

**Investigation of MexAB-OprM Efflux Pump Expression Level in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Patients Hospitalized in Shahid Motahari Hospital in Tehran City using Real-Time PCR method (Iran)**

Mehrzad Sadredinamin<sup>1</sup>, Hossein Goudarzi<sup>2</sup>, Ali Hashemi<sup>2,1\*</sup>, Samira Tarashi<sup>2</sup>, Soroor Erfanimesh<sup>3</sup>, Aref Shariati<sup>2</sup>, Zohreh Ghalavand<sup>2</sup>, Shervin Shokouhi<sup>1</sup>, Saeed Shams<sup>4</sup>, Neda Yousefi Nojookambari<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Infectious Diseases & Tropical Medicine Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>4</sup>Cellular & Molecular Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

\* **Corresponding Author:** Ali Hashemi, Department of Microbiology, Infectious Diseases & Tropical Medicine Research Center, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email: ali.hashemi@sbm.ac.ir

Received: 12 Apr, 2017

Accepted: 13 Jun, 2017

**Abstract**

**Background and Objectives:** Drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains has become a worldwide problem, and efflux pumps are one of the major resistance mechanisms in this bacterium. The aim of this study was to identify the mutation in *mexA* and *mexB* pumps and to investigate the expression level of *mexA* pump in the isolates from burn patients.

**Methods:** This study was conducted as a descriptive study on 100 isolates of *P. aeruginosa* isolated from patients hospitalized in Shahid Motahari Hospital during 2014-2015. Antibiogram tests were performed using disc diffusion (according to CLSI guidelines). The inhibitory effect of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), was assessed by broth microdilution method. Mutation in *mexA* and *mexB* genes, was detected by PCR and sequencing, and the expression level of *mexA* gene, was evaluated by real-time PCR and  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formula.

**Results:** Ninety-five out of 100 isolates of *P. aeruginosa*, were resistant to imipenem. Sixteen isolates had response to the inhibitory effect, and a 4-fold reduction was observed in MIC results at the presence of this inhibitor. In one isolate, glycine was replaced by aspartic acid at position 257 of *mexB* protein sequence, but no change was seen in MexA. All isolates had *mexA* and *mexB* genes. Twenty percent of the isolates showed overexpression in *mexA* gene.

**Conclusion:** According to the results of this study, the antibiotic resistance as a result of overexpression of efflux pump, is of great concern. Hence, infection control by accurate management of drug prescription and identification of resistant isolates, is essential to prevent the spread of resistance.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; Microbial; Real-Time Polymerase Chain Reaction.

## بررسی میزان بیان پمپ ترشحی MexAB-oprM در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جداشده از بیماران بستری در بیمارستان شهید مطهری تهران با استفاده از روش Real- Time PCR

مهرداد صدرالدین‌امین<sup>۱</sup>، حسین گودرزی<sup>۲</sup>، علی هاشمی<sup>۳\*</sup>، سمیرا تراشی<sup>۴</sup>، سرور عرفانی‌منش<sup>۳</sup>، عارف شریعتی<sup>۱</sup>، زهره فلاوند<sup>۱</sup>،  
شروین شکوهی<sup>۱</sup>، سعید شمس<sup>۵</sup>، ندا یوسفی نوجو کامبری<sup>۲</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** مقاومت دارویی در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا، به مشکلی جهانی تبدیل شده و پمپ‌های ترشحی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت در این باکتری است. این مطالعه با هدف شناسایی جهش در پمپ‌های *mexB* و *mexA* و بررسی میزان بیان پمپ *mexA* در ایزوله‌های بالینی جداشده از بیماران سوختگی انجام گرفت.

**روش بررسی:** این مطالعه به صورت توصیفی بر روی ۱۰۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا جداشده از بیماران بستری در بیمارستان شهید مطهری تهران طی سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۳ انجام شد. تست‌های آنتی‌بیوگرام با استفاده از دیسک دیفیوژن (براساس رهنمودهای CLSI) صورت گرفت. اثر مهارکننده کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون (CCCP) به روش میکرودايلوشن برات بررسی شد. جهش در ژن‌های *mexA* و *mexB* با تکنیک PCR Sequencing و بیان پمپ *mexA* با تکنیک Real-time RT-PCR و فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  سنجیده شد.

**یافته‌ها:** از مجموع ۱۰۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا، ۹۵ سویه به ایمنی‌پنم مقاوم بود. ۱۶ سویه به اثر مهارکننده پاسخ داد و در نتایج MIC به همراه این مهارکننده، کاهش ۴ برابری مشاهده گردید. در یک ایزوله، موقعیت ۲۵۷ توالی پروتئینی *mexB* گلايسين، به اسید آسپارتیک تبدیل شد، ولی تغییری در MexA مشاهده نشد. ۲۰٪ سویه‌ها، افزایش بیان در پمپ *mexA* داشتند.

