مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره دوم (پیاپی ۱۹) تابستان ۱۳۹۳
صفحات ۱۲۷-۱۱۸

Original Article

ارزیابی شیوع فنوتیپی و ژنتیکی پمپ های افلاکس و مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* در بین بیماران سوختگی بیمارستان قطب الدین شیرازی

یحیی دشتی زاده[۱]، آفاق معطری*[۲]، علی اکبر گرزین[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس ، دانشکده علوم پایه ،گروه میکروب شناسی، [۲] دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی، واحد شیراز، دانشکدهٔ پزشکی، گروه باکتری و ویروس شناسی [۳] استادیار، دانشگاه علوم پزشکی، واحد شیراز، دانشکدهٔ پزشکی، گروه باکتری و ویروس شناسی

چکیده

سابقه و هدف: *سودوموناس آئروژینوزا* از مهمترین علل عفونت های بیمارستانی در بیماران سوختگی می باشد. یکی از مشکلات درمان این بیماران بروز مقاومت های آنتی بیوتیکی با مکانیسم های مختلف می باشد. پمپ های افلاکس *mex* نقش اساسی در بروز مقاومت چندگانه نسبت به داروهای ضد میکروبی دارند. این مطالعه با هدف ارزیابی شیوع ژن های پمپ های افلاکس *mexA-B-oprM* و نیز بررسی حضور این ژن ها به صورت فنوتیپی انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی ۲۵۰ نمونه سواب از زخم بیماران دچار سوختگی سطح ۲ و ۳ مراجعه کننده به بیمارستان سوختگی قطب الدین شیرازی جمع آوری شد. جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* با آزمون های بیوشیمیایی و روش PCR تایید گردیدند. الگوی حساسیت دارویی با روش انتشار دیسک، بررسی فنوتیپی فعالیت پمپ های افلاکس با روش کارت ویل و بررسی ژن های *mex A* و *mex B* با روش PCR انجام گرفت.

یافته ها: در مطالعه حاضر ۲۶/۴۰٪ (۶۶ مورد) نمونه های زخم بیماران سوختگی آلوده به *سودوموناس آئروژینوزا* بودند. این باکتری به تمامی آنتی بیوتیک های مورد بررسی به جز کلیستین مقاوم بود. ۶۶/۶۶٪ از جدایه ها (۴۴ مورد) دارای پمپ افلاکس بودند. از این میان ۹۲/۴۲٪ و ۸۷/۸۷٪ از جدایه ها به ترتیب دارای ژن های *mexA* و *mexB* بودند.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که روش ژنوتیپی بسیار دقیق و قابل اعتماد تر از روش فنوتیپی در تشخیص پمپ‌های افلاکس در جدایه های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* می باشد. با توجه به حضور بیش از ۹۰٪ ی ژن های پمپ افلاکس در *سودوموناس آئروژینوزا*، بررسی حضور این ژن ها در پیشنهاد الگوی درمانی مناسب بیماران آلوده به این باکتری حائز اهمیت است.

واژگان کلیدی: بیماران سوختگی، *سودوموناس آئروژینوزا*، پمپ های افلاکس.

دریافت مقاله: اسفند ماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ماه ۹۳

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) باکتری گرم منفی و پاتوژن فرصت طلبی است که توانایی زیستن در تمام محیط ها را داشته و عامل بسیاری از عفونت ها در انسان مانند اندوکاردیت، منتژیت، سپتی سمی و عفونت های مزمن ریه در بیماران سیستیک فیبروزیس می باشد (۱). *سودوموناس آئروژینوزا* از عوامل مهم و جدی در عفونت های بیمارستانی و عامل مرگ و میر در مبتلایان به لوسمی (لنفوم)، سوختگی های شدید و بیماران دچار سیستیک فیبروزیس می باشد. این باکتری ارتباط مستقیمی با افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی دارد. به طوری که حدود ۳۰٪ عفونت های بیمارستانی مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری می باشد. مقاومت

*) آدرس برای مکاتبه: شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه باکتری و ویروس شناسی. تلفن: ۰۹۱۷۳۱۳۶۸۴۴ پست الکترونیک: moattaria@sums.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

آنتی بیوتیکی *سودوموناس* به عوامل مختلفی مانند نفوذپذیری غشا خارجی، حضور AmpC القایی، بتالاکتاماز کروموزومی و فعالیت ناشی از سیستم های افلاکس چند دارویی وابسته است. از این میان پمپ های افلاکس مهمترین علت ایجاد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی می باشد و اصلی ترین این پمپ ها سیستم های ذاتی افلاکس mexAB-oprM است (۱). سایر سیستم های mex از اهمیت بالینی کمتری برخوردار می باشند. نقش ذاتی پمپ های افلاکس در ایجاد مقاومت چند دارویی از طریق پمپاژ ترکیبات دارویی به خارج سلول می باشد. کاهش نفوذپذیری غشا و سیستم افلاکس فعال موجب افزایش سیستم افلاکس از نوع RND (Resistance Nodulation-Cell division) و در نتیجه افزایش مقاومت دارویی می گردد.

