Archive of SID

Iranian Journal of Medical Microbiology | ISSN:2345-4342

Investigating the Antibiotic Resistance Prevalence and Phenotypic and Genotypic Evaluation of AcrAB-OprM Efflux Pump in Multidrug-resistant in Clinical Isolates of *Moraxella catarrhalis* in Kazerun City, Iran

Parvin Mohammad Shafiei[1], Majid Baserisalehi[1*], Sina Mobasherizadeh[2]

1. *Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Kazeroun, Iran*
2. *Hospital Infection Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran*

10.30699/ijmm.14.5.388

ABSTRACT

Background: *Moraxella catarrhalis* a gram-negative bacterium, is a significant cause of lower and upper respiratory infections. The RND family efflux pumps lead to multidrug resistance in gram-negative bacteria. One of the well-known pumps in *M. catarrhalis* is AcrAB-OprM system. This study aimed to investigate the antibiotic resistance in *M. catarrhalis* and to determine its antibiotic resistance dependence on the efflux pump.

Methods: In this study, 137 different clinical samples were collected. *M. catarrhalis* isolates were confirmed by biochemical assays and PCR. The antibiotic susceptibility pattern was investigated by disc diffusion method according to CLSI. Phenotypic study of the efflux pumps activity was done using cartwheel method. Study of the *acra*, *acrb*, and *oprm* genes were performed by, PCR. In addition, the association of efflux pump with antibiotic resistance was investigated using phenylalanine-arginine β-naphthylamide.

Results: Of 10 isolated *M. catarrhalis*, 70% (7 isolates) showed multiple antibiotic resistance. The resistance to cefazolin, ceftazidime, tetracycline, chloramphenicol, and ciprofloxacin antibiotics was also dependent on the efflux pump.

Conclusion: The results showed that multiple antibiotic resistance has increased in *Moraxella catarrhalis*. The 70% presence of *acra*, *acrb*, *oprm* efflux genes of the efflux pumps in this bacterium and antibiotic resistance reduction in the presence of efflux pump inhibitor shows the importance of examining these genes' presence to suggest a suitable treatment model for the patients infected with *M. catarrhalis*.

Keywords: *acra, acrb,* Efflux Pump, *Moraxella catarrhalis,* Multidrug resistance, *oprm,* PAßN

Received: 2020/06/13; **Accepted**: 2020/08/10; **Published Online:** 2020/09/01

Corresponding Information: **Majid Baserisalehi,** Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Kazeroun, Iran. Email: Majidbaseri@hotmail.com

Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online

Mohammad Shafiei P, Baserisalehi M, Mobasherizade S. Investigating the Antibiotic Resistance Prevalence and Phenotypic and Genotypic Evaluation of AcrAB-OprM Efflux Pump in Multidrug-resistant in Clinical Isolates of Moraxella catarrhalis in Kazerun City, Iran. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (5) :388-407

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks

Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

www.SID.ir

Archive of SID

Introduction

Moraxella catarrhalis is a non-motile and non-pigmented gram-negative diplococcus considered as a nonpathogenic bacteria and respiratory system normal flora up until 1995, however; recognized as a human pathogenic agent afterwards **(1)**. These bacteria can cause upper and lower respiratory tract infections in adults **(1-3)**. Subsequent to *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*, *M. catarrhalis* is a leading bacterial infection agent responsible for 15% to 20% of the cases **(4)**.

Due to their broad innate and induced resistance to numerous antibiotic families, treating such respiratory infections is troublesome for medical practitioners **(3)**. These bacteria are known for their exclusive innate antibiotic resistance and very likely acquired antibiotic resistance **(5)**. Antibiotic resistance has led to several difficulties *M. catarrhalis* infection treatment.

Innate resistance in the bacteria can be on account of drug enzyme inhibition such as inhibition of beta-lactamase which transforms β-lactam using hydrolysis, bacteria cell membrane permeability alteration which leads to drug resistance such as purines, and expressing active secretion systems or efflux pumps **(5)**. Due to their broad substrate variety, efflux pumps in this family have been divided into five grand groups including RND (Division Nodulation Resistance) multidrug efflux pumps **(6)**.

AcrAB-OprM is an efflux system of RND family in *M. catarrhalis.* The pump consists of an inner membrane pump (AcrB), an outer membrane channel (OprM), and a periplasmic adaptor protein (AcrA) that facilitates outer and inner membrane antibiotic transmission in the bacteria. As AcrAB-OprM substrates, drugs can elevate *acrAB-oprM* expression which can lead to multidrug resistance **(5)**.

Efflux pumps not only increase minimal inhibition concentration (MIC) of antibiotics, but also develop drug-resistant lineages using proton motive force (PMF) and decreasing drug concentration **(7, 8)**. With increasing efflux pump expression, these bacteria resist to a wide range of drugs. Their synergism with other drug resistance mechanisms is of great importance and should be studied like other resistance mechanisms **(8-10)**. Recognition and inhibition of efflux pumps seem promising reinforcements for antibacterial substances efficacy. In the recent years, numerous inhibitors including natural products, various antibiotics, and synthetic molecules have been tested on gram positive and gram-negative bacteria in order to solve the resistance problem **(11)**. Considering the ever-increasing bacterial resistance, and the outstanding role efflux pumps play in it, discovering resistance adjusting factors or more specifically, efflux pump inhibitors (EPIs) is of great importance so that designing novel drugs necessitates recognizing and understanding resistance inducing systems in efflux pumps **(8, 9, 11)**.

Increasing antibiotic resistance in the bacteria is a global infectious and respiratory diseases risk. According to the absence of phenotypic and genotypic studies on the role of efflux pumps in *M. catarrhalis* infection resistance in Iran, this study aims to assess phenotypic and genotypic prevalence of *acrAB-oprM* efflux pump genes as significant antibiotic resistance agents in *M. catarrhalis* and inhibit efflux pumps using phenylalanine-arginine β-naphthylamide (PaβN) as a clinical practice.

Materials and Methods

Sampling and Identification of Bacteria

In this cross-sectional descriptive study, sampling was done on patients aged 3-75 years, both male and female, with respiratory infections and pneumonia referred to Bagherul Uloom clinic and laboratory and Valiasr Hospital clinic in Kazerun from December 2015 to May 2016. Inclusion criteria were patients referred for suspected tuberculosis, samples with respiratory infections, adult smokers with chronic bronchitis and sinusitis and children with acute middle ear infection. The above identification was made by a specialist.

Finally, 137 samples of sputum and throat swab (oral and laryngeal pharynx), and purulent secretions of the middle ear taken under standard conditions, were transferred to the laboratory. Samples were cultured in the laboratory for 24 h on chocolate agar and blood agar (Merck-Germany) growth mediums. Standard microbiological and biochemical tests to differentiate bacteria, including gram staining, oxidase, catalase, DNase, the glucose fermentation test (glucose, sucrose, maltose, fructose, and lactose), and nitrate reduction were used to identify and isolate *M. catarrhalis* bacteria **(12)**.

Determination of Antibiotic Susceptibility by Kirby-Bauer Method

The pattern of antibiotic susceptibility in the strains obtained using the disk diffusion method (Kirby-Bauer) was investigated in accordance with the guidelines of the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) version 2016.

Turbidity equivalent to 0.5 McFarland tube was prepared and then cultured on the Mueller-Hinton-Agar growth medium (Merck, Germany) for 24 h and then antibiotic disks (Padtan Teb, Iran) were placed on the growth medium. Antibiotic resistance to penicillin (10 µg), ampicillin (10 µg), erythromycin (15 µg), chloramphenicol (30 µg), clarithromycin (15 micrograms), cefazolin (30 µg), coamoxyclav (10+20 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25-23.75 µg),

www.SID.ir

Archive of SID

tetracycline (30 µg), ciprofloxacin (15 µg), azithromycin (15 µg), amikacin (30 µg), gentamicin (10 µg) and ceftazidime (30 µg) (Himedia, India) was investigated. After 24 h at 37°C, the diameter of the growth inhibition zone around the discs were measured and the strains were divided into susceptible, semi-susceptible, and resistant groups according to the CLSI guidelines. Isolates that showed resistance to more than two classes of antibiotics were introduced as strains with multiple MDR resistance **(13)**.

Identification of *Moraxella catarrhalis* by PCR

Identifying *M. catarrhalis* with multidrug resistance was confirmed by the SrRNA16 sequence (Table 1). DNA of these samples was extracted by Kit (Yekta Tajhiz, Iran). PCR reaction was performed on a final volume of 25 µL including 18 µL of Mastermix (Yekta Tajhiz, Iran), 3 µL of deionized distilled water, 1 µL of each forward and reverse primer, and 2 µL of template DNA. PCR program included initial denaturation at 94°C for 5 min, 35 thermal cycles including degreasing at 94°C for 20 sec, primer binding at 60°C for 30 sec, amplification at 45°C for 72 sec and the final amplification at 72°C for 2 min.

Amplified DNA was sent to Macrogen Korea Company for sequencing, and the identified sequences were blasted for gene analysis.

Phenotypic Study of Efflux Pump Using Ethidium Bromide-Agar Cartwheel Method

In order to evaluate the phenotypic activity of efflux pumps, the isolates of *M. catarrhalis* were examined by Ethidium Bromide-agar Cartwheel method. First, ethidium bromide solution (Merck, Germany) was prepared in distilled water at a concentration of 50 mg/mL and stored at 4°C. Plates containing nutrient agar growth medium (Merck, Germany) were prepared with ethidium bromide concentrations from 0 to 2 mg/L. Strains were then cultured on nutrient agar plates containing different concentrations of ethidium bromide from the center of the medium to the side of the medium as a line. Concentrations depended on the type of bacteria and can be variable. The plates were incubated for 24 h at 37°C. Fluorescence of each isolate was measured with Gel Documentation (Hidolgh-Germany) to determine the lowest concentration of ethidium bromide affecting the bacteria **(14, 15)**.

Phenotypic Evaluation of Efflux Pump Using Phenylalanine-arginine β-naphthylamide (Efflux Pump Inhibitor)

Phenylalanine-arginine β-naphthylamide dihydrochloride (Phe-Arg ß-naphthylamide dihydrochloride) was used to evaluate the phenotypic presence of efflux pump. First, two series of Mueller-Hinton agar growth medium (Merck-Elman) were prepared, the first series without inhibitory solution and the second series containing efflux pump inhibition solution. In Mueller-Hinton agar growth medium containing inhibitor, to dilute 0.25 mg phenylalanine β-naphthylamide dihydrochloride powder, 0.05 mg of this substance was dissolved in 30 mL of sterile distilled water and then 1 mL of this solution was transferred to empty sterile plates. Mueller-Hinton agar was then added to the plates **(11)** and multidrug-resistant *M. catarrhalis* isolates were cultured. Then standard discs, penicillin, ampicillin, amikacin, gentamicin, tetracycline, chloramphenicol, cefazolin, ceftazidime, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ciprofloxacin disks were placed on the medium at standard intervals. The cultures were incubated at 37°C for 24 h and then the inhibited growth area was measured using a millimeter ruler. Measurements were classified as susceptible, resistant, semi-susceptible according to CLSI defined standards **(13)**. The diameter of the inhibition zone was measured in two groups of plates containing phenylalanine-arginine β-naphthylamide and without phenylalanine-arginine β-naphthylamide. Increased diameter of the inhibition zone in the presence of the inhibitor indicates the effect of the efflux pump on antibiotic resistance. The results were analyzed using WHONET 5.6 software (WHO, Geneva Switzerland).