**نتیجه‌گیری:** طبق نتایج این مطالعه، مقاومت در نتیجه افزایش بیان پمپ ترشحی، بسیار نگران‌کننده است. از این رو کنترل عفونت جهت جلوگیری از گسترش مقاومت، با مدیریت دقیق تجویز دارو و شناسایی ایزوله‌های مقاوم ضروری است.

**کلید واژه‌ها:** سودوموناس آئروژینوزا؛ مقاومت دارویی میکروبی؛ زمان واقعی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

<sup>۱</sup>مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

<sup>۲</sup>گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

<sup>۳</sup>گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

<sup>۴</sup>مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات:

علی هاشمی، گروه میکروبی‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

ali.hashemi@sbm.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۵

تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۳

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Sadredinamin M, Goudarzi H, Hashemi A, Tarashi S, Erfanimanesh S, Shariati A, et al. Investigation of MexAB-OprM efflux pump expression level in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients hospitalized in Shahid Motahari Hospital in Tehran city using Real-Time PCR method (Iran). Qom Univ Med Sci J 2018;11(10):88-97. [Full Text in Persian]

## مقدمه

سوختگی یکی از رایج‌ترین و مخرب‌ترین اشکال تروما بوده که برای به حداقل رساندن مرگ‌ومیر در این بیماران، نیاز به مراقبت‌های فوری و تخصصی می‌باشد. این مراقبت‌ها هزینه‌های چشمگیری را به سیستم بهداشت و درمان در سراسر جهان متحمل کرده است. سطح زخم‌های سوختگی محیطی سرشار از پروتئین است که شامل بافت نکروزه شده فاقد عروق بوده و محیطی بسیار مناسب برای کلونیزاسیون و تکثیر باکتری‌ها فراهم می‌کند (۲،۱). بیماران سوختگی به دلیل آسیب‌های پوستی و کاهش ایمنی، در معرض خطر بالای اکتساب عفونت‌های فرصت‌طلب از جمله سودوموناس آئروژینوزا قرار دارند (۳)؛ که در نتیجه، درمان این بیماران بسیار مشکل خواهد بود و میزان مرگ‌ومیر آنها به بالای ۵۰-۴۰٪ می‌رسد (۴). سودوموناس آئروژینوزا یکی از اصلی‌ترین عوامل ایجاد سپتی‌سمی، عفونت مجاری ادراری، اندوکاردیت، عفونت پوست، چشم و گوش در بیماران سوختگی بستری در بیمارستان‌ها می‌باشد (۵،۶). از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت در باکتری‌ها می‌توان به بتالاکتامازها، پمپ‌های ترشحی و پورین‌های غشای خارجی اشاره کرد (۷،۸). این ارگانیزم مقاومت ذاتی و اکتسابی بالایی نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها دارد. مقاومت ذاتی ناشی از چندین مکانیسم از جمله نفوذپذیری پایین غشای خارجی، تولید بتالاکتامازها و فعالیت انواع پمپ‌های ترشحی می‌باشد و باعث مقاومت ایزوله‌ها به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود که با تشخیص مناسب نوع مکانیسم مقاومت می‌توان از گسترش سویه‌های مقاوم به دیگر بیماران جلوگیری کرد (۱۱-۹). در میان پمپ‌های ترشحی، *mexAB-OprM* در ایجاد مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌ویژه کارباپنم‌ها نقش مهمی دارد (۱۲،۱۳). ساختمان *mexAB-OprM* شامل سه جزء *mexA*، *mexB* متصل‌شونده به لیوپروتئین و *OprM* در قسمت غشای خارجی می‌باشد (۱۴). برای مهار پمپ‌های ترشحی در آزمایشگاه از ترکیبات مهارکننده‌ها استفاده می‌کنند. یکی از مهم‌ترین مهارکننده‌ها، کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون (CCCP) است (۱۵،۱۶). این مطالعه با هدف بررسی اثر مهارکننده کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون (CCCP)، شناسایی جهش در پمپ‌های *mexA* و *mexB* و بررسی میزان بیان پمپ *mexA*

میان سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سوختگی انجام گرفت.

## روش بررسی

این مطالعه به روش توصیفی بر روی تعداد ۱۰۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سوختگی بستری در بیمارستان شهید مطهری طی سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۳ انجام شد. تست‌های تأییدی شامل: تست اکسیداز، تست حرکت، رشد در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد، تست متیل‌رد و وگس - پروسکوئر (VP-MR) بود (۱۷). تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (کربی بائر) براساس رهنمودهای CLSI صورت گرفت. دیسک‌های مورد بررسی شامل: سفیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، آزترونام (۳۰ میکروگرم)، ایمپنم (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، تیکارسیلین (۷۵ میکروگرم)، پیراسیلین (۱۰۰ میکروگرم)، پیراسیلین/تازوباکتام (۱۰۰/۱۰ میکروگرم)، دورینم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) و کلیستین (۱۰ میکروگرم) از شرکت Mast انگلستان بود (۱۸).

