ارزیابی تولید بتالاکتاماز توسط پلاسمید در سویه‌های سودموناس آئروژینوزا جدا شده از سوختگی‌ها

سعید سپهری‌سرشت[1]، دکتر شهین نجارپیرایه[1*]، دکتر مرتضی ستاری[1]، دکتر محمد آهنگرزاده‌رضایی[1]

۱- گروه میکرب‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

دریافت: ۸۵/۸/۳۰ پذیرش: ۸۶/۲/۳

Title: *Production of plasmid-mediated ß-lactamases in Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients*

Authors: *Sepehri Seresht S, (MSc); Najar Peerayeh S, (PhD); Sattari M, (PhD); Rezaee MA, (PhD).*

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa is the most important pathogen causing nosocomial infections in burn patients. The existence of ß-lactamase producing isolates exhibiting resistance to most ß-lactam antimicrobial agents greatly complicates the clinical management of patients infected with such isolates. The aim of this study was to evaluate plasmid mediated ß-lactamase production in Pseudomonas aeruginosa isolates.*

Methods: *80 isolatedPseudomonas aeruginosa were isolated from patients with nosocomial infections admitted to Motahari Burn Center in Tehran from March 2004 to February 2005. ß-lactamase production was determined by Iodomertric test, and plasmids were extracted by alkaline lyses method. Electroporation was used for transfection of E. coli DH5α with extracted plasmids.*

Results: *ß-lactamase production was positive in all Pseudomonas aeruginosa isolates. Most of the strains (97.5%) showed between one and three plasmid bands in agarose gel. Only large plasmids were transferred to E. coli DH5α by electroporation, and ß-lactamase production was positive in all of transformed E. coli DH5α.*

Conclusion: *The results indicate that the ß-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa isolates are predominant in the Motahari Burn Center, and the plasmids commonly involve in ß-lactamase production. Therefore, these plasmids may transfer resistance to the same or different species.*

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa, beta-lactamase, Iodometric test, plasmid.*

Hakim Research Journal 2007; 10(1): 61- 65.

* نویسنده مسؤول: دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه میکروب‌شناسی. تلفن: (۳۸۴۰) ۸۸۰۱۱۰۰۱ نمابر: ۸۸۰۱۳۰۳۰

پست الکترونیک: najarp_s@modares.ac.ir

www.SID.ir

چکیده

مقدمه: *سودوموناس آئروژینوزا، مهم‌ترین باکتری بیماری‌زایی است که در بیماران دچار سوختگی و بستری در بیمارستان، عفونت ایجاد می‌کند. وجود سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز که نسبت به اکثر داروهای بتالاکتام مقاوم هستند مشکلات جدی در درمان این بیماران بوجود می‌آورد. هدف این بررسی، ارزیابی تولید پلاسمیدی بتالاکتاماز در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا است.*

روش کار: *۸۰ ایزوله از سودوموناس آئروژینوزا از بیماران بستری در بیمارستان سوختگی مطهری جدا گردید. تولید بتالاکتاماز با آزمون یدومتری صورت گرفت و پلاسمید با روش لیز قلیایی از باکتری استخراج شد. از الکتروپوریشن برای ترانسفورم کردن باکتری اشرشیا کلی DH5α با پلاسمیدهای استخراج شده از سودوموناس آئروژینوزا استفاده گردید.*

یافته‌ها: *تولید بتالاکتاماز توسط همه سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا (۱۰۰٪) مثبت بود. اغلب سویه‌ها (۹۷/۵٪) دارای یک تا سه باند پلاسمیدی بر روی ژل آگاروز بودند. تنها پلاسمید بزرگ باکتری با روش الکتروپوریشن به اشرشیاکلی DH5α منتقل گردید. آزمایش یدومتری همه سویه‌های ترانسفورم شده اشرشیاکلی DH5α مثبت بود.*

نتیجه‌گیری: *نتایج نشان داد که سویه‌های تولید کننده بتالاکتاماز سودوموناس آئروژینوزا در بیمارستان سوختگی مطهری غالب هستند و در این سویه‌ها تولید بتالاکتاماز با واسطه پلاسمید صورت می‌گیرد. بنابراین احتمال دارد این پلاسمیدها مقاومت را به سایر سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا و یا به گونه‌های باکتری‌های دیگر منتقل نمایند.*

