

جداسازی باکتری سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به مواد ضد میکروبی دارای ژن qacE از محیط های بیمارستانی

الهام سیاسی*، رباب رفیعی طباطبایی، فرزانه هجری

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا یکی از مهم ترین عوامل عفونت در بیمارستان است. مصرف گسترده و بی رویه آنتی بیوتیک ها و مواد ضد میکروبی در مراکز درمانی باعث پیدایش مقاومت در این باکتری شده است. هدف از این مطالعه بررسی حضور ژن qacE در سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به مواد بیوسایدی جدا شده از محیط بیمارستان ها بود.

مواد و روش ها: ۷۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا از محیط های بیمارستان جمع آوری شد. حساسیت این سویه ها نسبت به ماده بیوسایدی دکونکس به روش ماکرودیلوشن براث سنجیده شد. حضور ژن qacE با واکنش زنجیره ای پلی مرز بررسی شد.

یافته ها: در میان ۷۰ نمونه جدا شده از محیط بیمارستان ۱۵ نمونه سودوموناس آئروژینوزا بود. در بین باکتری های مورد آزمایش ۱۲ نمونه با MIC ۷۵ µg/ml و ۳ نمونه دارای MIC ۴۰۰ µg/ml نسبت به دکونکس بودند. در ۱۲ نمونه (۲۴٪) حضور ژن qacE مشاهده شد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این بررسی، حضور ژن qacE را در سودوموناس آئروژینوزا نشان داد. با مقایسه سایر یافته در سراسر جهان، افزایش روز افزون مقاومت ژنتیکی باکتری سودوموناس آئروژینوزا را نسبت به مواد بیوسایدی به خصوص دکونکس مشخص می نماید. این نتایج برای کاربرد سیاست های صحیح استفاده از مواد ضد میکروبی حائز اهمیت است.

واژه های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت به مواد ضد میکروبی، ژن qacE، حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC).

مقدمه

Resistant (MDR) به صورت گسترده در کشورهای مختلف، راه های پخش شدن و گسترش ژن های مربوطه از اهمیت ویژه ای برخوردار شده اند و پتانسیل این خطر برای سلامت عمومی به خوبی مشخص شده است (۱،۲۰). از جمله مکان های پخش و گسترش باکتری های مقاوم می توان به مکان های عمومی هم چون مدارس، مراکز خرید، ادارات و سرویس های حمل و نقل و محیط های بیمارستانی اشاره کرد (۱۳،۱۷).

عفونت های بیمارستانی به عنوان عفونت کسب شده در بیمارستان یا عفونت های مرتبط با بیمارستان مطرح می شود که پس از پذیرش بیمار در بیمارستان ۴۸ تا ۷۲ ساعت یا طی دوره ای مشخص ۱۰ تا ۳۰ روز پس از ترخیص رخ می دهد و شامل عفونت هایی می باشد که در هنگام پذیرش بیمار در بیمارستان وجود ندارد بلکه در طول اقامت بیمار در بیمارستان به وجود می آیند. عفونت بیمارستانی از ۵/۲ تا ۱۰ درصد متغیر بوده و طی ۲۰ سال تا ۳۶ درصد افزایش یافته است. به گفته

امروزه مقاومت به آنتی بیوتیک ها و مواد ضد عفونی کننده در سویه های مختلف یک مشکل سلامتی عمومی در جهان محسوب می شود که افزایش روز افزون آن در سطح جهان مطرح است. گزارش های مربوط به این مسئله اصولاً بر پایه شناسایی مقاومت به آنتی بیوتیک ها در باکتری های گرفته شده در عفونت های بیمارستانی بوده اند اما در سال های اخیر با شناسایی سویه های مقاوم به چند دارو Multi Drug

نویسنده مسئول:

گروه ژنتیک، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تهران
پست الکترونیکی: emi_biotech2006@yahoo.ca

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۱۴

سازمان بهداشت جهانی، ۵ تا ۱۰ درصد بیماران بستری در بیمارستان‌های کشورهای توسعه یافته، به یک عفونت بیمارستانی مبتلا شده که این رقم در کشورهای در حال توسعه به ۲۵ درصد می‌رسد. طبق بررسی‌های انجام شده، عفونت ادراری شایع‌ترین و پنومونی کشنده‌ترین عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شود (۱۹).

از میان باکتری‌های بیماری‌زای رایج عامل ایجاد انواع عفونت‌ها می‌توان به سودوموناس آئروژینوزا اشاره نمود که حضورش در مکان‌های عمومی و بیمارستانی نیز بسیار گزارش شده است. این باکتری یک باسیل گرم منفی هوازی است که در بسیاری محیط‌های اکولوژیکی (nich) می‌تواند رشد کند اما محیط‌های مرطوب را ترجیح می‌دهد. در محیط‌های آبی با مواد مغذی کم یا الیگوتروفیک و محیط‌های مغذی مانند فاضلاب و بدن انسان یافت می‌شود و یک پاتوژن شایع مجاری ادراری و دستگاه تناسلی در بیمارستان است. در همه بخش‌های بیمارستان می‌تواند وجود داشته باشد، به‌خصوص در عفونت‌های بیمارستانی مراقبت‌های ویژه (ICU intensive care unit) وجود دارد که در آنجا حدود ۱۵٪ از عفونت‌های مربوطه را تشکیل می‌دهد (۱۶).

