HKG1 و HKG2 بدون ذکر توالی به عنوان کنترل داخلی و شش محلول استاندارد برای هر یک از سه ژن به صورت مجزا با غلظت‌های متوالی (۱۰ برابر) می‌باشد. علاوه برای ژن oprM پرایمرهای پیشرو oprM1 با توالی 5-GATCCCCGACTACCAGCGCCCCG-3 و برگشتی oprM2 با توالی 5-ATGCGGTACTGCGCCCCGAAGGC-3 استفاده شد و برای تهیه نمونه‌های استاندارد از محصولات PCR خالص حاصل از تکثیر این ژن رقت‌های متوالی ده برابر تهیه و تراکم آن‌ها توسط اسپکتروفتومتر کیوبیت تعیین شد. برای انجام RT-PCR شرایط دمایی طبق جدول ۳ در حضور سایبر گرین بیو راد (Syber Green iQ™ Supermix) به میزان ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای اختصاصی با غلظت ۱۰ میکرومولار هر کدام ۱/۵ میکرولیتر، cDNA به میزان پنج میکرولیتر، آب مقطر استریل در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و دستگاه آی سایکلر (iCycler iQ) استفاده شد (۱۴). مراحل حرارتی دو و سه جدول ۳ به میزان ۴۰ چرخه انجام شد. همچنین برای هر ایزوله دو نمونه جهت واکنش PCR تهیه گردید (دو تکرار). کمیت نسبی نمونه‌ها با استفاده از روش Pfaffl تعیین گردید برای این منظور همه‌ی داده‌ها با ژن‌های خانه زاد به عنوان کنترل داخلی نرمال شدند (۱۹). بیان کمی نسبی از نسبت زیر بدست می‌آید:

$$\text{نسبت} = \frac{E^{\Delta Ct}}{(E^{\Delta Ct})_{\text{ژن مورد نظر}}}$$

$$\Delta Ct = Ct_{\text{سویه بالینی}} - Ct_{\text{سویه تیپ وحشی}}$$

(E) بازدهی PCR در زمان واقعی و Ct نقطه تماس منحنی تکثیر با خط آستانه است و در واقع سیکلی است که در آن میزان فلورسنس محصولات از یک حد آستانه بیشتر می‌شود.

تفاوت بین ایزوله‌ها از لحاظ میزان بیان با استفاده از آزمون t محاسبه شد. حدود اطمینان ۹۵ درصد در نظر گرفته شد و $p < 0.05$ معنی‌دار محسوب گردید. بر طبق دستورالعمل کیت و همچنین محاسبات آماری انجام شده مقادیر کمتر از دو برای ژن‌های mexA و oprM به عنوان بیان پایه و برابر یا بیش از دو به عنوان بیش بیان در نظر گرفته شد.