در چندین دهه اخیر اساسی ترین مشکل مقاومت چند دارویی در بسیاری از عوامل بیماری زای انسانی استفاده نامناسب و بیش از حد از ترکیبات ضد میکروبی می باشد. به طور معمول بسیاری از مکانیسم های کروموزومی مقاومت آنتی بیوتیکی ایجاد شده توسط سیستم های افلاکس در ارگانیسم های گرم مثبت و گرم منفی یافت شده است (۲ و ۳). به طور کلی پمپ های افلاکس چند دارویی باکتریایی بر اساس ترادف و شباهت اسیدهای آمینه در پنج گروه اصلی قرار می گیرند. این گروه ها شامل خانواده Major Facilitator Super Family (MFS) (۴)، خانواده ATP Binding Cassette (ABC) (۵)، Resistance-Nodulation-Division (RND) (۶-۸)، Small Multidrug Resistance (SMR) (۴) و Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) (۹) هستند. پمپ های افلاکس از نظر بالینی به طور موثری در ارتباط با گروه های RND یا MFS می باشند که با آزاد سازی انرژی نیروی محرکه پروتون (PMF)، در خارج کردن آنتی بیوتیک از سلول نقش دارند (۴، ۷ و ۱۰).

انتقال دهنده های خانواده RND به تعداد زیادی در باکتری های گرم منفی وجود دارند. این انتقال دهنده ها به طور خاص در اتصال به پروتئین اتصالی غشای پری پلاسمیک (Membrane Fusion Protein (MFP)) (۶ و ۱۱) (که اغلب افلاکس پروتئین پری پلاسمیک خوانده می شود (PEP)) (۱۲)، یک پروتئین غشا خارجی (۷) و یا فاکتور ساده غشا خارجی (۱۲) نقش دارند. این سازماندهی و عملکرد موجب خارج شدن آنتی بیوتیک از میان هر دو غشا داخلی یا خارجی در باکتری های گرم منفی می گردد.

امروزه بزرگ ترین چالش و نگرانی در بخش مراقبت های سوختگی، عفونت های بیمارستانی بیماران دچار سوختگی می باشد که منجر به مرگ بیش از ۵۰٪ بیماران می گردد (۱۳). *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان مهم ترین عامل عفونت های بیمارستانی در بیماران دچار سوختگی مطرح می باشد.

از آنجایی که تاکنون در مورد نقش پمپ های افلاکس در مقاومت عفونت های *سودوموناس آئروژینوزا* در ایران به صورت فنوتیپی مطالعه ای انجام نشده است، این مطالعه با هدف ارزیابی شیوع ژن *mexA-B-oprM* مرتبط با پمپ های افلاکس و نیز بررسی حضور این ژن به صورت فنوتیپی انجام گرفت.

مواد و روش ها

الف) نمونه گیری، کشت و جداسازی جدایه ها: در این مطالعه مقطعی ۲۵۰ نمونه سواب از زخم بیماران دچار سوختگی سطح ۲ و ۳ مراجعه کننده به بیمارستان سوختگی قطب الدین شیرازی طی سال های ۹۱-۹۲ در شرایط استریل جمع آوری شد. نمونه ها از بخش های اطفال، زنان، مردان و بخش مراقبت های ویژه تهیه گردید. بیماران شامل ۱۸۴ مرد و ۱۰۲ زن که سن آنها بین ۲ روز تا ۷۳ سال بود. در تمامی موارد اطلاعات تاریخچه ای بر اساس پرسشنامه از پرونده افراد استخراج شد.

نمونه های زخم بر روی محیط های نوترینت براث و بلاد آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C قرار گرفتند. به منظور شناسایی جدایه ها از آزمون های بیوشیمیایی استاندارد مانند اکسیداز، کاتالاز، TSI، SIM، سیترات و رشد در ۴۲ درجه سلسیوس استفاده گردید (۱۴).

Archive of SID

www.SID.ir

ب) تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی: برای این منظور از روش انتشار دیسک مطابق با دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI)استفاده شد. میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفتازدیم (۲۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، ونکومایسین (۱۰ میکروگرم)، سفالکسین (۲۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۱۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۱۰ میکروگرم)، آمپی سیلین–سولباکتام (۲۰ میکروگرم)، سفپیم (۳۰ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (۱۰ میکروگرم)، پیپراسیلین–تازوباکتام (۱۰ میکروگرم) و کلی سیتین (۲۵ میکروگرم) (شرکت مرک، آلمان) سنجیده شد (۱۴).

