تحقیقی

شناسایی ژن‌های مولد فسفولیپاز و پیلی‌تیپ IV در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* با مقاومت چند دارویی

عارفه منظمی[1]، دکتر فخری حقی*[2]

۱- دانشجوی رشته میکروبیولوژی، گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.

۲- دانشیار، باکتری شناسی، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *سودوموناس آئروژینوزا باکتری فرصت‌طلب با عوامل بیماری زایی متعدد از جمله فسفولیپاز C و پیلی نوع IV است. از مشکلات عمده عفونت‌های سودوموناسی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن است که اغلب درمان چنددارویی برای آن پیشنهاد می‌گردد. این مطالعه به منظور شناسایی ژن‌های مولد فسفولیپاز و پیلی‌تیپ IV در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا با مقاومت چند دارویی انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه توصیفی روی ۹۳ سویه سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده از نمونه‌های بالینی (ادرار، خون، ترشحات تنفسی، مدفوع، خلط و زخم) انجام شد. پس از تعیین هویت و تایید سویه‌ها با تست‌های بیوشیمیایی، الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش کربی-بائر و براساس استانداردهای CLSI انجام شد. DNA ایزوله‌ها استخراج و با روش PCR و پرایمرهای اختصاصی ژن‌های plcH ، plcN ، pilA و pilB ارزیابی گردید.*

یافته ها : *بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به سفوکسیتین (۹۵/۶درصد) و کمترین درصد مقاومت مربوط به آمیکاسین (۲۶/۸درصد) بود. ۸۰/۶ درصد ایزوله‌ها مقاومت چنددارویی داشتند. در بین ۷۵ ایزوله با مقاومت چنددارویی، فراوانی ژن‌های plcH ، plcN ،pilA و pilB به ترتیب ۹۷/۳ درصد، ۴۹/۳ درصد، ۲۶/۶ درصد و ۱۷/۳ درصد تعیین شد.*

نتیجه‌گیری : *با توجه به فراوانی بالای ژن فسفولیپاز C در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا با مقاومت چنددارویی جداسازی شده از منابع بالینی مختلف، به‌نظر می‌رسد این عامل ویرولانس نقش مهمی در فرایند بیماری‌زایی این باکتری ایفا کند. همچنین نتایج این مطالعه اهمیت کمتر پیلی در ایزوله‌های با مقاومت چنددارویی را نشان داد.*

کلید واژه‌ها : *سودوموناس آئروژینوزا ، مقاومت آنتی‌بیوتیکی ، فسفولیپاز C ، پیلی نوع IV*

* نویسنده مسؤول : دکتر فخری حقی ، پست الکترونیکی haghi@zums.ac.ir

نشانی : زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، گروه میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی، تلفن ۳۳۴۴۰۳۰۱-۰۲۴، نمابر ۳۳۴۴۹۵۵۳

وصول مقاله : ۱۳۹۵/۲/۱۱ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹۵/۶/۷ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹۵/۶/۱۵

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باسیل گرم منفی فرصت‌طلبی است که قابلیت بالایی در بیماری زایی و ایجاد عفونت در بیماران بستری و افراد دچار نقص سیستم ایمنی بدن دارد. این ارگانیسم می‌تواند هر عضوی از بدن را درگیر کند و بیماری‌های بالینی مهمی از جمله عفونت‌های خونی، ریوی، دستگاه ادراری ، زخم و باکتریمی ایجاد کند (۳-۱). توانایی تحمل محدوده دمایی وسیع، نیازهای تغذیه‌ای حداقل، تولید طیف وسیعی از عوامل بیماری زایی، مقاومت ذاتی و اکتسابی به آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل ضدمیکروبی مختلف از جمله عوامل اثرگذار در قابلیت بقای این ارگانیسم در محیط بیمارستانی است. *سودوموناس آئروژینوزا* به طور ذاتی به چندین آنتی‌بیوتیک مقاوم است و توانایی اکتساب ژن‌های مقاومتی را از طریق عناصر ژنتیکی متحرک مانند پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها دارد (۴). مقاومت ذاتی و اکتسابی *سودوموناس آئروژینوزا* سبب بروز سویه‌هایی با فنوتیپ مقاومت دارویی چندگانه شده است که شامل مقاومت همزمان به سه خانواده آنتی‌بیوتیکی مختلف است (۵و۶). به‌طوری که بیش از ۱۰ درصد از ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* درسراسر دنیا مقاوم به چند دارو (Multi-drug resistant: MDR) هستند (۷). استفاده بی‌رویه و خودسرانه از آنتی‌بیوتیک‌ها موجب افزایش مقاومت چنددارویی و ایجاد سویه‌های MDR در بیمارستان‌ها و مراکز درمانی و به طبع آن ناتوانی در درمان و کنترل عفونت‌های بیمارستانی می‌شود (۸). در فرایند بیماری‌زایی *سودوموناس آئروژینوزا* علاوه بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تولید عوامل ویرولانس ترشحی و سطح سلولی مختلف شامل توکسین‌ها،