برای استخراج RNA ابتدا از استوک‌های تهیه شده از ایزوله‌های مورد نظر روی پلیت حاوی تریپتون سوی آگار (TSA) (BD Diagnostics) کشت تازه تهیه شد. پلیت‌های به گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل و یک شب سرماگذاری شد. سپس کلنی‌های تک به محیط مولر-هینتون برات (BD Diagnostics) منتقل و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۵۰ در دقیقه سرماگذاری شدند. میزان جذب نوری کشت‌ها توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر تعیین گردید (۱۴). کشت‌های سودوموناس اتروجینوزا از اواخر فاز لگاریتمی برداشت شد زیرا میزان بیان پمپ MexAB-OprM وابسته به فاز رشد می‌باشد و بیشترین بیان آن مربوط به اواخر فاز لگاریتمی است (۱۵). بعد از رسیدن جذب نوری به یک در این طول موج کشت‌ها در $5000 \times g$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و رسوب حاصل در منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای استخراج RNA کل از مینی کیت کایژن (RNeasy mini kit, Qiagen)، طبق دستورالعمل استفاده شد (۱۴). در نهایت RNA در آب مقطر عاری از RNase جمع آوری شد و در منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس RNA های بدست آمده با آنزیم Turbo DNaseI (Ambion) طبق دستورالعمل کارخانه سازنده تیمار شد تا بقایای DNA موجود در نمونه‌ها حذف گردد. برای این منظور از ۵ میکرولیتر بافر آنزیم X ۱، ۱۰ میکرولیتر آنزیم (۲ U/μl)، ۱۰ میکرولیتر RNA و آب مقطر عاری از RNase در حجم نهایی ۰/۵ میلی لیتر استفاده گردید. برای اطمینان از حذف DNA نمونه‌های حاصل برای تکثیر یک ژن ضروری مانند rpsL (توسط پرایمرهای rpsL-AS و rpsL-S به ترتیب با توالی‌های 5-CGGCACTGCGTAAGGTATGC-3 و 5-CCCGGAAGGTCCTTTACAC-3 با روش PCR استفاده شد (۱۱). برای این منظور از یک نمونه کنترل مثبت حاوی DNA ژنومی استفاده شد. در صورت حذف DNA، نمونه‌ها نباید محصول PCR داشته باشند و این مسئله با ژل الکتروفورز محصولات PCR دارای RNA و کنترل مثبت حاوی DNA آشکار می‌شود. برای اطمینان از خلوص و تعیین غلظت نمونه‌های RNA از دستگاه اسپکتروفتومتر کیو بیت (Qu-bit nucleic acid, Invitrogen) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. تولید cDNA توسط رونویسی معکوس از ۱ میکروگرم RNA عاری از DNA و هگزامرهای تصادفی^۴ (۶۰۰ pm/μl) به عنوان پرایمر و dNTP با استفاده از آنزیم Superscript III (Invitrogen) (۲۰ U/μl) طبق دستورالعمل انجام شد (۱۴). برای انجام PCR از

⁴ Random hexamers

یافته‌ها

بعد از استخراج RNA و تیمار آن با آنزیم DNase I و انجام PCR مشخص گردید که نمونه‌های RNA فاقد DNA می‌باشند (شکل ۱). از حجم‌های مناسب آن‌ها برای تهیه cDNA استفاده شد. بررسی کیفی PCR نمونه‌های cDNA مناسب بودن آن‌ها را جهت انجام PCR کمی نسبی نشان داد. شکل ۲ محصول PCR ژن *oprM* را نشان می‌دهد. پس از انجام RT-PCR نقطه ذوب ژن‌های *mexA* و *oprM* به ترتیب ۹۳ و ۹۲ درجه سانتی‌گراد و ژن‌های ضروری *HKG1* و *HKG2* به ترتیب ۸۹ و ۸۸ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید. منحنی‌های ذوب نمونه‌ها به غیر از نمونه کنترل منفی هیچ‌گونه شانه اضافی را نشان نداد. نمودار ۱ منحنی ذوب ژن *mexA* را نشان می‌دهد. برای تعیین بازدهی سیستم و ضریب همبستگی از شش نمونه استاندارد با رقت‌های متوالی (۱۰ برابر) برای هر ژن که در کیت *mexQ-TesT* موجود بود و همچنین استانداردهای ساخته شده برای ژن *oprM* با رقت‌های متوالی ده برابر استفاده شد. نرم افزار دستگاه این مقادیر را محاسبه و منحنی‌های استاندارد را رسم نمود. شکل ۳ منحنی استاندارد *mexA* را نشان می‌دهد. برای چهار ژن ضریب همبستگی حدوداً ۰/۹۹ و بازدهی PCR از ۹۴ درصد به بالا بود. بازدهی RT-PCR (E) مربوط به چهار ژن در محدوده ۱/۹-۲/۱ بود. همچنین نرم‌افزار دستگاه ای سایکلر قادر به ترسیم منحنی چرخه‌های آستانه ژن‌ها است. نمودار ۲ چرخه آستانه ژن *mexA* را نشان می‌دهد. جدول ۱ میانگین بیان کمی نسبی برای دو ژن *oprM* و *mexA* در سویه تیپ وحشی و ایزوله‌های بالینی را نشان می‌دهد. از آنجائی که ژن‌های *oprM* و *mexA* هر دو متعلق به یک اپرون هستند بنابراین انتظار می‌رود که هر دو با هم در یک

