Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(92): 70-79

Correlation between the expression of *OprD* gene and sensitivity to carbapenems of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples using qRT-PCR

Arabestani MR[1]*, Rajabpour M[1], Yousefi Mashouf R[1], Alikhani MY[1], Mousavi SM[1]

1-Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Received: 8 Sep 2014, Accepted: 12 Nov 2014

Abstract

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most common nosocomial pathogens with high mortality rates. OprD is the major resistance mechanism to carbapeneme antibiotics. The aim of this study was to determine the expression of the genes encoding these efflux pumps using qRT-PCR.

Materials and Methods: This study examined 100 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients admitted to various hospitals in the Hamedan. Conventional phenotypic tests were used for identifying the 100 collected samples, then 31 samples were selected based on type of collected specimen and antibiotic susceptibility test i.e. antibiotic disk diffusion method performed for aminoglycoside, quinolone and carbapenem antibiotics. Furthermore, MIC method was performed for imipenem. Finally, RNA was extracted and converted to cDNA for determining the efflux pump genes expression using qRT-PCR.

Results: Among 8 selected antibiotics, the greatest resistance was for levofloxacin (61.2%, n=19) and the lowest one for imipenem (9.6%, n=3). The results of MIC were to imipenem 12 samples (38.7%) resistant, 13 samples (41.93%) intermediate, and 6 samples (19.35%) sensitive. The *OprD* gene was present in all strains but different expression has been observed. The strains with over expression of *OprD* gene showed high sensitivity towards carbapenems family antibiotics especially imipenem.

Conclusion: Identifying of bacterial resistance mechanisms is very complicated and extensive due to different mechanisms involved for similar antibiotics. OprD is main cause of attachment to the carbapenems family antibiotics. The more expression of OprD shows the more antibiotic sensitivity.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, MIC, Gene exoression, *OprD*, qRT-PCR

*Corresponding Author:
Address: Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
Email: mohammad.arabestani@gmail.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۷، شماره۱۱ (شماره پیاپی۹۲)،بهمن ۱۳۹۳، ۷۹-۷۰

ارتباط بین میزان بیان ژن*OprD* و حساسیت نسبت به کاربا‌پنم‌ها در سویه‌های پسودوموناس جدا شده از نمونه‌های بالینی به روش qRT-PCR

محمد رضا عربستانی[1*]، مجتبی رجب پور[2]، رسول یوسفی مشعوف[3]، محمد یوسف علیخانی[4]، سید مسعود موسوی[2]

۱- استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۲- کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۳- استاد، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۴- دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: پسودوموناس آئروژینوزا یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های بیمارستانی با میزان مرگ و میر بالاست. پورین *OprD* به عنوان یکی از اصلی‌ترین مکانیسم‌های مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های خانواده کاربا‌پنم محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه تعیین میزان بیان ژن کدکننده این پورین از طریق qRT-PCR است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه با بررسی ۱۰۰ سویه پسودوموناس آئروژینوزا، ۳۱ نمونه انتخاب و تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن برای آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزید، کینولون‌ها، کاربا‌پنم‌ها و تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی برای آنتی‌بیوتیک ایمی پنم انجام گرفت. سپس استخراج RNA و تبدیل آن به cDNA انجام و در مرحله آخر بیان ژن‌های مورد نظر توسط qRT-PCR صورت پذیرفت.

یافته‌ها: از بین ۸ آنتی‌بیوتیک انتخاب شده، بیشترین مقاومت نسبت به لووفلوکساسین ۱۹ (۶۱/۲ درصد) و هم‌چنین کمترین مقاومت نسبت به ایمی پنم ۳ (۹/۶ درصد) مشاهده گردید. نتایج حداقل غلظت مهار کنندگی آنتی‌بیوتیک ایمی پنم، ۱۲ مورد (۳۸/۷ درصد) مقاوم، ۱۳ مورد (۴۱/۹۳ درصد) اینترمدیت و ۶ مورد (۱۹/۳۵ درصد) حساس گزارش گردید. ژن *OprD* در تمام سویه‌ها وجود داشت ولی میزان بیان در سویه‌ها مختلف، به صورت متفاوت مشاهده شد. سویه‌های دارای بیان بالای ژن *OprD* حساسیت بالایی نسبت به کاربا‌پنم‌ها به ویژه ایمی پنم نشان دادند.

نتیجه‌گیری: شناسایی مکانیسم‌های مقاومت در باکتری‌ها بسیار پیچیده و گسترده است و مکانیسم‌های مختلفی برای یک سری آنتی‌بیوتیک‌های مشابه عمل می‌کنند. *OprD* عامل اصلی اتصال کاربا‌پنم‌ها بوده و با افزایش بیان این پورین حساسیت باکتری‌ها به این آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش می‌یابد.

