Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 13, Number 2 (May - June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Investigation of MexAB-OprM efflux pump gene expression in clinical isolates of *pseudomonas aeruginosa* isolated from Intensive Care Unit

Masomeh Beig[1], Mohammad Reza Arabestani[2*]

1- *Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*
2- *Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*

Article Information

Article Subject:
Molecular Microbiology

DOI:

Corresponding author:

Mohammad Reza Arabestani,
Brucellosis Research Center,
Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Email:
mohammad.arabestani@gmail.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important pathogens of nosocomial infections, especially in the ICU (Intensive Care Unit), which has resistance to a wide range of antibiotics, especially Carbapenems. Among the most important resistance mechanisms of this bacteria against carbapenems are MexAB-OprM efflux pump. Therefore, the aim of this study was to evaluate the gene expression of MexAB-OprM efflux pump in clinical isolates of *P. aeruginosa* that isolated from ICU.

Materials and Methods: A total of 33 sampales were isolated from patient in ICU units from different Hamadan hospitals, since november 2018 to May 2019. Antibiotic susceptibility testing was performed using disk diffusion and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) methods by Etest for imipenem. Expression levels of MexAB-OprM efflux pump genes were measured by Real-Time PCR.

Results: The results of statistical analysis showed that the highest resistance was to Ceftriaxone 21 (63.63%) and the lowest resistance was to piperacillin, 11 (33.33%). The results of the MIC of imipenem showed that among off 33 samples isolated from the ICU, 14 (42.42%) and 19 (57.57%) isolates were resistant and susceptible, respectively. Increased expression of of *MexA, MexB and OprM* genes compared with control strain were observed in 20% (4/20), 25% (5/20) and 20% (4/20) of isolates, respectively.

Conclusion: Increased expression of MexAB-OprM efflux pump is one of the most common mechanisms in the resistance of *P. aeruginosa* isolates against Carbapenem antibiotics in different units of hospitals especially intensive care unit. So identification of resistance mechanisms to Carbapenem antibiotics can be useful in controlling and treating such resistant isolates.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Real-TimePCR, PCR, MexAB-OprM

Received: 2019/05/25 Accepted: 2019/08/23 Available online: 2019/08/23

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

How to cite this article:

Beig M, Arabestani M R. Investigation of MexAB-OprM efflux pump gene expression in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa isolated from Intensive Care Unit. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (2) :142-150

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ ـ شماره ۲ ـ خرداد و تیر ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی سطح بیان افلاکس پمپ MexAB-OprM در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه

معصومه بیگ[۱]، محمد رضا عربستانی*[۱،۲]

۱. گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۲. مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۰۴

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۱

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۰۶/۰۱

موضوع:

میکروب‌شناسی مولکولی

IJMM1398;13(2): 142-150

نویسندهٔ مسئول:

محمد رضا عربستانی

گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

پست الکترونیک:

mohammad.arabestani@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: *سودوموناس آئروژینوزا* از جمله عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی به ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) است که مقاوم به طیف گسترده‌ای از آنتی بیوتیک ها به خصوص کارباپنم ها است. از جمله مکانیسم‌های مقاومت به کارباپنم‌ها افلاکس پمپ MexAB-OprM است. لذا هدف از این مطالعه ارزیابی سطح بیان ژن‌های افلاکس پمپ MexAB-OprM در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بخش ICU بود.

مواد و روش‌کار: ۳۳ ایزوله بالینی از بیماران بستری در بخش ICU از بیمارستان‌های آموزشی همدان در طی سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۷ جمع آوری شدند. آزمون تست حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌ها به روش دیسک دیفیوژن و تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) برای ایمی‌پنم به روش Etest انجام شد. سطح بیان ژن‌های افلاکس پمپ MexAB-OprM توسط Real-Time PCR اندازه گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بالاترین میزان مقاومت در برابر سفتریاکسون ۲۱ (۶۳/۶۳٪) و کمترین مقاومت در برابر پیپراسیلین ۱۱ (۳۳/۳۳٪) بود. حداقل غلظت مهارکنندگی ایمی‌پنم نشان داد که از میان ۳۳ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* ایزوله شده از بخش ICU، ۱۴ (۴۲/۴۲٪) و ۱۹ (۵۷/۵۷٪) ایزوله به ترتیب MIC مقاوم و حساس را نشان دادند. افزایش بیان ژن‌های *MexA*، *MexB*، *OprM* در مقایسه با سویه کنترل به ترتیب در ۲۰٪ (۴/۲۰)، ۲۵٪ (۵/۲۰) و ۲۰٪ (۴/۲۰) از ایزوله‌ها مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: افزایش بیان ژن‌های افلاکس پمپ MexAB-OprM از جمله مکانیسم‌های شایع در مقاومت ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم در بخش‌های مختلف بیمارستان به ویژه مراقبت‌های ویژه می‌باشد. لذا شناسایی مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم می‌تواند در کنترل و درمان چنین سویه‌های مقاومی مفید باشد.

