شناسایی ژن های پس زننده دارو (Efflux pump) در سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های مدفوعی در استان کرمان

مریم زارع نیا[۱]، میترا صالحی*[۲]، بابک خیرخواه[۳]

۱) گروه میکرو بیولوژی، دانشکده علوم پایه،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سیرجان، سیرجان، ایران

۲) گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۳) گروه میکرو بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش:۹۵/۴/۶

چکیده

مقدمه: *سودوموناس آئروژینوزا* از باکتری های مهم ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی به ویژه در بیماران مبتلا به نقص ایمنی است. برای درمان عفونت های ناشی از این باکتری، آنتی بیوتیک های متعددی نظیر آمینو گلیکوزید ها، کینولون ها و بتالاکتام ها به کار می‌روند. اما ظهور مقاومت و شیوع بیمارستانی سویه های مقاومت بسیار گزارش شده است. امروزه پمپ‌های افلاکس به عنوان یکی از مهم ترین مکانیسم های مقاومت ذاتی و اکتسابی آنتی بیوتیک ها در باکتری ها مطرح شده اند.

مواد و روش: در این مطالعه مقطعی- توصیفی، ۶۰ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* از نمونه‌های مدفوع از آزمایشگاه های استان کرمان جمع آوری شد. تمامی ایزوله‌ها با استفاده از تست های فنوتایپی و بیو شیمیایی مورد تایید قرار گرفتند. آزمایش دیسک دیفیوژن بر اساس روش CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) با انتی‌بیوتیک های مختلف انجام شد. آزمایش M-PCR جهت تشخیص ژن های پمپ های انتشار (*mexR*،*mexB*،*mexA*) با استفاده از آغازگر ها اختصاصی انجام شد.

یافته های پژوهش: ۶۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* توسط تست های بیو شیمیایی مورد تایید قرار گرفت. بیش ترین حساسیت مربوط به آنتی بیوتیک های سفتی زوکسیم ۵۵(۹۱,۷٪)، ایمی پنم ۵۴(۹۰٪) ، مرو پنم ۴۸(۸۰٪) و سیپرو فلوکساسین ۴۰ (۶۶,۷٪) مشاهده شد. بیش ترین مقاومت نیز به آنتی بیوتیک های سفپیم ۳۶ (۶۰٪) و سیپرو فلوکساسین ۱۹ (۳۱,۷٪) تعیین گردید. بیش ترین فراوانی ژنی مربوط به *Mex B* در ۵۹ (۹۸,۳٪) از ایزوله های مورد بررسی مشاهده شد.

واژه های کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، ژن پمپ انتشار، روش Multiplex PCR

* **نویسنده مسئول** : گروه میکروب شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Email:mitra_salehi_microbiology@yahoo.com

