



Correlation Between MexE and MexC Efflux Pump Expression and Levofloxacin Resistance in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Mehdi Pourjafar Devin ¹, Reyhaneh Shaban Hashemabadi ², Mahdi Kouhi Noghondar ³, Leili Shokoohizadeh ^{4*}

¹ Department of Biology, Kavian Institute of Higher Education, Mashhad, Iran.

² Department of biology, Islamic Azad University of Mashhad, Mashhad, Iran.

³ Department of Microbiology, Imam Reza Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

⁴ Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

Received: 2025/02/27

Accepted: 2025/04/26

Online Published: 2025/04/26

Abstract

Multidrug resistance in hospital-acquired *Pseudomonas aeruginosa* isolates poses significant challenges in patient treatment. Understanding the molecular mechanisms underlying antibiotic resistance in *P. aeruginosa* infections is crucial for developing effective therapeutic strategies. This study aimed to investigate the antibiotic resistance patterns and the expression levels of the efflux pump genes *MexCD-OprJ* and *MexEF-OprN* in resistant *P. aeruginosa* isolates collected from clinical samples in Mashhad. A total of 102 *P. aeruginosa* isolates were identified using phenotypic and biochemical methods. Antibiotic susceptibility was assessed by the agar disk diffusion method using cefepime, aztreonam, norfloxacin, levofloxacin, ofloxacin, ceftiofur, and ceftriaxone disks. The minimum inhibitory concentration (MIC) for levofloxacin was determined by agar dilution method. Expression levels of *mexC* and *mexE* genes in levofloxacin-resistant isolates were evaluated using real-time PCR. The results showed that all isolates were resistant to ceftriaxone. Resistance rates to ceftiofur, cefepime, and aztreonam were 93%, 65%, and 54.4%, respectively. Among the fluoroquinolones (norfloxacin, levofloxacin, and ofloxacin), the overall resistance rate was approximately 71%. Multidrug resistance was observed in 53.4% of the isolates. The highest proportion of isolates (22.4%) exhibited an MIC of 128 µg/ml for levofloxacin. Overexpression of *mexE* and *mexC* was statistically significant in 11 (55%) and 9 (45%) of the resistant isolates, respectively. However, in the remaining isolates, changes in gene expression—whether increased or decreased was not statistically significant, suggesting the involvement of alternative resistance mechanisms. Overall, efflux pump overexpression appears to be a key contributor to antibiotic resistance in these clinical isolates.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic resistance, *mexE*, *mexC*.

Cite this article: Pourjafar Devin M, Shaban Hashemabadi R, Kouhi Noghondar M, Shokoohizadeh L. Correlation between MexE and MexC efflux pump expression and levofloxacin resistance in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2025;2(1):11-24.

Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education

Corresponding author: Shokoohizadeh, Leili

Email: l.shokohizadeh@umsha.ac.ir

ارتباط بین بیان ژن پمپ افلاکس MexE و MexC و مقاومت به لووفلوکساسین در سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو

مهدی پورجعفردوین^۱، ریحانه شبان هاشم‌آبادی^۲، مهدی کوهی نقندر^۲، لیلی شکوهی زاده^{۳*}

^۱ گروه زیست‌شناسی، موسسه آموزش عالی کویان، مشهد، ایران.

^۲ گروه میکروبیولوژی، بیمارستان امام رضا (ع)، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

^۳ گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۹ پذیرش: ۱۴۰۴/۲/۶ انتشار آنلاین: ۱۴۰۴/۲/۶

چکیده

مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی چندگانه در جدایه‌های بیمارستانی سودوموناس آئروژینوزا مشکلات فراوانی را برای درمان بیماران و ریشه‌کن کردن آن ایجاد کرده است. آگاهی از مکانیسم‌های مولکولی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا، ضروری می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و میزان بیان ژن‌های افلاکس *MexEF-OprN* و *MexCD-OprJ* در جدایه‌های مقاوم سودوموناس آئروژینوزا در شهر مشهد، می‌باشد. تعداد ۱۰۲ جدایه سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های بالینی با روش‌های استاندارد فنوتیپی و بیوشیمیایی شناسایی شدند. برای بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار در آگار، دیسک‌های سفپیم، آزترئونام، نورفلوکسازین، لووفلوکسازین، افلوکسازین، سفتیوفور و سفتریاکسون مورد استفاده قرار گرفتند. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) لووفلوکساسین با روش رقت‌سازی در آگار ارزیابی شد. در نهایت میزان بیان ژن *mexE* و *mexC* با Real time PCR در ایزوله‌های مقاوم به لووفلوکساسین ارزیابی شد. نتایج انتشار در آگار نشان داد تمامی جدایه‌ها نسبت به سفتریاکسون مقاوم بودند. مقاومت نسبت به سفتیوفور، سفپیم و آزترئونام به ترتیب ۹۳، ۶۵ و ۵۴/۴ درصد بود. در گروه فلوروکینولون‌ها (نورفلوکسازین، لووفلوکساسین، افلوکسازین) میزان مقاومت تقریباً ۷۱ درصد مشاهده شد. ۵۳/۴ درصد ایزوله‌ها دارای مقاومت چندگانه بودند. بیشترین درصد ایزوله‌ها (۲۲/۴۴ درصد) دارای حداقل غلظت مهارکنندگی ۱۲۸ μg/ml نسبت به لووفلوکساسین بود. مطابق نتایج Real time PCR، سویه‌های مقاوم، میزان بیان بیشتری نسبت به سویه‌های حساس نشان دادند. همچنین بیان ژن *mexE* و *mexC* در مقاوم به لووفلوکساسین به ترتیب در ۱۱ (۵۵ درصد) و ۹ (۴۵ درصد) جدایه، از نظر آماری معنی‌دار بود. با این حال افزایش بیان ژن در بقیه نمونه‌ها معنی‌دار نبود. بیان بالای پمپ‌های خروج یکی از عوامل کلیدی در مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری سودوموناس آئروژینوزا است. عدم معنی‌دار بودن با وجود افزایش بیان و حتی کاهش بیان نسبت به سویه کنترل، می‌تواند به دلیل مکانیسم‌های دیگری مانند جهش و وجود اینتگرون‌ها اتفاق افتاده باشد.