ایزوله افزایش بیان داشته باشند. همان طوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود هشت ایزوله بالینی از ۱۷ تا افزایش بیان هر دو ژن *oprM* و *mexA* را نشان می‌دهند و بیان این دو ژن در مابقی ایزوله‌ها در مقایسه با سویه تیپ وحشی اختلاف معنی‌داری ندارند. این مسئله هم‌خوانی نتایج حاصل از RT-PCR با استفاده از کیت و بدون استفاده از کیت را نشان می‌دهد. در این ایزوله‌ها MIC کربنی سیلین افزایش ۲-۴ برابری نسبت به سویه تیپ وحشی دارد (جدول ۱) حال آنکه برای سایر آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش MIC متغیر است. در ایزوله‌های PA19 و PA213 که بیش بیان کننده پمپ هستند، افزایش MIC برای هر پنج آنتی‌بیوتیک مشاهده شد (جدول ۱). حال آنکه در شش ایزوله دیگر که بیش بیان کننده پمپ هستند، افزایش MIC برای ۲-۴ آنتی‌بیوتیک مشاهده شد (جدول ۱). چنین نتیجه‌ای که ایزوله‌های بالینی بیش بیان کننده پمپ دارای الگوهای متفاوتی از مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند قبلاً نیز گزارش شده است (۱).

ایزوله بالینی PA248 بیش بیان کننده ژن‌های *mexA* و *oprM* نمی‌باشد و بر طبق جدول ۱ دارای افزایش MIC برای کربنی سیلین نیست ولی دارای افزایش MIC برای مروپنم، سفییم و پیپرسیلین-تازوباکتام است.

همچنین با مقایسه نتایج بیان با مقادیر MIC هیچ ارتباط مستقیمی میان مقدار افزایش بیان پمپ با مقدار افزایش MIC برای آنتی‌بیوتیک‌ها به غیر از کربنی سیلین مشاهده نشد. این مسئله قبلاً گزارش شده است (۱۴).

در نهایت هم‌خوانی نتایج مربوط به بیان ژن (نتایج ژنوتیپی) تنها با نتایج MIC برای کربنی سیلین (نتایج فنوتیپی) مشاهده شد.

جدول (۱): مقدار MIC آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و میانگین مقادیر بیان نسبی ژن‌های *oprM* و *mexA*

در سویه تیپ وحشی و ایزوله‌های بالینی

سویه	MEM	TZP	FEP	CIP	CAR	<i>mexA</i> ^۱	<i>oprM</i> ^۱
PA07	۱	۴	۲	۰/۲۵	۳۲	۰±۱	۰±۱
PA11	۱	۴	۲	۰/۲۵	۳۲	۰/۰۸±۰/۴۸	۰/۰۲±۰/۷۵
PA12	۱	۸	۲	۰/۵	۳۲	۰/۰۲±۰/۹۳	۰/۰۱±۱/۰۱
PA19	۸	۱۶	۸	۲	۶۴	۰/۰۵±۲/۱	۰/۰۴±۲/۰۲
PA20	۸	۴	۲	۰/۲۵	۶۴	۰/۰۴±۲/۱	۰/۰۳±۲/۰۵
PA21	۴	۸	۴	۰/۲۵	۱۲۸	۰/۰۹±۳/۲	۰/۰۵±۳/۳۱
PA105	۱	۸	۲	۰/۲۵	۶۴	۰/۰۹±۰/۴۷	۰/۰۸±۰/۳۷
PA106	۱	۴	۲	۰/۲۵	۶۴	۰/۰۵±۰/۵۲	۰/۰۲±۰/۶۲
PA178	۱	۳۲	۴	۰/۲۵	۱۲۸	۰/۰۲±۳/۱۹	۰/۰۱±۳/۳۷
PA213	۶۴	۳۲	۱۲۸	۲	۶۴	۰/۰۳±۲/۲۸	۰/۰۱±۲/۷۱
PA248	۲	۱۶	۸	۰/۲۵	۳۲	۰/۰۲±۰/۳۷	۰/۰۵±۰/۴۷