حساسیت ۱۰۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا براساس حداقل غلظت مهارکننده از رشد (MIC) با استفاده از روش میکروداپلوشن براث برای تعیین حساسیت نسبت به مهارکننده CCCP تعیین گردید. در این مطالعه، از سیپروفلوکساسین به‌تنهایی و سیپروفلوکساسین به همراه رقت نهایی ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر CCCP استفاده شد. از سویه‌های استاندارد PAO1 و ATCC27853 سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان سویه‌های کنترل استفاده گردید (۱۹). استخراج DNA با استفاده از کیت شرکت GeNet (Cat. No. K-3000) انجام شد. برای بررسی DNA استخراج شده از لحاظ کمی، تمامی نمونه‌ها به‌وسیله دستگاه نانودراپ (WPA Biowave II Nanospectrophotometer) در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ bp بررسی شدند.

PCR برای ژن‌های *mexA* و *mexB* با استفاده از Master Mix 2x شرکت سیناکلون (CAT. NO: PR901638) شامل ۰/۴ میلی‌مول از هر dNTP، ۳ میلی‌مول از  $MgCl_2$ ، ۰/۰۸ واحد از آنزیم Taq

پرایمرهای مورد استفاده با غلظت ۱۰ پیکومول بود که توالی پرایمرها برای *mexA-F*، *mexA-R* و CGACCAGGCCGTGAGCAAGCAGC با طول موج ۳۱۶bp (۲۰) و پرایمرهای ژن خانه‌دار *rpsL-F* و TCCTTTACACGACCGCCAC با طول موج ۱۹۴bp (طراحی شده در این مطالعه) بود.

برنامه دمایی مورد استفاده برای RT-CR بدین ترتیب بود: Initial denaturation (۵ دقیقه، ۹۴ درجه سانتیگراد)، Denaturation (۴۵ ثانیه، ۹۴ درجه سانتیگراد)، Annealing (۴۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد)، Extention (۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد)، Final extention (۵ دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد)، که برای ۳۶ چرخه انجام گرفت.

برای بررسی میزان بیان ژن *mexA* و ژن خانه‌دار *RpsL* از شرکت Power SYBR Green PCR Master Mix (CatNO.4367659, Invitrogen Co, USA) استفاده شد.

توالی پرایمرهای مورد استفاده برای *mexA-F* و *mexA-R* و CGACCAGGCCGTGAGCAAGCAGC با طول موج ۳۱۶bp و پرایمرهای ژن خانه‌دار *rpsL-F* و TCCTTTACACGACCGCCAC

CAAAACTGCCCGCAACGTC با طول موج ۱۹۴bp بود. میکروتیوب‌ها در دستگاه RotorGene6000 متعلق به شرکت Corbette Rsearch قرار گرفتند، و برای تشخیص سیگنال منشره از کانال ۴۷۰-۵۸۵ نانومتر این دستگاه استفاده شد. سویه سودوموناس آئروژینوزا PAO1 نیز به‌عنوان کنترل مثبت و منفی تیوبی به کار برده شد که حاوی همه مواد موجود در واکنش بجز cDNA بود و به جای cDNA، DEPC افزوده شد که با برنامه دمایی Initial denaturation (۱۰ دقیقه، ۹۴ درجه سانتیگراد)، Denaturation (۶۰ ثانیه، ۹۴ درجه سانتیگراد)، Annealing (۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد)، Extention (۱۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد)، Final extention (۵ دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد) برای ۴۰ چرخه با دمای ذوب ۹۵-۷۲ درجه سانتیگراد اجرا شد و برای

پلیمرز انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای *mexA-F* CGACCAGGCCGTGAGCAAGCAGC و *mexA-R* GGAGACCTTCGCCGCGTTGTCGC با طول موج ۳۱۶bp (۲۰) و پرایمرهای *mexB-F* و *mexB-R* CAAGGGCGTCCGGTACTTCCAG و ACCTGGGAACCGTCCGGGATTGA با طول موج ۲۷۳bp (۲۱) می‌باشد. توالی پرایمرها با اطلاعات توالی نوکلئوتیدی موجود در Gene Bank (سیستم blast) چک گردید و در نهایت، PCR طبق برنامه دمایی Initial Denaturation (۵ دقیقه، ۹۴ درجه سانتیگراد) شامل یک سیکل، Denaturation (۴۵ ثانیه، ۹۴ درجه سانتیگراد)، Annealing (۴۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد)، Extension (۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد) برای ۳۶ سیکل و Final extension (۵ دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد) یک سیکل که در دستگاه ترموسایکلر تنظیم شده بود، انجام گرفت. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ با بافر TBE (Tris-Borate EDTA) الکتروفورز شده و ژل حاصل با اتیدیوم بروماید ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر رنگ شد و در نهایت، نتایج با دستگاه Gel Doc مقایسه با مارکر مولکولی، کنترل منفی و مثبت بررسی گردید.