Copyright © 2017 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

سودوموناس ها یکی از مهم ترین جنس های موجود در خانواده سودومونا داسه محسوب می-شوند. باکتری های موجود در این جنس همگی میله ای شکل، گرم منفی، غیر اسید فست و بدون اسپور می باشند. این باکتری‌ها دارای یک یا چند فلاژل قطبی بوده و متحرک هستند. *سودوموناس آئروژینوزا* از مهم ترین 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 (۴-۱). این باکتری به فراوانی در طبیعت پخش شده و از محیط بیمارستان ، وسایل پزشکی ، پرستاران و سایر پرسنل بیمارستان به آسانی جدا می‌گردد (۵). عفونت‌های بیمارستانی از جمله معضلات و مشکلات مهم پزشکی در کشور های توسعه یافته و در حال توسعه محسوب می‌شود. مقاومت آنتی بیوتیکی به عنوان یک مشکل بالینی در حال رشد و یک تهدید کننده عمده ی سلامت ملی است. عفونت‌های ناشی از میکرو ارگانیسم‌های مقاوم به آنتی بیوتیک به طور شاخصی منجر به طولانی شدن زمان بستری ، افزایش بروز مرگ و میر و بالا رفتن هزینه‌های درمانی در مقایسه با میکرو ارگانیسم‌های حساس به آنتی بیوتیک می‌گردد (۷، ۶). به طور کلی مکانیسم‌های مقاومت *سودوموناس آئروژینوزا* در برابر آنتی بیوتیک‌ها عبارتند از کاهش نفوذ پذیری دیواره سلولی، تولید بتا لاکتامازهای خارج سلولی با منشاء پلاسمیدی و کروموزومی، آنزیم‌های تغییر دهنده ساختمان شیمیایی آمینو گلیکوزیدها و مکانیسم‌های فعال دفع چند دارویی، عدم نفوذ پذیری سلول *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به آنتی بیوتیک ها در گذشته بیش از نقش مکانیسم دفع دارو مورد بررسی قرار گرفته است. این باکتری از طریق مکانیسم‌های مختلفی نسبت به داروهای ضد میکروبی مقاوم می‌شود (۹ ، ۸). یکی از مهم ترین آن ها سیستم تراوشی می‌باشد. *سودوموناس آئروژینوزا* پتانسیل بیان ۱۲ نوع پمپ تراوشی چند دارویی تحت عنوان Multidrug Efflux System (mex) را دارد. از این میان پمپ‌های مقاومت به دارو این ۵ پمپ به نام های *mexAB-oprM* ، *mexXY-oprM* ، *mexEF-oprN*، *mexCD-oprT* و *mexJK-oprM* از مهم ترین عوامل مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها به شمار می‌روند (۱۲-۱۰). *mexAB-oprM* تنها پمپ تراوشی است که در سویه های وحشی *سودوموناس آئروژینوزا* بیان می‌شود و در مقاومت ذاتی این باکتری نقش دارد. سایر پمپ ها بر اثر بروز جهش بیان شده و در مقاومت اکتسابی این باکتری به برخی از آنتی بیو تیک ها نقش دارند سیستم‌های انتشار غشایی عمومی در *سودوموناس آئروژینوزا* به خانواده پمپ انتشار تعلق دارند اعضای این خانواده آنتی پورترهای پروتون- دارو هستند که با به کارگیری نیروی محرکه پروتونی در ازای ورود یون های پروتون به درون سلول ترکیبات دارویی را از سلول خارج می‌کنند (۱۳). روش‌های ژنوتیپی بسیار دقیق و قابل اعتماد تر از روش فنوتیپی در تشخیص پمپ‌های افلاکس در جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد . با توجه به حضور بیش از ۹۰٪ ژن‌های پمپ افلاکس در این باکتری بررسی حضور این ژن‌ها در پیشنهاد الگوی درمانی مناسب بیماران آلوده به این باکتری حائز اهمیت می‌باشد. هدف این مطالعه تعیین و جدا سازی ژن‌های پس زننده دارو (efflux pump) در *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه‌های مدفوعی استان کرمان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه: در یک مطالعه توصیفی- مقطعی تعداد ۶۰ نمونه مدفوعی از تیر ۱۳۹۴ تا شهریور ۱۳۹۴ از آزمایشگاه های تشخیص طبی استان کرمان جمع آوری شد. تست‌های بیو شیمیائی شامل ستریماید آگار، مک کانکی آگار، اکسیداز و کاتالاز، اوره آز، اندول، MRVP، ذوب ژلاتین، بررسی تولید گاز، حرکت، رشد در دمای ۴۲ درجه و تولید پیگمان پیو سیانین در محیط

مولر هینتون آگار برای تایید ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شد (۱۴).