سودوموناس آئروژینوزا یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌ها به‌ویژه در میزبان‌هایی با ایمنی متوسط است و باکتری گرم منفی را ایجاد می‌کند که سبب عفونت‌های بیمارستانی می‌شود. عفونت به‌وسیله این میکروارگانیسم بیش‌تر به علت بیماری‌زایی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی ذاتی و اکتسابی و انتخاب محدود ترکیب‌های ضد میکروبی مؤثر، به سختی درمان می‌شود. این باکتری هم‌چنین به بیوسایدها (دزاینفکتانت‌ها) - آنتی‌سپتیک‌ها - نگهدارنده‌ها) مقاوم است. مقاومت به بیوسایدها برخلاف مقاومت آنتی‌بیوتیکی که موضوع بسیاری از تحقیق‌ها بوده است، موضوعی است که به‌تازگی مورد توجه قرار گرفته است (۱۲). گندزدایی، ضدعفونی کردن و استریل کردن، اصول پایه‌ای هر نوع برنامه کنترل عفونت است. انگل هارت و همکارانش در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که شیوع سودوموناس آئروژینوزا در بخش‌های هماتولوژی و انکولوژی در ارتباط با آلودگی سطوح وسایل بیماران است به‌خصوص هنگامی که از محلول‌های تمیز کننده غیر جرم‌گیر به‌جای دزاینفکتانت‌ها برای ضد عفونی کردن محیط بیماران استفاده می‌شود (۱۲).

ترکیب‌های شیمیایی متفاوتی به‌عنوان دزاینفکتانت در مراکز کلینیکی استفاده می‌شوند مانند گلو تار آلدهید، ترکیب‌های چهار تایی آمونیوم سرفاکتانت‌هایی کاتیونیک هستند که به‌طور وسیع برای کنترل رشد باکتری‌ها در محیط‌های بیمارستانی و صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این ترکیب -

ها برای اهداف متفاوت پزشکی و داروسازی به کار می‌روند. به‌طور کلی آن‌ها ترکیب‌هایی هستند که بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مؤثر هستند (۱۲). ترکیب‌های چهارتایی آمونیوم دارای ساختار کلی $NR_2R_3R_4X$ هستند. گروه R می‌تواند اتم هیدروژن، گروه‌های آلکیل ساده و یا گروه‌های آلکیل که با سایر گروه‌های عملکردی جانشین شده است باشد و X نیز یک آنیون است (۴). در حالت محلول، ترکیب‌های چهارتایی آمونیوم به دو جز کاتیونی و آنیونی تقسیم می‌شود. بر خلاف یون آمونیوم و کاتیون‌های یک، دو و سه بار مثبت آن، کاتیون‌های چهارتایی آمونیوم به‌طور دائم باردار بوده مستقل از PH حلالی هستند که در آن یافت می‌شوند. ترکیب‌های چهارتایی آمونیوم با توانایی در کاهش تعامل سطحی آب شناخته می‌شوند. این خصوصیت آن‌ها را در گروه‌های شیمیایی بزرگی از ترکیب‌های فعال سطحی قرار می‌دهد که به‌طور معمول به آن‌ها عوامل مرطوب کننده و پاک کننده و یا عوامل متفرق کننده اطلاق می‌گردد. ترکیب‌های فعال سطحی اغلب دترجنت‌های آنیونی با طبیعت اسیدی و دترجنت‌های کاتیونی که ترکیب‌های چهارتایی آمونیوم از مهم‌ترین آن‌ها است دست‌بندی می‌شوند (۴،۵). این ترکیب‌ها دارای فعالیت‌های ضد میکروبی بر علیه محدوده وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، از جمله شکل رویشی باکتری‌ها، کپک‌ها، جلبک‌ها، ویروس‌ها هستند و می‌توانند از جوانه زدن اسپور باکتریایی و هم‌چنین رشد سلول‌های رویشی باکتریایی مخمرها، کپک‌ها و جلبک‌ها ممانعت به‌عمل آورند. فعالیت ضد میکروبی ترکیب‌های چهارتایی آمونیوم به خصوصیت‌های سورفاکتانتی کاتیونی‌اش مربوط می‌شود و مولکول‌های مختلفی هم‌چون پروتئین‌ها و لیپیدها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. مهم‌ترین نحوه عملکرد این ترکیب‌هایی بر علیه سلول‌های میکروبی، واکنش آن با غشاء سلولی بوده که باعث اختلال و تراوش محتویات سلول می‌گردد. این عمل شامل اتصال نیتروژن چهار جزئی با سر گروه فسفو لیپیدهای اسیدی بوده که قبل از ورود دم آب‌گریز به هسته غشاء آب‌گریز رخ می‌دهد و در غلظت‌های بالا قادر است ترکیب‌های آب‌گریز غشاء سلولی را با تشکیل میسل‌های تجمع یافته، حل نماید. اختلال و تخریب پروتئین‌های ساختاری و آنزیم‌های سلول از دیگر خصوصیات این ترکیبات است که جدا از فعالیت ضد میکروبی آن می‌باشد (۴،۷،۱۱).

