



Isolation, identification and investigation of the relationship between multidrug resistance (MDR) and the presence of *mexC*, *exoS* and *plcH* genes in *P. aeruginosa* clinical isolates

Leyli Ali Abd Alhasinat ¹, Bita Behboodian ², Samaneh Dolatabadi ³, Elahe Vadayekheiry ⁴

¹ MSc, Department of biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University Tehran, Iran.

² Assistant professor, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

³ Associate Professor, Department of Microbiology, Neyshabur branch Islamic Azad University, Neyshabur, Iran.

⁴ Ph.D, Research Center for Animal Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa causes serious hospital acquired infections. The prevalence of multidrug-resistant strains reduces treatment options and significantly increases complication rates. Due to the importance of this topic, knowledge of pathogenic mechanisms and antibiotic resistance seems essential. The aim of this study is to evaluate drug resistance factors in *Pseudomonas aeruginosa* through the expression of *mexC*, *exoS* and *plcH*. First, 150 clinical samples of hospitalized patients were collected. *P. aeruginosa* isolates were identified by biochemical tests. Antibiotic sensitivity phenotype of *P. aeruginosa* isolates was done by disk diffusion method. PCR technique was used to check the presence of *mexC*, *exoS* and *plcH* genes in resistant isolates. The results showed that 66% of the samples were infected with *P. aeruginosa*, and the highest frequency of contamination was related to blood samples. According to the obtained results, the frequency of resistance to cefixime antibiotic was the highest and 86%. The lowest percentage of resistance to imipenem was 42%, 60% of isolates had MDR phenotype. PCR analysis showed that 90% of tested resistant isolates carry the *plcH* gene and 75% have *exoS*. Due to the increase of resistance to antibiotics in hospital acquired infections, including *Pseudomonas aeruginosa*, it is necessary to take immediate measures for timely identification and definitive treatment with appropriate antibiotics.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, drug resistance, phospholipase C, exotoxin, *mexC*.

Received: 26 August 2024

Revised: 25 October 2024

Accepted: 2 December 2024

Correspondence to: Bita Behboodian

Tel: +98 9151673248

E-mail: b.behboodian@mshdiau.ac.ir

Journal of Microbial World 2024, 17 (3): 211 - 221

DOI: <https://doi.org/10.82363/jmw.2024.1201625>



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



جداسازی، شناسایی و بررسی ارتباط بین مقاومت چنددارویی (MDR) و حضور ژن‌های

P. aeruginosa در *plcH* و *exoS*، *mexC*

لیلی علی‌الحسینات^۱، بیتا بهبودیان^{۲*}، سمانه دولت‌آبادی^۳، الهه ودایع‌خیری^۴

^۱ کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران. ^۲ استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران. ^۳ دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران. ^۴ دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکون جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران.

چکیده

سودوموناس/ائروژینوزا باعث عفونت‌های جدی بیمارستانی می‌شود. شیوع سویه‌های مقاوم به چند دارو گزینه‌های درمانی را کاهش و به طور قابل توجهی نرخ عوارض را افزایش می‌دهد. به دلیل اهمیت این موضوع، آگاهی از مکانیسم‌های بیماریزایی و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه ارزیابی عوامل مقاوم به دارو در سودوموناس/ائروژینوزا از طریق بیان *plcH* و *exoS*، *mexC* می‌باشد. ابتدا ۱۵۰ نمونه بالینی بیماران بستری جمع‌آوری شد. شناسایی جدایه‌های *P. aeruginosa* با آزمایش‌های بیوشیمیایی انجام گردید. فنوتیپ حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *P. aeruginosa* با روش دیسک دیفیوژن انجام شد. برای بررسی حضور ژن‌های *plcH* و *exoS*، *mexC* در جدایه‌های مقاوم، تکنیک PCR استفاده شد. نتایج نشان داد که ۶۶٪ نمونه‌ها آلوده به *P. aeruginosa* بودند و بیشترین فراوانی آلودگی مربوط به نمونه‌های خون بود. همچنین فراوانی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفکسیم بیشترین و ۸۶ درصد بود. کمترین درصد مقاومت نسبت به ایمپنم با ۴۲ درصد بود. ۶۰ درصد جدایه‌ها فنوتیپ MDR داشتند. بررسی PCR نشان داد که ۹۰ درصد جدایه‌های مقاوم حامل ژن *plcH* و ۷۵ درصد دارای *exoS* می‌باشند. با توجه به افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در عفونت‌های بیمارستانی از جمله سودوموناس/ائروژینوزا لازم است اقدامات فوری در شناسایی به موقع و درمان قطعی با آنتی‌بیوتیک‌های مناسب انجام شود.