کلمات کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، *mexE*، *mexC*

Cite this article: Pourjafar Devin M, Shaban Hashemabadi R, Kouhi Noghondar M, Shokoohzadeh L. Correlation between MexE and MexC efflux pump expression and levofloxacin resistance in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2025;2(1):11-24.

Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education

Corresponding author: Shokoohzadeh, Leili

Email: l.shokohzadeh@umsha.ac.ir

مقدمه

سوبستراهای اختصاصی را از خلال فضای پری پلاسمی به بیرون از غشاء تسهیل می کنند (۶).

ساختار آنها از سه پروتئین متفاوت تشکیل شده است: یک پروتئین تعدیل کننده پری پلاسمی که معمولاً به عنوان پروتئین القایی غشاء پری پلاسمی (PMFP)^۹ شناخته می شود، مانند *MexA*, *MexX*, *MexC* و *MexE*. یک ناقل مقاومت ندولاسیون تقسیم سلولی (RNDt)^{۱۰} از قبیل *MexB*, *MexY*, *MexD* و *MexF* و در نهایت فاکتور تشکیل کانال در غشاء خارجی از قبیل *OprM*, *OprJ*, *OprN* (۶، ۷).

ژنوم سودوموناس *اثروجینوزا* حداقل دارای دوازده ژن ساختاری برای سیستم های پمپ خروج RND است که چهار ژن شامل *MexAB-OprM*, *MexCD-OprJ*, *MexEF-OprN* و *MexXY* از نظر بالینی مهم هستند (۵). در بین این ژن ها *MexAB-OprM* و *MexXY* به مقاومت ذاتی در برابر بسیاری از آنتی بیوتیک ها کمک می کنند (۵). این در حالی است که *MexCD-OprJ* و *MexEF-OprN* در سلول های نوع وحشی بیان نمی شوند، اما می توانند پس از کسب جهش های تنظیمی، بیش از حد بیان شوند که منجر به مقاومت چند دارویی اکتسابی می شود (۸، ۹). بیان همزمان سیستم های *Mex* در جدایه های بالینی سودوموناس *اثروجینوزا* گزارش شده است که در آن تأثیر متغیر آن بر حساسیت آنتی بیوتیکی مشاهده شده است (۱۰، ۱۱).

تشخیص مقاومت های آنتی بیوتیکی ناشی از پمپ خروج، داده هایی را ارائه می دهد که هم برای آنالیزهای بالینی مانند انتخاب آنتی بیوتیک و دوز مناسب مفید است و هم برای مطالعات اپیدمیولوژیکی مانند نظارت بر مکانیسم های مقاومت موجود و رایج کاربرد دارد (۱۲). با وجود شناسایی مهارکننده های پمپ خروج (EPI)^{۱۱} به عنوان جایگزینی برای توسعه آنتی بیوتیک های جدید، هنوز هیچ EPI برای استفاده بالینی تأیید نشده است (۱۳). روش های شناسایی مبتنی بر فنوتیپی معمولاً به دلیل وجود مکانیسم های مقاومت دیگر، بیان همزمان بیش از حد *Mex* ها و دشواری در ارزیابی پمپ هایی که سطح مقاومت کم یا متوسط را ایجاد می کنند، نتایج مبهمی دارند (۱۲). یکی از روش های تشخیص سیستم های *Mex*، آنالیز وسترن بلات با استفاده از

آنتی بیوتیک ها، داروهای قدرتمندی هستند که در درمان عفونت های باکتریایی به کار می روند. استفاده نادرست از این داروها منجر به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در بسیاری از باکتری ها شده است که به دنبال آن عفونت های ناشی از این باکتری های مقاوم، در بیمارستان ها رو به گسترش می باشند (۱). با اینکه میکروب های مقاوم به دارو در همه جا حضور دارند، ولی شیوع آن ها در بخش مراقبت های ویژه (ICU)^۱ بصورت تصاعدی در حال افزایش می باشد (۲).