بسیاری از ژن‌های مقاومت به مواد ضد میکروبی، در باکتری‌های گرم منفی جدا شده از نمونه‌های عفونی، در قطعه‌های ژنتیکی به نام انتگرون قرار دارند. انتگرون‌های متعددی که باعث مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند، شناخته شده‌اند. انتگرون‌های کلاس ۱ شامل ژن *suII* عامل مقاومت به

مثبت در زیر میکروسکوپ به رنگ بنفش و باکتری‌های گرم منفی به رنگ صورتی دیده می‌شوند. سپس این نمونه‌ها که از باکتری‌های گرم منفی بودند در چند سری کشت چهار مرحله‌ای روی محیط‌های اختصاصی خالص‌سازی شدند.

شناسایی ایزوله‌ها با استفاده از تست‌های

بیوشیمیایی - باکتری‌ها برای شناسایی بر روی محیط‌های بلاد آگار، مک کانکی آگار، TSI، SIM، سیمون سترات، اوره آز، MR/VP و OF کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۳۷ درجه مورد بررسی قرار گرفتند.

تست اکسیداز و کاتالاز - به منظور انجام تست کاتالاز از

آب اکسیژنه استفاده شد. برای انجام تست اکسیداز از کاغذ صافی و یک قطره محلول اکسیداز استفاده شد.

رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد - برای سنجش

توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، نمونه‌ها در محیط نوترینت برات کشت داده شده و سپس در بن ماری ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از یک شب انکوباسیون ۴۲ درجه سانتی‌گراد، کدورت محیط کشت بررسی شد. (زیرا رشد سودوموناس آئروژینوزا در دمای ۴۲°C به متمایز نمودن این ارگانیزم از بقیه گونه‌های سودوموناس کمک می‌نماید).

بررسی رشد در محیط ستریمید آگار - از ستریمید

آگار نیز برای جداسازی انتخابی باکتری سودوموناس آئروژینوزا و افزایش تولید پیگمان استفاده می‌گردد. (به علت حضور ستریمید)

تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش تهیه رقت

در لوله Broth Dilution Test

Minimum Inhibition Concentration= MIC)

(تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد

برای تهیه حداقل غلظت مهارکنندگی رشد مواد بیوسایدی، از روش تهیه رقت در لوله Broth Dilution Test استفاده شد. سوسپانسیون میکروبی با کدورت نیم مک‌فارلند از نمونه باکتری تهیه گردید. برای انجام آزمایش ۱۳ لوله استریل استفاده شد. به همه لوله‌ها ۱ml محلول مولر هینتون برات افزوده، سپس ۱ ml از محلول‌های بیوسایدی تهیه شده در کنار شعله و توسط پیپت استریل به لوله شماره ۱ افزوده شد، محتویات لوله به‌طور کامل مخلوط شده و ۱ml از آن به لوله شماره ۲ اضافه شد و این عمل تا لوله شماره ۱۲ تکرار گردید، سپس ۱ml از محلول لوله شماره ۱۲ برداشته شد و دور ریخته

سولفونامیدها و ژن‌های qacE و qacEΔ1 عامل تعیین کننده مقاومت به ترکیب‌های چهارتایی آمونیوم هستند (۴،۵). پروتئین تولید شده توسط این ژن‌ها، ترکیب‌های آمونیوم چهار ظرفیتی را به‌عنوان یکی از گسترده‌ترین مواد ضد عفونی کننده پوست، زخم‌ها و محیط بیمارستانی به خارج پمپ می‌نماید (۴). بنابراین از یک سو افزایش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و از سوی دیگر افزایش استفاده از مواد ضد عفونی کننده، بررسی میزان مقاومت به مواد ضد عفونی کننده باکتری‌ها را در محیط‌های بیمارستانی بسیار با اهمیت نموده است (۵).

افزایش پیدایش مقاومت در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به مواد ضد میکروبی به‌خصوص ترکیب‌های آمونیوم چهار ظرفیتی در سراسر جهان گزارش شده است و در این زمینه ارتباط حضور ژن qacE در سودوموناس آئروژینوزاها با مقاومت به مواد ضد عفونی کننده مورد تأیید قرار گرفته است. به‌خصوص توانایی تبادل‌های ژنتیکی در بین باکتری‌های گرم منفی و مقاوم به مواد ضد میکروبی سبب افزایش فراوانی سویه‌های مختلف مقاوم و ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی شده است. از این رو هدف از این تحقیق بررسی حضور ژن qacE در سودوموناس آئروژینوزاها موجود در محیط‌های بیمارستانی در جامعه و آن هم در شهرهای پر جمعیت هم‌چون تهران بوده است تا راه‌گشایی برای کاربرد سیستم‌های بهداشتی مناسب در این زمینه باشد.

روش کار

جمع‌آوری نمونه - در این مطالعه پژوهشی، ۷۰ نمونه غیر

بالینی به وسیله سوآپ استریل مرطوب، از محیط چهار بیمارستان در شرق تهران، جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه منتقل شد.

مشاهده خصوصیت‌های مورفولوژیک - نمونه‌های

جمع‌آوری شده در محیط BHI آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری شد. پس از ۲۴ ساعت کلنی‌ها بر روی محیط ظاهر شد. ابتدا ظاهر کلنی‌ها و بوی شبیه انگور در روی محیط آگار دار مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر بررسی ظاهر کلنی و بوی آن، همولیز در آگار خون‌دار و هم‌چنین موکوئیدی بودن کلنی‌ها و نیز پیگمان‌های زرد- سبز یا سبز- آبی یا آبی بررسی گردید.