کلمات کلیدی: سودوموناس/ائروژینوزا، مقاوت دارویی، فسفولیپاز C، آگزوتوکسین، *mexC*

پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۹/۱۲

ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۸/۴

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۶/۵

مقدمه

ایمنی و آن‌هایی که در بخش مراقبت‌های ویژه ICU بستری می‌شوند، بیشتر مستعد ابتلا به عفونت‌های تهدید کننده زندگی هستند؛ از جمله پنومونی مرتبط با ونتیلاتور، عفونت‌های جریان خون، عفونت‌های دستگاه ادراری، عفونت‌های زخم سوختگی و عوارض فیبروز کیستیک (۲). میکروارگانیسم‌هایی که تحت تیمارهای آنتی‌بیوتیکی قرار می‌گیرند، مکانیسم‌هایی

سودوموناس/ائروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) یک باسیل گرم منفی غیر تخمیری و یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی است (۱). بیماران دچار نقص سیستم

(*) آدرس برای مکاتبه: گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

پست الکترونیک: b.behboodian@mshdiau.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۵۱۶۷۳۲۴۸



فسفولیپاز C یک آنزیم خارج سلولی و حساس به حرارت با وزن مولکولی ۷۸ کیلودالتون است که نقش مهمی در بیماری‌زایی *سودوموناس/ئروژینوزا* ایفا می‌کند. این باکتری دو نوع فسفولیپاز تولید می‌کند که یکی از آن‌ها همولیتیک با وزن مولکولی بالا H-PLC و دیگری غیرهمولیتیک با وزن مولکولی پایین N-PLC است (۹). این دو می‌توانند فسفوریل کولین را که ماده اصلی سورفاکتانت ریه است تجزیه نموده و موجب آزاد شدن دی‌آسیل گلیسرول و کولین شده که منجر به تشکیل ترومبوسان، پروستاگلاندین‌ها و لکوترین‌ها می‌شود. فسفولیپاز C همولیتیک H-PLC همولیز کننده اریتروسیت‌های انسانی است و همچنین اسفنگومیلین را که از اجزای اصلی غشاء سلول‌های یوکاریوتی است هدف قرار می‌دهد و به دلیل کاهش عملکرد ریه، نقش مهمی در عفونت‌های شدید ریوی به ویژه در بیماران سیستمی فیبروزیس ایفا می‌کند (۱۰).

بیماری‌زایی *سودوموناس/ئروژینوزا* با ترشح سم آن انجام می‌شود در باکتری‌های گرم منفی سیستم ترشح نوع سه شناخته شده که در آن سموم به طور مستقیم به سلول‌های میزبان مجاور تزریق می‌شوند. در *سودوموناس* چهار پروتئین افکتور شناخته شده *exoY*، *exoU*، *exoT*، *exoS* (۱۱). این پروتئین‌ها دارای دو دامین عملکردی مجزا می‌باشد، پایانه آمین دارای دامین فعال کننده GTPase برای GTPases Rho و در نتیجه اختلال در عملکرد میکروفیلament اکترین و در نتیجه گرد کردن سلول می‌باشد. پایانه کربوکسیل دارای فعالیت ADP ریبوزیل ترانسفراز در جهت Ras و سایر پروتئین‌هاست و برای سلول‌های یوکاریوتی سیتوتوکسیک است، علاوه بر این، *ExoS* ممکن است نقشی در تعدیل ورود باکتریایی توسط سلول‌های یوکاریوتی بازی کند (۱۲).

سیستم‌های افلاکس پمپ نقش مهمی در مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *سودوموناس/ئروژینوزا* به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف دارند. *سودوموناس/ئروژینوزا* دارای پتانسیل بیان ۱۲ نوع پمپ افلاکس چند دارویی به نام Mex می‌باشد (۱۳). سیستم افلاکس Mex متعلق به خانواده RND است. پنج پمپ به نام‌های

برای مهار کردن عوامل ضد میکروبی و در امان ماندن از اثر آن‌ها از خود نشان می‌دهند. در نتیجه رژیم‌های درمانی بی اثر شده و سویه‌های مقاوم از میکروارگانیسم‌ها باعث عفونت‌های کشنده می‌شوند (۳).

در موارد عفونت‌های باکتریایی، نیاز مبرمی برای یافتن انواع جدیدی از درمان وجود دارد، این افزایش مقاومت را می‌توان در بسیاری از گونه‌های باکتریایی از جمله *P. aeruginosa* مشاهده کرد (۴).

پاتوژن *P. aeruginosa* پیچیده است. عفونت *سودوموناس* می‌تواند به صورت یک بیماری تهاجمی برق‌آسای حاد یا کلونیزاسیون مزمن ظاهر شود (۱). بیماری‌زایی به تعامل بین عوامل باکتریایی متعدد و وضعیت ایمنی میزبان نسبت داده می‌شود. پپلی نوع IV (T4P)، تازک‌ها و الیگوساکاریدهای هسته در ساختارهای لیپوپلی ساکارید پیچیده (LPS) فاکتورهای حداث شناخته شده (VFs) هستند که سلول‌های باکتریایی را قادر می‌سازند به سطوح میزبان/غیر زیستی بچسبند و عفونت را آغاز کنند (۵). *P. aeruginosa* همچنین از پنج سیستم ترشحی نوع (I-V) برای رساندن سموم به محیط خارج سلولی یا سیتوپلاسم سلول میزبان، از جمله پروتئازها، آگزوتوکسین‌ها و آنزیم‌هایی مانند پروتئاز قلیایی، آگزوتوکسین-A، فسفولیپاز C و الاستازها استفاده می‌کند (۶). توانایی تشکیل بیوفیلم باعث افزایش بیشتر مقاومت در برابر ترکیبات ضد میکروبی می‌شود و ساختار پیچیده بیوفیلم از باکتری‌ها در برابر سیستم ایمنی میزبان محافظت می‌کند (۷).