ج) بررسی فنوتیپی با روش کارت ویل: به منظور بررسی فعالیت پمپ های افلاکس به صورت فنوتیپی تمامی ایزوله ها با تکنیک آگار حاوی اتیدیوم – بروماید با روش (کارت ویل) مورد بررسی قرار گرفتند (۱۵ و ۱۶). در ابتدا سویه های مقاوم به چند دارو بر روی پلیت های نوترینت آگار حاوی غلظت های متفاوت (۰ تا ۲/۵ میلی گرم بر لیتر) اتیدیوم بروماید به صورت یک خط (از مرکز محیط به سمت کنار محیط) کشت داده شدند (شکل ۱). غلظت ها وابسته به نوع باکتری بوده و قابل تغییر هستند. کمترین غلظت ممانعت کننده رشد (MIC) نیز ۲ میلی گرم در لیتر در نظر گرفته شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. هر پلیت نوترینت آگار حاوی اتیدیوم بروماید می تواند شامل ۱۲ جدایه باکتری باشد. میزان فلوروسنت هر جدایه با دستگاه ژل داک (Gel Documentation, Iran) اندازه گیری شد تا کمترین غلظت اتیدیوم بروماید موثر بر باکتری مشخص گردد. سویه هایی که خاصیت فلوروسنتی کمتری نسبت به باکتری کنترل (دارای فعالیت افلاکس) داشتند انتخاب شدند. در این مطالعه دو نوع باکتری می توانست به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گیرد: کنترل ۱ دارای بیشترین خاصیت فلوروسنتی (بیانگر عدم فعالیت افلاکس یا فعالیت فیزیولوژیک افلاکس) می باشد. کنترل ۲ فاقد خاصیت فلوروسنتی یا فعالیت خیلی کم فلوروسنت (نشانگر فعال بودن افلاکس و بیان سیستم افلاکس). در این مطالعه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* که فاقد فعالیت افلاکس می باشد به عنوان کنترل استفاده شد.

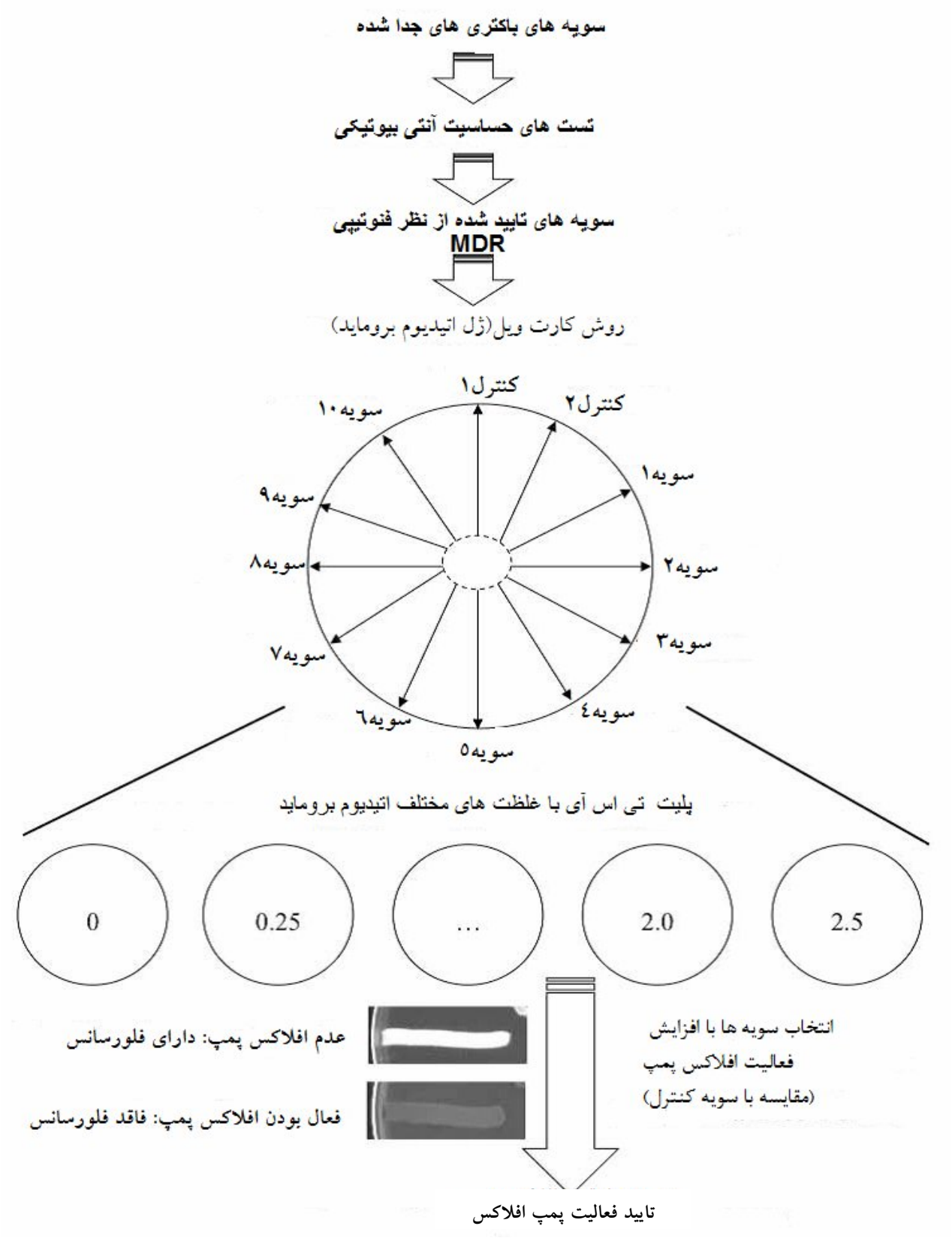
د) واکنش زنجیره ای پلی مراز: ابتدا DNA کروموزمی تمام ایزوله های جداسازی شده به روش فنوتیپی با استفاده از کیت تجاری استخراج DNA (سینا کلون، ایران) استخراج گردید. در ادامه خلوص DNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. به منظور تایید جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* از پرایمر اختصاصی ژن *16S rRNA* و به منظور شناسایی حضور ژن پمپ افلاکس *mex A* ،*mex B* از پرایمرهای اختصاصی ذکر شده در جدول ۱ استفاده گردید (۱۷).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، یک میکرولیتر منیزیم کلراید (۵۰ میلی مولار) ، یک میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ پیکومول)، ۱/۵ میکرولیتر dNTPs (۲۵ میلی مولار)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و ۲ میکرولیتر DNA الگو (۵ نانوگرم) انجام شد. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bioneer, Korean) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سلیسیوس به مدت یک دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت یک دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم برماید منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفتند (۱۸). در این مطالعه از سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27583) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

