Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:46 +0430 on Wednesday April 14th 2021

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هفتم، شماره بیست و هشتم - پائیز ۱۳۹۶

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

جداسازی باکتری سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به مواد ضد میکروبی دارای ژن qacE از محیط‌های 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 آئروژنوزا یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت در بیمارستان است. مصرف گسترده و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها 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 آئروژنوزای مقاوم به مواد بیوسایدی جدا شده از محیط بیمارستان‌ها بود.

مواد و روش‌ها: ۷۰ سویه سودوموناس آئروژنوزا از محیط‌های بیمارستان جمع آوری شد. حساسیت این سویه‌ها نسبت به ماده بیوسایدی دکونکس به روش ماکرودیلوشن براث سنجیده شد. حضور ژن qacE با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بررسی شد.

یافته‌ها: در میان۷۰ نمونه جداشده از محیط بیمارستان ۱۵ نمونه سودوموناس آئروژینوزا بود. در بین باکتری‌های 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.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این بررسی، حضور ژن qacE را در سودوموناس آئروژنوزا نشان داد. با مقایسه سایر یافته در سراسر جهان، افزایش روز افزون مقاومت ژنتیکی باکتری سودوموناس آئروژینوزا را نسبت به مواد بیوسایدی به‌خصوص دکونکس مشخص می‌نماید. این نتایج برای کاربرد سیاست‌های صحیح استفاده از مواد ضد میکروبی حائز اهمیت است.

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

مقدمه

امروزه مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضد عفونی کننده در سویه‌های مختلف یک مشکل سلامتی عمومی در جهان محسوب می‌شود که افزایش روزافزون آن در سطح جهان مطرح است. گزارش‌های مربوط به این مسئله اصولاً بر پایه شناسایی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های گرفته شده در عفونت‌های بیمارستانی بوده‌اند اما در سال‌های اخیر با شناسایی سویه‌های مقاوم به چند دارو Multi Drug Resistant (MDR) به صورت گسترده در کشورهای مختلف، راه های پخش شدن و گسترش ژن های مربوطه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار شده‌اند و پتانسیل این خطر برای سلامت عمومی به خوبی مشخص شده است (۱،۲۰). از جمله مکان‌های پخش و گسترش باکتری‌های مقاوم می‌توان به مکان‌های عمومی هم‌چون مدارس، مراکز خرید، ادارات و سرویس‌های حمل و نقل و محیط‌های بیمارستانی اشاره کرد (۱۳،۱۷).

عفونت‌های بیمارستانی به عنوان عفونت کسب شده در بیمارستان یا عفونت‌های مرتبط با بیمارستان مطرح می‌شود که پس از پذیرش بیمار در بیمارستان ۴۸ تا ۷۲ ساعت یا طی دوره‌ای مشخص ۱۰ تا ۳۰ روز پس از ترخیص رخ می‌دهد و شامل عفونت‌هایی می‌باشد که در هنگام پذیرش بیمار در بیمارستان وجود ندارد بلکه در طول اقامت بیمار در بیمارستان به‌وجود می‌آیند. عفونت بیمارستانی از ۵/۲ تا ۱۰ درصد متغیر بوده و طی ۲۰ سال تا ۳۶ درصد افزایش یافته است. به گفته

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

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:46 +0430 on Wednesday April 14th 2021

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 ائروژینوزا 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 الیگوترفیک 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 intensive care unit (ICU) وجود دارد که در آنجا حدود ۱۵٪ از عفونت‌های مربوطه را تشکیل می‌دهد (۱۶).

سودوموناس آئروژنوزا یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌ها به‌ویژه در میزبان‌هایی با ایمنی متوسط است و باکتریمی 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 (دزانفکتانت‌ها- 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 آئروژنوزا در بخش‌های هماتولوژی و انکولوژی در ارتباط با آلودگی سطوح وسایل بیماران است به‌خصوص هنگامی‌که از محلول‌های تمیز کننده غیر جرم‌گیر به‌جای دزانفکتانت‌ها برای ضد عفونی کردن محیط بیماران استفاده می‌شود (۱۲).