واکنش رنگ‌آمیزی افتراقی گرم - رنگ‌آمیزی گرم

روی کشت‌های ۲۴-۱۸ ساعته انجام شد. باکتری‌های گرم

انکوباسیون در دمای ۳۷°C از کلنی های خالص آن برای استخراج DNA کروموزومی استفاده شد.

۱- استخراج DNA - جهت بررسی حضور ژن qacE با روش PCR، استخراج مواد ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA مخصوص باکتری های گرم منفی، از شرکت MBST انجام گرفت.

۲- واکنش زنجیره پلی مرز PCR - پس از استخراج مواد ژنومی برای انجام PCR، پرایمرهای اختصاصی مطابق با جدول ۱ به کار برده شد. همچنین مقدار مواد به کار رفته در PCR و شرایط انجام واکنش به ترتیب در جدول ۲ و ۳ نشان داده شده است.

شد. لوله شماره ۱۳ به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد و بیوساید به آن اضافه نگردید. سپس به تمامی لوله ها غیر از لوله شاهد منفی (لوله شماره ۱۲ که فاقد سوسپانسیون باکتری است)، ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری معادل با کدورت نیم مک فارلند افزوده شد و لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. نتایج پس از ۲۴ ساعت از نظر رشد میکروبی مورد بررسی قرار گرفتند. کم ترین غلظتی از بیوساید که مانع رشد باکتری شده و کدورتی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) بر حسب میکروگرم در میلی لیتر گزارش گردید.

تشخیص مولکولی - پس از تشخیص با استفاده از تست های بیوشیمیایی به منظور تأیید نهایی ایزوله مورد نظر را بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده و پس از ۲۴ ساعت

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تعیین حضور ژن qacE

| | |
|---------|---------------------------------|
| ژن qacE | توالی پرایمر 5'-3' |
| | Forward 5'- ATGAAAGGCTGGCTT -3' |
| | Reverse 5'- TCACCATGGCGTCGG -3' |

جدول ۲- مواد مورد استفاده برای واکنش PCR

| مخلوط مواد PCR | مقدار مواد برای یک نمونه (μl) |
|-------------------------------|-------------------------------|
| • آب دوبار تقطیر و غیر یونیزه | 9/5 |
| • Master mix | 1۲/۵ |
| • پرایمر چپ | ۱ |
| • پرایمر راست | ۱ |
| • DNA نمونه | ۱ |
| حجم کلی بر حسب μl | ۲۵ |

جدول ۳- شرایط انجام واکنش زنجیره پلیمرز در ترموسایکلر برای ژن qacE

| چرخه های دمایی PCR | دما (°C) | زمان | تعداد سیکل |
|--------------------|----------|----------|------------|
| مرحله واسرشتگی | ۹۴ | ۴۵ ثانیه | - |
| مرحله اتصال | ۵۵ | ۴۵ ثانیه | - |
| مرحله طولیل شدن | ۷۲ | ۶۰ ثانیه | ۳۵ |
| چرخه نهایی | ۷۲ | ۵۵ دقیقه | - |

اختصاصی، ۱۵ نمونه سودوموناس ائروژینوزا، توسط تست های تشخیصی (رنگ آمیزی گرم، تست های بیوشیمیایی، تست های اکسیداز و کاتالاز، کشت در دمای ۴۲ ° C و محیط سیتریمید آگار) جداسازی و شناسایی شد.

بررسی خصوصیت های مورفولوژیکی - خصوصیت های کلنی ها از روی کشت سویه ها بر روی محیط EMB و BHI و رشد در دمای ۳۷ ° C به مدت ۲۴ ساعت مشخص شد. همه ایزوله ها گرم منفی و میله ای شکل و کوکو باسیل بودند. هم چنین پس از انجام رنگ آمیزی گرم باکتری ها، گرم منفی و به رنگ صورتی زیر میکروسکپ مشاهده شدند.

الکتروفورز و مشاهده باندها حاصل از PCR - پس از اتمام واکنش های PCR، محصول واکنش، الکتروفورز گردید. برای انجام الکتروفورز از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. سپس با رنگ آمیزی به وسیله اتیدیوم برامید باندهای حاصل از محصول PCR برای ژن مورد نظر مشاهده شد.

نتایج

تشخیص ایزوله های باکتریایی - ۷۰ نمونه از سطوح داخل اماکن، زمین و وسایل بیمارستان به کمک سواب مرطوب جمع آوری شد، بعد از کشت بر روی محیط های

نتایج تست های بیوشیمیایی - نتایج کشت باکتری سودوموناس آئروژینوزا روی محیط های کشت افتراقی که به منظور شناسایی و جداسازی باکتری انجام گرفته است در جدول ۴ آمده است.

نتایج آزمون کاتالاز و اکسیداز - سودوموناس آئروژینوزا پس از مجاورت با اکسیداز رنگ بنفش تولید نمود و اکسیداز مثبت گزارش شد و در حضور آب اکسیژنه H₂O₂ به علت دارا بودن آنزیم کاتالاز در این باکتری حباب اکسیژن تولید شد و کاتالاز مثبت گزارش شد.

