فراوانی ژن های rhlR، rhlI و lasR در سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از عفونت های ادراری در مراکز درمانی شهر تهران. ۱۳۹۵

الهام سیاسی[1]* ، سیده رایا قاضی[2]

۱-استادیار، گروه میکروبیولوژی،دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی ،واحد تهران شمال، تهران، ایران.
۲-کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی،دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد تهران شمال، تهران ، ایران.
***نشانی برای مکاتبه:** میدان هروی – خیابان مکران جنوبی – بوستان دهم – دانشکده علوم زیستی - گروه میکروبیولوژی (هیئت علمی تمام وقت). تلفن : ۰۹۱۲۴۰۵۶۷۴۶- نمابر : ۰۲۱۲۲۹۲۴۸۳۳ - emi_biotech2006@yahoo.ca

دریافت مقاله: فروردین نود و شش پذیرش برای چاپ: خرداد نود و شش

چکیده

سابقه و هدف- *سودوموناس ائروژینوزا از باکتری های شایع ایجاد کننده عفونت های مجاری ادراری است که تشخیص آن جهت درمان مناسب از اهمیت بالایی برخوردار است. این باکتری ، دو سیستم کامل کروم سنسینگ دارد که سبب فعال سازی ژن های بیماریزا می شود. هدف از انجام این تحقیق، جداسازی سودوموناس ائروژینوزا مقاوم به دارو از عفونت های ادراری و تشخیص مولکولی ژن های کروم سنسینگ (rhII ، rhIR و lasR) به عنوان مارکر ژنتیکی در شناسایی این باکتری بود.*

روش کار: *۱۵۰ نمونه ادرار از بیماران جمع آوری شد. سویه های سودوموناس ائروژینوزا از نمونه ها با استفاده از تست های بیوشیمیایی شناسایی شد. آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن بررسی شد. از نمونه های مقاوم استخراج DNA انجام گرفت. سپس حضور ژن های rhlR، rhlI و lasR با تکنیک PCR بررسی شد.*

یافته ها- *تعداد ۲۳ سویه سودوموناس ائروژینوزا از نمونه های ادرار جدا شد. بیشترین مقاومت نسبت به سفتازیدیم و مروپنم و کمترین مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین و پیپراسیلین- تازوباکتام بود. ژن های rhlR، rhlI و lasR به ترتیب در ۱۱ ، ۲ و ۱۵ نمونه از سویه های مقاوم مشاهده شد.*

نتیجه گیری- *نتایج نشان داد ژن های کروم سنسینگ در سویه های سودوموناس ائروژینوزا مقاوم حضور دارند. نقص در ژن های کروم سنسینگ باعث کاهش حساسیت در برابر آنتی بیوتیک ها می شود. در این مطالعه تنها ژن های rhlR، rhlI و lasR مطالعه شده اند و تعیین همبستگی نیازمند تکمیل پانل ژنتیکی است.*

واژگان کلیدی- عفونت ادراری، سودوموناس ائروژینوزا ، ژن های rhlR، rhlI و lasR، کروم سنسینگ

مقدمه

عفونت های مجاری ادراری یکی از مشکلات و معضلات بهداشت عمومی همه کشورها است. ارگانیسم های متعدد مانند ویروس ها، باکتری ها، قارچ ها و انگل ها عفونت مجاری اداری ایجاد می نمایند(۱). در ابتلا به عفونت های مجرای ادراری، زنان نسبت به مردان مستعدتر هستند. عوامل متعدد بیماری زا و عادات رفتاری مختلفی در ایجاد عفونت های مجاری ادراری دخالت دارند(۲). بیش از چهارده سال است که آنتی بیوتیک ها برای درمان بیماری های باکتریایی به کار می روند. مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها در اثر مصرف بی رویه و دائمی آنتی بیوتیک ها سبب شده تا باکتری ها به این آنتی بیوتیک ها مقاوم شوند و در صورت مقاومت به آنتی بیوتیک های متعدد گاهی گونه هایی چند مقاومتی پدید می آیند. مقاومت ممکن است با منشأ پلاسمیدی، کروموزومی و یا ترانسپوزومی باشد. مکانیسم مقاومت باکتری ها به داروها شامل تجزیه دارو، غیر فعال نمودن دارو با ترشح آنزیم ها، تغییر آنزیماتیکی، تغییر هدف یا تحمل پذیری است که به صورت اختصاصی می باشند(۳). مقاومت باکتری ها به مواد ضد میکروبی، به طور وراثتی با ژن های کروموزومی و یا اکتسابی در نتیجه جهش در عوامل کروموزومی، کسب پلاسمید و ترانسپوزون می باشد(۳).

باکتری های عامل عفونت های مجاری ادراری شامل *اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس ها، انتروباکتر، پروتئوس، سیتروباکتر، سودوموناس، ادواردسیلا، سراشیا، انتروکوک، کلبسیلا* می باشند. در میان این باکتری ها، *سودوموناس* ها گستردگی مکانی بالایی دارند. آن ها باسیل های گرم منفی، هوازی اجباری، متحرک و فاقد اسپور می باشند و شامل گونه های *آئروژینوزا، مالئی، پسدومالئی* هستند(۴).