ه) آنالیز آماری: به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده ها از نسخه چهاردهم نرم افزار SPSS و آزمون های آماری مربع کای

www.SID.ir



شکل۱: آزمون سویه های باکتری با استفاده از روش کارت ویل (آگار حاوی اتیدیوم– بروماید).

www.SID.ir

جدول ۱: توالی پرایمر مربوط به ژن های مورد بررسی در مطالعه

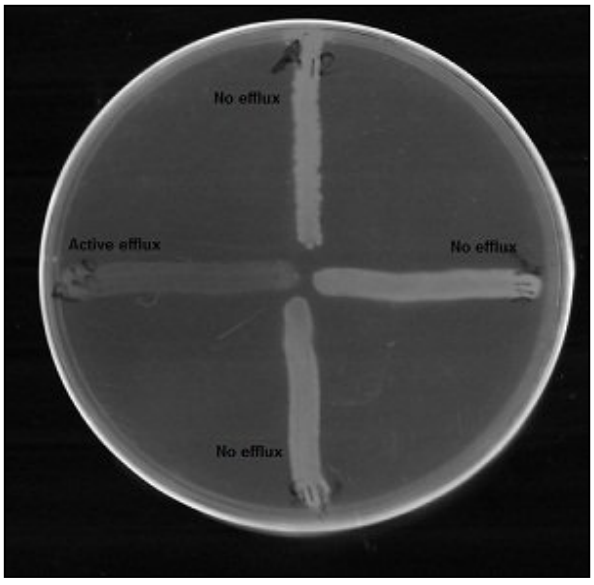
پرایمر	توالی پرایمر (۵'→۳')	اندازه محصول PCR (bp)
mexB-F	TGTCGAAGTTTTTCATTGATAG	۲۸۰
mexB-R	AAGGTCACGGTGATGGT	
16S rRNA-F	GGGGGACCAACCCTCCTCA	۸۴۳
16S rRNA-R	TCCAATGCTTCGGCACCAG	

و آزمون آماری t استفاده شد. مرز معنی داری بر روی $p\leq ۰/۰۵$ قرار داده شد.

