

Mutations in *nalC* gene in ciprofloxacin resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals and laboratories of Guilan province in 2014-2015 years

Fatemeh Hakimi¹, Najmeh Ranji^{2*}, Mohammad Faezi Ghasemi³

1- MSc Student, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

2- Associated Professor, Department of Genetics, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

3- Associated Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

Received: 16 April 2016, Accepted: 13 Jul 2016

Abstract

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is a major nosocomial pathogen that due to its intrinsic and acquired resistance to a wide spectrum of antibiotics poses a threat in clinical settings. One of the drug resistance mechanisms in *P. aeruginosa* is mutation in negative regulators of efflux pump systems such as *nalC*. The aim of this study was investigation of *nalC* mutations in *P. aeruginosa* isolates from some Rasht hospitals and Lahijan laboratories.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, forty-five *P. aeruginosa* strains was isolated from several Rasht hospitals and Lahijan laboratories between 2013 to 2014 and identified by biochemical tests. The antibiotic resistance and susceptibility of isolates was determined by Kirby Bauer method and microdilution method. Then PCR-sequencing was carried out to assess *nalC* mutations in ciprofloxacin resistant isolates.

Results: In this study, the most *P. aeruginosa* strains was isolated from urine sample (53%), followed by burned strains (31%). The most resistance was seen to erythromycin (100%) and the lowest resistance was seen to ciprofloxacin (~31 %). The highest MIC of ciprofloxacin was determined in some strains >512 µg/ml. Sequencing results showed that 12 ciprofloxacin resistant isolates had one or several missense mutations G71E, S209R and E153Q in *nalC* gene.

Conclusion: Given that mutation was defined in most isolates in this study, it seems that mutation in *nalC* gene plays an important role in ciprofloxacin resistance of nosocomial *P. aeruginosa* isolates in Guilan province.

Keywords: Ciprofloxacin, *Pseudomonas aeruginosa*, Mutation, *nalC*

*Corresponding Author:

Address: Department of Genetics, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, P.O.Box: 41335-3516. Rasht, Iran.

Email: n_ranji@iaurasht.ac.ir

جهش‌های موجود در ژن *nalC* در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به سیپروفلوکساسین جدا شده از بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های استان گیلان در سال‌های ۹۴-۱۳۹۳

فاطمه حکیمی^۱، نجمه رنجی^{۲*}، محمد فائزی قاسمی^۳

۱- دانشجوی کارشناس ارشد، میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

۲- استادیار، ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

۳- استادیار، میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: سودومونای آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی است که به خاطر مقاومت ذاتی و اکتسابی به طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها تهدیدی برای مراقبت‌های کلینیکال محسوب می‌شود. یکی از مکانیسم‌های مقاومت دارویی در سودوموناس آئروژینوزا، جهش در ژن‌های تنظیم‌کننده منفی سیستم افلاکس پمپ نظیر *nalC* می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی جهش‌های ژن *nalC* در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا از بعضی بیمارستان‌های رشت و آزمایشگاه‌های لاهیجان بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی ۴۵ سویه سودوموناس آئروژینوزا در یک مقطع یک ساله از چندین بیمارستان رشت و آزمایشگاه لاهیجان جداسازی شدند و به کمک روش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. حساسیت و مقاومت به آنتی‌بیوتیک به روش کربی بور و میکروداپلوشن تعیین گردید. سپس به روش PCR- سکونسینگ جهش‌های ژن *nalC* در جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین بررسی گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه بیش‌ترین جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های ادراری (۵۳ درصد) و سپس نمونه‌های سوختگی (۳۱ درصد) جمع‌آوری شد. بیش‌ترین میزان مقاومت نسبت به اریترومايسين (۱۰۰ درصد) و کم‌ترین میزان مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین (۳۱ درصد) مشاهده گردید. بالاترین میزان MIC سیپروفلوکساسین در بعضی از نمونه‌ها بیش از ۵۱۲ µg/ml تعیین گردید. نتایج سکونسینگ نشان داد که ۱۲ جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای یک یا چند جهش بدمعنی S209R، G71E و E153Q در ژن *nalC* بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که جهش در اغلب جدایه‌ها در این مطالعه تعیین شده، به نظر می‌رسد جهش در ژن *nalC* نقش مهمی در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه‌های بیمارستانی سودوموناس آئروژینوزا در استان گیلان داشته باشد.