گل‌واژگان: *سودوموناس آئروژینوزا، بتالاکتاماز، یدومتری، پلاسمید.*

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در بخش‌های سوختگی است و باعث ایجاد عفونت‌های اکتسابی از بیمارستان می‌شود (۱). این باکتری به فراوانی در طبیعت پخش شده و از محیط بیمارستان، وسایل پزشکی، پرستاران و سایر پرسنل بیمارستان به آسانی جدا می‌گردد (۲). سودوموناس آئروژینوزا مقاومت ذاتی نسبت به بسیاری از مواد ضدمیکروبی و ضدعفونی کننده نظیر ترکیبات آمونیم، هگزاکلروفن، صابون‌ها و محلول‌های ید دارد (۳). افزون بر این، استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در سال‌های اخیر موجب شده است که این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف از گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی مقاوم شود. وجود سویه‌های با مقاومت چندگانه دارویی، مشکل اصلی در درمان این باکتری در بخش‌های مهم بیمارستانی چون سوختگی و مراقبت‌های ویژه است (۴ و ۵). مقاومت دارویی معمولاً با اکتساب پلاسمید یا سایر عناصر متحرک ژنتیکی و یا ایجاد جهش در کروموزوم باکتری است. پلاسمیدهای R (مقاومت دارویی) یکی از مهم‌ترین عواملی هستند که مقاومت دارویی را در بین سویه‌های مختلف یک گونه باکتری و نیز بین گونه‌های نزدیک پخش می‌کنند (۸ -۶). آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام نظیر پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، کاربا‌پنم‌ها و منوباکتم‌ها از داروهای انتخابی برای درمان تک دارویی و یا ترکیبی عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا هستند. مقاومت نسبت به بتالاکتام‌ها با راه‌های مختلفی نظیر تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز، افزایش بیان پمپ‌های افلاکس برای دفع فعال داروها و کاهش نفوذپذیری غشای خارجی باکتری صورت می‌گیرد (۱۱ -۷). آنزیم‌های بتالاکتاماز توسط کروموزوم و پلاسمید تولید می‌گردند ولی تولید پلاسمیدی این آنزیم‌ها به‌دلیل انتشار سریع آنها بین باکتری‌های مختلف از اهمیت بیشتری برخوردار است. این تحقیق تولید پلاسمیدی بتالاکتاماز را در بین سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از عفونت‌های سوختگی را بررسی می‌نماید.

روش کار

نمونه‌ها: ۸۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از بیماران سوختگی بستری در بیمارستان سوانح و سوختگی شهید مطهری جدا شدند و توسط تست‌های بیوشیمیایی استاندارد تا حد گونه مورد تأیید قرار گرفتند.

Archive of SID
www.SID.ir

استخراج بتالاکتاماز: در باکتری‌های گرم منفی، آنزیم‌های بتالاکتاماز در فضای پری‌پلاسمیک قرار دارند (۱۲). در این مطالعه از روش کولیگان[1] برای استخراج بتالاکتامازها استفاده شد (۱۳). ابتدا یک کلونی از کشت ۱۸ ساعته باکتری بر روی آگار مغذی برداشته و در محیط کشت مایع LB به‌طور کامل حل شد و به‌مدت ۲۴-۱۸ ساعت در $37^{\circ}C$ قرار گرفت. سپس باکتری به‌مدت یک دقیقه سانتریفوژ و رسوب آن با محلول PBS دو بار شسته شد. آنگاه به رسوب محلول تریس- سوکروز افزوده و ورتکس گردید. سپس محلول EDTA به آن اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. آنگاه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس آب مقطر استریل به رسوب حاصل اضافه و به آرامی مخلوط و مجدداً به‌مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت و پس از سانتریفوژ کردن از مایع رویی برای آزمون بتالاکتاماز استفاده گردید.

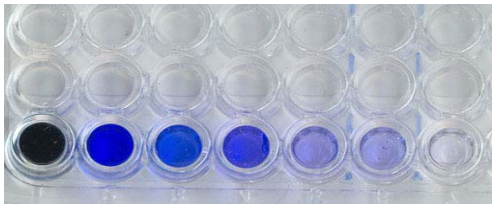
آزمون بتالاکتاماز (یدومتری): ابتدا محلول ید تازه تهیه شده را با محلول نشاسته ۰/۰۴٪ مخلوط کرده و ۲۰۰ میکرولیتر از آن به ۵۰ میکرولیتر محلول پنی‌سیلین اضافه شد. آنگاه ۲۰ میکرولیتر از نمونه استخراج شده باکتری به مخلوط اضافه و تغییر رنگ ایجاد شده بررسی گردید (۱۴).