پیوسیانین، لیپو پلی‌ساکارید، پیلی، فلاژل و آنزیم‌های متنوع از جمله فسفولیپاز C و الاستاز نقش بسیار مهمی ایفا می‌کنند. سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به سویه‌های حساس، عوامل ویرولانس بیشتری تولید می‌کنند و سویه‌های مهاجم‌تری هستند (۹-۷). در بین عوامل ویرولانس *سودوموناس آئروژینوزا*، فسفولیپاز C یک آنزیم خارج سلولی و حساس به حرارت با وزن مولکولی ۷۸ کیلودالتون است که نقش مهمی در بیماری‌زایی ایفا می‌کند. این باکتری دو نوع فسفولیپاز تولید می‌کند که یکی از آنها همولیتیک با وزن مولکولی بالا (PLC-H) و دیگری غیرهمولیتیک با وزن مولکولی پایین (PLC-N) است. ژن‌های plcH و plcN واقع در قطعه کروموزومی 3.1 kb به ترتیب کدکننده آنزیم‌های فسفولیپاز همولیتیک و غیرهمولیتیک است (۱۰). این دو می‌توانند فسفوریل کولین را که ماده اصلی سورفاکتانت ریه است؛ تجزیه نموده و موجب آزاد شدن دی آسیل گلیسرول و کولین شده که منجر به تشکیل پروستاگلاندین‌ها، ترومبوکسان و لکوترین‌ها می‌گردد (۱۱). فسفولیپاز C همولیتیک (PLC-H)، همولیز کننده اریتروسیت‌های انسانی است و همچنین اسفنگومیلین را که از اجزای اصلی غشاء سلول‌های یوکاریوتی است؛ هدف قرار می‌دهد و به‌دلیل کاهش عملکرد ریه، نقش مهمی در عفونت‌های شدید ریوی به‌ویژه در بیماران سیستیک فیبروزیس ایفا می‌کند (۱۲). پیلی نوع IV زائده‌های انقباضی هستند و با ویژگی‌هایی از جمله اتصال به بافت میزبان، حرکت Twitching و تشکیل بیوفیلم موجب پیشرفت بیماری‌زایی *سودوموناس آئروژینوزا* می‌شود (۱۳). این ساختار، پلیمری قوی، انعطاف‌پذیر و رشته‌ای متشکل از هزاران مونومر به نام پیلین (pilin) به وزن مولکولی ۲۳-۱۳ کیلو دالتون است که محصول بیان ژن pilA بوده؛ ولی اسمبلی و عملکرد آنها توسط تعداد زیادی ژن‌های کروموزومی از جمله pilB، C ، D ، T، Q، M، N، O و P صورت می‌گیرد (۱۴). ژن‌های کدکننده پیلی نوع IV شامل pilA است که در یک قطعه DNA کروموزومی 4.0 kb قرار دارد و دارای ۴۴۹ جفت باز است و در پایین دست آن، ژن pilB قرار دارد (۱۳). جهش در ژن pilA موجب اختلال در سنتز پیلین شده و تشکیل بیوفیلم به شدت تحت تاثیر قرار می‌گیرد و بیوفیلم تولید نمی‌شود (۱۵). جهش در ژن pilB، باعث عدم تشکیل پیلی و اختلال در عملکرد پیلی می‌شود و باکتری قادر به حرکت Twitching خواهد بود (۱۶). با توجه به اهمیت شناسایی سویه‌های بیماری‌زا و مهاجم *سودوموناس آئروژینوزا* به منظور کنترل و ریشه‌کنی عفونت‌های بیمارستانی، این مطالعه به منظور شناسایی ژن‌های مولد فسفولیپاز و پیلی‌تیپ IV در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* با مقاومت چند دارویی انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی ۹۳ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* از نمونه‌های بالینی مختلف شامل ادرار، خون، ترشحات تنفسی، مدفوع، خلط و زخم از بیمارستان‌های آیت‌الله موسوی، ولیعصر، امام‌حسین و شهیدبهشتی شهر زنجان طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ جمع‌آوری گردید.

برای تایید ایزوله‌ها از تست‌های بیوشیمیایی مرسوم شامل رشد در محیط مک‌کانکی آگار، تست اکسیداز، واکنش در محیط TSI، تست OF، بررسی تحرک، رشد در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و تولید پیگمان پیوسیانین در محیط مولر هینتون آگار استفاده شد.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن (کربی - بائر) طبق استانداردهای CLSI انجام شد (۱۷). دیسک های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده محصول شرکت MAST انگلستان و شامل آزترئونام (۳۰ µg)، سفوکسیتین (۳۰ µg)، ایمی‌پنم (۱۰ µg)، سفتازیدیم (۳۰ µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، کوآموکسی کلاو (۳۰ µg)، تتراسایکلین (۳۰ µg)، کوتریموکسازول (۲۵ µg)، آمیکاسین (۳۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg) و سیپروفلوکساسین (۵ µg) بودند.

