Original Article JQUMS, Vol.18, No.2, 2014, pp.12-17

Comparison of genotypic method of mexX gene expression and phenotypic method of minimum inhibitory concentration in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa

R. Pourahmad* PM. Tulkens** F. Van Bambeke**

*Assistant Professor of Genetics, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
**Professor of Molecular Pharmacology, University of Catholique de Louvain, Brussels, Belgium

✵Abstract

Background: The MexXY-OprM efflux pump contributes to the intrinsic resistance to various antimicrobial agents in Pseudomonas aeruginosa isolated from patients. Detection of the expression of genes encoding components of the MexXY-OprM efflux pump such as mexX using real time polymerase chain reaction (PCR) can be helpful in selecting suitable antibiotic treatment.

Objective: The aim of this study was to compare the genotypic method of mexX gene expression and the phenotypic method of minimum inhibitory concentration in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa.

Methods: This descriptive-laboratory study was conducted in University of Catholique de Louvain in 2012. After RNA extraction from 16 clinical isolates and cDNA synthesis, expression of mexX was detected by real time PCR using P. aeruginosa mex Q-TesT. According to the mex Q-TesT guideline, which is based on student T-test with 95% confidence interval and $P<0.05$, values equal or greater than 5 were considered as overexpression.

Findings: Only 7 out of 11 clinical isolates with increased minimum inhibitory concentration for aminoglycosides showed overexpression of mexX. There was not any relationship between the pump expression and the increase in minimum inhibitory concentration values for various antibiotics.

Conclusion: Since the results of the gene expression and the antimicrobial resistance data are not consistent in all cases, simultaneous use of both genotypic and phenotypic methods is recommended.

Keywords: Pseudomonas Aeruginosa, OprM Protein, Real-Time Polymerase Chain Reaction, Drug Resistance

Corresponding Address: Razieh Pourahmad, Faculty of Science, Shahrekord University, Saman Road, Shahrekord, Iran
Email: razieh_Jaktaji@yahoo.com
Tel: +98-381-4424401-2200
Received: 7 Sep 2013
Accepted: 22 Dec 2013

مقایسه دو روش ژنوتیپی بیان ژن mexX و فنوتیپی حداقل تراکم بازدارندگی در سویه‌های بالینی سودوموناس ایروژنزا

دکتر راضیه پوراحمد* پروفسور پل م تولکنز** پروفسور فرانسواسی ون بمبک**

* استادیار ژنتیک دانشگاه شهرکرد
** استاد فارماکولوژی مولکولی دانشگاه کاتولیک لوین بلژیک

آدرس نویسنده مسؤول: شهرکرد، کیلومتر دو جاده سامان، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، تلفن ۲۲۰۰-۴۴۲۴۴۰۱-۰۳۸۱
Email: razieh_Jaktaji@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۱

چکیده

زمینه: فعالیت پمپ MexXY-OprM باعث مقاومت ذاتی به عوامل ضد میکروبی متعدد در سویه‌های سودوموناس ایروژنزا جدا شده از بیماران می‌شود. بررسی بیان ژن‌های کدکننده اجزای پمپ MexXY-OprM نظیر mexX با روش Real time PCR می‌تواند در انتخاب درمان مناسب آنتی‌بیوتیکی کمک کند.

هدف: مطالعه به منظور مقایسه دو روش ژنوتیپی بیان ژن mexX و فنوتیپی حداقل تراکم بازدارندگی در سویه‌های بالینی سودوموناس ایروژنزا انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۰ در دانشگاه کاتولیک لوین انجام شد. پس از استخراج RNA از ۱۶ سویه بالینی و ساختن cDNA، سطح بیان ژن mexX با روش Real time PCR و کیت mexQ-TesT تعیین شد. طبق دستور کار کیت که مبتنی بر محاسبه آماری تی با حدود اطمینان ۹۵٪ و P<۰/۰۵ است، سطح بیان ۵ و بالاتر به عنوان بیش بیان در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: از ۱۱ سویه بالینی با افزایش حداقل تراکم بازدارندگی برای آمینوگلیکوزیدها، تنها ۷ سویه بیش بیان ژن mexX را نشان دادند. هیچ ارتباط مستقیمی میان مقدار بیان پمپ با مقدار افزایش حداقل تراکم بازدارندگی برای آنتی بیوتیک‌های مختلف مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که نتایج بیان ژن با داده‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در همه موارد همخوانی نشان نداد، استفاده همزمان از دو روش ژنوتیپی و فنوتیپی توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها: سودوموناس ایروژنزا، پروتئین OprM، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی، مقاومت دارویی