ترکیب‌های شیمیایی متفاوتی به‌عنوان دزانفکتانت در مراکز کلینیکی استفاده می‌شوند مانند گلوتارآلدهید، ترکیب‌های چهار تایی آمونیوم سورفاکتانت هایی کاتیونیک هستند که به‌طور وسیع برای کنترل رشد باکتری‌ها در محیط‌های بیمارستانی و صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این ترکیب‌ها 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,R_2,R_3,R_{+4},X- هستند .گروه R می‌توانند 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 میکرواورگانیسم‌ها، 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 ضدمیکروبی 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 برعلیه 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 میسل های تجمع یافته، حل نماید . اختلال و تخریب پروتئین های ساختاری و آنزیم های 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 sul1 عامل مقاومت به

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:46 +0430 on Wednesday April 14th 2021

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 می-نماید (۴). بنابراین از یک سو افزایش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و از سوی دیگر افزایش استفاده از مواد ضدعفونی 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 ائروژینوزای 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 ائروژینوزاهای مقاوم به مواد ضد عفونی کننده مورد تأئید 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 آئروژنوزاهای 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 جمع آوری 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 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 سیترات، 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 براث 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 ارگانیسم از بقیهٔ گونه‌های سودوموناس کمک می‌نماید).

بررسی رشد در محیط ستریمید آگار- از سیتریمید آگار نیز برای جداسازی انتخابی باکتری سودوموناس آئروژینوزا و افزایش تولید پیگمان استفاده می‌گردد. (به‌علت حضور سیتریمید)

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 براث افزوده، سپس ۱ ml از محلول های بیوسایدهای 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

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:46 +0430 on Wednesday April 14th 2021

شد. لوله شماره ۱۳ به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد و بیوساید به آن اضافه نگردید. سپس به تمامی لوله‌ها غیر از لوله شاهد منفی (لوله شماره ۱۲ که فاقد سوسپانسیون باکتری است)، ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری معادل با کدورت نیم مک‌فارلند افزوده شد و لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 میلی‌لیتر گزارش گردید.

تشخیص مولکولی – پس از تشخیص با استفاده از تست-های بیوشیمیایی به‌منظور تأئید نهایی ایزوله مورد نظر را بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده و پس از ۲۴ ساعت 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 باکتری‌های گرم منفی، از شرکت MBST انجام گرفت.

۲- واکنش زنجیره پلی‌مراز PCR- پس از استخراج مواد ژنومی برای انجام PCR، پرایمرهای اختصاصی مطابق با جدول ۱ به کار برده شد. هم‌چنین مقدار مواد به‌کار رفته در PCR و شرایط انجام واکنش به‌ترتیب در جدول۲ و ۳ نشان داده شده است.

جدول۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تعیین حضور ژن qacE

ژن	توالی پرایمر 5´-3´
qacE	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	۱۲/۵
• پرایمر چپ	۱
• پرایمر راست	۱
• DNA نمونه	۱
حجم کلی بر حسب µl	۲۵

جدول ۳- شرایط انجام واکنش زنجیرهایی پلیمراز در ترموسایکلر برای ژن qacE

چرخه های دمایی PCR	دما (°c)	زمان	تعداد سیکل
مرحله واسرشتگی	۹۴	۴۵ ثانیه	-
مرحله اتصال	۵۵	۴۵ثانیه	-
مرحله طویل شدن	۷۲	۶۰ثانیه	۳۵
چرخه نهایی	۷۲	۵دقیقه	-

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

نتایج

تشخیص ایزوله‌های باکتریایی- ۷۰ نمونه از سطوح داخل اماکن ، زمین و وسایل بیمارستان به کمک سواب مرطوب جمع آوری شد، بعد از کشت بر روی محیط‌های اختصاصی، ۱۵ نمونه سودوموناس ائروژینوزا، توسط تست های تشخیصی (رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های بیوشیمیایی، تست‌های اکسیداز و کاتالاز، کشت در دمای c ° ۴۲ و محیط سیتریمید آگار) جداسازی و شناسایی شد.