پس از انجام دیسک دیفیوژن، قطر هاله عدم رشد در اطراف هر دیسک اندازه گیری و نتایج آن با توجه به استانداردهای CLSI به‌صورت حساس، بینابینی و مقاوم گزارش گردید. از سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 برای کنترل روش‌های آنتی‌بیوگرام استفاده گردید.

به منظور شناسایی ژن‌های plcH ، plcN ، pilA و pilB از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید (۱۸) (جدول یک). ابتدا DNA توتال ایزوله ها با استفاده از روش Boiling استخراج شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر Mastermix شرکت فرمنتاز، یک میکرولیتر پرایمر

جدول ۱ : توالی پرایمرهای مورد استفاده

مارکر ژن (ها)	توالی نوکلئوتیدی ('3-'5)	اندازه محصول (جفت‌باز)
plcH	*fp: GCACGTGGTCATCCTGATGC* *rp: TCCGTAGGCGTCGACGTAC*	۶۰۸
plcN	*fp: TCCGTTATCGCAACCAGCCCTACG* *rp: TCGCTGTCGAGCAGGTCGAAC*	۴۸۱
pilA	*fp: ACAGCATCCAACTGAGCG* *rp: TTGACTTCCTCCAGGCTG*	۱۶۷۵
pilB	*fp: TCGAACTGATGATCGTGG* *rp: CTTTCGGAGTGAACATCG*	۴۰۸

۱۰ پیکومول از هر کدام، ۵ میکرولیتر DNA الگو با غلظت ۵۰ میکروگرم طی ۳۰ سیکل، تحت برنامه زمانی ترموسایکلر (Analytica Jena، آلمان) انجام شد. پس از ۵ دقیقه مرحله جداسازی اولیه دو رشته در ۹۴ درجه سانتی گراد، واکنش PCR در ۳۰ سیکل شامل مرحله باز شدن دو رشته (Denaturing Step) در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها (Annealing Step) در ۶۰ درجه سانتی گراد به‌مدت یک دقیقه برای ژن plcH و ۵۴/۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه برای ژنهای plcN و pilB و ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه برای ژن pilA، مرحله طویل شدن رشته هدف (Extension Step) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و مرحله طویل شدن نهایی (Final Extension Step) در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از انجام PCR، ژل آگارز ۱/۵ درصد برای الکتروفورز محصولات PCR مورد استفاده قرار گرفت و قطعات ژنی مورد نظر با استفاده از مارکر 100 bp شرکت فرمنتاز ارزیابی شدند. DNA استخراج شده از سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* که حامل ژن‌های مورد بررسی بودند و قبلاً تعیین توالی شدند؛ به‌عنوان کنترل مثبت و از سویه *اشریشیا کلی* ATCC25992 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

یافته‌ها

از ۹۳ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* جمع آوری شده از نمونه‌های بالینی، ۳۱ ایزوله (۳۳درصد) مربوط به نمونه‌های ادرار، ۲۶ ایزوله (۲۸درصد) مربوط به نمونه‌های خون، ۱۷ ایزوله (۱۸درصد) مربوط به نمونه تنفسی، ۱۰ ایزوله (۱۱درصد) مربوط به خلط، ۸ ایزوله (۹درصد) مربوط به مدفوع و یک ایزوله (یک درصد) مربوط به زخم بود.

نتایج آنتی‌بیوگرام بیانگر بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به سفوکسیتین در ۸۹ ایزوله (۹۵/۶ درصد) و کمترین میزان مقاومت نسبت به آمیکاسین در ۲۵ ایزوله (۲۶/۸ درصد) بود. بیشترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به آمیکاسین و ایمی‌پنم (۶۶/۶ درصد) مشاهده شد (جدول ۲).

همه ایزوله‌ها به خانواده بتالاکتام‌ها مقاوم بودند و هر ایزوله حداقل به یکی از آنتی بیوتیک‌های این خانواده مقاومت نشان داد. ایزوله‌های مورد بررسی کمترین مقاومت را به خانواده تتراسایکلین نشان دادند. ۸۰/۶ درصد ایزوله‌ها نسبت به سه خانواده از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مقاوم بودند و به عنوان ایزوله‌هایی با مقاومت چندداروییی در نظر گرفته شدند (جدول‌های ۲ و ۳).

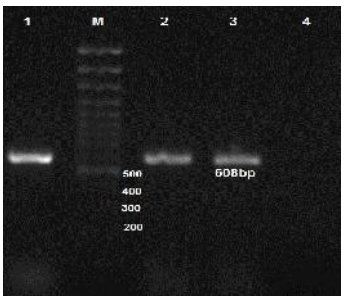
از کل ایزوله‌های مورد مطالعه، ۹۰ ایزوله (۹۶/۷درصد) حامل ژن plcH، ۴۳ ایزوله (۴۶/۲ درصد) حامل ژن plcN، ۲۳ ایزوله (۲۴/۷درصد) حامل ژن pilA و ۱۶ ایزوله (۱۷/۲درصد) حامل ژن pilB بودند (شکل‌های ۴-۱).