واژگان کلیدی: سیپروفلوکساسین، سودوموناس آئروژینوزا، جهش، *nalC*

* نویسنده مسئول: رشت، پل طالبان، دانشگاه آزاد اسلامی رشت، گروه زیست‌شناسی

Email: najmehranji@gmail.com

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یک عامل شایع عفونت های بیمارستانی است (۱) که قابلیت کسب مقاومت ذاتی و اکتسابی نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف را دارا می باشد (۲). این باکتری به عنوان عامل عفونت های فرصت طلب بیمارستانی مانند زخم، دستگاه ادراری و عفونت دستگاه تنفسی گزارش شده است (۳) فلورو کوئینولون ها یک کلاس مهم از آنتی بیوتیک های مورد استفاده در درمان عفونت با سودوموناس هستند (۴) که به طور گسترده ای جهت درمان عفونت های بیمارستانی مورد استفاده قرار می گیرند (۵) سودوموناس آئروژینوزا در نتیجه مکانیسم های مختلفی چون نفوذ پذیری کم غشای خارجی، آنزیم های تغییر دهنده ساختار آنتی بیوتیک ها و افزایش بیان پمپ های تراوشی به طیف گسترده ای از آنتی بیوتیک ها مقاوم است (۶-۹).

از مهم ترین پمپ های تراوشی موجود در این باکتری که در مقاومت اکتسابی آن نقش دارد می توان به پمپ *MexAB-oprM* اشاره نمود (۱۰، ۱۱) پمپ *MexA-oprM* از سه بخش تشکیل شده است: (۱) *MexA* (multidrug resistance protein MexA) که یک پروتئین متصل به غشا است، (۲) *MexB* (multidrug resistance protein MexA) پروتئین درون غشایی که باعث انتقال فعال آنتی بیوتیک ها از عرض غشا می شود و (۳) *oprM* (outer membrane protein OprM) که یک کانال خروج خارج غشایی است (۱۲). افزایش بیان این پمپ منجر به مقاومت قابل ملاحظه ای نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف در سویه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا شده است (۱۳، ۱۴). *nalC* (transcriptional regulator) از جمله ژن های تنظیم کننده بیان این پمپ افلاکس است که جهش در آن می تواند باعث افزایش بیان سیستم افلاکس پمپ *MexAB-oprM* شود. افزایش بیان افلاکس پمپ *MexAB-oprM* باعث خروج داروی وارد شده به سلول و در نتیجه مقاومت آنتی بیوتیکی در سودوموناس آئروژینوزا می شود (۱۵).

افزایش روز افزون مصرف آنتی بیوتیک ها در دنیا، مقاومت به این آنتی بیوتیک ها را به میزان زیادی در انواع باکتری ها افزایش داده است. به طوری که محققان به دنبال راهکارهای مناسب تری برای درمان انواع عفونت های باکتریایی هستند. سودوموناس آئروژینوزا جزء باکتری هایی است که دارای مقاومت ذاتی به انواعی از آنتی بیوتیک ها می باشد، اما وقوع جهش های مختلف و یا کسب ژن های مقاومت به دارو در این باکتری باعث افزایش مقاومت در نمونه های بیمارستانی شده است. با توجه به این که سودوموناس آئروژینوزا یکی از دلایل تهدید کننده بقا در افراد با نقص سیستم ایمنی نظیر بیماران دچار سوختگی، مبتلایان به سیستیک فیبروز و مبتلایان به سرطان تحت شیمی درمانی می باشد (۱۶)، کسب اطلاعات بیشتر در خصوص میزان و فراوانی باکتری های دارای جهش های خاص مقاوم به دارو ضروری به نظر می رسد. سیپروفلوکساسین تنها فلورو کوئینولونی است که بیشترین اثر مهارری را علیه سودوموناس آئروژینوزا داراست. با این وجود توصیه نمی شود که به عنوان تنها دارو برای درمان استفاده شود. زیرا این ارگانیزم به راحتی در مدت درمان مقاوم می شود (۱۷). با توجه به این که در مراکز درمانی زمان و هزینه کافی برای بررسی ژنتیکی دلایل مقاومت در این باکتری وجود ندارد در این مطالعه سعی شد یکی از ژن های مهم در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین (ژن *nalC*) در جدایه های مقاوم آئروژینوزا بررسی شود تا در آینده نزدیک در مراکز درمانی از این اطلاعات جهت به کارگیری روش های درمانی مناسب تر استفاده گردد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه و شناسایی باکتری

در این مطالعه مقطعی، تعداد ۴۵ نمونه در بازه زمانی یک ساله ۹۴-۱۳۹۳ از نمونه های مختلف بالینی (سوختگی، تنفسی، ادرار و نکروز بافتی) از بیمارستان های ولایت، آریا، قائم و رازی رشت و آزمایشگاه های مهر و رازی لاهیجان