یکی از علل شایع عفونت های بیمارستانی سودوموناس *اثروجینوزا* می باشد که به دلیل مقاومت آن در برابر آنتی بیوتیک های متعدد یکی از چالش برانگیزترین باکتری ها در درمان های بالینی می باشد. انجمن بیماری های عفونی آمریکا (IDSA)^۲ این باکتری را در فهرست عوامل بیماری زای *ESKAPE*^۳ (گروهی از پاتوژن ها که به دلیل شیوع فزاینده و گاهی اثربخش عوامل ضد باکتریایی موجود، بزرگترین تهدید برای سلامت عموم محسوب می شوند) قرار داده است (۳). همچنین سازمان بهداشت جهانی (WHO)^۴، سودوموناس *اثروجینوزا* را در دسته ی بحرانی لیست باکتری های بیماری زای اولویت دار، قرار داده است. این لیست شامل باکتری هایی است که به صورت فوری به تحقیق و توسعه ی آنتی بیوتیک های جدید نیاز دارند (۴).

مقاومت در سودوموناس *اثروجینوزا* عمدتاً به دلیل هم افزایی بین نفوذپذیری پایین غشای خارجی^۵ و بیان سیستم های خروجی چند دارو^۶، به ویژه در خانواده ندولاسیون-تقسیم سلولی-مقاومت (RND)^۷ نسبت داده می شود که اغلب موارد به صورت کروموزومی کد می شوند (۵). در هسته مرکزی ژنوم سودوموناس *اثروجینوزا*، ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک های متعددی از قبیل ژن های کد کننده پمپ های خروج^۸ شامل *MexXY*, *MexAB-OprM*, *MexCD-OprJ* و *MexEF-OprN* کد می شوند. همه این ساختارها بخش اعظمی از خانواده بزرگ RND ها به حساب می آیند. این پمپ ها ساختار پروتئینی سه بخشی دارند که حامل ها، دارو-پروتون را در دو جهت مخالف حمل می کنند، بنابراین خروج

⁶ Multidrug efflux systems

⁷ Resistance-Nodulation-Cell Division

⁸ Efflux pumps

⁹ Periplasmic Membrane Forming protein

¹⁰ Resistance Nodulation Division transporter

¹¹ Efflux pumps inhibitors

¹ Intensive Care Unit

² Infectious diseases society of America

³ *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter species*

⁴ World Health Organization

⁵ Outer membrane

سودوموناس *اِثروجینوزا* ابتدا روی محیط بلاداآگار کشت داده شده و سپس با تست‌های بیوشیمیایی شامل تست آهن- قند سه گانه (TSI)^۲، تست اوره، کاتالاز، اکسیداز، سیترات، حرکت- ایندول- سولفید (SIM)^۳، آزمون اکسیداسیون و تخمیر گلوکز (OF)^۴ و در نهایت کشت روی محیط ستریماید آگار و انکوباسیون در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد بررسی شدند. نمونه استاندارد *سودوموناس اِثروجینوزا* PAOI به عنوان نمونه استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی انتشار از دیسک^۵ (روش کربی - بایر)

۱۰۳ ایزوله *سودوموناس اِثروجینوزا* شناسایی شده از نمونه‌های جمع‌آوری شده از بخش‌های مختلف بیمارستان امام رضا، برای بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار از دیسک استفاده شد. برای این منظور، استانداردهای موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI)^۶ رعایت شد. محیط کشت مورد استفاده مولر هینتون آگار بود که باکتری‌های معادل نیم مک فارلند به شکل چمنی روی محیط کشت داده شده و سپس دیسک‌گذاری انجام شد. دیسک‌های آنتی‌بیوگرام مورد استفاده از شرکت پادتن طب تهیه گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفپیم (۳۰μg)، آزترئونام (۳۰μg)، نورفلوکساسین (۱۰μg)، لووفلوکساسین (۵μg)، افلوکساسین (۵μg)، سفتیوفور (۳۰μg) و سفتریاکسون (۳۰μg) مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)^۷

حداقل غلظت مهارکنندگی با روش رقت‌سازی درآگار، برای لووفلوکساسین به عنوان کاندید فلوروکینولون‌ها انجام شد. پودر لووفلوکساسین از شرکت تولید دارو تهران، تهیه شد. به طور خلاصه از پودر لووفلوکساسین ذخیره آنتی‌بیوتیکی غلظت ۱۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مطابق فرمول زیر تهیه شد:

$$\frac{1000}{P} \times V.C = W$$

P=پوتنسی^۸ آنتی‌بیوتیک مورد استفاده برحسب میکروگرم بر میلی‌گرم که توسط شرکت‌های سازنده ارائه می‌شود (در برخی موارد به صورت درصد نیز بیان می‌شود).