جدول ۲ : الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

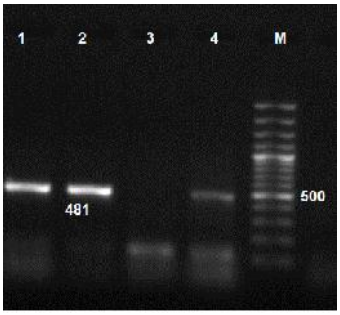
آنتی‌بیوتیک	مقاوم تعداد (درصد)	بینابینی تعداد (درصد)	حساس تعداد (درصد)
آزترئونام	۳۹ (۴۱/۹)	۱۷ (۱۸/۲)	۳۷ (۳۹/۷)
سفوکسیتین	۸۹ (۹۵/۶)	۰ (۰)	٤ (٤/۳)
ایمی پنم	۳۱ (۳۳/۳)	۰ (۰)	٦۲ (٦٦/٦)
سفتازیدیم	۳۱ (۳۳/۳)	۵ (۵/۳)	۵۷ (٦۱/۲)
سفوتاکسیم	٤۷ (۵۰/۵)	۱۰ (۱۰/۷)	۳٦ (۳۸/۷)
کوآموکسی کلاو	۸۳ (۸۹/۲)	۱ (۱)	۹ (۹/٦)
تترا سایکلین	۳۲ (۳٤/٤)	۲۱ (۲۲/۵)	٤۰ (٤۳)
کوتریموکسازول	۷۲ (۷۷/٤)	٦ (٦/٤)	۱۵ (۱٦/۱)
آمیکاسین	۲۵ (۲٦/۸)	٦ (٦/٤)	٦۲ (٦٦/٦)
جنتامایسین	٦٤ (٦۸/۸)	۱ (۱)	۲۸ (۳۰/۱)
سیپروفلوکساسین	۳۷ (۳۹/۷)	۹ (۹/٦)	٤۷ (۵۰/۵)

جدول ۳ : فراوانی ایزوله‌های با فنوتیپ MDR براساس نمونه‌های بالینی مورد مطالعه

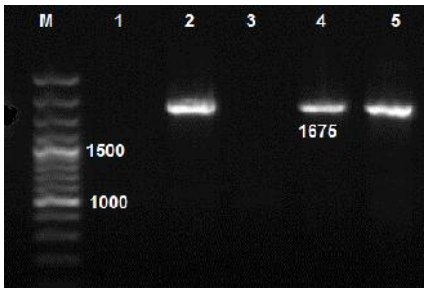
منابع ایزوله‌ها	تعداد	تعداد MDR	انواع MDR ۳تایی	٤تایی XDR	۵تایی XDR
ادرار	۳۱	۲۵	٦	۷	۱۲
خون	۲٦	۲۱	٦	۸	۷
تنفسی	۱۷	۱۲	٤	۲	٦
خلط	۱۰	۹	۳	٤	۲
مدفوع	۸	۷	۳	۲	۲
زخم	۱	۱	–	۱	–
کل	۹۳	۷۵	۲۲	۲٤	۲۹



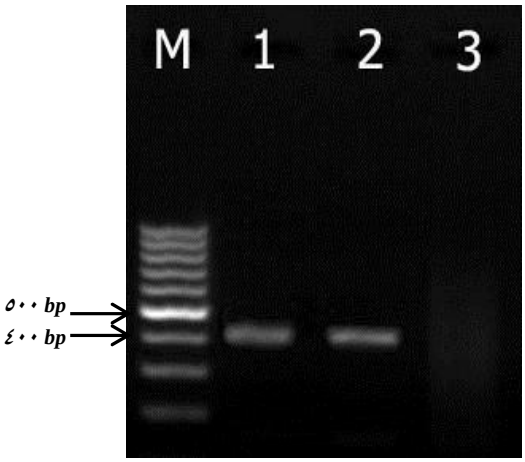
شکل ۱ : الکتروفورز ژل آگارز (۱/۵ درصد) برای شناسایی ژن plcH ؛ چاهک M : سایز مارکر (100bp)؛ ۱) نمونه کنترل مثبت ۲و۳) نمونه بالینی؛ ٤) کنترل منفی



شکل ۲ : الکتروفورز ژل آگارز برای شناسایی ژن plcN چاهک M: سایز مارکر (100bp)؛ ۱و٤) نمونه بالینی؛ ۲) نمونه کنترل مثبت؛ ۳) کنترل منفی



شکل ۳ : الکتروفورز ژل آگارز برای شناسایی ژن pilA
چاهک M: سایز مارکر (1kb)؛ ۳و٤و٥) نمونه بالینی؛ ۲) نمونه کنترل مثبت؛ ۱) کنترل منفی



شکل ٤: الکتروفورز ژل آگارز برای شناسایی ژن pilB
چاهک M: سایز مارکر (100bp)؛ چاهک ۱) کنترل مثبت؛ چاهک ۲) نمونه بالینی؛ چاهک ۳) کنترل منفی

از کل ایزوله های مورد مطالعه، ۳۵ ایزوله تنها حامل ژن plcH به صورت تک‌ژنی، ۲۵ ایزوله حامل plcH و plcN به‌طور همزمان، ۶ ایزوله حامل plcH و pilA به‌طور همزمان و ۵ ایزوله حامل plcH و pilB به‌طور همزمان بودند. همچنین ژن plcH در ۸ ایزوله به همراه ژن‌های pilA و plcN، در ۳ ایزوله به همراه ژن‌های plcN و pilB، در ۲ ایزوله به همراه ژن‌های pilB و pilA و در ۶ ایزوله به همراه ژن‌هایpilB، pilA، plcN شناسایی شد.