پس از انجام PCR، جهت تعیین توالی ژن *mexA* و *mexB* محصولات PCR به شرکت Bioneer (کشور کره جنوبی) ارسال شد و نتایج با استفاده از نرم‌افزار Chromas 1.45 و Blast در NCBI مورد بررسی قرار گرفت. استخراج RNA با استفاده از کیت RNX (شرکت سیناژن CAT. NO.:RN7713c) انجام گرفت. برای بررسی RNA استخراج شده از لحاظ کمی، تمامی نمونه‌ها به وسیله دستگاه نانودراپ (WPA Biowave II Nanospectrophotometer) از لحاظ مقدار و نسبت ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۳۰/۲۶۰ بررسی شدند. برای تیمار RNA استخراج شده، از آنزیم DNase (شرکت Fermentase) استفاده گردید، سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت تاکارا (Cat.#RRO37Q) انجام شد.

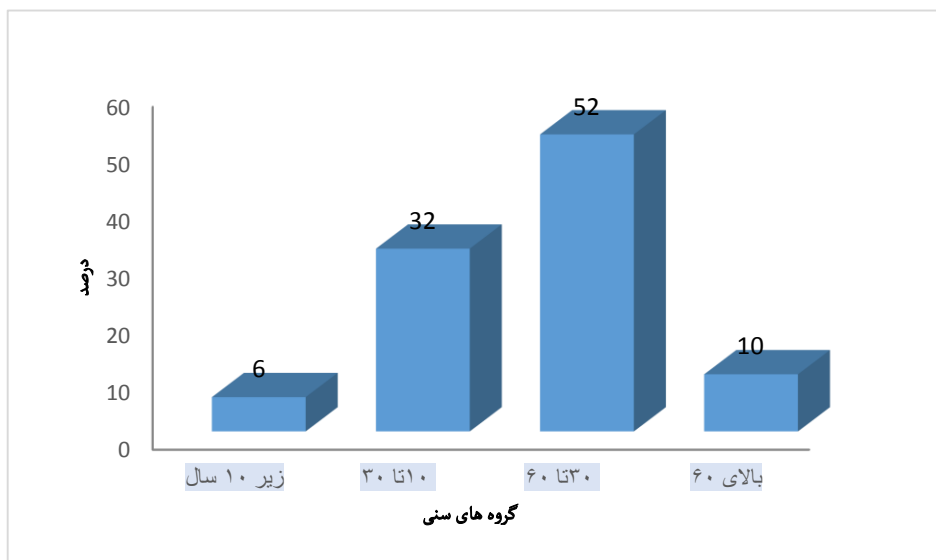
برای انجام RT-CR، از MasterMix2x (شرکت سیناکلون) استفاده گردید؛ بدین ترتیب که ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکرولیتر پرایمر Forward، ۱ میکرولیتر پرایمر Reverse، ۲ میکرولیتر از cDNA و ۶/۵ میکرولیتر آب تزریقی اضافه شد.

آنالیز نتایج از روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  استفاده گردید.

### یافته‌ها

در این مطالعه، از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی در بیماران سوختگی، ۷۴ نمونه متعلق به مردان و ۲۶ نمونه متعلق به زنان بود. در نمودار شماره ۱، فراوانی باکتری سودوموناس آئروژینوزا در گروه‌های مختلف سنی در بین بیماران سوختگی نشان داده شده است.

نتایج با استفاده از نرم‌افزار Minitab13، آزمون آماری تی تست و Pearson تحلیل شدند. سطح معنی‌داری،  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.



نمودار شماره ۱: فراوانی باکتری سودوموناس آئروژینوزا در گروه‌های مختلف سنی در بین بیماران سوختگی.