مقدمه:

انواع مختلفی از سیستم های تخلیه چند جزئی نظیر MexAB-OprM و MexXY-OprM متعلق به خانواده Resistance Nodulation Division (RND) در باکتری‌های گرم منفی وجود دارند. این سیستم‌ها عامل ایجاد مقاومت ذاتی و اکتسابی علیه مواد ضد میکروبی، حلال‌های آلی و فلزهای سنگین هستند. یکی از باکتری‌های گرم منفی، سودوموناس ایروژنزا (عامل بیماری‌زای مهم انسانی) است.[۱-۲]

آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی که از لحاظ ساختمانی غیر مرتبط هستند نظیر بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون‌ها در درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط این باکتری استفاده می‌شوند.[۲]

پمپ MexXY-OprM از سه جزء تشکیل شده است: MexX که یک پروتئین متصل به غشاء است، MexY که یک پروتئین درون غشایی است و باعث انتقال فعال آنتی‌بیوتیک‌ها از عرض غشاء می‌شود و OprM که یک کانال خروج خارج غشایی است.[۱] این اجزا به ترتیب توسط ژن‌های mexX، mexY و oprM کد می‌شوند. دو ژن اول در یک اپرون قرار دارند، ولی ژن سوم مربوط به اپرون mexAB-oprM است.[۲] این اپرون

به صورت پیوسته بیان می‌شود و به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها شامل بتالاکتام‌ها (به استثنای ایمی‌پنم)، کینولون‌ها، تتراسیکلین، ماکرولیدها، کلرآمفنیکل و غیره مقاومت ایجاد می‌کند. افزایش بیان پمپ MexAB-OprM در برخی از سویه‌های بالینی سودوموناس ایروژنزا دیده شده است.[۳و۴]

پمپ MexXY-OprM همچنین باعث مقاومت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر پنی‌سیلین‌ها (به استثنای کربنی سیلین)، کینولون‌ها، تتراسیکلین، ماکرولیدها، کلرآمفنیکل و آمینوگلیکوزیدها می‌شود.[۴و۵] آمینوگلیکوزیدها در تراکم‌های غیر بازدارنده، محرک بیان پمپ فوق هستند. این مسأله به این معناست که پمپ مزبور خصوصیت القایی دارد.[۶]

اپرون mexXY به صورت منفی توسط ژن بالا دست تنظیم می‌شود که به طور معکوس از اپرون رونویسی می‌شود و mexZ نام دارد. غیر فعال شدن این ژن باعث افزایش بیان mexXY می‌شود.[۴و۷و۸] بیش فعالی پمپ MexXY-OprM در سویه‌های بالینی گزارش شده است.[۴و۹]

همان‌طور که ذکر شد دو پمپ MexAB-OprM و MexXY-OprM برخی سوبستراهای آنتی‌بیوتیکی مشترک دارند. بنابراین مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند در نتیجه بیش فعالی یکی یا هر دوی آن‌ها باشد.[۴و۱۰] همچنین در مورد بتالاکتام‌ها علت مقاومت علاوه بر پمپ‌های فوق می‌تواند تولید انواع بتالاکتامازها به خصوص متالوبتالاکتامازها باشد.[۱۳-۱۰] این مسأله باعث ناکارآمد شدن درمان آنتی‌بیوتیکی در بیماران مبتلا به عفونت سودوموناسی می‌شود. بیش فعالیت این پمپ‌ها را می‌توان با بررسی بیش بیان ژن‌های کدکننده آن‌ها با روش Real time PCR سنجید. لذا مطالعه حاضر با هدف مقایسه دو روش ژنوتیپی بیان ژن mexX و فنوتیپی حداقل تراکم بازدارندگی در سویه‌های بالینی سودوموناس ایروژنزا انجام شد.

❋ مواد و روش‌ها:

این مطالعه توصیفی- آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۰ انجام شد. سویه‌های بالینی از آسپیره تراشه بیماران مبتلا به پنومونی و بستری در بیمارستان‌های آموزشی وابسته به دانشگاه کاتولیک لوین (UCL) شهر بروکسل در کشور بلژیک جداسازی شدند و با روش‌های استاندارد میکروبیولوژیکی تشخیص داده شدند.[۱۴] مقدار حداقل تراکم بازدارندگی آنتی‌بیوتیک‌های مختلف که در درمان عفونت‌های سودوموناسی استفاده می‌شوند با روش رقت‌های متوالی در محیط مولر هینتون برات (امریکا BD,) مطابق با توصیه‌های انستیتو استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) تعیین شد.[۱۵] سویه تیپ وحشی PA07 به عنوان شاهد استفاده شد.

