Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (155-169)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

الكشف عن جينات Efflux Pumps في عزلات Pseudomonasaeruginosa المعزولة من التهابات الكسور المفتوحة.

زهراء خيرالدين محي الدين[1]، محسن أيوب عيسى[2]، محمود زكي الحسو[3]
[1،2] قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل، العراق.
[3]قسم الفيزياء الحياتية، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل، العراق.
Zahsbio109@uomosul.edu.iq, drmuhsin68@yahoo.com, mahmoodalhasso@gmail.com

الملخص

تم التحري عن تواجد جينات الضخ الخارجي Efflux pumps (MexR, MexB, MexA) و(MexY, MexZ,) (MexX) في 24 عزلة من جرثومة P.aeruginosa المتعددة المقاومة للمضادات، المعزولة من التهابات الكسور المفتوحة، ذلك باستخدام تقنية الـــPCR. اذ اظهرت النتائج تواجد جينات (MexR, MexB, MexA) (MexY MexZ,) في جميع العزلات المختبرة وبنسبة (100%)، في حين تواجد الجين (MexX) في 7 عزلات فقط وبنسبة (29.2%).

الكلمات الدالة: Efflux pumpsgenes ،Mex XYOprm. Paeruginosa ،Mex ABO prm.

DOI: http://doi.org/10.32894/kujss.2018.13.4.12

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (155-169)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

Detection of Efflux Pumps Genes in *Pseudomonasaeruginosa* Isolates Isolated from Open Fracture Infections

Zahraa Khairi-Aldeen Mohi-Aldeen[1,] Muhsin Ayoub Essa[2], Mahmod Zeki Al-Hasso[3]
[1,2]Biology Department, College of Science, Mosul University, Mosul, Iraq.
[3]Biophiysics Department, College of Science, Mosul University, Mosul, Iraq.
Zahsbio109@uomosul.edu.iq, drmuhsin68@yahoo.com, mahmoodalhasso@gmail.com

Abstract

The presence of Effluxpumpsgenes (MexR, MexB, MexA) and (MexZ,MexY, MexX) was investigated in 24 antibiotic resisting isolates of Paeruginosa, isolated from open fracture infections using PCR technique. The results showed 100% presence of (MexR, MexB, MexA) and (MexZ,MexY) genes in all tested isolates while the MexX gene was present in only 7 isolates representing 29.2%.

Keywords: Efflux pumpsgenes, Mex XYOprm. Paeruginosa, Mex ABO prm.

DOI: http://doi.org/10.32894/kujss.2018.13.4.12

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (155-169)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

1. المقدمة:

ان مقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية متزايدة مما ادى الى ارتفاع نسبة معدلات المرضى والوفيات سواء في الاصابات المكتسبة من المجتمع من المستشفيات ويلعب الاستخدام العشوائي للمضادات في كثير من الاحيان دورا مهما في حدوث طفرات في الجينات المشفرة للمقاومة وان انتقال الجينات المشفرة للمقاومة من الكروموسوم الجرثومي الى العناصر الوراثية المتحركة كالبلازميدات قد ادى الى انتشار هذه الجينات بين الانواع الجرثومية بحيث اصبحت مشكلة عالميه متفاقمة [1]. يتميز نظام الضخ MexAB-OprM بمعدل عالي من التغيير في سلالات P.aeruginosa، ويتكون التركيب الكرستالي لهذا النظام من ثلاث اجزاء (MexB) التي تمثل بروتينات الغشاء الداخلي Inner membrane أي البروتينات مكونات الضخ للـ(RND) والتي ترتبط بـ(OprM) الموجودة في الغشاء الخارجي Outer membrane من خلال (MexA) الموجود في البيريبلازم [2]. يعد نظام الضخ MexXY-OprM من الانظمة المهمة التي تساهم بشكل كبير في اظهار المقاومة لمضادات الكلايكوسيدات الامينية Aminoglycosides في العزلات السريرية لجرثومة P.aeruginosa وخاصة لدى مرضى التليف الكيسي [3]. يحفز التعبير عن هذا النظام من خلال المضادات الحيوية التي هدفها الرايبوسوم.

أن آليات ضخ المضادات لها أهمية في المقاومة المتعددة للمضادات في P.aeruginosa المسببة لعديد من الامراض [4]. ونظر لكون هذه الجراثيم من الممرضات الانتهازية والمسببات الشائعة للإصابات المكتسبة من المستشفيات فان امتلاكها لمثل هذه الاليات يزيد من ضراوتها ومقاومتها للعلاج مما يجعل الاصابات الناتجة عنها اكثر خطورة ومهددة للحياة في بعض الاحيان [5]. تعد جرثومة P.aeruginosa من اكثر الجراثيم مقاومة للمضادات الحيوية وهذا يعود الى امتلاكها مجموعة من اليات المقاومة التي يكون اغلبها مسيطر عليها جينيا , من اهمها امتلاكها لأنظمة الضخ المتعدد Efflux pumps المشفرة من جينات مسيطر عليها من قبل جينات اخرى منظمة تقع على نفس الأوبرون [6]. تعد الانظمة، MexXY- OprM، MexAB-OprM من انظمة الضخ التي تساهم في المقاومة الطبيعية والمكتسبة للمضادات الحيوية في جرثومة Ps aeruginosa، كذلك قدرتها على طرح biocides والمذيبات العضوية والمطهرات واملاح الصفراء وبعض المشتقات النباتية. تعود هذه الانظمة الى عائلة الـ RND التي تساهم في المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية و تستخدم هذه الأنظمة لضخ المضادات إلى خارج الخلية الجرثومية، حيث تقلل من تركيز المضادات الذي يصل إلى الهدف من دون عمل تحوير في مكوناته مقارنة مع ميكانيكيات المقاومة الاخرى التي تعمل على تغيير الهدف أو المضاد لتعطل من فعاليته [7]. يهدف البحث

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (155-169)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

الى التحري عن جينات الضخ (MexR, MexB, MexA) و (MexZ, MexY, MexX) في عزلات P.aeruginosa، المعزولة من التهابات الكسور المفتوحة لبيان مدى انتشارها وتوزيعها في هذه العزلات.