از کیت AccuPower® PCR PreMix (شرکت BIONEER، کره جنوبی) با افزودن DNA ژنومی، جفت پرایمر (100 μM) و آب استریل به محلول PreMix (حاوی آنزیم، کوفاکتور و بافر مخصوص) آماده شد. سنتز پرایمرها توسط شرکت Bioneer صورت گرفت. واکنش PCR طبق برنامه ذیل انجام شد: یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در 92 درجه سانتی گراد به مدت 3 دقیقه، 30 سیکل در دمای 92 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه، 54 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه، 72 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه، و یک مرحله گسترش نهایی در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه بعد از اطمینان از تولید محصولات PCR، نمونه‌ها با حفظ زنجیره سرمایی توسط شرکت تکاپو زیست (ایران، تهران) به شرکت Bioneer کشور کره جنوبی فرستاده شد. بعد از تخلیص محصولات PCR از روی ژل آگارز، نمونه‌ها تعیین توالی شدند. سپس نتایج حاصل به کمک نرم افزار CLC main workbench v3.5 و نرم افزار آنالین بلاست (BLAST) از نظر وجود یا عدم وجود جهش در نمونه‌های مقاوم نسبت به نمونه استاندارد رفرنس (PAO1) موجود در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفتند.

آزمون آماری

جهت بررسی معنی‌دار بودن نتایج تحقیق شامل موضع عفونت و وضعیت حساسیت و مقاومت به دارو از آزمون آماری χ^2 بهره برده شد. سطح معنی‌دار بودن 0/05 < p. در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه 45 جدایه سودوموناس آئروژینوزا از بیماران بستری در بیمارستان‌های سطح استان گیلان جداسازی شد (نمودار 1) و تفاوت معنی‌داری در موضع عفونت به سودوموناس آئروژینوزا مشاهده نشد (p < 0/05). نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت این باکتری نسبت به 6 آنتی‌بیوتیک در جدول 1 نشان داده شده است. در این آزمون بیش‌ترین مقاومت نسبت به اریترومايسين و بیش‌ترین

جمع‌آوری گردید. سپس جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا بر اساس رنگ گرم، تست اکسیداز، تولید رنگدانه و رشد در دمای 42 درجه سانتی گراد تشخیص داده شدند.

سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی

نمونه‌های مقاوم، حساس و حساس وابسته به دوز سودوموناس آئروژینوزا با انجام تست آنتی‌بیوگرام از طریق روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Baur-Kirby) و طبق استاندارد CLSI 2013، با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی نالیدیکسیک اسید (30 μg)، اریترومايسين (30 μg)، سیپروفلوکساسین (5 μg)، تتراسایکلین (30 μg)، سفتری اکسون (30 μg) و سفالکسین (30 μg) تعیین گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت High Media (هند) خریداری شد. بعد از 18-24 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی گراد، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت گردید.

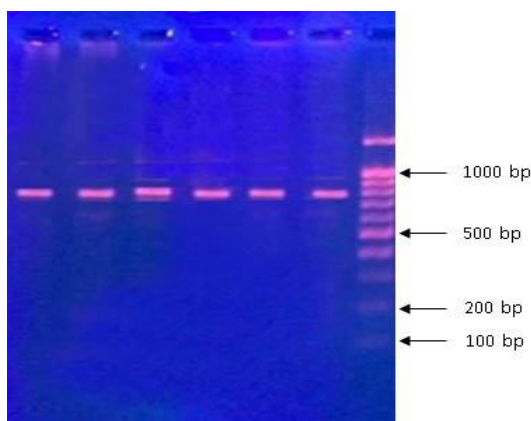
تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC)

برای تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی رشد از آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید و ایمی پنم به روش براث مایکروداپلوشن بر اساس استاندارد CLSI 2013 استفاده شد. به این منظور جدایه‌ها در محیط کشت مولر هینتون براث در غلظت‌های مختلف دارو به مدت 24 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس اولین لوله‌ای که عدم رشد در آن مشاهده شد به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

واکنش PCR و تعیین توالی ژن *nalC*

در ابتدا جدایه‌ها در محیط مولر هینتون براث به مدت 24-18 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از رسیدن به کدورت سلولی مناسب، از کیت TOP General Genomic DNA Purification (شرکت توپازژن، ایران) جهت استخراج DNA استفاده شد. برای تأیید استخراج، نمونه‌ها در ژل آگارز 1/5 درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند. بعد از حصول اطمینان از تشکیل تک باند، اجزای واکنش PCR در حجم نهایی 25 μl با استفاده