استخراج پلاسمید: برای استخراج پلاسمید از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا از روش لیز قلیایی با تغییرات مختصر استفاده گردید (۱۵ و ۱۶). از جمله این تغییرات، شستشوی ابتدایی باکتری‌ها با محلول PBS و افزایش مدت زمان قرار گرفتن مخلوط واکنش بر روی یخ پس از افزودن محلول لیز کننده بود.

الکتروپوریشن: برای بررسی نقش پلاسمیدها در تولید بتالاکتامازها از ترانسفورماسیون به روش الکتروپوریشن استفاده شد (۱۷). در این روش از نمونه‌های پلاسمیدی جدا شده از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا برای ترانسفورمه کردن اشرشیاکلی DH5α (فاقد آنزیم بتالاکتاماز) استفاده گردید. سپس آزمون یدومتری بر روی اشرشیاکلی DH5α ترانسفورم شده انجام گرفت.

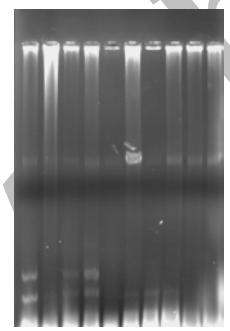
نتایج

آزمون یدومتری: در روش یدومتری، مخلوط ید و نشاسته محلول آبی‌رنگ ایجاد می‌کند و پنی‌سیلین در اثر عمل آنزیم بتالاکتاماز به اسید پنی‌سیلوئیک تبدیل می‌شود که میزان تمایل اسید پنی‌سیلوئیک برای اتصال به ید بیشتر از نشاسته است. در نتیجه اگر بر روی مخلوطی از ید و نشاسته، پنی‌سیلین و سپس آنزیم بتالاکتاماز (نمونه) اضافه شود، اسید پنی‌سیلوئیک حاصل، باعث جدا شدن ید از نشاسته و در نتیجه از بین رفتن رنگ آبی می‌شود. همه ۸۰ (۱۰۰٪) سویه سودوموناس آئروژینوزا بتالاکتاماز تولیدکردند (شکل ۱).



شکل ۱- با افزودن آنزیم بتالاکتاماز به مخلوط ید- نشاسته- پنی‌سیلین رنگ مخلوط از آبی به بی‌رنگ تبدیل می‌شود. در این شکل از سمت راست به چپ آنزیم با تأخیر زمانی ۲۰ ثانیه اضافه شده است. تغییر تدریجی رنگ مشهود است.

استخراج پلاسمید: در کلیه سویه‌ها (به‌جز یک سویه) یک تا سه باند پلاسمیدی مشاهده گردید. ۲۵٪ (۲۰ :۸۰) سویه‌ها حاوی سه باند پلاسمیدی، ۸/۷٪ (۷ :۸۰) آنها دو باند پلاسمیدی و ۶۶/۳٪ (۵۳ :۸۰) سویه‌ها حاوی یک باند پلاسمیدی بودند (شکل ۲). با ثابت نگاهداشتن شرایط الکتروفورز از فاکتور Rf برای بررسی شباهت پلاسمیدها استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد، کلیه ۷۹ نمونه حاوی پلاسمید دارای یک باند پلاسمیدی مشابه با وزن ملکولی بالا بودند.



شکل ۲- الگوی الکتروفورزی پلاسمیدهای جدا شده از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا: در تمامی سویه‌ها به جز سویه شماره ۳۷ (حفره دوم از سمت چپ) بین یک تا سه باند پلاسمیدی مشاهده شد.