مقاومت ذاتی بالای *P. aeruginosa* به چندین کلاس ضد میکروبی به دلیل نفوذپذیری غشای بیرونی، بیان پمپ‌های افلاکس مقاوم به چند دارو (MDR) و تولید آنزیم‌های غیرفعال کننده آنتی‌بیوتیک و همچنین جهش‌هایی است که در طی تکثیر DNA ظاهر می‌شوند. به عنوان مثال، تولید بیش از حد *amp-C* و غیرفعال کردن پروتئین متصل شونده به پنی سیلین 4-PBP. مطالعات اخیر روی بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک، جهش‌هایی را در PBP-3 نشان داده است که به مقاومت به بتالاکتام کمک می‌کند (۸).

حرارت ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله عدم رشد برای هر آنتی‌بیوتیک اندازه‌گیری گردید و نتایج برای هر آنتی‌بیوتیک مطابق با دستورالعمل CLSI به‌عنوان حساس، حد واسط و مقاوم ثبت شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک شامل سفکسیم (۵μg)، سفتریاکسون (۳۰μg)، سفوتاکسیم (۳۰μg)، ایمی پنم (۱۰μg)، جنتامایسین (۱۵μg)، کلستین (۱۰μg)، که طبق استاندارد CLSI انتخاب و از شرکت Mast انگلستان تهیه شدند.

تعیین الگوی مقاومت MDR در سویه‌های جداسازی شده با توجه به CLSI و دستورالعمل CDC صورت گرفت که مطابق آن یک باکتری MDR به‌عنوان باکتری غیرحساس به حداقل یک عامل در سه یا تعداد بیشتری از دسته‌های ضد میکروبی در نظر گرفته می‌شود. بنابراین انتخاب دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی به گونه‌ای بود که متعلق به چند گروه آنتی‌بیوتیکی مختلف باشند تا ارزیابی صحیحی از فنوتیپ‌های MDR به‌دست آید.

ج PCR جهت شناسایی ژن‌ها: استخراج DNA به‌روش Boiling و کیت استخراج سیناکلون، ایران انجام شد. به‌دین ترتیب که ۲-۳ کلونی ۱۰ دقیقه جوشانده و سپس سانتریفیوژ انجام شد. واکنش PCR جهت شناسایی ژن‌های *mexC*, *exoS*, *plcH* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر که شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها، ۳ میکرولیتر DNA و در نهایت آب مقطر استریل تا حجم ۲۵ میکرولیتر می‌باشد، برنامه‌ریزی گردید. ترکیب حاصل از نظر کیفی با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و با ولتاژ ۸۰ ولت و جریان ۵۰ میلی‌آمپر برای ژن‌های مورد بررسی قرار گرفت. پرایمرهای اختصاصی استفاده شده ژن‌های مربوطه در جدول ۱ و برنامه PCR در جدول ۲ نمایش داده شده است.

د) آنالیز آماری داده‌ها: اطلاعات به‌دست آمده به کمک نرم افزار SPSS ۱۶ مورد تحلیل قرار گرفتند. در تحلیل داده‌ها از آمار توصیفی (فراوانی، درصد، میانگین) استفاده شد.

oprj, - MexJK-OprM MexXY-OprM, MexAB-OprM MexCD oprN-MexEF مهمترین پمپ‌های افلاکس این خانواده هستند. OprM-MexAB تنها پمپ ترشحی است که در تمامی جدایه‌های سودوموناس/نروژینوزا یافت شده و موجب مقاومت ذاتی این باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌گردد (۱۴).

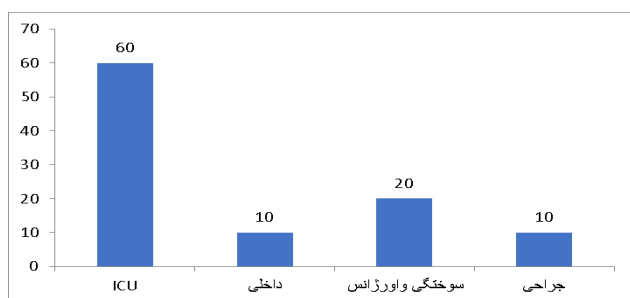
درمان غیرعلمی نامناسب با افزایش مرگ و میر در عفونت‌های *P. Aeruginosa* همراه است. تأخیر در شروع درمان مناسب ممکن است به افزایش مدت بستری در بیمارستان و تداوم عفونت کمک کند. علاوه بر این، پیامدهای بالینی بدتر ممکن است با عفونت‌های MDR به دلیل محدود بودن گزینه‌های ضد میکروبی موثر مرتبط باشد. در نتیجه لزوم اطلاعات از گونه‌های مقاوم برای دسترسی به آنتی‌بیوتیک‌های جایگزین ضروری است که در این مطالعه به آن پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

الف) جمع‌آوری و شناسایی جدایه‌های باکتری: ۱۵۰ نمونه بالینی از تراشه، زخم و خون بیماران بخش‌های ICU، داخلی، سوختگی و اورژانس و جراحی بیمارستان موسی بن جعفر قوچان جمع‌آوری شده و مورد بررسی و شناسایی قرار گرفتند. نمونه‌های بالینی روی محیط بلاد آگار و EMB کشت داده شدند. برای شناسایی و تایید جدایه‌های *P. aeruginosa*، تست رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، MRVP، OF، بررسی تحرک در دمای ۴۲ درجه سلسیوس و بررسی تولید پیگمان فلورسنت در محیط کشت ستریماید انجام شد.