برای بررسی بیان با روش Real time PCR، RNA کل از کشت‌های مرحله لگاریتمی در محیط مولر- هینتون برات با استفاده از مینی کیت کیاژن (RNeasy mini kit, Qiagen) استخراج شد. سپس نمونه‌های RNA با آنزیم Turbo DNaseI (Ambion) طبق دستور کار کارخانه سازنده تیمار شدند تا بقایای DNA موجود در نمونه‌ها حذف شود. برای اطمینان از خلوص و تعیین غلظت نمونه‌های RNA از دستگاه اسپکتروفتومتر کیوبیت (Qu-bit nucleic acid, Invitrogen) طبق دستور کار شرکت سازنده استفاده شد. تولید cDNA توسط رونویسی معکوس از ۱ میکروگرم RNA و هگزامرهای تصادفی (۶۰۰ پیکومول بر میکرولیتر) به عنوان نوان پرایمر و dNTP با استفاده از آنزیم Superscript III (Invitrogen) (۲۰ واحد بر میکرولیتر) طبق دستور کار انجام شد.

PCR با دستگاه ترموسایکلر (بیوراد مدل ۱۰۰) و مراحل حرارتی مطابق با دستور کار کیت انجام شد. از نمونه‌های cDNA حاصل برای تکثیر استفاده شد. برای این منظور از کیت mexQ-TesT (شرکت Coris Bioconcept) برای بررسی بیان mexX استفاده

شد. این کیت مخلوط پرایمرهای مخصوص ژن mexX و همچنین دو ژن خانه‌زاد به نام‌های HKG1 و HKG2 را بدون ذکر توالی دارد. برای انجام Real time PCR از شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و ۴۰ چرخه با شرایط دمایی ۱۵ ثانیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه ۶۰ درجه سانتی‌گراد و بررسی منحنی ذوب در محدوده دمایی ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از کیت سایبر گرین (Syber Green iQ^{TM} Supermix) و مطابق با دستور کار آن انجام شد. از دستگاه آی سایکلر (iCycler iQ) برای انجام واکنش استفاده شد. همچنین برای هر سویه دو نمونه جهت واکنش PCR تهیه شد (دو تکرار). بیان نسبی نمونه‌ها با استفاده از روش Pfaffl تعیین گردید.[۶] جهت تعیین بیان نسبی، مقادیر بازدهی PCR در ژن‌های خانه‌زاد و mexX محاسبه و همچنین نقطه تماس منحنی تکثیر با خط آستانه (Ct) نمونه‌ها تعیین شد.

طبق دستور کار کیت که براساس محاسبه آماری تی با حدود اطمینان ۹۵ درصد و P<۰/۰۵ است، سطح بیان ۵ و بالاتر برای ژن mexX به عنوان بیش بیان در نظر گرفته شد.[۱۶]

❋ یافته‌ها:

پس از انجام روش Real time PCR نقطه ذوب ژن mexX ۸۷ درجه سانتی‌گراد و ژن‌های خانه‌زاد HKG1 و HKG2 به ترتیب ۸۹ و ۸۸ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. منحنی‌های ذوب نمونه‌ها، خالص بودن آن‌ها را نشان داد. ضریب همبستگی این ۳ ژن حدود ۰/۹۹، بازدهی محصول بیش از ۹۴ درصد و بازدهی واکنش در محدوده ۱/۹ تا ۲/۱ بود. ۷ نمونه بالینی از ۱۶ نمونه بالینی افزایش بیان ژن mexX را نشان دادند و بیان این ژن در بقیه نمونه‌ها در مقایسه با سویه تیپ وحشی تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. در این ۷ سویه، حداقل تراکم بازدارندگی جنتامیسین و آمیکاسین نسبت به سویه تیپ وحشی افزایش یافته، ولی برای سایر آنتی‌بیوتیک‌ها، حداقل تراکم بازدارندگی متغیر بود (جدول شماره ۱). ۴ سویه بالینی (PA152، PA281، PA283 و PA297) بیش بیان‌کننده ژن mexX نبودند، ولی افزایش حداقل تراکم بازدارندگی برای آمینوگلیکوزیدها داشتند. همچنین هیچ ارتباط مستقیمی میان مقدار افزایش بیان پمپ با مقدار افزایش حداقل تراکم بازدارندگی برای آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مشاهده نشد.