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال یا پلی‌کلونال می‌باشد. این تکنیک پیچیده و زمان‌بر است و آنتی‌بادی‌های اختصاصی پروتئین Mex به صورت تجاری نیز در دسترس نیستند. واکنش زنجیره‌ای پلی-مرز کمی در زمان واقعی (qRT-PCR)^۱ یک روش سریع برای اندازه‌گیری بیان ژن است. از آنجایی که *سودوموناس اِثروجینوزا* یک سویه مقاوم به چند دارو است، ریشه‌کن کردن آن دشوارتر می‌شود. به دلیل اهمیت مرگ و میر ناشی از مقاوم شدن به دارو در عفونت‌های *سودوموناس اِثروجینوزا*، آگاهی از مکانیسم‌های ویروانس و مقاومت‌های آنتی-بیوتیکی ضروری به نظر می‌رسد. سویه‌های *سودوموناس اِثروجینوزا* که از نمونه‌های بالینی بیمارستان امام رضا در مشهد جدا شده‌اند، پروفایل مقاومتی بسیار بالا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده‌اند. بنابراین، پیش و بررسی الگوی مقاومت در بازه زمانی مناسب می‌تواند سیر تغییرات مقاومت آنتی‌بیوتیکی را دنبال کند. این مطالعه به بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و میزان بیان ژن‌های پمپ خروج *MexEF-OprN* و *MexCD-OprJ* در جدایه‌های بالینی در شهر مشهد می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های بالینی و جداسازی باکتری‌ها

مطالعه حاضر از نوع مطالعات مقطعی Cross-Sectional می‌باشد. نمونه‌گیری در بازه زمانی خرداد تا آبان ۱۴۰۲ صورت گرفت. معیارهای ورود به مطالعه در این بررسی کلیه نمونه‌های بالینی *سودوموناس اِثروجینوزا* جدا شده از بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان امام رضا (ع) شامل ICU، بخش عفونی، اورولوژی، سوختگی و سایر بخش‌های بیمارستانی می‌باشد. نمونه‌های بالینی جمع‌آوری شده مربوط به تراشه، ترشحات مختلف (شامل زخم، ریه، خلط، آسیت، آبسه و گوش)، کشت ادرار، کشت خون و سایر نمونه‌هایی که برای بررسی میکروبیولوژیکی به آزمایشگاه میکروبی شناسی ارسال می‌شدند، بودند. نمونه‌هایی که تکراری بوده و همچنین نمونه‌هایی که بر اساس تشخیص‌های فنوتیپی جزو *سودوموناس اِثروجینوزا* قرار نمی‌گرفتند، از مطالعه خارج شدند. نمونه‌های عفونی ارسال شده به آزمایشگاه بیمارستان جهت حضور نمونه‌های عفونی ارسال شده به آزمایشگاه بیمارستان جهت حضور

¹ Quantitative realtime RT-PCR

² The triple sugar- iron agar

³ Sulfide Indole Motility

⁴ Oxidative/fermentation glucose test

³ Disk diffusion method

⁶ Clinical & Laboratory Standards Institute

⁷ Minimum inhibitory concentration

⁸ Potency

آنکوستروم توسط سانتریفیوژ برداشت شدند. سلول‌ها بلافاصله برای استخراج RNA کل با استفاده از کیت استخراج پارس توس (ایران) مورد استفاده قرار گرفتند. برای بررسی خلوص RNA استخراج شده، میزان جذب نور در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد.

سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز پارس توس (ایران) انجام شد. مخلوط بافر RT 2X، حاوی بافر RT 2X، ۱ میلی‌مولار MgCl₂، الیگو d(t)₁₆، هگزامر dNTP، ۸ میلی‌مولار DEPC می‌باشد. تمامی مواد همراه RNase و تثبیت کننده^۶ و آب DEPC می‌باشد. تمامی مواد همراه با RNA خالص و عاری از DNA مطابق دستورالعمل شرکت تولید کننده مخلوط و سنتز انجام شد. مخلوط در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد، سپس ۶۰ دقیقه در دمای ۴۷ سانتی‌گراد گرماگذاری و متوقف کردن واکنش ۵ دقیقه در ۸۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. به سرعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه روی یخ سرد شد. cDNA های بدست آمده تا زمان استفاده در دمای -۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

qRT-PCR

در پژوهش حاضر ژن‌های مورد مطالعه شامل *mexC*، *mexE* در مقایسه با ژن خانه‌دار^۷ 16S rRNA به‌عنوان ژن کنترل داخلی، با استفاده از مستر میکس سایبرگرین پارس توس انجام شد. مخلوط واکنش شامل مستر میکس ۱۰ میکرولیتر، پرایمرهای پیشرو و پسرو (جدول ۱) هر کدام یک میکرولیتر، cDNA دو میکرولیتر، سپس با اب مقطر به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی، توسط دستگاه Rotor-Gene Q 2.1.0.9 سنجیده شد. واکنش طی ۴۵ سیکل به ترتیب دمای واسرشت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، دمای انیلینگ پرایمرها ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و دمای طویل سازی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه انجام شد. اطلاعات به‌دست‌آمده، با کمک نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۱۰ بررسی شد. تمامی نمونه‌ها با سه بار تکرار انجام شدند نتایج طبق $\Delta\Delta Ct$ Quantification Relative بررسی شدند. نتایج qPCR بر اساس روش pfaffl با استفاده از میزان Ct در فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$