Frequency of Efflux Pump *acrAB-oprM* Gene in Multidrug-Resistant Isolates of *M. Catarrhalis*

PCR with specific primers was used to identify the efflux pump gene in multidrug-resistant isolates. Primers of efflux pump *M. catarrhalis* efflux pump genes were designed using the genes in NCBI and bioinformatics methods (Table 1).

Table 1. Designed primers used in the study.

Gene length (Base pair)	Primer	Gene
1360bp	F: 5′ CAGGCCTAACACATGCAAGTC3′ R: 5′ GGGCGGAGTGTACAAGGC3′	*16s rRNA*
692 bp	F: 5′ GCCAGTCAAAAACAGCAAGC3′ R: 5′ TAATCCACCAATGCCGACTG3′	*oprm*

www.SID.ir

Archive of SID

Gene length (Base pair)	Primer	Gene
1061bp	F: 5′ TTGGTTTAGAAGGCGGTGGC3′ R: 5′ TAGTATGGTGCAGGCAGGAC3′	*acra*
719 bp	F: 5′ ACCACAGGTGAGGCAAGTAT3′ R: 5′ TGCCGATGGCGTTTGTTAAAT3′	*acrb*

At this point, Mastermix of Yekta Tajhiz (Iran) was used. The PCR mixture consisted of 18 µL of Mastermix, 1 µL of each of the forward and reverse primers, 2 µL of template DNA, and 3 µL of double distilled water with a total volume of 25 µL. The desired Mastermix was mixed with the primers of the efflux pump and the tubes containing the PCR mixture in a thermocycler (Sangavar-Bio-Rad) with a temperature program of 15 sec was initially denatured at 95°C and then 35 cycles including denaturing at 94°C for 5 sec, connection at 58°C for 15 sec, elongation at 72°C for 30 sec, and finally final elongation at 72°C for 120 sec were done. PCR products were then transferred to 2% agarose gel and identified by Gel Documentation electrophoresis (Hidolgh, Germany).

Data Analysis and Statistical Analysis

Data were evaluated using WHONET 5.6 software (WHO, Geneva Switzerland) according to CLSI (2016 version) and SPSS version 22 (SPSS Inc., Chicago, IL., USA). Chi-square test (chi-square) was used to analyze the relationship between the presence of efflux pump genes and drug resistance and an independent t-test was used to analyze the relationship between antibiotics and dependence on the efflux pump before and after using the pump inhibitor. 95% confidence level was considered for the significance of the tests ($P \leq 0.05$).

Results

After performing standard microbiological and biochemical tests, out of 137 randomly collected samples, including 80 men and 57 women aged 3-75 years, 10 isolates were identified as *M. catarrhalis*. The frequency of *M. catarrhalis* isolates by age and sex is shown in Table 2.

Table 2. Frequency of *Moraxella catarrhalis* isolates by age and sex.

Sample	Age	Sex	Sample	Age	Sex
N_1	65	Male	N_6	3	Male
N_2	72	Male	N_7	72	Male
N_3	69	Male	N_8	75	Male
N_4	5	Female	N_9	45	Female
N_5	66	Male	N_{10}	68	Male

Frequency of *M. catarrhalis* isolates divided by clinical samples, 3 cases of sputum in patients with lower respiratory tract infection (30%), 1 case of smoker sputum with chronic bronchitis (10%), 2 cases of sputum in people with suspected tuberculosis (20%), as well as 2 cases of the adult hypopharynx and oropharynx swabs with sinusitis infection (20%) and 2 cases of purulent middle ear swabs in children (20%) were reported.

Results of Antibiotic Resistance by Disk Diffusion Method

According to the 2016 CLSI standard, out of 10 bacteria isolated from clinical samples, 7 isolates (70%) had the highest antibiotic resistance to the penicillin, ampicillin, amikacin, gentamicin, chloramphenicol, tetracycline, ciprofloxacin, cefazolin, ceftazidime and lower resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole which showed to be resistant to more than two classes of antibiotics and were selected as MDR strains. All strains of bacteria were susceptible to amoxicillin/clavulanic acid (co-amoxiclav), azithromycin and erythromycin, and clarithromycin (100%). It was also found that none of the strains of *M. catarrhalis* are resistant to all antibiotics and the amoxicillin/clavulanic acid, clarithromycin, erythromycin, azithromycin antibiotics can be effective with 100% susceptibility.

Identification Results of *Moraxella catarrhalis* Isolated by PCR Test

After measuring the diameter of the inhibition zone, 7 isolates resistant to more than two classes of antibiotics were selected to perform the rest of the

www.SID.ir

Archive of SID

steps of this study. Using SrRNA16 specific primer, the isolates resistant to several drugs were identified. The formation of a band of 1360 pairs showed the presence of *M. catarrhalis* (Figure 1).

Phenotypic Results of the Presence of Efflux Pump Using Ethidium Bromide and Cartwheel Method

To identify the efflux pump activity of *M. catarrhal* isolates, all isolates in the study were cultured with ethidium bromide agar technique and Cartwheel method. The results showed that 7 isolates (70%) had an efflux pump (also to ensure the presence of the Influx pump, all 10 isolates were evaluated). As shown in Figure 2, after being placed under a Gel Documentation device, 7 isolates of *M. catarrhalis* were unable to store these dyes in the cell.

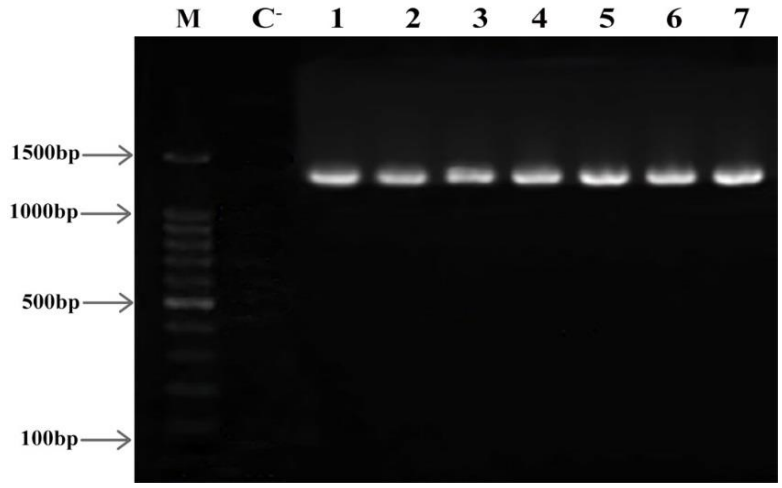


Figure 1. Electrophoresis of *16SrRNA* gene product on 2% agarose gel M: Marker (Gene Ruler 100 bp) C-: Negative Control 1-7 columns: multidrug-resistant isolates Product Length: 1360 bp

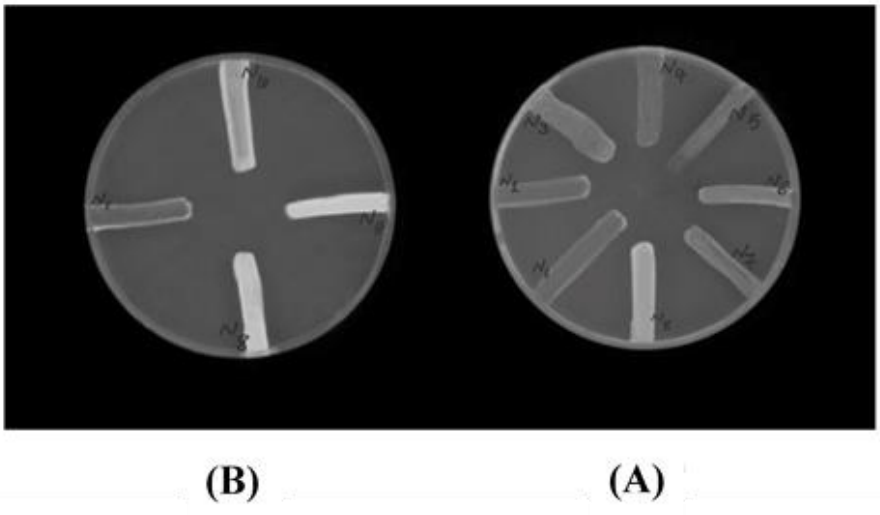


Figure 2. Results of phenotypic analysis of efflux pump. Each line is indicative of a *Moraxella catarrhalis* isolate. Hyaline lines are indicative of efflux pump inactivation and opalline lines are indicative of efflux pump activation. A: Fluorescence plate including 0.5 g/mL ethidium bromide and B: Fluorescence plate including 1 g/mL ethidium bromide

Results of the Dependence of Antibiotic Resistance on Efflux Pump Activity Using Efflux Pump Inhibitor

After the addition of the efflux pump inhibitor to the growth medium, cefazolin, ceftazidime, ciprofloxacin, chloramphenicol, tetracycline antibiotics became more antibacterial (Figure 3). These antibiotic resistance of M. catarrhalis isolates were dependent on the efflux pump because their growth inhibition zone changed compared to the first antibiogram (absence of inhibitor) and the diameter of the inhibition zone increased in the presence of inhibitor. Therefore, this issue shows the effect of the efflux pump on antibiotic resistance.

www.SID.ir

Archive of SID

Results of Frequency Study of *acra*, *acrb*, *oprm* Genes

After amplification of *acra*, *acrb*, and *oprm* genes for all multidrug-resistant *M. catarrhalis* isolates, PCR products were observed in bands according to Figures 4, 5 and 6 on 2% agarose gel. The efflux pump genes were present in all 7 multidrug-resistant isolates (Figures 4, 5, 6).

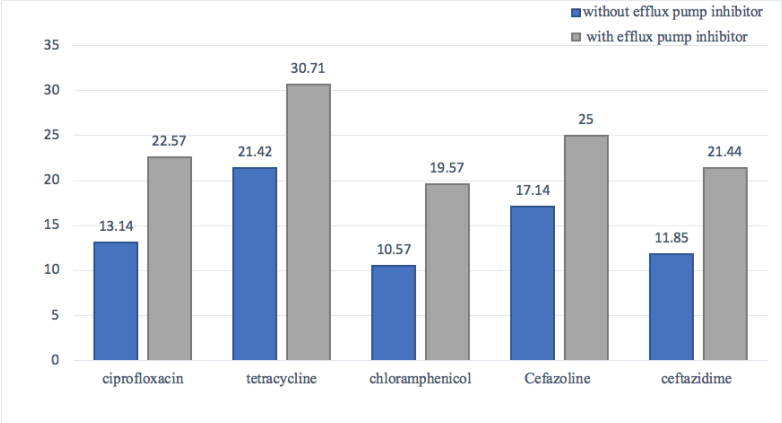


Figure 3. Comparing *Moraxella catarrhalis* isolates resistance patterns to ciprofloxacin, tetracycline, chloramphenicol, cefazoline, and ceftazidime with and without efflux pump inhibitor presence.