نتایج دیسک دیفیوژن مقاومت بالایی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: نتایج دیسک دیفیوژن

آنتی‌بیوتیک‌ها	مقاوم	نیمه‌حساس	حساس
آمیکاسین	۹۱(٪۹۱)	۴(٪۴)	۵(٪۵)
آزترونام	۹۰(٪۹۰)	۷(٪۷)	۳(٪۳)
سفتازیدیم	۷۵(٪۷۵)	۹(٪۹)	۱۶(٪۱۶)
سفپیم	۹۳(٪۹۳)	۳(٪۳)	۴(٪۴)
سیپروفلوکساسین	۹۴(٪۹۴)	۲(٪۲)	۴(٪۴)
کلیستین	۰(٪۰)	۰(٪۰)	۱۰۰(٪۱۰۰)
دورینم	۹۴(٪۹۴)	۰(٪۰)	۶(٪۶)
جتنامیسین	۹۵(٪۹۵)	۰(٪۰)	۵(٪۵)
ایمی‌پنم	۹۵(٪۹۵)	۱(٪۱)	۴(٪۴)
مروپنم	۹۵(٪۹۵)	۵(٪۵)	۰(٪۰)
پپراسیلین (۱۰۰ میکروگرم)	۹۰(٪۹۰)	۳(٪۳)	۷(٪۷)
پپراسیلین / تازوباکتام (۱۰ / ۱۰۰ میکروگرم)	۸۲(٪۸۲)	۱۰(٪۱۰)	۸(٪۸)
تیکارسیلین (۷۵ میکروگرم)	۹۸(٪۹۸)	۱(٪۱)	۱(٪۱)

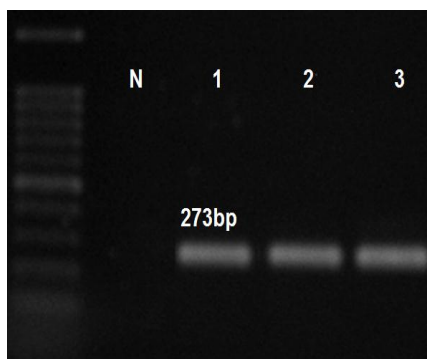
برابری نسبت به نتایج تست MIC بدون مهارکننده را نشان داد (جدول شماره ۲).

از مجموع ۱۰۰ ایزوله مورد بررسی، تنها ۱۶٪ ایزوله‌ها به مهارکننده کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون حساسیت نشان دادند و نتایج تست MIC آنها به همراه مهارکننده، کاهش چهار

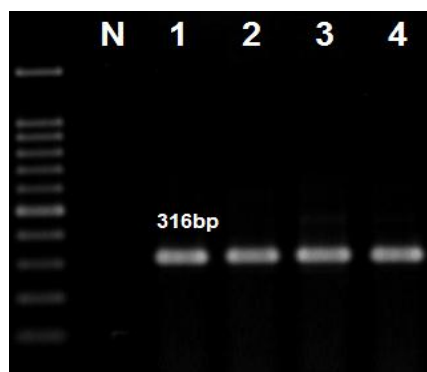
جدول شماره ۲: اثر مهارکننده کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون (CCCP) روی MIC سیروفلوکساسین در ۱۰۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا

میزان کاهش چند برابری MIC سیروفلوکساسین همراه با CCCP	تعداد ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا
۰	۴۵
۲	۳۹
۴	۵
۸	۶
۱۶	۳
۳۲	۲

پمپ *mexA* و *mexB* در تمام ۱۰۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی مشاهده شد. نتایج الکتروفورز محصولات PCR چند نمونه مورد مطالعه در شکل‌های شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است.



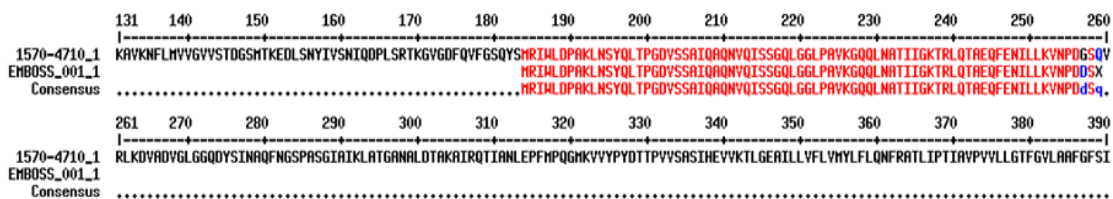
شکل شماره ۱: (N) کنترل منفی، (۱) کنترل مثبت (*P.aeruginosa* PAO1)، (۲ و ۳) نمونه‌ها.



شکل شماره ۲: (N) کنترل منفی، (۱) کنترل مثبت (*P.aeruginosa* PAO1)، (۲ و ۳) نمونه‌ها.

شده است (شکل شماره ۳)، در پمپ *mexA* یک ایزوله نیز تغییر تیروزین به سیتوزین در موقعیت ۷۲۹ مشاهده گردید، ولی هیچ تغییری در توالی پروتئینی آن دیده نشد (شکل شماره ۴).

توالی نوکلئوتیدی پمپ *mexB* در یک نمونه مقاوم، تغییر گوانین به آدنین را در موقعیت ۷۷۰ نشان می‌دهد که باعث تبدیل گلايسين به اسيدآسپارتیک در موقعیت ۲۵۷ توالی پروتئینی آن



شکل شماره ۳: هم‌ترادفی کردن توالی‌های پروتئینی برای پمپ MexB.