V = حجم مورد نیاز از محلول ذخیره آنتی‌بیوتیکی برحسب میلی‌لیتر.

C = غلظت نهایی محلول ذخیره آنتی‌بیوتیکی (ضربیی از ۱۰۰۰) برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر.

W = وزنی از آنتی‌بیوتیک برحسب میلی‌گرم که در حجم V حل می‌شود.

غلظت‌های آنتی‌بیوتیکی از ۱ تا ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محیط‌های مولر هینتون آگار به صورت رقت‌سازی در آگار، در پلیت‌ها تهیه شده و سپس از سوسپانسیون باکتریایی معادل 5×10^5 CFU/ml، به هر رقت تلقیح شد. کمترین غلظتی از آنتی‌بیوتیک که رشد قابل مشاهده بعد از یک شبانه روز مشاهده نشد، به عنوان MIC ثبت گردید. تفسیر نتایج مطابق CLSI انجام شد. برای سویه‌های حساس $MIC \leq 1$ ، سویه‌های با مقاومت بینابینی $MIC = 2$ و سویه‌های مقاوم $MIC \geq 4$ در نظر گرفته شد که بر اساس دوز مصرفی ۷۵۰ میلی‌گرم در هر ۲۴ ساعت تعیین شده است.

تعیین سویه‌های مقاوم به چند دارو

باکتری‌های مقاوم به چند دارو (MDR)^۱، به عنوان عدم حساسیت به حداقل یک عامل در سه یا چند کلاس ضد میکروبی تعیین شدند. (۱۴). در پژوهش حاضر از جدیدترین دستورالعمل CLSL 2023 استفاده شده که مطابق آن از شش گروه ارائه شده برای تست ضد میکروبی، سه گروه آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی قرار گرفتند. بنابراین با قطعیت می‌توان در مورد شیوع MDR نظر داد.

بررسی مولکولی پمپ‌های خروج MexE و MexC با روش qRT-PCR^۲

جهت بررسی میزان بیان پمپ‌های خروج و نقش آن‌ها در ۲۰ جدایه دارای مقاومت چندگانه و مقاومت به لووفلوکساسین بومی ایزوله شده از بیماران بستری در بیمارستان، بیان ژن‌های *mexE* و *mexC* در نظر گرفته شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

سلول‌های سودوموناس *اِثروجینوزا* رشد کرده در لوریا برتانی (LB)^۳ در ۱۲ ساعت رشد با جذب ۵.۵ در طول موج ۵۵۰

⁵ Enzyme Mix

⁶ Stabilizer

⁷ Housekeeping

¹ Multidrug-resistant

² Quantitative real-Time PCR

³ Luria-bertani

⁴ Random hexamer

(کنترل ΔC_T -نمونه $\Delta C_T = \Delta C_T$) مورد محاسبه قرار گرفت. میزان بیان نسبی هر ژن در گروه غیر حساس در مقایسه با گروه-های حساس محاسبه شد (pfaffl 2001).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده.

Table1. Sequence of primers.

Target gene	Oligonucleotide sequences (5'-3')	Product size(bp)
<i>mexC</i>	F: GTGCTGTTTCGAGGCGCAG R: TCCTGCTGGCTGACCGC	73 bp
<i>mexE</i>	F: CCACCCTGATCAAGGACGAAG R: CGGTAGACGGTCTTGTTCG	90 bp
16S rRNA	F: CAGCTCGTGTCTGAGATGT R: CGTAAGGGCCATGATGACTT	150 bp

تجزیه و تحلیل نتایج

تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده از بررسی‌های فنوتیپی با نرم افزار SPSS انجام شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون One-way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقادیر p-value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شدند. مقایسه‌ی بیان ژن‌ها در مقایسه با سویه کنترل مثبت به کمک آزمون تی انجام گرفت. تحلیل‌ها در نرم افزار GraphPad prism نسخه‌ی ۱۰.۱.۲ انجام گرفت. مقادیر p-value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان حلت معنی‌دار در نظر گرفته شده است. به صورت اختصاصی، مقادیر p-value کمتر از ۰/۰۵ با *، کمتر از ۰/۰۱ با **، کمتر از ۰/۰۰۱ با *** و کمتر از ۰/۰۰۰۱ با **** نمایش داده شده است.

