

Research Paper

Efflux Inhibition in Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* Using Sertraline for Ciprofloxacin Resistance Breakdown



Ahmad Sahabzamani¹ , Maryam Sadrnia^{1,2} , *Majid Akbari^{1,3} , Sasan Saki⁴ 

1. Department of Biology, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.
2. Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran.
3. Infectious Diseases Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
4. Department of Medical Laboratory Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.



Citation Sahabzamani A, Sadrnia M, Akbari M, Saki S. [Efflux Inhibition in Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* Using Sertraline for Ciprofloxacin Resistance Breakdown (Persian)]. *Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS)*. 2022; 25(3):382-393. <https://doi.org/10.32598/JAMS.25.3.262.1>

 <https://doi.org/10.32598/JAMS.25.3.262.1>



Article Info:

Received: 19 May 2022

Accepted: 01 Jun 2022

Available Online: 01 Aug 2022

Keywords:

Pseudomonas aeruginosa,
Ciprofloxacin, Efflux
pump, Sertraline

ABSTRACT

Background and Aim The efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the effect of ciprofloxacin by releasing quinolones out of the cell. It is important to find compounds to inactivate or inhibit its activity to continue using the antibiotics. The present study was done to investigate using sertraline as an efflux pump inhibitor in *P. aeruginosa* to reduce antibiotic resistance.

Methods & Materials *P. aeruginosa* strains were isolated from clinical sources and identified by routine microbiological methods. Resistance of the isolates to ciprofloxacin was evaluated by Kirby–Bauer test. Resistance breakdown was investigated by adding sertraline to the Moller Hinton agar medium and determining the zone of inhibition of ciprofloxacin. Minimum inhibitory concentration (MIC) by microplate dilution method and Minimum bactericidal concentration (MBC) by culture and MTT method were done for the isolates and ATCC 27853. The presence of the efflux pump was evaluated by the phenotypic method using sertraline and serial dilution method of the liquid medium in a microplate, on ciprofloxacin-resistant strains. The presence of the producing gene of this pump was determined by the genotyping method in resistant strains by performing PCR. The standard PAO1 strain of *P. aeruginosa* was used as a positive control.

Ethical Considerations This study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences of Islamic Azad University, Brojerd Branch (Code: IR.IAU.B.REC.1401.011).

Results Based on Kirby–Bauer test results, three strains were considered resistant to ciprofloxacin. MIC of drug-resistant strains was between 32 and 64 mg/ml and MBC was between 16 and 32 mg/ml. By performing electrophoresis on the PCR products, it was determined that the tested strains contained the *mexA* gene encoding the efflux pump. In the agar medium without sertraline, the zone of inhibition around the ciprofloxacin disc was zero, but after adding sertraline, the diameter of the halo increased to 25 mm. The minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin in the isolates before adding 25 µg of sertraline was 128 µg/ml and after adding sertraline, it was 4 µg/ml.

Conclusion It was concluded that sertraline inhibited the efficiency of the efflux pump in resistant *P. aeruginosa* isolates and reduced ciprofloxacin resistance.

* Corresponding Author:

Majid Akbari, PhD.

Address: Department of Biology, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran./Infectious Diseases Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

E-mail: majakbari@yahoo.com

Extended Abstract

Introduction

Pseudomonas aeruginosa plays a key role in various nosocomial infections worldwide. This bacterium is found in many habitats and grows in aerobic conditions.

It causes disease with various virulence factors. Currently, *P. aeruginosa* is inherently resistant to many antibiotics. It might be due to the low permeability of the outer membrane and the efflux pump and the leakage of the enzymes inactivating the antimicrobial agent, making the treatment very difficult. Fluoroquinolones, especially ciprofloxacin, are widely used in the treatment of *P. aeruginosa* infections. The emergence of resistant strains has caused concerns in this regard. The spread of infectious diseases and consequently an increase in drug resistance have been one of the most serious threats to the successful treatment and health of the community. The very high costs of processing an antibiotic and its long time to treat a bacterium have resulted in developing newer ways of using antibiotics in the treatment of bacteria. One way to reduce the bacterial stability is the inhibition of antibiotic disposal systems, such as the efflux pump in bacteria [1]. Sertraline (with trade names of Zoloft and Acentra) is an antidepressant drug from the group of serotonin reuptake inhibitors. It is used to treat depression and is taken orally. Sertraline prevents the reuptake of serotonin by postsynaptic neuroreceptors and an increase in the concentration of serotonin in the central nervous system. Sertraline also slightly inhibits the reuptake of dopamine. Its chemical formula is C₁₇H₁₇Cl₂N. Its half-life is between 13 and 45 hours. It has been used in some studies to reduce the function of efflux pump proteins of Gram-negative bacteria, such as *E. coli*.

The present study aimed to investigate using this compound in inhibiting the efflux pump in *P. aeruginosa*. [7]

Materials and Methods

P. aeruginosa isolates were collected from clinical centers. Using biochemical reactions and differential diagnosis, *P. aeruginosa* isolates were evaluated in terms of sensitivity to the antibiotic ciprofloxacin from the 12-hour growth of the bacteria based on the CLSI2020 M100 standard guidelines in the form of Kirby-Bauer test by Disk diffusion method with five units of ciprofloxacin disk. The isolates with a zone of less than 18 mm were considered resistant strains. Then, for further examination and verification, MIC was evaluated using the CLSI2020M7-8 standard, and the minimum inhibitory concentration of

ciprofloxacin for the growth of *P. aeruginosa* was determined. The resistant strains in terms of the presence of the efflux pump were identified by PCR method using the primer designed by studying the efflux pump gene.

For resistance breakdown evaluation, 2 % of sertraline was added to the Mueller Hinton agar medium for determining the zone of inhibition of ciprofloxacin.

The microplate dilution method was used for determining the minimum inhibitory concentration. The minimum bactericidal concentration was determined by culturing and MTT methods. Resistance breakdown in broth media was evaluated by the reduction in the minimum inhibitory concentration of the isolates in Muller Hinton Broth and the determination of a significant reduction in bacterial resistance to ciprofloxacin.