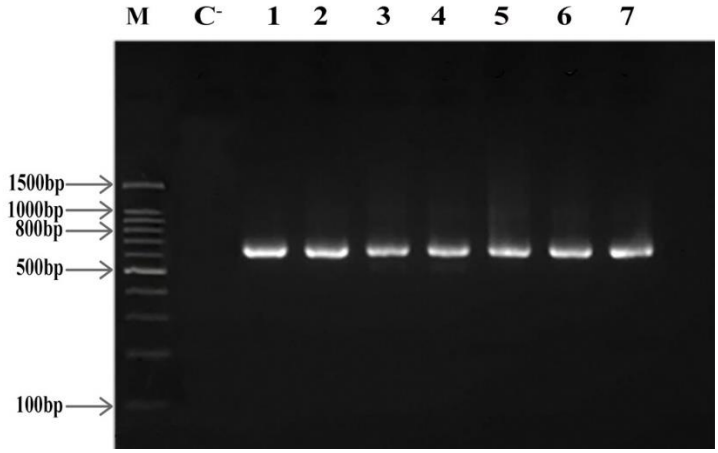


Figure 4. *oprm* electrophoresis on 2% agarose gel, M: Marker (Gene Ruler 100 bp), C⁻: Negative Control, 1-7 columns: multidrug-resistant isolates, Product Length: 692 bp

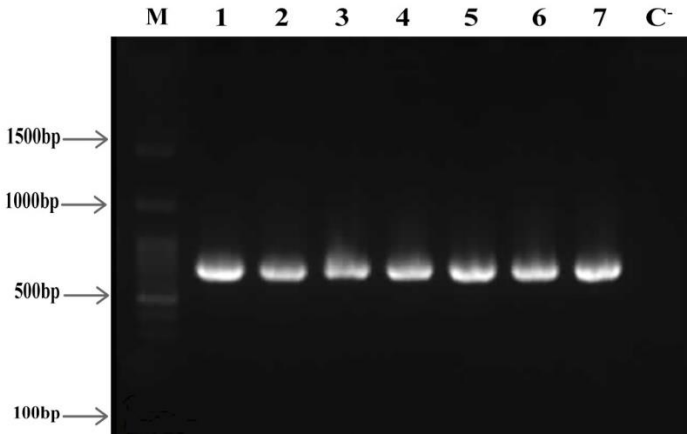


Figure 5. *acrb* electrophoresis on 2% agarose gel, M: Marker (Gene Ruler 100 bp), C⁻: Negative Control, 1-7 columns: multidrug-resistant isolates, Product Length: 719 bp

www.SID.ir

Archive of SID

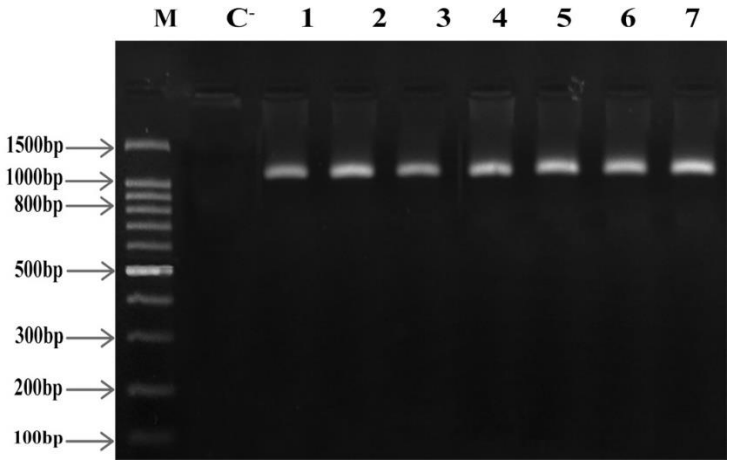


Figure 6. *acra* electrophoresis on 2% agarose gel, M: Marker (Gene Ruler 100 bp), C-: Negative Control, 1-7 columns: multidrug-resistant isolates, Product Length: 1061 bp

Also, according to the Chi-square test, a significant relationship was observed at the level of P-value≤0.05 between antibiotic-resistant isolates and the presence of *acla*, *acrb* and *oprm* genes in the efflux pump and no significant relationship was observed at the level of P-value≤0.05 for the four co-amoxiclav, erythromycin, azithromycin, and clarithromycin antibiotics, which were reported to be susceptible in all isolates.

Discussion

Moraxella catarrhalis has been reported in recent years as an important factor in lower and upper respiratory infections and it is the most common type that can be isolated from sputum, middle ear secretions, sinuses, and throat and mouth swabs **(5)**. In this study, a total of 10 cases of *M. catarrhalis* were isolated from 137 different clinical samples. In a study conducted by Ghaznavi *et al*. (2005) on 200 patients, 17 samples of *M. catarrhalis* were isolated **(16)**. A 2016 study by Sillanapau *et al*. on 222 specimens isolated 22 cases of *M. catarrhalis* **(17)**. In a Miravitlles study of 48 patients with chronic obstructive pulmonary disease, eight *M. catarrhalis* patients (9%) isolated as the main cause of the disease **(18)**. The mentioned values are somewhat consistent with the number of bacteria isolated in this study (10 samples). However, the small difference observed may be due to the different prevalence of bacteria in different geographical areas.

The results of antibiotic susceptibility showed that the highest resistance was related to gentamicin, amikacin, penicillin G, ampicillin, ceftazidime, cefazolin, tetracycline, chloramphenicol, and ciprofloxacin (70%). Isolates of this study showed moderate resistance to trimethoprim-sulfame-thoxazole antibiotics. Also, the isolated strains were completely susceptible to azithromycin, erythromycin, clarithromycin, and amoxicillin/ clavulanic acid antibiotics (100%).

Various studies have been performed to evaluate the antibiotic resistance of *M. catarrhalis* strains. In 2006, Naderi *et al*. isolated 54 samples of *M. catarrhalis* from 1161 children and examined the pattern of antibiotic resistance, with the highest susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid (100%) and the highest resistance to penicillin (100%) **(19)**. A 2014 study by Bandet *et al*. showed that all strains of isolated *M. catarrhalis* were highly susceptible to amoxicillin/clavulanic acid, erythromycin, and clarithromycin antibiotics **(20)**. These results are consistent with the findings of the present study, which were 100% susceptible to amoxicillin/clavulanic acid and macrolides. Also, in a similar study conducted by Abdullah *et al*. in 2013 on 766 patients, 39 strains of *M. catarrhalis* were isolated, with the highest resistance to amikacin (92.3%) and the highest susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid (100%). A study by Ramadan *et al*. in 2012 examined 200 patients, of whom 91.3% were resistant to penicillin and 100% susceptible to amoxicillin/clavulanic acid, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, and 97.7% to tetracycline **(22)**.

From the comparison of the present study and other studies published in the field of the prevalence of antibiotic-resistant strains of *M. catarrhalis* bacteria, it is clear that antibiotics such as penicillin, ampicillin, ceftazidime, cefazolin, chloramphenicol, tetracycline, ciprofloxacin, gentamicin, amikacin can no longer be used as a drug against *M. catarrhalis* due to repeated reports of resistance. One of the reasons for the

www.SID.ir

Archive of SID

increase in resistance in recent years is the excessive use of antibiotics, geographical and cultural factors such as the arbitrary use of antibiotics, and the availability of antibiotics, each of which has a role to play in increasing antibiotic resistance **(23)**.

The AcrAB-OprM multidrug leakage system is the first pump under study in *M. catarrhalis*, which is a homolog of the efflux pump in *Escherichia coli* **(5, 24)**. The number of studies performed on the efflux pump genes in *M. catarrhalis* is relatively limited and there are not many studies in this field. According to the results obtained in this study with phenotypic and genotypic tests, the presence of this pump and its involvement in antibiotic resistance were declared. The strength of this study was the phenotypic study at the same time as the genotypic study of the efflux pump activity, because despite the fact that the genotypic method is more accurate and reliable, simultaneous phenotypic and genotypic methods show more reliable results. One of the advantages of the phenotypic method is the faster cultivation and less expensive identification of the efflux pump **(14, 15)**.

Also, the Cartwheel method, in addition to determining the phenotypic activity of the efflux pump, which shows the MDR phenotype in clinical isolates of gram-positive and gram-negative pathogenic bacteria; provides a rapid comparison of the activity of efflux resulting from isogenic mutations in the laboratory caused by continuous irradiation, deletion of a gene or group of genes, or growth of a bacterial strain under different conditions (temperature, pH, etc.) **(14)**.

Based on the evidence, the activity of the efflux pump systems in *M. catarrhalis* was not previously fully identified. According to recent studies and PCR results of isolated strains in this study, it is shown that there are a number of efflux pumps in the *M. catarrhalis* bacteria and due to the increased resistance of *M. catarrhalis* and the increase in respiratory diseases, the study of these genes can be important in examining the treatment pattern of infectious and respiratory patients **(5, 24)**. Using sequencing data for the BBH18 strain of *M. catarrhalis* in 2015, Spaniol *et al*. showed that Acr and Mtr efflux pumps were present. Also, following the previous studies, the authors (in 2010) showed that after treatment with amoxicillin, purine M35 is negatively regulated, which leads to increased resistance. These cascading reactions represent a new mechanism of resistance to aminopenicillins in *M. catarrhalis*. The role of AcrAB-OprM efflux pump in antibiotic resistance was also identified in that study by constructing mutant strains containing *acrA*, acrB, and *oprM* genes in *M. catarrhalis* O33E **(5)**.

The phenylalanine-arginine-β-naphthylamide dihydrochloride inhibitor is one of the first inhibitors of RND pumps in gram-negative bacteria **(26, 27)**. Studies show that by disrupting efflux pumps in resistant strains of bacteria with the help of efflux inhibitors, the properties of antibiotics and biocides are significantly increased **(28)**. In a 2015 study by Gholami *et al*., examining 60 species of *Acinetobacter baumannii*, it was shown that susceptibility to imipenem increased in the presence of a phenylalanine-arginine-β-naphthylamide dihydrochloride inhibitor. So that for 96.6% of the isolates, the minimum inhibitory concentration decreased from 4 to 64 µg/mL **(29)**. In 2013, Dal *et al*. examined the effect of PAßN and NMP inhibitors on the *adeB* gene in 40 *Acinetobacter* isolates. The antimicrobial properties of some antibiotics along with the efflux inhibitor increased significantly, but no significant change was reported in aminoglycosides **(30)**. In 2010, Hornsey *et al*. showed a significant relationship in *Acinetobacter* between the expression of the efflux pump and the MIC **(31)**. In a 2012 study by Mavri and Mozin, researchers found that disrupting efflux pumps in resistant strains of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* by efflux pump inhibitors increased the antimicrobial properties of antibiotics and biocides. The inhibitory effect of alpha naphthylamine was also investigated **(32)**. The results of the above studies are consistent with the present study and show the importance of inhibiting the efflux pump.

In another 2012 study, Sonnet *et al*. showed that the phenylalanine inhibitor beta-naphthylamide and antibiotics such as ciprofloxacin in Pseudomonas aeruginosa were effective in suppressing resistance. For the clinical use of high-efficiency efflux pump inhibitor, a combination of inhibitors was prepared and their effect on different pumps was investigated **(26)**. In the present study, it was shown that the efflux pump can be involved in reducing resistance to fluoroquinolones and some beta-lactams, tetracyclines, and chloramphenicol; Because by inactivating the pump, the effect of these antibiotics on all isolates increased. Therefore, the use of an efflux pump is an issue that can be considered to reduce the emergence of antibiotic-resistant species. There have been very few studies on the antibiotic resistance associated with the efflux pump and its inhibitor in the *M. catarrhalis* bacteria, but the results of this study were consistent with other bacteria. Given the increase in bacterial resistance and the significant role of efflux pumps in these resistances, the need to discover new antibiotics and inhibitor pump inhibitors seem obvious **(33)**. Although antibiotic resistance may not completely restore susceptibility to multidrug-resistant organisms only by inhibiting efflux pumps, given the maximal activity of

www.SID.ir

Archive of SID

the efflux pump in 70% of the strains of this study, the association between the expression of efflux pumps and antibiotic resistance should not be overlooked. Genetic studies of these pumps and other involved factors including beta-lactamase enzymes will be considered necessary in future studies.