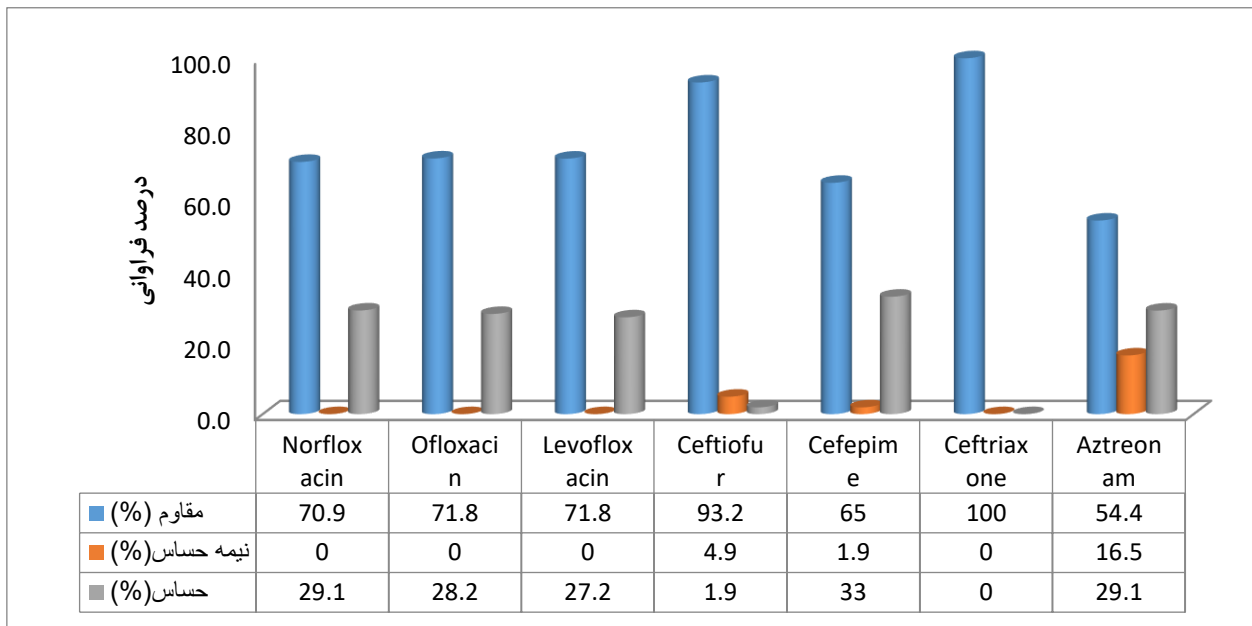
نتایج

در کل ۱۳۰ نمونه بالینی بررسی شده، ۱۰۳ نمونه حاوی سودوموناس *اِثروجینوزا* بودند. به طور خلاصه تعداد باکتری‌های

جداشده از بخش‌ها و نمونه‌های بالینی مختلف در جدول ۲ و ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که بیشترین نمونه‌ها مربوط به ICU با ۲۷ درصد (۲۸ مورد) و سپس بخش اورولوژی و داخلی با ۱۶/۵ درصد (۱۷ مورد) در مقام دوم فراوانی قرار گرفتند. از برخی از بخش‌ها در بازه زمانی بررسی شده شامل کبد و گوارش، پوست و آزمایشگاه مرکزی فقط یک نمونه ارسال شده بود. از کل نمونه‌های جمع‌آوری شده، ۴۰/۸ درصد (۴۲ نمونه) مربوط به ادرار، ۳۴ درصد (۳۴ مورد) مربوط به ترشحات و ۱۱/۷ درصد (۱۲ مورد)، نمونه‌های مربوط به تراشه بودند.

نتایج آزمون‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی

جهت بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های سودوموناس *اِثروجینوزا* از چهار گروه مختلف، دیسک‌های سفپیم، آزترونام، نورفلوکساسین، لووفلوکساسین، افلوکساسین، سفتیوفور و سفتریاکسون مطابق با CLSI انتخاب شدند. نتایج به دست آمده نیز باتوجه به جدول استاندارد CLSI از لحاظ مقاوم، حساس و یا