1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
472024-473175_1 MQRTPAMRVLVPALLVAISALSGCGKSEAPPAQTPQVGVITLQAQTVTLNTELPGRTHAFRTAEVYRQVNGIILKRLFKEGSDVKAGQQLYQIDPATYEAQYQSAQANLASTQEQAQRKLLVADQAVS													
Consensus													
131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
472024-473175_1 KQQYADANAAYLQSKAAVEQARINLRYTKVLSPTSGRTGSRVYTEGALVYNGQANAHATVQQLDPTVYVDVYQTPSTALLRLRRELASQGLERAGDNRKVSLSKLEDSGQVPLEGRLEFSEVSDVEGTGSVT VSLSKLEDSGQVPLEGRLEFSEVSDVEGTGSVT VSLSKLEDSGQVPLEGRLEFSEVSDVEGTGSVT													
Consensus													
261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	383
472024-473175_1 IRAYVFPNPNELLPGHFVHAQLQEGVYKQKAILAPQGVYTRDLKGAOTALVYNQAKVELRYIKADRYIGDKMLYTEGLNAGOKITTEGLQFVQPGVEVKTVPKKNVSAQKADAPAKTDSKG IRAYVFPNPNELLPGHFVHAQLQE IRAYVFPNPNELLPGHFVHAQLQE													
Consensus													

شکل شماره ۴: هم‌ترادفی کردن توالی‌های پروتئینی برای پمپ MexA.

در مطالعه‌ای که توسط سلیمی در کشور انجام گرفت، بیشترین مقاومت نسبت به تیکارسلین (۹۹٪)، ایمپنم، مروپنم و آزترونام (۹۶٪) گزارش شد (۲۳). در مطالعه‌ای دیگر در کشور هند توسط Arunava و همکاران، بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین (۱۰۰٪)، سفنازیدیم (۸۱/۱٪)، آمیکاسین و سیپروفلوکسازین (۷۲/۷٪) گزارش شد. در این بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ایمپنم برابر با ۲۲/۴٪ و آنتی‌بیوتیک‌های کلیستین و پلی‌میکسین B با ۱۰۰٪ حساسیت، به‌عنوان بهترین آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا شناخته شدند (۲۴). مقایسه میزان مقاومت در دو پژوهش نشان می‌دهد آنتی‌بیوتیک کلیستین به‌عنوان بهترین آنتی‌بیوتیک جهت درمان عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا در هر دو مطالعه مطرح است. با این وجود، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در دو مطالعه مذکور به‌طور کامل با نتایج مطالعه حاضر مطابقت ندارد که می‌تواند با عواملی همچون منطقه جغرافیایی مورد بررسی، همچنین رژیم درمانی خاصی که در این مرکز برای درمان عفونت‌های سودوموناسی استفاده شده، مرتبط باشد. یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت، پمپ‌های ترشحی است. دانشمندان در اوایل دهه سال ۱۹۹۰ دریافتند *mexAB-oprM* از جمله افلاکس پمپ‌هایی است که در ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌ویژه کارباپنم‌ها نقش دارد (۲۵). در مطالعه حاضر، همه ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا دارای پمپ‌های ترشحی *mexAB* بودند. در مطالعه‌ای که خسروی و همکاران در شهر اهواز انجام دادند همه ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا دارای پمپ‌های ترشحی *mexAB* بودند (۲۶). در این مطالعه، ۶ ایزوله مقاوم به آنتی‌بیوتیک، برای بررسی جهش‌ها احتمالی در پمپ‌های ترشحی *mexAB* ارسال گردید و تنها یک نمونه،

در مطالعه‌ای نشان داده شد سویه‌های با افزایش بیان ۳ برابری نسبت به سویه استاندارد، مثبت و سویه‌های با بیان ۲ برابری یا کمتر، منفی در نظر گرفته می‌شوند، همچنین سویه‌های با افزایش ۲-۳ برابری را بوردرلاین می‌نامند. بر این اساس، در این مطالعه میزان بیان این پمپ در سویه‌های که به‌صورت فنوتیپی دارای مقاومت ناشی از پمپ‌های ترشحی بودند (با استفاده از CCCP)، در محدوده ۵۴/۹-۰/۰۰۷ متغیر بود و به‌طور میانگین افزایش بیان ۱۰/۹۳ برابری نسبت به سویه استاندارد *P. auroginosa* PAO1 وجود داشت. در این مطالعه، بیان این پمپ در ۵ سویه مقاوم به سیپروفلوکسازین شناسایی شده به‌صورت فنوتیپی با استفاده از CCCP، افزایش داشت و سایر سویه‌ها افزایش بیان در این پمپ را نشان ندادند.