جدول ۴- نتایج تست های بیوشیمیایی برای شناسایی و جداسازی باکتری سودوموناس آئروژینوزا

| تست های بیوشیمیایی | رنگ آمیزی گرم | کاتالاز | اکسیداز | سیتریمد آگار | TSI | SIM | اوره | سیمون سیترات | MR | VP | OF | |
|---------------------|---------------|---------|---------|--------------|---------|------|------|--------------|----|----|-------|----------|
| | | | | | | | | | | | هوازی | بی هوازی |
| سودوموناس آئروژینوز | - | + | + | کلنی سبز | alk/alk | -- + | + | + | - | - | - | + |

نتایج حاصل از آنتی بیوگرام به روش ماکرودیلوشن براث - ۱۵ نمونه باکتری سودوموناس آئروژینوزا ایزوله شده برای سنجش حساسیت نسبت به بیوساید به روش ماکرودیلوشن براث، آنتی بیوگرام شدند و تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) آنها نسبت به ماده بیوسایدی دکوتکس به دست آمد. نتایج آنتی بیوگرام در جدول ۵ آورده شده است.

رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد - رشد سودوموناس آئروژینوزا در دمای ۴۲ C° در محیط نوترینت براث سبب تمایز این ارگانسیم از بقیه گونه های سودوموناس می گردد بنابراین کدورت در محیط کشت که نشانه رشد باکتری است مشاهده شد.

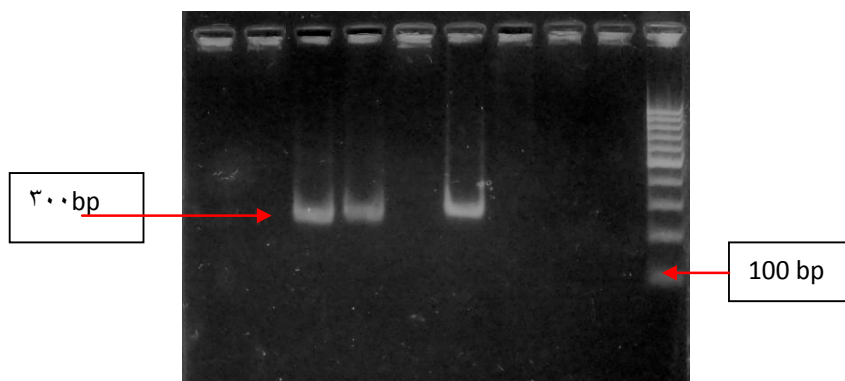
بررسی رشد در محیط ستریمید آگار - به علت حضور ترکیب ستریمید در محیط کشت ستریمید آگار و توانایی باکتری سودوموناس آئروژینوزا در رشد روی این محیط کشت، جداسازی انتخابی و افزایش تولید پیگمان باکتری سودوموناس آئروژینوزا در محیط ستریمید آگار مشاهده شد.

جدول ۵- تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی رشد بیوساید برای سودوموناس آئروژینوزاهای ایزوله شده

| میزان MIC بر حسب $\mu\text{g/ml}$ | باکتری سودوموناس آئروژینوزا |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| ۷۵ $\mu\text{g/m}$ | نمونه ۱۲ |
| ۴۰۰ $\mu\text{g/m}$ | نمونه ۳ |

نتایج حاصل از PCR - از ۱۵ نمونه سودوموناس آئروژینوزای جداسازی شده ۱۲ نمونه دارای ژن qacE بودند و فراوانی ژن qacE در باکتری های سودوموناس آئروژینوزا ایزوله شده ۲۴٪ بود. حضور ژن qacE در شکل ۱ نشان داده شده است. برای مشاهده باند محصول PCR برای ژن qacE از مارکر مولکولی ۱۰۰ bp و ویال بدون DNA به عنوان کنترل منفی و نمونه شارپ دارای باند ۳۰۰ bp به عنوان کنترل مثبت، استفاده شد.

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰



شکل ۱- محصول PCR حاصل از تکثیر ژن qacE (۳۰۰ bp)

خانه شماره ۱- مارکر مولکولی ۱۰۰ bp، خانه شماره ۵- کنترل مثبت، خانه شماره ۶- کنترل منفی، خانه های شماره ۷ و ۸ نمونه سودوموناس ائروژینوزای مقاوم دارای ژن qacE.

بحث

به تحمل آن است بر روی آن باقی می ماند. در این مطالعه از ۷۰ نمونه جدا شده از محیط بیمارستان ۱۵ نمونه سودوموناس ائروژینوزا بود، که از این ۱۵ نمونه ۱۲ نمونه دارای MIC (حداقل غلظت مهار کنندگی رشد) برابر با ۷۵ و ۳ و ۳ نمونه دارای MIC (حداقل غلظت مهار کنندگی رشد) برابر با ۴۰۰ $\mu\text{g}/\text{m}$ بودند. ۱۲ نمونه (۲۴٪) حاوی ژن qacE بودند.

کازاما و همکارانش در سال ۱۹۹۷ برای جداسازی سودوموناس ائروژینوزا از سایر باکتری های گرم منفی از محیط BHI آگار و BHI برات استفاده کردند. نوع محیط کشتی که آنها برای جداسازی نمونه ها استفاده کردند با محیط کشتی که در این مطالعه برای سویه ها استفاده شد مطابقت داشت (۵). در سال ۲۰۱۰ یوسفی و همکارانش، باکتری های سودوموناس ائروژینوزا را از خون، زخم و ادرار جدا سازی کردند و آنها را توسط تست های بیوشیمیایی مانند رنگ آمیزی گرم، تست اکسیداز و کاتالاز و رشد در محیط ستریمید آگار شناسایی کردند. روش های بیوشیمیایی و محیط کشت اختصاصی که یوسفی و همکارانش در مطالعه خود بر روی سودوموناس ائروژینوزا برای شناسایی و ایزوله استفاده کرده بود با روش ها و محیط های کشت اختصاصی در این بررسی مطابقت داشت (۲۱).