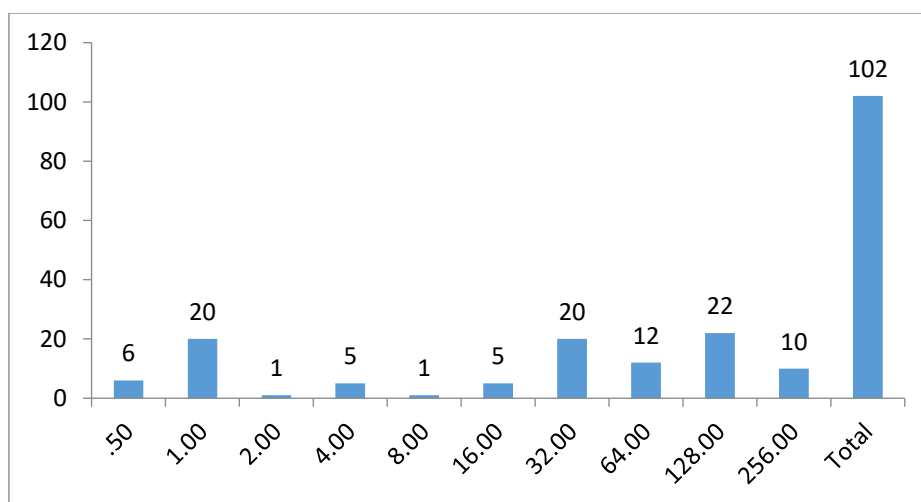


شکل ۱. درصد فراوانی ایزوله‌های سودوموناس ائروجینوزا حساس، مقاوم و نیمه حساس.

Figure1. Percentage of sensitive, resistant, and intermediate *P. aeruginosa* isolates.

هم و در حدود ۷۱ درصد مشاهده شد. بیشترین مقاومت بینابینی در سودوموناس ائروجینوزا به آزترئونام با ۱۶/۵ درصد مشاهده شد. شکل ۱ نیز نمودار مربوط به حساسیت، مقاومت و حساسیت بینابینی را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در بین جدایه‌های سودوموناس ائروجینوزا را نشان می‌دهد.

نیمه حساس بودن گزارش شد. تمامی جدایه‌های بالینی نسبت به سفتریاکسون مقاوم بودند و ۹۳ درصد جدایه‌ها به سفتیوفور (دو آنتی‌بیوتیک مربوط به سفالوسپورین‌ها) مقاومت نشان دادند. ۶۵ و ۵۴/۴ درصد ایزوله‌ها به ترتیب به سفپیم و آزترئونام مقاومت نشان دادند. در گروه فلوروکینولون‌ها شامل نورفلوکساسین، لووفلوکساسین، افلوکساسین، مقاومت نزدیک به



شکل ۲. نمودار مربوط به نتایج MIC.

Figure 2. Graph showing the MIC results.

شناسایی ایزوله‌های MDR

برای بررسی سویه‌های MDR، همانطور که در قسمت روش‌ها ذکر شد، مقاومت به حداقل یک عامل ضد میکروبی در سه گروه مورد بررسی قرار گرفت. آنالیزهای انجام شده نشان داد که از ۱۰۳ جدایه بالینی *سودوموناس ائروجینوزا*، ۵۴ نمونه با درصد فراوانی ۵۳/۴ درصد، مربوط به سویه‌های MDR بودند و ۴۹ نمونه با درصد فراوانی ۴۷/۶ درصد سویه‌های غیر MDR بودند.

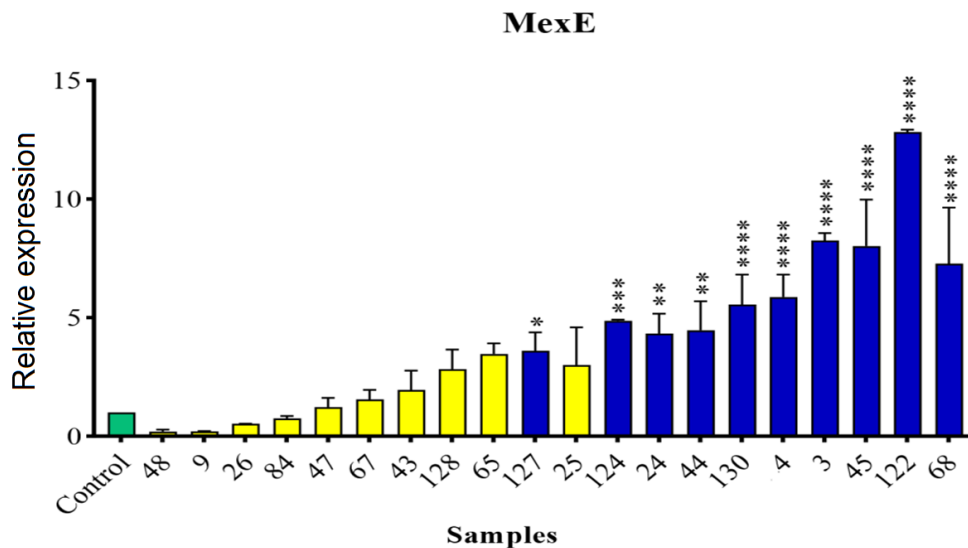
نتایج مربوط به MIC

برای بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی نسبت به لووفلوکساسین، آزمون MIC با روش رقت سازی در آگار انجام شد. نتایج در جدول و شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده شد، حداقل غلظت مهارکننده لووفلوکساسین در ۲۲ ایزوله (۲۱/۵ درصد)، معادل ۱۲۸ µg/ml بودند و فقط یک ایزوله با غلظت ۸ µg/ml مهار شد.