شایع ترین گونه بیماری زا *سودوموناس ائروژینوزا* بوده که شاخص های بیماری زایی آن، پیلی، لیپوپلی ساکاریدی، آنزیم های خارج سلولی شامل الاستاز، پروتئاز، فسفولیپاز C، رامنو لیپید و توکسین های خارج سلولی شامل اگزوتوکسین های S، A و T، می باشد(۵). سطح بالای مقاومت *سودوموناس ائروژینوزا* به آنتی بیوتیک ها و گریز از سیستم ایمنی باعث انتشار این باکتری می گردد. از مکانیسم های گریز از سیستم ایمنی میزبان در *سودوموناس* می توان به آنتی فاگوسیتیک بودن *سودوموناس ائروژینوزا* اشاره نمود که به دلیل وجود لیپوپلی ساکارید، کپسول، لایه چسبنده و تشکیل بیو فیلم می باشد. سیگنالینگ کروم سنسینگ در مراحل اولیه گسترش بیوفیلم موثر است، که با تشکیل میکروکلنی ها مشخص می شود (۷،۶). در تنظیم بیان ژن به واسطه کروم سنسینگ، انتقال پیام و ارتباط سلول به سلول از طریق سیگنال هایی که خود باکتری تولید می کند صورت می گیرد و در نتیجه نسخه برداری ژن های کنترل کننده کروم سنسینگ را القا می کنند(۸). در این باکتری، دو سیستم کامل کروم سنسینگ وجود دارد: las و rhl . سیستم las شامل ژن های فعال کننده رونویسی *lasR* و *lasI* و سیستم rhl شامل ژن های *rhlI* و *rhlR* می باشد. ژن *lasI* تولید الاستاز، اگزوتوکسین A و آلکالین پروتئاز را تنظیم می کند. در حالی که ژن *rhlI* مسئول تنظیم تولید رامنولیپید، آلکالن پروتئاز، الاستاز، سیانید و پیوسیانین می باشد(۱۰،۹). 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 بیماریزا می شوند(۱۱). سیستم Las، سبب نسخه برداری و بیان سایر ژن های بیماری زا و رنگدانه پیوسیانین و تولید بیوفیلم که در تهاجم باکتری به میزبان و همچنین مقاومت به سیستم ایمنی میزبان نقش دارند، می گردد. بنابراین تعدادی از ژن ها و محصولات ژنی را که عامل بیماریزایی *سودوموناس ائروژینوزا* هستند را تنظیم می کند(۱۲). مقاومت بالای *سودوموناس* ها نسبت به آنتی بیوتیک ها با حضور ژن های بتا لاکتاماز، وجود آنزیم متالوبتالاکتاماز، وجود افلوکس پمپ ها، شکل گیری بیوفیلم، نفوذپذیری لیپو پلی ساکاریدهای غشاء سلولی و در مطالعات اخیر نقص در سیستم کروم سنسینگ، گزارش شده است(۱۴-۱۲).

هدف از این تحقیق تعیین حضور ژن های اصلی در سیستم کروم سنسینگ (سیستم Las QS و یا Rhl QS) در نمونه های *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از عفونت های ادراری می باشد که می توانند بعنوان مارکر و عامل مؤثر در ویرولانس این باکتری نقش داشته باشند.

روش کار

۱۵۰ نمونه ادرار از بیماران جمع آوری شد. دامنه سنی این بیماران بین ۱۵ تا ۷۸ سال با میانگین ۴۲/۴ سال بود. ابتدا از نمونه ادرار بر روی محیط های بلاد آگار و EMB آگار کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. از باکتری های رشد کرده بر روی محیط های کشت اسمیر تهیه کرده و رنگ آمیزی گرم انجام شد. سپس از محیط های افتراقی برای تعیین هویت سویه های جدا شده استفاده شد. رنگ‌آمیزی گرم روی کشت‌های ۲۴-۱۸ ساعته انجام شد. باکتری‌های گرم مثبت در زیر میکروسکوپ به رنگ بنفش و باکتری های گرم منفی به رنگ صورتی دیده می‌شوند. سپس از باکتری‌های گرم منفی در چند سری کشت چهار مرحله‌ای روی محیط‌های اختصاصی خالص‌سازی انجام شد. باکتری ها برای شناسایی بر روی محیط های بلاد آگار، مک کانکی آگار، EMB، TSI، SIM، سیمون سیترات، اوره آز، MR/VP وOF کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت نگه داری در دمای ۳۷ درجه مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور انجام تست کاتالاز از آب اکسیژنه استفاده شد. برای انجام تست اکسیداز از کاغذ صافی و یک قطره محلول اکسیداز استفاده شد. برای سنجش توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد، نمونه ها در محیط نوترینت براث کشت داده شده و سپس در بن ماری ۴۲ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از یک شب انکوباسیون ۴۲ درجه سانتی گراد، کدورت محیط کشت بررسی شد. (زیرا رشد *سودوموناس آئروژینوزا* در دمای C° ۴۲ سبب تمایز این ارگانیسم از بقیهٔ گونه های سودوموناس می گردد). از سیتریمید آگار نیز برای جداسازی انتخابی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و افزایش تولید پیگمان استفاده می گردد (بعلت حضور ترکیب سیتریمید در این محیط کشت).