از ۷۵ ایزوله MDR، ۷۳ ایزوله (۹۷/۳درصد) حامل ژن plcH بودند. فراوانی ژن plcH در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا دارای الگوی مقاومت دارویی چندگانه بیشتر از ژن plcN بود. همچنین ژن pilB کمترین فراوانی (۱۷/۳درصد) را در ایزوله سودوموناس آئروژینوزا دارای الگوی مقاومت دارویی چندگانه نشان داد (جدول ۴). همچنین ژن‌های PlcH (تعداد ۱۷)، plcN (تعداد ۷)، pilA (تعداد ۳) و pilB (تعداد ۳) به ترتیب شامل ۹۴/۴ درصد، ۳۸/۸ درصد، ۱۶/۶ درصد و ۱۶/۶ درصد در عدم مقاومت چنددارویی (تعداد ۱۸) تعیین شد.

در ۲۲ ایزوله با فنوتیپ MDR سه تایی (مقاومت نسبت به سه خانواده آنتی بیوتیکی متفاوت)، ۲۱ ایزوله حامل ژن plcH، ۹ ایزوله حامل ژن plcN، ۳ ایزوله حامل ژن pilA و ۲ ایزوله حامل ژن pilB بودند. همچنین تمامی ایزوله‌های با فنوتیپ MDR پنج‌تایی (مقاومت نسبت به ۵ خانواده آنتی بیوتیکی) حامل ژن plcH بودند و حضور این ژن در این ایزوله‌ها تایید شد (جدول ۴).

بحث

نتایج مطالعه حاضر بیانگر مقاومت بالای ایزوله‌ها نسبت به سفوکسیتین بود. در حالی که آمیکاسین بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را نشان داد. همچنین بیشتر ایزوله‌ها نسبت به حداقل سه کلاس آنتی‌بیوتیک (بتالاکتام‌ها، تتراسایکلین، سولفانامیدها، آمینوگلیکوزیدها، فلوروکوئینولون‌ها و ماکرولیدها) مقاوم بودند و به عنوان ایزوله‌هایی با مقاومت چنددارویی در نظرگرفته شدند. همچنین ژن PlcH فراوانی بالاتری نسبت به سایر ژن‌ها در ایزوله‌های با مقاومت چند دارویی داشت. نکته قابل توجه درمورد فراوانی ژن‌ها در نمونه‌های بالینی مختلف این است که از ۳۱ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* مربوط به نمونه ادرار، ۳۰ ایزوله حامل ژن plcH، ۱۲ ایزوله حامل plcN، ۸ ایزوله حامل pilA و ۵ ایزوله حامل pilB بودند. در سایر نمونه‌های بالینی مورد بررسی نیز ژن plcH بیشترین فراوانی را داشت.

نقش بیماری‌زایی محصول ژن plcH (فسفولیپاز همولیتیک) بسیار پررنگ‌تر از ژن plcN (فسفولیپاز غیرهمولیتیک) است. در واقع فسفولیپاز غیرهمولیتیک به‌تنهایی فعالیت بیماری‌زایی ندارد. در حالی که فسفولیپاز همولیتیک به عنوان یک عامل بیماری‌زای مهم در عفونت سودوموناسی محسوب می‌شود. عفونت *سودوموناس آئروژینوزا* در ۸۰درصد مبتلایان به سیستیک فیبروزیس رخ می‌دهد و PLCH در کاهش عملکرد ریه و بیماری زایی آن نقش مهمی ایفا می کند (۱۰و۱۲).

در مطالعه Jamali و همکاران در هند بر روی ۷۳ ایزوله، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی شامل سفوکسیتین ۹۱/۸درصد، آمیکاسین ۷۲/۲ درصد و جنتامایسین ۶۸/۵ درصد بود (۱۹). نتایج مقاومت نسبت به سفوکسیتین و جنتامایسین مطالعه مذکور مشابه مطالعه حاضر است. مطالعه دیگری توسط فاضلی و همکاران در اصفهان انجام شده که مشابه مطالعه حاضر، بیشترین میزان حساسیت ایزوله‌ها نسبت به آمیکاسین گزارش شد (۲۰). به‌نظر می‌رسد آمیکاسین کارایی خود را در درمان عفونت‌های سودوموناسی حفظ کرده است.