جهت بررسی مولکولی مقاومت به سیروفلوکساسین، ژن *nalC* در نمونه های جدا شده به روش PCR تکثیر شدند (شکل ۱) و بعد از اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR، نمونه ها مورد آنالیز به کمک سکونسینگ قرار گرفتند. نتایج سکونسینگ نشان داد که ۱۲ مورد از جدایه ها دارای یک یا چند جهش بدمعنی G71E (شکل ۲)، S209R (شکل ۳) و E153Q (شکل ۴) بودند. ۹ مورد از باکتری ها دارای جهش های بدمعنی G71E و S209R به طور هم زمان بودند. دو باکتری فقط جهش بدمعنی G71E داشتند. دو جدایه دارای جهش بدمعنی E153Q بودند. جهش S209R در همه نمونه ها یا به همراه G71E گزارش شد یا به همراه E153Q هم چنین همه نمونه ها علاوه بر جهش های بدمعنی دارای یک یا چند جهش خاموش از جمله A23A بودند. در دو مورد از ۱۴ نمونه مقاوم سودوموناس آئروژینوزا هیچ جهش بدمعنی شناسایی نشد. هر دو باکتری ذکر شده تنها دارای جهش خاموش G49G بود.

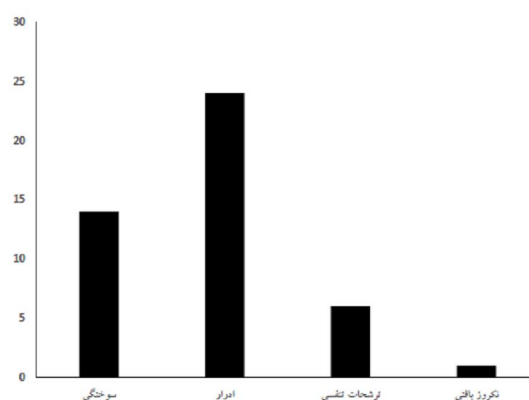


شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR ژن *nalC* بر روی ژل آگارز ۲ درصد. به ترتیب از راست به چپ DNA لدر 100bp و شش جدایه مقاوم سودوموناس آئروژینوزا نشان داده شده است. طول محصول PCR در هر نمونه حدود ۸۱۲ جفت باز است.

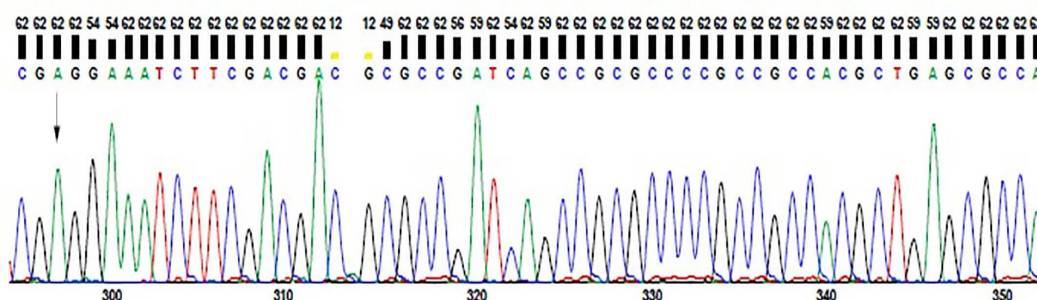
حساسیت نسبت به سیروفلوکساسین مشاهده شد. آنالیز نتایج نشان داد رابطه آماری معنی داری بین حساسیت و مقاومت به هر دارو در بین جدایه ها وجود ندارد ($p < 0.05$). در این مطالعه از ۴۵ جدایه، ۱۴ جدایه مقاوم به سیروفلوکساسین از نظر میزان MIC مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه میزان MIC سیروفلوکساسین بین 16 $\mu\text{g/ml}$ تا $>512 \mu\text{g/ml}$ تعیین شد. هم چنین مقاومت به نالیدیکسیک اسید در همه نمونه های مقاوم (۱۴ نمونه) به میزان $>512 \mu\text{g/ml}$ تعیین شد.

جدول ۱. الگوی مقاومت ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های بالینی نسبت به آنتی بیوتیک

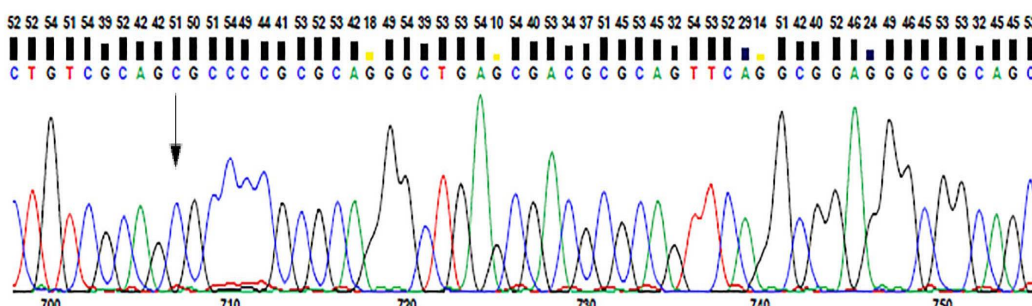
نوع آنتی بیوتیک	مقاوم تعداد(درصد)	حساس وابسته دوز تعداد(درصد)	حساس تعداد(درصد)
سیروفلوکساسین	۱۴(۳۱/۱۱)	۳(۶/۶۷)	۲۸(۶۲/۲۲)
اریترومایسین	۴۵(۱۰۰)	-	-
سفالکسین	۴۴(۹۷/۷۸)	-	۱(۲/۲۲)
سفتری اکسون	۴۲(۹۳/۳۳)	۲(۴/۴۴)	۱(۲/۲۲)
تتراسایکلین	۳۴(۷۵/۵۶)	۸(۱۷/۷۷)	۳(۶/۶۷)
نالیدیکسیک اسید	۳۹(۸۶/۶۷)	۲(۴/۴۴)	۴(۸/۸۹)



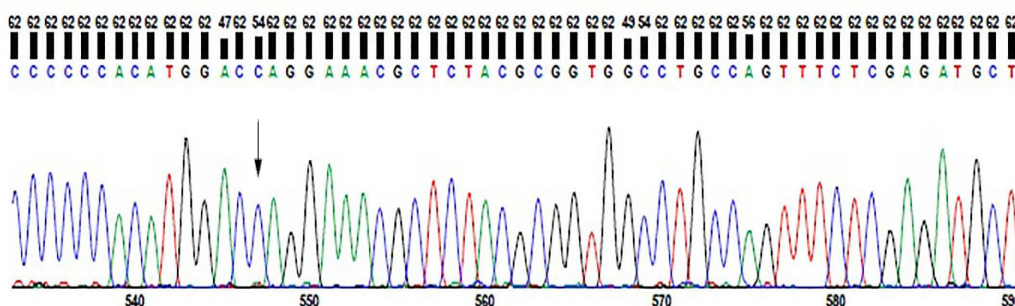
نمودار ۱. توزیع عفونت های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیمارستان ها و آزمایشگاه های استان گیلان به صورت درصد.



شکل ۲. الکتروفوروگرام مربوط به تغییر باز G در موقعیت ۲۱۲ به A: با تغییر کدونی GGG > GAG و تغییر آمینو اسیدی G71E



شکل ۳. الکتروفوروگرام مربوط به تغییر باز A در موقعیت ۲۰۹ به C: با تغییر کدونی AGC (Ser) > CGC (Arg) و تغییر آمینو اسیدی S209R



شکل ۴. الکتروفوروگرام مربوط به تغییر باز G در موقعیت ۱۵۳ به C: با تغییر کدونی GAG (GLU) < (Gln)CAG و تغییر آمینو اسیدی (nalC16) E153Q

بحث

آنزیم های غیرفعال کننده آنتی بیوتیک ها (نظیر سفالوسپورینازها) به طور ذاتی به چندین آنتی بیوتیک مقاوم است. بنابراین پتانسیل قابل توجهی برای ایجاد یا کسب مقاومت های دارویی را در هر منطقه جغرافیایی داراست. عفونت های ناشی از سویه های مقاوم باعث افزایش سه برابری مرگ و میر، افزایش نه برابری باکتری می ثانویه، افزایش دو برابری طول مدت بستری در بیمارستان و افزایش قابل ملاحظه هزینه درمان شده است. داروهای آنتی سودومونال رایج شامل بتالاکتامها، آمینوگلیکوزیدها و

مقاومت آنتی بیوتیکی یکی از مشکلات مهم کشورها در درمان بیماری های عفونی می باشد. سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن گرم منفی فرصت طلب بیمارستانی برای طیف وسیعی از عفونت ها است که ممکن است با مقاومت بالای دارویی همراه باشد. مکانیسم های مقاومت دارویی این باکتری به دو گروه ذاتی و اکتسابی تقسیم می شوند. سودوموناس آئروژینوزا به خاطر نفوذپذیری کم غشای خارجی، بیان دائمی چندین پمپ افلاکس و تولید انواع