2. المواد وطرائق العمل:

2.1 العزلات الجرثومية المستخدمة :

استخدمت 24 عزلة من جرثومة P.aeruginosa المعزولة من التهابات الكسور المفتوحة المشخصة في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل، المقاومة لمجموعة من المضادات الحيوية التي تعد دليلا اوليا على احتمالية امتلاكها لجينات الضخ.

2.2 البوادئ المستخدمة :

استخدمت بوادئ خاصة بالجينات Mex A,B,R، Mex X,Y,Z المجهزة من شركة The Medland.

Reagent company Inc (Texas, USA)، أذيب كل بادئ في كمية مناسبة من الماء المقطر الخالي من الأيونات للحصول على محلول خزين بتركيز 100 بيكومول/ مايكروليتر، مزجت جيداً قبل الاستعمال باستخدام Vortex لضمان انتشارها وتوزيعها بشكل متجانس في محلول التفاعل, كما في الجدول 1.

الجدول 1: تسلسلات بوادئ الـ DNA المستخدمة في الدراسة.

الجين	5→3 تتابع البادئ	الحجم (زوج قاعدة)
Mex A	F: CTCGACCCGATCTACGTC R: GTCTTCACCTCGACACCC	503
Mex B	F: TGTCGAAGTTTTTCATTGATAG R: AAGGTCACGGTGATCGT	280
Mex R	F: GAACTACCCCGTGAATCC	411
Mex X	F: CATCAGCGAACGCGAGTACAC R:TCGACGATCTTCAGGCGGTTCTG	389
Mex Y	F: TGGTCAACGTCAGCGCCAGCTAT R: TCGACGATCTTCAGGCGGTTCTG	289
Mex Z	F: TCGTGAACTCGCGAGCTTG R: CACATCAGCGAGGAAGACGC	177

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (155-169)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

2.3 استخلاص الـ DNA :

تم استخلاص الـ DNA من عزلات الـ P.aeruginosa. استخدمت العدة المجهزة من قبل شركة Omega الامريكية لغرض استخلاص الحامض النووي الـDNA في جراثيم P.aerugenosa قيد الدراسة، حيث تم تلقيح وسطLuria Bertoni بالمستعمرات الجرثومية الفتية ومن ثم حضنت بدرجة حرارة c° 35 لمدة (18- 24) ساعة، بعدها تم اتباع خطوات الاستخلاص وحسب تعليمات الشركة المجهزة، وبعد اكمال عملية الاستخلاص حفظت مستخلصات الحامض النووي بالتجميد عند درجة c° (20-).

2.4 تفاعلات الـ PCR :

حضر الخليط من مكونات التفاعل وبمعدل 20 مايكروليتر من الحجم التفاعلي لكل انبوب والذي يحتوي على Premix kit, D.W., DNA template, Reverse primer, Foreword primer، حضرت جميع الاضافات في الثلج ومزجت محلول انابيب الابندروف بجهاز Vortex mixer لترسيب قطرات محلول التفاعل الموجودة على جدران الانبوب، وأُدخلت الانابيب بعد ذلك في جهاز Thermocycycler لإنجاز التضاعف وباستخدام البرنامج المناسب لكل بادئ كما موضح بالجدول 2، وبعد انتهاء وقت التفاعل، تم تحميل المزيج في هلام الأكاروز بتركيز % 1.5 ورحلت العينات بجهاز الترحيل الكهربائي لمدة 90 دقيقة.

الجدول 2: البرامج المستخدمة لتفاعلات الـ PCR.

الجين	برنامج التفاعل	المصدر
Mex A **Mex B** **Mex R** **Mex X** **Mex Y** **Mex Z**	94ºC for 3 min, 32 cycles of 94 ºC for 305, 57 ºC for 45 s and 72 ºC for l min.	(Palka- santini et al., 2009)

3. النتائج والمناقشة:

استخدمت تقنية الـ PCR للتحري عن جينات MexAB والمنظم السلبي لها MexR وجينات النظام MexXY والمنظم السلبي لها MexZ في عزلات جرثومة P.aeruginosa، ويبين الجدول 3 نتائج هذا التحري، حيث كانت جميع العزلات المختبرة حاوية على جينات MexB,MexA,MexR كما موضح في الشكل 1، 2، 3 ظهور حزم الجين MexA عند

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (155-169)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

الحجم الجزيئي(503bp) والجين MexB عند الحجم الجزيئي (280bp) والجين MexR عند الحجم الجزيئي(4llbp) الذي يعد دليلا عن وجود هذه الجينات على كروموسوم العزلات الجرثومية المختبرة. اشارت دراسة [8] الى وجود اوبرون نظام الضخ MexAB-OprM المشفر كروموسوميا في جميع عزلات الـ P.aeruginosa المعزولة اذا اظهرت نتائج تفاعل الـ PCR التشخيص بامتلاك جميع العزلات للجينات MexR,MexB,MexA وبنسبة (100%) وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية.