Results

The effect of sertraline on the disc diffusion method was evaluated. In this method, before the addition of sertraline, there was no zone of inhibition (Figure 3), but after the addition of sertraline, the zone of inhibition increased to 25 mm. It means that with the addition of sertraline, the completely drug-resistant bacteria became sensitive.

The results of minimum inhibitory concentration and minimum lethal concentration of ciprofloxacin for drug-resistant strains of *P. aeruginosa* and standard strain *P. aeruginosa* 25873 can be seen in Table 3. The results of the MTT assay were also consistent with the culture results in the case of MBC determination.

The results of the presence of the efflux pump gene showed that the resistant strains had efflux pumps.

The results showed that sertraline can prevent the assembling of the efflux pump in *P. aeruginosa* due to its formulation or interference with its function by forming a complex with the efflux pump proteins. Therefore, fluoroquinolone antibiotics, such as ciprofloxacin, released out of the cell by the efflux pump, prevent the division of the bacteria; thus, the protein-producing function is impaired and the effect of the antibiotic increases.

Discussion

Based on the results, it was concluded that sertraline could inhibit the efficiency of the efflux pump in resistant *P. aeruginosa* isolates and break the ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *P. aeruginosa*.

It is recommended to examine these materials for efflux pumps *in vivo*.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This research was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences of Islamic Azad University, Brojerd Branch (Code: IR.IAU.B.REC.1401.011).

Funding

This article was extracted from the Ph.D. dissertation of the first author at the Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Arak Branch.

Authors' contributions

All authors contributed to the research and preparation of this article.

Conflicts of interest

According to the authors, this article has no conflict of interest

مقاله پژوهشی

مهار پمپ افلاکس در سویه‌های کلینیکی سودوموناس آئروجینوزا با استفاده از سرترالین برای شکست مقاومت باکتری به سیپروفلوکساسین

احمد صاحب‌الزمانی^۱، مریم صدرنیا^{۱،۲}، *مجید اکبری^{۱،۳}، ساسان ساکی^۴

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
۳. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
۴. گروه علوم آزمایشگاهی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.

Use your device to scan and read the article online



Citation Sahabzamani A, Sadmia M, Akbari M, Saki S. [Efflux Inhibition in Clinical Isolates of Pseudomonas Aeruginosa Using Sertraline for Ciprofloxacin Resistance Breakdown (Persian)]. *Journal of Arak University of Medical Sciences(JAMS)*. 2022; 25(3):382-393. <https://doi.org/10.32598/JAMS.25.3.262.1>

doi <https://doi.org/10.32598/JAMS.25.3.262.1>

چکیده

زمینه و هدف: پمپ افلاکس در سودوموناس آئروجینوزا باعث مقاومت آنتی‌بیوتیک‌های خانواده کینولون‌ها با اخراج آن از سلول سودوموناس می‌شود؛ بنابراین مهار این پمپ با کمک ترکیبات شیمیایی غیرفعال‌کننده فعالیت پمپ می‌تواند باعث مقابله با مقاومت دارویی باکتری شود. هدف از این پژوهش، ارزیابی استفاده از سرترالین به عنوان مهارکننده پمپ افلاکس در سودوموناس آئروجینوزا برای کاهش مقاومت دارویی است.

مواد و روش‌ها: سویه‌های سودوموناس آئروجینوزای ارزیابی شده در این پژوهش از نمونه‌های بالینی بیماران جداسازی و پس از شناسایی آن‌ها با روش‌های میکروپوشناسی، مقاومت آن‌ها نسبت به سیپروفلوکساسین با روش کربی بافر ارزیابی شد. حداقل غلظت ممانعت‌کننده سیپروفلوکساسین با روش سریال رقتی محیط مایع در میکروپلیت و حداقل غلظت کشنده دارو با کشت و نیز روش MTT برای سویه‌های مقاوم به داروی سودوموناس آئروجینوزا و سوش استاندارد سودوموناس آئروجینوزای ۲۵۸۷۳ تعیین شد. بررسی شکست مقاومت با اضافه کردن سرترالین به محیط مولر هینتون آگار و تعیین قطر هاله سیپروفلوکساسین انجام شد. حضور پمپ افلاکس به روش فنوتیپی با استفاده از ماده دارویی سرترالین و روش سریال رقتی محیط مایع در میکروپلیت، روی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین ارزیابی شد. وجود ژن مولد این پمپ به روش ژنوتیپی در سویه‌های مقاوم با انجام PCR تعیین شد. از سویه استاندارد PAO1 سودوموناس آئروجینوزا به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

ملاحظات اخلاقی: این پژوهش با کد اخلاق IR.IAU.B.REC.1401.011 به تصویب کمیته اخلاق دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد رسید.

یافته‌ها: بر اساس نتایج کربی بافر، ۳ سویه مقاوم به سیپروفلوکساسین در نظر گرفته شد. حداقل غلظت ممانعت‌کننده سویه‌های مقاوم به دارو بین ۳۲ تا ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشنده دارو بین ۱۶ تا ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. با انجام الکتروفورز روی محصولات PCR مشخص شد سویه‌های مورد آزمایش، حاوی ژن mexA کدکننده پمپ افلاکس هستند. در محیط آگاردار بدون سرترالین، قطر هاله اطراف دیسک سیپروفلوکساسین صفر بود، اما پس از افزودن سرترالین، قطر هاله به ۲۵ میلی‌متر افزایش یافت. همچنین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد سیپروفلوکساسین در سویه‌ها قبل از اضافه کردن ۲ درصد سرترالین، ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که پس از اضافه کردن سرترالین به ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر تبدیل شد.

نتیجه‌گیری: سرترالین باعث کاهش حداقل غلظت ممانعت‌کننده دارو از طریق کاهش کارایی پمپ افلاکس در باکتری سودوموناس آئروجینوزا می‌شود و مقاومت باکتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین کاهش می‌دهد.

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۲۹ اردیبهشت ۱۴۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۱ خرداد ۱۴۰۱

تاریخ انتشار: ۱۰ مرداد ۱۴۰۱

کلیدواژه‌ها:

سودوموناس آئروجینوزا، سیپروفلوکساسین، پمپ افلاکس، سرترالین

* نویسنده مسئول:

دکتر مجید اکبری

نشانی: اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، گروه زیست‌شناسی، اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی.