واژگان کلیدی: پسودوموناس آئروژینوزا، حداقل غلظت مهار کنندگی، بیان ژن *OprD* ، qRT-PCR

* **نویسنده مسئول:** دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بروسلوز
Email: mohammad.arabestani@gmail.com

مقدمه

پسودوموناس آئروژینوزا پاتوژن فرصت طلبی است که در سال‌های اخیر به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای عفونت‌های بیمارستانی شناسایی شده است(۱). عفونت‌های سودوموناسی غالبا در سوختگی‌ها، عفونت‌های ادراری و بیماری‌های ریوی مثل سیستیک فایبروزیس گزارش شده است(۲).

یکی از مشکلات عمده در درمان و پیش‌گیری از عفونت‌های ایجاد شده توسط پسودوموناس آئروژینوزا مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی ایجاد شده در آن می‌باشد. پسودوموناس آئروژینوزا مقاومت چند دارویی ایجاد می‌کند که این پدیده توسط انواع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف ثابت شده است از جمله: تولید آنزیم‌های سفالوسپورینار (به دلیل وجود ژن *AmpC*)، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز، کاهش نفوذپذیری غشای خارجی (کاهش پروتئین *OprD*)، سنتز آنزیم‌هایی مانند فسفریل ترانسفرازها و استیل ترانسفرازها که باعث مقاومت به آمینو گلیکوزیدها می‌شود و تغییر در توپوایزومراز II و IV که مقاومت به کوئینولون‌ها را ایجاد می‌کند. علاوه بر آنزیم‌های ذکر شده مکانیسم دیگری در مقاومت آنتی‌بیوتیکی پسودوموناس آئروژینوزا تحت عنوان افلاکس پمپ وجود دارد(۳). افلاکس پمپ در حال حاضر به عنوان یکی از ترکیبات مهم مقاومت باکتری‌ها به اکثر کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی شناخته شده است. این پمپ‌ها در عرض غشاء واقع شده‌اند و به صورت انتقال فعال باعث خروج ترکیبات سمی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها از سلول می‌شوند. افلاکس پمپ‌ها ابتدا در سال ۱۹۸۰ کشف شدند که به عنوان مکانیسمی برای مقاومت انتروباکتریاسه‌ها به تتراسایکلین شناخته شدند و پس از سال‌ها نقش آنها در مقاومت‌های باکتریایی به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده شد(۴).

یکی دیگر از راه‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا *OprD* است. *OprD* یک پورین بر روی غشاء سیتوپلاسمی پسودوموناس آئروژینوزا است. در مطالعات ساختمانی مشخص شده است که حلقه ۲ و ۳ پروتئین *OprD* محل ورود ایمی پنم و هم‌چنین محل اتصال آن است. بنا براین موتاسیون و تغییر در loop ۲ و loop ۳ می‌تواند باعث تغییر ساختمانی و مقاومت به کاربانپم شود. *OprD* هم‌چنین یک کانال عمومی برای ورود بعضی آمینواسیدها و پپتیدها است و رقابتی بین این مواد و کاربانپم برای ورود اتفاق می‌افتد. هم‌چنین *OprD* توسط موادی مثل مولکول‌های کوچک حیاتی، اسیدآمینه‌ها، و تنظیم کننده افلاکس پمپ تنظیم می‌شود.

به دلیل مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی پسودوموناس آئروژینوزا، کلاس‌های کمی از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری مورد استفاده قرار گیرند. به همین دلیل کاربانپم‌ها یکی از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده هستند. این آنتی‌بیوتیک‌ها آخرین خط درمانی در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی، از جمله پسودوموناس آئروژینوزا می‌باشند(۵). اصلی‌ترین مقاومت به کاربانپم‌ها شامل کاهش نفوذ کاربانپم به دلیل تغییر در بیان *OprD* است. پسودوموناس آئروژینوزا با کاهش بیان ژن *OprD* سبب ایجاد مقاومت به کاربانپم می‌شود(۶). هدف از این مطالعه تعیین بیان ژن کد کننده پورین *OprD* با استفاده از Real-time PCR (qRT-PCR) و ارتباط بین میزان بیان ژن *OprD* و حساسیت نسبت به کاربانپم‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

شناسایی ایزوله‌ها

برای تعیین ایزوله‌ها از آزمایش‌های میکرب شناسی معمولی از جمله رنگ آمیزی گرم، آزمایش اکسیداز، کاتالاز، تولید پیوسیانین، رشد در دمای ۴۱-۴۲ درجه سانتی‌گراد، تعیین O/F و تست رنگ دانه استفاده شد. برای نگهداری باکتری‌ها، آنها را در محیط کشت مایع حاوی گلیسرول تلقیح و سپس در دمای ۷۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تأیید تست‌های فنوتیپی با استفاده از ژن PA-16S-rRNA اختصاصی گونه‌های سودوموناس