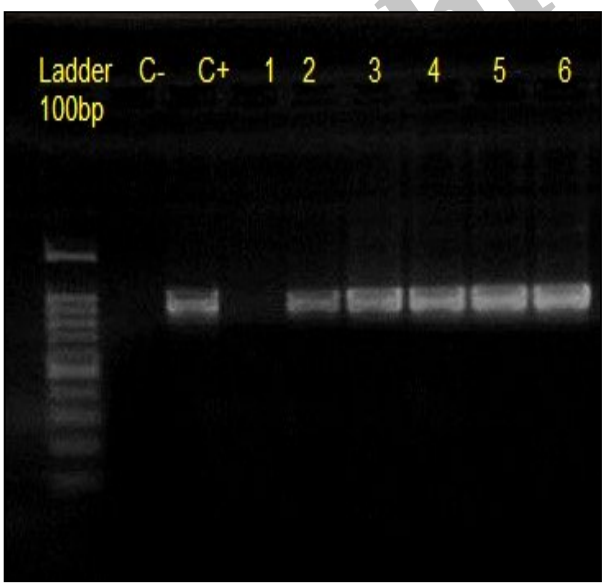
یافته ها

در این مطالعه از مجموع ۲۵۰ نمونه زخم بیماران دچار سوختگی، ۶۶ (۲۶/۴۰٪) جدایه *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی گردید. ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا* به تمامی آنتی بیوتیک های مورد بررسی با فراوانی ۱۰۰٪ مقاوم بودند. به جز آنتی بیوتیک کلی سیتین که تمامی جدایه ها نسبت به آن (۱۰۰٪) حساس بودند. نتایج حاصل از بررسی پرونده پزشکی بیماران نشان داد که *سودوموناس آئروژینوزا* شایع ترین میکروارگانیسم در بین بیماران سوختگی از روز چهارم به بعد بوده است.

مطالعه فنوتیپی بیان سیستم افلاکس با استفاده از اتیدیوم بروماید در سویه های بالینی مقاوم به چند دارو نشان دهنده حضور پمپ های افلاکس در ۴۴ جدایه (۶۶/۶۶٪) بود (شکل ۲). ارزیابی مولکولی فعالیت پمپ افلاکس نشان دهنده حضور ژن های *mexA* و *mexB* به ترتیب در ۶۱ (۹۲/۴۲٪) و ۵۸ (۸۷/۸۷٪) جدایه بود. همچنین ۳۹ جدایه (۸۸/۶۳٪) با مقاومت آنتی بیوتیکی دارای ژن *mexA* (p=۰/۱۶) و (۸۶/۳۶) ۳۸ جدایه دارای ژن *mexB* (p=۰/۴۶۲) بود.



شکل ۲: نتایج بررسی فنوتیپی فعالیت پمپ افلاکس. هر خط رشد متعلق به یک جدایه می باشد. خطوط کشت شفاف بیانگر عدم فعالیت پمپ افلاکس و خطوط کشت مات بیانگر فعال بودن سیستم افلاکس پمپ می باشد.



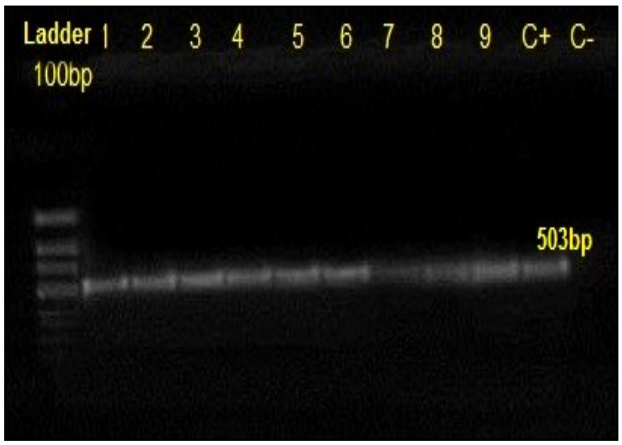
شکل ۳: نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *16S rRNA*. (C^+) کنترل مثبت، (C^-) کنترل منفی، ستون ۱) نمونه منفی، ستون های ۲ تا ۶) نمونه های مثبت آلوده به *سودوموناس آئروژینوزا* (۹۰۰ جفت باز)

www.SID.ir

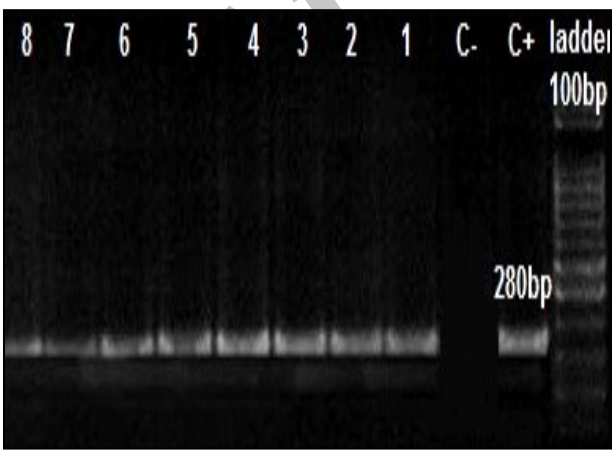
بحث

در مطالعه حاضر ۲۶/۴۰٪ نمونه های زخم بیماران سوختگی آلوده به *سودوموناس آئروژینوزا* بودند. ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* به تمامی آنتی بیوتیک های مورد بررسی با فراوانی ۱۰۰٪ مقاوم بودند. به جز آنتی بیوتیک کلیستین که تمامی جدایه ها نسبت به آن (۱۰۰٪) حساس بودند. با توجه به این نتایج، درمان و کنترل عفونت های ناشی از این ارگانیسم امری نگران کننده به نظر می رسد. همچنین با توجه به تاثیرات جانبی نامطلوب آنتی بیوتیک کلیستین بر روی سیستم عصبی انسان، این دارو برای درمان عفونت های *سودوموناس آئروژینوزا* مناسب نمی باشد. از طرف دیگر با نگاهی به مکانیسم عمل این آنتی بیوتیک که بر روی غشای ارگانیسم تاثیر دارد، می توان دریافت که با بهبود و بهینه سازی داروهای با مکانیسم تاثیر بر روی غشا این امکان وجود دارد که در آینده بتوان این نوع عفونت ها را کنترل نمود.

تاکنون مطالعات زیادی بر روی الگوی مقاومت دارویی *سودوموناس آئروژینوزا*های جدا شده از نمونه های بالینی صورت گرفته است. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۷ در مرکز درمانی سینا تبریز انجام شد از مجموع ۱۳۵ جدایه *سودوموناس آئروژینوزا* بیشترین مقاومت نسبت به کلیستین ۷۴٪، سفتازیدیم ۶۹٪، پیپراسیلین ۶۷٪ و کمترین آن نسبت به آمیکاسین ۱۵٪ و ایمی پنم ۲٪ بوده است (۱۹). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۰ در تهران انجام شد، از ۱۷۰ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* که به صورت مستقیم از زخم بیماران دچار سوختگی جداسازی شده بود، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به صورت آمیکاسین ۸۱/۷۰٪، پیپراسیلین ۶۷٪، ایمی پنم ۵۲/۹۰٪ ،جنتامایسین ۵۱٪ و کلیستین ۳۴/۱۰٪ گزارش گردید (۲۰). با مقایسه این نتایج با یافته مطالعه حاضر می توان به روشنی دریافت که این نتایج بیانگر افزایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به اکثر آنتی بیوتیک ها به استثنای کلیستین می باشد. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۲ در مرکز سوختگی شیراز بر روی ۱۵۰ نمونه زخم بیماران دچار سوختگی انجام شد، *سودوموناس آئروژینوزا* در ۲۶ نمونه (۱۷/۳۳٪) شناسایی گردید. از طرفی مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری نسبت به ایمی پنم، مروپنم و نسل سوم سفالوسپورین ها کم بوده است (۲۱). اما در مطالعه حاضر میزان شیوع عفونت ۲۶/۴۰٪ تعیین گردید. که بیانگر افزایش شیوع *سودوموناس آئروژینوزا*، به ویژه سویه های شدیداً مقاوم به آنتی بیوتیک ها می باشد. با مقایسه این نتایج با سایر نقاط کشور ملاحظه



شکل ۴: نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *mexA* (C^+) کنترل مثبت، (C^-) کنترل منفی، ستون های ۱ تا ۹) نمونه های مثبت حاوی ژن *mexA* (۵۰۳ جفت باز)



شکل ۵: نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *mexB* (C^+) کنترل مثبت، (C^-) کنترل منفی، ستون های ۱ تا ۸) نمونه های مثبت حاوی ژن *mexB* (۲۸۰ جفت باز)

www.SID.ir

می گردد که میزان مقاومت در حال حاضر در شیراز نسبت به دیگر نقاط کشور بالاتر است. در نگاه کلی به نتایج ارائه شده در این تحقیق می توان دریافت که آنتی بیوتیک های ایمی پنم، مروپنم و سفپیم به دلیل وجود مقاومت بالا دیگر به عنوان داروی ضد *سودوموناس* نمی توانند مطرح باشند.

الغروی (Al-Grawi) و همکاران در سال ۲۰۱۲ در عراق نشان دادند که تمامی ۵۳ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شده دارای ژن های *mexA* و *mexB* بوده اند (۲۲). این در حالی است که در پژوهش حاضر ۹۲/۴۲٪ سویه ها دارای ژن *mexA* و ۸۷/۸۷٪ دارای ژن *mexB* بودند. نتایج این مطالعه بیانگر این است که از لحاظ آماری بین وجود ژن های *mexA* و *mexB* و همین طور مقاومت‌های آنتی بیوتیکی *سودوموناس آئروژینوزا* ارتباط معنی داری وجود دارد. که این نتایج مشابه با نتایج مطالعه صالحی و همکاران در سال ۲۰۱۳ بود (۲۳).

