بررسی وجود ژن‌های مقاوم به کلسیتین (mcr- pmr) در کلبسیلاپنومونیه جداشده از شیر خام با روش Multiplex-PCR

نگین ملکی [۱]، کیومرث امینی [۲*]، غلامرضا جوادی [۱]

چکیده

کلبسیلا پنومونیه باکتری گرم منفی روده‌ای است که سبب عفونت‌های بیمارستانی می‌شود. هدف از انجام این مطالعه بررسی ژنوتیپی ژن‌های مقاوم به کلسیتین (mcr- pmr) در کلبسیلا پنومونیه جداشده از شیر خام با روش Multiplex-PCR است.

از ۲۲۰ تانک نگهداری شیر خام در مراکز نگهداری شیر در سال ۱۳۹۷ در تهران نمونه‌برداری صورت گرفت. سویه‌های کلبسیلا پنومونیه با استفاده از آزمون‌های روتین بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی استاندارد شناسایی شدند.استخراج DNA طبق دستورالعمل کیت تجاری مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (MBK0041) انجام شد. بعد از انجام آزمون PCR در دستگاه ترموسایکلر جهت بررسی حضور ژن‌های mcr و pmr محصول نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ انتقال داده‌شده و با اتیدیوم‌بروماید رنگ‌آمیزی و سپس در دستگاه ژل داک موردبررسی قرار گرفت.

در این مطالعه به بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی دو ژن mcr و pmr، در ۶۰ جدایه باکتری کلبسیلا پنومونیه پرداخته شد. در این میان ژن mcr با فراوانی ۱۱، (۱۸/۳٪) و ژن Pmr با فراوانی ۷، (۱۱/۶ ٪) گزارش شد. ردیابی دو ژن موردمطالعه با روش مالتیپلکس PCR انجام شد که به نظر می‌رسد این اولین موردمطالعه بر روی شیر و بررسی دو ژن mcr،pmr باشد، که در ایران از نمونه‌های شیر جداسازی شده از تانک نگهداری شیر در دامداری‌های صنعتی از باکتری کلبسیلا پنومونیه صورت گرفته است، و دو ژن مذکور به‌عنوان مارکر اصلی شناسایی شدند.

واژگان کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، کلسیتین، mcr- pmr، شیر خام

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۱۸

مقدمه

شیر و فرآورده‌های لبنی به لحاظ دارا بودن ارزش غذایی بالا، در تغذیه‌ی انسان نقش بسزایی دارند(۱). شیری که از پستان گاو سالم دوشیده می‌شود فاقد باکتری می‌باشد، ولی غالباً با انواع میکروب‌ها و استرپتوکوکوکوس‌هایی که معمولاً در مجاری شیر و ابتدای پستان به سر می‌برند آلوده می‌شود(۲).

همچنین کلبسیلاپنومونیه از عوامل مهم و مؤثر در ایجاد تورم پستان و یک پاتوژن مهم بیمارستانی مطرح است. این باکتری در ایجاد انواع مختلفی از عفونت‌ها نقش دارد که موجب پنومونی، سپتی‌سمی، اسهال، ایجاد آبسه در کبد، منتژیت، عفونت‌های ادراری و باکتریمی می‌شود. افزایش ظهور مقاومت چند دارویی در بین سویه‌های کلبسیلاپنومونیه و مقاومت دارویی به این آنتی‌بیوتیک‌ها رو به افزایش است. کلسیتین آنتی‌بیوتیکی از خانواده پلی میکسین‌هاست که با تأثیر بر روی غشای سلولی و تغییر در میزان نفوذپذیری آن، باعث مرگ سلول باکتری شده و نیز تا حدودی موجب خنثی‌سازی اندوتوکسین باکتری‌ها می‌شود(٤).