يعد نظام MexAB-OprM، نظام ضخ مهم في P.aeruginosa، يتم التعبير عنه بشكل مستمر وله القدرة على ضخ العديد من المضادات الحيوية والصبغات والمطهرات والمذيبات العضوية خارج الخلية [9]. تويتم السيطرة على التعبير عن نظام MexAB-OprM البروتينات المنظمة NalD,MexR,ArmR,NalC والتي يشفر لها جينات nalD,mexR,armR,nalC على التوالي، وان حدوث طفرات في هذه الجينات يؤدي الى التعبير العالي لنظام الضخ MexAB-OprM مما يؤدي الى زيادة المقاومة للعديد من المضادات [10، 11]. ان لأنظمة الضخ اهمية كبيرة في ضخ وازالة المركبات السامة من الخلايا وضخ مختلف المضادات الحيوية وبعض المواد منها Fluoroquinolones, Chloramphenicol, β-Lactams, Sodium dodecyl sulfae, Macrolides, Tetracycline و Ethidium [7] bromide مما يزيد من ضراوتها، اذ ان النظام MexAB-OprM له اهمية كبيرة في ضراوة الـ P.aeruginosa، فقد اثبتت بعض الدراسات انه عند حدوث طفرة في جرثومة P.aeruginosa تؤدي الى فقدان الـ MexAB-OPrM ينتج عنه الفشل في احداث اصابة في الفئران [12]، ربما يعود هذا الى زيادة فعالية المضادات وقتل الجراثيم وبالتالي عدم احداث الإصابة. كما يبين الجدول 3 نواتج تفاعل ال PCR للتحري عن جينات الضخ MexXY والمنظم MexZ لهذا النظام في عزلات جرثومة P.aeruginosa، اذ بلغت نسبة وجود الجينين MexZ, MexX100%، في حين كانت نسبة وجود الجين MexX(29.2%) وكما مبين في الشكل 4، 5، 6 التي توضح نتائج فصل الـ DNA الكروموسومي بتقنية الـPCR وظهور حزم الجين MexX عند الحجم الجزيئي (389bp) والجين MexY عند الحجم الجزيئي (289bp) والجين MexZ عند الحجم الجزئي (177bp) الخاصة بالبوادئ المستخدمة والتي تعد دليلا على وجود هذه الجينات على كروموسوم العزلات الجرثومية المختبرة. يساهم نظام الضخ MexXY-OprM في مقاومة الكلايكوسيدات الامينية فيP.aeruginosa، التي دليلا اوليا على احتمالية امتلاكها لهذه الجينات. يعود هذا النظام لعائلة الـRND ويحفز التعبير لجينات MexXY-OprM في الاويرون التي يتم تنظيمها من خلال الجين MexZ (المنظم السلبي) لهذا النظام، ويحفز هذا النظام المضادات الحيوية التي

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (155-169)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

هدفها الرايبوسوم، كما وان هناك جين ثاني (PA5471) ايضا يتحفز بالمضادات التي هدفها الرايبوسوم، اذ يتفاعل PA5471 مع MexZ لرفع الكبح عن نظام الضخ MexXY-OprM [11,10].

ان عزلات جرثومة P.aeruginosa التي تحمل الجينات الثلاثة (MexY, MexX, MexZ) تظهر مقاومة عالية للمضادات الحيوية ربما يرجع السبب الى حدوث طفرات في الجين المنظم MexZ اما ان تكون هذه الطفرات في داخل الجين المنظم MexZ وتسمى الطفرة (agrz) او خارج الجين المنظم MexZ وتسمى (agrw)، مما يؤدي الى زيادة التعبير للاوبرون MexXY [3، 10].