جدول ۱- مقایسه مقدارحداقل تراکم بازدارندگی آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و میانگین مقادیر بیان نسبی ژن mexX در سویه تیپ وحشی با نمونه‌های بالینی

سویه	آمیکاسین	سیپروفلوکساسین	سفپیم	پیپرسیلین- تازوباکتام	جنتامایسین	mexX
PA07	۴	۰/۲۵	۲	۴	۲	۱
PA19	۸	۲	۲	۴	۴	۵/۴۸
PA22	۱۶	۱	۴	۸	۴	۱۵/۶۳
PA50	۴	۴	۴	۸	۴	۹/۷۹
PA119	۸	۸	۱۲۸	۲۵۶	۴	۳۳/۲۸
PA152	۱۶	۰/۲۵	۴	۸	۴	۰/۸
PA156	۴	۱	۳۲	۱۲۸	۲	۰/۹۷
PA213	۸	۲	۳۲	۲۵۶	۸	۴۷/۰۱
PA248	۸	۰/۲۵	۸	۱۶	۲	۴/۱۳
PA278	۸	۰/۲۵	۳۲	۲۵۶	۲	۱/۲۳
PA281	۸	۰/۲۵	۳۲	۱۲۸	۴	۳/۶
PA283	۸	۰/۲۵	۳۲	۱۲۸	۴	۳/۵۱
PA297	۸	۰/۵	۸	۱۶	۴	۱/۴۶
PA313	۴	۰/۲۵	۴	۱۶	۲	۳/۷۷
PA354	۸	۰/۵	۸	۶۴	۴	۵۳/۹۱
PA355	۸	۰/۵	۴	۴	۴	۱۴۱/۴۹

مقادیر بیان میانگین دو تکرار بوده و انحراف استاندارد در همه موارد کم‌تر از ۱۰٪ میانگین است. اعداد مربوط به ستون بیان نسبی، نسبت بیان ژن هدف (mexX) به بیان ژن خانه‌زاد (gapA) را نشان می‌دهد. مقادیر بیش از ۵ قابل ملاحظه در نظر گرفته شد (P<۰/۰۵)

❋ بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد که داده‌های مربوط به حداقل تراکم بازدارندگی در همه موارد با نتایج بیان ژن mexX همخوانی نداشت که لزوم استفاده از هر دو نوع سنجش فنوتیپی و ژنوتیپی را متذکر می‌شود.

این یافته که ۷ سویه از ۱۶ سویه بالینی افزاینده بیان پمپ MexXY-OprM بودند، تأییدکننده گزارش‌های قبلی در زمینه افزایش بیان پمپ در برخی از سویه‌های بالینی است.[۵و۱۴] همچنین احتمال وقوع موتاسیون در ناحیه mexOZ را پیشنهاد می‌کند.

در این مطالعه ۷ سویه بیش بیان‌کننده پمپ، دارای افزایش حداقل تراکم بازدارندگی برای آمینوگلیکوزیدها نسبت به سویه تیپ وحشی بودند، حال آن که حداقل تراکم بازدارندگی برای سایر آنتی‌بیوتیک‌ها متغیر بود. این یافته دلالت بر حضور الگوهای متفاوت مقاومت مطابق با نتایج قبلی[۱۷] و همخوانی نتایج ژنتیکی تنها با نتایج حداقل تراکم بازدارندگی برای آمینوگلیکوزیدها (فنوتیپی) را دارد. همچنین هیچ ارتباط مستقیمی میان مقدار افزایش بیان پمپ با مقدار افزایش حداقل تراکم بازدارندگی برای آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مشاهده نشد که این مسأله قبلاً گزارش شده[۱۸] و علت آن حضور مکانیسم‌های مختلف مقاومت است.[۱۳-۱۰]

در این مطالعه ۱۳ سویه افزایش حداقل تراکم بازدارندگی را برای بتالاکتام‌ها (پیپرسیلین- تازوباکتام و سفپیم) نشان دادند، حال آن که تنها در ۵ سویه از آن‌ها افزایش بیان mexX دیده شد. این یافته بر احتمال حضور بتالاکتامازها در این ۱۳ سویه بالینی دلالت دارد. به علاوه همان طور که در بالا اشاره شد احتمال افزایش بیان یک یا دو پمپ به‌طور همزمان در سویه‌های بالینی وجود دارد.[۴و۱۰] این تحقیق نشان داد سویه‌های بالینی PA19 و PA213 بیش بیان‌کننده پمپ MexXY-OprM بودند و تحقیق قبلی نشان داد که این سویه‌ها بیش بیان‌کننده پمپ MexAB-OprM نیز بودند.[۱۹] به طور کلی بیان همزمان هر دو پمپ در سویه‌های بالینی تأیید شد. بنابراین به علت القایی بودن پمپ‌های غشایی و امکان بیش فعالیت همزمان این پمپ‌ها، استفاده از هر دو سنجش فنوتیپی و ژنوتیپی برای درمان مناسب توصیه می‌شود.