مکانیسم مقاومت به کلیستین شامل تغییر در مسیر بیوسنتتیک لیپید A و تغییر در سطح لیپوپلی‌ساکارید باکتری است(٤و ٥). ژن‌های پلاسمیدی و کروموزومی متنوعی در ایجاد مقاومت *کلسیتین* نقش دارند که از آن جمله می‌توان به ژن‌های *mcr1* و *mcr2* در اپران *pmr* نام برد(٦). ژن *mcr-1* که به‌عنوان اولین ژن مقاومت به کلیستین وابسته به پلاسمید در غذای حیوانات، غذا و بیماران در چین جدا شد و از آن زمان سوش‌های *mcr-1* مثبت در سرتاسر جهان از انتروباکتریاسه‌ها گزارش شدند(۷). کلیستین در اطراف لیپوپلی‌ساکارید در غشای خارجی شارژ منفی ایجاد می‌کند و توسط جانشین کردن یون‌های کلسیم و منیزیم باعث نفوذ می‌شود. محصولات ژن *pmr* (مقاومت به پلی میکسین) تغییرات جابجایی را در LPS افزایش می‌دهد که سبب کاهش اتصال گلیسین به سطح خارجی باکتری‌های گرم منفی شده و باعث مرگ سلول باکتری می‌شود(۸و۹).

اپران ژن pmr باعث کاهش اتصال کلسیتین به لیپید A شده و این ژن با فعال کردن کیناز هیستیدین نقش تنظیمی

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
*۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران(dr_kumarss_amini@yahoo.com)

درمقاومت به کلسیتین ایجاد می کند .برای مقاومت به کلیستین، ۱۱ ژن باتغییر لیپید A در مسیر L-Ara4N -4 amino-4)-(deoxy-L-arabinose توانایی ایجاد مقاومت در برابر کلیستین را دارند. این ژن‌ها شامل *ugd*، *arnA_dh*، *arnA_FT*، *arnB*، *arnC*، *arnT*، *pmrJ*، *pmrL*، *pmrD*، *pmrM* و *pmrG* می باشد. ژن *pmr* می تواند از طریق دو سیستم باعث تغییر در LPS شود. این ژن می‌تواند از طریق شارژ مثبت در مولکول‌های ارابینوز و پنتا اریترول لیپید A باکتری مانع از تاثیر کلیستین بر روی باکتری شود. این تغییر باعث کاهش شارژ منفی لیپید **a** و همچنین LPS باکتری شود. ژن *pmr* کلاسهای مختلفی دارد که مهمترین آن *pmrA*، *pmrB* می باشند. مقاومت به کلستین (Colr) به طور فزاینده ای از محیط های بالینی گزارش شده است. مکانیزم های ژنتیکی که منجربه Colr در *K. Pneumoniae* به طور کامل مشخص نیست. مهمترین مکانیسم‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در *کلبسیلا پنومونیه* شامل بتالاکتامازها، جهش در پورین ها و نیز پمپ های ترشحی بوده که پمپ های ترشحی به عنوان یکی از موارد اصلی دفاع این باکتری در مقابل آنتی بیوتیک ها محسوب می‌شوند، ژن*mcr* که به عنوان اولین ژن مقاومت به کلیستین وابسته به پلاسمید جدا شد واز آن زمان سوش های *mcr* مثبت در سرتاسر جهان از انتروباکتریاسه ها گزارش شده است(۹و۸).

در این مطالعه ژن *mcr1, mcr2* و اپران ژن *pmr* بررسی می‌شود.