Conclusion

According to the approval of phenotypic and genotypic role of efflux pumps and dependence of antibiotic resistance to efflux pump activity using pump inhibitors, research and novel drugs can be developed in order to control and treat *Moraxella catarrhalis* infections. Development of efflux pump inhibitors can revive antibiotic efficacy. On the other hand, new proposals can be practiced to inhibit efflux pumps in order to decrease drug resistance in *M. catarrhalis.*

Acknowledgement

I would like to express my gratitude and thanks to all those who helped me during the implementation of this research. It is worth mentioning that this article is the result of a part of the master's thesis of Ms. Parvin Mohammad Shafiei from the Islamic Azad University, Kazerun Branch.

Conflict of Interest

The authors declared no conflict of Interest.

Financial Resources

This article was financially supported by the authors.

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۴ ـ شماره ۵ ـ مهر و آبان ۱۳۹۹

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ارزیابی فنوتیپی و ژنوتیپی پمپ افلاکس AcrAB-OprM در جدایه‌های کلینیکی مقاوم به چند دارو در باکتری *موراکسلا کاتارالیس* در شهرستان کازرون، ایران

پروین محمدشفیعی [۱]، مجید باصری صالحی [۱*]، سینا مباشری زاده [۲]

۱. گروه میکروب شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، ،کازرون، ایران

۲. مرکز تحقیقات عفونت بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۰۴

پذیرش:۱۳۹۹/۰۵/۲۰

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۶/۱۱

موضوع: مقاومت پادزیستی

نویسندهٔ مسئول:

مجید باصری صالحی، ۱.گروه میکروب شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، ،کازرون، ایران

ایمیل: Majidbaseri@hotmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: *موراکسلا کاتارالیس* عامل مهم عفونت‌های تنفسی تحتانی و فوقانی می‌باشد و مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری گرم منفی در حال افزایش است. پمپ‌های افلاکس خانواده RND در این باکتری‌ها منجربه مقاومت چند دارویی می‌گردند. یکی از پمپ‌های شناخته شده در *موراکسلا کاتارالیس* سیستم AcrAB-OprM می‌باشد. مطالعه حاضر به منظور بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *موراکسلا کاتارالیس* و تعیین وابستگی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به پمپ افلاکس طراحی شد.

مواد و روش کار: ۱۳۷ نمونه مختلف کلینیکی جمع آوری گردید. جدایه‌های *موراکسلا کاتارالیس* با ازمون‌های بیوشیمیایی وروش PCR تاییدگردیدند. الگوی حساسیت انتی‌بیوتیکی با روش انتشار دیسک برطبق CLSI، بررسی فنوتیپی فعالیت پمپ‌های افلاکس باروش کارتویل و بررسی ژن‌های *acra, acrb, oprm* باروش PCR انجام گرفت. بعلاوه ارتباط وجود پمپ افلاکس بامقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از ماده فنیل آلانین بتا نفتیل آمید (PAßN) انجام شد.

یافته‌ها: درمطالعه حاضر از ۱۰ باکتری *موراکسلا کاتارالیس* جداسازی شده ۷۰٪ (۷جدایه) دارای مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی بودند. همهٔ جدایه‌های مقاوم به چند دارو (۷۰٪) دارای ژن‌های *acra, acrb, oprm* بودند. همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیک های سفازولین، سفتازیدیم، تتراسایکلین،کلرامفنیکل و سیپروفلوکساسین وابسته به پمپ افلاکس بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی در*موراکسلا کاتارالیس* افزایش یافته است. حضور ۷۰٪ ژنهای *acra, acrb, oprm* پمپ افلاکس در این باکتری وکاهش میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک در حضور مهارکننده پمپ افلاکس اهمیت بررسی حضور این ژن‌ها را برای پیشنهاد الگوی درمانی مناسب بیماران الوده به *موراکسلا کاتارالیس* نشان می‌دهد.

کلید واژه‌ها: *موراکسلا کاتارالیس*، مقاومت چنددارویی، پمپ افلاکس، *acra acrb oprm* PAßN

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

موراکسلا کاتارالیس (*Moraxella catarrhalis*) دیپلوکوک گرم منفی غیرمتحرک و بدون پیگمان است که تا ۱۹۹۵ به‌عنوان فلور نرمال سیستم تنفسی، باکتری غیر بیماری‌زا در نظر گرفته می‌شد (۱). اما پس از آن، به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای انسانی شناخته شد. این باکتری می‌تواند عفونت‌های دستگاه تنفسی فوقانی (عفونت گوش‌میانی، سینوزیت و اوتیت مدیا) و عفونت‌های تنفسی تحتانی (برونشیت حاد و پنومونی در بالغین) را ایجاد نماید (۱-۳). *موراکسلا کاتارالیس* بعد از *استرپتوکوکوس پنومونیه* و *هموفیلوس آنفلونزا*، به عنوان عامل باکتریایی عفونت، مطرح است و در حدود، ۲۰ – ۱۵ درصد موارد را شامل می‌شود (۴).

درمان چنین عفونت‌های تنفسی به دلیل مقاومت گستردهٔ این باکتری‌ها به گروه‌های متعددی از آنتی‌بیوتیک‌ها، برای پزشکان

www.SID.ir

Archive of SID

بسیار مشکل است (۳). بخشی از این مقاومت، اکتسابی و بخشی ذاتی است. یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد این ارگانیسم‌ها مقاومت ذاتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز تمایل بالای آن در کسب مقاومت آنتی‌بیوتیکی است (۵). مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها مشکلات فراوانی را برای درمان عفونت *موراکسلا کاتارالیس* ایجاد کرده است.

مقاومت ذاتی این باکتری می‌تواند در نتیجه اثر متقابل مهار آنزیمی دارو مانند مهار آنزیم بتالاکتاماز (که بتالاکتام را از طریق هیدرولیز این حلقه تغییر می‌دهد) و ایجاد مقاومت دارویی از طریق تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی باکتری (مانند پورین‌ها) و بیان سیستم‌های تراوشی فعال یا افلاکس پمپ‌ها، صورت گیرد (۵). پمپ‌های افلاکس در این خانواده به علت تنوع وسیع سوبسترایی، از نظر فیلوژنی به پنج خانواده بزرگ تقسیم شده‌اند. از بین این خانواده‌ها، پمپ‌های RND (Division Nodulation Resistance) متعلق به پمپ‌های افلاکس چند دارویی (Multidrug Efflux Pumps) هستند (۶).

سیستم افلاکس پمپ سه‌گانه AcrAB-OprM یک سیستم افلاکس از خانواده RND در *موراکسلا کاتارالیس* است. این پمپ شامل، یک پمپ غشا داخلی (AcrB)، یک کانال غشا خارجی (OprM) و یک پروتئین آداپتور پری‌پلاسمیک (AcrA) است که منجر به خروج آنتی‌بیوتیک از میان هر دو غشا داخلی و خارجی دراین باکتری می‌شود. داروها به‌عنوان سوبسترای پمپ AcrAB-OprM، می‌توانند بیان ژن‌های *acrAB-oprM*، را افزایش دهند که به نوبهٔ خود، منجر به بروز مقاومت چند دارویی می‌شود (۵).

پمپ‌های افلاکس نه تنها باعث افزایش حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند، بلکه با استفاده از نیروی محرکه پروتونی (PMF) و با کاهش غلظت دارو در داخل سلول باعث ایجاد سویه‌های مقاوم به دارو می‌گردند (۷،۸). این باکتری‌ها با افزایش بیان این پمپ‌ها به واسطهٔ جهش، باعث ایجاد مقاومت نسبت به گسترهٔ وسیعی از داروها می‌گردند. همچنین اثر هم‌افزایی آنها با سایر مکانیسم‌های مقاومت دارویی بسیار حائز اهمیت بوده و لازم است مانند سایر مکانیسم‌های مقاومت، راهکارهای مقابله با آنها بررسی گردد (۸-۱۰). به‌نظر می‌رسد شناخت و مهار پمپ‌های افلاکس یک راهکار امیدوارکننده برای تاثیر مواد ضدباکتریایی باشد. درسال‌های اخیر به‌منظور رفع مشکل مقاومت دارویی به واسطهٔ پمپ افلاکس تعداد زیادی مهارکننده ازجمله محصولات طبیعی، انواع آنتی‌بیوتیک و مولکول‌های مصنوعی روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی آزمایش شده است (۱۱). باتوجه به بروز روز افزون مقاومت‌های باکتریایی و نقش چشمگیر پمپ‌های افلاکس در این مقاومت‌ها، کشف عوامل تعدیل کننده مقاومت و به طور اختصاصی‌تر، مهارکننده‌های پمپ افلاکس،Efflux pump inhibitors (EPIs) از اهمیت به‌سزایی برخوردار هستند. بنابراین طراحی داروهای نوین مستلزم شناسایی و درک وضعیت سیستم‌های ایجاد کنندهٔ مقاومت ازجمله پمپ افلاکس است (۸، ۹، ۱۱).

با افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های متعدد خطر افزایش بیماری‌های عفونی و تنفسی سلامت بشر را تهدید می‌کند و از آنجایی که تاکنون در مورد نقش پمپ‌های افلاکس در مقاومت عفونت‌های *موراکسلا کاتارالیس* در ایران به‌صورت فنوتیپی و ژنوتیپی مطالعه‌ای انجام نشده است، این مطالعه با هدف ارزیابی شیوع فنوتیپی و ژنوتیپی ژن‌های *acrAB-oprM* مرتبط با پمپ‌های افلاکس به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *موراکسلا کاتارالیس* و مهار آن با استفاده از فنیل آرژینین بتا نفتیل آمید (PaβN) به‌منظور ارائه به مراکز خدمات درمانی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و شناسایی باکتری‌ها

در این مطالعهٔ مقطعی-توصیفی، از بیماران ۳ – ۷۵ سال از هر دو جنس مرد و زن مبتلا به عفونت‌های تنفسی و پنومونی مراجعه کننده به درمانگاه و آزمایشگاه باقرالعلوم و کلینیک بیمارستان ولی‌عصر شهرستان کازرون از دی ۱۳۹۴ تا خرداد ۱۳۹۵ نمونه‌گیری تصادفی ساده انجام شد. معیار ورود نمونه‌ها به مطالعه، افراد مراجعه کنندهٔ مشکوک به سل، نمونه‌های مبتلایان به عفونت‌های تنفسی، افراد بالغ سیگاری مبتلا به برونشیت مزمن و سینوزیت، کودکان دارای عفونت حاد گوش میانی بودند. تشخیص موارد فوق توسط پزشک متخصص انجام شد.

در نهایت ۱۳۷ نمونه خلط و سواپ گلو (حلقی دهانی و حلقی حنجره‌ای) و ترشحات چرکی گوش میانی گرفته شده در شرایط استاندارد به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه بر روی محیط کشت شکلات‌آگار و آگارخوندار (مرک-آلمان) کشت ۲۴ ساعته داده شدند. سپس با استفاده از تست‌های میکروب‌شناسی و بیوشیمیایی استاندارد برای افتراق باکتری‌ها، شامل رنگ‌آمیزی گرم، تست اکسیداز، کاتالاز، DNase، تست تخمیر قند (گلوکز، سوکروز، مالتوز،

www.SID.ir

Archive of SID

فروکتوز و لاکتوز) و احیای نیترات برای شناسایی و جداسازی باکتری *موراکسلا کاتارالیس* استفاده شد (۱۲).

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش Kirby-Bauer

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های به دست آمده با استفاده از روش انتشار در دیسک (کربی-بائر Kirby-Bauer)، منطبق بر دستورالعمل موسسهٔ استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (Clinical and Laboratory Standards Institute)CLSI نسخهٔ ۲۰۱۶ بررسی شد.