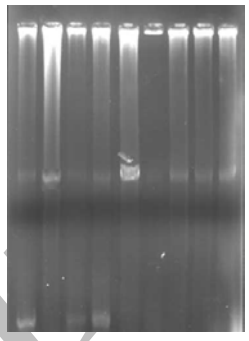
الکتروپوریشن: محتوی پلاسمیدی هر یک از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به‌طور جداگانه برای انجام ترانسفورماسیون به‌روش الکتروپوریشن و انتقال به اشرشیاکلی DH5α مورد استفاده قرار گرفتند. تنها باند پلاسمیدی مشابه در

[1] Coligan

www.SID.ir
Archive of SID

سویه‌ها که دارای وزن مولکولی بالا بود به اشرشیاکلی DH5α منتقل شد (شکل ۳).

آزمون یدومتری تمامی ۷۹ اشرشیاکلی DH5α ترانسفورم شده با پلاسمید مثبت گردید.



شکل ۳- الگوی الکتروفورزی پلاسمیدهای جدا شده از سویه‌های ترانسفورم شده اشرشیاکلی DH5α (حفره‌های ۱ تا ۴ از راست) در مقایسه با پلاسمیدهای جدا شده از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا (حفره‌های ۵ تا ۹ از راست). تنها پلاسمید با وزن مولکولی بالا از سودوموناس آئروژینوزا به اشرشیاکلی DH5α منتقل شده است.

بحث

سودوموناس آئروژینوزا نقش بسیار مهمی در عفونت‌های انسانی به‌خصوص در بیماران سوختگی بازی می‌کند، زیرا بسیاری از سویه‌های این باکتری در برابر اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهند. تشخیص سریع عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا و جلوگیری از انتشار آن در بین بیماران بسیار ضروری به‌نظر می‌رسد؛ به‌خصوص هنگامی که ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر روی عناصر ژنتیکی متحرک قرار داشته باشد و بتواند در بین سویه‌ها منتشر شود (۱۸ و ۱۹).

در این تحقیق ۱۰۰٪ سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران بستری در بخش سوختگی، آنزیم بتالاکتاماز تولید می‌کردند. آنزیم‌های بتالاکتاماز سبب تجزیه داروهای بتالاکتام و بی‌اثر شدن آنها می‌گردند. این آنزیم‌ها بسیار متنوع هستند و تولید آنها از مؤثرترین راه‌های بی‌اثرسازی داروهای بتالاکتام محسوب می‌شود.

پاگانی[1] و همکاران (۲۰) از ایتالیا، پلگرینو[2] و همکاران (۲۱) از برزیل و شاهید[3] و همکاران (۱۱) از هند نیز تولید ۱۰۰٪ بتالاکتاماز را برای سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا گزارش کرده‌اند. آنالیز الگوی پلاسمیدی باکتری‌ها نشان داد که ۹۷/۵٪ سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا دارای پلاسمید هستند. تحقیقات نشان می‌دهد سویه‌های واجد پلاسمید این باکتری رو به افزایش است. به‌طوری‌که میلسیمو[4] و همکاران (۲۲) در ۱۹۹۶ نشان دادند که ۴۵/۲٪ از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا دارای پلاسمید هستند. در حالی که در بررسی که توسط شاهچراغی و همکاران (۳) در سال ۲۰۰۳ در تهران صورت گرفته است ۹۵٪ سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا واجد پلاسمید گزارش شده‌اند.

انتقال پلاسمید با روش الکتروپوریشن به باکتری اشرشیاکلی DH5α نشان داد که پلاسمیدهای تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز در ۱۰۰٪ سویه‌های دارای پلاسمید وجود دارند و حداقل یکی از منابع تولید آنزیم بتالاکتاماز در ۹۷/۵٪ سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا وجود پلاسمید می‌باشد. این پلاسمید بین سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مشترک بود و شاید این حقیقت را نشان می‌دهد که این پلاسمید در بین سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به آسانی قابل انتقال است. تولید پلاسمیدی بتالاکتاماز توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (۸-۶ و ۲۳).

نتیجه‌گیری

طبق نتایج این مطالعه، ۹۷/۵٪ سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سوختگی بستری در بیمارستان دارای پلاسمیدی هستند که ژن‌های تولید آنزیم بتالاکتاماز را دارد. از آن‌جا که پلاسمیدها می‌توانند در بین سویه‌های یک باکتری یا سویه‌های باکتری‌های در ارتباط منتقل شوند، کنترل انتشار پلاسمیدها در بین باکتری‌ها از طریق کاهش مصرف آنتی‌بیوتک‌های محرک تولید بتالاکتامازها و همچنین استفاده از ترکیب دارویی از گروه‌های آنتی‌بیوتیکی مؤثر بر این باکتری جهت حذف سریع سودوموناس آئروژینوزا ضروری به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

از همکاری و بذل عنایت پرسنل محترم آزمایشگاه بیمارستان سوانح و سوختگی شهید مطهری و جناب آقای دکتر علیرضا خوشدل تشکر و قدردانی می‌شود.