اکثریت مطالعات در این زمینه بر روی تحقیقات اپیدمیولوژیکال متمرکز شده است به این سبب باعث شده اطلاعات ژنومیک کمی در اختیار باشد. با توجه به اهمیت استفاده از کلیستین در درمان عفونت‌های مقاوم به چند دارو و ذکر این مهم که کلیستین آخرین خط درمان است، لذا لزوم بررسی وضعیت حاملین ژن *mcr* از نمونه های *کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر* جدا شده از منابع غذایی بویژه شیر حائز اهمیت می‌باشد .*mcrAB* ازجمله مهمترین پمپ‌های ترشحی هستند که باعث مقاومت *کلبسیلاپنومونیه* به پلی میکسین ها می شوند. ژن‌های *mcrB* و *mcr*A بر روی کروموزوم قرار دارند و یک پمپ ترشحی چنددارویی را که در اکثر باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه وجود دارد، کد می‌کنند. پمپ ترشحی *mcrAB*، پمپ های اصلی ایجادکننده مقاومت ذاتی سویه های *کلبسیلا پنومونیه* علیه فلوروکینولون‌ها، به ویژه سیپروفلوکسازین از طریق تغییر نفوذپذیری در غشای پروکاریوتی، دفع آنتی بیوتیک به محیط خارجی و کاهش غلظت داخلی آنتی بیوتیک می‌باشد . پمپ ترشحی *mcrA*B، جزء افلاکس پمپ های خانواده RND طبقه بندی می‌شود که این خانواده از مهمترین پمپ های ترشحی MDR بوده و نقش اصلی در مقاومت چنددارویی در برابر باکتری ها ایفا می‌کنند.

هدف از مطالعه حاضر ارزیابی وجود ژن‌های مقاوم به کلسیتین (*mcr- pmr*) در کلبسیلاپنومونیه جداشده از شیر خام با روش Multiplex-PCR می‌باشد.

مواد و روش‌کار

نمونه‌گیری و ایزولاسیون میکروبی

این‌یک مطالعه توصیفی در علوم پایه بوده و نمونه‌گیری به‌صورت تصادفی از ۲۲۰ تانک نگهداری شیر خام در مراکز نگهداری شیر در سال ۱۳۹۷ در تهران نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌های شیر در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط استاندارد به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. سپس شیر مطابق روش رایج میکروبیولوژی بعد از تهیه رقت در محیط Violet Red Bile Agar (VRBA) مطابق استاندارد ایران کشت داده شد. سویه‌های کلبسیلاپنومونیه با استفاده از آزمون‌های رایج بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی شامل: سیمون سیترات، اوره‌از، اندول، MRVP, TSI استفاده شد(۱۰).

استخراج DNA ژنومی

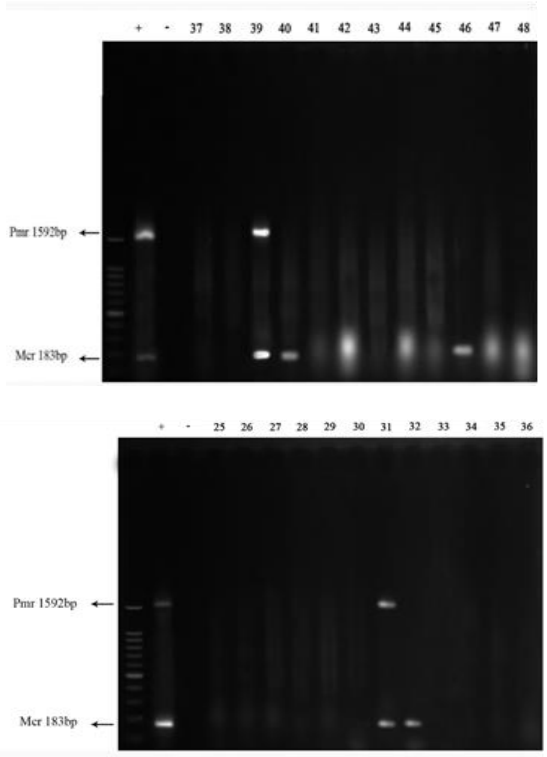
با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت پیشگامان انتقال ژن طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج انجام گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده با استفاده از ژل الکتروفورز ۱٪ و دستگاه نانودرآپ (۲nm–۱/۸=۲۶۰/۲۸۰ OD) مورد ارزیابی قرار گرفت.