فلوروکوئینولون ها می باشد که معمولا به طور هم زمان باعث ایجاد مقاومت چند دارویی در اغلب سویه ها می شوند. در مطالعه حاضر که بر روی ۴۵ نمونه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های و آزمایشگاه های سطح استان گیلان انجام گرفت، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در ۳۱.۱۱ درصد از جدایه ها گزارش گردید. در حالی که در مطالعه توحید پور و همکاران در سال ۲۰۰۹ از ۱۳۳ نمونه کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا ۳۴ درصد ایزوله ها به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین مقاوم بودند (۱۸). هم چنین در مطالعه صورت گرفته توسط نیدی و همکاران در سال ۲۰۱۴ از ۱۷۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا ۵۷ درصد نمونه ها به سیپروفلوکساسین مقاوم بوده است (۱۹). در مطالعه صالحی و همکاران میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین حدود ۶۴/۳ درصد موارد گزارش شد (۲۰). در مطالعه اکرامی و همکاران در سال ۲۰۰۷ تمامی سویه های جدا شده از بیماران سوختگی مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند (۲۱). هم چنین در سال ۲۰۱۴ گلی و همکاران در بین ۱۰۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزا ۶۵ درصد مقاومت به سیپروفلوکساسین مشاهده کردند (۲۲). بر این اساس در نواحی مختلف میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین متفاوت بوده اما به دلیل مصرف بی رویه آنتی بیوتیک انتظار می رود در ایران میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در حال افزایش باشد.

در مطالعات مختلف دلایل مقاومت چند دارویی در سودوموناس آئروژینوزا شامل جهش در ژن های نظیر *nalC* و افزایش بیان ژن های سیستم های افلاکس نظیر *mexB*، *mexA* و *oprM* شناسایی شده است (۲۳، ۲۴). *MexAB-OprM* مسئول مقاومت به داروهای نظیر تتراسایکلین، کلرومفینیکل، کوئینولون ها و اغلب بتا لاکتام ها به جز ایمی پنم می باشد (۲۵، ۲۶). در مطالعه کوئل و همکاران سال ۲۰۰۶ در جدایه های بیمارستانی دارای مقاومت چند دارویی با افزایش بیان *MexA* جهش در *nalC* و *nalD* مشاهده شد (۲۷). در مطالعه حاضر با تعیین توالی ژن *nalC* مشخص شد که ۸۶ درصد موارد دارای یک یا چند جهش

(E153Q و S209R،G71E) بودند. در حالی که ۶۴ درصد موارد هر دو جهش G71E و S209R را داشتند. در مطالعات قبلی هر دو جهش S209R،G71E (۲۹-۲۷) و یا هر سه جهش S209R،G71E و E153Q گزارش شده بودند (۳۰). در مطالعه لیناس و همکاران، وقوع دو یا هر سه جهش مذکور با افزایش بیان *mexA* در نمونه های مقاوم همراه بود (۳۰). هم چنین در مطالعه کوئل و همکاران در اغلب نمونه های مقاوم به داروی سودوموناس آئروژینوزا با جهش های G71E و S209R در *nalC* افزایش بیان *mexA* مشاهده شد (۲۷). با توجه به این که *nalC* یک مهار کننده منفی *ArmR* است، با غیر فعال شدن آن *ArmR* فعال شده و باعث مهار فعالیت *MexR* می شود. *MexR* نیز به نوبه خود یک مهار کننده بیان ژن های سیستم افلاکس پمپ *mexAB-oprM* است که مهار آن توسط *ArmR* صورت می گیرد (۳۱، ۳۲). با غیر فعال شدن *MexR* انتظار می رود افزایش بیان سیستم *mexAB-oprM* رخ دهد. بنابراین با توجه به مطالعات قبلی به نظر می رسد در تمامی یا اغلب نمونه های دارای جهش در *nalC* در این مطالعه، تغییر در بیان سیستم افلاکس پمپ *mexAB-oprM* رخ داده باشد که به مطالعات تکمیلی در آینده نیاز دارد. از سوی دیگر عدم وقوع جهش بدمعنی در ۱۴ درصد نمونه ها نشان می دهد که عوامل دیگری در ایجاد مقاومت در این جدایه ها از جمله جهش در دیگر ژن ها نقش داشته باشد. به طوری که در مطالعه لیناس و همکاران علاوه بر جهش در ژن *nalC* جهش در دو تنظیم کننده منفی دیگر سیستم های افلاکس پمپ (*mexR* و *mexZ*) در نمونه های مقاوم به داروی سودوموناس آئروژینوزا نیز مشاهده گردید (۳۰). هم چنین همراهی مقاومت به سیپروفلوکساسین و جهش در زیر واحدهای توپوایزومرازها (*gyrA*، *gyrB*)، *parC* و *parE* در مطالعات مختلف نشان داده شده است (۱۸، ۳۳). با توجه به این که جدایه های دارای جهش در ژن *nalC* دارای مقادیر متفاوتی از MIC سیپروفلوکساسین بودند، به نظر می رسد بین افزایش مقاومت و وقوع جهش در تعداد بیش تری از ژن ها ارتباط وجود داشته باشد که به مطالعه بر