کلمات کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*, Real-TimePCR, PCR, MexAB-OprM

کپی‌رایت © مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی و پاتوژن فرصت‌طلب است که در سال‌های اخیر به عنوان یکی از مهمترین پاتوژن‌های عفونت‌های بیمارستان شناخته شده است. این باکتری توانائی ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله عفونت‌های مجاری ادراری، سیستم تنفسی، پوست، عفونت بافت‌های نرم، باکتریمی، عفونت‌های سیستمیک و همچنین عفونت‌های کشنده در افراد مبتلا به ضعف سیستم ایمنی و افراد سرطانی دارد (۱). این باکتری دومین عامل شایع و عامل ۲۱٪ عفونت‌های بیمارستانی به ویژه عفونت در بخش مراقبت‌های ویژه است. از جمله فاکتورهای خطر مهم در این بخش‌ها برای ابتلاء به عفونت، نامساعد بودن شرایط بیماران، بستری شدن طولانی مدت و استفاده از وسایل پزشکی از جمله کتترها و مصرف آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف در بیماران بستری در این بخش‌ها می‌باشد (۴-۲). بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بخش‌های مختلف بیمارستان به ویژه ICU مشکلات زیادی را برای درمان عفونت‌های باکتریائی ایجاد کرده است. اگر چه کرباپنم‌ها از جمله آنتی بیوتیک‌های مؤثر برای درمان عفونت‌های *سودوموناس آئروژینوزا* هستند، مقاومت به کرباپنم‌ها به ویژه در بخش ICU به یک نگرانی در سراسر جهان تبدیل شده است که موجب افزایش میزان مرگ

و میر در این بخش می‌شود (۵). به طور کلی مقاومت *سودوموناس آئروژینوزا* به آنتی‌بیوتیک‌های گروه کارباپنم به علت ترکیبی از چندین عامل از جمله نفوذپذیری پایین پورین‌های غشا خارجی (OprD)، وجود AmpC کروموزومی، حضورآنزیم‌های هیدرولیز کننده کارباپنم و افزایش بیان سیستم‌های افلاکس می‌باشد. سیستم‌های افلاکس پمپ نقش مهمی در مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف دارند (۶). *سودوموناس آئروژینوزا* دارای پتانسیل بیان ۱۲ نوع پمپ افلاکس چند دارویی به نام Mex می‌باشد. سیستم افلاکس Mex متعلق به خانواده RND است. پنج پمپ به نام‌های MexCD-oprJ، MexAB-OprM، MexJK-OprM، MexXY-OprM MexEF-oprN مهم‌ترین پمپ‌های افلاکس این خانواده هستند (۷).

MexAB-OprM تنها پمپ ترشحی است که در تمامی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* یافت شده و موجب مقاومت ذاتی این باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌ها می‌گردد (۸). ارتاپنم، مروپنم و دوری‌پنم سوبسترای سیستم افلاکس MexAB-OprM، هستند. لذا افزایش بیان سیستم افلاکس پمپ MexAB-OprM نقش مهمی در مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و به ویژه کارباپنم‌ها را دارد (۹). بنابراین شناسایی مکانیسم‌های دخیل در مقاومت به کرباپنم ها می‌تواند در کنترل، مدیریت و درمان به موقع و مناسب عفونت های ایجاد شده توسط *سودوموناس آئروژینوزا* مؤثر باشد. لذا هدف از این مطالعه ارزیابی سطح بیان ژن‌های افلاکس پمپ MexAB-OprM در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بخش ICU می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا*

در طی دوره‌ی ۷ ماهه از آبان ۹۶ تا اردیبهشت ۹۷ ایزوله‌های باکتریایی *سودوموناس آئروژینوزا* از بیماران بستری در بخش ICU بیمارستان‌های بعثت، بهشتی و سینا شهر همدان جمع‌آوری شدند. سپس ایزوله‌های باکتریایی به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی، منتقل شدند. جهت تأیید ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جمع‌آوری شده، از تست‌های بیوشیمیایی مختلف شامل رشد در محیط مک‌کانکی آگار، تست اکسیداز، کاتالاز، واکنش در محیط TSI، تست OF، بررسی تحرک، رشد در محیط ستریماید آگار و رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس هینتون آگار استفاده شد (۱۰). در نهایت برای تأیید ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* PCR برای ژن *acsA* انجام گرفت (۱۱).

تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی

مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، به روش استاندارد دیسک دیفیوژن و مطابق با روش Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2018) انجام گرفت (۱۲). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت MAST انگلستان خریداری شدند و شامل پیپراسیلین (۱۰۰µg)، پیپراسیلین/تازوباکتام (۱۰۰/۱۰ µg)، سفتازیدیم (۳۰µg)، سفتریاکسون (۳۰ µg)، آزترونام (۳۰µg)، ایمی‌پنم (۱۰µg)، مروپنم (۱۰µg)، دوری‌پنم (۱۰µg)، آمیکاسین (۳۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg) و تتراسایکلین (۳۰µg) بودند. از *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 به عنوان سویهٔ کنترل استفاده شد.

تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) ایمی‌پنم:

در این روش حداقل غلظت مهاری برای ایمی‌پنم با استفاده از نوار E-test (شرکت MAST انگلستان) انجام شد (۱۳).

استخراج ژنوم و انجام روش PCR

استخراج DNA به روش بویلینگ انجام شد (۱۴). آزمون PCR برای ژن‌های *MexA*،*MexB*، *OprM* و ژن *acsA* به عنوان Housekeeping gene انجام شد (جدول ۱). سویه *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در نهایت الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد (۱۵).

انتخاب ایزوله‌ها:

از میان ۳۳ ایزوله جدا شده از بیماران بستری در بخش ICU، ۲۰ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* بر اساس نمونه‌گیری طبقه بندی شده (نوع نمونه‌های بالینی، حضور ژن‌های مختلف کارباپنماز و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی، به عنوان مثال نمونه‌هایی با کاهش حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها به ویژه کرباپنم) انتخاب شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA (RiboEx, شرکت Gene All ,کره) انجام شد تا سطح بیان ژن‌های *MexA*، *MexB*، *OprM* و *rpoD* به عنوان یک ژن کنترل داخلی ایزوله‌های مختلف *سودوموناس آئروژینوزا* با استفاده از PCR Real Time تعیین شود. سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (شرکت Gene All,کره) و پرایمر هگزامر (شرکت کیاژن- ایران) انجام شد. RNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای -۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد (۱۶).

بررسی سطح بیان ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از Real-Time PCR

به منظور بررسی کمی بیان، ژن‌های *MexA*، *MexB*، *OprD* و *rpoD* (به عنوان ژن کنترل داخلی) با استفاده از کیت شرکت Gene All، کره و پرایمرهای ذکر شده در جدول ۱ انجام شد. مطابق پروتکل، مسترمیکس، پرایمرها و cDNA سنتز شده در حجم مناسبی مخلوط شده و توسط دستگاه Real-time PCR واکنش انجام گردید. *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. بیان ژن‌های *MexA*، *MexB*، *OprM* با بیان ژن *rpoD* به عنوان ژن house keeping مقایسه گردید. از فرمول مرجع نسبی بیان ($\theta\Delta Ct$) برای تعیین بیان ژن مورد نظر استفاده گردید (۱۷).

آنالیز آماری

آزمون آماری One way ANOVA برای مقایسه تفاوت معنی دار مقادیر به دست آمده از بیان ژن‌های مورد در سویه استاندارد (که واجد مقدار ۱ می‌باشد) و ایزوله‌های بالینی مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر کمتر از ۰/۰۵، به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد. در این مطالعه از نرم افزار آماری SPSS۱۶ استفاده شد.

جدول ۱ پرایمرهای مورد استفاده در Real- Time PCR و PCR

نام ژن	توالی پرایمر	وزن محصول	رفرانس
MexA	AACCCGAACAACGAGCTG ATGGCCTTCTGCTTGACG	۵۰۳	(۱۸)
MexB	TGTCGAAGTTTTTCATTGAG AAGGTCAC GGTGATGGT	۲۸۰	(۱۷)
OprM	GATCCCCGACTACCAGCGCCCCG ATGCGGTACTGCGCCCGGAAGGC	۲۴۷	(۱۹)
rpoD	GGGCTGTCTCGAATACGTTGA ACCTGCCGGAGGATATTTCC	۹۰	(۲۰)
acsA	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC GACATAGATGCCCTGCCCCTTGAT	۸۲۳	(۲۱)

یافته‌ها

جمع‌آوری ایزوله‌های بالینی

در مجموع ۳۳ نمونه سودوموناس آئروژینوزا از بیماران بستری در بخش ICU جمع‌آوری شدند.

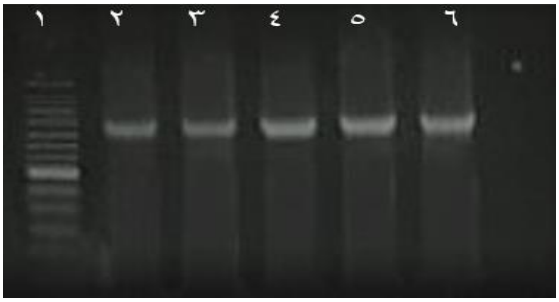
الگوی حساسیت ضد میکروبی ایزوله‌ها: نتایج آزمایش‌های حساسیت ضد میکروبی نشان داد که بالاترین مقاومت به سفتریاکسون (۶۳/۶۳٪، n = ۲۱) و کمترین مقاومت در برابر پیپراسیلین (۳۳/۳۳٪، n =۱۱) بود. (جدول ۲). نتایج MIC ایمیپنم نشان داد که ۱۴ (۴۲/۴۲٪) ایزوله مقاوم و ۱۹ (۵۷/۵۷٪) ایزوله حساس به ایمیپنم بودند.