در مطالعه Finnan و همکاران روی۱۷ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه‌های بالینی مبتلایان به سیستیک فیبروزیس، ۶۳/۶ درصد ایزوله‌ها (۷ ایزوله) حامل ژن pilA بودند (۲۱) و این میزان در مقایسه با مطالعه ما (۹ درصد) بسیار بیشتر بود که می‌تواند به دلیل کم‌بودن تعداد نمونه‌های مطالعه مذکور باشد. در مطالعه Wolska و Szweda در لهستان روی ژن‌های بیماری‌زا

جدول ٤ : ارتباط بین ژن‌های plcH و plcN و نوع مقاومت چنددارویی (MDR)

نوع مقاومت دارویی	تعداد	الگوی MDR و تعداد نوع کلاس آنتی‌بیوتیکی	تعداد	تعداد (درصد) ژن‌های مورد بررسی در انواع MDR			
				PlcH	plcN	pilA	pilB
سه دارویی	۲۲	(I, III, IV) بتالاکتام، کوتریموکسازول، آمینوگلیکوزید	۱۱	۱۱	٤	۲	۲
		(I, II, III) بتالاکتام، تتراسایکلین، کوتریموکسازول	۸	۸	٥	۱	
		(I, IV, V) بتالاکتام، آمینوگلیکوزید، سیپروفلوکسازین	۲	۲			
		(I, II, III) بتالاکتام، تتراسایکلین، کوتریموکسازول	۱				
		تعداد کل (درصد)	۲۲ (۲۹/۳)	۲۱ (۲۸)	۹ (۱۲)	۳ (٤)	۲ (۲/٦)
چهارداروی	۲٤	(I, II, III, IV) بتالاکتام، تتراسیکلین، کوتریموکسازول، آمینوگلیکوزید	۱۰	۹	٦	٥	۳
		(I, III, IV, V) بتالاکتام، کوتریموکسازول، آمینوگلیکوزید، سیپروفلوکسازین	۱۰	۱۰	۷	۳	۲
		(I, II, III, V) بتالاکتام، تتراسایکلین، کوتریموکسازول، سیپروفلوکسازین	۳	۳	۱		
		(I, II, IV, V) بتالاکتام، تتراسایکلین، آمینوگلیکوزید، سیپروفلوکسازین	۱	۱			
		تعداد کل (درصد)	۲٤ (۳۲)	۲۳ (۳۰/٦)	۱٤ (۱۸/٦)	۸ (۱۰/٦)	٥ (٦/٦)
پنج دارویی	۲۹	(I, II, III, IV, V) بتالاکتام، تتراسایکلین، کوتریموکسازول، آمینوگلیکوزید، سیپروفلوکسازین	۲۹ (۳۸/٦)	۲۹ (۳۸/٦)	۱۳ (۱٤/۷)	۹ (۱۲)	٦ (۸)

جدا شده از ۶۲ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزا*، ۹۶/۷درصد ایزوله ها حامل ژن plcH بودند (۲۲) که با مطالعه ما همسو بود. همچنین در مطالعه Wolska و Szweda ۹۰/۳ درصد حامل pilB بودند (۲۲) که نسبت به مطالعه ما بالاتر بود. در مطالعه Ugargol و همکاران در هندوستان روی ۲۵۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزای* جمع‌آوری شده از نمونه‌های ادرار و چرک، ژن‌های plcH و آلژینات بررسی شد. فراوانی plcH ۵۰درصد به‌دست آمد (۲۳) که در مقایسه با نتایج مطالعه ما کمتر بود. در مطالعه Mitov و همکاران در بلغارستان روی۲۰۲ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزای* با مقاومت چنددارویی از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس و منابع مختلف کلینیکی غیر مبتلا به سیستیک فیبروزیس، ژن‌های بیماری‌زا از جمله plcH جداسازی شد. نتایج بیانگر فراوانی ۹۱/۶ درصدی ژن plcH و فراوانی ۲۳/۸ درصدی ژن pilB بود (۲۴) که با مطالعه ما همسو بود. در مطالعه Mahmood Ra'oof فراوانی ژن‌های بیماری‌زا بر روی ۲۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* با مقاومت چنددارویی ارزیابی شد. فروانی ژن plcH در این ایزوله‌ها ۱۰۰درصد گزارش شد (۱۸) که مشابه مطالعه ما بود.