برای بررسی مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتامی روش تست انتشار از دیسک مطابق استاندارد با پروتکل استاندارد ۲۰۱۶ CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines) و با استفاده از محیط کشت مولر هینتون آگار به عنوان محیط رشد باکتری‌ها و دیسک های آنتی بیوتیکی انجام شد. به این ترتیب که ابتدا سوسپانسیونی از باکتری مورد نظر در آب مقطر تهیه شد که کدورت آن با کدورت لوله شماره ۰/۵ مک فارلند برابر بود. سپس با سوآپ استریل در کنار شعله از سوسپانسیون باکتری برداشت کرده و در سطح پلیت حاوی کشت مناسب برای آنتی بیوگرام که مولر هینتون آگار است کشت متراکم در سه جهت عمودی، افقی و مورب (تمام سطوح) انجام داده شد. سپس سوآپ دور پلیت کشیده شد و بعد سوآپ را سوزانده و در محلول ساولن انداخته شد. مرحله بعد قرار دادن دیسک‌های آنتی‌بیوتیک روی سطح محیط مولر هینتون آگار است که در فواصل معینی در کنار شعله و با پنس استریل گذاشته و با فشار روی محیط ثابت شد. آنتی بیوتیک های به کار رفته شامل: سیپروفلوکساسین(۵ میکروگرم)، سفتازیدیم(۳۰ میکروگرم)، ایمیپنم(۱۰ میکروگرم)، مروپنم(۱۰ میکروگرم)، پیپراسیلین-تازوباکتام(۱۰۰/۱۰ میکروگرم)، و جنتامایسین(۴ میکروگرم) بود. سپس در پلیت را بسته و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴

ساعت گرماگذاری گردید. پس از این مدت پاسخ آزمون با اندازه گیری هاله عدم رشد باکتری که در اطراف دیسک‌ها به وجود می‌آید تعیین گردید. اندازه ی‌هاله با توجه به استاندارد CLSI تعیین شد و به صورت حساس، نیمه حساس (متوسط) و مقاوم گزارش شد.

استخراج ژنوم باکتری با استفاده از کیت استخراج شرکت Roche انجام گرفت. برای استخراج DNA طبق دستورالعمل کیت عمل شد. DNA استخراج شده در۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. با استفاده از دستگاه بیوفتومتر اپندورف‌جذب محلول های رقیق شده DNA به نسبت ۱:۵۰ (۲۰ میکرولیتر محلول استوک DNA به علاوه ۹۸۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل یا آب مقطر) در طول موج ۲۶۰ نانومتر (طول‌موج جذب اسید های نوکلئیک) و۲۸۰ نانومتر (طول موج جذب پروتئین‌ها) اندازه‌گیری شد. همچنین برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده، محصول فرآیند استخراج بر روی ژل آگارز ۰/۸ ٪ الکتروفورز گردید. تکثیر قطعه ژن های *rhlR*، *rhlI* و*lasR* با استفاده از جفت پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ انجام گردید. محتویات مخلوط واکنش PCR و برنامه دستگاه PCR به ترتیب در جدول ۲ و ۳ آورده شده است.

برای راه اندازی روش PCR برای تکثیر و تشخیص ژنهای *rhlR*، *rhlI*و *lasR* از سویه ATCC 15692 *سودوموناس ائروژینوزا* بعنوان شاهد مثبت و برای نشان دادن عدم انتقال آلودگی از آب مقطر به عنوان شاهد منفی استفاده شد. به منظور بررسی دمای مناسب اتصال پرایمر از ترموسایکلر دارای شیب دمایی استفاده شد. جهت مشاهده باند حاصل از قطعات تکثیر شده با PCR الکتروفورز انجام شد. برای این منظور با استفاده از بافر 0/5 X TBE و آگارز، ژل ۱/۵٪ تهیه شد. سپس با رنگ آمیزی به وسیله اتیدیوم برامید باندهای حاصل از محصول PCR برای ژن مورد نظر مشاهده شد.

بررسی نتایج و رسم نمودارهای نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد. سپس با استفاده از Chi-square test در این نرم افزار نتایج آماری با محاسبه P-value بررسی گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرهای تکثیر ژن های rhlR، rhlI و lasR

پرایمر	توالی ' ۳ - '۵	اندازه
rhlR (F)	5’ TGCATTTTATCGATCAGGGC 3’	۱۳۳bp
rhlR (R)	5’ CACTTCCTTTTCCAGGACG 3’	
rhlI (F)	5’ TTCATCCTCCTTTAGTCTTCCC 3’	۱۵۵ bp
rhlI (R)	5’ TTCCAGCGATTCAGAGAGC 3’	
lasR (F)	5’ AAGTGGAAAATTGGAGTGGAG 3’	۱۳۰ bp
lasR (R)	5’ GTAGTTGCCGACGACGATGAAG 3’	

جدول۲- محتویات مخلوط واکنش برای واکنش PCR برای شناسایی ژن های rhlR، rhlI و lasR در سودوموناس آئروژینوزا

محتویات	غلظت	حجم نهایی
بافر PCR	۲/۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر
کلرید منیزیم	۲ میلی مول	
dNTPs	۲۰۰ میکرومول	
آنزیم Taq	۱ یونیت در میکرولیتر	
هر پرایمر	۱۰ پیکومول در میکرولیتر	
DNA الگو	۲ میکرولیتر	

جدول۳- شرایط Setup واکنش PCR برای شناسایی ژن های rhlR، rhlI و lasR در سودوموناس ائروژینوزا

زمان	دما	مراحل		
۲ دقیقه	۹۵ °c	واسرشت اولیه		
۴۰ ثانیه	۹۵ °c	۳۰ چرخه	واسرشت	
۱ دقیقه	۶۰ °c			اتصال پرایمر
۱ دقیقه	۷۲ °c		گسترش	
۱۰ دقیقه	۷۲ °c	گسترش انتهایی		

یافته ها

در مطالعه حاضر، ۱۵۰ نمونه ادرار(۹۰ نمونه از مردان و ۶۰ نمونه از زنان) از بیمارانی که به آزمایشگاه های تشخیص پزشکی مراجعه کرده بودند، جمع آوری شد. دامنه سنی این بیماران بین ۱۵ تا ۷۸ سال (با میانگین سن ۴۶/۵ و انحراف معیار ۱۸/۷۵) قرار داشت. ۲۳نمونه آلوده به سودوموناس ائروژینوزا بود.