ب) تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش آنتی‌بیوگرام: برای بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های سودوموناس/نروژینوزا از روش دیسک دیفیوژن آگار بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای بین المللی آزمایشگاه CLSI استفاده گردید.

از کشت تازه این باکتری‌ها سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه و سپس روی محیط مولر هینتون آگار کشت چمنی داده شده و دیسک‌گذاری انجام شد. بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری در



شکل ۱: فراوانی جدایه‌های *P. aeruginosa* به تفکیک بخش‌های بیمارستانی.

در این مطالعه ۶ دیسک آنتی‌بیوتیکی از گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی انتخاب شد که شامل سفکسیم ($\mu\text{g}5$)، سفتریاکسون ($\mu\text{g}30$)، سفوتاکسیم ($\mu\text{g}30$)، ایمپنم ($\mu\text{g}10$)، جنتامایسین ($\mu\text{g}15$)، کلستین ($\mu\text{g}10$)، طبق استاندارد CLSI بودند. نتایج حاصل از آزمایش تعیین حساسیت ۱۰۰ جدایه *P. aeruginosa* به آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده، در نمودار شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی کمترین مقاومت در نمونه‌های تراشه و بیشترین مقاومت در نمونه‌های خون دیده شد. میزان مقاومت به سفکسیم در خون ۴۳ درصد، ادرار ۳۷ درصد و زخم و تراشه به ترتیب ۱۲ و ۱۵ درصد بود. ۵۱ درصد جدایه‌های جدا شده از خون نسبت به سفتریاکسون مقاومت نشان دادند و این در حالی است که فراوانی مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک در بین نمونه‌های ادرار و زخم و تراشه به ترتیب ۱۹، ۱۲ و ۱۶ درصد بود. مقاومت نسبت به سفوتاکسیم در نمونه‌های خون ۳۹ درصد، در ادرار ۳۸ درصد و در زخم و تراشه به ترتیب ۱۴ و ۱۷ درصد بود. در بین جدایه‌های جدا شده از خون فراوانی مقاومت به ایمپنم و جنتامایسین و کلستین به ترتیب ۴۶، ۴۰ و ۴۵ درصد گزارش شد. شکل ۲ فراوانی مقاومت و حساسیت جدایه‌های *P. aeruginosa* را به تفکیک نمونه‌های بالینی نشان می‌دهد.

مطابق نتایج به دست آمده فراوانی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفکسیم ۸۶ درصد و جنتامایسین ۷۲ درصد بود. کمترین درصد مقاومت نسبت به ایمپنم با ۴۲ درصد بود. نمودار شکل ۳ مقاومت به ۱۰۰ جدایه *P. aeruginosa* را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی نشان می‌دهد.

جدول ۱: توالی پرایمرها.

منبع	طول قطعه	توالی	آغازگر
(۱۵)	۴۱۷pb	GAAATGGTGTGCCGGTGGAG	mexC-F
		GTCTGGGTGAAATCCGCATAGA	mexC-R
(۱۶)	۲۷۰pb	GCGAGGTCAGCAGAGTATCG	exoS-F
		TTCGGCGTCACTGTGGATGC	exoS-R
(۱۷)	۳۰۷bp	GCACGTGGTCATCCTGATGC	plcH-F
		TCCGTAGGCGTCGACGTAC	plcH-R

جدول ۲: برنامه PCR.

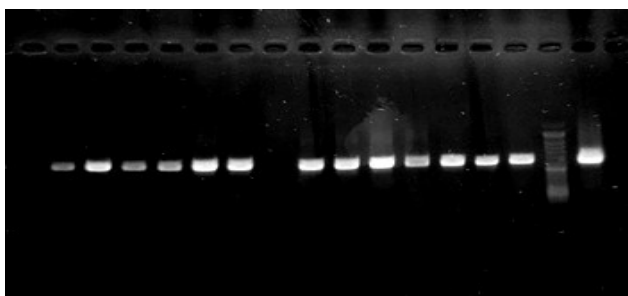
نام مرحله	درجه حرارت ($^{\circ}\text{C}$)	مدت زمان	تعداد سیکل
واسرشت سازی اولیه	۹۴	۲min	۳
واسرشت سازی	۹۴	۱ min	
اتصال آغازگرها	۶۰	۱ min	۳۵
سنتز قطعه‌ی موردنظر	۷۲	۵۰ s	
گسترش نهایی	۷۲	۱۰ min	۵

یافته‌ها

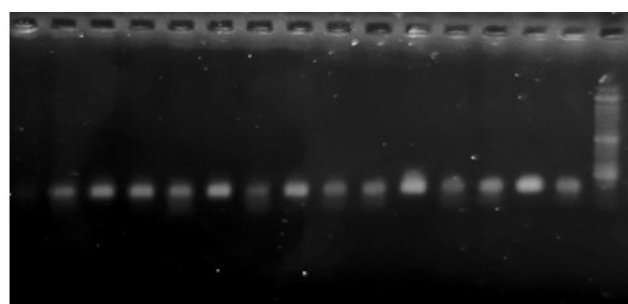
در پژوهش حاضر درکل از بین ۱۵۰ نمونه بالینی، ۱۰۰ جدایه *P. aeruginosa* با تست‌های بیوشیمیایی و میکروسکوپی شناسایی شدند. نمونه‌ها از بیماران بستری در بخش‌های ICU، داخلی، سوختگی، اورژانس و جراحی بیمارستان موسی بن جعفر قوچان جمع‌آوری شدند.