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن (کربی بائر): تست دیسک دیفیوژن بر اساس پروتکل CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام شد. بر این اساس مقداری از کلونی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* را به وسیله آنس برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل نموده تا به کدورت مناسب و برابر با استاندارد نیم مک فارلند برسد. بعد از تهیه سوسپانسیون با سواب استریل آن را به محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال داده و به طور کامل به وسیله سواب بر روی محیط، کشت داده شد. بعد از کشت، دیسک های آنتی بیوتیک تهیه شده از شرکت HIMEDIA Himedia Laboratories Pvt.Limited-(INDIA) شامل: ایمی پنم (۱۰µg)، مرو پنم (۱۰ µg)، سفپایم (۳۰ µg)، سفتازیدیم (۳۰ µg)، سفتی زوکسیم (۳۰ µg)، سیپرو فلوکساسین (µg ۵) و آمیکاسین (۳۰ µg) بر روی محیط کشت منتقل شد. بعد از قرار دادن دیسک ها، پلیت را در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، انکوبه و بعد از ۲۴- ۱۸ ساعت زیر نور چراغ بررسی قرار گرفت. سپس قطر هاله عدم رشد را با خط کش اندازه گیری شد (۱۵).

واکنش زنجیره پلیمرازی(PCR)

استخراج DNA: برای استخراج DNA از کیت باکتری‌های گرم منفی سیناژن (Cinna Pure DNA KIT-PR881613) استفاده گردید. ابتدا از ۶۰ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* کدورتی معادل نیم استاندارد مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$) تهیه و سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از بافر Prelysis برای شکستن دیواره باکتری‌ها و ۱۰ میکرو لیتر از Ribotynase اضافه شد. در مرحله بعد به وسیله ورتکس محتویات واکنش مخلوط شد. سپس در Hot plate در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت۳۰ دقیقه قرار گرفت. به محتویات واکنش فوق ۴۰۰ میکرو لیتر از بافر Lysis اضافه و با بالا ترین سرعت به مدت۲۰ ثانیه خوب هم زده شد. سپس استخراج به وسیله ستون Spin در لوله Collection ریخته و سپس با قدرت rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ستون به آرامی و با دقت به یک ستون جدید ۱/۵میکرو لیتری انتقال و بافر ۶۵ درجه سانتی گراد را به حجم ۵۰ ماکرو لیتر در مرکز ستون قرار داده، و به مدت ۵- ۳ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه و سپس برای ۱ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد.

مولتی پلکس- واکنش زنجیره ای پلیمراز (Multiplex-PCR): ابتدا ۶ میکرو لیتر از نمونه DNA داخل ویال مخصوص PCR اضافه شد. مخلوط مواد مورد استفاده در واکنش، شامل این ترکیبات می‌باشد: در ابتدا آب مقطر به مقدار ۲۰/۴ ماکرو لیتر، از هر یک از پرایمر های (mexR، mexA و mexB) (۱۶) به میزان ۴/۲ میکرو لیتر، (جدول ۱)، سپس ۱۲ میکرولیتر از بافر x۱۰، ۳/۶میکرولیتر از Mgcl2 ، ۳ میکرو لیتر از dNTP و ۱/۸ میکرو لیتر *Taq* DNA Polymerase و ۵ میکرو لیتر از ژنوم DNA به مخلوط واکنش اضافه تا حجم نهایی واکنش ۵۰ میکرو لیتر شد. واکنش PCR در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، باز شدن دو رشته در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و پلیمریزاسیون در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت مرحله طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای ۳۵ سیکل زمانی تکثیر یافت (۱۲-۱۰). جهت بررسی کنترل آزمایش از سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 تهیه شده از بانک میکروبی به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای مشاهده نتیجه تکثیر هر یک از ژن‌های مورد مطالعه، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۲٪ در شرایط ۱۵۰ ولت در بافر 10× TBE تجاری (Fermentase) به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد.

داده های آماری با نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ و با استفاده از آزمون های آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

جدول ۱. سکانس پرایمر های *Mex-A*، *Mex-B* و *Mex-R*

gens	Primer sequence (5–3)	Size of product (bp)	references
Mex-A	F: CTCGACCCGATCTACGTC R: GTCTTCACCTCGACACCC	503	۱۶
Mex-B	F: TGTCGAAGTTTTTCATTGAG R: AAGGTCAC GGTGATGGT	280	۱۶
Mex-R	F: GAACTACCCCGTGAA TC R: CACTGGTCGAGGAGATGC	411	۱۶