از این تعداد ۸ سویه از نمونه ادرار مردان و ۱۵ سویه ار نمونه ادرار زنان جدا شد. تایید نمونه ها به عنوان سودوموناس ائروژینوزا از طریق مشاهده شکل ظاهری، رشد در محیط EMB و بلاد آگار و رشد در دمای ۳۷ °c ، نتایج رنگ آمیزی گرم، نتایج آزمون کاتالاز و اکسیداز انجام شد(جدول ۴).

جدول ۴- نتایج حاصل از تست های بیوشیمیایی برای شناسایی و جداسازی *سودوموناس آئروژینوزا*

OF		VP	MR	سیمون سیترات	اوره	SIM	TSI	سیتریمید آگار	اکسیداز	کاتالاز	لایزین دکربوکسیلاز	تست های بیوشیمیایی
هوازی	بیهوازی											
+	-	-	-	+	+	+ - -	alk/alk	کلنی سبز	+	+	-	نتایج

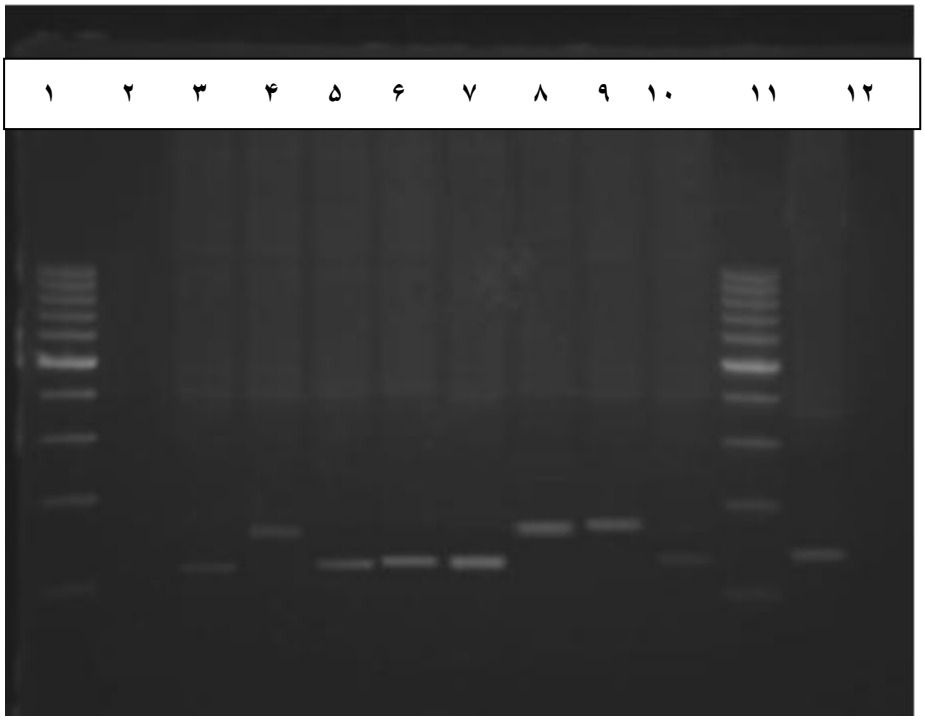
نتایج حاصل از آنتی بیوگرام بر روی سویه های سودوموناس ائروژینوزا در جدول ۵ آورده شده است. بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفتازیدیم و مروپنم و کمترین مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین و پیپراسیلین- تازوباکتام بود.

جدول ۵- فراوانی سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک

دیسک	فراوانمی مطلق	درصد مقاوم ها ٪
سیپروفلوکساسین	۹	۳۹
سفتازیدیم	۱۸	۷۸
ایمیپنم	۱۵	۶۴
مروپنم	۲۰	۸۷
پیپراسیلین-تازوباکتام	۸	۳۴
جنتامایسین	۱۳	۵۵

در دستگاه بیوفتومتر اپندورف نسبت جذب نوری محلول‌های DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (۲۶۰/۲۸۰) که شاخص میزان خلوص DNA می‌باشد، با عدد ۱/۸ بدست آمد و باندهای حاصل از استخراج ژنوم روی ژل الکتروفورز ۰/۸ ٪ مشاهده شد.در نمونه با کتری های مقاوم مورد مطالعه، ژن rhlR دارای باند ۱۳۳ bp، ژن lasR با باند ۱۳۰ bp و ژن rhlI با باند ۱۵۵ bp بر روی ژل آگارز مشاهده شد.

ژن rhlR در ۱۱ (۴۷/۸۲٪) ، rhlI در ۲ (۸/۶۹٪) و lasR ۱۵ (۶۵/۲۱٪) از سویه های سودوموناس ائروژینوزا مشاهده شد. نتایج حاصل از تکثیر ژن های rhlR، rhlI و lasR در شکل ۱ آورده شده است. در تمام نمونه ها برای تکثیر و تشخیص ژن های rhlR، rhlIو lasR ، از سویه ATCC 15692 سودوموناس ائروژینوزا به عنوان شاهد مثبت و برای نشان دادن عدم انتقال آلودگی از آب مقطر به عنوان شاهد منفی استفاده شد.



شکل ۱- نتایج تکثیر ژن های *rhlR* ،*rhlI* و *lasR* – از سمت چپ خانه های ۱ و ۱۱: مارکر مولکولی 100bp– خانه ۲: کنترل منفی – خانه ۳: کنترل مثبت برای ژن *rhlR* با طول 130bp – خانه ۴: کنترل مثبت ژن *rhlI* با طول 155bp– خانه ۵: ژن *lasR* با طول 133bp– خانه های ۶ و ۷: ژن *lasR* با طول 133bp – خانه های ۸ و ۹: ژن *rhlI* با طول 155bp- خانه های ۱۰ و ۱۲: ژن *rhlR* با طول 130bp.