بررسی خصوصیت‌های مورفولوژیکی- خصوصیت‌های کلنی-ها از روی کشت سویه‌ها بر روی محیط EMB وBHI و رشد در دمای c ° ۳۷ به مدت ۲۴ ساعت مشخص شد. همه ایزوله‌ها گرم منفی و میله‌ای شکل و کوکو باسیل بودند. هم‌چنین پس از انجام رنگ‌آمیزی گرم باکتری‌ها، گرم منفی و به رنگ صورتی زیر میکروسکپ مشاهده شدند.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:46 +0430 on Wednesday April 14th 2021

نتایج آزمون کاتالاز و اکسیداز- سودوموناس آئروژنوزا 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.

نتایج تست‌های بیوشیمیایی- نتایج کشت باکتری سودوموناس آئروژینوزا روی محیط‌های کشت افتراقی که به‌منظور شناسایی و جداسازی باکتری انجام گرفته است در جدول ۴ آمده است.

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

تست های بیوشیمیایی	رنگ‌آمیزی گرم	کاتالاز	اکسیداز	سیتریمیدآگار	TSI	SIM	اوره	سیمون سیترات	MR	VP	OF	
											بیهوازی	هوازی
سودوموناس آئروژینوز	-	+	+	کلنی سبز	alk/alk	- - +	+	+	-	-	-	+

رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد- رشد سودوموناس آئروژینوزا در دمای C° ۴۲ در محیط نوترینت براث سبب تمایز این ارگانیسم از بقیهٔ گونه‌های سودوموناس می‌گردد بنابراین کدورت در محیط کشت که نشانه رشد باکتری است مشاهده شد.

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

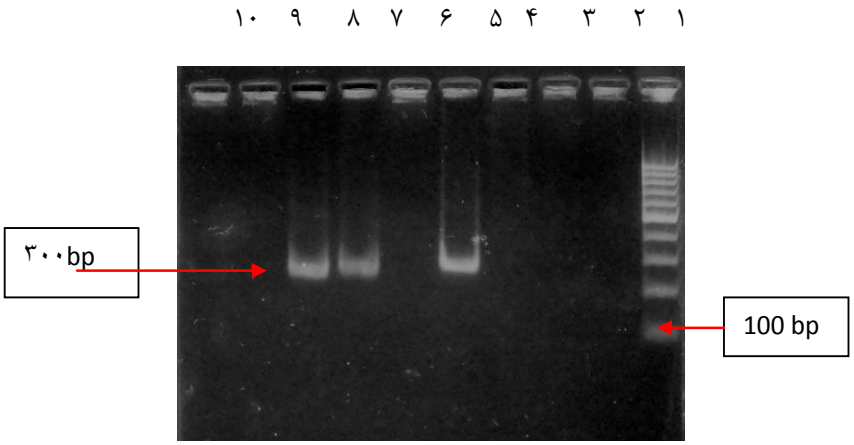
نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام به روش ماکرودیلوشن براث – ۱۵ نمونه باکتری سودوموناس آئروژنوزا ایزوله شده برای سنجش حساسیت نسبت به بیوساید به روش ماکرودیلوشن براث، آنتی بیوگرام شدند و تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) آن‌ها نسبت به ماده بیوسایدی دکوتکس به‌دست آمد. نتایج آنتی‌بیوگرام در جدول ۵ آورده شده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

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

باکتری سودوموناس آئروژنوزا	میزان MIC برحسب µg/ml
۱۲ نمونه	۷۵ µg/m
۳ نمونه	۴۰۰ µg/m