## بحث

در مطالعه حاضر، بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به روش دیسک دیفیوژن نشان داد بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تیکارسلین (۹۸٪)، ایمپنم، مروپنم، جنتامایسین (۹۵٪)، دورپنم و سیپروفلوکسازین (۹۴٪) بوده و بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت به‌علت مصرف غیراستاندارد آنتی‌بیوتیک‌ها، سویه‌های مقاوم نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها (MDR) گسترش یافته‌اند. در این بررسی از مجموع ۱۰۰ نمونه مربوط به بیماران بستری در بخش سوختگی، هیچ‌گونه مقاومتی به کلیستین مشاهده نشد. اما از آنجا که کلیستین دارای عوارض زیادی برای بیماران است، زمانی باید از این آنتی‌بیوتیک برای بیماران با عفونت ناشی از سودوموناس آئروژینوزا استفاده شود که این سویه‌ها به بقیه آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم باشند (۲۲).

نتایج این بررسی‌ها نشان می‌دهد یکی از مکانیسم‌های مهم در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، افزایش بیان پمپ ترشحی *mexAB-oprM* می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، مقاومت ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله کاربابنم‌ها، بالا گزارش شد که یکی از علل اصلی مقاومت در ایزوله‌ها، بیان بالای پمپ ترشحی *mexAB-oprM* بود. با توجه به این نتایج، مقاومت در نتیجه افزایش بیان پمپ ترشحی بسیار نگران‌کننده است؛ از این رو، کنترل عفونت جهت جلوگیری از گسترش مقاومت، با مدیریت دقیق تجویز دارو و شناسایی ایزوله‌های مقاوم، ضروری به نظر است.

### تشکر و قدردانی

مقاله حاضر حاصل اجرای طرح تحقیقاتی مصوب در مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (با کد ثبت ۹۳۶۹ و کد اخلاقی IR.SBMU.RETECH.REC.1396.85) می‌باشد.

باعث تبدیل گلايسين به اسيد آسپارتیک در موقعیت ۲۵۷ توالی پروتئینی در پمپ *mexB* شده بود. در مطالعات متعددی نشان داده شده است از علل افزایش بیان پمپ‌های ترشحی *mexAB-oprM* جهش در ژن‌های *mexR* و *mexZ* *nalC* می‌باشد (۲۷، ۲۸). در مطالعه حاضر برای تعیین نقش پمپ *mexAB-oprM* در مقاومت به کاربابنم‌ها و میزان بیان آن، از تکنیک Real-Time RT-PCR استفاده شد که نتایج نشان داد به‌طور میانگین، افزایش بیان ۱۰/۹۳ برابری نسبت به سویه استاندارد *P.aeruginosa* PAO1 وجود دارد. در مطالعه‌ای دیگر توسط Khuntayaporn و همکاران در تایلند، افزایش بیان پمپ *mexAB-oprM* در ۹۲/۰۶٪ از ایزوله‌ها دیده شد (۲۹). در نتایج مطالعه Rodríguez-Martínez و همکاران در فرانسه نیز افزایش بیان افلاکس پمپ *mexAB-oprM* در ۲۸٪ از سویه‌ها مشاهده گردید (۳۰). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Vincent و همکاران در هوستن بر روی ۲۱ سویه مقاوم به کاربابنم صورت گرفت، ۶ سویه (۲۸/۶٪) دارای افزایش بیان در افلاکس پمپ *mexAB-oprM* بودند (۳۱).

### References:

- Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. Clin Microbiol Rev 2006;19(2):403-34.
- Gholipourmalekabadi M, Sameni M, Hashemi A, Zamani F, Rostami A, Mozafari M. Silver-and fluoride-containing mesoporous bioactive glasses versus commonly used antibiotics: Activity against multidrug-resistant bacterial strains isolated from patients with burns. Burns 2016;42(1):131-40.
- Hallajzadeh M, Hashemi A, Goudarzi H, Tarhani M, Bazmi F, Sattarzadeh Tabrizi M, et al. Detection of Ambler class A, B and D  $\beta$ -lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from burn patients. Ann Burns Fire Disasters 2014;27(1):8-13.
- Estahbanati HK, Kashani PP, Ghanaatpisheh F. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. Burns 2002;28(4):340-8.
- Jafari M, Fallah F, Borhan RS, Navidinia M, Karimi A, Tabatabaei SR, et al. The first report of CMY, aac (6')-Ib and 16S rRNA methylase genes among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Iran. Arch Pediatr Infect Dis 2013;1(3):109-12. [Full Text in Persian]
- Ghazi M, Isadyar M, Gachkar L, Mahmoudi S, Goudarzi H, Eslami G, et al. Serum levels of mannose-binding lectin and the risk of infection in pediatric oncology patients with chemotherapy. J Pediatr Hematol Oncol 2012;34(2):128-30.