در سال ۲۰۰۰ کوکن و همکارانش برای ۳۷ نمونه سودوموناس ائروژینوزا، MIC نسبت به ترکیب های چهارتایی آمونیوم را تعیین کردند. آنها برای ۳۳ نمونه MIC ۷۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$ برای ۳ نمونه MIC ۱۰۰-۱۰۰۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$ و برای یک نمونه MIC ۵۰۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$ را گزارش کردند (۱). مطالعه حاضر با بررسی این محققان مطابقت دارد. سانهم و همکارانش در سال ۱۹۹۷، مقاومت نسبت به ترکیب های چهارتایی آمونیوم را تعیین کردند. آنها برای ۳۰ نمونه از ۶۰۰ مورد آزمایش MIC تعیین کردند. آنها سودوموناس ها را به دو گروه مقاوم با

سودوموناس ائروژینوزا پاتوژن فرصت طلب انسانی است. این باکتری به طور معمول بیماری که نقص در سیستم ایمنی خود دارند را مورد حمله قرار می دهد مثل افرادی که از بیماری هایی مانند سیستمیک فیبروزیس ریوی، سرطان یا ایدز رنج می برند (۹). این باکتری پاتوژن بسیار مهمی است زیرا اغلب به بیماران بستری در بیمارستان ها حمله کرده و باعث ایجاد بیماری های بسیار خطرناک تر در آنها می شود. سودوموناس ائروژینوزا عامل بیشترین عفونت با باکتری های گرم منفی است که ۴۰ تا ۶۰ درصد مرگ و میر را شامل می شود. در میزان بالای از مرگ و میرهایی ناشی از سیستمیک فیبروزیس ریوی دخالت دارد و در نهایت این باکتری همیشه جزو یکی از سه باکتری گرم منفی پاتوژن است که سبب بدترین بیماری های عفونی می شود (۹). این باکتری هم چنین مقاومت ذاتی بالایی را به بسیاری از ترکیب های ضد میکروبی و آنتی-بیوتیکی نشان می دهد و این مسئله باعث ایجاد مشکل در از بین بردن و حذف آنها شده است (۲).

در این تحقیق نمونه هایی از محیط های بیمارستانی جمع آوری شد و ابتدا بر روی محیط BHI آگار کشت داده شدند. سپس، به وسیله تست های بیوشیمیایی از جمله کشت بر روی محیط های مک کانکی آگار، TSI، SIM، سیمون سترات، ستریمید آگار و تست های اکسیداز و کاتالاز شناسایی شدند. بعد از تأیید سودوموناس ائروژینوزا بودن این باکتری ها، نمونه های مورد نظر بر روی محیط ستریمید آگار که محیط اختصاصی برای سودوموناس ائروژینوزا است به منظور مطالعه بیشتر کشت و نگهداری شدند. این محیط به دلیل داشتن ستریمید که نوعی ترکیب ضد میکروبی است از رشد سایر باکتری ها جلوگیری کرده و تنها سودوموناس ائروژینوزا که قادر

کردند و ژن *qacE* را در هیچ یک از سویه‌ها مشاهده نکردند (۱۵). محزونیه و همکارانش در سال ۲۰۱۳ به بررسی ژن‌های ایجاد کننده مقاومت به ترکیب‌های آمونیوم چهار ظرفیتی در باکتری‌های سودوموناس و اسنیتوباکتر جدا شده از سوختگی‌ها از بیمارستان‌های تهران و اصفهان پرداختند، از ۸۳ نمونه سودوموناس ۵۰٪ دارای ژن *qacE* و ۹۱.۵٪ دارای ژن *qacEΔ1* بودند. از ۵ نمونه اسنیتوباکتر ۴۰٪ دارای *qacE* و ۸۰٪ دارای *qacEΔ1* بودند (۱۰). مطالعه حاضر با بررسی محزونیه و همکارانش مطابقت دارد. کوکن و همکارانش در سال ۲۰۰۰ به بررسی ۱۰۳ نمونه بیمارستانی گرم منفی در کشور آلمان پرداختند که تنها یک نمونه از ۳۷ نمونه سودوموناس جدا شده دارای ژن *qacE* بود (۶). که با بررسی انجام شده بر روی ژن *qacE* در سویه سودوموناس آئروژنوزا مطابقت داشت. هلال و همکارانش در سال ۲۰۱۵ اثر آنتی-بیوتیک و آنتی‌سپتیک را بر روی اثر ساولون، فنل، فرمالین و کلر را بر روی سودوموناس آئروژنوزا بررسی کردند و از میان ۱۳۶ ایزوله سودوموناس آئروژنوزا ۸۹/۷۵ درصد از نمونه‌ها به عوامل ضد میکروبی مقاوم بودند و شیوع ژن *qacE* در این میان ۴۲/۳ درصد بود (۳).