یافته های پژوهش

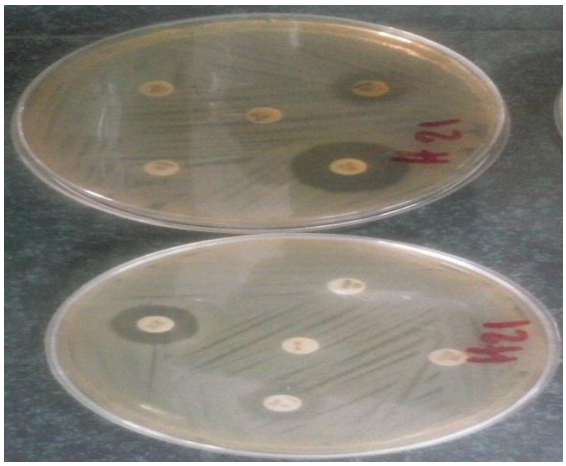
در این مطالعه ۶۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* توسط تست های بیو شیمیایی مورد تایید قرار گرفت. برای تمامی سویه های سودوموناس آئروژینوزا جداشده از نمونه های بالینی آزمایش دیسک دیفیوژن برای آنتی بیوتیک های ایمی‌پنم (IPM)، مرو پنم (MEN)، سفپیم (FEP)، سفتازیدیم (CAZ)، سفتیزوکسیم (CT)، سیپرو فلوکساسین (CP) و آمیکاسین (AN) صورت گرفت که نتایج در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. بیش ترین فراوانی ژنی مربوط به *Mex B* در ۵۹ (۹۸٪/۳) از ایزوله های مورد بررسی مشاهده شد (جدول۳). بیش ترین حساسیت مربوط به آنتی بیوتیک های سفتی زوکسیم ۵۵ (۹۱/۷٪)، ایمی پنم ۵۴ (۹۰٪) ، مرو پنم ۴۸ (۸۰٪) و سیپرو فلوکساسین ۴۰ (۶۶/۷٪) مشاهده شد. بیش ترین مقاومت نیز به آنتی بیوتیک های سفپیم ۳۶ (۶۰٪) و آمیکاسین ۲۱ (۳۵٪) تعیین گردید (شکل ۱). نتایج حاصل از تکثیر ژن های *Mex A*، *Mex B* و *Mex R* در ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا همراه با مشاهده باند bp ۵۰۳، bp ۴۱۱ و bp ۲۸۰ به ترتیب برای ژن های *Mex A*، *Mex R* و *Mex B* در بیان شده است(شکل ۲).

جدول ۲. نتایج حساسیت نمونه های *سودوموناس آئروژینوزا*

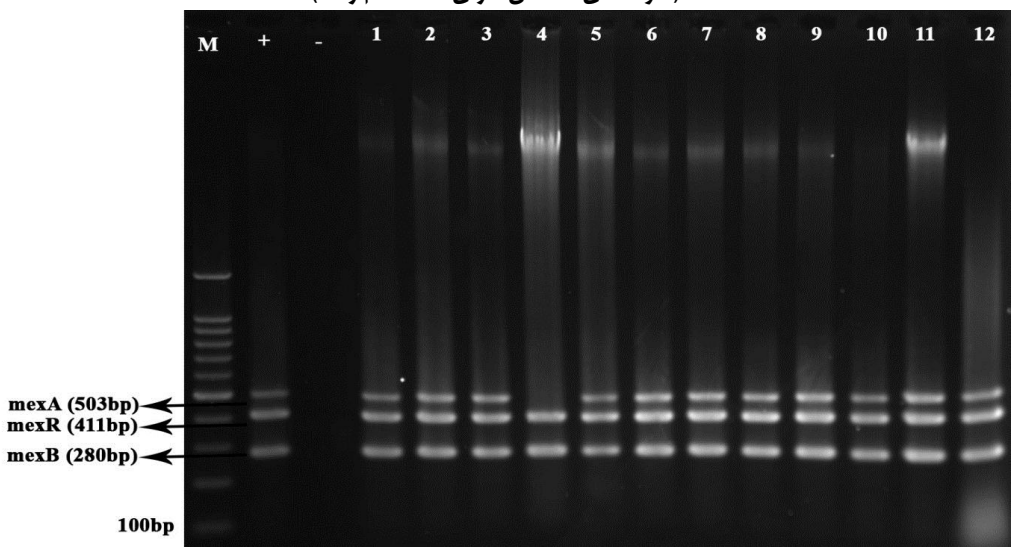
نوع آنتی بیوتیک	حساس	نیمه حساس	مقاوم
ایمی پنم	۵۴(۹۰٪)	۱(۱/۷٪)	۵(۸/۳٪)
مرو پنم	۴۸(۸۰٪)	۲(۳/۳٪)	۱۰(۱۶/۷٪)
سفپیم	۱۸(۳۰٪)	۶(۱۰٪)	۳۶(۶۰٪)
سفتی زوکسیم	۵۵(۹۱/۷٪)	_	۵(۸/۳٪)
سفتی زیدیم	۳۹(۶۵٪)	۳(۵٪)	۱۸(۳۰٪)
سیپرو فلوکساسین	۴۰(۶۶/۷٪)	۱(۱/۶٪)	۱۹(۳۱/۷٪)
آمیکاسین	۲۵(۴۱/۷٪)	۱۴(۲۳/۳٪)	۲۱(۳۵٪)