کدورت معادل لوله ۰/۵ مک فارلند تهیه شد و سپس بر روی محیط کشت مولرهینتون‌آگار (مرک، آلمان) کشت ۲۴ ساعته انجام شد و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (پادتن‌طب، ایران) روی محیط کشت قرار داده شد. میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰میکروگرم)، کلاریترومایسین (۱۵میکروگرم)، سفازولین (۳۰میکروگرم)، کوآموکسی‌کلاو (۱۰+۲۰میکروگرم)، تری‌متوپریم-سولفامتاکسازول (۲۳/۱-۷۵/۲۵ میکروگرم) و آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۱۵میکروگرم)، آزیترومایسین (۱۵میکروگرم)، امیکاسین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰میکروگرم)، (Himedia، هند) سنجیده شد. پس از مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد و سویه‌ها براساس دستورالعمل CLSI درگروه‌های حساس، نیمه‌حساس و مقاوم تقسیم‌بندی شدند. جدایه‌هایی که به بیش از دو کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاومت نشان دادند به عنوان سویه‌های دارای مقاومت چندگانه MDR معرفی شدند (۱۳).

تشخیص *موراکسلا کاتارالیس* با PCR

تشخیص *موراکسلا کاتارالیس*‌های با مقاومت چند دارویی با توالی ۱۶SrRNAتایید شد (جدول۱). DNA این نمونه‌ها به وسیلهٔ کیت (یکتا تجهیز، ایران) استخراج شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۸ میکرولیتر مسترمیکس (یکتا تجهیز، ایران)، ۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای فوروارد و ریورس و ۲ میکرولیتر DNA الگو انجام شد. برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴°Cبه مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۶۰°C به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۴۵°C به مدت۷۲ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه بود. DNA تکثیر شده برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره فرستاده شدند و توالی‌های مشخص شده برای تجزیه و تحلیل ژنی بلاست شدند.

بررسی فنوتیپی پمپ افلاکس با استفاده از روش کارت ویل اگار- اتیدیوم بروماید

به‌منظور بررسی فعالیت پمپ‌های افلاکس به صورت فنوتیپی جدایه‌های *موراکسلا کاتارالیس*، با روش کارت‌ویل آگار- اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide-agar Cartwheel method) بررسی شدند. ابتدا محلول اتیدیوم بروماید (شرکت مرک، آلمان) در آب مقطر و به غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شده و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار (شرکت مرک، آلمان) همراه با غلظت‌های اتیدیوم بروماید ازصفرتا ۲ میلی گرم بر لیتر آماده شد. سپس سویه‌ها بر روی پلیت‌های نوترینت آگار حاوی غلظت‌های متفاوت اتیدیوم بروماید از مرکز محیط به سمت کنار محیط به صورت یک خط کشت داده شدند. غلظت‌ها وابسته به نوع باکتری بوده و قابل تغییر هستند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. میزان فلوروسنس هر جدایه با دستگاه ژل داک (Hidolgh ـ آلمان) اندازه‌گیری شدتاکمترین غلظت اتیدیوم بروماید موثر بر باکتری مشخص گردد (۱۴، ۱۵).

بررسی فنوتیپی پمپ افلاکس با استفاده از ماده فنیل آلانین – آرژنین بتانفتیل آمید (مهار کننده پمپ افلاکس)

به‌منظور بررسی فنوتیپی وجود پمپ افلاکس، از مادهٔ فنیل آلانین- آرژنین- بتانفتیل آمید دی هیدروکلراید (Phe- Arg ß – naphthylamide dihrochloride) استفاده شد. ابتدا دو سری محیط کشت مولرهینتون آگار (مرک-آلمان) تهیه شد که سری اول بدون محلول ممانعت کننده و سری دوم حاوی محلول ممانعت کننده پمپ افلاکس بودند. محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی ممانعت کننده، برای رقیق کردن پودر ۰/۲۵ میلی گرمی فنیل آلانین بتا نفتیل آمید دی هیدروکلراید، مقدار۰/۰۵ میلی‌گرم از این ماده در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل گردید و سپس مقدار ۱ میلی‌لیتر از این محلول به پلیت‌های استریل خالی منتقل شد. سپس به پلیت‌های مذکور، مولرهینتون آگار اضافه شد (۱۱) و جدایه‌های *موراکسلا کاتارالیس* مقاوم به چند دارو، کشت داده شدند. سپس دیسک‌های استاندارد، پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، آمیکاسین، جنتامایسین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل، سفازولین، سفتازیدیم، تری متوپریم-سولفامتاکسازول و سیپروفلوکساسین با در نظر گرفتن فواصل استاندارد بر روی محیط قرار داده شدند. این کشت‌ها به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند و سپس منطقه مهار شده از رشد با استفاده از خط کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری‌ها براساس

www.SID.ir

Archive of SID

استانداردهای تعریف شده CLSI بصورت حساس، مقاوم، نیمه حساس طبقه‌بندی شد (۱۳). قطر هالهٔ عدم رشد، در دو گروه پلیتِ دارای فنیل آلانین – آرژنین بتانفتیل آمید و بدون فنیل آلانین – آرژنین بتانفتیل آمید اندازه‌گیری شد. در صورتیکه قطر هاله بدون رشد در حضور مهار کننده بیشتر شده باشد نشان از اثر پمپ افلاکس در مقاومت آنتی‌بیوتیک دارد. نتایج با استفاده از نرم افزار WHONET 5.6 software (WHO,Geneva Switzerland) بررسی شد.

بررسی فراوانی ژن *acrAB-oprM* پمپ افلاکس در جدایه‌های مقاوم به چند دارو *موراکسلا کاتارالیس*

از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی برای شناسایی ژن پمپ افلاکس در*جدایه‌های* مقاوم به چند دارو استفاده شد. پرایمر ژن‌های پمپ افلاکس *موراکسلا کاتارالیس* با استفاده از ژن‌های موجود در(NCBI) و با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک طراحی گردید (جدول ۱).

در این مرحله نیز از مستر میکس یکتا تجهیز (ایران) استفاده گردید. مخلوط PCR شامل ۱۸میکرولیتر مسترمیکس، ۱میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای فوروارد و ریورس، ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۳ میکرولیتر آب دوبار تقطیر باحجم کلی ۲۵ میکرولیتر بود. مسترمیکس مورد نظر با پرایمرهای پمپ افلاکس مخلوط گردید و تیوپ‌های حاوی مخلوط PCR در دستگاه ترموسایکلر (سنگاور_ Bio-Rad) با برنامه دمایی ۱۵ثانیه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی، در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت۳۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ ثانیه انجام شد. سپس محصولات PCR بر روی ژل اگارز ۲ درصد انتقال داده شد و به وسیله دستگاه ژل داک (Hidolgh، آلمان) الکتروفورز، آشکار گردید.

تجزیه تحلیل داده‌ها و آنالیز آماری

داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم افزار (WHO,Geneva WHONET 5.6 Switzerland) بر طبق CLSI (نسخه ۲۰۱۶) و SPSS نسخهٔ ۲۲ (SPSS Inc., Chicago, IL., USA) ارزیابی شدند. از آزمون مربع کای (کای دو) برای تحلیل ارتباط بین وجود ژن‌های پمپ افلاکس و مقاومت دارویی و از آزمون تی دو مستقل، برای آنالیز رابطهٔ بین آنتی‌بیوتیک و وابستگی به پمپ افلاکس قبل و بعد از مهار کننده پمپ استفاده شد. سطح اطمینان ۹۵ درصد برای معنی‌داری آزمون‌ها ($P\leq ۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

پس از انجام آزمون‌های استاندارد میکروبیولوژی و بیوشیمیایی، از مجموع ۱۳۷ نمونه تصادفی جمع‌آوری شده که شامل۸۰ مرد و ۵۷ زن ۳-۷۵ ساله بودند، ۱۰ جدایه به عنوان *موراکسلا کاتارالیس* تشخیص داده شدند. فراوانی *جدایه‌های موراکسلا کاتارالیس* به تفکیک سن و جنس در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده مورد استفاده درمطالعه

ژن	پرایمر	طول ژن (جفت باز)
16s rRNA	F: 5´ CAGGCCTAACACATGCAAGTC3´ R: 5´ GGGCGGAGTGTACAAGGC3´	bp۱۳۶۰
oprm	F: 5´ GCCAGTCAAAAACAGCAAGC3´ R: 5´ TAATCCACCAATGCCGACTG3´	۶۹۲ bp
acra	F: 5´ TTGGTTTAGAAGGCGGTGGC3´ R: 5´ TAGTATGGTGCAGGCAGGAC3´	۱۰۶۱ bp
acrb	F: 5´ ACCACAGGTGAGGCAAGTAT3´ R: 5´ TGCCGATGGCGTTTGTTAAAT3´	۷۱۹ bp

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲. فراوانی جدایه‌های موراکسلا کاتارالیس به تفکیک سن و جنس

نمونه	سن	جنس	نمونه	سن	جنس
N_1	۶۵	مرد	N_6	۳	مرد
N_2	۷۲	مرد	N_7	۷۲	مرد
N_3	۶۹	مرد	N_8	۷۵	مرد
N_4	۵	زن	N_9	۴۵	زن
N_5	۶۶	مرد	N_{10}	۶۸	مرد

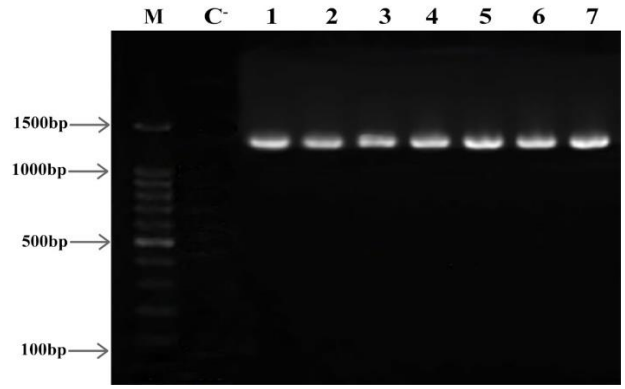
فراوانی جدایه‌های *موراکسلا کاتارالیس* به تفکیک نمونه‌های بالینی، ۳ مورد از خلط بیماران مبتلا به عفونت تنفسی تحتانی (۳۰٪)، ۱ مورد از خلط فرد سیگاری مبتلا به برونشیت مزمن (۱۰٪)، ۲ مورد از خلط افراد مشکوک به سل (۲۰٪) و همچنین ۲ مورد از نمونه سواپ ناحیه هیپوفارنکس و اوروفارنکس بالغین دارای عفونت سینوزیت (۲۰٪) و ۲ مورد از سواپ چرکی گوش میانی در کودکان (۲۰٪) گزارش گردید.

نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار در دیسک

بر اساس استاندارد۲۰۱۶ CLSI ، از ۱۰ باکتری جداشده از نمونه‌های بالینی، ۷ جدایه (۷۰٪) بیشترین مقاومت را به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، امیکاسین، جنتامایسین، کلرامفنیکل، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، سفازولین، سفتازیدیم و مقاومت کمتر نسبت به تری‌متوپریم/سولفامتاکسازول گزارش شدندکه به بیش از دو کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاومت نشان دادند و به عنوان سویه های MDR انتخاب گردیدند. تمامی سویه های باکتری‌های مورد نظر به آنتی‌بیوتیک‌های، آموکسی‌سیلین /کلاولانیک اسید (کواموکسی کلاو)، آزیترومایسین و اریترومایسین و کلاریترومایسین (۱۰۰٪) حساسیت داشتند. هم چنین مشخص گردید که هیچ سویه‌ای از *موراکسلا کاتارالیس* به همهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم نشده و آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین/ کلاولانیک اسید، کلاریترومایسین، اریترومایسین، آزیترومایسین با حساسیت ۱۰۰٪ می‌توانند موثر باشند.