نقص در تولید فاکتور ویرولانس (سیستم کروم سنسینگ) و کاهش حساسیت به آنتی بیوتیک ارتباط وجود دارد. سویه هایی که دارای نقص در ژن فاکتور ویرولانس بودند، عموماً کاهش حساسیت نسبت به عوامل ضد میکروبی داشتند. برای بررسی ارتباط بین حضور ژن های مورد مطالعه و حساسیت ضد میکروبی از تست Chi-squer test در نرم افزار اکسل استفاده شد. توزیع سویه های مقاوم براساس حضور ژن های برسی شده و مقاومت به آنمتی بیوتیک ها در جدول ۶ نشان داده شده است.

جدول۶- رابطه بین حضور ژن های *rhlI* ،*rhlR* و *lasR* و حساسیت ضد میکروبی در سویه های *سودوموناس ائروژینوزا*

نام آنتی بیوتیک	سیپروفلوکساسین	سفتازیدیم	ایمی پنم	مروپنم	پیپراسیلین-تازوباکتام	جنتامایسین
فراوانی مقاومت در سویه هایی با حضور ژن *rhlR*	۴	۹	۷	۱۰	۳	۶
میزان Pvalue (برای ژن *rhlR*)	۰/۷۹	۰/۶۸	۰/۰۱	۰/۵۸	۰/۲۳	۰/۸۵
فراوانی مقاومت در سویه هایی با حضور ژن *rhlI*	۱	۰	۱	۱	۱	۱
میزان Pvalue (برای ژن *rhlI*)	۰/۷۴	۰/۰۱	۰/۶۳	۰/۱۰	۰/۱۹	۰/۸۳
فراوانی مقاومت در سویه هایی با حضور ژن *LaR*	۴	۱۴	۹	۱۴	۱	۸
میزان Pvalue (برای ژن*LaR*)	۰/۰۹	۰/۰۳	۰/۹۴	۰/۲۱	۰/۱۶	۰/۶۷

بحث

عفونت ادراری یکی از شایع‌ترین علل مراجعات بیماران به مراکز پزشکی است که گاهی به دلیل وخامت حال عمومی و یا وجود یک زمینه ناتوان کننده در شخص، نیاز به بستری احساس می شود. عفونت ادراری همچنین شایع‌ترین نوع عفونت بیمارستانی و دومین علت مرگ بر اثر این گونه عفونت‌ها می‌باشد. *سودوموناس ائروژینوزا* یک باسیل گرم منفی است که بعنوان عفونت فرصت طلب، یکی از عوامل عفونت های بیمارستانی بوده و مسئول ۱۰٪ عفونت های بیمارستانی می باشد. عفونت ایجاد شده توسط این باکتری اغلب شدید و تهدید کننده حیات هستند و درمان آنها مشکل است، چون حساسیت کمی نسبت به مواد ضد میکروبی دارند. بنابراین تشخیص و درمان به موقع عفونت‌های ادراری به ویژه در موارد درگیری قسمت‌های فوقانی سیستم امری حیاتی بوده، چرا که تأخیر در شروع درمان به منزله آسیب غیر قابل برگشت به پارانشیم کلیه و بروز عوارضی نظیر پیونفروز، آبسه کلیه یا دور کلیه و یا پیلونفریت مزمن است که گاه می‌توانند زمینه‌ساز نارسایی مزمن کلیه هم باشند (۱۶ ،۱۵). افزایش ظهور *سودوموناس* های چند مقاومتی با عوامل انتقال دهنده ژنی یا پلاستیسیته ژنی و توانایی تشکیل بیوفیلم ارتباط مستقیم دارد و ۱۰٪ ژنوم *سودوموناس آئروژینوزا* با سیستم کروم سنسینگ کنترل می شود (۱۷). مطالعات مختلفی بر روی تغییر حساسیت ضد میکروبی *سودوموناس آئروژینوزا* تحت تأثیر سیستم کروم سنسینگ صورت گرفته است (۲۲، ۲۱، ۲۰، ۱۹، ۱۸). بنابراین این مطالعه برای بررسی درصد مقاومت به آنتی بیوتیک ها و فراوانی حضور ژن های ویرولانس *rhlR*، *rhlI* و *lasR* بر روی سویه های *سودوموناس ائروژینوزا* جدا شده از نمونه های ادراری انجام گرفت. از ۱۵۰ نمونه ادرار مورد بررسی، ۲۳ ادرار آلوده به *سودوموناس ائروژینوزا* بودند. بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفتازیدیم و مروپنم و کمترین مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین و پیپراسیلین-تازوباکتام بود. ژن *rhlR* در ۱۱(۴۷/۸۲٪) نمونه، *rhlI*

در ۲(۸/۶۹٪) نمونه و lasR در ۱۵(۶۵/۲۱٪) نمونه از سویه های سودوموناس ائروژینوزا مشاهده شد.