نتایج حاصل از PCR- از ۱۵ نمونه سودوموناس ائروژینوزای جداسازی شده ۱۲ نمونه دارای ژن qacE بودند و فراوانی ژن qacE در باکتری‌های سودوموناس ائروژینوزا 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 bp ۱۰۰ و ویال بدون DNA به‌عنوان کنترل منفی و نمونه شارپ دارای باند bp ۳۰۰ به‌عنوان کنترل مثبت، استفاده شد.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:46 +0430 on Wednesday April 14th 2021



شکل ۱- محصول PCR حاصل از تکثیر ژن qacE (۳۰۰ bp)
خانه شماره۱- مارکر مولکولی ۱۰۰ bp، خانه شماره۵- کنترل مثبت، خانه شماره ۶- کنترل منفی،
خانه های شماره ۷ و ۸ نمونه سودوموناس ائروژینوزای مقاوم دارای ژن qacE.

بحث

سودوموناس آئروژینوزا پاتوژن فرصت طلب انسانی است. این باکتری به‌طور معمول بیمارانی که نقص در سیستم ایمنی خود دارند را مورد حمله قرار می‌دهد مثل افرادی که از بیماری‌هایی مانند سیستیک فیبروزیس ریوی، سرطان یا ایدز رنج می‌برند (۹). این باکتری پاتوژن بسیار مهمی است زیرا اغلب به بیماران بستری در بیمارستان‌ها حمله کرده و باعث ایجاد بیماری‌های بسیار خطرناک‌تر در آن‌ها می‌شود. سودوموناس آئروژینوزا عامل بیش‌ترین عفونت با باکتری‌های گرم منفی است که ۴۰ تا ۶۰ درصد مرگ و میر را شامل می‌شود. در میزان بالایی از مرگ و میرهایی ناشی از سیستیک فیبروزیس ریوی دخالت دارد و در نهایت این باکتری همیشه جزو یکی از سه باکتری گرم منفی پاتوژن است که سبب بدترین بیماری‌های عفونی می‌شود (۹). این باکتری هم‌چنین مقاومت ذاتی بالایی را به بسیاری از ترکیب‌های ضد میکروبی و آنتی-بیوتیکی نشان می‌دهد و این مسئله باعث ایجاد مشکل در از بین بردن و حذف آن‌ها شده است (۲).

در این تحقیق نمونه‌هایی از محیط‌های بیمارستانی جمع آوری شد و ابتدا بر روی محیط BHI آگار کشت داده شدند. سپس ، به‌وسیله تست‌های بیوشیمیایی از جمله کشت بر روی محیط-های مک کانکی آگار، TSI، SIM، سیمون سیترات، سیتریمید آگار و تست‌های اکسیداز و کاتالاز شناسایی شدند. بعد از تأیید سودوموناس آئروژینوزا بودن این باکتری‌ها، نمونه-های مورد نظر بر روی محیط سیتریمید آگار که محیط اختصاصی برای سودوموناس آئروژینوزا است به منظور مطالعه بیش‌تر کشت و نگهداری شدند. این محیط به دلیل داشتن سیتریمید که نوعی ترکیب ضد میکروبی است از رشد سایر باکتری‌ها جلوگیری کرده و تنها سودوموناس آئروژینوزا که قادر به تحمل آن است بر روی آن باقی می‌ماند. در این مطالعه از ۷۰ نمونه جدا شده از محیط بیمارستان ۱۵ نمونه سودوموناس آئروژینوزا بود، که از این ۱۵ نمونه ۱۲ نمونه دارای MIC (حداقل غلظت مهار کنندگی رشد) برابر با ۷۵ µg/m و ۳ نمونه دارای MIC (حداقل غلظت مهار کنندگی رشد) برابر با ۴۰۰ µg/m بودند. ۱۲ نمونه (۲۴٪) حاوی ژن qacE بودند.

کازاما و همکارانش در سال ۱۹۹۷ برای جداسازی سودوموناس آئروژنوزا از سایر باکتری‌های گرم منفی از محیط BHI آگار و BHI براث استفاده کردند. نوع محیط کشتی که آنها برای جداسازی نمونه ها استفاده کردند با محیط کشتی که در این مطالعه برای سویه‌ها استفاده شد مطابقت داشت (۵). در سال ۲۰۱۰ یوسفی و همکارانش، باکتری‌های سودوموناس آئروژنوزا را از خون، زخم و ادرار جدا سازی کردند و آنها را توسط تست-های بیوشیمیایی مانند رنگ‌آمیزی 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 آئروژنوزا برای شناسایی و ایزوله استفاده کرده بود با روش‌ها و محیط‌های کشت اختصاصی در این بررسی مطابقت داشت (۲۱).

در سال ۲۰۰۰ کوکن و همکارانش برای ۳۷ نمونه سودوموناس آئروژنوزا، MIC نسبت به ترکیب‌های چهارتایی آمونیوم را تعیین کردند. آنها برای ۳۳ نمونه MIC،۷۰µg/ml برای ۳ نمونه MIC µg/ml ۱۰۰-۱۰۰۰ و برای یک نمونه MIC ۵۰۰ µg/ml را گزارش کردند (۱). مطالعه حاضر با بررسی این محققان مطابقت دارد. سانهیم و همکارانش در سال ۱۹۹۷، مقاومت نسبت به ترکیب‌های چهارتایی آمونیوم را تعیین کردند. آنها برای ۳۰ نمونه از ۶۰۰ نمونه مورد آزمایش MIC تعیین کردند. آنها سودوموناس‌ها را به دو گروه مقاوم با

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:46 +0430 on Wednesday April 14th 2021

MIC بالاتر از ۲۰۰ µg/ml و سویه‌های حساس با MIC پایین‌تر از ۲۰۰ µg/ml گروه‌بندی کردند. MIC که این محققان برای سویه‌های حساس تعیین کردند بین ۷۰ µg/ml-۵۰ و برای سویه‌های مقاوم بیش‌تر از ۲۰۰ µg/ml بود (۸) در مطالعه حاضرMIC ۱۲ نمونه از سودوموناس آئروژنوزا ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در ۳ نمونه دیگر ۴۰۰ 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 باکتری هایی 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 ژن های qacE/qacEΔ1 در میان باکتری‌های گرم منفی مانند انتروباکتر کلوآکه، 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 کلوآکه 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 می داد. این ژن در هیچ‌یک 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 دزانفکتانت 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 کردند و ژن qacE را در هیچ‌یک 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 سال۲۰۰۰ 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 برروی 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 ائروژینوزای 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 می-باشند که مشکل جدی در تهدید سیستم‌های بهداشتی برای کنترل و درمان عفونت با این باکتری به شمار می‌روند.

نتیجه‌گیری

امروزه استفاده نادرست و بیش از اندازه از مواد بیوسایدی موجب پیدایش سویه‌های مقاوم در بین باکتری‌ها از جمله سودوموناس آئروژینوزا 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 بیمارستان ها مورد استفاده قرار می گیرند 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-

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:46 +0430 on Wednesday April 14th 2021

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 باکتری ها نه تنها باعث حذف و از بین رفتن آن‌ها نمی شود بلکه می تواند 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.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:46 +0430 on Wednesday April 14th 2021

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, SussmanM. Topley and Wison'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 disinfectsnt 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 infectione:lessonsn from a versatile opportunist. Microbes infect, 2000; 2(9):1051-60.
10. Mahzounieh MR, Sheida Khoshnood Sh, Ebrahimi A, Habibian S,Yaghoubian 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 Clinic 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. Protondependent multidrug efflux systems. Microbiol. Rev, 1996; 60: 575-608
15. Rungtip G, Russall AD. Antisptics 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 aquntic environment: Elimintion and biodegrade ability in the closed bottle lest monitored by LC-MS/MS. Chemosphere. 2008; 72(3):479-84.
19. Taheri1 N, Abtahi H, Amozande-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, 4rd edition, U.S.A, International Society for Infectious Diseases, 2008:283-7.
21. Yousefi S, Nahaei MR, Farajnia S, Ghojazadeh 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.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 6:46 +0430 on Wednesday April 14th 2021