نتایج تعیین هویت *موراکسلا کاتارالیس* جدا شده با تست PCR

بعداز اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، ۷ جدایه مقاوم به بیش از دو کلاس آنتی‌بیوتیکی، برای انجام بقیهٔ مراحل این مطالعه انتخاب شدند که با استفاده از پرایمر اختصاصی ۱۶SrRNA جدایه‌های مقاوم به چند دارو تعیین هویت شدند. تشکیل باند ۱۳۶۰ جفت بازی نشان دهندهٔ حضور *موراکسلا کاتارالیس* بود (شکل۱).



شکل۱. الکتروفورز محصول ژن 16SrRNA بر روی ژل اگارز۲ درصد، M: مارکر (Gene Ruler 100 bp)، ستون C-: کنترل منفی، ستون‌های شماره گذاری ۱ تا۷ جدایه‌های مقاوم به چند دارو، طول محصول= ۱۳۶۰جفت باز.

نتایج فنوتیپی وجود پمپ افلاکس با استفاده ازاتیدیوم بروماید و روش کارت‌ویل

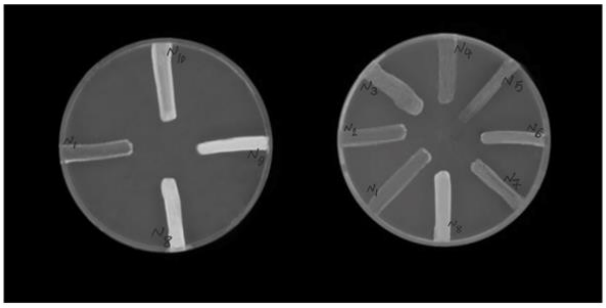
برای تشخیص فعالیت پمپ افلاکس جدایه‌های *موراکسلا کاتارالیس*، همهٔ *جدایه‌های* مطالعه با تکنیک اگار حاوی اتیدیوم بروماید و روش کارت ویل کشت داده شدند، نتایج نشان داد که ۷ جدایه (۷۰ درصد) دارای پمپ افلاکس بودند (همچنین برای اطمینان از وجود پمپ افلاکس هر ۱۰ جدایه ارزیابی قرار شدند). همانگونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، پس از قرار گرفتن در زیر دستگاه ژل داک، ۷ جدایه *موراکسلا کاتارالیس* قادر به ذخیره‌سازی این رنگ‌ها در سلول نبودند. خطوط کشت شفاف بیانگر فعال نبودن پمپ افلاکس و خطوط کشت مات بیانگر فعال بودن سیستم افلاکس پمپ هستند.

www.SID.ir

Archive of SID

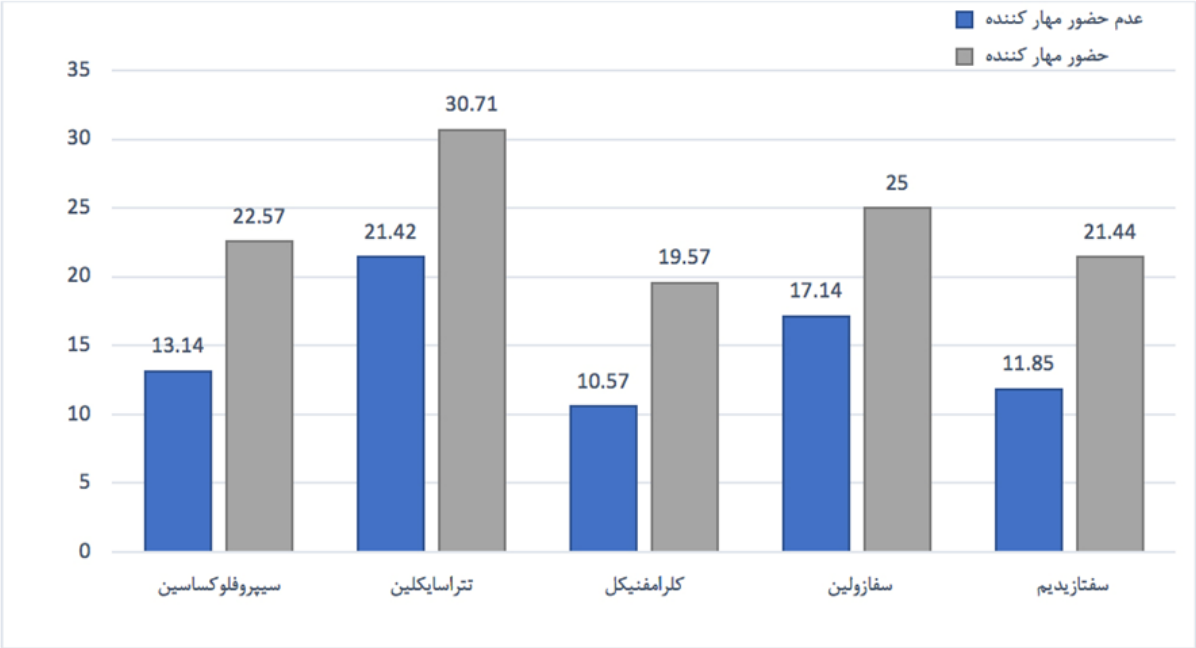
نتایج وابستگی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به فعالیت پمپ افلاکس با استفاده از مهارکنندهٔ پمپ افلاکس

پس از اضافه شدن ممانعت‌کننده پمپ افلاکس به محیط کشت، آنتی‌بیوتیک‌های، سفازولین، سفتازیدیم، سیپرو-فلوکساسین، کلرامفنیکل، تتراسایکلین دارای عملکرد ضد باکتریایی بیشتری شدند (شکل۳). این مقاومت آنتی‌بیوتیکی *جدایه‌های موراکسلا کاتارالیس* وابسته به پمپ افلاکس بود؛ زیرا منطقهٔ ممانعت‌کننده از رشد آنها نسبت به آنتی‌بیوگرام اول (عدم حضور مهارکننده) تغییر پیدا کرده و قطر هالهٔ عدم رشد در حضور مهار کننده بیشتر شد. لذا این مسئله، نشان از تاثیر پمپ افلاکس در مقاومت آنتی‌بیوتیک دارد.



(ب) (الف)

شکل ۲. نتایج بررسی فنوتیپی پمپ افلاکس، هرخط مربوط به یک جدایه از *موراکسلا کاتارالیس* است به طوری که خطوط کشت شفاف، فعال نبودن پمپ افلاکس و خطوط کشت مات فعال بودن پمپ افلاکس را نشان می‌دهد(تصویر الف: فلورسنت پلیت حاوی غلظت ۰/۵ گرم بر میلی‌لیتر از اتیدیوم‌بروماید و تصویر ب: فلورسنت پلیت حاوی غلظت ۱گرم بر میلی‌لیتر از اتیدیوم‌بروماید)



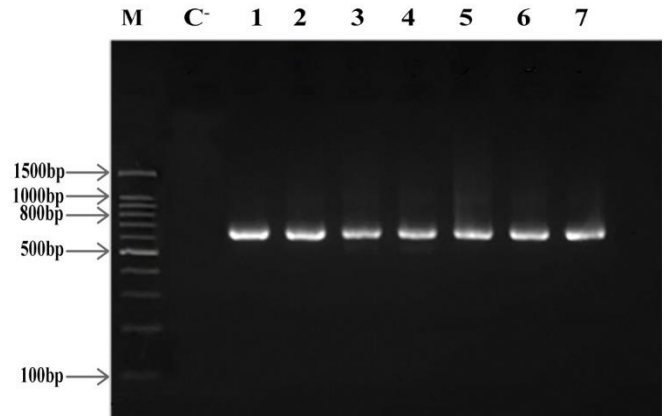
شکل ۳. مقایسه الگوی مقاومتی جدایه‌های *موراکسلا کاتارالیس* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل، سفازولین و سفتازیدیم در عدم حضور مهارکننده و درحضور مهارکننده پمپ افلاکس.

نتایج بررسی فراوانی ژن‌های *oprm ،acrb ،acra*

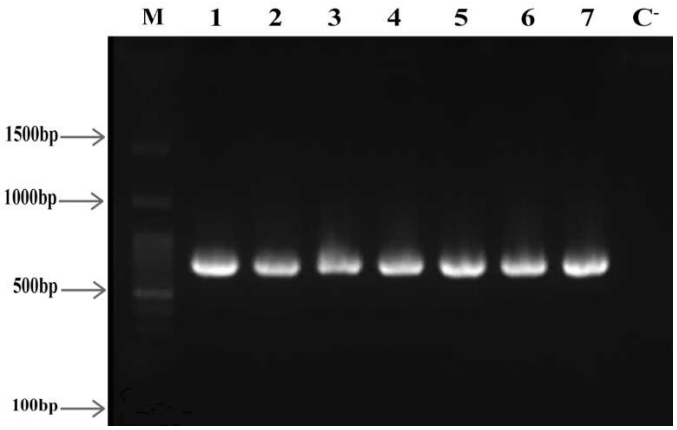
پس از تکثیر ژن‌های *acra, acrb, oprm* برای همهٔ جدایه‌های *موراکسلا کاتارالیس* مقاوم به چند دارو، محصولات PCR به صورت باندهایی مطابق شکل‌های ۴ تا ۶ روی ژل اگارز ۲ درصد مشاهده شد. ژن‌های پمپ افلاکس در هر ۷ جدایه مقاوم به چند دارو وجود داشتند (شکل۴، ۵، ۶).

www.SID.ir

Archive of SID

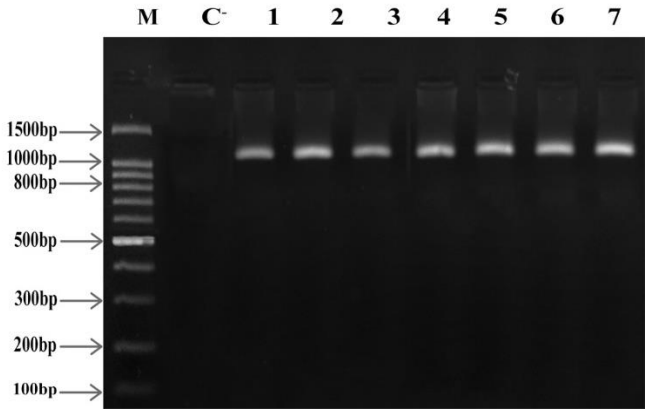


شکل ۴. الکتروفورز ژن *oprm* روی ژل اگارز۲٪. M: مارکر(Gene Ruler 100 bp)، ستون c-:کنترل منفی، ستون‌های شماره‌گذاری ۱تا۷ نمونه مثبت *جدایه‌های* مقاوم به چند دارو مورد استفاده در این مطالعه، طول محصول=۶۹۲جفت باز.



شکل ۵. الکتروفورز ژن *acrb* بر روی ژل اگارز۲٪. M: مارکر(Gene Ruler 100 bp)، ستون c-:کنترل منفی، ستون‌های شماره گذاری ۱ تا ۷ نمونه مثبت *جدایه‌های* مقاوم به چند دارو مورد استفاده در این مطالعه، طول محصول=۷۱۹جفت باز.

همچنین بر طبق آزمون مربع کای ارتباط معنی داری در سطح P-value≤۰۵/۰ بین جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و حضور ژن‌های *acra*، *acrb* و*oprm* پمپ افلاکس مشاهده شد و برای چهار آنتی‌بیوتیک کوآموکسی‌کلاو، اریترومایسین، ازیترومایسین و کلاریترومایسین که در همه جدایه‌ها حساس گزارش گردید، ارتباط معناداری در سطح P-value≤۰۵/۰ مشاهده نشد.