فراوانی بیماران مراجعه کننده به بخش‌ها نشان داد که ۶۰ درصد بیماران در محدوده سنی ۴۰-۳۵ بودند و کمترین فراوانی با میزان ۱۰ درصد مربوط به محدوده سنی ۲۵-۲۰ بود.

فراوانی بیماران با دامنه سنی ۳۰-۲۵، ۱۵ درصد بود. فراوانی جدایه‌های مربوط به بخش‌های مختلف در نمودار شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود بیشترین فراوانی مربوط به بخش ICU بوده و کمترین فراوانی مربوط به بخش داخلی و جراحی گزارش شد.



شکل ۴: نتایج الکتروفورز مربوط به ژن *plcH* در بین جدایه‌ها. چاهک A: الگو، چاهک B: کنترل مثبت، چاهک C: کنترل منفی، جدایه‌های شماره ۱ تا ۱۳. D



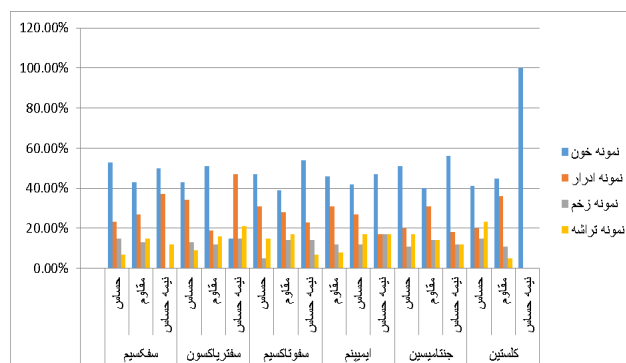
شکل ۵: نتایج الکتروفورز مربوط به ژن *exoS* در بین جدایه‌ها. چاهک A: الگو، چاهک B: کنترل مثبت، چاهک C: کنترل منفی، جدایه‌های شماره ۱ تا ۱۳. D

بحث

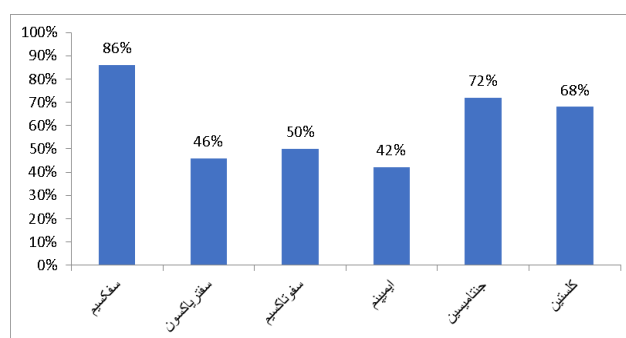
P. aeruginosa یک پاتوژن مهم است که اغلب در عفونت‌های مرتبط با مراقبت‌های بهداشتی (healthcare-associated infections)، به‌ویژه در بیماران بدحال یا نقص ایمنی نقش دارد. *P. aeruginosa* توانایی ایجاد عفونت‌های مختلف را دارد. انتخاب مناسب آنتی‌بیوتیک‌ها به مشخصات مقاومت آنتی‌بیوتیکی و نظارت فعال بر روند تغییر الگوهای مقاومت بستگی دارد (۱۸). بنابراین، ما این مطالعه را برای برآورد شیوع *P. aeruginosa* در قوچان و برآورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های بالینی بیمارستان انجام دادیم.

در پژوهش حاضر ۱۰۰ جدایه *P. aeruginosa* از بیماران بستری در بخش‌های ICU، داخلی، سوختگی، اورژانس و جراحی بیمارستان موسی بن جعفر قوچان با تست‌های بیوشیمیایی و میکروسکوپی شناسایی شدند.

بیشترین فراوانی مربوط به دامنه سنی ۴۰-۳۵ بود و کمترین



شکل ۲: نمودار حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *P. aeruginosa* برحسب نمونه‌های بالینی.



شکل ۳: نمودار مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی در جدایه‌های بالینی *P. aeruginosa*.

در مطالعه حاضر ۶۰ درصد جدایه‌های نسبت به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی مورد آزمون یا بیشتر، مقاوم بودند که به‌عنوان فنوتیپ MDR در نظر گرفته شدند.