رایانامه: majakbari@yahoo.com

مقدمه

فنتیازین‌ها علیه کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروجینوزا را بررسی کردند [۱۹]. بر اساس این شواهد، برخی از داروهای ضدافسردگی، از جمله سرتالین^۱، سینالوپرام^۲ و ونلافاکسین^۳ نیز ویژگی‌های بالقوه ضد میکروبی خود را به تنهایی و در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌ها و تأثیر ترکیبات ضدافسردگی/آنتی‌بیوتیک بر مقاومت به بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها آشکار کرده‌اند. هدف از این پژوهش، استفاده از این ترکیب در مهار پمپ افلاکس مقاومت دارویی سپیروفلوکسازین در سودوموناس آئروجینوزاست.

مواد و روش‌ها

داروها و مواد شیمیایی

داروها و مواد شیمیایی شامل سرتالین (داروسازی اکسیر ۱۰۰ میلی گرمی)، سپیروفلوکسازین (شرکت 016M4058V # No Fluka)، دیسک آنتی‌بیوتیک ۵ واحدی سپیروفلوکسازین (پادتن تب No # 201127) و دی‌متیل سولفو کساید (حلال سرتالین CAS number: 67-68-5) بود.

سویه‌های باکتری

در این مطالعه مقطعی، سویه‌های سودوموناس آئروجینوزای استفاده‌شده در این تحقیق از نمونه‌های بالینی در مراکز درمانی شهر اراک جدا شده بودند که با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی و تشخیص‌های افتراقی معمول شناسایی شدند [۱، ۲۰].

محیط‌های کشت

محیط‌های کشت شامل B.H.I برات (شرکت No و Quelab و 759980)، بلاد آگار (شرکت Canda Lab و No#30505)، مولر هینتون برات (شرکت QUElab و No#46339) و مولر هینتون آگار (شرکت Candalab و No#209219) بود.

آزمایش انتشار از دیسک

آزمایش حساسیت به آنتی‌بیوتیک سپیروفلوکسازین، طبق دستورالعمل استاندارد CLSI 2020, M100, 30th از روش انتشار از دیسک، کربی بائر و با دیسک‌های ۵ واحدی سپیروفلوکسازین (پادتن طب) انجام شد و جدایه‌هایی که هاله کمتر از 18mm داشتند، سوش‌های مقاوم در نظر گرفته شدند [۲۱].

تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده به روش میکروبراث سریال

1. Sertraline (SR)
2. Citalopram (CIT)
3. Venlafaxine (VF)

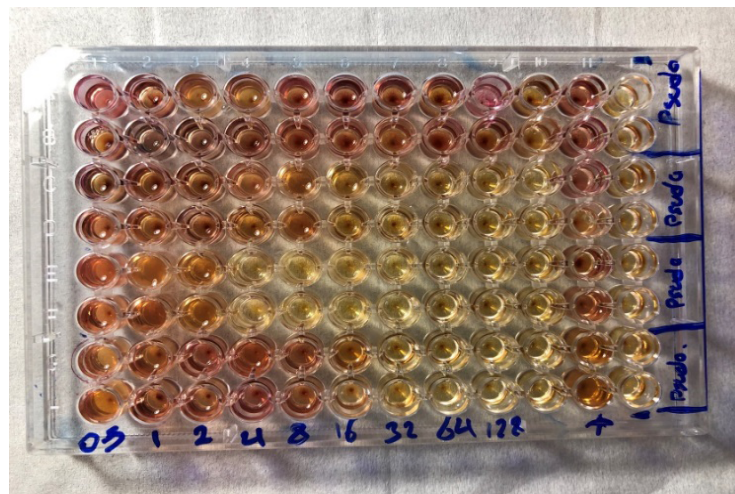
گسترش بیماری‌های عفونی و نیز افزایش مقاومت دارویی یکی از تهدیدهای جدی در درمان موفقیت‌آمیز بیماری‌های عفونی است. سویه‌های مقاوم سودوموناس آئروجینوزا نقش برجسته‌ای در ایجاد عفونت‌های گوناگون و از جمله عفونت‌های بیمارستانی در سراسر جهان دارند [۱]. معمولاً سودوموناس به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است که دلیل آن می‌تواند نفوذپذیری پایین غشای خارجی، وجود پمپ‌های افلاکس و تولید آنزیم‌های غیرفعال‌کننده آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند بتا لاکتامازها باشد که درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری را با دشواری زیادی روبه‌رو می‌کند [۲].

پمپ افلاکس باعث بیرون راندن آنتی‌بیوتیک‌ها از سلول باکتری می‌شود. لوی پمپ‌های افلاکس را در سال ۱۹۷۸ در E. coli شناسایی کرد. ۵ خانواده از سیستم‌های پمپ افلاکس باکتری‌ها شناسایی شده‌اند. بخشی از مقاومت دارویی مشاهده‌شده در باکتری‌ها در برابر داروهای مختلف مربوط به وجود همین پمپ‌هاست [۳، ۴]. یکی از راه‌های کاهش مقاومت باکتری، استفاده از مهارکننده‌های پمپ‌های افلاکس در باکتری‌ها است [۴]. مهارکننده‌های پمپ افلاکس عواملی هستند که با مهار کردن پمپ‌های افلاکس و اختلال در کارایی آن‌ها، باعث افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک درون باکتری شده و موجب عملکرد طبیعی آنتی‌بیوتیک و مرگ باکتری می‌شوند [۳، ۵].

مطالعات سال‌های اخیر نشان داد ترکیباتی که به داروهای غیرآنتی‌بیوتیک معروف شده‌اند و برای کنترل شرایط پاتولوژیک غیرعفونی مانند التهاب، افسردگی و بیماری‌های قلبی عروقی استفاده می‌شوند [۵]، فعالیت‌های ضد میکروبی دارند. از جمله این گروه‌های دارویی می‌توان به داروهای ضدافسردگی [۶، ۷] ضدروان‌پریشی [۸، ۹] ضد فشار خون [۹، ۱۰]، آنتی‌هیستامین‌ها [۱۱]، ضداسپاسم [۱۲]، ضدالتهاب [۱۳] و داروهای قلبی عروقی [۱۴] اشاره کرد.