در مطالعه Sonbol و همکاران بر روی ۴۰ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد که ۱۲ ایزوله دارای مقاومت چنددارویی بوده و از ۱۲ ایزوله MDR، همه ایزوله‌ها (۱۰۰درصد) حامل ژن plcH بودند (۲۵). بیشترین فراوانی درن مطالعه مذکور مربوط به plcH بود که با مطالعه ما همسو بود. در مطالعه فاضلی و ممتاز در تهران فراوانی ژن‌های بیماری‌زا در ۱۰۲ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* با مقاومت چنددارویی ارزیابی شد. میزان فراوانی ژن‌های plcH ۴۵/۱درصد، plcN ۲۳/۵درصد، pilA ۳۴/۳درصد و pilB ۱۷/۶درصد تعیین شد (۲۶) که با نتایج مطالعه ما مطابقت داشت. در مطالعه سلیمی و همکاران ۶۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از دو منبع بالینی مختلف بررسی شد. ۳۰ ایزوله مربوط به بیماران سوختگی (۵۰درصد) و ۳۰ ایزوله مربوط به بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس بود. فراوانی ژن pilA در سویه‌های سیستیک فیبروزیس (۱۹ نمونه) و سوختگی (۱۷ نمونه) به ترتیب ۶۳/۳درصد و ۵۶/۷درصد تعیین شد (۲۷) که در مقایسه با نتایج مطالعه ما فروانی این ژن به مراتب بیشتر بود. دلیل این تفاوت می‌تواند به دلیل نوع ایزوله‌ها و نقش پیلی نوع چهار در ایجاد بیوفیلم در عفونت‌های تنفسی در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس و سوختگی باشد. از محدویت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم دسترسی به بتالاکتام‌های ضدسودوموناسی نظیر پیپراسیلین، کاربنی‌سیلین و تیکارسیلین و عدم بررسی الگوی مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها اشاره نمود.

نتیجه‌گیری

با توجه به فراوانی بالای ژن فسفولیپاز C در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* با مقاومت چنددارویی جداسازی شده از منابع بالینی مختلف، به‌نظر می‌رسد این عامل ویرولانس نقش مهمی در فرایند بیماری زایی این باکتری ایفا کند. همچنین نتایج این مطالعه اهمیت کمتر پیلی در ایزوله‌های با مقاومت چنددارویی را نشان داد.

تشکر و قدردانی

ایـن مقالـه حاصـل پایـان‌نامـه (شـماره ۱۳۸۳۰۵۰۷۹۳۲۰۱۳) خـانم عارفـه منظمـی بـرای اخـذ درجـه کارشناسـی ارشـد در رشـته میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان بود. بدین وسیله از گروه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی زنجان، به‌ویژه خـانم غزال نادری به خاطر همکاری در اجرای تحقیق نهایت سـپاس خـود را اعلام می‌داریم.

References

1. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes Infect. 2000 Jul; 2(9): 1051-60.

2. Agodi A, Barchitta M, Cipresso R, Giaquinta L, Romeo MA, Denaro C. Pseudomonas aeruginosa carriage, colonization, and infection in ICU patients. Intensive Care Med. 2007 Jul; 33(7): 1155-61.

3. Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii infections in the healthcare setting. Curr Opin Infect Dis. 2005 Aug; 18(4): 306-13.

4. Vettoretti L, Floret N, Hocquet D, Dehecq B, Plésiat P, Talon D, et al. Emergence of extensive-drug-resistant Pseudomonas aeruginosa in a French university hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 Oct; 28(10): 1217-22. doi: 10.1007/s10096-009-0767-8

5. Sabharwal N, Dhall S, Chhibber S, Harjai K. Molecular detection of virulence genes as markers in Pseudomonas aeruginosa isolated from urinary tract infections. Int J Mol Epidemiol Genet. 2014; 5(3): 125-34.

6. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev. 2009 Oct; 22(4): 582-610. doi: 10.1128/CMR.00040-09

7. Lutz JK, Lee J. Prevalence and antimicrobialresistanceof Pseudomonas aeruginosa in swimming pools and hot tubs. Int J Environ Res Public Health. 2011; 8(2): 554-64. doi: 10.3390/ijerph8020554

8. Quan F, Liu G, Wang L, Wang X. Investigation of pulmonary infection pathogens in neurological intensive care unit. Ther Clin Risk Manag. 2011; 7: 21-5. doi: 10.2147/TCRM.S15730

9. Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N, Siebert B, Gudowius P, Morales G, et al. Population structure of Pseudomonas aeruginosa. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104(9): 8101-6. doi: 10.1073/pnas.0609213104

10. Murray RGE, Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA. Bergey's manual of systematic bacteriology. 1st ed. Baltimore: Williams and Wilkins. 2001; pp: 141-219.

11. López DJ, Collado MI, Ibarguren M, Vasil AI, Vasil ML, Goñi FM, et al. Multiple phospholipid substrates of phospholipase C/sphingomyelinase HR2 from Pseudomonas aeruginosa. Chem Phys Lipids. 2011 Jan; 164(1): 78-82. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2010.11.001

12. Ostroff RM, Vasil AI, Vasil ML. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol. 1990 Oct; 172(1): 5915-23.

13. Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. Annu Rev Microbiol. 2002; 56: 289-314. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160938

14. Maschmeyer G, Braveny I. Review of the incidence and prognosis of Pseudomonas aeruginosa infections in cancer patients in the 1990s. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000 Dec; 19(12): 915-25.

15. Lee KK, Sheth HB, Wong WY, Sherburne R, Paranchych W, Hodges RS, et al. The binding of Pseudomonas aeruginosa pili to glycosphingolipids is a tip-associated event involving the C-terminal region of the structural pilin subunit. Mol Microbiol. 1994 Feb; 11(4): 705-13.