جدول ۲. نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن

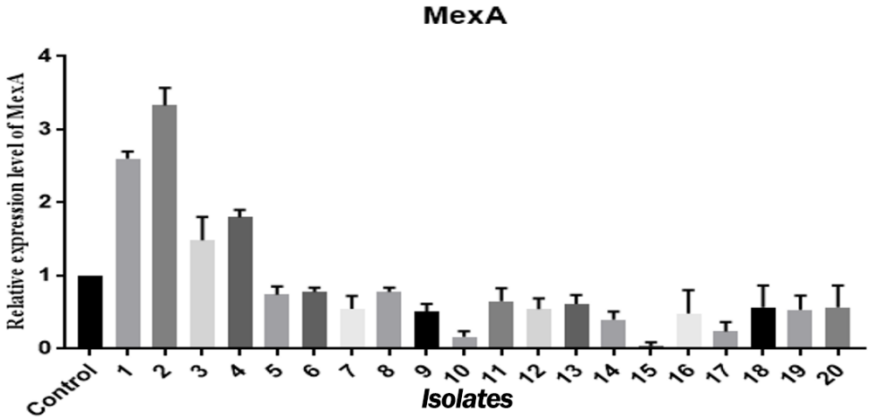
آنتی‌بیوتیک	مقاوم (درصد)	حدواسط (درصد)	حساس (درصد)
پیپراسیلین	۱۱ (۳۳/۳۳)	۷ (۲۱/۲۱)	۱۵ (۴۵/۴۵)
پیپراسیلین-تازوباکتام	۱۳ (۳۹/۳۹)	۳ (۹/۰۹)	۱۷ (۵۱/۵۱)
سفتازیدیم	۱۵ (۴۵/۴۵)	۳ (۹/۰۹)	۱۵ (۴۵/۴۵)
ایمی‌پنم	۱۵ (۴۵/۴۵)	۰ (۰)	۱۸ (۵۴/۵۴)
آزترونام	۱۷ (۵۱/۵۱)	۶ (۱۸/۱۸)	۱۰ (۳۰/۳۰)
آمیکاسین	۱۲ (۳۶/۳۶)	۴ (۱۲/۱۲)	۱۷ (۵۱/۵۱)
سیپروفلوکساسین	۱۹ (۵۷/۵۷)	۰ (۰)	۱۴ (۴۲/۴۲)
مروپنم	۱۳ (۳۹/۳۹)	۰ (۰)	۲۰ (۶۰/۶)
دوری‌پنم	۱۴ (۴۲/۴۲)	۰ (۰)	۱۹ (۵۷/۵۷)
تتراسایکلین	۱۶ (۴۸/۴۸)	۲ (۶/۰۶)	۱۵ (۴۵/۴۵)
سفتریاکسون	۲۱ (۶۳/۶۳)	۶ (۱۸/۱۸)	۶ (۱۸/۱۸)

نتایج آزمون PCR و qRT-PCR

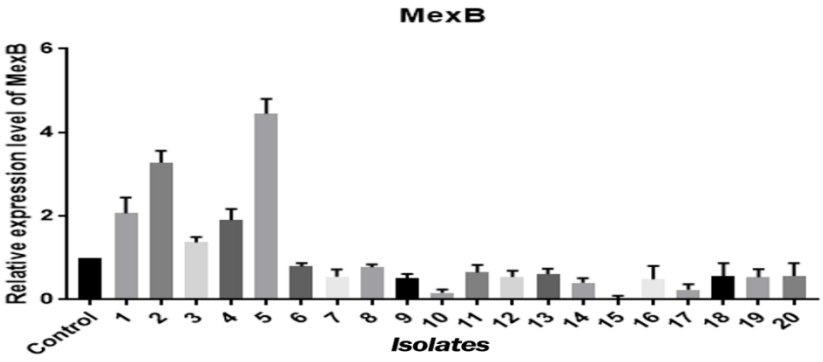
نتایج آزمون PCR ژن *acsA* به *عنوان* Housekeeping gene جهت تأیید سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد که این ژن در تمامی ایزوله‌های های باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* وجود دارد (شکل ۱). همچنین ژن داخلی *rpoD* به عنوان ژن کنترل داخلی در تمام ایزوله‌ها وجود داشت که نشان دهنده صحت انجام واکنش PCR بود. هم‌چنین نتایج PCR نشان داد که ژن‌های افلاکس پمپ (*MexA*, *MexB* و *OprM*) در تمام ایزوله‌های مورد بررسی وجود داشت. هم‌چنین نتایج آزمون بیان ژن حاکی از آن بود که از میان ۲۰ ایزولهٔ بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بخش ICU، افزایش بیان ژن‌های *OprM,MexB, MexA* به ترتیب در ۴ (۲۰٪)، ۵ (۲۵٪) و ۴ (۲۰٪) ایزوله مشاهده شد (شکل ۴-۲). منحنی افقی نشان دهندهٔ ایزوله‌های بالینی و کنترل و منحنی عمودی نشان‌دهندهٔ میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه می‌باشد.