جدول۳. نتایج حاصل از تکثیر ژن های *Mex A*، *Mex B* و *Mex R*

ژن	فراوانی نمونه های مثبت	درصد فراوانی نمونه های مثبت	فراوانی نمونه های منفی	درصد فراوانی نمونه های منفی
Mex A	۵۷	۹۵٪	۳	۵٪
Mex B	۵۹	۹۸/۳٪	۱	۱/۷٪
Mex R	۵۶	۹۳/۳٪	۴	۶/۷٪



شکل ۱- نتایج آزمایش آنتی بیوگرام نمونه های سودوموناس آئروژینوزا به روش دیسک دیفیوژن با آنتی بیوتیک های مختلف (نمونه های حساس دارای هاله عدم رشد)



شکل ۲- نتایج حاصل از تکثیر ژن های *Mex A*، *Mex B* و *Mex R* در ایزوله های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا*، M: سایز مارکر ۱۰۰bp، ردیف + : *سودوموناس ائروژینوزا* کنترل +، ردیف -: کنترل منفی، ردیف ۱۲-۱ باند ۵۰۳ bp، ٤١١ bp و ۲۸۰ bp به ترتیب برای ژن های *Mex A*، *Mex R* و *Mex B*

بحث و نتیجه گیری

برای درمان عفونت های شدید ناشی از این باکتری، آنتی بیوتیک های متعددی نظیر آمینو گلیکوزید ها، کینولون ها و بتا لاکتام ها به کار می روند. اما ظهور مقاومت و شیوع بیمارستانی سویه های مقاومت بسیار گزارش شده است. امروزه پمپ های افلاکس فعال به عنوان یکی از مهم ترین مکانیسم های مقاومت ذاتی و اکتسابی آنتی بیوتیک ها در باکتری ها مطرح شده اند (۵-۱). در این مطالعه میزان مقاومت سویه‌های جمع آوری شده نسبت به دسته های مختلف آنتی بیوتیک تعیین شد. در مطالعه حاضر بیش ترین مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک سفپیم و کمترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های ایمی پنم و سفتی زوکسیم مشاهده شد. سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* در این مطالعه نسبت به ایمی پنم مقاومت ۸/۳ درصدی نشان دادند که با مطالعات انجام شده توسط شاه چراغی و همکاران کاملا مطابقت دارد (۱۷). عربستانی و همکاران طی پژوهشی که در سال ۱۳۹۳ انجام دادند نشان دادند که ۹/۶ ٪ سویه ها نسبت به ایمی پنم مقاومند که با نتایج حاصل از این مطالعه هم خوانی دارد (۱۶). میهنی و همکاران طی پژوهشی که در سال ۱۳۸۶ بر روی نمونه های جدا شده بیمارستان سوانح و سوختگی طالقانی اهواز انجام دادند، نشان دادند که ۴۱٪ سویه ها به ایمی پنم مقاوم بودند (۱۸). فاضلی و همکاران طی