از مقایسه نتایج این تحقیق با سایر مطالعه‌های انجام شده در سراسر دنیا مشخص گردیده است که پیدایش سویه‌های سودوموناس آئروژنوزای مقاوم به مواد ضد میکروبی در محیط بیمارستان و نمونه‌های کلینیکی در حال افزایش است و این سویه‌ها با مقاوم شدن ژنتیکی و انتقال ژن‌های کد کننده مقاومت به آنتی‌سپتیک‌ها بین سویه‌های پاتوژن همراه می‌باشند که مشکل جدی در تهدید سیستم‌های بهداشتی برای کنترل و درمان عفونت با این باکتری به شمار می‌روند.

نتیجه گیری

امروزه استفاده نادرست و بیش از اندازه از مواد بیوسایدی موجب پیدایش سویه‌های مقاوم در بین باکتری‌ها از جمله سودوموناس آئروژنوزا شده است که عامل اصلی مرگ و میر در بیماران به‌خصوص بیمارانی با سیستم ایمنی ضعیف شده است. این سویه‌ها با بیان ژن مقاومت به *qacE* قادر هستند میزان بیش‌تری از این بیوسایدها را تحمل کنند که باعث مزیت انتخاب آن‌ها نسبت به سایر سویه‌ها شده است. بیوسایدهایی که در مراکز کلینیکی و بیمارستان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند مانند ترکیب‌های چهار تایی آمونیوم اگر با غلظت مناسب و توصیه شده توسط تولید کننده مصرف گردند، تمامی باکتری‌های بیماریزا از جمله سودوموناس آئروژنوزا را که عامل اصلی عفونت در بیماران مبتلا به بیماری‌های ریوی و به-

MIC بالاتر از $200 \mu\text{g/ml}$ و سویه‌های حساس با MIC پایین‌تر از $200 \mu\text{g/ml}$ گروه‌بندی کردند. MIC که این محققان برای سویه‌های حساس تعیین کردند بین $70 \mu\text{g/ml}$ - ۵۰ و برای سویه‌های مقاوم بیش‌تر از $200 \mu\text{g/ml}$ بود (۸) در مطالعه حاضر MIC ۱۲ نمونه از سودوموناس آئروژنوزا $75 \mu\text{g/ml}$ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در ۳ نمونه دیگر $400 \mu\text{g/ml}$ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد و در ۱۲ نمونه (۲۴٪) حضور ژن *qacE* مشاهده شد. وجود این ژن در سودوموناس آئروژنوزاهای غیر کلینیکی به احتمال حاکی از ورود ترکیب‌های بیوسایدی به محیط‌های خارج از مراکز کلینیکی و در نتیجه مقاوم شدن باکتری‌ها به این ترکیب‌ها یا وجود باکتری‌هایی می‌باشد که از قبل این ژن را داشتند و در محیط‌های غیز کلینیکی حضور دارند. این باکتری‌های مقاوم شده می‌توانند از طرق مختلف به محیط داخل بیمارستان‌ها انتقال یابند و عامل مهمی برای شیوع عفونت‌های بیمارستانی به شمار آیند.

در سال ۲۰۰۰، کوکن و همکارانش به بررسی فراوانی ژن‌های *qacE/qacEΔ1* در میان باکتری‌های گرم منفی مانند انتروباکتر کلواکه، سیتروباکتر فروندی، سودوموناس آئروژنوزا پرداختند. نتایج تحقیق آن‌ها حضور ژن *qacEΔ1* را با فراوانی ۱۳/۵٪ در سودوموناس آئروژنوزا، ۹/۴٪ در سیتروباکتر فروندی و ۸/۴٪ در انتروباکتر کلواکه نشان داد. آن‌ها ژن *qacE* را تنها در یک سویه از سودوموناس آئروژنوزا مشاهده کردند (۶). نتایج حاصل از مطالعه این محققان در سال ۲۰۰۰ مطابقت کمی با این بررسی دارد که نشان دهنده افزایش حضور ژن *qacE* در بین سودوموناس آئروژنوزا محیطی در سال‌های اخیر دارد. در سال ۱۹۹۸ کازاما و همکارانش فراوانی ژن‌های *qacE/qacEΔ1* را در بین باکتری‌های گرم منفی از جمله سودوموناس آئروژنوزا مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها در بین ۶۳ سویه کلینیکی، ۲۱ سویه حامل ژن *qacEΔ1* مشاهده کردند که ۶۸٪ سویه‌ها را تشکیل می‌داد. ژن *qacE* نیز در ۱۵ سویه از سویه‌های کلینیکی مشاهده شده بود که ۲۴٪ از سویه‌ها را تشکیل می‌داد. این ژن در هیچ یک سویه‌های محیطی دیده نشده بود. ژن *qacEΔ1* نیز در دو سویه از سودوموناس آئروژنوزاهای محیطی دیده شد. علت تفاوت نتایج آن‌ها با نتایج به‌دست آمده در این مطالعه می‌تواند تفاوت در نوع دزانتفکانت مصرفی یا وجود سویه‌های متفاوت از سودوموناس آئروژنوزا باشد. مطالعه حاضر از نظر حضور ژن *qacE* با بررسی کازاما در سال ۱۹۹۸ مطابقت دارد. در سال ۲۰۰۷، چانچن و همکارانش به مطالعه و بررسی ژن‌های *qacE/qacEΔ1* در باکتری گرم منفی سالمونلا پرداختند. آن‌ها از سودوموناس آئروژنوزا به عنوان شاهد مثبت برای این ژن‌ها استفاده کردند. آن‌ها ژن *qacEΔ1* را در ۲۷٪ سویه‌های سالمونلا مشاهده