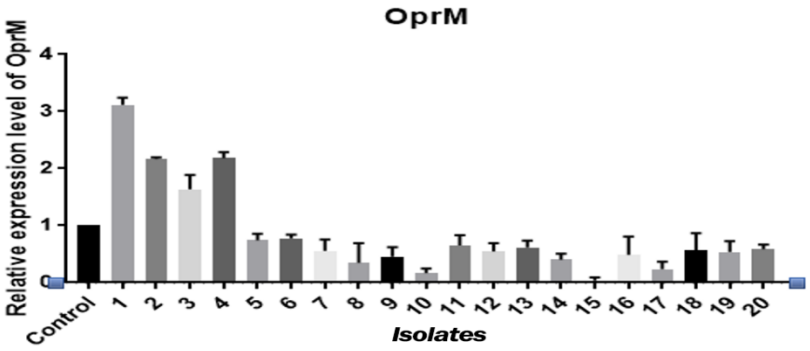
شکل ۱. نتیجه الکتروفورز تکثیر محصولات ژن استاندارد *acsA* با طول ۸۲۳ جفت باز. چاهک ۱: مارکر فرمانتس با وزن مولکولی ۱ کیلو باز، چاهک ۲: از سمت چپ، باکتری استاندارد *سودوموناس آئروژینوز* ATCC 27853 بعنوان کنترل مثبت، چاهک‌های شماره ۳ الی ۶: ایزوله‌های باکتریایی *سودوموناس آئروژینوز*



شکل ۲. بیان ژن *MexA*



شکل ۳. بیان ژن *MexB*



شکل ۴. بیان ژن *OprM*

بحث

سودوموناس آئروژینوزا از جمله پاتوژن‌های مهم در عفونت‌های بیمارستانی به ویژه در بخش ICU می‌باشد که به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از جمله کارباپنم‌ها مقاوم می‌باشد (۲۲). شیوع ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به چند دارو (MDR) در سال‌های اخیر در سراسر جهان افزایش یافته است (۲۳). در این مطالعه میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم، مروپنم و دوری‌پنم به ترتیب ۴۵/۴۵٪، ۳۹/۳۹٪ و ۴۲/۴۲٪ می‌باشد که مشابه با مطالعه Siasi و همکاران در تهران بود (۲۴).

آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم خط اول درمان برای بیشتر عفونت‌های باکتریایی به‌خصوص *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشند، تأثیر این آنتی‌بیوتیک‌های مهم به‌دلیل گسترش باکتری‌های مقاوم به کارباپنم به ویژه در بخش ICU کاهش یافته است (۲۵). بنابراین شناسایی سریع و دقیق ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به کارباپنم‌ها و شناسایی مکانیسم‌های مقاومتی به این آنتی‌بیوتیک‌ها در بخش ICU برای درمان مناسب و پیشگیری از انتشار این ایزوله‌ها ضروری است (۲۶). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر سفتریاکسون ۶۳/۶۳٪ و کمترین مقاومت در برابر پیپراسیلین ۳۳/۳۳٪ بود. هم‌چنین از میان آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم بیشترین مقاومت نسبت به ایمی‌پنم ۴۵/۴۵٪ و کمترین مقاومت نسبت به مروپنم ۳۹/۳۹٪ می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Mihani و همکاران که بر روی ۱۰۰ ایزوله‌ی بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* در اهواز انجام شد، مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمیپنم و مروپنم به ترتیب ۴۱٪ و ۲۳٪ بود که کمی با مطالعه‌ی حاضر متفاوت بود که به ترتیب ۴۵/۴۵٪ و ۳۹/۳۹٪ بود (۲۷). در مطالعه‌ای Fazeli و همکاران در اصفهان بر روی ۶۶ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بخش ICU انجام دادند، ۷۵/۸٪ از ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم و ۷۲/۷٪ از ایزوله‌ها نسبت به پیپراسیلین مقاومت داشتند (۲۸) که میزان مقاومت در مطالعه ما نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های فوق کمتر از مطالعه فاضلی بود که به ترتیب برابر با ۴۵/۴٪ و ۳۳/۳٪ می‌باشد که احتمالاً به دلایلی از جمله محدودیت در تعداد نمونه‌های مطالعه حاضر بود. در مطالعه‌ای که توسط Aminizadeh و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بخش ICU انجام شد بیشترین و کمترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به سفتازیدیم (۸۷٪) و ایمی‌پنم (۶/۵٪) بود (۲۹). در مطالعهٔ حاضر بیشترین و کمترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون و پیپراسیلین بود که احتمالاً به دلیل تفاوت در ایزوله‌های مورد بررسی دو مطالعه می‌باشد که الگوی مقاومت متفاوتی دارند. در مطالعه Bayani و همکاران در سال ۲۰۱۳ در بابل که بر روی ۳۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بخش ICU انجام شد بشترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین و آمپی‌سیلین-سولباکتام (۵۳/۳٪) گزارش شد (۳۰). در مطالعه Moniri و همکاران در کاشان که بر روی ۶۹ ایزولهٔ *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بخش ICU انجام شد بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، سفوکسیم و سفتی‌زوکسیم (۱۰۰٪) و کمترین میزان مقاومت نسبت به آمیکاسین (۲۳/۲٪) گزارش شد. هم‌چنین از بین آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم ۴۷/۶٪ و ۳۹٪ ایزوله‌ها به ترتیب نسبت به ایمی‌پنم و مروپنم مقاوم بودند (۳۱) که مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم و مروپنم در مطالعهٔ ما ۴۵/۴۵٪ و ۳۳/۳۳٪ بود که این میزان تا حدی مشابه با مطالعهٔ فوق بود که احتمالاً به این دلیل باشد که ایزوله‌ها از بخش ICU بوده و دارای الگوی مقاومت مشابهی می‌باشند.