ادامه جدول (۱)							
PA259	۱	۱۶	۸	۰/۲۵	۶۴	۰/۰۷ ± ۲/۱۴	۰/۰۳ ± ۲/۴۶
PA303	۱	۴	۸	۰/۲۵	۱۲۸	۰/۰۴ ± ۳/۳۴	۰/۰۱ ± ۳/۸۵
PA312	۱	۱۶	۴	۰/۲۵	۶۴	۰/۰۳ ± ۱/۵۱	۰/۰۶ ± ۱/۱۲
PA332	۴	۱۲۸	۱۶	۰/۵	۳۲	۰/۰۵ ± ۱/۲۲	۰/۰۸ ± ۱/۱۵
PA347	۱	۱۶	۸	۰/۲۵	۳۲	۰/۰۱ ± ۱/۰۸	۰/۰۳ ± ۱/۲۲
PA348	۱۶	۶۴	۸	۰/۲۵	۳۲	۰/۰۳ ± ۱/۰۷	۰/۰۱ ± ۱/۲
PA375	۱	۶۴	۴	۰/۲۵	۶۴	۰/۰۶ ± ۲/۲۳	۰/۰۹ ± ۲

MEM (مروپنم)، TZP (پیپرسیلین - تازوباکتام)، FEP (سفپیم)، CIP (سیپروفلوکساسین) و CAR (کربنسیلین).

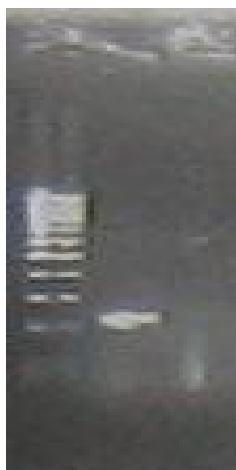
جدول (۲): مراحل حرارتی تهیه cDNA

مدت زمان	مراحل حرارتی
۱۰ دقیقه	۶۵ درجه سانتی گراد
۱۰ دقیقه	۲۵ درجه سانتی گراد
۶۰ دقیقه	۵۰ درجه سانتی گراد
۵ دقیقه	۸۵ درجه سانتی گراد

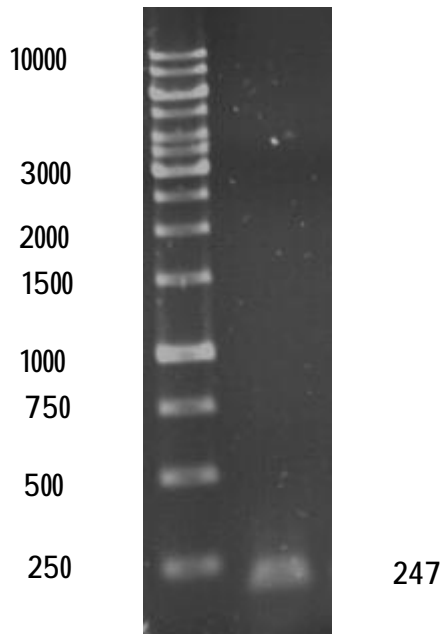
جدول (۳): مراحل حرارتی RT-PCR

مدت زمان	مراحل حرارتی
۳ دقیقه	۹۵ درجه سانتی گراد
۱۵ ثانیه	۹۵ درجه سانتی گراد
۱ دقیقه	۶۰ درجه سانتی گراد
مطابق برنامه دستگاه	۶۰-۹۵ درجه سانتی گراد

2000
700
500
300
100



شکل (۱): ژل الکتروفورز محصول PCR بعد از تیمار با DNaseI. ستون ۱ مارکر DNA (100 bs)، ستون ۲ کنترل مثبت و ستون ۳ نمونه ی RNA

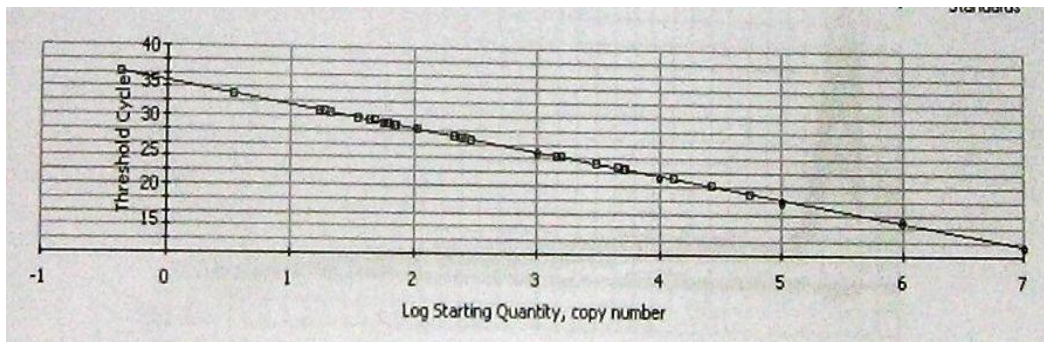


شکل (۲): ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به نمونه cDNA ژن oprM. ستون امارکر DNA (۱ kb)، ستون ۲ نمونه cDNA ژن oprM