پژوهش که در سال ۱۳۸۸ بر روی نمونه های جدا شده از بیماران سوختگی انجام دادند مقاومت ۹۴/۴ درصدی نسبت به ایمی پنم گزارش کردند که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر اختلاف زیادی دارد (۱۹). مقایسه این نتایج نشان می‌دهد که مقاومت آنتی بیوتیکی در بیماران دچار سوختگی بیش از سایر موارد است و این می تواند به دلیل ضعف سیستم ایمنی و مقاومت کم تر بیماران سوختگی باشد. مرو پنم آنتی بیوتیک موثر دیگری است که امروزه برای درمان عفونت های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده می شود. نتایج حاصل از این مطالعه مقاومت ۱۶/۷ درصدی مقابل این آنتی بیوتیک را نشان می‌دهد. در تحقیقی معصومه دوستی و همکاران بر روی سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* در بیمارستان ولیعصر زنجان انجام دادند ۹۸/۶٪ سویه ها مقاومت از خود نشان دادند (۲۰). هم چنین در پژوهشی که دشتی و همکاران در سال ۱۳۹۲ بر روی بیماران سوختگی بیمارستان قطب الدین شیراز انجام دادند سویه های مورد مطالعه ۱۰۰٪ مقاوم بودند که مقایسه دو تحقیق ذکر شده با مطالعه حاضر اختلاف زیادی را نشان می دهد (۲۱). در حالی که نتایج حاصل از پژوهش میهنی و همکاران (مقاومت ۲۳ ٪) به مطالعه حاضر نزدیک تر است. فاطمه میهنی و همکاران در تحقیقی که انجام دادند ۸۱٪ مقاومت به سفتازیدیم را گزارش کردند (۱۸). با مقایسه نتایج این تحقیق (۳۰٪) با تحقیق های دیگر به این نتیجه می‌رسیم که نمونه های *سودوموناس آئروژینوزا* در این تحقیق کم ترین میزان مقاومت نسبت به تحقیق‌های دیگر را ازخود نشان می دهند. این مطالعه حضور ژن های پمپ افلاکس *mexA, mexB* و *mexR* را در بیش از ۹۳٪ نمونه ها نشان داد. از آن جا که ژن‌های *mexAB-oprM* ژن های کروموزومی هستند و در تمامی سویه های وحشی وجود دارند، عدم حضور آن ها در سویه ها می تواند ناشی از جهش در باکتری ها و یا به دلیل این که این سویه ها در اثر انتقال مکرر بین محیط و میزبان دچار تغییرات کروموزومی می‌شوند و سویه ها از حالت وحشی خارج شده باشند. بیش ترین میزان فراوانی ژن های مقاومت در این مطالعه مربوط به ژن *mexB* بود که موجب ایجاد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های بتا لاکتام ها، فلورو کینولون ها، تترا سیکلین، ماکرو لید ها، کلر امفنیکل، نور پیوسین و تری متو پریم می باشد و کم ترین میزان فراوانی را ژن *mexR* داشته است. پژوهشی که صالحی و همکاران در سال ۹۲ بر روی نمونه های بالینی انجام دادند تنها ۲۷٪ جدایه ها ژن های *mexAB-oprM* را روی کروموزوم خود داشتند که با مطالعه حاضر هم خوانی ندارد (۲۲). در حالی که عربستانی و همکاران طی پژوهشی که در سال ۲۰۱۵ در همدان انجام دادند حضور ژن های *mexAB-oprM* را در ۱۰۰٪ سویه ها گزارش کردند (۱۶). هم چنین قدبن و همکاران در عراق نیز در سال ۲۰۱۲ ژن‌های مورد نظر را از ۱۰۰٪ سویه ها جدا کردند که با مطالعه حاضر نزدیکی دارد (۲۳). شناسایی میکرو ارگانیسم‌های مقاومت بسیار پیچیده می‌باشد. اگرچه پمپ های انتشار نقش مهمی در مقاومت آنتی بیوتیکی *سودوموناس آئروژینوزا* بازی می‌کنند چرا که به طور غیر اختصاصی باعث انتشار دارو به سمت خارج غشاء می‌شوند. بنا بر این شناسایی عامل مقاومت آنتی بیوتیکی در *سودوموناس آئروژینوزا* با پمپ یا بدون پمپ انتشار بسیار مهم می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان می دهد که همانند سایر تحقیقات انجام شده در دیگر نقاط ایران و جهان میزان سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک *سودوموناس آئروژینوزا* رو به افزایش است. پمپ های انتشار نقش مهمی در مقاومت به آنتی بیوتیک داشته و ارتباط معنا داری بین حضور ژن‌های پمپ افلاکس mexA, mexB و mexR و میزان بروز مقاومت در نمونه های بالینی مدفوع جدا سازی شده وجود دارد. شناسایی سویه های مقاوم حاوی ژن های افلاکس پمپ در نمونه های مدفوع می‌تواند زنگ خطری برای سلامت جامعه بوده و در ارائه راه کار های پیشگیری و کنترل عفونت های ثانویه خطرناک بیمارستانی موثر باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری از کارکنان آزمایشگاه پژوهشی میکرو بیولوژی پاسارگاد به ویژه جناب آقای دکتر کیومرث امینی، که در انجام مراحل عملی این تحقیق

یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1.Brogden KA, Minion FC, Cornick N, Stanton TB, Zhang Q, Nolan LK, et al. Virulence mechanisms of bacterial pathogens. 4th ed .ASM Publication. 2006; P. 93-113.
2.Drenkard E, Ausubel FM. Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. Nature 2002;416: 740-3.
3.Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. Am J Med 1991;91: 72-5.
4.Defez C, Fabbro-Peray P, Bouziges N, Gouby A, Mahamat A, Daures J, et al. Risk factors for multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa nosocomial infection. J Hosp Infect 2004;57: 209-16.
5.Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology pathogenesis and treatment of pseudomonas aeruginosa infections. Drugs 2007;67: 351-68.
6.Levin AS, Barone AA, Penço J, Santos MV, Marinho IS, Arruda EA, et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug resistant pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii. Clin Infect Dis 1999; 28: 1008-11.
7.Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R. Nosocomial infections due to multidrug resistant pseudomonas aeruginosa: Epidemiology and treatment options. J Hum Pharmacol Drug Therapy 2005; 25: 1353-64.
8.Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in pseudomonas aeruginosa: Our worst nightmare. Clin Infect Dis 2002; 34: 634-40.
9.Lambert P. Mechanisms of antibiotic resistance in pseudomonas aeruginosa. J R Soc Med 2002;95: 22.
10.Mine T, Morita Y, Kataoka A, Mizushima T, Tsuchiya T. Expression in Escherichia coli of a new multidrug efflux pump mexxy from pseudomonas aeruginosa. Antimicrol Age Chemother 1999; 43: 415-17.
11.Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in pseudomonas aeruginosa and related organisms. J Mol Microbiol Biotechnol 2001; 3: 255-64.
12.Hirakata Y, Srikumar R, Poole K, Gotoh N, Suematsu T, Kohno S, et al. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of pseudomonas aeruginosa. J Exp Med 2002; 196: 109-18.
13.Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate specificities of mexAB oprm, mexCD oprj and mexxy oprm efflux pumps in pseudomonas aeruginosa. Antimicrol Age Chemother 2000; 44: 3322-7.
14.Arai T, Enomoto S, Kuwahara S. Determination of pseudomonas aeruginosa by biochemical test methods. Jpn J Microbiol 1970; 14: 49-56.
15.Behera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Sharma V. An evaluation of four different phenotypic techniques for detection of metallo-β-lactamase producing pseudomonas aeruginosa. Indian J Med Microbiol 2008;26: 233.
16.Arabestani MR, Rajabpour M, Yousefi MR, Alikhani MY, Mousavi SM. Expression of efflux pump mexab-oprm and oprd of pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical samples using PCR. Arch Iranian Med 2015; 18: 102-8.
17.Shahcheraghi F, Nikbin VS, Feizabadi MM. Prevalence of ESBLs genes among multidrug-resistant isolates of Pseudomonas aeruginosa isolated from patients in Tehran. Microb Drug Res 2009; 1;15:37-9.
18.Mihani F, Khosravi A. [Isolation of Pseudomonas aeruginosastrains producing metallo beta lactamases from infections in burned patients and identification of blaIMP and blaVIM