کیران در سال ۲۰۱۱ نشان داد که سیستم کروم سنسینگ با حساسیت ضد میکروبی ارتباط دارد (۱۷). او در مطالعه خود از آنتی بیوتیک های آمیکاسین، جنتامایسین، کانامایسین، استرپتومایسین، توبرامایسین، سیپروفلوکساسین و تتراسایکلین برای بررسی حساسیت سویه های سودوموناس آئروژینوزا استفاده کرد. نتایج مطالعه حاضر و مطالعه کیران هر دو مؤید این موضوع هستند که نقص در سیستم کروم سنسینگ سبب کاهش مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی می شود، که این می تواند دلیلی بر تأثیر سیستم کروم سنسینگ روی حساسیت ضد میکروبی باشد. کیران در مطالعه خود نشان داد که استفاده از لاکتوزان باعث خاموش شدن اثر سیستم کروم سنینگ بر حساسیت ضد میکروبی می شود (۱۷). در مورد مقاومت های آنتی بیوتیکی در سودوموناس ائروژینوزا جدا شده از نمونه های بالینی، تاکنون مطالعات فراوانی صورت گرفته است که نتایج این مطالعات بر حسب زمان و مکان مطالعه متفاوت می باشد. در مطالعه اصغری مقدم سویه های سودوموناس ائروژینوزا در بیشتر آنتی بیوتیک های مورد مطالعه بالای ۵۰٪ مقاومت نشان داده شد. آنتی بیوتیک های مورد مطالعه شامل کوتریموکسازول، سفوتاکسیم، کاربنسیلین، ایمیپنم، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، سفتازیدیم، سفپیم و جنتامایسین بود (۱۸). در مطالعه دکتر فاضلی اظهار گردید که میزان مقاومت گزارش شده برای سفتازیدیم در فرانسه ۲۱/۴، در ترکیه ۳۰٪، در تهران ۳۴/۹٪، در اصفهان ۵۳/۸٪ بوده است. همچنین در مطالعه ایشان در اصفهان مقاومت به سفتازیدیم ۷۵/۸٪ گزارش گردید (۱۹). مطالعه حاضر نشان داده که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفتازیدیم و مروپنم و کمترین مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین و پیپراسیلین-تازوباکتام می باشد. با توجه به مطالعات انجام شده و مطالعه حاضر می توان این طور نتیجه گیری کرد که پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی براساس زمان و مکان می تواند تحت تأثیر عوامل مختلف از جمله انتقال پلاسمیدها، فاژها و جهش های ژنتیکی و فاکتورهای محیطی و قومی و نژادی در جمعیت های کشورهای مختلف، متفاوت باشد. همچنین میزان مقاومت به آنتی بیوتیک ها در کشورهای در حال توسعه یافته در حال افزایش می باشد. احتمال می رود این افزایش بدلیل مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها در این کشورها باشد.

امروزه مشخص شده که بسیاری از گونه های باکتریایی از جمله سودوموناس ائروژینوزا از سیستم کروم سنسینگ به عنوان دستگاه تنظیمی شان استفاده می کنند. در مطالعات متعددی ژن lasR به عنوان تنظیم کننده مثبت رونویسی در ساختار ژن الاستاز (lasB) در سویه PAO1 سودوموناس ائروژینوزا گزارش شده است (۲۱،۲۰،۶). در بسیاری از تحقیقات انجام گرفته جهت شناسایی اختصاصی سودوموناس آئروژینوزا به روش PCR ردیابی ژن های بیماریزا و ژن های کد کننده پروتئین های سطحی که عامل تهاجم می باشند، مورد توجه قرار گرفته است. زیرا ژن های اختصاصی بوده و در شروع و ایجاد بیماری به وسیله این باکتری نقش موثری دارند. با توجه به نکات مذکور و فاکتورهای بیماریزای خارج سلولی ترشح شده بوسیله سودوموناس آئروژینوزا ژن های سیستم کروم سنسینگ las و rhl که در بیماریزایی این باکتری نقش کلیدی و کنترل کننده دارند به عنوان یک کاندید دارای حساسیت و اختصاصیت مطرح هستند. در مطالعه اپیدمیک در سال ۲۰۱۱ در هندوستان تحقیقاتی درباره ژن های کروم سنسینگ و ژن های بیماریزای باکتری سودوموناس ائروژینوزا جدا شده از نمونه های عفونت مجاری ادراری انجام شد و نتایج حاکی از توزیع متغیر این ژن ها بود که برای شناسایی مارکرهای تشخیصی در نمونه های کلینیکی این ارگانیسم مفید هستند. با توجه به سرعت بالا و مزایای روش های مولکولی در تشخیص سودوموناس ائروژینوزا، PCR راهی مناسب در شناسایی آن می باشد که می تواند مانع از ایجاد عوارض بیشتر عفونت در بیماران شود (۲۲). در مطالعه ای که در سال ۱۳۹۲ توسط آقا ملایی و همکاران صورت گرفته است، مقایسه ای بین نتایج حاصل از تشخیص به روش کشت و PCR برای باکتری سودوموناس ائروژینوزا انجام گرفت و جهت شناسایی سریع باکتری ، ژن lasI بعنوان ژن اختصاصی این باکتری انتخاب شد. همچنین برای ارزیابی اختصاصیت واکنش PCR از ژنوم چهار گونه باکتریایی دیگر از جمله اشرشیا کولی ، ویبریو کلرا ، استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه برای بررسی اختصاصیت استفاده گردید. در مطالعه آقا ملایی نشان داده شد که روش PCR برای تشخیص ژن lasI صد در صد بوده و تمامی سویه ها واجد این ژن بودند (۲۳). مطالعه سنتورک نشان داده است که بعضی سویه های سودوموناس ائروژینوزاچهار ژن rhlR، lasI، rhlI و lasR را دارند، در حالیکه بعضی سویه ها ژن lasR را در ژنوم خود ندارند. یک ایزوله نیز فاقد ژن های rhlR، lasI و lasR بود (۱۰). در مطالعه امینی و همکاران در راستای تشخیص ژن های کروم سنسینگ در سویه های سودوموناس ائروژینوزا جدا شده از نمونه های بالینی انسانی، بر روی ژن های lasR، lasI، rhlR، rhlI، lasB، lasAB و apr مطالعه شد. ژن rhlR در هیچ یک از نمونه های مورد مطالعه مشاهده نشد. در ان مطالعه ژن های rhlI، rhlI و lasR با فراوانی های متفاوت در سویه مورد مطالعه مشاهده گردید (۲۴). مطالعه حاضر نشان داد ژن های rhlR، rhlI و lasR در بعضی از سویه های سودوموناس ائروژینوزا وجود نداشت و همچنین مشخص شد که بررسی حضور ژن های rhlR، rhlI و lasR بصورت تک تک جهت تشخیص سویه های سودوموناس ائروژینوزا کافی نمی باشد و نیاز است که پروفایلی از این ژن ها برای تشخیص استفاده گردد همچنین نشان داده شد که با انجام PCR بر روی ژنوم سویه های سودوموناس ائروژینوزا، جهت بررسی وجود هر سه ژن بصورت توأم جهت تشخیص مناسب می باشد.