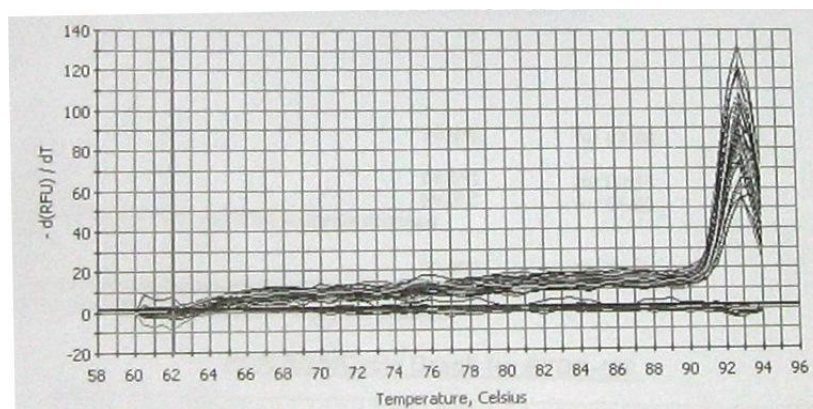
ضریب همبستگی
۰/۹۹۹
PCR بازده، % ۹۸/۸

شیب -3/35
Y=34/98

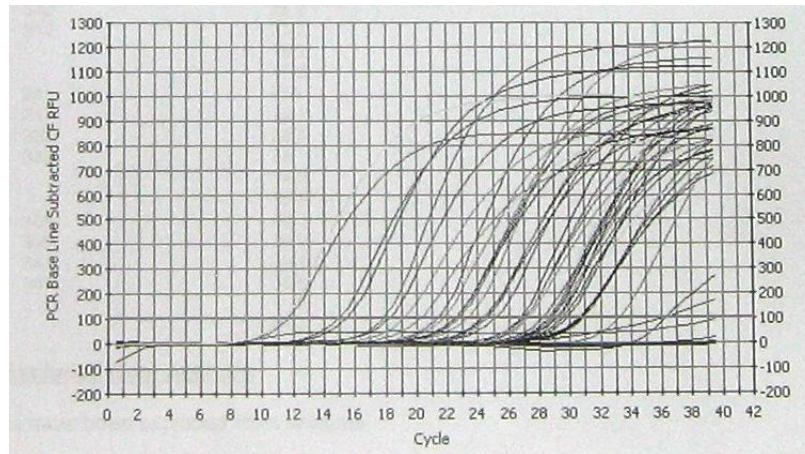
ناشناخته □
استاندارد ○



شکل (۳): منحنی استاندارد ژن mexA برای نمونه‌های استاندارد و بالینی جهت تعیین بازدهی PCR در زمان واقعی



نمودار (۱): منحنی ذوب PCR در زمان واقعی مربوط به ژن mexA در نمونه‌های استاندارد و بالینی جهت نشان دادن عدم آلودگی نمونه‌ها.



نمودار (۲): منحنی چرخه‌های تکثیر ژن mexA در نمونه‌های استاندارد و بالینی جهت تعیین Ct آن‌ها.

بحث

سودوموناس اتروجینوزا به صورت ذاتی به عوامل ضد میکروبی مختلف مقاوم است. اهمیت پمپ MexAB-OprM برای ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها قبلاً به اثبات رسیده است (۵-۲) به طوری که موتان‌های فاقد mexAB حساس به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (۲). این پمپ شباهت زیادی به پمپ AcrAB-TolC در باکتری *E. coli* (۲۰) و MtrCDE در باکتری *N. gonorrhoeae* دارد (۲۱) و این مسئله اهمیت حضور این نوع پمپ را در باکتری‌ها جهت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی که از لحاظ ساختاری متفاوت می‌باشند را نشان می‌دهد.