افلاکس پمپ‌ها به دلیل تنوع سوبسترایی در ایجاد مقاومت چند دارویی بسیار قابل توجه می‌باشند. در میان باکتری‌های گرم منفی سیستم افلاکس MexAB-OprM، یکی از افلاکس پمپ‌های با اهمیت دخیل در مقاومت‌های چند دارویی *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد و تنها سیستم افلاکس پمپ ذاتی در این باکتری می‌باشد (۳۲). در مطالعه حاضر افلاکس پمپ MexAB-OprM، از جمله مکانیسم‌های مقاومتی مهم در برابر آنتی‌بیوتیک‌های کاربانپم بود. افزایش بیان سیستم افلاکس پمپ در میان ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* در گزارشات مختلف ۵۷/۹٪-۲۱/۱٪ گزارش شده است (۳۳). در این مطالعه افزایش بیان ژن‌های افلاکس پمپ *MexAB-OprM*، ۲۰٪، ۲۵٪ و ۲۰٪ گزارش شد که کمتر از مطالعه انجام شده توسط TubA Moderris و همکارانش در ترکیه در سال ۲۰۱۸ بود که ۴۷/۶٪ ایزوله‌ها افزایش بیان افلاکس MexAB-OprM را نشان دادند (۳۴). هم‌چنین درمطالعه‌ای که توسط Ji-Young Lee و همکارانش در کره در سال ۲۰۱۲ انجام شد، از میان ۵۷ ایزوله مقاوم به کاربانپم، ۳۲ (۵۶/۱٪) ایزوله افزایش بیان ژن MexAB-OprM و ۵۴ (۹۴/۷٪) ایزوله‌ها کاهش بیان ژن *OprD* را نشان دادند (۳۵). در مطالعهٔ حاضر، افزایش بیان ژن‌های افلاکس پمپ MexAB-OprM کمتر از مطالعهٔ مذکور بود که این تفاوت در بیان ژن MexAB-OprM احتمالاً به دلیل تفاوت در سویه‌های دو منطقه جغرافیایی مختلف و الگوی مختلف مقاومت آنتی‌بیوتیکی و به کار گیری مکانیسم‌های مقاومتی مختلف در میان سویه‌های مختلف است.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاومت آنتی بیوتیکی بالایی در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌ها دارند. در بیشتر ایزوله‌هائی که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کاربانپم مختلف مقاومت داشتند افزایش بیان ژن‌های افلاکس پمپ MexAB-OprM مشاهده شد. به‌طوری‌که میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم،مروپنم و دوریپنم به ترتیب ۴۵/۴۵٪، ۳۹/۳۹٪ و ۴۲/۴۲٪ بود و افزایش بیان ژن‌های *MexA*، *MexB*، *OprM* در مقایسه با سویه کنترل به ترتیب در ۲۰٪ (۴/۲۰)، ۲۵٪ (۵/۲۰) و ۲۰٪ (۴/۲۰) از ایزوله‌ها مشاهده شد. بنابراین بین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کاربانپم و افزایش بیان سیستم افلاکس پمپ MexAB-OprM/ *رتباط وجود دارد*. لذا شناسایی مکانیسم‌های دخیل در ایجاد مقاومت در بین این ایزوله‌ها از جمله سیستم‌های افلاکس پمپ جهت به کار گیری راهکارهای درمانی مناسب جهت جلوگیری از انتشار چنین سویه‌های مقاومی ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد با شماره ۹۶۱۰۱۲۶۵۱۴ و کد اخلاقی IR.UMSHA.REC.1396.662 در سال ۱۳۹۶ می‌باشد. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از این معاونت محترم و پرسنل آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان به دلیل همکاری در پیشبرد این مطالعه، ابراز می‌دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Tam VH, Chang KT, Abdelraouf K, Brioso CG, Ameka M, McCaskey LA, et al. Prevalence, resistant mechanisms, and susceptibility of multidrugresistant bloodstream isolates of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(3):1160-4. [DOI:10.1128/AAC.01446-09] [PMID] [PMCID]
2. Bonten MJ, Bergmans DC, Ambergen AW, De Leeuw PW, Van der Geest S, Stobberingh EE, et al Risk factors for pneumonia, and colonization of respiratory tract and stomach in mechanically ventilated ICU patients. Am J Respir Crit Care Med1996; 154(5):1339-46. [DOI:10.1164/ajrccm.154.5.8912745] [PMID]
3. Agodi Agodi A, Barchitta M, Cipresso R, Giaquinta L, Romeo MA, Denaro C. Pseudomonas aeruginosa carriage, colonization, and infection in ICU patients. Intensive Care Med 2007; 33(7):1155- 61. [DOI:10.1007/s00134-007-0671-6] [PMID]
4. Thuong M, Arvaniti K, Ruimy R, de la Salmonière P, Scanvic-Hameg A, Lucet JC, et al. Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. J Hosp Infect 2003; 53(4):274-82. [DOI:10.1053/jhin.2002.1370] [PMID]
5. Kaye KS, Pogue JMJPTJoHP, Therapy D. Infections caused by resistant gram-negative bacteria: epidemiology and management. Pharmacotherapy 2015;35(10):949-62. [DOI:10.1002/phar.1636] [PMID]