خصوص بیماران مبتلا به سوختگی است را از بین می‌برند. این مطلب با نتایج حاصل از مطالعه‌های انجام شده در این زمینه، که ارتباط مؤثری بین وجود ژن‌های مقاومت به ترکیب‌های چهارتایی آمونیوم و مقاومت به بیوسایدها را نشان داده است، تأیید می‌گردد. این ارتباط بیانگر این است که استفاده بیش از حد هر نوع ماده ضد میکروبی برای از بین بردن باکتری‌ها نه تنها باعث حذف و از بین رفتن آن‌ها نمی‌شود بلکه می‌تواند به گزینش مقاومت بیوسایدی منجر گردد. بنابراین حضور ژن qacE در سودوموناس آئروژنوزا و توانایی آن در افزایش مقاومت بیولوژیکی آن‌ها و احتمال بروز سویه‌های مقاوم اهمیت بسیار زیادی در کنترل عفونت‌ها از جمله عفونت با باکتری‌های گرم منفی دارد.

سپاسگزاری

از کلیه مسئولین محترم در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال به خصوص دانشکده علوم زیستی و مسئولین بیمارستان‌ها و مراکز درمانی و آزمایشگاهی شرق تهران که در انجام کارهای آزمایشگاهی و تهیه نمونه‌های این تحقیق کمال همکاری و مساعدت لازم را مبذول فرموده اند، سپاسگزاری فراوان می‌گردد.

منابع

1. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K. 2002, Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*. 2002; 359(9320):1819-27.
2. Brian WJ M. Vol 1: Virology, Collier L, Albert Balows A, Sussman M. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. 9th ed, New York, Oxford University Press, 2005, 245-1138.
3. Helal Z H, Khan M I. QacE and qacEΔ1 genes and their correlation to antibiotics and biocides resistance *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Biomed Sci*, 2015; 7(2): 52-62.
4. Ioannou C J, Haanlon G W, Denyer S P. Action of disinfectants quaternary ammonium compounds against *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(1):296-306.
5. Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, Arai T. Distribution of the antiseptic-resistance genes qacE and qacEv1 in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 1998; 159 (2):173-8.
6. Kucken D, Feucht H H, Kaulfers P M. Association of qacE and qacEv1 with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 2000; 183: 95-8.
7. Kummerer K. Resistance in the environment. *J Antimicrob Chemother*, 2004; 54:311-20.
8. Langsrud S, Sundheim G. Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compound. *J Appl Microbiol*. 1997 ; 82(6):705-12.
9. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes infect*, 2000; 2(9):1051-60.
10. Mahzounieh MR, Sheida Khoshnood Sh, Ebrahimi A, Habibian S, Yaghoobian M. Detection of Antiseptic-Resistance Genes in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* spp. Isolated From Burn Patients. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, 2014; 9(2): e15402.
11. Maillard JY. Antimicrobial biocides in the healthcare environment: efficacy, usage, policies, and perceived problems. *Therapeut Clin Risk Manag*. 2005; 1(4):307-20.
12. Moorer WR. Antiviral activity of alcohol for surface disinfection, *Int J Dent Hyg*. 2003; 1(3):138-42.
13. Nobile C, Costantino R, Bianco A, Pileggi C, Pavia M. Prevalence and pattern of antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. in poultry meat in Southern Italy. *Food Control*, 2013; 32:715-8.
14. Paulsen IT, Brown MB, Skurray RA. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev*, 1996; 60: 575-608
15. Rungtip G, Russall AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin microbial Rev*, 1999; 12(1):147-179.
16. Slekovec C, Plantin J, Cholley P, Thouverez M, Talon D, Bertrand X, Hocque D. Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a wastewater network. *PLoS One*, 2012; 7(12):e49300.
17. Sobhy N, Aly F, Abd El Kader O, Ghazal A, Elbaradei A. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from skin and soft tissue infections (in a sample of Egyptian population): Analysis of mec gene and staphylococcal cassette chromosome. *Braz J Infect Dis*, 2012; 16(5):426-31.
18. Sutterlin H, Alexy R, Coker A, Kummerer K. Mixture of quaternary ammonium compounds and anionic organic compounds in the aquatic environment: Elimination and biodegradation ability in the closed bottle test monitored by LC-MS/MS. *Chemosphere*. 2008; 72(3):479-84.
19. Taheri N, Abtahi H, Amozandeh-Nobaveh A, Zarinfar N, Ghaznavi-Rad E. The Antibiotic Resistant Determinant of Pathogenic Bacteria Isolated from Medical Equipment and Hospital Environment in Valiasr Hospital. *J Mazand Univ Med Sci*, 2014; 24(114): 60-73 (Persian).
20. Wenzel R, Bearman G, Brewer T, Butzler JP. Prevention and Control of Nosocomial Infections, Marc F, Force La, Infection control in the Hospitals, 4th edition, U.S.A, International Society for Infectious Diseases, 2008:283-7.
21. Yousefi S, Nahaei MR, Farajnia S, Ghojatzadeh M, Akhi MT, Sharifi Y, Milani M, Ghotaslou R. 2010, Class 1 integron Imipenam resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* : prevalence and antibiotic susceptibility. *Iranian J Microb*, 2010; 2(3):113-9. *J Microb*, 2010; 2(3):113-9.

