Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 8:16 +0430 on Wednesday September 20th 2017

Arak Medical University Journal (AMUJ)
2016; 19(112): 12-21

Original Article

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

Fatemeh Hakimi[1], Najmeh Ranji[2*], Mohammad Faezi Ghasemi[3]

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

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 8:16 +0430 on Wednesday September 20th 2017

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۹، شماره ۷ (شماره پیاپی ۱۱۲)، مهر ۱۳۹۵، ۲۱-۱۲

جهش‌های موجود در ژن *nalC* در سویه‌های سودوموناس آئروزینوزا 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 زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

۲- استادیار، ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، 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 تنظیم کننده 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 مایکرودایلوشن 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 اریترومایسین (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 G71E، S209R 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 طالشان، دانشگاه آزاد اسلامی رشت، گروه زیست شناسی

Email: najmehranji@gmail.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 8:16 +0430 on Wednesday September 20th 2017

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یک عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی است(۱) که قابلیت کسب مقاومت ذاتی و اکتسابی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را دارا می‌باشد(۲). این باکتری به عنوان عامل عفونت‌های فرصت طلب بیمارستانی مانند زخم، دستگاه ادراری و عفونت دستگاه تنفسی گزارش شده است(۳) فلوروکوئینولون‌ها یک کلاس مهم از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان عفونت با سودوموناس هستند(۴) که به طور گسترده‌ای جهت درمان عفونت‌های بیمارستانی مورد استفاده قرار می‌گیرند(۵) سودوموناس آئروژینوزا در نتیجه مکانیسم‌های مختلفی چون نفوذپذیری کم غشای خارجی، آنزیم‌های تغییر دهنده ساختار آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش بیان پمپ‌های تراوشی به طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است(۶-۹).

از مهم‌ترین پمپ‌های تراوشی موجود در این باکتری که در مقاومت اکتسابی آن نقش دارد می‌توان به پمپ *MexAB-oprM* اشاره نمود(۱۰، ۱۱) پمپ *MexAB-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) یک پروتئین درون غشایی که باعث انتقال فعال آنتی‌بیوتیک‌ها از عرض غشا می‌شود و ۳) *oprM* (outer membrane protein OprM) که یک کانال خروج خارج غشایی است(۱۲). افزایش بیان این پمپ منجر به مقاومت قابل ملاحظه‌ای نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا شده است(۱۳، ۱۴). *nalC* (transcriptional regulator) از جمله ژن‌های تنظیم کننده بیان این پمپ افلاکس است که جهش در آن می‌تواند 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 آنتی‌بیوتیکی در سودوموناس آئروژینوزا می‌شود(۱۵).

افزایش روز افزون مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در دنیا، مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها را به میزان زیادی در انواع باکتری‌ها افزایش داده است. به طوری که محققان به دنبال راهکارهای مناسب‌تری برای درمان انواع عفونت‌های باکتریایی هستند. سودوموناس آئروژینوزا جزء باکتری‌هایی است که دارای مقاومت ذاتی به انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد، اما وقوع جهش‌های مختلف و یا کسب ژن‌های مقاومت به دارو در این باکتری باعث افزایش مقاومت در نمونه‌های 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 فیبروزیز و مبتلایان به سرطان تحت شیمی درمانی می‌باشد(۱۶)، کسب اطلاعات بیش‌تر در خصوص میزان و فراوانی باکتری‌های دارای جهش‌های خاص مقاوم به دارو ضروری به نظر می‌رسد. سیپروفلوکساسین تنها فلوروکوئینولونی است که بیش‌ترین اثر مهاری را علیه سودوموناس آئروژینوزا داراست. با این وجود توصیه نمی‌شود که به عنوان تنها دارو برای درمان استفاده شود. زیرا این ارگانیسم به راحتی در مدت درمان مقاوم می‌شود(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 ژن‌های مهم در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین (ژن *nalC*) در جدایه‌های مقاوم آئروژینوزا بررسی شود تا در آینده نزدیک در مراکز درمانی از این اطلاعات جهت به کارگیری روش‌های درمانی مناسب‌تر استفاده گردد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و شناسایی باکتری

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

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 8:16 +0430 on Wednesday September 20th 2017

جمع‌آوری گردید. سپس جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا بر اساس رنگ گرم، تست اکسیداز، تولید رنگدانه و رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد تشخیص داده شدند.

سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی

نمونه‌های مقاوم، حساس و حساس وابسته به دوز سودوموناس آئوروژینوزا با انجام تست آنتی‌بیوگرام از طریق روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Baur-Kirby) و طبق استاندارد CLSI 2013، با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی نالیدیکسیک اسید (۳۰µg)، اریترومایسین (۳۰µg)، سیپروفلوکساسین(۵µg)، تتراسایکلین (۳۰µg)، سفتری اکسون (۳۰µg) و سفالکسین (۳۰µg)) تعیین گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت High Media (هند) خریداری شد. بعد از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ، 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 مایکرودایلوشن بر اساس استاندارد CLSI 2013 استفاده شد. به این منظور جدایه‌ها در محیط کشت مولر هینتون براث در غلظت‌های مختلف دارو به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 ۱/۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند. بعد از حصول اطمینان از تشکیل تک باند، اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵µl با استفاده از کیت AccuPower® PCR PreMix (شرکت BIONEER، کره جنوبی) با افزودن DNA ژنومی، جفت پرایمر (۱۰۰ 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 ۹۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل در دمای ۹۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ 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 آنلاین 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 ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

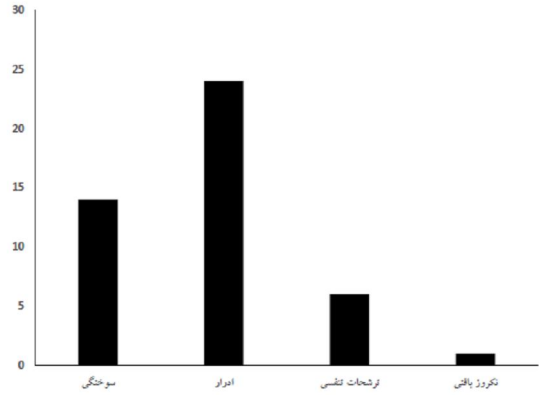
در این مطالعه ۴۵ جدایه سودوموناس آئروژینوزا از بیماران بستری در بیمارستان‌های سطح استان گیلان جداسازی شد (نمودار ۱) و تفاوت معنی‌داری در موضع عفونت به سودوموناس آئروژینوزا مشاهده نشد ($p<0/05$). نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت این باکتری نسبت به ۶ آنتی‌بیوتیک در جدول ۱ نشان داده شده است. در این آزمون بیش‌ترین مقاومت نسبت به اریترومایسین و بیش‌ترین

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 8:16 +0430 on Wednesday September 20th 2017

حساسیت نسبت به سیپروفلوکساسین مشاهده شد. آنالیز نتایج نشان داد رابطه آماری معنی‌داری بین حساسیت و مقاومت به هر دارو در بین جدایه‌ها وجود ندارد (p<۰/۰۵). در این مطالعه از ۴۵ جدایه، ۱۴ جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین از نظر میزان MIC مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه میزان MIC سیپروفلوکساسین بین 16 µg/ml تا 512< µg/ml تعیین شد. هم‌چنین مقاومت به نالیدیکسیک اسید در همه نمونه‌های مقاوم (۱۴ نمونه) به میزان 512< µg/ml تعیین شد.