[1] Pagani
[2] Pellegrino
[3] Shahid
[4] Millesimo

Archive of SID
www.SID.ir

References

1- Neu HC. The role of *Pseudomonas aeruginosa* in infections. J Antimocrob Chemother 1983; 11: 1-13.
2- Pirnay J, Vos D, Cochez C, et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: Persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. J Clin Microbiol 2003; 41: 1192-1202.
3- Shahcheraghi F, Feizabadi MM, Yamin V, et al. Serovar determination, drug resistance patterns and plasmid profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients at two hospitals of Tehran (IRAN). Burns 2003; 547-551.
4- Makedou KG, Tsiakiri EP, Bisiklis AG, et al. Changes in antibiotic resistance of the most common Gram- negative bacteria isolated in intensive care units. J Hosp Infect 2005; 60(3): 245-8.
5- Tsukayama DT, van Loon HJ, Cartwright C, et al. The evolution of *Pseudomonas aeruginosa* during antibiotic rotation in a medical intensive care unit: the RADAR-trial. Int J Antimicrob Agents 2004; 24(4): 339-45.
6- Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobiol resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nighatmare? Clin Infect Dis 2002, 34:634-640.
7- Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenems in gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 321-331.
8- Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum B-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2385-2392.
9- Regal RE, DePestel DD, VandenBussche HL. The effect of an antimicrobial restriction program on *Pseudomonas aeruginosa* resistance to beta-lactams in a large teaching hospital. Pharmacotherapy 2003; 23(5): 618-24.
10- Roe MT, Pillai SD. Monitoring and identifying antibiotic resistance mechanisms in bacteria. Poult Sci 2003; 82(4):622-6.
11- Shahid M, Malik A, Sheeba S. Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa strains harbouring R-plasmids and AmpC beta-lactamases isolated from hospitalized burn patients in a tertiary care hospital of North India. FEMS Microbiol Lett 2003; 228(2): 181-6.
12- Ma Q, Zhai Y, Schneider JC, et al. Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. Biochim Biophys Acta 2003; 1611(1-2): 223-33.
13- Coligan JE, Dunn BM, Speicher DW. Short protocols in protein science. USA: John Wiely and Sons Inc.; 2003: 5-9.
14- Woodford N, Johnson AP. Molecular bacteriology: Protocols and clinical applications. New Jeresy: Humana press; 1998: 465-469.
15- Hardy KG. Plasmids: a practical approach. Switzerland: Glaxo Institute for Molecular Biology; 1993:4-7.
16- Woodford N, Johnson AP. Molecular bacteriology: Protocols and clinical applications. New Jeresy: Humana Press; 1998: 51-63.
17- Sambrook J. Molecular cloning: Preparing cells for transfotmation. New York: Gold Spring Harbor Laboratory Press; 2001: 119-122.
18- Cabrera EC, Halos CC, Velmonte MD. Antibiograms, O serotypes and R plasmids of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates. FEMS Microbiol. Letters 2003; 228: 181-186.
19- Veenu, Sikka R, Arora DR. Isolation and susceptibility pattern of nonfermenting gram-negative bacilli from clinical samples. Indian J Med Microbiol 1998; 17: 14-18.
20- Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, et al. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum B-lactamase in Northern Italy. J Clin Microbiol 2004; 42: 2523-2529.
21- Pellegrino F, Teixeira LM, Carvalho M, et al. Occurrence of a multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol 2002; 40: 2420-2424.
22- Millesimo M, De intins G, Chirillo D. *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: Serotypes, resistance phenotype and plasmid profiles. Eur J Epidemiol 1996; 12: 123-129.
23- Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, et al. Widespread detection of PER-1 type extended-spectrum B-lactamases among nosocomial *Acinteobacter* spp. and Pseudomonas aeruginosa isolates in Turkey. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2265-2269.

Archive of SID

www.SID.ir