فلوروکوئینولون ها می باشد که معمولا به طور هم زمان باعث ایجاد مقاومت چند دارویی در اغلب سویه ها می شوند. در مطالعه حاضر که بر روی ۴۵ نمونه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های و آزمایشگاه های سطح استان گیلان انجام گرفت، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در ۳۱.۱۱ درصد از جدایه ها گزارش گردید. در حالی که در مطالعه توحید پور و همکاران در سال ۲۰۰۹ از ۱۳۳ نمونه کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا ۳۴ درصد ایزوله ها به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین مقاوم بودند (۱۸). هم چنین در مطالعه صورت گرفته توسط نیدی و همکاران در سال ۲۰۱۴ از ۱۷۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا ۵۷ درصد نمونه ها به سیپروفلوکساسین مقاوم بوده است (۱۹). در مطالعه صالحی و همکاران میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین حدود ۶۴/۳ درصد موارد گزارش شد (۲۰). در مطالعه اکرامی و همکاران در سال ۲۰۰۷ تمامی سویه های جدا شده از بیماران سوختگی مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند (۲۱). هم چنین در سال ۲۰۱۴ گلی و همکاران در بین ۱۰۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزا ۶۵ درصد مقاومت به سیپروفلوکساسین مشاهده کردند (۲۲). بر این اساس در نواحی مختلف میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین متفاوت بوده اما به دلیل مصرف بی رویه آنتی بیوتیک انتظار می رود در ایران میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در حال افزایش باشد.

در مطالعات مختلف دلایل مقاومت چند دارویی در سودوموناس آئروژینوزا شامل جهش در ژن های نظیر *nalC* و افزایش بیان ژن های سیستم های افلاکس نظیر *mexB*، *mexA* و *oprM* شناسایی شده است (۲۳، ۲۴). *MexAB-OprM* مسئول مقاومت به داروهای نظیر تتراسایکلین، کلرومفینیکل، کوئینولون ها و اغلب بتا لاکتام ها به جز ایمی پنم می باشد (۲۵، ۲۶). در مطالعه کوئل و همکاران سال ۲۰۰۶ در جدایه های بیمارستانی دارای مقاومت چند دارویی با افزایش بیان *MexA* جهش در *nalC* و *nalD* مشاهده شد (۲۷). در مطالعه حاضر با تعیین توالی ژن *nalC* مشخص شد که ۸۶ درصد موارد دارای یک یا چند جهش

منابع

1. Chatterjee M, Anju CP, Biswas L, Anil Kumar V, Gopi Mohan C, Biswas R. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *International journal of medical microbiology: IJMM*. 2016; 306(1):48-58.
2. Hooper DC, Wolfson JS. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *New England Journal of Medicine*. 1991 Feb 7; 324(6):384-94.
3. Hancock RE, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug resistance updates*. 2000 Aug 31; 3(4):247-55.
4. Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2005 Oct 1; 25(10):1353-64.
5. Gorgani N, Ahlbrand S, Patterson A, Pourmand N. Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of antimicrobial agents*. 2009 Nov 30; 34(5):414-8.
6. Adewoye L, Sutherland A, Srikumar R, Poole K. The mexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity. *Journal of bacteriology*. 2002 Aug 1; 184(15):4308-12.
7. Ahmed M, Borsch CM, Taylor SS, Vazquez-Laslop N, Neyfakh AA. A protein that activates expression of a multidrug efflux transporter upon binding the transporter substrates. *Journal of Biological Chemistry*. 1994 Nov 11; 269(45):28506-13.
8. Akama H, Kanemaki M, Yoshimura M, Tsukihara T, Kashiwagi T, Yoneyama H, et al. Crystal Structure of the Drug Discharge Outer Membrane Protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa* dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Dec 17; 279(51):52816-9.
9. Akama H, Matsuura T, Kashiwagi S, Yoneyama H, Narita SI, Tsukihara T, et al. Crystal structure of the membrane fusion

روی دیگر ژن های دخیل در مقاومت به این آنتی بیوتیک نیاز است. به طوری که در مطالعه دیگر توسط همین گروه وقوع جهش در ژن هایی چون *gyrA* (زیر واحد A ی DNA ژیراز) و *parC* در بعضی نمونه ها مشاهده شد (نتایج ارائه نشده است).

نتیجه گیری

با توجه به این که سیپروفلوکساسین جزء آنتی بیوتیک های با بیش ترین تأثیر کشندگی سودوموناس آئروژینوزا می باشد وجود ۱۴ جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین از ۴۵ جدایه و همچنین مقاومت به دوز های بالای نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین در این مطالعه خطر خاموش افزایش مقاومت های آنتی بیوتیکی را در استان نشان می دهد. هم چنین وقوع ۳ جهش شایع *nalC* در دنیا در این مطالعه نیز در ۱۲ مورد از ۱۴ جدایه نشانه اهمیت این ۳ جهش در ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک در این باکتری در استان گیلان می باشد. لذا انتظار می رود با توجه به وقوع جهش در ژن های تنظیم کننده منفی سیستم های افلاکس از جمله *nalC* در نمونه های سودوموناس آئروژینوزا از روش های درمانی کارآمدتری در مراکز درمانی بهره برده شود، چرا که جهش در این گروه از ژن ها باعث افزایش بیان ژن های سیستم افلاکس و در نتیجه خروج بیش تر دارو از سلول و در نتیجه بی اثر بودن دوزهای مختلف آنتی بیوتیک می گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله تحقیقاتی حاصل پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد میکرب شناسی می باشد. نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به خاطر همکاری، نهایت تشکر را دارند. هم چنین کمال تشکر را از دکتر معصومه انوری، دکتر لیلا اسدپور، دکتر سعید نادر محمد، فروغ رهنمای رودپشتی و فاطمه اسدی را داریم.

- protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Jun 18; 279(25):25939-42.
10. De Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, Timmis KN. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *Journal of bacteriology*. 1990 Nov 1; 172(11):6568-72.
11. Dimitrova M, Younes-Cauet G, Oertel-Buchheit P, Porte D, Schnarr M, Granger-Schnarr M. A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG*. 1998 Jan 1; 257(2):205-12.
12. Mokhonov VV, Mokhonova EI, Akama H, Nakae T. Role of the membrane fusion protein in the assembly of resistance-nodulation-cell division multidrug efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004 Sep 17; 322(2):483-9.
13. Ziha-Zarifi I, Llanes C, Köhler T, Pechere JC, Plesiat P. In Vivo Emergence of Multidrug-Resistant Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the Active Efflux System MexA-MexB-OprM. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999 Feb 1; 43(2):287-91.
14. De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K, et al. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001 Jun 1; 45(6):1761-70.
15. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*. 2007 Feb 1; 67(3):351-68.
16. May TB, Shinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, DeVault JD, et al. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clinical microbiology reviews*. 1991; 4(2):191-206.
17. Antibiotic Resistance: Data Gaps Will Remain Despite HHS Taking Steps to Improve Monitoring. Jul 2011:49-52.
18. Tohidpour A, Najar Peerayeh S, Najafi S. Detection of DNA Gyrase Mutation and Multidrug Efflux Pumps Hyperactivity in Ciprofloxacin Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*. 2013 dec;1(1):1-7.
19. Nidhi N, Pradyot P, Mohan LG, Tribhuban MM. Possible Role of Curcumin as an Efflux Pump Inhibitor in Multi Drug Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014 Oct; 8(10): DC04–DC07.
20. Zolali M, Salehi M, Mosavari N, Bolfion M, Taheri M, Mirzaei M. investigation of mexX gene in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples. *Quarterly Journal of Microbiology Knowledge* 2010; 2(6):1-6.
21. Ekrami A, Kalantar E. Bacterial infections in burn patients at a burn hospital in Iran. *Indian Journal of Medical Research*. 2007;126(6):541.
22. Goli HR, Nahaei MR, Ahangarzadeh Rezaee M, Hasani A, Samadi Kafil H, Aghazadeh M. Emergence of colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Tabriz hospitals, Iran. *Iranian journal of microbiology*. 2016;8(1):62-9.
23. Geyik MF, Aldemir M, Hosoglu S, Tacyildiz HI. Epidemiology of burn unit infections in children. *American journal of infection control*. 2003 Oct 31; 31(6):342-6.
24. Pan YP, Xu YH, Wang ZX, Fang YP, Shen JL. Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of microbiology*. 2016; 198(6): 565-71.
25. De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K, et al. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001 Jun 1; 45(6):1761-70.
26. 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*.

- Antimicrobial agents and chemotherapy. 2000 Dec 1; 44(12):3322-7.
27. Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2006 May 1; 50(5):1633-41.
28. Maeda T, García-Contreras R, Pu M, Sheng L, Garcia LR, Tomás M, et al. Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds. The ISME journal. 2012 Mar 1; 6(3):493-501.
29. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Dominguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, et al. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2012; 56(12):6349-57.
30. Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plésiat P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004 May 1; 48(5):1797-802.
31. Ghosha S, Cremersb CM, Jakobb U, Lovea NG. Chlorinated phenols control the expression of the multi-drug resistance efflux pump MexAB-OprM in *Pseudomonas aeruginosa* by activating NalC. Mol Microbiol. 2011 Mar; 79(6): 1547-56.
32. Starr LM, Fruci M, Poole K. Pentachlorophenol induction of the *Pseudomonas aeruginosa* mexAB-oprM efflux operon: involvement of repressors NalC and MexR and the antirepressor ArmR. PloS one. 2012; 7(2):e32684.
33. Lee JK, Lee YS, Park YK, Kim BS. Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. International journal of antimicrobial agents. 2005; 25(4):290-5.