در برخی از این پژوهش‌ها گزارش شد برای مثال، کلرپرومازین جریان اتیدیوم بروماید علیه همه گونه‌های سالمونلا انتریکا، مایکوباکتریوم آویوم و مایکوباکتریوم اسمگماتیس را کاهش داده است [۱۴، ۱۵] یا گزارش شد وراپامیل، یک مسدودکننده کانال کلسیم، چندین پمپ خروجی باکتری از جمله p-glycoprotein را مهار می‌کند [۱۶، ۱۷] یا در پژوهشی دیگر کاتز و همکاران، فعالیت ضدباکتریایی پاروکستین، فموکستین و مشتقات آن‌ها را علیه E. coli و S. aureus بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که این ترکیبات فعالیت پمپ‌های خروجی NorA, non-NorA و RND را مهار می‌کنند [۱۸].

به طور مشابه، هندریکس و همکاران، خواص ضد میکروبی ۲ ضدافسردگی ۳ حلقه‌ای ایمپ‌پرامین، آمی‌تریپتیلین و



تصویر ۱. تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده به روش میکرو برات سریال دایلوژن

دایلوژن در محیط مایع و تعیین حداقل غلظت کشنده دارو

بر اساس استاندارد 11th ed، M07، CLSI 2018، برای سویه‌ها، حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد، سیپروفلوکساسین به روش میکرو برات سریال دایلوژن در محیط مایع CAMHB تعیین شد.

برای این کار، ابتدا ۱۰ برابر غلظت مورد نیاز سیپروفلوکساسین طبق دستورالعمل برای حداقل غلظت ممانعت‌کننده آماده شد [۲۲]. سریال دایلوژن از ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت میکرو دایلوژن تا ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر انجام و چاهک‌های شماره ۱۱ (کنترل مثبت) و ۱۲ (کنترل منفی) در نظر گرفته شد (تصویر شماره ۱). همچنین با استفاده از رنگ حیاتی MTT، حداقل غلظت کشنده باکتری نیز مشخص شد [۲۳].

ارزیابی هم‌افزایی سرتالین و سیپروفلوکساسین در *in vitro*

آماده‌سازی محلول استوک سرتالین

برای این کار، ۱۰ برابر مقدار مؤثر از سرتالین (۲۵۰ میلی‌گرم) در ۱۰ میکروگرم محلول دی‌متیل سولفوکساید (حلال) تهیه و برای آنتی‌بیوگرام رقیق شد.

روش ارزیابی دیسک دیفیوژن

تأثیر سرتالین روی افزایش قطر هاله در روش کربی بائر بررسی شد. ابتدا ۲ گرم سرتالین به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مولر هینتون آگار استریل‌شده، در دمای ۴۰ درجه (قبل از بسته شدن محیط) اضافه شده و محیط کاملاً یکنواخت و هموزن شد. مولر هینتون آگار در پلیت‌های ۶ سانتی‌متری تقسیم شده و سپس جدایه‌های مقاوم به داروی سودوموناس آئروجینوزا روی آن کشت داده شدند.

روش ارزیابی به روش میکرو برات سریال دایلوژن در محیط مایع



در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط استریل مولر هینتون برات ۲ گرم درصد سرتالین حل شده اضافه شد. برای اثبات تأثیر سرتالین بر پمپ افلاکس سیپروفلوکساسین به روش فنوتیپی حداقل غلظت ممانعت‌کننده سیپروفلوکساسین قبل از اضافه کردن سرتالین و بعد از اضافه کردن آن سنجیده شد.

ارزیابی مولکولی

استخراج دی‌ان‌ای

برای استخراج دی‌ان‌ای جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین سودوموناس آئروجینوزا از روش پیشنهادی Trkov and Avgus- tin، 2003، استفاده شد که به طور خلاصه، باکتری‌ها در محیط BHI برات (QUElab، Exp. D 2025، Bath. N:...) کشت داده شده و برای حداقل ۱۲ ساعت انکوبه شدند. ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت در دور ۱۳۰۰۰×g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع روشن‌شده به آهستگی برداشته و دور ریخته شد. سپس ته‌نشین در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر در سطح ملکولی (Molecular Grade Water) حل شد، ویال مربوطه در آب در حال جوش به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. سپس ۱۰ دقیقه در ظرف حاوی یخ و بعد از آن ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰×g سانتریفیوژ شد. رسوب ایجادشده در ویال در ۱۰۰ میکرولیتر PBS به آهستگی حل و جهت انجام آزمایش PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۴]. غلظت محصول به‌دست‌آمده با دستگاه نانو دراپ تعیین شد.

آزمایش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۶ میکرولیتر از دی‌ان‌ای الگو، ۸ میکرولیتر مستر میکس (بیشگام، ایران)، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای رفت و برگشت است، حجم مخلوط واکنش با استفاده از ۹ میکرولیتر آب دیونیزه به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شده بود.

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمر مربوطه

MexR Forward Reverse	GTTTCGTTGCATAGCGTTGCCTCA CATCGAGCTAAA	TTGATAACCGGC-	MexR	bp 170	Saito, K., H. Yoneyama, and T. Nakae
-------------------------	--	---------------	------	--------	---



نتایج دیسک دیفیوژن

به روش کربی بائر، همه سویه‌های سودوموناس آئروجینوزای مطالعه‌شده مورد ارزیابی حساسیت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین قرار گرفتند. در جدول شماره ۳، صرفاً سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین ارائه شده‌اند. از سویه استاندارد ATCC27853 برای مقایسه استفاده شد. نتایج در جدول شماره ۲ مشخص شده است.

نتایج تأثیر سرتالین در روش دیسک دیفیوژن

در این روش، قبل از افزودن سرتالین، قطر هاله وجود نداشت (تصویر شماره ۲)، اما پس از افزودن سرتالین، قطر هاله به ۲۵ میلی‌متر افزایش یافت.

بر اساس استاندارد CLSI. M100 قطر هاله سیپروفلوکساسین به میزان ۲۵ میلی‌متر نشانگر حساسیت کامل باکتری نسبت به

PCR در ترموسایکلر حرارتی تحت شرایط زیر انجام شد: واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای آنیلینگ (Annealing) در دمای ۵۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه جهت ۳۰ سیکل (۵۵.. درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و گسترش (Elongation) در دمای ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه) در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه انجام شد. سویه استاندارد سودوموناس آئروجینوزای ATCC به عنوان کنترل مثبت استفاده شد [۲۵]. پرایمرهای طراحی شده در پژوهش در جدول شماره ۱ مشخص شده است. محصولات PCR روی ژل ۱/۵ درصد آگاروز به همراه نمونه کنترل و کنترل منفی الکتروفورز شده و در دستگاه ژل داک مشاهده شدند.

نتایج

جدول ۲. نتایج دیسک دیفیوژن، حداقل غلظت ممانعت‌کننده و حداقل غلظت کشنده داروی جدایه‌های سودوموناس آئروجینوزا

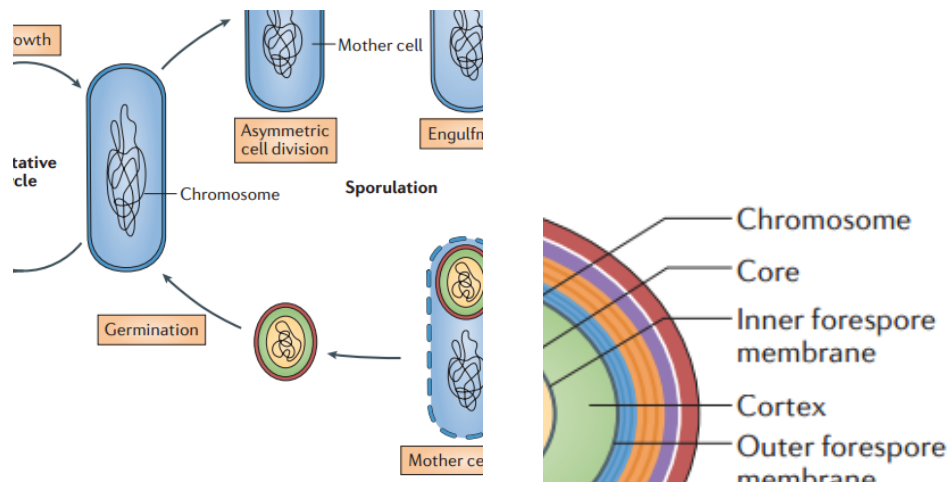
سوش‌های سودوموناس	دیسک دیفیوژن در مولر هینتون آگار	حداقل غلظت ممانعت‌کننده در مولر هینتون برات	MBC در مولر هینتون آگار
سوش شماره ۱	۱۰	۳۲	۶۴
سوش شماره ۲	۸	۱۶	۳۲
سوش شماره ۳	۱۴	۴	۸
ATCC27853	۲۴	۰/۵	۱



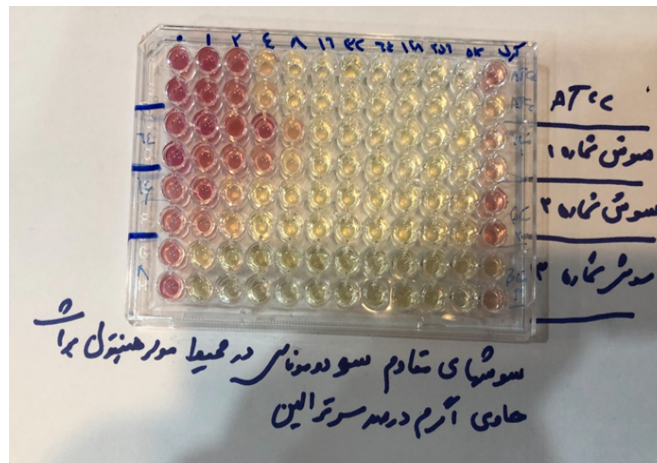
جدول ۳. نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کننده و حداقل غلظت کشنده داروی جدایه‌های قبل و بعد از تأثیر سرتالین ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ μM)

سوش‌های سودوموناس	حداقل غلظت ممانعت‌کننده قبل از اضافه کردن سرتالین	حداقل غلظت ممانعت‌کننده بعد از اضافه کردن سرتالین	حداقل غلظت کشنده قبل از اضافه کردن سرتالین	حداقل غلظت کشنده بعد از اضافه کردن سرتالین
سوش شماره ۱	۶۴	۲	۳۲	۱
سوش شماره ۲	۳۲	۴	۱۶	۲
سوش شماره ۳	۸	۲	۴	۱

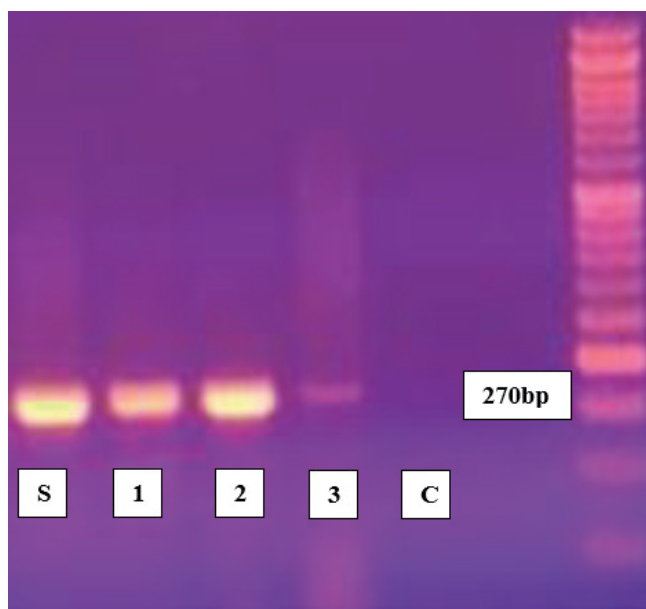




تصویر ۲. نتایج تأثیر سرتالین در روش دیسک دیفیوژن قبل و بعد از افزودن سرتالین



تصویر ۳. نتایج حداقل غلظت ممانعت کننده بعد از تأثیر MTT



تصویر ۴. نتایج بررسی PCR پمپ افلاکس در سویه‌ها، S: کنترل مثبت (سویه استاندارد PAO1 سودوموناس آئروجینوزا)، ۱-۳: سویه‌های مقاوم به دارو، C: کنترل منفی





به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند با افزودن سرتالین حساس شدند. در مطالعه ترکیبی حاضر، هم‌افزایی بین سیپروفلوکساسین (آنتی‌بیوتیک) و سرتالین (غیرآنتی‌بیوتیک) مشاهده شد. قطر مناطق بازدارنده با افزودن غلظت سرتالین افزایش یافت.

در تحقیق حاضر، افزودن سرتالین در غلظت استفاده‌شده ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر همراه با آنتی‌بیوتیک، رشد باکتری‌ها را کاملاً متوقف کرد، اما به عنوان یکی از محدودیت‌های تحقیق، تعیین کمیت هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک سرتالین در این غلظت امکان‌پذیر نشد.

سازوکار دقیق فعالیت ضدباکتریایی سرتالین هنوز مشخص نیست و نیاز به مطالعات مولکولی دارد. اثبات شده که سرتالین یک مهارکننده انتخابی بازجذب سروتونین و یک مهارکننده پمپ بازجذب در انسان است [۲۸، ۲۹]؛ بنابراین می‌تواند به عنوان مهارکننده پمپ خروجی در باکتری‌ها عمل کند. با این حال، برای تأیید اینکه فعالیت ضدباکتریایی سرتالین به دلیل مهار پمپ جریان است، استفاده از باکتری با پمپ‌های جریان مولکولی مشخص شده و مطالعات با مهارکننده‌های پمپ‌های جریان شناخته‌شده مانند اتیدیوم بروماید مورد نیاز است [۲۸].

از زمانی که نقش پمپ‌های افلاکس به عنوان سازوکار مقاومت در برابر چندین ضد میکروبی شناخته شد، منابع قابل توجهی به تولید موادی اختصاص داده شده است که می‌توانند این سیستم را مهار کنند.

علیرغم چندین مطالعه آزمایشگاهی، این داروها عمدتاً به دلایل بی‌ثباتی و سمیت سرم، هرگز از نظر بالینی آزمایش نشده‌اند [۳۰]. در *P. aeruginosa*، *Phe-Arg-β-naphthylamide* باعث افزایش فعالیت کینولون‌ها، کاهش دفع آن‌ها از سلول باکتری و کاهش حداقل غلظت بازدارنده آن‌ها می‌شود [۳۱].

میچل و همکاران، چندین پپتید سنتز کردند که ناحیه TM4 SMR- سودوموناس را هدف قرار دادند. دامنه TM4 برای مونتاژ همودایمر و به عنوان یک پمپ کاربردی مهم است. آن‌ها نشان دادند که پپتیدهای سنتز شده نه تنها می‌توانند جریان را کاهش دهند، بلکه می‌توانند فعالیت زیست‌کشی سایر ترکیبات را نیز بهبود بخشند [۳۲].

علاوه بر مواد سنتزی، ده‌ها محصول طبیعی و گیاهی برای استفاده به عنوان مهارکننده پمپ جریان آزمایش شده‌اند. در حالی که برخی فعالیت مهاری نشان داده‌اند، مطالعات بالینی هنوز انجام نشده است [۳۳]. از زمانی که نقش پمپ‌های افلاکس به عنوان سازوکار مقاومت در برابر چندین ضد میکروبی شناخته شد، منابع قابل توجهی به تولید موادی اختصاص داده شده است که می‌توانند این سیستم را مهار کنند [۳۴، ۳۵].

در *P. aeruginosa*، *Phe-Arg-β-naphthylamide* باعث

دارو است [۲۱]، یعنی اینکه با افزودن سرتالین، باکتری کاملاً مقاوم به دارو، به حساس تبدیل شد.

نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کننده و حداقل غلظت کشنده سویه‌های مقاوم

نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کننده و حداقل غلظت کشنده سیپروفلوکساسین برای سویه‌های مقاوم به داروی سودوموناس آئروجینوزا و سوش استاندارد سودوموناس آئروجینوزای ۲۵۸۷۳ در جدول شماره ۲ قابل مشاهده است.

نتایج استفاده از MTT نیز منطبق با نتایج کشت درباره حداقل غلظت کشنده تعیین بود (تصویر شماره ۳ و جدول شماره ۳).

برای سودوموناس‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین قبل و بعد از رشد روی محیط واجد سرتالین حداقل غلظت ممانعت‌کننده انجام شد و نتایج طبق جدول شماره ۳ است.

نتایج PCR

تعیین غلظت ژنوم تخلیص‌شده نشان داد نسبت دی‌ان‌ای به پروتئین و مواد آلی جداشده بیشتر از ۱/۸ بوده و برای سنجش بسیار مناسب است (نسبت ۲۶۰ به ۲۳۰ بر اساس نانوگرم بر میکرولیتر). نتایج بررسی وجود ژن پمپ افلاکس نشان داد سوش‌های مقاوم همه پمپ افلاکس داشتند. سویه استاندارد PAO1 سودوموناس آئروجینوزا که به عنوان کنترل مثبت استفاده شده بود نیز باند ۲۷۰ را ارائه کرد (تصویر شماره ۴).

بحث

در این تحقیق، اثر سرتالین در شکست مقاومت سودوموناس به سیپروفلوکساسین اثبات شد. استفاده از روش درمان ترکیبی با عوامل ضد میکروبی به دلیل ظهور باکتری‌های مقاوم به چند دارو (MDR) رایج شده است [۲۶، ۲۷]. یکی از راهبردها، تولید داروها به صورت ترکیبی است، زیرا هم‌افزایی می‌تواند از ظهور مقاومت اکتسابی جلوگیری کرده، اثربخشی را افزایش، سمیت را کاهش و طیف وسیع‌تری از فعالیت‌ها را نسبت به رژیم‌های تک‌درمانی ارائه دهد.

مطالعات قبلی نشان داد درمان ترکیبی ضد میکروبی در برابر بیماری‌های صعب‌العلاج مانند سل و عفونت HIV مؤثر است، زیرا این میکروب‌ها به دلیل مقاومت یا عدم کارایی به تک‌درمانی پاسخ نمی‌دهند [۲۸]؛ بنابراین شناسایی چنین ترکیباتی ممکن است مفید باشد و هزینه و مدت درمان دارویی ضد میکروبی را کاهش دهد. انگیزه انتخاب این مواد برای مطالعات هم‌افزایی، استفاده طولانی‌مدت و مطالعات قبلی روی داروهای ضد اسردگی و داروهای ضد روان‌پریشی بود [۱۸، ۱۹].

یافته‌های ما نشان داد برخی از سویه‌های باکتریایی که قبلاً

تشکر و قدردانی

از پرسنل محترم آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی مرکز تحقیقات عفونی دانشگاه علوم پزشکی اراک تشکر و قدردانی می‌شود.

افزایش فعالیت کینولون‌ها، کاهش دفع آن‌ها از سلول باکتری و کاهش حداقل غلظت بازدارنده آن‌ها می‌شود [۳۶]. با وجود چندین کاندیدای بالقوه به عنوان مهارکننده‌های پمپ افلاکس در *P. aeruginosa*، دستیابی به یک داروی مؤثر هنوز موضوع مطالعات متعددی است. شناخت این متغیرها و چگونگی ارتباط ترکیبات با این سازوکارهای نفوذ مختلف اهمیت ویژه‌ای در مبارزه با مقاومت آنتی‌بیوتیکی *P. aeruginosa* دارد [۳۷].

اثبات شده است که این مهارکننده‌های پمپ افلاکس نیز می‌توانند بر تولید بیوفیلم تأثیر بگذارند، چراکه رابطه نزدیکی بین ترشح مولکوهایی که تولید بیوفیلم را تحریک می‌کنند و کوئوروم سنسینگ وجود دارد [۳۸].

نتیجه‌گیری

در این تحقیق شکست مقاومت سودوموناس آئروجینوزا به سیپروفلوکساسین با مهار پمپ افلاکس در سویه‌های کلینیکی با استفاده از سرتالین به روش فنوتیپی و ژنوتیپی اثبات شد. سرتالین حداقل غلظت مهارکننده سیپروفلوکساسین را از طریق غیرفعال کردن پمپ افلاکس در باکتری سودوموناس آئروجینوزا کاهش و مقاومت باکتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین تغییر داد. با توجه به اثر بسیار مناسب سرتالین پیشنهاد می‌شود مطالعات فراتر روی موش آزمایشگاهی انجام شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این پژوهش با کد اخلاق IR.IAU.B.REC.1401.011 به تصویب کمیته اخلاق دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد رسید.

حامی مالی

این مقاله برگرفته از رساله دکتری تخصصی نویسنده اول در گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک است.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در پژوهش و آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

References

- [1] Reynolds D, Kollef M. The epidemiology and pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: An update. *Drugs*. 2021; 81(18):2117-31. [DOI:10.1007/s40265-021-01635-6] [PMID] [PMCID]
- [2] Rehman A, Patrick WM, Lamont IL. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem. *J Med Microbiol*. 2019; 68(1):1-10. [DOI:10.1099/jmm.0.000873] [PMID]
- [3] Ma D, Cook DN, Hearst JE, Nikaido H. Efflux pumps and drug resistance in gram-negative bacteria. *Trends Microbiol*. 1994; 2(12):489-93. [DOI:10.1016/0966-842X(94)90654-8] [PMID]
- [4] Nasim F, Qureshi IA. Role of structural biology methods in drug discovery. In: Tripathi T, Dubey VK, editors. *Advances in protein molecular and structural biology methods*. United States: Elsevier; 2022. [DOI:10.1016/B978-0-323-90264-9.00022-2]
- [5] Marquez B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*. 2005; 87(12):1137-47. [DOI:10.1016/j.biochi.2005.04.012] [PMID]
- [6] Munoz-Bellido JL, Munoz-Criado S, Garcia-Rodriguez JA. Antimicrobial activity of psychotropic drugs: Selective serotonin reuptake inhibitors. *Int J Antimicrob Agents*. 2000; 14(3):177-80. [DOI:10.1016/S0924-8579(99)00154-5] [PMID]
- [7] Martinez-Martinez L, Eliecer Cano M, Manuel Rodríguez-Martínez J, Calvo J, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008; 6(5):685-711. [DOI:10.1586/14787210.6.5.685] [PMID]
- [8] Dastidar SG, Jairaj J, Mookerjee M, Chakrabarty AN. Studies on antimicrobial effect of the antihistaminic phenothiazine trimeprazine tartrate. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 1997; 44(3):241-7. [PMID]
- [9] Dutta NK, Mazumdar K, DasGupta A, Dastidar SG. In vitro and in vivo efficacies of amlodipine against *Listeria monocytogenes*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009; 28(7):849-53. [DOI:10.1007/s10096-009-0703-y] [PMID]
- [10] Kristiansen JE, Mortensen ID, Gaarslev K. The antibiotic effect of the anti-depressive drug femoxetine and its stereo-isomeric analogs on diarrhoea producing enterobacteriaceae. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B*. 1986; 94(2):103-6. [DOI:10.1111/j.1699-0463.1986.tb03027.x]
- [11] Chattopadhyay D, Dastidar SG, Chakrabarty AN. Antimicrobial properties of methdilazine and its synergism with antibiotics and some chemotherapeutic agents. *Arzneimittelforschung*. 1988; 38(7):869-72. [PMID]
- [12] Karak P, Kumar KA, Mazumdar K, Mookerjee M, Dastidar SG. Antibacterial potential of an antispasmodic drug dicyclomine hydrochloride. *Indian J Med Res*. 2003; 118:192-6. [PMID]
- [13] Mazumdar K, Dastidar SG, Park JH, Dutta NK. The anti-inflammatory non-antibiotic helper compound diclofenac: An antibacterial drug target. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009; 28(8):881-91. [DOI:10.1007/s10096-009-0739-z] [PMID]
- [14] Mazumdar K, Ganguly K, Kumar KA, Dutta NK, Chakrabarty AN, Dastidar SG. Antimicrobial potentiality of a new non-antibiotic: The cardiovascular drug oxyfedrine hydrochloride. *Microbiol Res*. 2003; 158(3):259-64. [DOI:10.1078/0944-5013-00204] [PMID]
- [15] Bailey AM, Paulsen IT, Piddock LJ. RamA confers multidrug resistance in *Salmonella enterica* via increased expression of *acrB*, which is inhibited by chlorpromazine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(10):3604-11. [DOI:10.1128/AAC.00661-08] [PMID] [PMCID]
- [16] Choudhuri BS, Bhakta S, Barik R, Basu J, Kundu M, Chakrabarti P. Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drxA* and *drxB* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J*. 2002; 367(1):279-85. [DOI:10.1042/bj20020615] [PMID] [PMCID]
- [17] Lee EW, Huda MN, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(12):3733-8. [DOI:10.1128/AAC.47.12.3733-3738.2003] [PMID] [PMCID]
- [18] Kaatz GW, Moudgal VV, Seo SM, Hansen JB, Kristiansen JE. Phenylpiperidine selective serotonin reuptake inhibitors interfere with multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*. 2003; 22(3):254-61. [DOI:10.1016/S0924-8579(03)00220-6] [PMID]
- [19] Hendricks O, Butterworth TS, Kristiansen JE. The in-vitro antimicrobial effect of non-antibiotics and putative inhibitors of efflux pumps on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*. 2003; 22(3):262-4. [DOI:10.1016/S0924-8579(03)00205-X] [PMID]
- [20] Haynes WC. *Pseudomonas aeruginosa*—its characterization and identification. *J Gen Microbiol*. 1951; 5(5 S):939-50. [DOI:10.1099/00221287-5-5-939] [PMID]
- [21] Cusack TP, Ashley EA, Ling CL, Roberts T, Turner P, Wangrangsimakul T, et al. Time to switch from CLSI to EUCAST? A Southeast Asian perspective. *Clin Microbiol Infect*. 2019; 25(7):910-1. [DOI:10.1016/j.cmi.2019.03.007] [PMID] [PMCID]
- [22] Inbasekaran D, Sankari M, Girija AS. The Antimicrobial effect of Isoamyl Cyanoacrylate: An In-vitro study. *Res J Pharm Technol*. 2019; 12(8):3899-902. [DOI:10.5958/0974-360X.2019.00671.1]
- [23] Houdkova M, Rondevaldova J, Doskocil I, Kokoska L. Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. *Fitoterapia*. 2017; 118:56-62. [DOI:10.1016/j.fitote.2017.02.008] [PMID]
- [24] Trkov M, Avguštin G. An improved 16S rRNA based PCR method for the specific detection of *Salmonella enterica*. *Int J Food Microbiol*. 2003; 80(1):67-75. [DOI:10.1016/S0168-1605(02)00138-1] [PMID]
- [25] Linget C, Stylianou DG, Dell A, Wolff RE, Piémont Y, Abdallah MA. Bacterial siderophores: The structure of a desferri-ferri-bactin produced by *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. *Tetrahedron Lett*. 1992; 33(27):3851-4. [DOI:10.1016/S0040-4039(00)74802-7]
- [26] Jawetz E. The use of combinations of antimicrobial drugs. *Annu Rev Pharmacol*. 1968; 8:151-70. [DOI:10.1146/annurev.pa.08.040168.001055] [PMID]
- [27] Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. 2000; 406(6797):775-81. [DOI:10.1038/35021219] [PMID]
- [28] Ayaz M, Subhan F, Ahmed J, Khan AU, Ullah F, Ullah I, et al. Sertraline enhances the activity of antimicrobial agents against pathogens of clinical relevance. *J Biol Res (Thessalon)*. 2015; 22(1):4. [DOI:10.1186/s40709-015-0028-1] [PMID] [PMCID]
- [29] Petersen I, Gilbert RE, Evans SJ, Man SL, Nazareth I. Pregnancy as a major determinant for discontinuation of antidepressants: An analysis of data from The Health Improvement Network. *J Clin Psychiatry*. 2011; 72(7):979-85. [DOI:10.4088/JCP.10m06090blu] [PMID]

- [30] Bacinschi N, Tudor E, Tărăburcă M. [Energy metabolism inhibitors - a new group of antituberculous drugs (Romanian)]. *Științe Medicale*. 2021; 71(3):55-63. [DOI:10.52692/1857-0011.2021.3-71.30]
- [31] Rejiba S, Aubry A, Petitfrere S, Jarlier V, Cambau E. Contribution of ParE mutation and efflux to ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *J Chemother*. 2008; 20(6):749-52. [DOI:10.1179/joc.2008.20.6.749] [PMID]
- [32] Mitchell CJ, Stone TA, Deber CM. Peptide-based efflux pump inhibitors of the small multidrug resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019; 63(9):e00730-19. [DOI:10.1128/AAC.00730-19] [PMID] [PMCID]
- [33] Stavri M, Piddock LJ, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59(6):1247-60. [DOI:10.1093/jac/dkl460] [PMID]
- [34] Ainsa JA, Blokpoel MC, Otal I, Young DB, De Smet KA, Martin C. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*. 1998; 180(22):5836-43. [DOI:10.1128/JB.180.22.5836-5843.1998] [PMID] [PMCID]
- [35] Hulen C, Racine PJ, Feuilloley M, Elomri A, Lomri NE. Effects of verapamil and two bisbenzylisoquinolines, curine and guattegaumerine extracted from *Isolona hexaloba*, on the inhibition of ABC transporters from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*. 2022; 11(5):700. [DOI:10.3390/antibiotics11050700] [PMID] [PMCID]
- [36] Coban AY, Ekinci B, Durupinar B. A multidrug efflux pump inhibitor reduces fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Chemotherapy*. 2004; 50(1):22-6. [DOI:10.1159/000077280] [PMID]
- [37] Lorusso AB, Carrara JA, Barroso CD, Tuon FF, Faoro H. Role of efflux pumps on antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(24):15779. [DOI:10.3390/ijms232415779] [PMID] [PMCID]
- [38] Liu Y, Yang L, Molin S. Synergistic activities of an efflux pump inhibitor and iron chelators against *Pseudomonas aeruginosa* growth and biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(9):3960-3. [DOI:10.1128/AAC.00463-10] [PMID] [PMCID]