7. Hashemi A, Fallah F, Taherpour A, Goudarzi H, Tarashi S, Erfanimesh S, et al. Detection of metallo-beta-lactamases, extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), outer membrane porins among klebsiella pneumoniae strains isolated from hospitalized patients in Tehran. J Zanjan Univ Med Sci 2015;23(98):89-102. [Full Text in Persian]
8. Fallah F, Taherpour A, Vala MH, Hashemi A. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1). Arch Clin Infect Dis 2012;6(4):171-7.
9. Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. Resistance mechanisms of multiresistant Pseudomonas aeruginosa strains from Germany and correlation with hypermutation. Antimicrob Agents Chemother 2007;51(11):4062-70.
10. Lamarche MG, Déziel E. MexEF-OprN efflux pump exports the Pseudomonas quinolone signal (PQS) precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). PLoS One 2011;6(9):e24310.
11. Fallah F, Borhan RS, Hashemi A. Detection of bla (IMP) and bla (VIM) metallo-β-lactamases genes among Pseudomonas aeruginosa strains. Int J Burns Trauma 2013;3(2):122–24.
12. Yi M, Wang P, Liu Y. Molecular typing and resistance mechanisms of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Chinese surgical intensive care unit Chin Med J (Engl) 2014;127(6):1071-6.
13. Roodsari MR, Fallah F, Taherpour A, Vala MH, Hashemi A. Carbapenem-resistant bacteria and laboratory detection methods. Expert Rev Anti Infect Ther 2016;14(8):705-17.
14. Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2006;50(5):1633–41.
15. Gholami M, Hashemi A, Hakemi-Vala M, Goudarzi H, Hallajzadeh M. Efflux Pump inhibitor Phenylalanine-arginine B-naphthylamide effect on the minimum inhibitory concentration of imipenem in acinetobacter baumannii strains isolated from hospitalized patients in shahid motahari burn hospital, Tehran, Iran. Jundishapur J Microbiol 2015;8(10):e19048.
16. Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. Virulence 2013;4(3):223-9.
17. Forbes B, Sahm D, Weissfeld AS. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 12<sup>th</sup> ed. London: Mosby; 2007. p. 345.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement; 2012.
19. Adabi M, Talebi-Taher M, Arbabi L, Afshar M, Fathizadeh S, Minaeian S, et al. Spread of efflux pump overexpressing-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by using an efflux pump inhibitor. Infect Chemother 2015;47(2):98-104.
20. Ozer B, Duran N, Onlen Y, Savas L. Efflux pump genes and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lower respiratory tract infections acquired in an intensive care unit. J Antibiot (Tokyo) 2012;65(1):9-13.
21. Moyá B, Beceiro A, Cabot G, Juan C, Zamorano L, Alberti S, et al. Pan-β-lactam Resistance Development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: Molecular Mechanisms, PBPs Profiles and Binding Affinities. Antimicrob Agents Chemother 2012;56(9):4771-8.
22. Goverman J, Weber JM, Keaney TJ, Sheridan RL. Intravenous colistin for the treatment of multi-drug resistant, gram-negative infection in the pediatric burn population. J Burn Care Res 2007;28(3):421-6.
23. Salimi F, Eftekhari F. Prevalence of blaIMP and blaVIM gene carriage in metallo-β-lactamase-producing burn isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Tehran. Turk J Med Sci 2014;44(3):511-4.

24. Kali A, Srirangaraj S, Kumar S, Divya HA, Kalyani A, Umadevi S. Detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Australas Med J* 2013;6(12):686–93.
25. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002;34(5):634-40.
26. Khosravi AD, Mohammadian A. Efflux mexab-mediated resistance in multidrug and pan-drug resistant strains of *pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with burn and wound infections. *Jundishapur J Nat Pharm Products* 2016;11(1):1-6.
27. Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plésiat P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(5):1797–802.
28. Choudhury D, Ghosh A, Chanda DD, Talukdar AD, Choudhury MD, Paul D, et al. Premature Termination of MexR leads to overexpression of MexAB-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary referral hospital in India. *PLoS One* 2016;11(2):e0149156.
29. Khuntayaporn P, Montakantikul P, Santanirand P, Kiratisin P, Chomnawang MT. Molecular investigation of carbapenem resistance among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated clinically in Thailand. *Microbiol Immunol* 2013;57(3):170-8.
30. Rodríguez-Martínez J-M, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(11):4783-8.
31. Tam VH, Chang KT, LaRocco MT, Schilling AN, McCauley SK, Poole K, et al. Prevalence, mechanisms, and risk factors of carbapenem resistance in bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58(3):309-14.