بدین صورت که وجود هر یک از ژن ها می تواند دلیلی بر سودوموناس ائروژینوزا بودن سویه جدا شده باشد. در مطالعه کاراتونا در سال ۲۰۱۰ نشان داده شد که بین نقص در تولید فاکتور ویرولانس و کاهش حساسیت به آنتی بیوتیک ها همبستگی وجود دارد. نمونه هایی که فاقد توانایی تولید فاکتور ویرولانس بودند، معمولاً حساسیت کمتری نسبت به آنتی بیوتیک داشتند و رابطه آماری بین بعضی عوامل مشاهده شد، مانند عدم توانایی تولید الاستاز و مقاومت به پیپراسیلین و سفتازیدیم، نقص در تولید آلکالین پروتئاز و مقاومت به توبرامایسین، پیپراسیلین و پیپراسیلین-تازوباکتام، سفپیم، ایمیپنم و سپروفلوکساسین، نقص در تولید پیوسیانین و مقاومت آمیکاسین، توبرامایسین، سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین و افلوکساسین (۱۵). همچنین از آن مطالعه و سایر مطالعات مشابه نتیجه گیری شد که نقص در سیستم کروم سنسینگ در سویه های سودوموناس ائروژینوزا باعث کاهش حساسیت در برابر آنتی- بیوتیک ها شده است. در مطالعه حاضر، کاهش حساسیت ضد میکروبی در سویه های سودوموناس ائروژینوزا دارای نقص در سیستم کروم سنسینگ (ژن های ویرولانس) مشاهده شد که با مطالعه کاراتونا مطابقت داشت. البته در این مطالعه تنها بر روی سه ژن rhlR، rhlI و lasR مطالعه شده است و کمبود ژن های مذکور بصورت تکی یا توأم در سویه های مقاوم مشاهده شد. همچنین در این تحقیق، ایزوله ای از سودوموناس ائروژینوزاوجود داشت که دارای هر سه ژن مورد مطالعه بود. با توجه به این که در مطالعه کاراتونا نشان داده شد نقص در ژن های کروم سنسینگ باعث کاهش حساسیت در برابر آنتی بیوتیک ها می شود، بنابراین مقاومتی نباید مشاهده می شد، در حالیکه نسبت به سفتازیدیم، ایمیپنم و سیپروفلوکساسین مقاومت مشاهده گردید. این به این دلیل است که در این مطالعه تنها بر روی سه ژن، بررسی صورت گرفته و ممکن است نقص در ژن های مؤثر دیگر، وجود داشته باشد. همچنین در سویه هایی که کمبود یک یا چند ژن مشاهده شد، مقاومت به بعضی از آنتی بیوتیک های مورد مطالعه مشاهده گردید و این موضوع در راستای مطالعات گذشته بود.

مطالعه حاضر نشان داد که بررسی حضور ژن های rhlR، rhlI و lasR بصورت تک تک جهت تشخیص سویه های سودوموناس آئروژینوزا کافی نمی باشد و انجام PCR بر روی ژنوم سویه های سودوموناس ائروژینوزا، جهت بررسی وجود هر سه ژن بصورت توأم جهت تشخیص مؤثر می باشد. وجود هر یک از ژن ها می تواند دلیلی بر سودوموناس ائروژینوزا بودن سویه جدا شده باشد. تفاوت در پراکندگی ژن های ویرولانس در سویه های سودوموناس آئروژینوزا، می تواند بر روی سازگاری سویه های باکتری با شرایط اختصاصی در مکان های عفونت تاثیر گذار بوده و بعضی سویه ها می توانند بعضی با شرایط بهتر سازش پیدا کنند.

نتیجه گیری

با توجه به افزایش مقاومت نسبت به گزارشات سال های قبل ، بررسی تغییرات پروفایل مقاومتی سویه های سودوموناس ائروژینوزا بطور متناوب، تایپینگ آن ها و مقایسه تغییرات ایجاد شده در طی گذر زمان و در نهایت اصلاح پروتکل های درمانی توصیه جدی می گردد. همچنین توصیه می گردد جهت مطالعه موارد مذکور ضروری است نمونه برداری از مناطق جغرافیایی وسیع تری صورت بگیرد و تعداد نمونه بیشتری مورد ارزیابی قرار بگیرند. مطالعه حاضر نشان داد علاوه بر اثر توانایی تشکیل بیوفیلم روی حساسیت ضد میکروبی می تواند فنوتیپ حساسیت ضد میکروبی در سویه های سودوموناس آنروژینوزا متأثر از موتاسیون های حاصل در ژن های سیستم کروم سنسینگ باشد. با توجه به سرعت بالا و مزایای روش های مولکولی در تشخیص سودوموناس آئروژینوزا، PCR راهی مناسب در شناسایی آن می باشد که می تواند مانع از ایجاد عوارض بیشتر عفونت در بیماران شود.