نتایج *PCR* در مطالعه حاضر برای بررسی حضور ژن آگزوانزیم S جدایه‌های بالینی *P. aeruginosa* از پرایمر اختصاصی *exoS* و برای بررسی حضور ژن فسفولیپاز C از پرایمر اختصاصی *plcH* استفاده شد. همچنین حضور ژن *mexC* نیز برای بررسی پمپ افلاکس انتخاب شد. نتایج تکنیک *PCR* و الکتروفورز روی ژل آگارز در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است. هیچ کدام از جدایه‌های بالینی *P. aeruginosa* با پرایمرهای مربوط به *mexC* جواب ندادند. نتایج نشان دارد که از بیست نمونه تست شده برای *plcH* ۱۸ نمونه مثبت بودند. در واقع ۹۰ درصد سویه‌ها حامل ژن فسفولیپاز C بودند. در مورد ژن *exoS* ۱۷ مورد مثبت شدند یعنی ۸۵ درصد از جدایه‌های دارای ژن آگزوانزیم S بودند.

همکاران در آزمایشی مشابه در قزوین درصد مقاومت به ایمنی‌پنم را ۳۱ درصد گزارش کرده‌اند (۲۰). میزان مقاومت به ایمنی‌پنم در اصفهان ۷۶ درصد، تهران ۷۰/۵ درصد، تبریز ۴۹ درصد و اهواز ۴۳ درصد گزارش شده است (۱۹).

براساس بررسی متاآنالیز انجام شده توسط واعظ و همکاران مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در ایران بالاتر از درصد گزارش شده از ایسلند، بریتانیا و سوئد است. همچنین بر طبق گزارش سازمان نظارت بر مقاومت ضد میکروبی اروپا در سال ۲۰۱۳ درصد جدایه‌های مقاوم به کارباپنم *P. aeruginosa* در دانمارک ۲۰۹٪ بود که به طور قابل توجهی کمتر از نتایج ما است (۱۹).

نتایج حاضر نشان داد که از ۱۰۰ جدایه *P. aeruginosa*، ۶۰ درصد جدایه‌ها نسبت به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده یا بیشتر، مقاوم بودند که به عنوان فنوتیپ MDR در نظر گرفته شدند.

مطالعه Gill و همکاران بین سال‌های ۲۰۱۴ و ۲۰۱۵ فراوانی سویه‌های *P. aeruginosa* MDR بیمارستان بستری در بخش مراقبت‌های ویژه را ۵۰٪ نشان دادند که تقریباً ده درصد از مقاومت ما کمتر بود (۲۱). علاوه بر این، یافته Khan و همکاران نشان داد که شیوع *P. aeruginosa* MDR (۳۰ درصد) در بیمارستان‌های مختلف کراچی پاکستان کمتر از ما است (۲۲). یک مطالعه جامع که از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۵ در ۲۸ بیمارستان در تایلند انجام شد، نشان داد که شیوع *P. aeruginosa* MDR از ۲۰ درصد تا ۳۰ درصد بود که کمتر از یافته‌های ما است (۲۳).

اگزوانزیم S (ExoS) یک پروتئین ۴۳ کیلو دالتونی است که توسط ژن *exoS* کدگذاری می‌شود و مشابه YopE یرسینیا /نتروکولیتیکا است. اگزوانزیم S فعالیت-ADP-ریبوزیل ترانسفراز خارج سلولی دارد که از سیستم ترشحی تیپ III ترشح می‌شود. در مطالعه حاضر ژن *exoS* در ۱۷ جدایه *P. aeruginosa* شناسایی شد یعنی ۸۵ درصد از جدایه‌ها حامل ژن *exoS* بودند. در مطالعه‌ای که نیک بین و همکاران (۲۰۱۲) انجام دادند *exoS* در ۳۱ درصد جدایه‌های *P. aeruginosa* در

فراوانی به دامنه سنی ۲۵-۲۰ تعلق داشت. فراوانی مشاهده شده در محدوده ۲۵-۳۵، ۱۵ درصد بود. میزان تفاوتی که در فراوانی سنین بالاتر دیده شد ممکن است به دلیل ظهور بیماری‌ها در افراد سنین بالا و کاهش سیستم ایمنی به خصوص در سبک زندگی ایرانی باشد.

بیشترین باکتری از بخش مراقبت‌های ویژه جدا شد و در بین نمونه‌های بالینی، نمونه‌های خون و سپس ادرار بالاترین فراوانی *P. aeruginosa* را داشتند. پیمانی و همکاران (۱۳۹۳) بیشترین جدایه‌های *P. aeruginosa* را از نمونه‌های خونی جدا کردند که مشابه یافته‌های حاضر می‌باشد.

سفیکسیم یک آنتی‌بیوتیک سفالوسپورین با طیف وسیع است و معمولاً برای درمان عفونت‌های باکتریایی گوش، مجاری ادراری و دستگاه تنفسی فوقانی استفاده می‌شود. مطابق نتایج به دست آمده فراوانی مقاومت نسبت به سفیکسیم ۸۶ درصد بود. بیشترین مقاومت نسبت به سفیکسیم (۴۳ درصد) در جدایه‌های *P. aeruginosa* مربوط به نمونه‌های خون و کمترین مقاومت در جدایه‌های به دست آمده از نمونه‌های زخم (۱۳ درصد) مشاهده شد.