بعلاوه افزایش بیان این پمپ در برخی از ایزوله‌های بالینی قبلاً مشاهده شده است. به طوری که این پمپ در حد پایه در سویه تیپ وحشی بیان می‌شود ولی بیان آن در ایزوله‌های بالینی می‌تواند تا چند برابر نسبت به تیپ وحشی افزایش یابد (۲، ۷، ۱۴، ۱۵). افزایش بیان این پمپ در ایزوله‌های بالینی ممکن است مرتبط با نوع و مقدار آنتی‌بیوتیک تجویز شده به بیمار و یا غیرفعال شدن رپرسور اپرون *mexA-mexB-oprM* به نام MexR باشد (۵). از آنجائی که پمپ‌های تخلیه خانواده RND دارای سوبستراهای آنتی‌بیوتیکی مشترک هستند احتمال بیان بیش از یک پمپ هم در یک زمان وجود دارد (۷). بعلاوه مقاومت به بتالاکتان‌ها می‌تواند ناشی از کسب بتا لاکتامازها هم باشد (۱۱-۸) ولی دلیل اصلی مقاومت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مرتبط با پمپ MexAB-OprM است. بنابراین اندازه گیری میزان بیان ژن‌های این پمپ نظیر mexA می‌تواند در تجویز آنتی‌بیوتیک‌های مناسب در درمان سودمند باشد. زیرا انتخاب نوع آنتی‌بیوتیک برای تجویز و مقدار آن بدون بررسی میزان بیان این

نوع پمپ‌ها منجر به افزایش فراتر بیان آن‌ها شده و ناتوانی در درمان مبتلایان به عفونت‌های سودوموناسی را سبب شود. این مسئله صراحتاً اهمیت اندازه گیری بیان این پمپ‌ها را نشان می‌دهد.

در مطالعات گذشته سنجش‌های فنوتیپی (تعیین MIC برای آنتی‌بیوتیک‌های مختلف) و سنجش‌های ژنتیکی (تعیین میزان بیان ژن‌های کد کننده اجزای پمپ‌ها) همراه هم در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی به کار رفته است. برخی از این مطالعات چاپ شده تناقض‌هایی را در بعضی موارد میان نتایج فنوتیپی و ژنوتیپی نشان دادند و لزوم استفاده از سنجش‌های ژنتیکی را متذکر شدند (۱۴). از میان روش‌هایی که برای سنجش ژنتیکی استفاده می‌شوند طبق توضیحات گفته شده در مقدمه مزایای روش RT-PCR بیشتر است. البته برای کسب شرایط مناسب برای سنجش نیاز به صرف زمانی برای انجام آزمایشات اولیه توسط نیروی متخصص می‌باشد. این امر در آزمایشگاه تحقیقاتی میسر می‌باشد ولی در آزمایشگاه‌های بالینی به علت ذیق وقت در جوابدهی و شاید تعداد زیاد ایزوله‌های بالینی نیاز به مهیا بودن این شرایط مناسب از ابتدا می‌باشد. بنابراین استفاده از کیت‌های تجارتي باعث تسهیل در سنجش بیان پمپ‌ها می‌شود. هدف از این تحقیق استفاده از کیت mexQ-TesT برای بررسی بیان ژن mexA و عدم استفاده از کیت برای بررسی بیان ژن oprM در ۱۷ ایزوله بالینی با استفاده از روش PCR در زمان واقعی و مقایسه نتایج حاصل بود.

این یافته که هشت ایزوله از ۱۷ ایزوله بالینی افزایش بیان پمپ MexAB-OprM هستند، نشان دهنده هم‌خوانی نتایج حاصل از استفاده از کیت و عدم استفاده از کیت می‌باشد. البته استفاده از کیت برای بررسی بیان باعث سهولت انجام کار می‌شود.

توصیه می‌کند. البته قیمت و دشواری تهیه آن از خارج از کشور را نیز باید در نظر داشت.