شکل۶. الکتروفورز ژن *acra* روی ژل اگارز۲٪. M: مارکر(Gene Ruler 100 bp)، ستون c-:کنترل منفی، ستون‌های شماره گذاری ۱تا۷ نمونه مثبت *جدایه‌های* مقاوم مورداستفاده در این مطالعه، طول محصول=۱۰۶۱جفت باز.

بحث

موراکسلا کاتارالیس در سال‌های اخیر به عنوان یک عامل مهم در عفونت‌های تنفسی تحتانی و فوقانی گزارش شده است و شایع‌ترین گونه‌ای است که از خلط، ترشحات گوش‌میانی، سینوس و سواپ حلق و دهان قابل جداسازی است (۵). در این مطالعه از ۱۳۷ نمونه بالینی مختلف جمعاً ۱۰ مورد *موراکسلا کاتارالیس* جداسازی گردید. در مطالعه‌ای که توسط Ghaznavi و همکاران (۱۳۸۴) بر روی ۲۰۰ بیمار صورت گرفت، ۱۷ نمونه *موراکسلا کاتارالیس* ایزوله گردید (۱۶). مطالعه Sillanapau و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی ۲۲۲ نمونه، ۴۲ مورد *موراکسلا کاتارالیس* جداسازی گردید (۱۷). در تحقیقات Miravitlles که بر روی ۴۸ بیمار مبتلا به بیماری مزمن انسدادی ریه صورت گرفته بود، از ۸ نفر (۹٪) *موراکسلا کاتارالیس* به‌عنوان عامل اصلی ایجاد کننده بیماری ایزوله گردید (۱۸). مقادیر فوق با مقدار باکتری ایزوله شده در این تحقیق (۱۰ نمونه) تا حدودی همخوانی دارد. ولی اختلاف کوچکی که مشاهده می‌شود می‌تواند به علت متفاوت بودن شیوع باکتری‌ها در نواحی جغرافیایی مختلف باشد.

نتایج حاصل از حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که بیشترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، آمیکاسین، پنی سیلین G، آمپی‌سیلین، سفتازیدیم، سفازولین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل و سیپروفلوکساسین (۷۰٪) بود. جدایه‌های این مطالعه به آنتی‌بیوتیک تری متوپریم- سولفامتاکسازول مقاومت حدواسط را نشان دادند. همچنین سویه‌های ایزوله شده، به آنتی‌بیوتیک‌های

www.SID.ir

Archive of SID

آزیترومایسین، اریترومایسین،کلاریترومایسین و آموکسی سیلین /کلاولانیک اسید کاملاً حساسیت داشتند (۱۰۰٪).

مطالعات مختلفی برای بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *موراکسلا کاتارالیس* انجام شده است. Naderi و همکاران در سال ۱۳۸۵ از ۱۱۶۱ کودک، ۵۴ نمونه *موراکسلا کاتارالیس* جداسازی نموده و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بررسی کردند که بیشترین حساسیت مربوط به آموکسی‌سیلین/کلاولانیک اسید (۱۰۰٪) و بالاترین مقاومت به پنی‌سیلین (۱۰۰٪) گزارش گردید (۱۹).

مطالعه Bandet و همکارانش در سال ۲۰۱۴ نشان داد همهٔ سویه‌های *موراکسلا کاتارالیس* جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین/کلاولانیک اسید، اریترومایسین و کلاریترومایسین کاملا حساس بودند (۲۰). این نتایج با یافته‌های به‌دست آمده از مطالعه حاضر که ۱۰۰ درصد حساس به آموکسی‌سیلین/کلاولانیک اسید و ماکرولیدها بود، مطابقت دارد. همچنین با مطالعهٔ مشابهی که توسط Abdullah و همکارانش در سال ۲۰۱۳ روی ۷۶۶ بیمار صورت گرفت، ۳۹ سویه *موراکسلا کاتارالیس* جداسازی گردید، که بالاترین مقاومت به آمیکاسین (۹۲/۳ درصد) گزارش شد و بیشترین حساسیت به آموکسی‌سیلین/کلاولانیک اسید (۱۰۰٪) گزارش شد (۲۱). مطالعه Ramadan و همکارانش در سال ۲۰۱۲ روی ۲۰۰ بیمار بررسی انجام شد، که ۹۱/۳ درصد مقاوم به پنی‌سیلین و ۱۰۰ درصد حساسیت به آموکسی‌سیلین /کلاولانیک اسید، سیپروفلوکساسین، اریترومایسین، جنتامایسین و ۹۷/۷ درصد به تتراسایکلین گزارش شد (۲۲).

از مقایسهٔ مطالعه حاضر و سایر مطالعات منتشر شده در قلمرو شیوع سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باکتری *موراکسلا کاتارالیس* می‌توان دریافت که آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، سفتازیدیم، سفازولین، کلرامفنیکل، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، آمیکاسین به دلیل گزارش‌های مکرر مقاومت، دیگر به‌عنوان دارویی علیه موراکسلا نمی‌توانند مطرح باشند. یکی از دلایل افزایش مقاومت در سال‌های اخیر مصرف بی‌رویهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها، عوامل جغرافیایی و فرهنگی مثل مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها و در دسترس بودن آنتی‌بیوتیک‌ها است که هریک به نحوی در افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها نقش دارند (۲۳).

سیستم تراوشی چند دارویی AcrAB-OprM اولین پمپ تحت بررسی در *موراکسلا کاتارالیس* است که همولوگ پمپ افلاکس در باکتری *اشریشیا کولی* است (۵، ۲۴). تعداد مطالعات انجام شده در مورد ژن‌های پمپ افلاکس در *موراکسلا کاتارالیس* نسبتا محدود است و مطالعات در این خصوص پیشینهٔ زیادی ندارد. بر طبق نتایج به‌دست آمده در این مطالعه با آزمون‌های فنوتیپی و ژنوتیپی، حضور این پمپ و دخالت آن در مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داده شد. نقطه قوت این مطالعه بررسی فنوتیپی همزمان با مطالعه ژنوتیپی فعالیت پمپ آفلاکس بود زیرا با وجود دقیق‌تر و قابل اعتمادتربودن روش ژنوتیپی هم زمانی هر دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی نتایج معتبری را نشان می‌دهد. از مزایای روش فنوتیپی می‌توان به کشت‌سریع و تشخیص کم هزینه‌تر پمپ افلاکس اشاره کرد (۱۴، ۱۵).

همچنین روش کارت‌ویل در کنار تعیین فعالیت فنوتیپی پمپ افلاکس که فنوتیپ MDR را در *جدایه‌های* بالینی باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و منفی نشان می‌دهد؛ یک مقایسه سریع از فعالیت افلاکس را که در نتیجهٔ جهش‌های ایزوژنیک در آزمایشگاه، به‌واسطه پرتودهی مداوم، حذف یک ژن یا گروهی از ژن‌ها و یا رشد سویهٔ باکتری در شرایط مختلف (دما، PH و غیره) ایجاد می‌شود، فراهم می‌کند (۱۴).

بر اساس شواهد، فعالیت سیستم‌های پمپ افلاکس در*موراکسلا کاتارالیس* قبلاً به‌صورت کامل، شناسایی نشده بود. باتوجه به مطالعات چند سال اخیر و نتایج حاصل از PCR سویه‌های جدا شده در این مطالعه نشان می‌دهد که تعدادی از پمپ‌های افلاکس در باکتری *موراکسلا کاتارالیس* وجود دارد که با توجه به افزایش مقاومت *موراکسلا کاتارالیس* و افزایش بیماری‌های تنفسی مطالعهٔ این ژن‌ها در بررسی الگوی درمانی بیماران عفونی و تنفسی می‌تواند حایز اهمیت باشد (۵،۲۴). Spaniol و همکارانش در سال ۲۰۱۵ با استفاده ازداده‌های توالی یابی برای سویهٔ BBH_{18} *موراکسلا کاتارالیس* نشان دادند که پمپ‌های افلاکس Acr و Mtr وجود دارد. همچنین به‌دنبال مطالعات قبلی نویسندگان (در سال ۲۰۱۰) نشان دادند که بعد از درمان با آموکسی‌سیلین، پورین M_{35} تنظیم منفی شده که منجر به افزایش مقاومت می‌گردد. این واکنش‌های آبشاری، نشان دهندهٔ مکانیسم مقاومت جدید در مقابل آمینوپنی‌سیلین ها در *موراکسلا کاتارالیس* است. همچنین نقش پمپ جریان AcrAB-OprM در مقاومت آنتی‌بیوتیکی با ساختن سویه‌های جهش یافته حاوی ژن‌های *acrA*، *acrB* و *oprM* در گونه *M.catarrhalis* O33E در آن مطالعه مشخص شده بود (۵).

مهارکنندهٔ فنیل آلانین- آرژنین- بتانفتیل آمید دی هیدروکلراید از اولین مهارکننده‌های پمپ‌های RND در باکتری‌های گرم منفی

www.SID.ir

Archive of SID

است (۲۶،۲۷). مطالعات نشان می‌دهد که با مختل کردن پمپ‌های افلاکس در سویه‌های مقاوم باکتری‌ها با کمک مهارکننده‌های افلاکس، خاصیت آنتی‌بیوتیک‌ها و بیوسایدها به مقادیر قابل توجهی افزایش می‌یابد (۲۸). در مطالعهٔ Gholami و همکاران در سال ۲۰۱۵ با بررسی ۶۰ گونه *اسینتوباکتر بومانی*، نشان داده شد که حساسیت به ایمی‌پنم در حضور مهارکنندهٔ فنیل آلانین- آرژنین- بتانفتیل آمید دی هیدروکلراید افزایش پیدا می‌کند. به‌طوری که برای ۹۶/۶٪ جدایه‌ها حداقل غلظت بازدارندگی ۴ تا ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش پیدا نمود (۲۹). Dal و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ اثر مهارکننده‌های PAßN و NMP را روی ژن *adeB* در ۴۰ جدایه اسینتوباکتر بررسی کردند. خاصیت ضدمیکروبی برخی آنتی‌بیوتیک‌ها همراه با مهارکننده افلاکس به مقدار قابل توجهی افزایش یافت ولی در آمینوگلیکوزیدها تغییر چشمگیری گزارش نشد (۳۰). Hornsey و همکاران درسال ۲۰۱۰ در باکتری اسینتوباکتر ارتباط معناداری میان میزان بیان پمپ افلاکس و میزان MIC را نشان دادند (۳۱). در مطالعه‌ای که Mavri و mozin در سال ۲۰۱۲ انجام شد، پژوهشگران نشان دادند که با مختل کردن پمپ‌های افلاکس در سویه‌های مقاوم *کمپیلوباکتر ژژونی* و *اشریشیا کولی* توسط مهارکننده‌های پمپ افلاکس خاصیت ضدمیکروبی آنتی‌بیوتیک‌ها و بیوسایدها افزایش می‌یابد. همچنین به اثر مهارکنندگی الفانفتیل آمید نیز پرداخته شد (۳۲). نتایج مطالعات فوق با مطالعه حاضر همسو بوده و اهمیت مهار پمپ افلاکس را نشان می‌دهد.