آئروژینوزا، آزمایش PCR انجام و برای تأیید گونه ها مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج ژنوم و تأیید سویه‌ها توسط روش PCR

استخراج DNA با روش فنل کلروفورم انجام شد. آزمون PCR جهت بررسی وجود ژن PA-16S-rRNA ۹۵۶ جفت بازی و تشخیص گونه سودوموناس انجام شد که از پرایمرهای رفت و برگشت GGGGGATCTTCGGACCTCA و TCCTTAGAGTGCCCACCCG استفاده شد(۷). سویه *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) PAO1 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. حجم واکنش PCR ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA نمونه، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت، ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت، ۱۰ میکرولیتر 2x Taq Premix-Master mix (شرکت پارس طوس بیوتک - ایران) و ۶ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل بود. چرخه دمایی شامل مرحله واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل نهایی برای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه بود. جهت شناسایی محصول PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد که حاوی ۲ میکرولیتر رنگ سایبر (سیناژن) بود.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در PCR

ژن هدف	توالی ها	محصول (bp)	دمای اتصال
OprD	F: ATCTACCGCACAAACGATGAG R: GCCGAAGCCGATATAATCAAACG	۱۵۶	۵۷
rPsL	F: GCAAGCGCATGGTCGACAAGA R: CGCTGTGCTCTTGCAGGTTGTGA	۲۰۱	۶۰

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA به منظور بررسی بیان ژن‌های *OprD* و *rPsL* به صورت نیمه کمی انجام گرفت. استخراج RNA به وسیله کیت تهیه شده از شرکت طوس بیوتک انجام پذیرفت. واکنش نسخه‌برداری معکوس (revers transcription) به منظور سنتز cDNA با استفاده از پرایمر هگزامز تهیه شده از شرکت کیاژن (ایران) انجام پذیرفت.

تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی

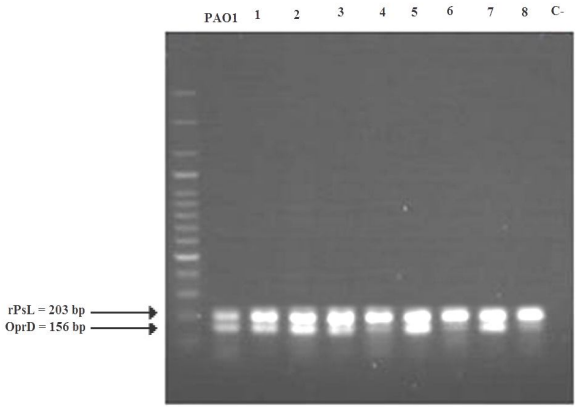
برای سنجش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها از روش دیسک دیفیوژن و طبق دستورالعمل CLSI استفاده شد(۸). دیسک‌های آنتی بیوتیکی مورد استفاده در این مطالعه از شرکت Himedia تهیه شده بود که عبارت بودند از: آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، لووفلوکساسین (۵ میکروگرم)، افلوکساسین (۵ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم) و ایمی پنم (۱۰ میکروگرم). برای انجام آزمون حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum inhibitory concentration-MIC) از نوار Etest ایمی پنم ساخت شرکت لیوفیلیچم ایتالیا استفاده شد.

شناسایی ژن OprD و ژن کنترل داخلی rPsL توسط PCR

پس از استخراج DNA، تکثیر و جداسازی ژن‌های *OprD* و *rPsL* به صورت مولتیپلکس (MultiPlex-PCR) انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ ذکر گردیده است(۹). ترادف ژن مورد نظر از مرکز اطلاعاتی NCBI با استفاده از شماره دسترسی آنها به دست آمد. سویه (ATCC 27853) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. حجم واکنش و چرخه دمایی همانند موارد اشاره شده در قبل می‌باشد.

تکثیر ژن‌های OprD و rpsL توسط PCR با استفاده از cDNA

پس از جداسازی RNA و سنتز cDNA عمل تکثیر ژن‌های مذکور انجام پذیرفت. این فرآیند توسط پرایمرهای ارائه شده در جدول ۱ انجام گرفت. همانند آزمون قبلی از سویه *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 27853) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در این واکنش نیز حجم واکنش و سیکل دمایی همانند موارد اشاره شده در قبل می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱. PCR ژن‌های *OprD* و *rPsL* از cDNA پسودوموناس آئروژینوزا. ستون یک سویه استاندارد PAO1 که واجد هر دو ژن *OprD* و *rPsL* می‌باشد. ستون‌های ۱ تا ۸ همگی سویه پسودوموناس آئروژینوزا بالینی می‌باشند که واجد ژن‌های *OprD* و *rPsL* می‌باشند. ولی میزان بیان در آنها متفاوت می‌باشد. ستون آخر به عنوان کنترل منفی می‌باشد (مارکر 100 bp شرکت فرمنتاس).

تعیین بیان ژن پورین OprD توسط آزمون Real Time PCR کمّی (qRT-PCR)

به منظور بررسی کمّی بیان ژن پورین *OprD* از آزمون Real-time PCR برای ژن *OprD* و ژن *rPsL* (به عنوان ژن کنترل داخلی) به صورت مولتیپلکس با استفاده از کیت فرمنتاز و پرایمرهای ارائه شده در جدول ۱ انجام پذیرفت. برطبق پروتکل، مسترمیکس، پرایمرها و cDNA سنتز شده در حجم مناسبی مخلوط شده و توسط دستگاه Bio-Rad Real-time PCR واکنش انجام گردید. حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر و شامل cDNA، پرایمر رفت، پرایمر برگشت، مسترمیکس و آب مقطر دوبار تقطیر استریل بود. چرخه دمایی شامل واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ سیکل در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل نهایی برای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه بود. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 27853) به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. بیان ژن *OprD* با بیان ژن *rPsL* به عنوان ژن house keeping مقایسه گردید. برای هر نمونه، واکنش سه مرتبه انجام گرفته و میانگین مقادیر به دست آمده به عنوان مقدار (کمیت) بیان ژن برای آن نمونه در نظر گرفته شد. از فرمول مرجع نسبی بیان ($\theta\Delta Ct$) برای تعیین بیان ژن مورد نظر استفاده گردید. $\theta\Delta Ct$ توسط تفریق ΔCt نمونه بالینی از ΔCt نمونه استاندارد (PAO1) به دست آمد.

آنالیز آماری

از آزمون آماری تی تست برای مقایسه تفاوت معنی دار مقادیر به دست آمده از بیان ژن پورین *OprD* در سویه استاندارد (که واجد مقدار ۱ می باشد) و سویه‌های بالینی جدا شده مورد استفاده قرار گرفت. هم چنین از آزمون آماری ضریب همبستگی پیرسون کای اسکوئر برای بررسی ارتباط الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی کاربانپم‌ها و هم‌چنین سایر آنتی‌بیوتیک‌ها با بیان پورین OprD در سویه‌های بالینی مورد استفاده قرار گرفت. برای همه آزمون‌های آماری مورد استفاده مذکور، مقادیر کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد. در این تحلیل از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ استفاده گردید.

یافته‌ها

ایزوله های انتخاب شده

از ۱۰۰ نمونه جمع آوری شده ۳۱ نمونه از بیماران بستری بر اساس نوع نمونه انتخاب شد که شامل ۸ نمونه از تراکئال تراشه، ۷ نمونه از خون، ۵ نمونه زخم (زخم بستر (۲)، زخم دست (۲) و زخم قرنیه چشم(۱))، ۴ نمونه خلط، ۴ نمونه مایع مفصلی و ۳ نمونه کشت ادرار بود.

نتایج حاصل از آنتی بیوگرام سویه‌ها

نتایج به دست آمده از تست حساسیت میکروبی، بیشترین مقاومت سویه‌های به دست آمده نسبت به لووفلوکساسین ۱۹ (۶۱/۲۹ درصد) و هم‌چنین کمترین مقاومت نسبت به ایمی پنم ۳ (۹/۶ درصد) مشاهده گردید. نتایج حاصل از این مطالعه میزان مقاومت نسبی به آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان می‌داد به طوری که ۲۲ درصد به هیچ یک از ۸ آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان ندادند، ۱۶ درصد سویه‌ها به ۱ آنتی‌بیوتیک، ۶/۵ درصد سویه‌ها به ۲ آنتی‌بیوتیک، ۱۲/۵ درصد سویه‌ها به ۳ آنتی‌بیوتیک، ۱۲/۵ درصد سویه‌ها به ۴ آنتی‌بیوتیک، ۶/۵ درصد سویه‌ها به ۶ آنتی‌بیوتیک، ۱۷/۵ درصد سویه‌ها به ۷ آنتی‌بیوتیک و ۶/۵ درصد سویه‌ها به ۸ آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. آنتی بیوگرام تیپ غالب مقاومت به تمام آنتی بیوتیک‌ها را نشان داد. نتایج MIC آنتی بیوتیک ایمی پنم بدین صورت بود: ۱۲ مورد (۳۰/۷ درصد) مقاوم، ۱۳ مورد (۴۱/۹۳ درصد) حدواسط و ۶ مورد (۳۵/۱۹ درصد) حساس.

نتایج آزمون PCR و qRT-PCR

ژن داخلی *rPsL* به عنوان ژن کنترل داخلی و house keeping در تمام سویه‌ها وجود نتایج مثبت داشت که نشان دهنده صحت انجام واکنش PCR به صورت مولتیپلکس می‌باشد. در بررسی وجود یا عدم وجود ژن پورین OprD از طریق DNA از ۳۱ سویه مورد بررسی در این مطالعه تمام سویه‌ها دارای ژن *OprD* بودند. هم چنین نتایج آزمون PCR با استفاده از cDNA حاکی از آن بود که همه سویه‌های بالینی، ژن پورین OprD را بیان کرده‌اند (شکل ۱). نتایج حاصل از آنالیز بیان ژن *OprD* توسط روش qRT-PCR برای سویه استاندارد و چند مورد از سویه‌های بالینی در جدول ۲ آمده است. نتایج آماری نیز در جدول ۳ آمده است.

جدول ۲. نتایج آنالیز ژن پورین OprD در بعضی از سویه ها

نام نمونه ها	ژن پورین
	OprD
PAO1	۱
Isolate 33	۰/۰۵
Isolate 8	۹۹/۹
Isolate 12	۰/۰۰۹
Isolate 5	۵۸/۹
Isolate 24	۱/۹
Isolate 9	۰/۰۰۷
Isolate 35	۰/۰۵
Isolate 66	۱۶۴
Isolate 30	۱/۲

جدول ۳. نتایج آزمون تی برای مقایسه تفاوت معنی‌دار مقادیر به دست آمده از بیان ژن پورین *OprD* در سویه استاندارد و سویه‌های بالینی جدا شده؛ و آنالیز همبستگی مابین بیان ژن *OprD* و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های مورد مطالعه بر اساس ضریب همبستگی پیرسون کای مربع

ژن	نتایج تحلیل آماری (*p value) برای ارتباط الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با بیان ژن *OprD*												Test Value=1	
	Imipenem (MIC)	Imipenem (DD)	Meropenem (DD)	Gentamicin (MIC)	Gentamicin (DD)	Tobramycin (DD)	Amikacin (DD)	Ciprofloxacin (MIC)	Ciprofloxacin (DD)	Ofloxacin (DD)	Levofloxacin (DD)	T. Test	p *
OprD	۰/۱۲۵	۰/۵۰۹	۰/۰۰۵	۰/۰۲۱	۰/۰۰۸	<۰/۰۰۱	۰/۷۲۱	۰/۰۷۱	۰/۰۲۸	۰/۰۹۹	۰/۰۸۴	۳/۹۷۷	<۰/۰۰۱

بحث

سودوموناس آئروژینوزا شایع‌ترین عامل بیماری‌زای انسانی در جنس سودوموناس است و به عنوان سومین عامل عفونت‌های بیمارستانی بعد از استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی به شمار می‌آید(۱۰). یکی از مشکلات عمده در درمان و پیش‌گیری از عفونت‌های ایجاد شده توسط پسودوموناس آئروژینوزا مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی ایجاد شده در آن می‌باشد و کاربا‌پنم‌ها به

عنوان آخرین خط درمانی در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی، از جمله پسودوموناس آئروژینوزا می‌باشند(۵). اصلی‌ترین مقاومت به کاربانم‌ها شامل کاهش نفوذ کاربانم به دلیل تغییر در بیان *OprD* است(۶).

در خصوص مقاومت سودوموناس به آنتی بیوتیک‌ها مطالعات زیادی صورت گرفته که نتایج این مطالعات بر حسب زمان و مکان متفاوت بوده است. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان مقاومت به جنتامایسین ۱۶ مورد (۵۱/۶ درصد)، آمیکاسین ۶ مورد (۱۹/۳ درصد)، توبرامایسین ۱۲ مورد (۳۸/۷ درصد)، مروپنم ۱۳ مورد (۴۱/۹ درصد)، ایمیپنم ۳ مورد (۹/۶ درصد)، سیپروفلوکساسین ۱۸ مورد (۵۸ درصد)، افلوکساسین ۱۲ مورد (۳۸/۷ درصد) و لووفلوکساسین ۱۹ مورد (۶۱/۲ درصد) می‌باشد که در مقایسه با مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ توسط راجات و همکاران در هند انجام شد و میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ۴۹ درصد، توبرامایسین ۶۸ درصد، لووفلوکساسین ۲۵ درصد، جنتامایسین ۶۳ درصد و ایمی پنم ۱۴ درصد را گزارش کرده بودند، نتایج در بیشتر موارد مطابقت دارد(۱۱، ۱۲). مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ در نپال توسط آنیل و همکاران انجام گرفت و مقاومت به آمیکاسین ۲۵ درصد و به سیپرو فلوکساسین ۷۵ درصد گزارش گردید، که مشابه نتایج مطالعه حاضر می‌باشد(۱۳). در مطالعه‌ای که در گیلان توسط نیکوکار و همکاران انجام پذیرفت، مقاومت به ایمی پنم ۲۳/۳ درصد، جنتامایسین ۳۷/۲ درصد، آمیکاسین ۴۸/۸ درصد، توبرامایسین ۵۸/۲ درصد، سیپروفلوکساسین ۶۳/۳ درصد گزارش شده است(۱۴). مقاومت‌های مشاهده شده نسبت به ایمی پنم و آمیکاسین در این مطالعه نسبت به مطالعه مشابه در همدان (مطالعه حاضر) میزان بالاتری را نشان می دهد و جای بسی نگرانی است. در مطالعه‌ای هم که توسط کیانپور و همکاران در اصفهان که انجام شد میزان مقاومت به آمیکاسین ۵۸/۱۴ درصد، سیپروفلوکساسین ۴۲/۸۵ درصد و ایمی پنم ۱۴/۸ درصد گزارش شده است(۱۵).

مطالعه‌ای دیگر توسط شاهچراغی و همکاران در بیمارستان سوانح سوختگی شهید مطهری انجام گرفت و درصد مقاومت نسبت به جنتامایسین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین به ترتیب ۹۳/۷، ۹۳/۴، ۸۶/۷ درصد گزارش گردید که در مقایسه با مطالعه حاضر مقاومت بالاتری مشاهده می‌شود(۱۶)، که دلیل این افزایش مقاومت می‌تواند به دلیل نوع نمونه‌های دکتر شاه چراغی باشد که مطالعه ایشان بر روی نمونه‌های سوختگی انجام گرفته بود که این نمونه‌ها در مقایسه با نمونه‌های جدا شده از سایر مناطق بالینی دارای مقاومت بیشتری هستند.

هم‌چنین مقایسه‌ای بین مقاومت‌های سودوموناس آئروژینوزا برای ایمی پنم در سال ۲۰۰۱ انجام گرفت که نتایج بدین صورت بود: در ژاپن ۸/۳ در کانادا ۱۲، روسیه ۱۳/۴، فرانسه ۱۸/۵ و اسپانیا ۱۴ درصد گزارش شده است(۱۷، ۱۸). میزان مقاومت به ایمی پنم در مطالعه حاضر در همدان ۹ درصد بود که میزان پایین‌تری نسبت به مناطق دیگر نشان می‌دهد.

میزان مقاومت برای سیپروفلوکساسین در سال ۸۹ در اردبیل توسط امانی ۹/۲۰ درصد گزارش گردید(۱۹). هم‌چنین میزان مقاومت برای سیپروفلوکساسین در سال ۲۰۰۲ در فرانسه ۹ درصد، زیمبابوه ۶۱، روسیه ۹۱/۷، کانادا ۱۸، آمریکا ۲۰/۷ درصد و در سال ۱۹۹۹ در اسپانیا ۲۳ درصد گزارش شده است(۱۸، ۲۰، ۲۱). میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در مطالعه حاضر ۵۸ درصد بود که نتایج به دست آمده نشان دهنده افزایش مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین در مقایسه با مطالعات سایر محققین می‌باشد که یکی از دلایل آن می‌تواند استفاده بیشتر این آنتی بیوتیک توسط پزشکان در درمان بیماران سودوموناسی باشد.

میزان مقاومت به آمیکاسین در مطالعه حاضر ۱۹ درصد برآورد گردید که نسبت به مقاومت گزارش شده در سال ۲۰۰۱ در اسپانیا (۹ درصد)، فرانسه (۹ درصد)، ترکیه (۴ درصد)، روسیه (۲۵ درصد)، آمریکا (۱۳/۱ درصد)، نتایج قابل قبول است(۲۰، ۲۲، ۲۳).

در مطالعه‌ای که توسط ویجایا و همکاران در هند انجام شد مقاومت به سیپروفلوکساسین ۵۹ درصد و مقاومت به مروپنم ۱۱ درصد گزارش گردید(۲۴).

در مطالعه ما در چندین سویه، مقدار بیان معنی‌داری در OprD یافت شد. در سویه‌هایی با بیان پایین OprD مقاومت کامل به ایمیپنم و مروپنم مشاهده گردید. هم چنین سویه‌هایی که حساسیت زیادی به کاربانپم‌ها داشتند مقدار بیان بالایی از OprD را نشان می‌دادند. البته در چند سویه ارتباط معنی داری بین بیان ژن *OprD* و مقاومت به کاربانپم‌ها یافت نشد، با پایین بودن بیان *OprD* حساسیت به کاربانپم‌ها وجود داشت. نکته دیگر در مورد سویه شماره ۸ بود، به طوری که با توجه به بیان بالای OprD مقاومت کامل به ایمی پنم و مروپنم نشان داد که به نظر می‌رسد روش‌های دیگری از جمله کارپنمازها باعث این مقاومت شده باشند.

مطالعه‌ای توسط بورجین و همکاران بر روی ۵۰ سویه جدا شده از ۲ مرکز مراقبت‌های ویژه برای بررسی بیان ژن‌های افلاکس پسودوموناس آئروژینوزا انجام گرفت. در این بررسی بر روی ۴ پروتئین افلاکس به همراه پروتئین OprD به روش Multiplex PCR انجام گرفت و بیان ژن‌های افلاکس با درصدهای مختلف مشخص شد. نتیجه این آزمایش نشان داد که افلاکس یکی از روش‌های مقاومت چند گانه است که می‌تواند چندین مقاومت را سبب شود هم چنین یک سری مکانیسم‌هایی مانند کاربانپنمازها و روش‌های دیگری که در این مطالعه انجام نشده بود می‌تواند باعث مقاومت پسودوموناس آئروژینوزا شود(۲۵).

در مطالعه حاضر نیز در یک سری از سویه‌ها مقاومت نسبت به تعداد زیادی آنتی‌بیوتیک‌ها وجود داشت ولی افلاکس‌ها بیان بسیار پایینی از خود نشان دادند. در مورد این سویه ا می‌توان گفت مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از روش‌های دیگری به جز افلاکس بوده است.

در مطالعه‌ای که توسط دوماس و همکاران انجام گرفت، سویه‌هایی که دارای بیان پایینی از پورین OprD بودند مقاومت بیشتری نسبت به ایمی پنم و مروپنم بروز دادند و سویه‌هایی که دارای بیان بالایی از پورین OprD بودند حساسیت بیشتری نسبت به کاربانپم‌ها داشتند و هاله عدم رشد گسترده‌تری تشکیل دادند. سویه‌هایی که موتاسیون در ژن کد کننده OprD صورت گرفته بود به طور کامل نسبت به ایمی پنم و مروپنم مقاوم بودند(۹).

جان و همکاران در نیویورک نیز مطالعه‌ای درباره پورین OprD انجام دادند و در آن از Real Time PCR برای نشان دادن مقدار بیان ژن *OprD* و مقاومت به کاربانپم‌ها استفاده شد و مشخص شد OprD مهم‌ترین پروتئین در مقاومت به کاربانپم‌ها است(۶).

نتیجه گیری

با توجه به این مطالعات می توان نتیجه گرفت، بهترین آنتی‌بیوتیکی که در مراحل بحرانی می‌توان از آن استفاده کرد ایمی پنم است که کمترین مقاومت نسبت به این پادزیست مشاهده شده است. البته مصرف ایمی پنم باید کاملاً کنترل شده باشد تا بتوان از این آنتی بیوتیک به عنوان یک آنتی بیوتیک موثر استفاده کرد. OprD عامل اصلی اتصال کاربانپم‌ها بوده و با افزایش بیان این پورین حساسیت باکتری‌ها به این آنتی بیوتیک‌ها افزایش میابد. هم چنین این امکان وجود دارد با افزایش OprD در سلول باکتری، کاربانپم‌ها به سلول باکتری وارد ولی توسط روش دیگری در سلول باکتری بی اثر شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت آموزشی وپژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان به خاطر تامین منابع مالی این پایان نامه تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع

1. Jaffe RI, Lane JD, Bates CW. Real-time identification of Pseudomonas aeruginosa direct from clinical samples using a rapid extraction method and polymerase chain reaction (PCR). J Clin Lab Anal. 2001;15(3):131-7.

2. Vanhems P, Lepape A, Savey A, Jambou P, Fabry J. Nosocomial pulmonary infection by antimicrobial resistant bacteria of patients hospitalized in intensive care units risk factors and survival. J Hosp Infect. 2000;45(2):98-106.
3. Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:2233-41.
4. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa: novel agents for combination therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001;45(1):105-16.
5. Quinn JP, Dudek EJ , DiVincenzo CA , Lucks DA , Lerner SA. Emergence of resistance to imipenem during therapy for Pseudomonas aeruginosa infections. J Infect Dis. 1986;154:289-94.
6. Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, ampC and oprD expression in carbapenem resistance of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(5): 1633-41.
7. Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of Pseudomonas aeruginosa from other Pseudomonas species recovered from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2004 42(5): 2074-9.
8. Clinical and Laboratory Standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Twenty-Third Informational Supplement. M100- S23. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards institute; 2013.
9. Dumas JL, van delden C, Perron K, Köhler T. Analysis of antibiotic resistance gene expression in Pseudomonas aeruginosa by quantitative real-time-PCR. FEMS Microbiol Lett Jan. 2006 254(2):217-25.
10. Zinsser HA WJ, et al. Zinsser microbiology: Ayizh; 2004; 295.
11. Rakesh R,Govind N, Kalpesh M, Rosy P, Kanu P, Vegad MM. Antibiotic resistance pattern in pseudomonas aeruginosa species isolated at a tertiary care hospital, ahmadabad. Natl J Med Res. 2012;2(2):156-9.
12. Fazeli H, Moghim Sh, Narimani T, Arabestani MR, Ghoddousi AR. Pseudomonas aeruginosa infections in patients, hospital means, and personnel's specimens. J Res Med Sci. 2012;17(4):332-7.
13. Anil C, Shahid RM. Antimicrobial Suseptibility Patterns of pseudomonas aeroginosa clinical isolates at tertiary care hospital in kathmando, nepal. Asian J Pharm Clin Res. 2013 6(3):235-8.
14. Nikokar I, Tishayar A, Flakiyan Z, Alijani K, Rehana-banisaeed S, Hossinpour M, et al. Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among Pseudomonas aeruginosa, isolated from burn patients in Guilan, Iran. Iranian journal of microbiology. 2013;5(1):36-41.[persian]
15. Kianpour F, Havaei SA, Hosseini MM. Evaluation of Pseudomonas aeroginosa isolated from cutaneous infections and determination of drug resistance pattern in patients of Alzahra hospital in Esfahan. Journal of Isfahan Medical School. 2010; 28(110).[persian]
16. Shahcheraghi F, Feizabadi MM, Yamin V, Abiri R, Abedian Z. Serovar determination, drug resistance pattern of Pseudomonas aeruginosa from burn patient's at two hospitals of Tehran. Burns. 2003;29(6):547-51.[persian]
17. Niitsuma K, Saito M, Kojimabara M, Kashiwabara N, Aoki T, Tomizawa M, et al. Antimicrobial susceptibility of Pseudomonas aeruginosa isolated in Fukushima Prefecture. Jpn J Antibiot. 2001;54(2):79-87.
18. Rio Y, Pina P, Jurin F, Allouch P, Didion J, Chardon H, et al. Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to antibiotics isolated from patients of intensive care units in France in 1998. Resistant phenotypes to beta-lactams. Pathol Biol (Paris). 2002;50(1):12-7.
19. Imani Foolad AA, Rostami Z, Shapouri R. Antimicrobial resistance and ESBL prevalence in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical specimen by phenotypic and genotypic Methods. j of Ardebil med sci uni. 2011;10(3):189-98.
20. Bouza E, Garcia-Garrete F, Cercenado E, Marin M, Diaz MS. Pseudomonas aeruginosa a survey of resistance in 136 hospitals in Spain.

The Spanish Pseudomonas aeruginosa Study Group. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43(4): 981-2.
21. Shawar RM, Macleod DL, Garber RL, Burns JL, Stapp JR, Clausen CR, et al. Activities of tobramycin and six other antibiotics against Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43(12): 2877-80.
22. Cavallo JD, Fabre R, Leblanc F, Nicolas-Chanoine MH, Thabaut A, et al. Antibiotic susceptibility and mechanisms of beta-lactam resistance in 1310 strains of pseudomonas aeruginosa: a French multicentre study (1996). J AntimicrobChemother. 2000;46(1):133-6.
23. Kato K, Iwai S, Kumasaka K, Horikoshi A, Inada S, Inamatsu T, et al. Survey of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa by The Tokyo Johoku Association of Pseudomonas Studies. J Infect Chemother. 2001;7(4):258-62.
24. Chaudhari V, Sandib G, Mehta M. Antibiotic resistance patterns of Pseudomonas aeruginosa in a tertiary care hospital in Central India. International Journal of Medical Science and Public Health. Int J Med Sci Public Health. 2013; 2(2):386-9.
25. Ozer B, Duran N, Onlen Y, Savas L. Efflux pump genes and antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from lower respiratory tract infections acquired in an intensive care unit. J Antibiot (Tokyo). 2012; 65(1):9-13.