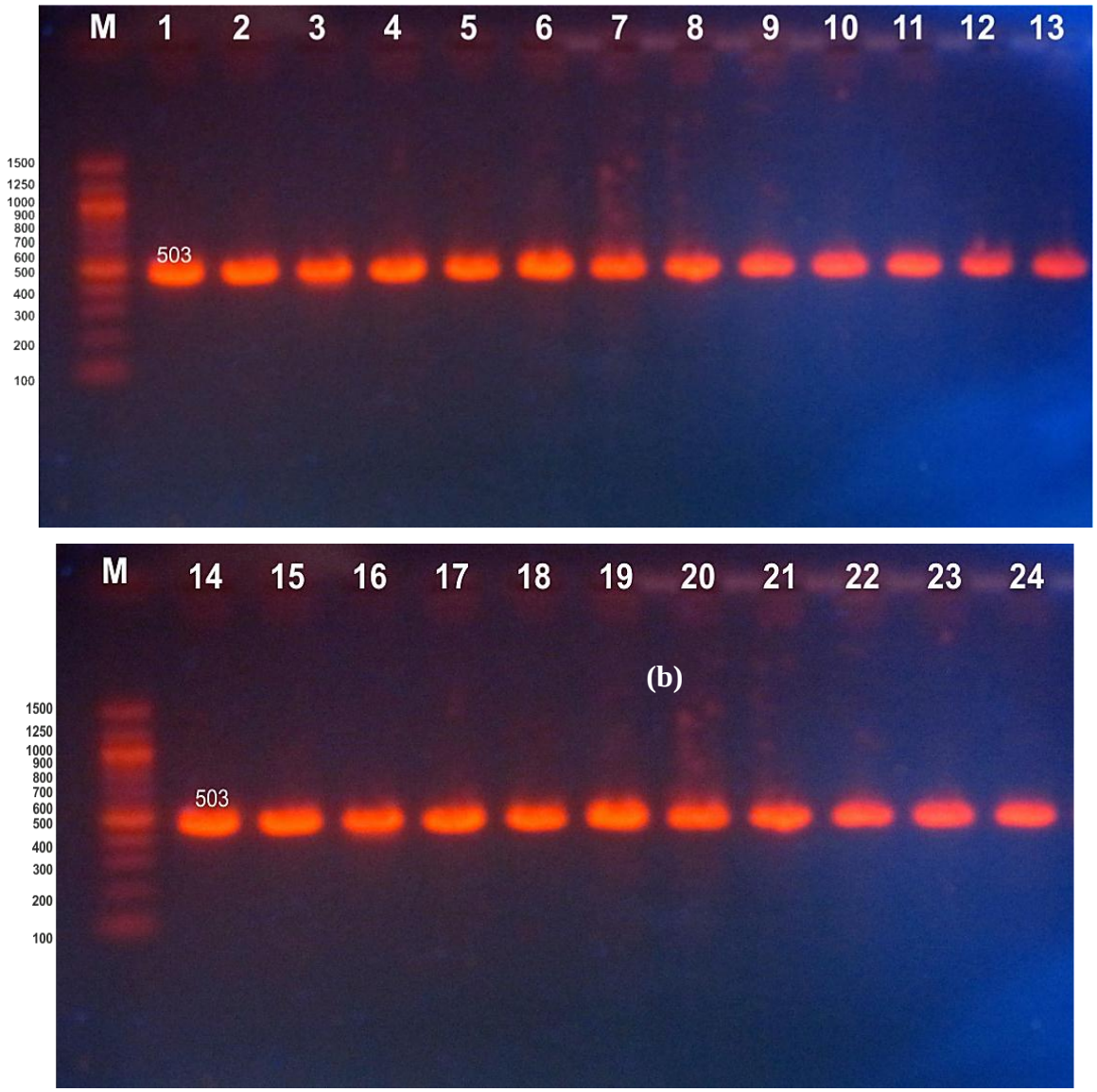
في حين اظهرت (7) عزلات من مجموع (24) عزلة جرثومية كما مبين بالجدول (4–22) امتلاكها للجين MexX قد يرجع هذا الى حدوث طفرات تعمل على تعطيل هذا الجين ومن ثم عدم ظهوره الا في سبع عزلات التي تعمل على احداث تغيرات في هذا الجين مما يؤدي التقليل من التنظيم العالي للجينMexX مما يؤدي بالنهاية الى انخفاض التعبير لنظام الضخ MexXYومقاومة للمضادات الحيوية اي ان العزلات تصبح حساسة للمضادات الحيوية التي هدفها الرايبوسوم، اذ ان انظمة الضخ MexXY-OprM مسؤولة عن ضخ المضادات التي هدفها الرايبوسوم وتشمل Aminoglycosides، Tetracyclines، Macrolides وChloramphenicol [13].

يمثل الجينMexY جزء من نظام الـ MexXY الممثلة لبروتينات الغشاء السايتوبلازمي في حين ان MexZ يعد الجين المنظم لهذا النظام [13].

الجدول 3: نسبة تواجد جينات Efflux pumps في عزلات جرثومة P.aeruginosa المدروسة بتقنية الـ PCR.

العزلات الجرثومية	عدد العزلات المختبرة	MexA		MexB		MexR		MexX		MexY		MexZ	
		العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%
P.aeruginosa	24	24	100	24	100	24	100	7	29.2	24	100	24	100

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (155-169)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