در بررسی متاآنالیز انجام شده توسط واعظی و همکاران در سال ۲۰۱۸، بیشترین مقاومت نسبت به جنتامایسین در جدایه‌های *P. aeruginosa* در اهواز با ۶۷ درصد و سپس تهران با ۶۲/۵ درصد و کمترین مقاومت بین جدایه‌های زاهدان با ۱۲ درصد گزارش شده است. مقاومت نسبت به سفیکسیم در جدایه‌های *P. aeruginosa* به دست آمده از نمونه‌های تبریز و اصفهان ۵۵ درصد، گیلان و زنجان حدوداً ۳۷ درصد بود (۱۹).

مقاومت به سفتریاکسون در درجه اول از طریق هیدرولیز توسط بتالاکتاماز، تغییر پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین (PBPs) و کاهش نفوذپذیری است. جدایه‌های بالینی *P. aeruginosa* بررسی شده در پژوهش حاضر، ۴۶ درصد به سفتریاکسون مقاومت نشان دادند.

ایمنی‌پنم جزو دسته آنتی‌بیوتیکی کارباپنم‌هاست. جدایه‌های بالینی *P. aeruginosa* جدا شده از قوچان ۴۲ درصد نسبت به ایمنی‌پنم مقاومت نشان دادند. این درحالی است که پیمانی و

است (۳۱).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه پیشنهاد می‌گردد که تعیین کم‌ترین غلظت ممانعت‌کننده از رشد باکتری و تست آنتی‌بیوگرام پیش از شروع درمان انجام گیرد. زیرا تا کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید و موثر می‌بایست با استفاده صحیح از داروهای موجود، امکان درمان مناسب بیماری‌های عفونی را فراهم نمود. همچنین اجتناب از استفاده همزمان چند آنتی‌بیوتیک به جهت جلوگیری از ظهور سویه‌های مقاوم پیشنهاد می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

از مسئولان و کارکنان آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد و بیمارستان موسی ابن جعفر قوچان تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

وجود ندارد.

زخم‌ها، ۶۷ درصد در سوختگی‌ها و ۵۶ درصد در جدایه‌های دستگاه تنفسی مشخص شد (۲۴). Bogiel و همکاران در سال ۲۰۱۷ فراوانی *exoS* را در ۴۷ درصد جدایه‌ها گزارش داد (۲۵). احتمال دارد که این تفاوت در میزان فراوانی‌های گزارش شده به دلیل تفاوت در تعداد جدایه‌های بالینی در مکان‌های مختلف و یا به دلیل نمونه‌گیری از بیماران با شرایط بالینی و فیزیولوژیکی متفاوت باشد.

مطالعات انجام شده روی ژن *mex C* فراوانی نسبتاً بالایی را برای جدایه‌های *P. aeruginosa* در ایران نشان می‌دهد (۲۶). در حالیکه هیچ کدام از سویه‌های مورد بررسی ما این ژن تشخیص داده نشد. احتمال می‌رود دلیل این امر، نوع انتخاب پرایمر یا عدم حضور این ژن در تعداد بیست جدایه مورد بررسی در منطقه مورد بررسی باشد؛ بنابراین نیاز به بررسی بیشتر دارد. هر چند که مطابق نتایج دشتی زاده و همکاران، مقاومت ذاتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در برخی از جدایه‌ها می‌تواند کاملاً ناشی از سیستم‌های افلاکس باشد (۲۷).

P. aeruginosa یک فسفولیپاز C همولیتیک و یک فسفولیپاز غیر همولیتیک (PLC) ترشح می‌کند. مطالعات نشان داده‌اند که PLC غیر همولیتیک هیچ فعالیت بیماری‌زایی ندارد (۲۸). در مطالعه حاضر به بررسی حضور ژن فسفولیپاز C همولیتیک در سویه‌های بالینی *P. aeruginosa* پرداختیم. نتایج به‌دست آمده از تکثیر ژن *plcH* نشان داد که ۹۰ درصد سویه‌ها حامل ژن فسفولیپاز C بودند. در مطالعه انجام شده در عراق فراوانی ژن *plcH* ۴۸ درصد گزارش شده است که نسبت به نتایج ما عدد پایین‌تری است (۲۹). همچنین درصد جدایه‌های ادراری حاوی ژن *plcH* را ۶۶/۷ درصد گزارش کردند. در مطالعه‌ای دیگر، گروهی از محققان دریافتند که درصد جدایه‌های حاوی *P. aeruginosa* دارای ژن *plcH* در نمونه‌های پاکستان ۱۸/۵ درصد بوده است (۳۰). تفاوت در فراوانی ژن *plcH* می‌تواند به دلیل نمونه‌های بالینی متفاوت و تعداد بیماران مورد بررسی و همچنین تفاوت‌های منطقه‌ای باشد. مطالعه انجام شده توسط ساروی در ایران فراوانی ژن مذکور را ۷۸ درصد گزارش کرده است که نشان دهنده درصد بالای این ژن در نمونه‌های ایرانی