انجام واکنش Multiplex-PCR

توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای مورداستفاده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است. پس انتخاب پرایمرهای مناسب و BLAST نمودن آن‌ها در سایت NCBI، واکنش Multiplex-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۱/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (سینا کلون، ایران) حاوی (۰/۰۵U/µl) Taq DNA polymerase، (۳mM)M_gCl_2 و (۰/٤mM) dNTPs، ۰/۷ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۱/۱ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (MWG Biotech Primus, Germany) با استفاده از برنامه طراحی شده جهت واکنش به صورت زیر انجام گرفت: ۵ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتی گراد جهت دناتوراسیون و جداسازی کامل دو رشته DNA (Denaturation step)، سپس ۳۵ سیکل متشکل از ٤۵ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد (Denaturation step)، ٤۵ ثانیه دمای ٥٦ درجه سانتیگراد جهت اتصال پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی به تک رشته DNA (Annealing step)، ٤۵ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد جهت انجام واکنش همانندسازی و در انتهای ۳۵ سیکل، ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد جهت همانند سازی کامل محصول PCR (Elongation step) انجام شد. تایید صحت انجام تست با وجود کنترل مثبت و منفی و بررسی آزمونهای میکروبی (بیوشیمیایی و کشت و تستهای حساسیت) صورت گرفت.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای انجام آزمون Multiplex-PCR (۱۱) (۱۷)

پرایمر	توالی پرایمر('۳به'۵)
pmrB-F	۵´- ATAAGCTGAAACGGATGGC -۳´
pmrB-R	۵´- CATA ATAATCAGGGCGAAAGT -۳´
MCR-1-F	۵´-CTCATGATGCAGCATACTTC-۳´
MCR-1-R	۵´-CGAATGGAGTGTGCGGTG-۳´



نگاره ۱- از سمت بالا به پایین؛ کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌های شماره ۲۵ تا ٤۸ موارد جدا شده از نمونه‌ی شیر دارای ژن *Pmr* با طول باند 159 bp، ژن *Mcr* با طول باند 183bp است.

نتایج

در مجموع از ۲۲۰ نمونه شیرجمع آوری شده از تانک‌های نگهداری شیر خام در دامداری‌های استان تهران تعداد ٦۰ سویه کلبسیلا پنومونیه جداسازی شد. فراوانی دو ژن mcr و

pmr، در ٦٠ جدایه کلبسیلا پنومونیه نشان داد که ژن mcr در ١١ (١٨/٣٪) جدایه و ژن pmr در ٧ (١١/٦٪) ایزوله حضور داشت (نگاره ١)

بحث

یکی از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌هایی که امروزه در درمان مورداستفاده قرار می‌گیرند، آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام می‌باشند، اما متأسفانه بنا به دلایلی منجمله؛ افزودن آنتی‌بیوتیک به جیره غذایی دام‌ها، استفاده نادرست، بیش‌ازحد و خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها و عدم نظارت دقیق در تجویز دارو سبب بروز سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک شده است (٩). مشکل اساسی در درمان عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم‌ها ظهور سویه‌هایی با مقاومت چندگانه (Multidrug resistance-MDR) می‌باشد که اغلب منجر به طولانی شدن زمان بستری بیمار، افزایش مرگ و میر و درگیری و ابتلا، بالا رفتن هزینه درمانی در مقایسه با میکروب‌های حساس به آنتی‌بیوتیک و سرانجام شکست درمانی (Drug Therapeutic Failure-DTF) می‌گردد (٥).