genes by PCR]. Iran J Med Microbiol 2007; 1: 23-31. (Persian)
19.Fazeli H, Moslehi Z, Irajian G, Salehi M. [Determination of drug resistance patterns and detection of bla-VIM gene in Pseudomonas aeruginosastrains isolated from burned patients in the Emam Mosa Kazem hospital Esfahan Iran 2008-9]. Iran J Med Microbiol2010; 3:1-8. (Persian)
20.Doosti M, Ramazani A, Hajojagh Faghihi M. [Isolation and assessment of phenotypic and genotypic characteristics of metallo-β-lactamase genes in Pseudomonas aueroginosa strains isolated from clinical samples at Valieasr hospital in Zanjan province]. Sci J kurdistan Uni Med Sci 2013;18:97-105. (Persian)
21. Dashtizadeh Y, Moattari A, Gorzin AA. [Phenotypic and genetically evaluation of the prevalence of efflux pumps and antibiotic resistance in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa among burned patients admitted to ghotbodin Shirazi hospital]. J Microbial World 2014, 7: 118-27. (Persian)
22. 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: 290-8. (Persian)
23.Ibtesam Ghadban AA, Amera Khadier AA, Noor Hashim K, Sabah AB. Occurrence of mexAB Oprm efflux pumb operon on septicemic Pseudomonas aeruginosa chromosome. Iraqi Postgrad Med J2012; 2:97-102.

Identification of Drug-Repellent Encoded Genes (Efflux pump) in Pseudomonas aeruginosa Isolated from Stool Samples, Kerman Province

Zarenia M[1], Salehi M[2], Kheirkhah B[3]*

(Received: February 10, 2016 Accepted: …June 26, 2016)

Abstract

***Introduction*:** *Pseudomonas aeruginosa* is one of the important bacteria for nosocomial infections; particularly in patients with immune deficiency. For the treatment of serious infections caused by these bacteria, antibiotics such as aminoglycosides many, quinolones and beta-lactams are used. However the emergence and spread of resistant nosocomial strains of resistance have been reported. Nowadays, efflux pump has been proposed as an important mechanism of resistance to antibiotics in bacteria.

***Materials & methods*:** In this cross-sectional study, 60 clinical isolates of *P.aeruginosa* were collected from fecal samples from laboratories in Kerman province. All isolates were approved with the phenotype and biochemical tests. The disk diffusion method was performed according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Multiplex-PCR tests were performed for detection of efflux pumps genes (mexA, mexB, mexR) using specific primers.

***Findings*:** All the 60 fecal isolates of *P.aeruginosa* were confirmed by biochemical tests. The greatest sensitivity was observed for ceftizoxime 55(91.7%), imipenem, 54(90%), meropenem, 48(80%) and ciprofloxacin 40(66.7%). The greatest resistance were determined to antibiotics cefepime 36(60%) and ciprofloxacin 19(31.7%). The highest frequency was observed of Mex B gene in 59(98.3%) of the isolates.

***Discussion & conclusions*:** Rapid diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples is more than important for initiation of treatment. In general, the use of multiplex polymerase chain reaction for detection of antibiotic-resistant *P. aeruginosa* is very important in clinical samples of patients.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Efflux pump genes, Multiplex PCR

1. Dept of Microbiology, *Islamic Azad University, Sirjan Branch, Sirjan, Iran*
2. Dept of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
3. Dept of Microbiology, Islamic Azad University, Kerman Branch, Kerman, Iran
** Corresponding author Email: mitra_salehi_microbiology@yahoo.com*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences