



مقاومت کینولونی وابسته به پمپ تراوشی mexAB-oprM در جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا

میترا صالحی^۱، مینا حکمت دوست^{۲*}، فرزانه حسینی^۱

^۱ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروب شناسی، ^۲ کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا یکی از مهم ترین باکتری های مقاوم نسبت به انواع آنتی بیوتیک های است و به همین دلیل درمان عفونت های سودوموناسی دشوار می باشد. پمپ MexAB-OprM قادر است طیف وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی را بدون هیچگونه شباهتی بین ساختار و عملکردشان به خارج از سلول تراوش نماید. *mexB* ژن مسوول تشکیل پروتئین آنتی پورتر پروتون- دارو در پمپ mexAB-oprM می باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی و شناسایی مقاومت کینولونی وابسته به پمپ تراوشی mexAB-oprM در جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا انجام شد.

مواد و روش ها: این مطالعه به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۱۰۴ نمونه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مراکز سوانح و سوختگی انجام گردید. در ابتدا جنس و گونه سویه های جداسازی شده با استفاده از تست های بیوشیمیایی مورد تایید قرار گرفت. ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها بر اساس روش انتشار دیسک نسبت به ۱۱ آنتی بیوتیک رایج و روش براث میکرودیلوژن نسبت به ۴ آنتی بیوتیک انجام شد. در نهایت حضور ژن *mexB* با روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) بررسی گردید.

یافته ها: در این مطالعه بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های نالیدیکسیک اسید (۸۶/۵۴٪)، سفتری آکسون (۸۲/۲٪) و اوفلوکساسین (۸۱/۷۸٪) بوده است. همچنین کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های ایمپی پنم (۴۰/۹۱٪)، پیراسیلین (۴۴/۹٪) و تتراسایکلین (۴۸/۰۳٪) مشاهده گردید. نتایج MIC نشان داد که بیشترین حساسیت مربوط به تتراسایکلین و بیشترین مقاومت مربوط به سفتریاکسون می باشد. نتایج واکنش زنجیره ای پلی مراز، حضور اپرون mexAB-oprM را در ۲۷٪ از جدایه های بالینی نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه بیانگر این است که از نظر آماری ارتباط معنی داری بین وجود ژن *mexB* و حضور پمپ تراوشی MexAB-OprM و همین طور مقاومت آنتی بیوتیکی در سودوموناس آئروژینوزا وجود دارد. با توجه به اهمیت مقاومت آنتی بیوتیکی، مطالعه سایر پمپ های تراوشی، مقایسه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و ارتباط بیان پمپ های تراوشی و منشا بالینی سویه ها پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، ژن *mexB* مقاومت کینولونی، پمپ تراوشی.

پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹۲

دریافت مقاله: مهرماه ۹۲

مقدمه

باکتری فرصت طلبی است که اغلب منجر به عفونت های بیمارستانی خطرناکی در افراد با سیستم ایمنی ضعیف شده می گردد. امروزه مشکل مهم درمان عفونت های سودوموناسی،

سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*)

* آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۲۳۳۳۷۵۰۳ پست الکترونیک: m.hekmat90@yahoo.com

قرار می گیرند. این آنتی بیوتیک ها یک گروه جدید از آنتی بیوتیک های سنتزی هستند و مشتقاتی از نالیدیکسیک اسید می باشند. کینولون ها مولکول های آب دوست کم وزنی هستند که همانندسازی DNA را بدون اثر بر روی سنتز RNA یا پروتئین در باکتری های حساس مهار می کنند. بروز فعالیت ضد باکتریایی فلوروکینولون ها به دلیل مهار دو آنزیم DNA ژیراز و توپوایزومراز IV می باشد.

DNA ژیراز در باکتری های گرم منفی و توپوایزومراز IV در باکتری های گرم مثبت نسبت به فلوروکینولون ها حساس تر می باشند. هر دو این آنزیم ها تترامر ولی با جفت زیر واحدهای متفاوت هستند. زیر واحدهای GyraA و GyraB از DNA ژیراز همولوگ ParC و ParE از توپوایزومراز IV می باشند (۹). در میان نسل کینولون ها، فلوروکینولون ها از جمله سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین، لوفلوکساسین و اوفلوکساسین می باشند که بر روی طیف وسیع تری از باکتری ها موثر هستند.

سیپروفلوکساسین تنها فلوروکینولونی است که بالاترین اثر مهاری را علیه سودوموناس آئروژینوزا دارا می باشد. با این وجود توصیه نمی شود که به عنوان تنها دارو برای درمان استفاده شود. زیرا این ارگانیزم به راحتی در مدت درمان مقاوم می شود (۳ و ۹). هدف از این پژوهش بررسی و شناسایی مقاومت کینولونی وابسته به پمپ تراوشی mexAB-oprM در جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا بود.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه و شناسایی باکتری: این مطالعه به صورت مقطعی توصیفی بر روی ۱۰۴ نمونه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مراکز سوانح و سوختگی در فاصله زمانی اسفند ۱۳۹۰ تا تیر ماه ۱۳۹۱ انجام شد. از ۱۰۴ نمونه، ۴۰ نمونه از عفونت زخم، ۲۱ نمونه از عفونت ادراری، ۲۰ نمونه از ترشحات خلط، ۱۵ نمونه از عفونت خون و ۸ نمونه از عفونت چشم بودند. به منظور

مقاومت بالای این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک هایی است که از نظر ساختاری و عملکردی هیچ شباهتی با یکدیگر ندارند (۱ و ۲). مکانیسم های مختلفی توسط این باکتری به کار گرفته می شود تا از اثرات زیان بار آنتی بیوتیک ها مصون بماند.

یکی از مهم ترین آنها، سیستم تراوشی می باشد. سودوموناس آئروژینوزا پتانسیل بیان ۱۲ نوع پمپ تراوشی چند دارویی تحت عنوان Mex (Multidrug efflux system) را دارد. از این میان ۵ پمپ به نام های MexAB-oprM، MexCD-oprY، MexEF-oprN، MexJK-oprM و MexXY-oprM از مهمترین عوامل مقاومت به آنتی بیوتیک ها به شمار می روند (۳ و ۴). MexAB-oprM تنها پمپ تراوشی است که در سویه های وحشی سودوموناس آئروژینوزا بیان می شود و در مقاومت ذاتی این باکتری نقش دارد. سایر پمپ ها بر اثر بروز جهش، بیان شده و در مقاومت اکتسابی این باکتری به برخی از آنتی بیوتیک ها نقش دارند (۵). سیستم های انتقالی Mex به خانواده RND (Resistance Nodulation Division cell family) تعلق دارند. اعضای این خانواده با به کارگیری نیروی محرکه پروتونی غشا، ترکیبات ضد میکروبی را از سلول خارج می نمایند.

ناقلین RNA از سه بخش اساسی تشکیل شده اند. قسمت اول در غشای سیتوپلاسمی قرار دارد و آنتی پورتر پروتون-دارو می باشد. قسمت دوم در بخش پری پلاسمیک، یک پروتئین غشایی ادغام شده است و بخش سوم یک کانال پروتئینی واقع در غشای خارجی می باشد. این قسمت موجب خروج دارو از سیتوپلاسم به محیط خارج می گردد (۶ و ۷).

mexB ژن مسوول تشکیل پروتئین آنتی پورتر پروتون-دارو در پمپ mexAB-oprM می باشد. این پمپ عامل مقاومت به بتالاکتام ها، فلوروکینولون ها، تتراسیکلین، ماکرولیدها، کلرامفنیکل، نورپیسین و تری متوپریم می باشد. همچنین قادر است طیف وسیعی از رنگ ها، دترجنت ها، مهار کننده های بیوسنتز اسید چرب، حلال های آلی را نیز تراوش نماید (۵ و ۸). کینولون ها عوامل ضد باکتریایی وسیع الطیف خوراکی هستند که به صورت گسترده مورد استفاده درمانی

Gene Runner طراحی شدند. سنتز پرایمرها توسط شرکت روبین طب گستر انجام گردید. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۲/۹ میکرولیتر آب مقطر، ۳ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۶۰ پیکومول)، ۰/۴ میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۱/۲ میکرولیتر MgCl₂ (غلظت ۵۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر DNA الگو (غلظت ۲۰ نانوگرم) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase انجام گردید.