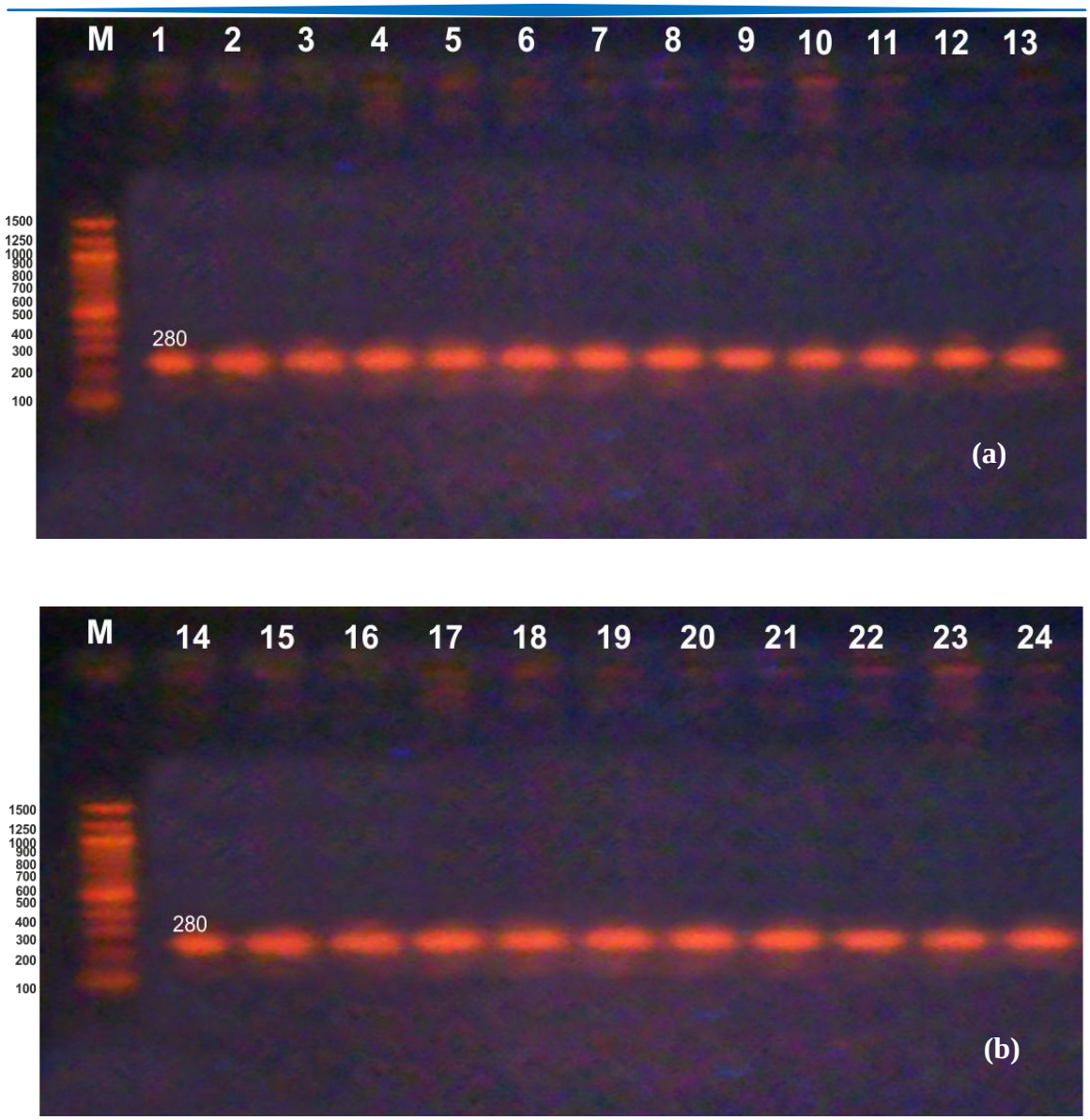


الشكل 1: الكشف عن جينات الـ Efflux pump في عزلات P.aeruginosa المعزولة من الكسور المفتوحة الكشف عن الجين (Mex A503 bp).

(a): توضح ظهور الجين MexA عند الموقع (503) للعزلات من (1–13) المختبرة.

(b): توضح ظهور الجين MexA عند الموقع (503 bp) للعزلات من (14–24) المختبرة.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (155-169)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

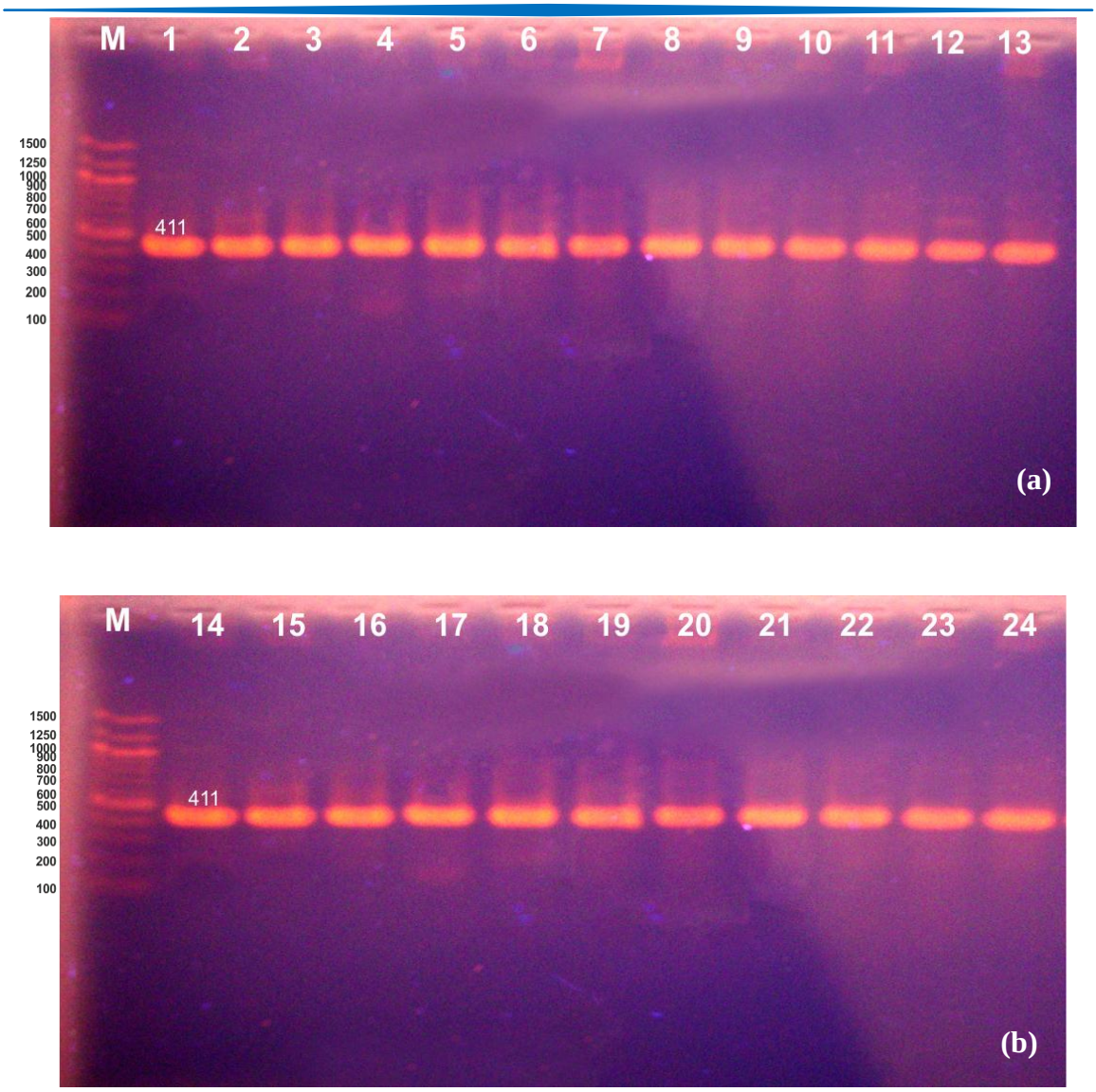


الشكل 2: الكشف عن الجين(MexB 280 bp)

(b): توضح ظهور الجين MexB عند الموقع (280 bp) للعزلات من (14–24) المختبرة.