در مطالعه‌ای که در سال ٢٠١٧ توسط Wright و همکارانش در ایتالیا انجام شد از ٧٤ سوش مقاوم به کلیستین در انتروباکتریاسه

(٦٤ اشریشیاکلی و ٩ گونه دیگر) تعداد ٦١ (٨٢/٥٪) سوش ژن شبه mcr-1 را حمل می‌کردند(١٢). در مطالعه‌ای در سال ٢٠١٧ توسط Kieffer و همکارانش در پرتغال جهت بررسی ژن *mcr-1* تولیدشده در اشریشیاکلی و کلبسیلاپنومونیه بر روی خوک‌ها انجام گرفت. در این تحقیق ١٠٠ خوک را در ٢ مزرعه ازنظر وجود مقاومت به کلسیتین غربالگری کرده و مشاهده شد ٩٨ ایزوله دارای *mcr-1* وابسته به پلاسمید بودند. بیشتر ایزوله‌ها مربوط به اشریشیاکلی بود و حمل ژن توسط پلاسمید inc انجام می‌شد(١٣).

در مطالعه‌ای که در سال ٢٠١٦ توسط Roy و همکارانش در هند بر روی ١٢٠٠ ایزوله جمع‌آوری‌شده کلبسیلاپنومونیه از نمونه‌های چرک، خون، ادرار، خلط انجام شد، آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش E.test انجام و تعداد ٢١ ایزوله (١٠/٥٪) مقاوم به کلیستین بودند. غربالگری با PCR و تعیین توالی، ٤ ایزوله حاوی ژن *mcr-1* را آشکار ساخت. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی براث میکرودایلوشن انجام و مشاهده شد همه ایزوله‌های *mcr-1* مثبت مقاوم به کاربا‌پنماز، نسل سوم سفالوسپورین، آمینوگلیکوزیدها و سیپروفلوکساسین بودند ولی حساس به تیگسیکلین بودند(١٤).

در مطالعه‌ای که در سال ٢٠١٧ توسط Yang و همکارانش در چین انجام شد، تعداد ٢٣٥٣ ایزوله انتروباکتریاسه بین سال‌های ٢٠١١ تا ٢٠١٤ از نمونه افراد تحت درمان و ١٦٨ ایزوله مرغی از یک کشتارگاه جهت بررسی حضور ژن-*mcr 1*انجام شد. انتقال‌پذیری و خصوصیات ژنتیکی ژن‌های مقاومت به کلیستین توسط کونژوگاسیون و سکانسینگ کل ژنوم انجام شد. میزان MIC برای کلبسیلا پنومونیه mg/L Col-R-KP, ١٢٨ که بالاتر از اشریشیاکلی mg/L Col-R-٨ EC,بود. نرخ حمل ژن *mcr-1* در Col-R-EC برابر ١٠٠٪ بود و در مورد Col-R-KP برابر ٢٣/٥٪ بود. دوسوم کلبسیلا پنومونیه مقاوم به کلستین Col-R-KP ازنظر ژن *mcr-1* منفی بودند(١٥).

در مطالعه Jousset در سال ٢٠١٩ بیان کردند که از ٥٠ مورد بررسی باکتری اشریشیاکلی و ٤٤ مورد کلبسیلا پنومونیه و ١٢ مورد جدایه سالمونلا انتریتیکا از منابع حیوانی و ٤٥٠ جدایه مقاوم به کاربا‌پنم که به تایید مرکز ملی مرجع فرانسه رسید. تعداد ژنهای مقاومت در برابر کولیستین که قابل انتقال به سایرین بوده از ١ -*mcr* به ٥-*mcr* متغیر بوده که بسیار مهم است. پنج جفت آغازگر برای تقویت ژنهای*mcr-1* ، *mcr*-2، *mcr*-3، *mcr*-4و *mcr*-5 در یک PCR چند منظوره طراحی شدند (١٦) در تحقیق حاضر به بررسی مطالعه‌ای و تعیین توالی ژنوم چند سویه از باکتری کلبسیلا پنومونیه مورد

پرداخته شد. از ۲۲۰ نمونه شیر خام در سطح شهر تهران ۱۱ باکتری کلبسیلا پنومونیه (۱۸/۳٪) دارای ژن *mcr* و ۷ سویه (۱۱/٦٪) واجد ژن *pmr* جداسازی شده که با سایر تحقیقات هم سویی دارد. با استفاده از ردیابی دو ژن موردمطالعه با روش مالتیپلکس PCR که به نظر می‌رسد این اولین موردمطالعه و بررسی دو ژن *mcr* و *pmr* باشد که در ایران از نمونه‌های شیر جداسازی شده از تانک نگهداری شیردر دامداری‌های صنعتی از باکتری کلبسیلا پنومونیه صورت گرفته است و دو ژن مذکور به‌عنوان مارکر اصلی موردمطالعه قرارگرفته‌اند.