6. Rojo-Bezares B, Cavalié L, Dubois D, Oswald E, Torres C, Sáenz YJJomm. Characterization of carbapenem resistance mechanisms and integrons in Pseudomonas aeruginosa strains from blood samples in a French hospital. J Med Microbiol.2016;65(4):311-9. [DOI:10.1099/jmm.0.000225] [PMID]

7. Dreier J, Ruggerone PJFim. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa. Front Microbiol. 2015;6:660. [DOI:10.3389/fmicb.2015.00660] [PMID] [PMCID]

8. Tian Z-X, Yi X-X, Cho A, O'Gara F, Wang Y-PJPp. CpxR activates MexAB-OprM efflux pump expression and enhances antibiotic resistance in both laboratory and clinical nalB-type isolates of Pseudomonas aeruginosa. PLOS. 2016;12(10):e1005932. [DOI:10.1371/journal.ppat.1005932] [PMID] [PMCID]

9. Pan Y-p, Xu Y-h, Wang Z-x, Fang Y-p, Shen J-lJAom. Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa. Arch Microbiol. 2016;198(6):565-71. [DOI:10.1007/s00203-016-1215-7] [PMID]

10. Gaby W, Hadley CJJob. Practical laboratory test for the identification of Pseudomonas aeruginosa.J bacteriol 1957;74(3):356.

11. Annear D, Black J, Govender S. Multilocus sequence typing of carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from patients presenting at port Elizabeth hospitals, south Africa. Afr J Infect Dis. 2017;11(2):68-74. [DOI:10.21010/ajid.v11i2.9] [PMID] [PMCID]

12. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th ed. CLSI supplement M100S. CLSI, PA. 38-40.

13. Mustafa MH, Chalhoub H, Denis O, Deplano A, Vergison A, Rodriguez-Villalobos H, et al. Antimicrobial Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa Isolated from Cystic Fibrosis Patients in Northern Europe. Antimicrobial agents chemother. 2016;60(11):6735-41 [DOI:10.1128/AAC.01046-16] [PMID] [PMCID]

14. Clarke l, Millar BC and Moore JC. Extraction of genemic DNA from pseudomonas aeroginosa: a comparison of three methods. Br j Biomed. 2003; 60(1):34-5. [DOI:10.1080/09674845.2003.11978040]

15. Tang Y, Li B, Dai J, Dai J, Wang X, Si J, et al. Genotyping of pseudomonas aeruginosa type III secretion system using magnetic enrichment multiplex polymerase chain reaction and chemiluminescence. J Biomed Nanotechnol. 2016;12(4):762-9. [DOI:10.1166/jbn.2016.2222] [PMID]

16. Heera R, Sivachandran P, Chinni SV, Mason J, Croft L, Ravichandran M, et al. Efficient extraction of small and large RNAs in bacteria for excellent total RNA sequencing and comprehensive transcriptome analysis. BMC Res Notes. 2015;8(1):754. [DOI:10.1186/s13104-015-1726-3] [PMID] [PMCID]

17. Arabestani MR, Rajabpour M, Yousefi Mashouf R, Alikhani MY, Mousavi SM. Expression of efflux pump MexAB-OprM and OprD of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical samples using qRT-PCR. Arch Iran Med. 2015;18(2):102-8.