نتیجه گیری

در مجموع استفاده از روش‌های وسترن به لات و نورترن به لات به صورت متداول در آزمایشگاه‌های بالینی جهت بررسی به ترتیب میزان سنتز پروتئین و RNA مشکل می‌باشد. حال آنکه روش‌های تشخیصی مبتنی بر PCR مانند RT-PCR به علت اختصاصی بودن و سرعت بالا دارای کاربردهای فزاینده‌ای است و مخصوصاً استفاده از کیت mexQ-TesT برای سنجش بیان ژن mexA برای ایزوله‌های بالینی به علت سهولت کار با آن و دقت بالا مخصوصاً برای آزمایشگاه‌های بالینی توصیه می‌گردد. البته ممکن است دشواری تهیه آن از خارج از کشور و یا قیمت آن محدود کننده باشد. ولی لزوم سنجش ژنتیکی برای انتخاب درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب علیه عفونت‌های سودوموناسی ممکن است ترغیب کننده مؤسسات تحقیقاتی و شرکت‌های داخل کشور در جهت ساخت کیت‌های مشابه در داخل کشور با قیمت‌های مناسب تر شود.

تشکر و قدر دانی

بدینوسیله از واحد فارماکولوژی سلولی مولکولی دانشگاه کاتولیک لوین که امکانات انجام این تحقیق را فراهم نمود و همچنین دانشگاه شهرکرد که فرصت انجام این کار را مهیا نمود کمال تشکر را دارم.

همچنین این یافته تایید کننده گزارشات قبلی در زمینه افزایش بیان پمپ در برخی از ایزوله‌های بالینی (۷، ۸، ۱۴، ۱۵) می‌باشد. افزایش بیان ژن‌های کد کننده اجزای پروتئینی پمپ می‌تواند به علت ایجاد تغییر ژنتیکی در خود این ژن‌ها و یا ژن‌های کد کننده پروتئین‌های تنظیمی اپرون mexAB-oprM مانند mexR در جهت افزایش فعالیت پمپ باشد (۲، ۵).

این یافته که در این ایزوله‌های بیش بیان کننده پمپ MIC کربنی سیلین افزایش ۲-۴ برابری نسبت به سویه تیپ وحشی داشته حال آنکه برای سایر آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش MIC متغیر است دلالت بر هم‌خوانی نتایج ژنتیکی تنها با یکی از نتایج MIC برای کربنی سیلین (فنوتیپی) دارد و لزوم استفاده از دو روش ژنتیکی و فنوتیپی را برای انتخاب درمان مناسب نشان می‌دهد. بعلاوه این یافته‌ها که ایزوله‌های بالینی PA19 و PA213 که بیش بیان کننده پمپ MexAB-OprM هستند و افزایش MIC برای پنج آنتی‌بیوتیک مشاهده شده و ایزوله بالینی PA248 که بیش بیان کننده پمپ نیست و افزایش MIC برای سایر آنتی‌بیوتیک‌ها به غیر از کربنی سیلین دارد، احتمالاً اهمیت سایر پمپ‌ها و مکانیسم‌های دیگر مقاومت در ایجاد مقاومت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان می‌دهد که در این تحقیق سنجش نشد. البته با تعیین میزان بیان ژن‌های مرتبط با این پمپ‌ها مثلاً با روش RT-PCR و بررسی حضور سایر ژن‌های مرتبط با مقاومت با روش PCR می‌توان این مسئله را بررسی نمود. هم‌خوانی نتایج بیان با استفاده از کیت و بدون استفاده از آن و سهولت کار با کیت به‌کارگیری آن را در آزمایشگاه‌های بالینی

References:

1. Piddock LJV. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinic Microbiol Rev* 2006; 19: 382-402.
2. Poole K, Srikumar R. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Curr Top Med Chem* 2001; 1: 59-71.
3. Srikumar R, Kon T, Gotoh N, Poole K. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(1):65-71.
4. Morita Y, Kimura N, Mima T, Mizushima T, Tsuchiya T. Roles of MeexXY and MexAB multidrug efflux pumps in intrinsic multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *J Gen Appl Microbiol* 2001; 47: 27-32.
5. Gorgani N, Ahlbrand S, Patterson A, Pourmand N. Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34: 414-8.
6. Mokhonova EI, Akama H, Nakae T. Role of the membrane fusion protein in the assembly of resistance nodulation cell division multidrug efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res. Commun* 2004; 332: 483-9.