اگر چه میزان شدید مقاومت دارویی ممکن است تنها به دلیل مقاومت چند دارویی پمپ‌های افلاکس نباشد. اما با توجه به نتایج ارزیابی فنوتیپی پمپ افلاکس در مطالعه حاضر که نشان دهنده حضور پمپ های افلاکس در ۴۴ جدایه (۶۶/۶۶٪) *سودوموناس آئروژینوزا* بود و همچنین درصد بالای حضور ژن های *mexA* و *mexB* در نمونه ها، همکاری و ارتباط بیان زیاد ژن های خاص در میان سویه های بالینی بسیار مقاوم به داروها نباید نادیده گرفته شود. هر چند که باید به خاطر داشت که مقاومت ذاتی نسبت به آنتی بیوتیک ها در برخی از ایزوله‌ها می تواند کاملاً ناشی از سیستم های افلاکس باشد (۲۴).

با مقایسه نتایج ارزیابی فنوتیپی و ژنوتیپی در این مطالعه می توان دریافت که درصد بروز فعالیت افلاکس ارزیابی شده به روش فنوتیپی نسبت به ژنوتیپی مقداری کمتر است. این امر را می توان به خاموش شدن ژن ها در اثر تنش های محیطی، میزان متفاوت درصد بیان این ژن ها در بین جدایه ها، درصد بیان پایین این ژن ها در بعضی جدایه ها، جهش های کروموزومی و یا تاثیرات داروهای مورد استفاده نسبت داد.

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه پیشنهاد می گردد که تعیین کم ترین غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری (MIC) و تست آنتی بیوگرام پیش از شروع درمان انجام گیرد. زیرا تا کشف آنتی بیوتیک های جدید و مؤثر می بایست با استفاده صحیح از داروهای موجود، امکان درمان مناسب بیماری های عفونی را فراهم نمود. از سوی دیگر با کامل کردن دوره درمان و تا حد امکان عدم استفاده از چند آنتی بیوتیک به طور هم زمان، از پیدایش سویه های مقاوم جلوگیری نمود.

مطالعه حاضر به منظور بررسی اختصاصی مقاومت وابسته به پمپ های افلاکس در *سودوموناس آئروژینوزا* تلفیقی از روش فنوتیپی و ژنوتیپی را به صورت هم زمان پیشنهاد می کند. با توجه به اهمیت پمپ افلاکس در فرآیند بیماریزایی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* این مطالعه زمینه جدیدی را برای مطالعه فرآیندهای مولکولی موثر در افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی باز می نماید.

نتیجه گیری

یافته های به دست آمده در این مطالعه نشان می دهد که روش ژنوتیپی بسیار دقیق و قابل اعتماد تر از روش فنوتیپی در تشخیص پمپ‌های افلاکس در جدایه های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* می باشد. با توجه به حضور بیش از ۹۰٪ ی ژن های پمپ افلاکس در *سودوموناس آئروژینوزا*، بررسی حضور این ژن ها در پیشنهاد الگوی درمانی مناسب بیماران آلوده به این باکتری حائز اهمیت است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از خانم ها ندا پیربنیه، میترا زردشت و مرکز سوختگی بیمارستان قطب الدین شیرازی به دلیل همکاری صمیمانه در اجرا این پژوهش کمال امتنان را دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Webber M, Piddock L. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother. 2003; 51(1): 9-11.

2. Nikaido H. Multiple antibiotic resistance and efflux. Curr Opin Microbiol. 1998; 1(5): 516-523.

3. Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-positive bacteria and the *mycobacteria*. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(10): 2595-2599.

4. Pao SS, Paulsen IT, Saier MH. Major facilitator superfamily. Microbiol Mol Biol Rev. 1998; 62(1):1-34.

5. Van Veen HW, Konings WN. The ABC family of multidrug transporters in micro organisms. BBA Bioenergetics. 1998; 1365(1): 31-36.

6. Saier MH, Paulsen IT, Sliwinski MK, Pao SS, Skurray RA, Nikaido H. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. FASEB J. 1998; 12(3): 265-274.

7. Nikaido H. Antibiotic resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps. Clin Infect Dis. 1998; 27(Supplement 1): S32-S41.

8. Tseng TT, Gratwick KS, Kollman J, Park D, Nies DH, Goffeau A, Saier MH Jr. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. J Mol Microbiol Biotechnol. 1999; 1(1): 107-125.

9. Brown MH, Paulsen IT, Skurray RA. The multidrug efflux protein *NorM* is a prototype of a new family of transporters. Mol Microbiol. 1999; 31(1): 394-405.

10. Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol Rev. 1996; 60(4): 575-608.

11. Dinh TQ, Smith CD, Du X, Armstrong RW. Design, synthesis, and evaluation of the multidrug resistance-reversing activity of D-glucose mimetics of hapalosin. J Med Chem. 1998; 41(6): 981-987.

12. Hansen LH, Johannesen E, Burmølle M, Sørensen AH, Sørensen SJ. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquindox in *Escherichia coli*. Antimicrob Agent Chemother. 2004; 48(9): 3332-3337.

13. Japoni A, Anvarinejad M, Farshad S, Giammanco GM, Rafaatpour N, Alipour E. Antibiotic susceptibility patterns and molecular epidemiology of metallo-β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. Burn. 2014; 5(9): 212-219.

14. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for "*Candida*" spp.," *Cryptococcus neoformans*", and " *Aspergillus fumigatus*": application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2009). Diagn Microbiol Infect Dis. 2011; 69(1): 45-50.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Martins M, Viveiros M, Couto I, Costa SS, Pacheco T, Fanning S. Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method. In Vivo. 2011; 25(2): 171-178.

16. Martins M, Santos B, Martins A, Viveiros M, Couto I, Cruz A. An instrument-free method for the demonstration of efflux pump activity of bacteria. In Vivo. 2006; 20(5): 657-664.

17. Palka-Santini M, Cleven BE, Eichinger L, Krönke M, Krut O. Large scale multiplex PCR improves pathogen detection by DNA microarrays. BMC Microbiol. 2009; 9(1): 1.

18. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual: Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY; 1982.

19. Yousefi S, Nahaei M, Farajnia S, Ghojazadeh M, Akhi M, Sharifi Y. Class 1 integron and imipenem resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence and antibiotic susceptibility. Iran J Microbiol. 2010; 2(3): 115.

20. Mirsalehian A, Akbari F, Bahador A. Frequency of metalo B-lactamase producer strains of *P. aeruginosa* isolated from burned patients. Tehran Uni Med J. 2010; 2: 562-569.

21. Mohammadi A, Tolidei R, Moein M. The percentage of infection amoung burn patients in Ghotbodin Shirazi Burn Hospital Shiraz University of Medical Sciences. JRC. 2012; 2: 105-115.

22. Al-Grawi IGA, Al-Absali Ak, Kareem NH, Belal SA-L. Occurrence of *mexAB-oprM* efflux pump operon on septicemic *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. Iraq Postgrad M J. 2012; 11(1): 97-102.

23. Salehi M, Hekmatdoost M, Hosseini F. Quinolone resistance associated with efflux pumps *mexAB-oprM* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Microbial World. 2014; 6 (4): 290-298.

24. Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multi-drug resistance efflux pumps in bacteria. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(2): 382-402.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 2, June 2014

Original Article

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

Yahya Dashtizadeh[1], Afagh Moattari[2], Ali Akbar Gorzin[3]

[1] MS.c., Department of Microbiology, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Bacteriology and Virology, Shiraz University of Medical Science, Shiraz, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of Bacteriology and Virology, Shiraz University of Medical Science, Shiraz, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Pseudomonas aeruginosa* is an important cause of nosocomial infections in burnt patients. Antibiotic resistance through various mechanisms is one of challenges for treatment of these patients. The mex efflux pumps play a vital role in the development of multiple resistances to antimicrobial drugs. This study aimed to analyze the prevalence of genes responsible for efflux pumps mexA-B-oprM and to investigate their phenotypes in the isolates.

Materials & Methods: In this cross-sectional study, 250 swabs were obtained from wounds of the patients suffering of burns levels 2 and 3 who admitted in Ghotbodin Shirazi hospital, Shiraz. Presence of *P. aeruginosa* isolates were confirmed by biochemical tests and PCR. Drug susceptibility, the phenotypic activity of efflux pumps and the presence of *mex A*, mex *B* genes were determined using disk diffusion method, cartwheel method and PCR methods, respectively.

Results: In this study, 26.40% (66 cases) of patients with burn wounds were infected with *P. aeruginosa*. These bacteria were resistant to all antibiotics tested except for colistin. Totally, 66.66% of the isolates (44 cases) had an efflux pump, among them 42.92% and 87.87% of the isolates carried *mexA* and *mexB* genes, respectively.

Conclusion: Our finding showed that genotypic method is very accurate and reliable than phenotypic methods for detection of efflux pumps in clinical isolates of *P. aeruginosa*. Due to presence of the efflux pump genes in more than 90% of the *P. aeruginosa* isolates, analysis of the presence of these genes is very important for suggestion of an effective treatment model for the patients with bacterial infection.

Keywords: Burned patients, *Pseudomonas aeruginosa*, Efflux pumps.

Correspondence to: Afagh Moattari

Tel: +989173136844

E-mail: moattaria@sums.ac.ir

Journal of Microbial World 2014, 7(2): 118-127.

Archive of SID

www.SID.ir