کلسیتین یا پلی میکسینE نوعی پلی پپتید کاتیونی ست .کلسیتین آخرین خط دفاعی در مقابل باکتری های گرم منفی می‌باشد . ژن های پلاسمیدی و کروموزومی متنوعی در ایجاد مقاومت کلسیتین نقش دارند.

فهرست منابع

1.Åkerstedt M, Waller KP, Larsen LB, Forsbäck L, Sternesjö Å. Relationship between haptoglobin and serum amyloid A in milk and milk quality. International dairy journal. 2008;18(6):669-74.

2.Argaw A. Review on epidemiology of clinical and subclinical mastitis on dairy cows. Food Sci Qual Manag. 2016;52:56-65.

3.Saltijeral J, Cordova A, Ruiz G, Alonso U, editors. Comparative study of electrical conductivity and CMT of quarter milk samples in dairy farm in Mexico. International Congress of the Society for Animal Hygiène; 2004.

4.Kim T, Jung D, Jayarao BM. Fuzzy reasoning for assessing bulk tank milk quality. Journal of Intelligence and Information Systems. 2004;10(3):39-57.

5.Bourrel AS, Poirel L, Royer G, Darty M, Vuillemin X, Kieffer N, et al. Colistin resistance in Parisian inpatient faecal Escherichia coli as the result of two distinct evolutionary pathways. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2019;74(6):1521-30.

6.Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in Acinetobacter baumannii is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010;54(12):4971-7.

7.Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of Acinetobacter baumannii: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. Journal of antimicrobial chemotherapy. 2012;67(7):1607-15.

8.Arcilla MS, van Hattem JM, Matamoros S, Melles DC, Penders J, de Jong MD, et al. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. The Lancet infectious diseases. 2016;16(2):147-9.

9.Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. The Lancet infectious diseases. 2016;16(2):161-8.

10.Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology-e-book: Elsevier Health Sciences; 2018;426-39.

11.Giani T, Arena F, Vaggelli G, Conte V, Chiarelli A, De Angelis LH, et al. Large nosocomial outbreak of colistin-resistant, carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae traced to clonal expansion of an mgrB deletion mutant. Journal of clinical microbiology. 2015;53(10):3341-4.

12.Wright MS, Suzuki Y, Jones MB, Marshall SH, Rudin SD, van Duin D, et al. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of Klebsiella pneumoniae reveal multiple pathways of resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2015;59(1):536-43.

13.Kieffer N, Aires-de-Sousa M, Nordmann P, Poirel L. High rate of MCR-1–producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae among pigs, Portugal. Emerging infectious diseases. 2017;23(12):2023.
14.Roy S, Viswanathan R, Singh AK, Das P, Basu S. Sepsis in neonates due to imipenem-resistant Klebsiella pneumoniae producing NDM-1 in India. Journal of antimicrobial chemotherapy. 2011;66(6):1411-3.
15.Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. The Korean journal of internal medicine. 2012;27(2):128.
16.Jousset AB, Bernabeu S, Bonnin RA, Creton E, Cotellon G, Sauvadet A, et al. Development and validation of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection of the five families of plasmid-encoded colistin resistance. International journal of antimicrobial agents. 2019;53(3):302-9.
17.Quesada, A., Porrero, M.C., Tellez, S., Palomo, G., Garcia, M., Dominguez, L. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of Escherichia coli and Salmonella enterica isolated from poultry and swine. J.Antimicrob.Chemother. (2014). 70,71–74.