7. Llanes C, Hocquel D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plesiat P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1797-802.
8. Cabot G, Campo-Sosa AA, Tuba F, Macia MD, Rodriguez C, Moya B, et al. Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: Prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 1906-11.
9. Umadevi S, Joseph NM, Kumari K, Easow JM. Detection of extended spectrum beta lactamases, AmpC beta lactamases and metallo beta lactamases in clinical isolates of ceftazidime resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *BJM* 2011; 42: 1284-8.
10. Esquisabel ABC, Rodriguez MC, Campososa AO, Rodriguez C, Martinez L. Mechanisms of resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* less susceptible to cefepime than to ceftazidime. *CMI* 2011; 17: 1817-22.
11. Lee JY, Sooko K. oprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC and metallo- β -lactamase in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *Int J Antimicrob Agent* 2012; 40: 168-72.
12. Zarifi Z, Llanes C, Kohler T, Pechere JC, Plesiat P. In vivo emergence of multidrug resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 287-91.
13. De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1761-70.
14. Mesaros N, Glupezynski Y, Avrain L, Caceres NE, Tulkens PM, Van Bambeke F. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 378-86.
15. Dumas JL, van Delden C, Perron K, Kohler T. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real time PCR. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 254: 217-25.
16. Coris BioConcept (Belgium). In vitro mexAB-oprM and mexXY-oprM efflux detection in *P. aeruginosa* by Real Time PCR. Brussels: Coris BioConcept; 2011.
17. Riou M, Carbonnelle S, Avrain L, Mesaros N, Pirnay JP, Bilocq F, et al. In vivo development of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from the lower respiratory tract of intensive care unit patients with nosocomial pneumonia and receiving antipseudomonas therapy. *Int. J Antimicrob Agents* 2010; 36: 513-22.
18. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3322-7.
19. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST ©) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real time PCR. *Nuc Acids Res* 2002; 30: 1-10.
20. Nikaido H. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1: 515-23.
21. Hagman KE, Pan W, Spratt BG, Balthazar JT, Judd RC, Shafer WM. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the MtrCDE efflux system. *Microbiol* 1995; 141: 611-22.

STUDY THE EXPRESSION OF MEXAB-OPRM PUMP GENES IN CLINICAL ISOLATES OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA USING RT-PCR METHOD

Razie Pourahmad¹, Paul M. Tulkens², Françoise Van Bambeke³

Received: 18 Jan , 2014; Accepted: 19 Mar , 2014

Abstract

Background & Aims: Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic bacterium that is intrinsically resistant to different antimicrobial substances. One reason for this resistance is the expression of multiple drug efflux pumps, such as MexAB-OprM. Analysis of expression of the MexAB-OprM pump such as mexA with RT-PCR especially with commercial kit can largely aid in selection of suitable antibiotic treatment. Thus, the aim of this investigation was to study the expression of mexA and oprM genes using RT-PCR in clinical isolates.

Materials & Methods: Following the extraction of RNA from 17 clinical isolates and synthesis of cDNA, the relative quantification of mexA and oprM genes were determined by RT-PCR with and without commercial kit, respectively.

Results: Over-expression of both mexA and oprM genes were seen in eight clinical isolates. This over-expression corresponded to 2-4 fold increase in MIC for carbenicillin..

Conclusion: The convergence between results obtained from using and not using the kit. Moreover, the convergence between only MIC for carbenicillin among several antibiotics used in phenotypic method and the expression of MexAB-OprM pump was found in all clinical isolates. Therefore, the application of phenotypic method and analysis of gene expression using RT-PCR with commercial kit, due to its ease of working, simultaneously is recommended.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, MexAB-OprM, Multidrug efflux pumps, RT-PCR

Address: Department of Genetics, Faculty of Science, University of Shahrekord, Saman Road, Shahrekord, Iran. Tel: +98 381-4424401

Email: Razieh_Jaktaji@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2014; 25(2): 96 ISSN: 1027-3727

¹ Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Science, University of Shahrekord, Saman Road, Shahrekord, Iran (Corresponding Author)

² Professor, Cellular and Molecular Pharmacology Unit, UCL, Belgium

³ Professor, Cellular and Molecular Pharmacology Unit, UCL, Belgium