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (کوریت) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگاروز ۳ درصد واجد اتیدیوم برمایند منتقل و الکتروفورز گردیدند. قطعات DNA به کمک دستگاه Uvidoc مشاهده و عکس برداری شدند.

د) آزمون آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نسخه ۲۱ نرم افزار SPSS و آزمون های آماری مربع کای و تست دقیق فیشر انجام گردید. مرز معنی داری در $p < 0.05$ قرار داده شد.

نتایج

در مجموع از ۱۰۴ سویه سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده، ۶۴٪ از نمونه ها مربوط به مردان و ۳۶٪ مربوط به زنان بود. همچنین میانگین سنی در جمعیت مورد مطالعه ۵۶/۹ سال بود. در این مطالعه بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های نالیدیکسیک اسید (۸۶/۵۴٪)، سفتری آکسون (۸۲/۲٪) و اوفلوکساسین (۸۱/۷۸٪) بوده است. همچنین کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های ایمپی پنم (۴۰/۹۱٪)، پیراسیلین (۴۴/۹٪) و تتراسایکلین (۴۸/۰۳٪) مشاهده گردید (جدول ۱).

شناسایی باکتری از آزمون های بیوشیمیایی مانند تست های اکسیداز و کاتالاز، TSI، تست OF، آزمون سیترات، SIM، MRVP، رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد، تولید رنگدانه، بوی خاص و رنگ آمیزی گرم استفاده گردید. نمونه های باکتریایی به منظور انجام آزمون های تکمیلی به محیط کشت BHI Broth (Merck Germany) حاوی ۲۰ درصد گلیسرول تلقیح و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

ب) سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی: به این منظور سویه ها با روش استاندارد انتشار دیسک (Kirby-Bauer) و بر اساس استانداردهای CLSI (۱۰) بر روی محیط مولر هینتون آگار (Merck, Germany) کشت و ارزیابی شدند. دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده شامل سپیروفلوکساسین (۵ μg)، نوافلوکساسین (۱۰ μg)، لوفلوکساسین (۵ μg)، اوفلوکساسین (۵ μg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ μg)، تتراسایکلین (۳۰ μg)، پیراسیلین (۱۰۰ μg)، ایمپی پنم (۱۰ μg)، جنتامیسین (۱۰ μg)، سفنازیدیم (۳۰ μg) و سفتریاکسون (۳۰ μg) (شرکت پادتن طب، ایران) بودند. بعد از ۱۸-۲۴ ساعت گرم خانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری و نتایج آن ثبت گردید. در این مطالعه از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 (مرکز پژوهش های علمی و صنعتی ایران) به عنوان کنترل کیفی آزمایش ها استفاده شد.

بررسی حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) آنتی بیوتیک های سپیروفلوکساسین، تتراسایکلین، جنتامیسین (سینا دارو- ایران) و سفتریاکسون (شرکت داروسازی جابراین حیان-ایران) با روش برات میکرودیلوژن مطابق با استاندارد CLSI تعیین گردید (۱۰).

ج) واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR): به منظور تکثیر ژن mexB از پرایمرهای پیش-رو 5'-GATTGTCGATCCCGTTCATC-3' و پیرو 5'-CATTGATAGGCCCATTTTCG-3' استفاده شد. برای طراحی پرایمرها، ابتدا توالی نوکلئوتیدی ژن mexB از سایت NCBI به دست آمد. سپس پرایمرها توسط برنامه

جدول ۱: ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی نمونه های سودوموناس آئروژینوزا با روش انتشار دیسک

نوع آنتی بیوتیک	نتایج حساسیت نمونه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا		
	مقاوم درصد	نیمه حساس درصد	حساس درصد
سیپروفلوکساسین	۶۴/۲۸	۲۶/۶۶	۹/۰۶
نورفلوکساسین	۶۸/۳۰	۲۴/۴۱	۷/۲۹
لوفلوکساسین	۷۵/۰۴	۱۶/۵۸	۸/۳۸
اوفلوکساسین	۸۱/۸۷	۱۶/۰۲	۲/۱۱
نالیدیکسیک اسید	۸۶/۵۴	۱۱/۶۹	۱/۷۷
تتراسیکلین	۴۸/۰۳	۱۵/۶۲	۳۶/۳۵
پیپراسیلین	۴۴/۹	۳/۴	۵۰/۷
ایمی پنم	۴۰/۹۱	۶/۲	۵۲/۸۹
جنتامیسین	۶۵/۲۷	۱/۲	۳۲/۶۳
سفتازیدیم	۷۹/۸۱	۱۷/۴۹	۲/۷
سفتری اکسون	۸۲/۷	۱۷/۳	۰

جدول ۲: ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی نمونه های سودوموناس آئروژینوزا با روش برات میکرودیلوژن

نوع آنتی بیوتیک	نتایج حساسیت نمونه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا		
	مقاوم درصد	نیمه حساس درصد	حساس درصد
سیپروفلوکساسین	۷۳/۳	۷/۸	۱۸/۹
تتراسایکلین	۵۰/۸	۱۷/۴	۳۱/۸
جنتامیسین	۷۷/۱۴	۱۵/۷۱	۷/۱۵
سفتری اکسون	۹۱/۴	۶/۳	۲/۳

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی آنتی بیوتیکی نشان داد که بیشترین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک تتراسیکلین و بیشترین مقاومت نسبت به سفتری اکسون بوده است (جدول ۲).

در این مطالعه دامنه حداقل غلظت بازدارنده رشد ۱۰۴ سویه سودوموناس آئروژینوزا برای سیپروفلوکساسین ۱-۶۴ μg/mL، تتراسیکلین ۴-۱۲۸ μg/mL، جنتامیسین ۴-۲۵۶ μg/mL و سفتری اکسون ۸-۵۱۲ μg/mL گزارش گردید. نتایج الکتروفورز حاصل از محصولات PCR با ایجاد باند ۲۰۹ جفت بازی نشان دهنده حضور ژن mexB در ۲۸ سویه (۲۶/۹۲٪) بود.

از مجموع ۲۸ نمونه حاوی ژن mexB، ۱۶ سویه (۵۷/۱۴٪) از زخم سوختگی، ۵ سویه (۱۷/۸۵٪) از عفونت ادراری، ۴ سویه (۱۴/۲۸٪) از ترشحات خلط، ۲ سویه (۷/۱۴٪) از عفونت خون و ۱ سویه (۳/۵۷٪) از عفونت چشم جداسازی شد. با توجه به نتایج به دست آمده، رابطه معنی داری بین مقاومت فنوتیپی و ژنوتیپی ژن mexB به دست آمد. تحلیل آماری داده ها نشان داد که بین گروه های مختلف آنتی بیوتیکی، مقاومت به فلوروکینولون ها، بتالاکتام ها و تتراسیکلین در بین سویه های دارای ژن mexB در مقایسه با سویه های فاقد ژن اختلاف معنی داری وجود دارد (p<۰/۰۵).

بحث

در این مطالعه واکنش PCR، حضور اپرون mexAB-oprM را در ۲۷٪ از ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا نشان داد. در ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی این سویه ها مشخص گردید که بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های نالیدیکسیک اسید (۸۶/۵۴٪)، سفتری اکسون (۸۲/۲٪) و اوفلوکساسین (۸۱/۸۷٪) بوده است. سودوموناس آئروژینوزا عامل مهمی در عفونت های بیمارستانی است و درمان عفونت های ناشی از آن یکی از مشکلات عمده بهداشتی به شمار می آید. مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری ناشی از مقاومت ذاتی به دلیل نفوذپذیری کم، وجود سیستم های تراوشی، اکتساب ژن مقاومت از طریق پلاسمید، ترانسپوزون ها، اینتگرون ها و تولید بیوفیلیم می باشد. پمپ های تراوشی می توانند طیف وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی را بدون هیچ گونه شباهتی بین ساختار و عملکردشان تراوش نمایند (۱۱). آنتی بیوتیک هایی که به منظور درمان عفونت های ناشی از این باکتری به کار برده می شوند، در زمره این ترکیبات توکسیک به شمار می روند و خروج آن ها از سلول باکتری، کاهش چشمگیری در اثر درمانی آن ها دارد.

بروز فعالیت ضد باکتریایی فلوروکینولون ها به دلیل مهار دسته II آنزیم های توپوایزومرازی (DNA ژیراز) که توسط دو ژن *gyrA*، *gyrB* و DNA توپوایزومراز IV که توسط دو ژن *parC*

جداگانه ای سهم پمپ تراوشی mexAB-OprM را در مقاومت ذاتی سودوموناس آئروژینوزا تعیین نمودند. آن‌ها نشان دادند که این پمپ می‌تواند آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام، فلوروکینولون، نوویوسین، تتراسیکلین و تری متوپریم را تراوش نماید (۵). تحقیقات بر روی این پمپ طی سال‌های ۲۰۰۰-۱۹۹۵ حاکی از آن است که این سیستم تراوشی MDR می‌تواند علاوه بر آنتی بیوتیک‌های بیوساید، رنگ‌ها، دترجنت‌ها، بازدارنده‌های متابولیسمی نظیر مهارکننده‌های بیوسنتز اسیدهای چرب، حلال‌های آلی، ترکیبات ضد عفونی کننده و مولکول‌هایی که در ارتباط سلول به سلول در سلول‌های باکتری نقش دارند مانند اسیل هموسرین لاکتون‌ها که خود القا کننده‌های حساسیت جمعیتی (Quorum Sensing) در سودوموناس آئروژینوزا هستند را نیز از سلول خارج نماید.

این پمپ‌ها با به کارگیری نیروی محرکه پروتونی ترکیبات ضد میکروبی را از سلول خارج می‌کنند (۱۵). در این مطالعه به بررسی حضور پمپ تراوشی MexAB-oprM و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به خصوص کینولون‌ها در سویه‌های دارای این پمپ پرداخته شد.

میزان انتشار این میکروارگانیسم در مردان ۶۴٪ و در زنان ۳۶٪ بود. در تحقیقی که ماندر (Munder) و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام دادند ثابت شد که میزان انتشار باکتری سودوموناس آئروژینوزا به جنسیت، سن و مدت بستری شدن در بیمارستان بستگی دارد. به طوری که مردان بیشتر از زنان به عفونت‌های سودوموناسی حساس هستند (۱۶). این یافته با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر مطابقت دارد.

ضمن بررسی الگوی مقاومت، مشاهده شد که سویه‌های مورد مطالعه به ترتیب کمترین و بیشترین مقاومت را نسبت به آنتی بیوتیک‌های ایمی پنم و نالیدیکسیک اسید دارند. مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعات قبلی نشان می‌دهد که سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا میزان مقاومت بالاتری نسبت به آنتی بیوتیک‌ها نشان دادند.

شاهچراغی (Shahcheraghi) و همکاران در سال ۱۳۸۵ نشان دادند که جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده

و *parE* کد می‌شود، می‌باشد. در این مطالعه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به دو روش انتشار دیسک و براث میکرودیلوژن تعیین و سپس با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس حضور ژن *mexB* بررسی گردید.

بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید، سفتری آکسون و اوفلوکساسین همچنین کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های ایمی پنم، پپیراسیلین و تتراسایکلین مشاهده گردید. نتایج MIC نشان داد که بیشترین حساسیت مربوط به تتراسیکلین و بیشترین مقاومت مربوط به سفتریاکسون بود. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس، حضور ژن *mexB* را در ۲۷٪ از ایزوله‌های بالینی نشان داد. با توجه به نتایج این مطالعه، از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین وجود ژن *mexB* و مقاومت آنتی بیوتیکی وجود داشت.

میکروارگانیسم‌ها با دو مکانیسم نسبت به این دسته از داروها مقاومت نشان می‌دهند: ۱- از طریق تغییر جایگاه هدف آزیمی دارو با ایجاد موتاسیون در ناحیه درونی ژن‌های کد کننده آزیم‌های توپوایزومرازی (معروف به نواحی القای مقاومت کینولونی). ۲- خروج دارو به وسیله مکانیسم تراوشی دارویی (۹). پمپ‌های تراوشی MDR اغلب منشا کروموزومی داشته و در مقاومت ذاتی چند دارویی در سویه‌های بالینی نقش مهمی ایفا می‌نمایند. بیشتر این پمپ‌ها در باکتری‌های گرم منفی به خانواده RND تعلق دارد. این پمپ‌ها دارای یک ساختمان سه بخشی هستند که از غشای داخلی آنها تا غشای خارجی گسترش یافته است (۱۲). اولین بار این سیستم‌های تراوشی در سال ۱۹۷۸ به عنوان یک فرضیه مطرح شد و سپس در سال ۱۹۹۲ با معرفی پمپ اختصاصی تراوشی تتراسیکلینی TET در پروکاریوت‌ها شناسایی شدند (۱۳).

سیستم تراوشی چند دارویی MexAB-oprM اولین پمپ تراوشی در سودوموناس آئروژینوزا بوده که به وسیله پروفوسور پول (Poole) و همکاران در سال ۱۹۹۳ شناسایی گردید (۱۴). در بین سال‌های ۱۹۹۸-۱۹۹۶ پروفوسور پول (Poole) و همکارانش و پروفوسور کوهلر (Kohler) در مطالعات

مطالعه آن‌ها هم خوانی دارد (۲۱).

در پژوهش حاضر ۲۷٪ از سویه های MDR سیستم تراوشی MexAB-OprM را بر روی کروموزوم خود داشتند. رحمانی بادی (Rahmani-Badi) و همکاران در سال ۱۳۸۵ تنها در ۱۷٪ از سویه های مورد مطالعه پمپ MexAB-OprM را مشاهده نمودند. در حالی که نجار پیرایه (Najjarpirayeh) و همکاران در سال ۱۳۸۹ در هیچ یک از ۳۳ سویه MDR سودوموناس آئروژینوزا پمپ MexAB-OprM را مشاهده نکردند (۲۲).

در مطالعه حاضر مقایسه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های دارای *mexB* نسبت به سویه های فاقد این ژن و نیز بررسی های آماری نشان داد که این سویه ها مقاومت بالایی نسبت به سیپروفلوکساسین، بتالاکتام ها و تتراسیکلین دارند. در حالی که سویه های سودوموناس آئروژینوزا مقاومت کمتری نسبت به آمینوگلیکوزیدها از خود نشان دادند.

این نتایج با مطالعه پول (Poole) و همکاران در سال ۲۰۰۳ مطابقت دارد (۲۳). دلیل این نوع مقاومت وجود سیستم تراوشی MexXY-OprM می باشد که به طور اختصاصی سبب تراوش آمینوگلیکوزیدها و اریترومایسین به خارج از سلول می گردد (۱۶). بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش پمپ MexAB-OprM در تراوش آنتی بیوتیک های کینولون ها از اهمیت بالایی برخوردار است و تمامی سویه های دارای این پمپ، به تمامی کینولون ها مقاوم بودند.

نتیجه گیری

بررسی و مطالعه دلایل ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها به ویژه باکتری های بیماری زای شایع بیمارستانی بسیار اهمیت دارد. زیرا با شناخت صحیح از این مکانیسم ها می توان با انتخاب داروهای مناسب از طریق اصلاح و با تغییر دستورالعمل ها در فرآیند درمان بیماران، با مدیریت مصرف آنتی بیوتیک های وسیع الطیف، از شیوع مقاومت و گسترش عفونت های بیمارستانی جلوگیری نمود. نتایج این مطالعه بیانگر این است که از نظر آماری ارتباط معنی داری بین وجود ژن *mexB* و حضور پمپ تراوشی MexAB-OprM و همین طور

در طول یک سال از بیمارستان امام خمینی، بیشترین درصد مقاومت را نسبت به سفتی زوکسیم (۹۲/۳۵٪) و کمترین میزان مقاومت را نسبت ایمی پنم (۵٪) دارند (۱۷). در مطالعه ای دیگر میهنی (Mihani) و همکاران در سال ۱۳۸۶ نشان دادند که سویه های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سوختگی در بیمارستان طالقانی اهواز به سفتازیدیم ۷۱٪، ایمی پنم ۴۱٪ و سیپروفلوکساسین ۶۷٪ مقاوم بودند (۱۸). شکیبایی (Shakibaie) و همکاران در سال ۱۳۸۷ نیز نشان دادند که ۴۱٪ از سویه های سودوموناس آئروژینوزا در ایران مولد آنزیم بتالاکتاماز و ۳۴٪ دارای ژن مقاومت به فلوروکینولون ها می باشند (۱۹).

اکرامی (Ekrami) و کلاتر در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که سویه های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سوختگی دارای ۱۰۰٪ مقاومت نسبت به جتامايسين، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، توبرامايسين و سفتازیدیم بودند (۲۰). یافته های پژوهش حاضر با نتایج بررسی آن‌ها مطابقت دارد. آنها نشان دادند که درصد زیادی از سودوموناس های جدا شده از بیماران سوختگی به انواع آنتی بیوتیک ها مقاوم می باشند و تفاوت درصد مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های این مطالعه به دلیل جمع آوری نمونه از بیمارستان های مختلف می باشد. همچنین نتایج MIC سویه های جدا شده در مقایسه با سویه های جدا شده از سایر کشورها نشان می دهد که میزان مقاومت سویه های ایرانی بالاتر از سویه های سایر کشورها می باشد. دلیل این امر می تواند تجویز غیر منطقی آنتی بیوتیک ها به ویژه مصرف بی رویه آن‌ها و درمان تک دارویی باشد که موجب افزایش گونه های مقاوم در عفونت های بیمارستانی و بروز عوارض خطرناک در بیماران شده است.

فطار (Fetar) و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعات جداگانه ای میزان MIC آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین ۱۶-۲، جتامايسين ۲۵۶ $\mu\text{g/ml}$ ، آمیکاسین ۱۶ $\mu\text{g/ml}$ ، افلوکساسین ۸ $\mu\text{g/ml}$ ، سفتازیدیم ۲۵۶ $\mu\text{g/ml}$ و سفتریاکسون ۱۰۲۴ را تعیین نمودند. یافته های به دست آمده در این مطالعه در مورد MIC سویه های سودوموناس آئروژینوزا با نتایج

تشکر و قدردانی مقاومت آنتی بیوتیکی در سودوموناس آئروژینوزا وجود دارد. نویسندگان این مقاله از کارشناسان آزمایشگاه محمودیه به ویژه خانم مظهر و آقای علی اکبری به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند. با توجه به اهمیت مقاومت آنتی بیوتیکی، مطالعه سایر پمپ های تراوشی، مقایسه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و ارتباط بیان پمپ های تراوشی و منشا بالینی سویه ها پیشنهاد می گردد.

References

1. Acton A. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights for the healthcare professional. Scholarly Brief. Scholarly Editions. 2013; pp: 11-32.
2. Quinn P, Markey B, Leonard F, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick E. Veterinary microbiology and microbial disease. 2nd edition. John Wiley & Sons, 2011; pp: 225-243.
3. Crosse M. Antibiotic resistance: data gaps will remain despite HHS taking steps to improve monitoring. DIANE Publishing, 2011; pp: 49-52.
4. Rahman A, Choudhary M. Frontiers in anti-infective drug discovery. 1st edition. Bentham Science Publishers, 2010; pp: 152-168.
5. Poole K, Nehme D. Assembly of the MexAB-OprM multidrug pump of *Pseudomonas aeruginosa*: component interactions define by the study of pump mutant suppressors. J Bacteriol. 2007; 189: 6118-6127.
6. Mahamoud A, Chevalier J, AlibertFranc S, Pages J. Antibiotic efflux pumps in Gram negative bacteria: the inhibitor response strategy. J Antimicrob Chemother. 2010; 59: 1223-1229.
7. Takehiko M, Kohira N, Ogawa W. Gene cloning and characteristics of the RND-type multidrug efflux pump MexAB-oprB possessing two RND componemts in *Pseudomonas aeruginosa*. AAC. 2009; 155: 3509-3517.
8. Wilke M, Heller M, Haynes Ch, Creagh A, McIntosh L, Poole K, Strynadka N. The crystal structure of MexR from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with its anti repressor ArmR. PNAS. 2008; 105(39): 1432-1438.
9. Acton A. Quinolones: Advances in research and application. 2nd edition. Scholarly Brief. Scholarly Editions. 2012; pp: 13-18.
10. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Twentieth Informational Supplement; 2010: M02-A10.
11. Bojary Nasrabadi M, Hajia M. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in Tehran reference Burn Hospital, Tehran, Iran. Afr J Microbiol Res. 2012; 6(7): 1393-1396.
12. Lutz J, Lee J. Prevalence and antimicrobial-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs. Int J Environ Res Public Health. 2011; 8(2): 554-564.
13. Saier M, Tam J, Reizer R, Reizer J. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. Mol Microbiol. 1994; 11:841-847.

14. Poole K, Krebs K, McNally C, Neshat S. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol.* 1993; 175: 7363-7372.
15. Poole K, Morita Y, Sobel M. Antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the antibiotic-inducible PA5471 gene product. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 188(5): 1847-1855.
16. Munder A, Wölbeling F, Kerber-Momot T, Wedekind D. Acute intratracheal *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis mice is age-independent. *Respir Res.* 2011; 12: 148-154.
17. Shahcheraghi F, Feizabadi M, Yamin V, Abiri R, Abedian Z. Serovar determination, drug resistance pattern and plasmid profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients at two hospitals of Tehran (Iran). *Burns.* 2002; 28: 340-348.
18. Mihani F, Khosravi A. MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with burn wound infections and PCR methods to identify *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* genes. *Iran J Microbiol.* 2007; 1(1): 23-31.
19. Shakibaie M, Shahcheraghi F, Hashemi A, Saeed Adeli N. Detection of TEM, SHV and PER Type extended-spectrum β -lactamas gene among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Burnt Patients at Shafa Hospital. *Iran J Basic Med Sci.* 2008; 11(2): 104-111.
20. Ekrami A, Enayat K. Bacterial infections in burn patients at burn hospital in Iran. *Indian J Med Res.* 2007; 126: 541-544.
21. Fetar H, Gilmour C, Klinoski R, Daigle D, Dean C, Poole K. mexEF-oprN multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by the MexT activator in response to nitrosative stress and chloramphenicol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(2): 508-514.
22. Rahmani-Badi A, Abdi-Ali A, Falsafi T, Nikname V. Study of antibiotic resistance by efflux in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pak J Biol Sci.* 2007; 10(6):924-927.
23. Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Bacteriol.* 2003; 6: 273-298.



Quinolone resistance associated with efflux pumps *mexAB-oprM* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Mitra Salehi¹, Mina Hekmatdoost², Farzaneh Hosseini¹

¹ Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Bioscience, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.

² MS.c., Department of Microbiology, Faculty of Bioscience, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objectives: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most common antibiotic resistant bacteria and, therefore, treatments of Pseudomonad-caused infections are complicated. MexAB-OprM pump exports many antimicrobial compounds regardless of their structural and functional similarities. The *mexB* gene encodes a proton-drug antiporter in MexAB-OprM pump. The present study was aimed to evaluate and detect the quinolone resistance associated with efflux pumps *mexAB-oprM* in *P. aeruginosa* isolated from clinical specimens.

Materials and Methods: This cross-sectional study was performed on 104 *P. aeruginosa* isolated from patients hospitalized in Trauma and Burn Intensive Care Unit (TBICU). The Genera and strains were identified primarily based on biochemical tests. The evaluation of antibiotic resistance pattern was carried out using disk diffusion method for 11 common antibiotics and microdilution broth method for 4 antibiotics. The presence of *mexB* gene was investigated using PCR method.

Results: According to the results, the most antibiotic resistance pattern were seen through treatment with nalidixic acid (86.54%), ceftazidime (82.2%) and ofloxacin (81.78%). Furthermore, the minimum antibiotic resistance were observed through treatment with imipenem (40.91%), piperacillin (44.9%) and tetracycline (48.03%). Based on MIC, the highest and lowest antibiotic sensitivity was recorded for tetracycline and ceftriaxone, respectively. Based on the PCR method, 27% of the clinical isolates harbor the *mexAB-oprM* operon.

Conclusion: Based on the results, there is a significant association between presence of *mexB* gene and *mexAB-oprM* pump and antibiotic resistance in *P. aeruginosa*. Regarding the importance of antibiotic resistance, the study of other efflux pumps, comparison of antibiotic resistance profile and the relationship between efflux pumps and clinical origin of the strains are recommended.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *mexB*, Quinolone resistance, Multidrug efflux pumps.

Correspondence to: Mina Hekmatdoost

Tel: +989123337503

E-mail: m.hekmat90@yahoo.com

Journal of Microbial World 2014, 6(4): 290-298.