(a): توضح ظهور الجين MexB عند الموقع (280 bp) للعزلات من (1–13) المختبرة.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (155-169)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

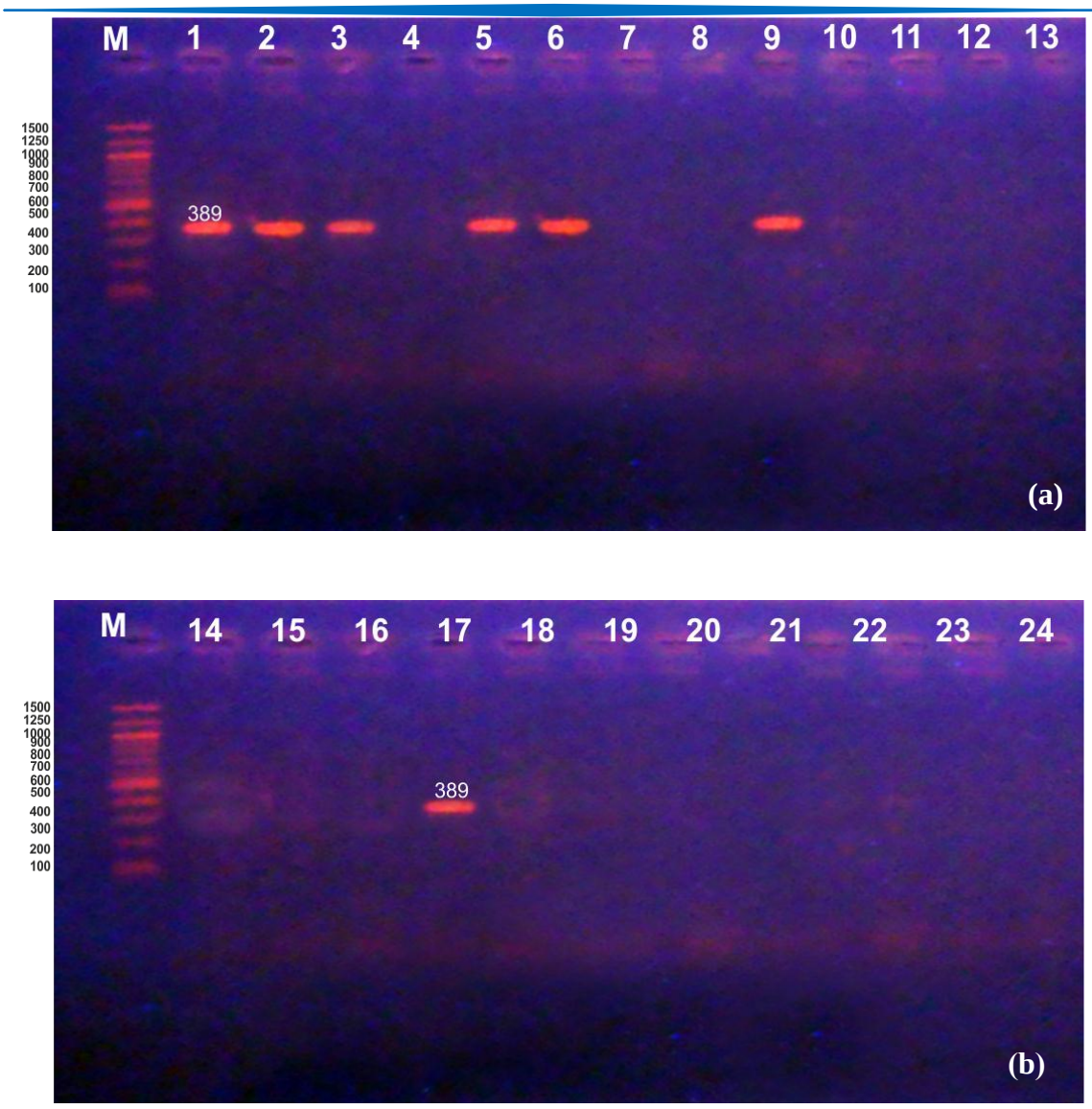


الشكل 3:الكشف عن الجين (MexR 411bp)

(a): توضح ظهور الجين MexR عند الموقع (411bp) للعزلات من (1–13) المختبرة.

(b): توضح ظهور الجين MexR عند الموقع (411bp) للعزلات من (14–24) المختبرة.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (155-169)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

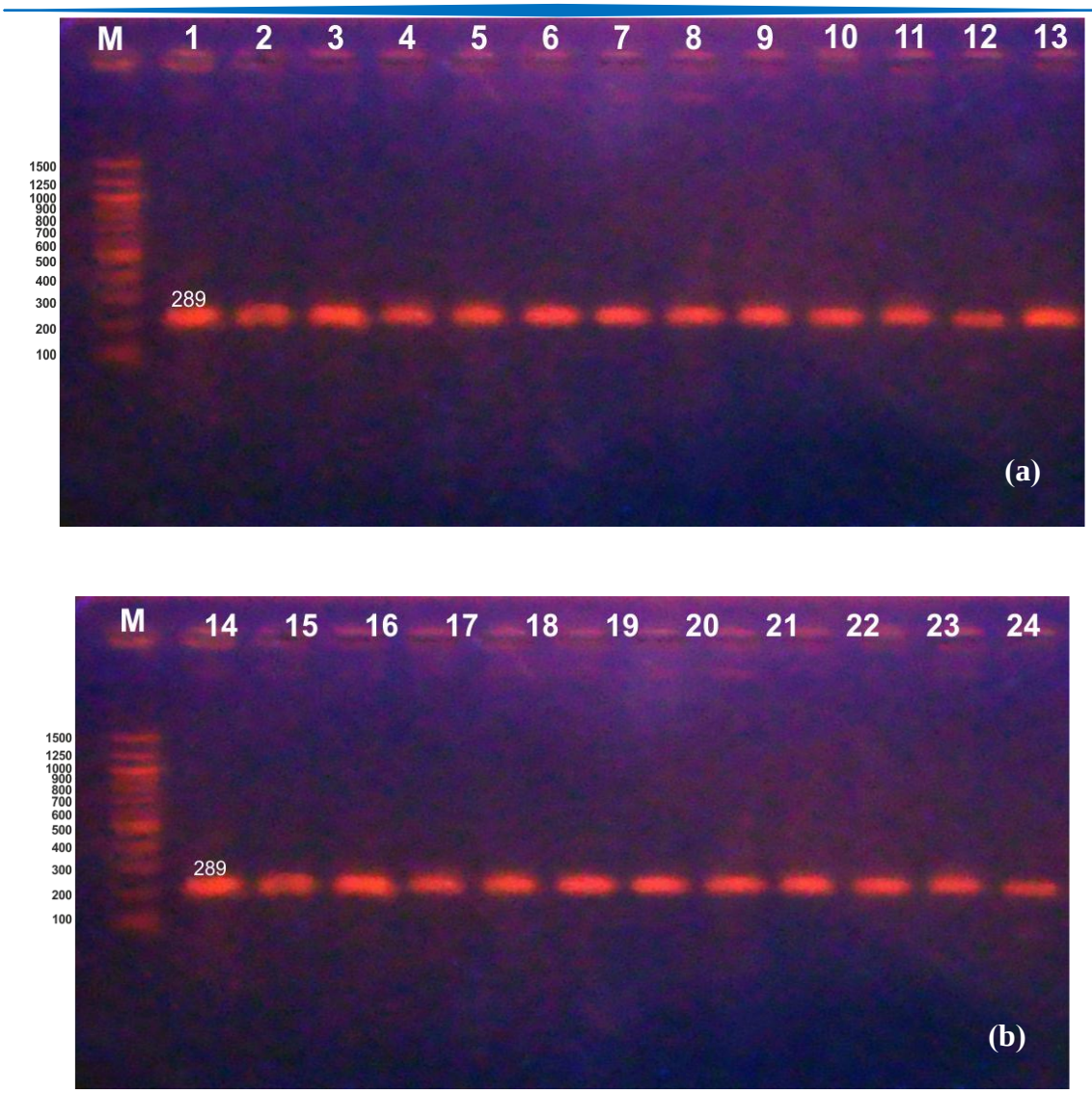


الشكل 4: الكشف عن الجين(MexX 389bp)

(a): توضح ظهور الجين MexX عند الموقع (389 bp) للعزلات من (1,2,3,5,6,9) فقط.

(b): توضح ظهور الجين MexX عند الموقع (389 bp) للعزلة (17) فقط.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (155-169)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

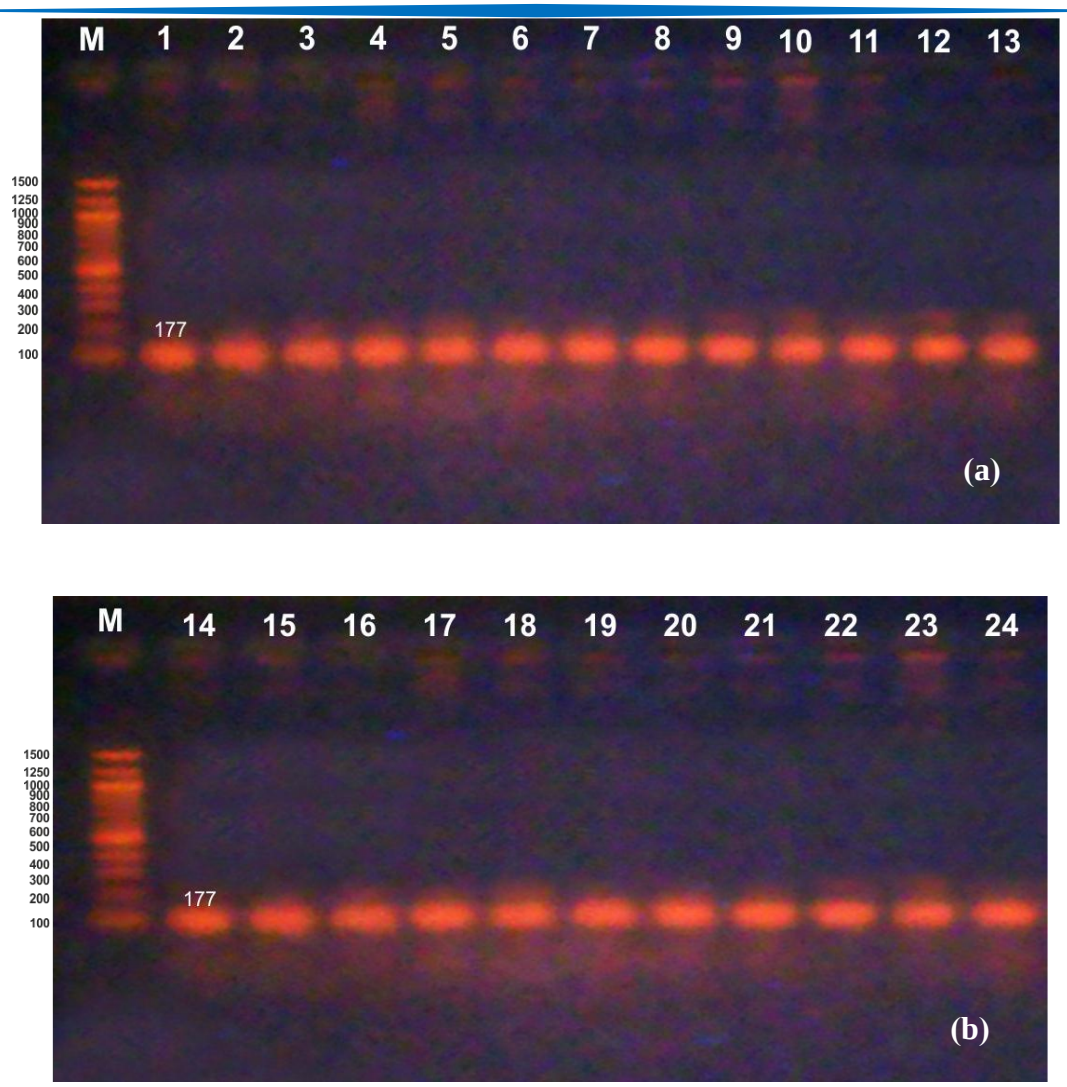


الشكل 5: الكشف عن الجين (MexY 289bp)

(a): توضح ظهور الجينMexYعند الموقع (289 bp) للعزلات من (1–13) المختبرة.

(b): توضح ظهور الجينMexYعند الموقع (289 bp) للعزلات من (14–24) المختبرة.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (155-169)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)



الشكل 6: الكشف عن الجين(MexZ 177bp)

(a): توضح ظهور الجين MexZ عند الموقع (177 bp) للعزلات من (1–13) المختبرة.

(b): توضح ظهور الجين MexZ عند الموقع (177 bp) للعزلات من (14–24) المختبرة.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (155-169)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

المصـــادر

[1] N. A. Seveno, D. Kallifidas, Smalla, J. D. Van Elsas, J. M. Collaard, A. D. Karagouni and E. M. H. Wellington, ***"Occurrence and reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment "***, Reviews in Medical Microbiology, 13, 15 (2002).

[2] G. Sennhauser, M. A. Bukowka, C. Briand and M. G. Grütter, ***"Crystar structure of the multidrug exporter Mex B from pseudomonas aerugoenosa",*** Journal of Medical Microbiology, 389, 134 (2009).

[3] Hocquet D., Nordmann P., El Garch F., Cabanne L., Plésiat P.," ***Involvement of the MexXy- OprM efflux system in emergence of cefipimerisistance in clinical stranin of pseudomonas aeruginosa Antimicrobial agents and chemotherapy***", Antimicrob Agents Chemother, 50(4), 1347 (2006).

[4] J. F. Acar and G. Moulin, Antimicrobial resistance: acomplex issue. Revue. Scientifique et , technicqre international office of Epizzotics., 31(1), 23 (2012).

[5] M. Askoura, W. Mottawea, T. Abujamel and I. Taher, ***"Efflux pump inhibitors (EPTs) as new antimicrobial agents agints Pseudomonas aeruginosa Libyan"***, Journal of Expermintal. Medicine. 6: 10. 3402/ l jm. V60. 5870 (2011).

[6] S. O. Stoitosova, Y. Braun, M. S. Uldrich, ***"Characterization of RND type multidryg efflux pump Mex AB. OprM of the plant pathogen Pseudomonas syringae",*** Applied and. Environ mental. Microbial., 74, 3387 (2008).

[7] K. Poole, ***"Bacterial multidrug efflux pumps serve therfumctions microbe",*** 3, 179 (2008).

[8] I. G. A. Al-Grawi, A. K. Al-Absali, N. H. Kareem and S. A. L. Belal, ***"Occurrence of MexAB- OprM Efflux pump operon on septicemic pseudomonas aeruginosa chromosome"***, The Iraqi postgraduate medical Journal, 11 (1), 12 (2012).

[9] J. A. Driscoll, S. L. Brody and M. H. Kollef, **"*The epidemiology,pathogenesis and treatment of pseudomonas aeruginose infections*"**, Drugs 67, 351 (2007).

[10] C. Llanes, V. Hocquet, C. Vogne, D. ali- Baitich, C. Neuwirth and P. plesiat, **"*Clinical strains of Pseudomonas aeruginosa overproducing mex AB- OprM and MexXY*",** Efflux pumps simultaneously, Antimicrob Agents Chemother, 48, 1797 (2004).

[11] Y. Morita, M. L. Sobel and K. Poole, **"*AntibioticInducitbility of the mex XY multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa: Involvement of the antibiotic- inducible PA5471 gene product* ",** Journal of Bacteriology volume 24 , 1847 (2006).

[12] Y. Hirakata, R. Srikumar, K. Poole, N. gotoh, T. Suematsu, S. Kohno, S. Kamihira, R. W. E. Hancock, and D. P. Speert, **"*Multidrug efflux systems play on important role in the invasiveness of pseudomonas aeruginsa*"**, Journal of Expermintal. Medicine. 196, 109 (2002).

[13] K.Jeannot, M. L. Sobel, F. El Garch, K. Poole, and P. Plesiat, **"*Introduction of the Mex XY efflux pump in Pseudomonas aeruginose is dependent on drug*",** Ribosome interaction Journal Bacteriol 187, 5340 (2005).