References

1. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. 2014;4(January):1–8.
2. Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ, et al. The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Maurice NM, Bedi B, Sadikot RT. TRANSLATIONAL REVIEW *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implications in Lung Infections. 2018;58(4):428–39.
4. Costa E, Matos O De, Andriolo RB, Rodrigues YC, Valéria K, Lima B. Review Article Mortality in patients with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a meta-analysis. 2018;51(4):415–20.
5. Inzana TJ. The many facets of lipooligosaccharide as a virulence factor for *Histophilus somni*. Curr Top Microbiol Immunol [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2024 Apr 14];396:131–48. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/82_2015_5020
6. Behzadi P, Baráth Z, Gajdács M. It's not easy being green: A narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant *pseudomonas aeruginosa*. Antibiotics. 2021;10(1):1–29.
7. Hilmarni. Uji Efek Teratogenik Infusa bunga Lawang (*Illicium verum* Hook.f) Pada Mencit Putih. Akad Farm Pray. 2019;4(1).
8. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. Clin Microbiol Rev. 2019;32(4):1–52.
9. Liao C, Huang X, Wang Q, Yao D, Lu W. Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. 2022;12(July):1–17.
10. Bogiel T, Depka D, Kruszewski S, Rutkowska A, Kanarek P, Rzepka M, et al. Comparison of Virulence-Factor-Encoding Genes and Genotype Distribution amongst Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Strains. 2023;1–13.
11. Jarjees KK. Cellular and Molecular Biology. 2020;(6).
12. Hassuna NA, Mandour SA, Mohamed ES. Virulence Constitution of Multi-Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Upper Egypt Virulence Constitution of Multi-Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Upper Egypt. 2020;
13. Infections A. pathogens Efflux MexAB-Mediated Resistance in *P. aeruginosa* Isolated from Patients with Healthcare. 2020;1–13.
14. Alcalde-rico M, Olivares-pacheco J, Alvarez-ortega C, Olivares-pacheco J. Role of the Multidrug Resistance Efflux Pump MexCD-OprJ in the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Response. 2018;9(November):1–16.

15. Mohamed NA, Alrawy MH, Abdelrahman MM, Gad EM, Shafik NS. Molecular detection of efflux pump and virulence factors genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbes Infect Dis. 2023;4(3):884–93.
16. Horna G, Amaro C, Palacios A, Guerra H, Ruiz J. High frequency of the *exoU*⁺/*exoS*⁺ genotype associated with multidrug-resistant “high-risk clones” of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals. Sci Rep [Internet]. 2019;9(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-47303-4>
17. Sabharwal N, Dhall S, Chhibber S, Harjai K. Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. Int J Mol Epidemiol Genet. 2014;5(3):125–34.
18. Noori HG, Tadjrobehkar O, Moazamian E. The effects of Tomatidine alkaloid on biofilm formation and the expression of quorum sensing associated genes in *Pseudomonas aeruginosa*. 2023;16(2):119–31
19. Vaez H, Salehi-Abargouei A, Ghalehnoo ZR, Khademi F. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Iran: A systematic review and metaanalysis. J Glob Infect Dis. 2018;10(4): 212–7.
20. Peymani A, Farivar TN, Ghanbarlou MM, Najafipour R. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing blaIMP-1 and blaVIM-1 in Qazvin and Alborz educational hospitals, Iran. Iran J Microbiol. 2015;7(6):302–9.
21. Gill J, Arora S, Khanna S, Kumar KVS. Prevalence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from a tertiary level Intensive Care Unit. J Glob Infect Dis. 2016;8(4):155–9.
22. Khan F, Khan A, Kazmi SU. Prevalence and susceptibility pattern of multi drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Karachi. Pakistan J Med Sci. 2014;30(5): 951–4.
23. Suwantararat N, Carroll KC. Epidemiology and molecular characterization of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in Southeast Asia. Antimicrob Resist Infect Control [Internet]. 2016;5 (1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13756-016-0115-6>
24. Aslani MM, Nikbin VS, Sharafi Z, Hashemipour M, Shahcheraghi F, Ebrahimipour GH. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. Iran J Microbiol. 2012;4(3):118–23.
25. Bogiel T, Deptuła A, Kwiecińska-Piróg J, Prazyńska M, Mikucka A, Gospodarek-Komkowska E. The prevalence of *exo* gene in multidrug-sensitive and multidrug-resistant *pseudomonas aeruginosa* clinical strains. Polish J Microbiol. 2017;66 (4):427–31.
26. Rezaei F, Saderi H, Boroumandi S, Faghihzadeh S. c r v i h o e f.

27. Dashtizadeh Y, Moattari A, Gorzin AA. Phenotypic and genetically evaluation of the prevalence of efflux pumps and antibiotic resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* among burned patients admitted to Ghotbodin Shirazi Hospital. J Microb World. 2014;7(2):118–27.
28. Meyers DJ, Berk RS. Characterization of phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* as a potent inflammatory agent. Infect Immun. 1990;58(3):659–66.
29. Hasan KA, Hussein AS, Mohammed TK. Detection of Lasb and Plch Genes in *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated From Urinary Tract Infections by PCR Technique. Ann Rom Soc Cell Biol. 2021;25(6):123–34.
30. Ullah W, Qasim M, Rahman H, Jie Y, Muhammad N. Beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Phenotypic characteristics and molecular identification of virulence genes. J Chinese Med Assoc [Internet]. 2017;80(3):173–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcma.2016.08.011>
31. Saravi NM, Mousavi T. Multidrug-Resistant Virulence Genes in Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Iranian Clinical Samples: A Review-Meta-Analysis. J Maz Univ Med Sci. 2022;32(215):176–88.