18. 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. [DOI:10.1128/AAC.50.5.1633-1641.2006] [PMID] [PMCID]

19. Su F, Wang J. Berberine inhibits the MexXY-OprM efflux pump to reverse imipenem resistance in a clinical carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa isolate in a planktonic state. Exp Ther Med. 2018;15(1):467-72. [DOI:10.3892/etm.2017.5431]

20. Azimi A, Naserpour T, Bazmi F, Peymani A, Aslanimehr M, Saadat S. Evaluation of oprD Gene Expression in Carbapenem-Resistant Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated From Severe Burn Patients With Secondary Infection. Biotech. Health. Sci. 2015. [DOI:10.17795/bhs30748]

21. Gardner JG, Grundy FJ, Henkin TM, Escalante-Semerena JCJJob. Control of acetyl-coenzyme A synthetase (AcsA) activity by acetylation/deacetylation without NAD+ involvement in Bacillus subtilis. ASM. 2006;188(15):5460-8. https://doi.org/10.1128/JB.01181-06 [DOI:10.1128/JB.00215-06] [PMCID]

22. Varaiya A, Kulkarni N, Kulkarni M, Bhalekar P, Dogra JJIJoMR. Incidence of metallo beta lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in ICU patients. Indian J Med Res. 2008;127(4). [DOI:10.4103/0377-4929.41683] [PMID]

23. Plant AJ, Dunn A, Porter RJJEroa-it. Ceftolozane-tazobactam resistance induced in vivo during the treatment of MDR Pseudomonas aeruginosa pneumonia. Expert Rev Anti Infect Ther 2018;16(5):367-8. [DOI:10.1080/14787210.2018.1473079] [PMID]

24. Siasi E, Rafiei Tabatabaii R, MoslehiMehr F. Isolation of bla_vim gene in Antibiotic resistant Pseudomonas aeruginosa from hospitals. New Cellularand Molecular Biotechnology Journal. 2018;8(29):97-106

25. Britt NS, Ritchie DJ, Kollef MH, Burnham C-AD, Durkin MJ, Hampton NB, et al. Importance of site of infection and antibiotic selection in the treatment of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa sepsis.

Antimicrob Agents Chemother. 2018;62(4):e02400-17. [DOI:10.1128/AAC.02400-17] [PMID] [PMCID]

26. Buehrle DJ, Shields RK, Clarke LG, Potoski BA, Clancy CJ, Nguyen MHJAa, et al. Carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa bacteremia: risk factors for mortality and microbiologic treatment failure. J Hosp Infect. 2017;61(1):e01243-16. [DOI:10.1128/AAC.01243-16] [PMID] [PMCID]
27. Mihani F, Khosravi A. Isolation of Pseudomonas aeruginosastrains producing metallo beta lactamases from infections in burned patients and identification of blaIMP and blaVIMgenes by PCR %J Iranian Journal of Medical Microbiology. 2007;1(1):23-31.
28. Fazeli H, Havaei SA, Solgi H, Shokri D, Motallebirad T. Pattern of Antibiotic Resistance in Pesudomonas Aeruginosa Isolated from Intensive Care Unit, Isfahan, Iran. J Isfahan Med Sch 2013; 31(232): 433-8
29. Aminizadeh Z, Kashi MS. Prevalence of multi-drug resistance and pandrug resistance among multiple gram-negative species: experience in one teaching hospital, Tehran, Iran. Int Res J Microbiol 2011; 2:90-5.
30. Bayani M, Siadati S, Rajabnia R, Taher AA. Drug Resistance of Pseudomonas aeruginosa and Enterobacter cloacae Isolated from ICU, Babol, Northern Iran. Int J Mol Cell Med 2013; 2(4):204-9.
31. Moniri R, Mosayebi Z, Movahedian AH, Mousavi GA. Emergence of multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa isolates in neonatal septicemia. J Infect Dis Antimicrob Agents 2005; 22:39-44.
32. Papadopoulos CJ, Carson CF, Chang BJ, Riley TV. Role of the MexAB-OprM efflux pump of Pseudomonas aeruginosa in tolerance to tea tree (Melaleuca alternifolia) oil and its monoterpene components terpinen-4-ol, 1,8-cineole, and alpha-terpineol. Appl Environ Microbiol. 2008;74(6):1932-5. [DOI:10.1128/AEM.02334-07] [PMID] [PMCID]
33. Amin NE, Giske CG, Jalal S, Keijser B, Kronvall G, Wretlind BJA. Carbapenem resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. APMIS. 2005;113(3):187-96. [DOI:10.1111/j.1600-0463.2005.apm1130306.x] [PMID]
34. Muderris T, Durmaz R, Ozdem B, Dal T, Unaldı O, Aydogan S, et al. Role of efflux pump and OprD porin expression in carbapenem resistance of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. JIDC. 2018;12(01):001-8. [DOI:10.3855/jidc.9486]
35. Lee K, Park AJ, Kim MY, Lee HJ, Cho J-H, Kang JO, et al. Metallo-β-lactamase-producing Pseudomonas spp. in Korea: high prevalence of isolates with VIM-2 type and emergence of isolates with IMP-1 type. Yonsei Med J.2009;50(3):335-9. [DOI:10.3349/ymj.2009.50.3.335] [PMID] [PMCID]