در مطالعهٔ دیگری Sonnet و همکاران در سال۲۰۱۲ نشان دادند که مهارکننده فنیل آلانین بتا نفتیل آمید و آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل سیپروفلوکساسین در *سودوموناس ائروژینوزا* در از بین بردن مقاومت موثر است. برای استفاده بالینی از مهارکننده پمپ افلاکس با اثربخشی بالا ترکیبی از مهارکننده‌ها تهیه و اثر آنها برروی پمپ‌های مختلف بررسی شد (۲۶). در مطالعه حاضر نشان داده شد که پمپ افلاکس می‌تواند در کاهش مقاومت به فلوروکینولون‌ها و بعضی از بتالاکتام‌ها، تتراسایکلین و کلرامفنیکل نقش داشته باشد؛ زیرا با غیرفعال کردن پمپ مذکور، تاثیر این آنتی‌بیوتیک‌ها در همهٔ جدایه‌ها افزایش یافت. لذا استفاده از پمپ افلاکس موضوعی است که می‌تواند برای کاهش ظهور گونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک مورد توجه قرار گیرد. مطالعات بسیار کمی در مورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی وابسته به پمپ افلاکس و مهارکننده این پمپ در باکتری *موراکسلا کاتارالیس* وجود دارد، ولی نتایج حاصل از این مطالعه با دیگر باکتری‌ها هم‌خوانی داشت. با توجه به افزایش مقاومت‌های باکتریایی و نقش چشمگیر پمپ‌های افلاکس در این مقاومت‌ها، ضرورت کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید، و مهارکننده‌های پمپ افلاکس بدیهی به نظر می‌رسد (۳۳). اگر چه مقاومت آنتی‌بیوتیکی ممکن است تنها با مهار پمپ‌های افلاکس حساسیت را به ارگانیسم‌های مقاوم به چند دارو، به صورت کامل بازنگرداند، اما با توجه به فعالیت حداکثری پمپ افلاکس در ۷۰٪ سویه‌های این مطالعه، همکاری و ارتباط بیان پمپ‌های افلاکس و مقاومت آنتی‌بیوتیکی نباید نادیده گرفته شود. بررسی ژنتیکی این پمپ‌ها و سایر عوامل دخیل از جمله آنزیم‌های بتالاکتاماز نیز در مطالعات آتی، ضروری به‌نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده در اثبات نقش پمپ افلاکس به صورت فنوتیپی و ژنوتیپی و وابستگی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به فعالیت پمپ افلاکس با استفاده از ممانعت‌کنندهٔ پمپ در این باکتری می‌توان، پیشنهاد تحقیق و تولید مواد ترکیبی جدید برای درمان و کنترل عفونت‌های ناشی از باکتری *موراکسلا کاتارالیس* را در نظر گرفت. توسعه مهارکننده‌های پمپ‌های افلاکس امکان استفاده مجدد از آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی که تحت تأثیر پمپ‌های افلاکس قرار می‌گیرند را بوجود می‌آورد. از طرف دیگر می‌توان با ارایهٔ راهکارهایی برای ممانعت از عملکرد پمپ افلاکس میزان مقاومت دارویی را در باکتری *موراکسلا کاتارالیس* کاهش داد.

سپاسگزاری

بدین وسیله مراتب قدرانی و تشکر خود را از تمام کسانی که در طول اجرای این پژوهش مرا یاری کردند اعلام می‌نمایم. شایان ذکر است که این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم پروین محمدشفیعی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون است.

تعارض در منافع

در انجام مطالعهٔ حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی نداشته‌اند.

منابع مالی

منابع مالی این تحقیق توسط، نویسندگان تامین شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

Referance

1. Enright MC, McKenzie H. Moraxella (Branhamella) catarrhalis. Clinical and molecular aspects of discovered pathogen. J Med Microbiol 1997; 46(5): 360-71 [DOI:10.1099/00222615-46-5-360] [PMID]
2. Tamang MD, Dey S, Makaju RK, Jha BK, Shivananda PG, Bhramadatan KN. Prevalence of Moraxella catarrhalis infections of the lower respiratory tract in elderly patients. Kathmandu Univ Med J (KUMJ). 2005;3(1):39-44
3. Murphy TF, Parameswaran GI. Moraxella catarrhalis, a human respiratory tract pathogen. Clin Infect Dis.2009;49(1): 124-131 [DOI:10.1086/599375] [PMID]
4. Wald ER. Sinusitis. Pediatr Ann 1998 Dec; 27(12):818-8 [DOI:10.3928/0090-4481-19981201-08] [PMID]
5. Spaniol V, Bernhard S, Aebi CH. Moraxella catarrhalis AcrAB-OprM Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Is Enhanced during Cold Shock Response. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(4): 1886-1894. [DOI:10.1128/AAC.03727-14] [PMID] [PMCID]
6. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. Biochemical and biophysical research communications. 2014;453(2):254-67. [DOI:10.1016/j.bbrc.2014.05.090] [PMID]
7. Webber M, Piddock L. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. J Antimicrob Chem. 2003;51(1):9-11 [DOI:10.1093/jac/dkg050] [PMID]
8. Du D,Wang-kan X,Neuberger A,W.Van Veen H, M.Pos K,J. V. Piddock L et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. Nature Reviews Microbiology. 2018;16(9):523-539 [DOI:10.1038/s41579-018-0048-6] [PMID]
9. Nikaido H, Takatsuka Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. Biochim Biophys Acta.2009;1794(5):769-781. [DOI:10.1016/j.bbapap.2008.10.004] [PMID] [PMCID]
10. Valadkhani F, Zeighami H. Efflux pump systems in bacteria. Lab Diagn. 2016; 8(33): 35-43. [In Persian]
11. Stavri M, Piddock LJ, Gibbons S.Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. J of antimicrobial chemotherapy.2016;59(6):1247-60. [DOI:10.1093/jac/dkl460] [PMID]
12. Melendez PR, Johnson RH.Bacteremia and septic arthritis caused by Moraxella catarrhalis. Reviews of Infectious Diseases. 1991;13(3): 428-9. [DOI:10.1093/clinids/13.3.428] [PMID]
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-four informational supplement. M100-S21. Wayne Pa: CLSI; 2016.
14. Martins M, McCusker MP, Viveiros M, Couto I, Fanning S, Pagès JM, Amaral L. A simple method for assessment of MDR bacteria for over-expressed efflux pumps. The open microbiology journal. 2013; 7:72 [DOI:10.2174/1874285801307010072] [PMID] [PMCID]
15. 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.
16. Ghaznavi Rad A, Zarei R, Jafari A, Palizwan M.R, Jourabchi A, Moeini L, Rafiei M. Prevalence of Moraxella catarrhalis and risk factors for it in patients with respiratory infections referred to Valiasr and Amirkabir hospitals in Arak.Yafte. 2005;7(4):117-122
17. Sillanpass S, Oikarinen S,Sipila M,kramna L, Rautianen M,Huhtala H et al.Moraxella catarrhalis Might Be More Common than Expected in Acute Otitis Media in Young Finnish Children. J Clin Microbiol.2016; 54(9): 2373-2379. [DOI:10.1128/JCM.01146-16] [PMID] [PMCID]
18. Miravitlles M, Espinosa C, FernandezLaso E, Martos JA, Maldonado JA,Gallego M. Relationship between bacterial flora in sputum and functional impairment in patients with acute exacerbations of COPD. Study Group of Bacterial Infection in COPD. Chest.1999; 116(1):40-6 [DOI:10.1378/chest.116.1.40] [PMID]
19. Naderi H,Bakhshaei M,qzvini K,Zamanian A,Haghighi ZH. Prevalence of moraxlacataralysis carriers in the nasopharynx of healthy children under 6 years of age in kindergartens in Mashhad and determination of antibiotic resistance pattern in isolated moraxella catarrhalis.Iran J Otorhinolaryngol.2007;18(46):169-173
20. Bandet T, Whitehead S, Blondel-Hill E, Wagner K, Cheeptham N. Susceptibility of clinical Moraxella catarrhalis isolates in British Columbia to six empirically prescribed antibiotic agents.Can J Infect Dis Med Microbiol.2014;25(3):155-158 [DOI:10.1155/2014/370964] [PMID] [PMCID]
21. Abdullah FE, Ahuja KR, Kumar H. Prevalence and emerging resistance of Moraxella catarrhalis in lower respiratory tract infections in Karachi. J Pak Med Assoc. 2013;63(11):1342-1344. [PubMed]
22. Ramana B V,Chaudhury. Antibiotic sensitivity pattern of Moraxella catarrhalis at a tertiary care hospital. IJPLS.2012;3(7):1805-6
23. Kafilzadeh F, Farsimadan F. Investigating multidrug efflux pumps in relation to the antibiotic resistance pattern

www.SID.ir

Archive of SID

in Escherichia coli strains from patients in Iran. Biomedical Research 2016; 27 (4): 1130-1135

24. Spaniol V, Wyder S, Aebi C. RNA-Seq-based analysis of the physio- logic cold shock-induced changes in Moraxella catarrhalis gene expression. PLoS One.2013;8(12):10.1371 [DOI:10.1371/annotation/a6e15b35-386c-4b0a-9de9-6fea091e9088]

25. Shriram V, Khare T, Bhagwat R, Shukla R, Kumar V. Inhibiting Bacterial Drug Efflux Pumps via Phyto-Therapeutics to Combat Threatening Antimicrobial Resistance. Front Microbiol.2018;9(2990) [DOI:10.3389/fmicb.2018.02990] [PMID] [PMCID]

26. Sonnet P, Izard D, Mullié C. Prevalence of efflux mediated ciprofloxacin and levofloxacin resistance in recent clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa and its reversal by the efflux pump inhibitors 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenylalanine arginine ß naphthylamide. Int J Antimicrobial .2012; 39:77- 80 [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2011.08.005] [PMID]

27. 27.Barrero MAO, Pietralonga P a. G, Schwarz DGG,Silva A, Paula SO, Moreira M a. S.Effect of the inhibitors phenylalanine arginyl ß naphthylamide (PAßN) and 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) on expression of genes in multidrug efflux systems of Escherichia coli isolates from bovine mastitis. Res Vet Sci.2014;97(2):176-81. [DOI:10.1016/j.rvsc.2014.05.013] [PMID]

28. Moazzen Z, Eslami G, Hashemi A, Yousefi Nojookambari N. Efflux Pump Inhibitor Carbonyl Cyanide 3-Chlorophenylhydrazone (CCCP) Effect on the Minimum Inhibitory Concentration of Ciprofloxacin in Acinetobacter baumannii Strains. Arch Clin Infect Dis.2018;13(2): e59644 [DOI:10.5812/archcid.59644]

29. 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 imipenemin Acinetobacter baumannii strains isolated from hospitalized patients in Shahid Motahari Burn Hospital, Tehran, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(10): 1-7 [DOI:10.5812/jjm.19048] [PMID] [PMCID]

30. Dal T, Aksu B, Pages J.M and Over-Hasdemir U. Expression of the adeB gene and responsiveness to 1 (1-naphthylmethyl)-piperazine and phenylalanyl arginylb-naphthylamide in clinical isolates of Acinetobacter baumannii. J Antimicrob Chemother.2013; 1-3. [DOI:10.1093/jac/dks511] [PMID]

31. Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, Thomas CP, Gordon NC, Wareham DW, et al. AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of Acinetobacter baumannii. J Antimicrob Chemother 2010; 93-65:1589 [DOI:10.1093/jac/dkq218] [PMID]

32. Mavri A. Mozˇina S.S. Involvement of efflux mechanisms in biocide resistance of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. J Med Microbiol.2012; 61: 800-8. [DOI:10.1099/jmm.0.041467-0] [PMID]

33. Sharma A, Gupta VK, Pathania R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. Indian J Med Res.2019; 149(2):129-145 [DOI:10.4103/ijmr.IJMR_2079_17] [PMID] [PMCID]

www.SID.ir