16. Graupner S, Frey V, Hashemi R, Lorenz MG, Brandes G, Wackernagel W. Type IV pilus genes pilA and pilC of Pseudomonas stutzeri are required for natural genetic transformation, and pilA can be replaced by corresponding genes from nontransformable species. J Bacteriol. 2000 Apr; 182(8): 2184-90.

17. Clinical an Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 23th Informational Supplement. CLSI document M100-S25. 2015; Vol 35. No 3.

18. Mahmood Ra'oof W. Distribution of algD, lasB, pilB and nan1 genes among MDR clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in respect to site of infection. Medical Journal of Tikrit. 2011; 17(2): 148-60.

19. Jamali S, Shahid M, Farrukh S, Singh A, M. Khan HM. Molecular characterization of genes encoding AmpC beta-lactamases in clinical isolates of Pseudomonas and Acinetobacter species. J App Pharm Sci. 2015; 5(10): 48-51. doi: 10.7324/JAPS.2015.501009

20. Fazeli H, Havaei SA, Solgi H, Shokri D, Motallebirad T. Pattern of Antibiotic Resistancein Pesudomonas Aeruginosa Isolated from Intensive Care Unit, Isfahan, Iran. J Isfahan Med Sch. 2013; 31(232): 433-38.

21. Finnan Sh, Morrissey JP, O'Gara F, Boyd F. Genome Diversity of Pseudomonas aeruginosa Isolates from Cystic Fibrosis Patients and the Hospital Environment. J Clin Microbiol. 2004; 42(12): 5783-92. doi: 10.1128/JCM.42.12.5783-5792.2004

22. Wolska K, Szweda P. Genetic features of clinical Pseudomonas aeruginosa strains. Pol J Microbiol. 2009; 58(3): 255-60.

23. Ugargol AR, Srikanth NS, Shilpa K, Santosh Patil. Characterisation and Detection of Virulence Factors, Alginate and Phospholipase 'C' in Pseudomonas Aeruginosa in a Tertiary Care Hospital. Int J Health Sci Res. 2014; 4(5): 82-87.

24. Mitov I, Strateva T, Markova B. Prevalence of Virulence Genes Among Bulgarian Nosocomail And Cystic Fibrosis Isolates of Pseudomonas aeruginosa. Braz J Microbiol. 2010; 41(3): 588–95. doi: 10.1590/S1517-83822010000300008

25. Sonbol FI, Khalil MA, Mohamed AB, Ali SS. Correlation between antibiotic resistance and virulence of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. Turk J Med Sci. 2015;45(3):568-77.

26. Fazeli N, Momtaz H. Virulence Gene Profiles of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Isolated From Iranian Hospital Infections. Iran Red Crescent Med J. 2014 Oct; 16(10): e15722. doi: 10.5812/ircmj.15722

27. Salimi Chirani A, Dabiri H, Nikokar I, Ebrahimpour Komleh M, Dousdar F, Goudarzi H, et al. [Evaluation of type IV pilin sub groups in Pseudomonas aeruginosa isolated from environmental samples, cystic fibrosis and burn patients]. Iran J Med Microbiol. 2014; 8(3): 1-7. [Article in Persian]

Original Paper

Detection of phospholipase and type IV pili genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Monazami A (B.Sc)[1], Haghi F (Ph.D)*[2]

[1]M.Sc Student in Microbiology, Department of Microbiology, Biology Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran. [2]Associate Professor, Department of Microbiology and Virology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

Abstract

Background and Objective: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen with numerous virulence factors such as phospholipase and type IV pili. The emergence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* has become a serious public health threat worldwide. This study was done to determine the frequency of plcH, plcN, pilA and pilB genes in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples.

Methods: In this cross-sectional study, 93 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* collected from different clinical samples from hospitals of Zanjan, Iran during 2013-14. After identification of isolates by biochemical tests, antibiotic susceptibility testing (Kirby-Bauer) was performed according to CLSI guidelines. Total DNA extracted and PCR was done to detect of plcH, plcN, pilA and pilB genes.

Results: Among 93 of *Pseudomonas aeruginosa* isolates, the highest antibiotic resistance related to Erythromycin and Cefoxitin (95.6%) and the lowest resistance related to Amikacin (26.8%). 80.6% of isolates were multidrug resistant (MDR). Out of 75 MDR isolates, the frequency of plcH, plcN, pilA and pilB genes was 97.4%, 49.3%, 26.6% and 17.3%, respectively.

Conclusion: According to high frequency of phospholipase C gene (plcH) in MDR *Pseudomonas aeruginosa* isolates which isolated from different clinical samples, presumably this virulence factor plays an important role in pathogenesis of this bacterium.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Antibiotic resistance, Phospholipase C, Type IV Pili

*** Corresponding Author: Haghi F (Ph.D), E-mail: haghi@zums.ac.ir**

Received 30 Apr 2016 **Revised** 28 Aug 2016 **Accepted** 5 Sep 2016

Cite this article as: Monazami A, Haghi F. [Detection of phospholipase and type IV pili genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*]. J Gorgan Uni Med Sci. Summer 2017; 19(2): 91-97. [Article in Persian]