تشکر و قدردانی

از گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و مدیریت و پرسنل آزمایشگاه مرجع سلامت که ما را در انجام مراحل این پروژه یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی می گردد.

REFERENCES

1.Puca E. Urinary Tract Infection in Adults. Clin Microbiol. 2014; 3: e120.
2.Pennesi M, L'erario I, Travan L, Ventura A. Managing children under 36 months of age with febrile urinary tract infection: a new approach. Pediatr Nephrol. 2012; 274(4): 611-5.
3.Williams G, Craig JC. Long-term antibiotics for preventing recurrent urinary tract infection in children. Cochrane Database Syst Rev. 2011; 16(3): CD001534.
4.Klrissa Streeter, Mohammad Katoul. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment . Infect Epidemiol Med. 2016; 2(1): 25-32.
5.Coggan KA, Wolfgang MC. Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. Curr Issues Mol Biol. 2012; 14(2): 47-70.
6.Nilkanta Chowdhury, Angshuman Bagchi. Molecular insight into the activity of LasR protein from *Pseudomonas aeruginosa* in the regulation of virulence gene expression by this organism. Elsevier. 2016; 580(1): 80-7.
7.Neha Sabharwal, Shriya Dhall, Sanjay Chhibber, Kusum Harjai, Original Article. Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonasaeruginosa* isolated from urinary tract infections. Int J Mol Epidemiol Genet. 2014; 5(3): 125–34.
8.Deep A, Chaudhary U, Gupta V. Quorum sensing and bacterial pathogenicity: from molecules to disease. Journal of laboratory physicians. 2011; 3(1): 4.
9.Kumar R, Chhibber S, Gupta V, Harjai K. Screening & profiling of quorum sensing signal molecules in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from catheterized urinary tract infection patients. Indian J Med R. 2011; 134: 208-13.
10.Senturk S, Ulusoy S, Bosgelmez-Tinaz G, Yagci A. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during urinary tract infections. J Infect Dev Ctries. 2012; 6(6): 501-7.
11. Kumar R, Chhibber S, Gupta V, Harjai K. Screening & profiling of quorum sensing signal molecules in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from catheterized urinary tract infection patients. Indian J Med Res. 2011; 134: 208-13.
12.Chang Ch, Krishnan T, Wang H, Chen Y, Wai-Fong Yin, Chong YM, et al. Non-antibiotic quorum sensing inhibitors acting against N-acyl homoserine lactone synthase as druggable target. Scientific Reports. 2014; 4: 7245.
13.Balasubramania D. Co-regulation of b-lactam resistance, alginate. production and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Medical Microbiology. 2011; 60: 147–56.
14.Karatuna O, Yagci A. Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production andits relationship with antimicrobial susceptibility in Pseudomonasaeruginosa respiratory isolates. Clin Microbiol Infect. 2010; 16: 1770–5.
15.Marston HD, Dixon DM, Knisely JM, Palmore TN, Fauci AS. Antimicrobial Resistance. *JAMA.* 2016; 316(11): 1193-204.
16.Wagner S, Sommer R, Hinsberger S, Lu C, Hartmann RW, Empting M, et al. Novel Strategies for the Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections. *Journal of Medicinal Chemistr*. 2016; 59 (13): 5929-69.
17.Kiran S, Sharma P, Harjai K, Capalash N. Enzymatic quorum quenching increases antibiotic susceptibility of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Iran J Microbiol. 2011; 3(1): 1–12.
18. Asghari-MoghadamP N, Rasoolzadeh R, Hoseini-Moghadam MM, Seifi M, Pour-Shafie MR, Talebi M. Isolation, Antibiotic Resistance Determination and Genotypic Analysis of Pseudomonas Aeruginosa Strains Causing Urinary Tract Infection in Catheterized Patients of Shohada and Labafi Nejad Hospitals, Tehran, Iran. Journal of Isfahan Medical School. 2014; 32(272): 1-8. (Full Text in Persian)

۱9.Fazeli H, Havaei A, Solgi H, Shokri D, Motallebirad T. Pattern of Antibiotic Resistance in Pesudomonas Aeruginosa Isolated from Intensive Care Unit, Isfahan, Iran. Journal of Isfahan Medical School. 2013; 31(232): 433-8.
20.Martins VV, Pitondo-Silva A, Manco LDM, Falcao JF, Freitas SDS, Silveira WDD, et al. Pathogenic potential and genetic diversity of environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica. 2014; 122(2): 92-100.
21.Muller C, Plésiat P, Jeannot K. A two–component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones and β–lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011; 55(3): 1211-21.
22.Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren S. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nature Reviews Microbiology. 2015; 13: 269–84.
23.Aghamollaei H, Azizi Barjini K, Moosazadeh Mogaddam. Rapid Detection of *Pseudomonas Aeruginosa* by PCR Method Using Specific Primers of Quorum Sensing LasI gene. YUMSJ. 2014; 18(9): 722-35. (Full Text in Persian)
24. Amini Bezanjanii F, Mahmoudi R, Amini K. The study and identification of Quorum Sensing (QS) genes of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from human clinical samples by Multiplex PCR and antibiotic resistance determination. yafte. 2016; 18 (2): 38-44. (Full Text in Persian)