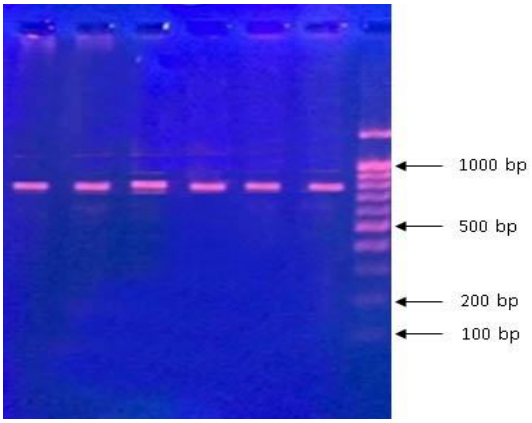
جدول ۱. الگوی مقاومت ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی نسبت به آنتی‌بیوتیک

نوع آنتی‌بیوتیک	مقاوم تعداد(درصد)	حساس وابسته دوز تعداد(درصد)	حساس تعداد(درصد)
سیپروفلوکساسین	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)



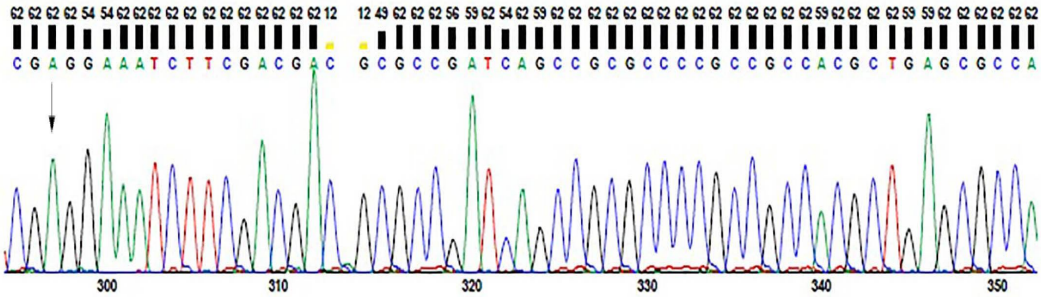
نمودار ۱. توزیع عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های استان گیلان به صورت درصد.

جهت بررسی مولکولی مقاومت به سیپروفلوکساسین، ژن *nalC* در نمونه‌های جدا شده به روش PCR تکثیر شدند (شکل۱) و بعد از اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR، نمونه‌ها مورد آنالیز به کمک سکونسینگ قرار گرفتند. نتایج سکونسینگ نشان داد که ۱۲ مورد از جدایه‌ها دارای یک یا چند جهش بدمعنی G71E (شکل ۲)، S209R (شکل ۳) و E153Q (شکل ۴) بودند. ۹ مورد از باکتری‌ها دارای جهش‌های بدمعنی G71E و S209R به طور هم‌زمان بودند. دو باکتری فقط جهش بدمعنی G71E داشتند. دو جدایه دارای جهش بدمعنی E153Q بودند. جهش S209R در همه نمونه‌ها یا به همراه G71E گزارش شد یا به همراه E153Q هم‌چنین همه نمونه‌ها علاوه بر جهش‌های 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.

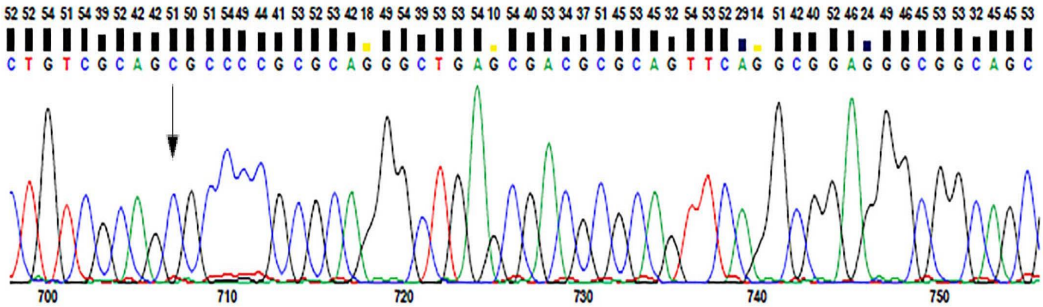


شکل۱. الکتروفورز محصولات PCR ژن *nalC* بر روی ژل آگارز ۲ درصد. به ترتیب از راست به چپ DNA لدر 100bp و شش جدایه مقاوم سودوموناس آئروژینوزا نشان داده شده است. طول محصول PCR در هر نمونه حدود ۸۱۲ جفت باز است.

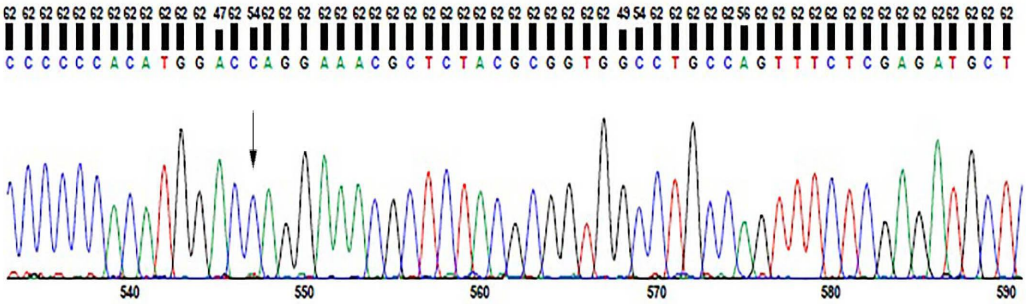
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 8:16 +0430 on Wednesday September 20th 2017



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



شکل ۳. الکتروفروگرام مربوط به تغییر باز A در موقعیت ۶۲۵ به C : با تغییر کدونی AGC (Ser) > CGC (Arg) و تغییر امینو اسیدی S209R



شکل ۴. الکتروفروگرام مربوط به تغییر باز G در موقعیت ۴۵۷به C : با تغییر کدونی GAG(GLU)<(Gln)CAG و تغییر امینو اسیدی (*nalc*16) E153Q

بحث

مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از مشکلات مهم کشورها در درمان بیماری‌های عفونی می‌باشد. سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن گرم منفی فرصت طلب بیمارستانی برای طیف وسیعی از عفونتهاست که ممکن است با مقاومت بالای دارویی همراه باشد. مکانیسم‌های مقاومت دارویی این باکتری به دو گروه ذاتی و اکتسابی تقسیم می‌شوند. سودوموناس آئروژینوزا به خاطر نفوذپذیری کم غشای خارجی، بیان دائمی چندین پمپ افلاکس و تولید انواع آنزیم‌های غیرفعال کننده آنتی‌بیوتیک‌ها (نظیر سفالوسپورینازها) به طور ذاتی به چندین آنتی‌بیوتیک مقاوم است. بنابراین پتانسیل قابل توجهی برای ایجاد یا کسب مقاومت‌های دارویی را در هر منطقه جغرافیایی داراست. عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم باعث افزایش سه برابری مرگ و میر، افزایش نه برابری باکتریمی ثانویه، افزایش دو برابری طول مدت بستری در بیمارستان و افزایش قابل ملاحظه هزینه درمان شده است. داروهای آنتی سودومونال رایج شامل بتالاکتام‌ها، آمینوگلایکوزیدها و

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 8:16 +0430 on Wednesday September 20th 2017

فلوروکوئینولون‌ها می‌باشد که معمولا به طور هم‌زمان باعث ایجاد مقاومت چند دارویی در اغلب سویه‌ها می‌شوند. در مطالعه حاضر که بر روی ۴۵ نمونه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های و آزمایشگاه‌های سطح استان گیلان انجام گرفت، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در ۳۱.۱۱ درصد از جدایه‌ها گزارش گردید. در حالی که در مطالعه توحید پور و همکاران در سال ۲۰۰۹ از ۱۳۳ نمونه کلینیکی سودوموناس ائروزینوزا ۳۴ درصد ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین مقاوم بودند(۱۸). هم‌چنین در مطالعه صورت گرفته توسط نیدی و همکاران در سال ۲۰۱۴ از ۱۷۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا ۵۷ درصد نمونه‌ها 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 سویه‌های جدا شده از بیماران سوختگی مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند(۲۱). هم‌چنین 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 بی‌رویه آنتی‌بیوتیک انتظار می‌رود در ایران میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در حال افزایش باشد.

در مطالعات مختلف دلایل مقاومت چند دارویی در سودوموناس آئروژینوزا شامل جهش در ژن‌هایی نظیر *nalC* و افزایش بیان ژن‌های سیستم‌های افلاکس نظیر *mexA*، *mexB* و *oprM* شناسایی شده است(۲۳، ۲۴). *MexAB-OprM* مسئول مقاومت به داروهایی نظیر تتراسایکلین، کلرومفنیکل، کوئینولون‌ها و اغلب بتالاکتام‌ها به جز ایمی پنم می‌باشد(۲۵، ۲۶). در مطالعه کوئل و همکاران سال ۲۰۰۶ در جدایه‌های 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 (S209R،G71E و E153Q) بودند. در حالی که ۶۴ درصد موارد هر دو جهش G71E و S209R را داشتند. در مطالعات قبلی هر دو جهش G71E، S209R (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 نمونه‌های مقاوم همراه بود(۳۰). هم‌چنین در مطالعه کوئل و همکاران در اغلب نمونه‌های مقاوم به داروی سودوموناس آئروژینوزا با جهش‌های 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 و باعث مهار فعالیت *MexR* می‌شود. *MexR* نیز به نوبه خود یک مهار کننده بیان ژن‌های سیستم افلاکس پمپ *mexAB-oprM* است که مهار آن توسط *ArmR* صورت می‌گیرد(۳۱، ۳۲). با غیر فعال شدن *MexR* انتظار می‌رود افزایش بیان سیستم *mexAB-oprM* رخ دهد. بنابراین با توجه به مطالعات قبلی به نظر می‌رسد در تمامی یا اغلب نمونه‌های 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 نمونه‌ها نشان می‌دهد که عوامل دیگری در ایجاد مقاومت در این جدایه‌ها از جمله جهش در دیگر ژن‌ها نقش داشته باشد. به طوری که در مطالعه لیانس و همکاران علاوه بر جهش در ژن *nalC*، جهش در دو تنظیم کننده منفی دیگر سیستم‌های افلاکس پمپ (*mexR* و *mexZ*) در نمونه‌های مقاوم به داروی سودوموناس آئروژینوزا نیز مشاهده گردید(۳۰). هم‌چنین همراهی مقاومت به سیپروفلوکساسین و جهش در زیرواحدهای توپوایزومرازها (*gyrA*،*gyrB* ، *parC* و *parE*) در مطالعات مختلف نشان داده شده است(۱۸، ۳۳). با توجه به این که جدایه‌های دارای جهش در ژن *nalC* دارای مقادیر متفاوتی از MIC ی سیپروفلوکساسین بودند، به نظر می‌رسد بین افزایش مقاومت و وقوع جهش در تعداد بیش‌تری از ژن‌ها ارتباط وجود داشته باشد که به مطالعه بر

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 8:16 +0430 on Wednesday September 20th 2017

روی دیگر ژن‌های دخیل در مقاومت به این آنتی‌بیوتیک نیاز است. به طوری که در مطالعه دیگر توسط همین گروه وقوع جهش در ژن‌هایی چون *gyrA* (زیر واحد A ی DNA ژیراز) و *parC* در بعضی نمونه‌ها مشاهده شد (نتایج ارائه نشده است).

نتیجه‌گیری

با توجه به این که سیپروفلوکساسین جزء آنتی‌بیوتیک‌های با بیش‌ترین تأثیر کشندگی سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد 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 مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی را در استان نشان می‌دهد. هم‌چنین 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 آنتی‌بیوتیک در این باکتری در استان گیلان می‌باشد. لذا انتظار می‌رود با توجه به وقوع جهش در ژن‌های تنظیم کننده منفی سیستم‌های افلاکس از جمله *nalC* در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا از روش‌های درمانی کارآمدتری در مراکز درمانی بهره برده شود، چرا که جهش در این گروه از ژن‌ها باعث افزایش بیان ژن‌های سیستم افلاکس و در نتیجه خروج بیش‌تر دارو از سلول و در نتیجه بی اثر بودن دوزهای مختلف آنتی‌بیوتیک می‌گردد.

تشکر و قدردانی

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

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

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 8:16 +0430 on Wednesday September 20th 2017

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 ofPseudomonas 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.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 8:16 +0430 on Wednesday September 20th 2017

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 xpression 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.