❋ سپاس‌گزاری:

بدین‌وسیله از واحد فارماکولوژی سلولی مولکولی دانشگاه کاتولیک لوین و همچنین دانشگاه شهرکرد که فرصت انجام این کار را مهیا نمودند، تشکر می‌شود.

❋ مراجع:

1. Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin Microbiol Rev 2006 Apr; 19 (2): 382-402

2. Morita Y, Kimura N, Mima T, et al. Roles of MexXY- and MexAB- multidrug efflux pumps in intrinsic multidrug resistance of Pseudomonas aeruginosa PAO1. J Gen Appl Microbiol 2001 Feb; 47 (1): 27-32

3. Mokhonova VV, Mokhonova EI, Akama H, Nakae T. Role of the membrane fusion protein in the assembly of resistance nodulation-cell division multidrug efflux pump in Pseudomonas aeruginosa. Biochem Biophys Res Commun 2004 Sep 17; 332 (2): 483-9

4. Llanes C, Hocquel D, Vogne C, et al. Clinical strains of Pseudomonas aeruginosa overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. Antimicrob Agents Chemother 2004 May; 48 (5): 1797-802

5. Hocquet D, Vogne C, EI Garch F, et al. MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of Pseudomonas aeruginosa to aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother 2003 Apr; 47 (4): 1371-5

6. Dumas JL, van Delden C, Perron K, Kohler T. Analysis of antibiotic resistance gene expression in Pseudomonas aeruginosa by quantitative real-time-PCR. FEMS Microbiol Lett 2006 Jan; 254 (2): 217-25
7. Mao W, Warren MS, Lee A, et al. MexXY-OprM efflux pump is required for antagonism of aminoglycosides by divalent cations in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 2001 Jul; 45 (7): 2001-7
8. Gorgani N, Ahlbrand S, Patterson A, Pourmand N. Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. Int J Antimicrob Agents 2009 Nov; 34 (5): 414-8
9. Hocquet D, Muller A, Blanc K, et al. Relationship between antibiotic use and incidence of MexXY-OprM overproducers among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 2008 Mar; 52 (3): 1173-5
10. Cabot G, Campo-Sosa AA, Tuba F, et al. Overexpression of AmpC and efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa isolates from bloodstream infections: Prevalence and impact on resistance in a Spanish muticenter study. Antimicrob Agents Chemother 2011 May; 55 (5): 1906-11
11. Umadevi S, Joseph NM, Kumari K, et al. Detection of extended spectrum beta lactamases, ampc beta lactamases and metallobetalactamases in clinical isolates of ceftazidime resistant Pseudomonas Aeruginosa. Braz J Microbiol 2011 Oct; 42 (4): 1284-8
12. Campo Esquisabel AB, Rodriguez MC, Campo-Sosa AO, et al. Mechanisms of resistance in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa less susceptible to cefepime than to ceftazidime. Clin Microbiol Infect 2011 Dec; 17 (12): 1817-22
13. Lee JY, Ko KS. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo-β-lactamases in carbapenem - resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from South Korea. Int J Antimicrob Agents 2012 Aug; 40 (2): 168-72
14. Riou M, Carbonnelle S, Avrain L, et al. In vivo development of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from the lower respiratory tract of Intensive Care Unit patients with nosocomial pneumonia and receiving antipseudomonal therapy. Int J Antimicrob Agents 2010 Dec; 36 (6): 513-22
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 17th Informational Supplement. Document M100-S17. Wayne. PA: CLSI, 2007
16. Coris BioConcept (Belgium). In vitro mexAB-oprM and mexXY-oprM efflux detection in P. aeruginosa by Real Time PCR. Brussels: Coris BioConcept, 2011
17. De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, et al. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2001 Jun; 45 (6): 1761-70
18. Mesaros N, Glupezynski Y, Avrain L, et al. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemother 2007 Mar; 59 (3): 378-86
19. Pourahmad R, Tulkens PM, Van Bambeke F. Study the expression of MexAB-OprM pump genes in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa using RT-PCR method. J Urmia Univ Med Sci. [In Print]