بررسی بیان پمپ خروج MexE و MexC

برای بررسی بیان پمپ‌های خروج MexE و MexC ۱۸ نمونه‌های

دارای مقاومت چندگانه با MIC بالای ۴ µg/ml و نتایج آنتی-بیوگرام که مقاومت به لووفلوکساسین را نشان می‌داد، انتخاب شدند. دو ایزوله حساس و سویه استاندارد برای ارزیابی بیان ژن و معنادار بودن هم انتخاب شدند. برای اطمینان از عدم حضور پیک‌های غیر اختصاصی برای پرایمرهای استفاده شده در مطالعه، آنالیز منحنی ذوب اجرا شد و دمای ذوب نیز برای *mexE* و *mexC* در محدوده ۸۵ قرار داشت. تغییرات مربوط به بیان ژن *mexE* در باکتری‌های مختلف بر مبنای مقایسه نسبی تغییرات آنها با سویه استاندارد *سودوموناس ائروجینوزا PAOI* سنجیده شد. بررسی نتایج نشان داد که اکثر ایزوله‌های انتخاب شده با نتایج MIC مقاوم نشان داده شدند، افزایش بیان نیز داشتند که این افزایش از نظر آماری معنادار بود ($p\text{-value} \leq 0.05$) دو سویه باکتریایی شماره ۲۶ و ۹ که در بررسی MIC حساسیت نشان داده بودند، کاهش بیان مشاهده شد که این کاهش از نظر آماری معنادار بود. با این حال ایزوله‌هایی نیز بودند که مقاوم به لووفلوکساسین بوده ولی در بررسی دو پمپ افزایش بیان نشان ندادند که این مسئله می‌تواند مربوط به سایر مکانیسم‌های مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک مربوطه باشد.

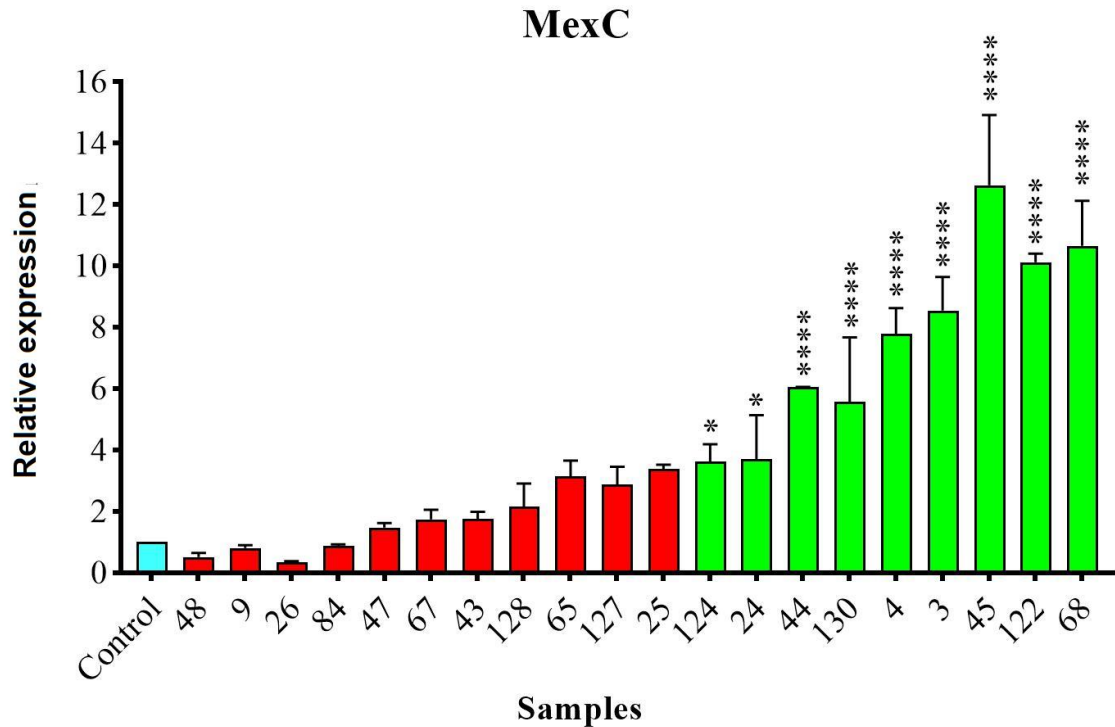


شکل ۳. توزیع بیان ژن *mexE* در ایزوله‌های مقاوم به لووفلوکساسین *سودوموناس ائروجینوزا* در مقایسه با دو ایزوله حساس (شماره ۹ و ۲۶) و سویه استاندارد به عنوان کنترل. مقادیر p-value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان حالت معنی‌دار در نظر گرفته شده است. به صورت اختصاصی، مقادیر p-value کمتر از ۰/۰۵ با *، کمتر از ۰/۰۱ با **، کمتر از ۰/۰۰۱ با *** و کمتر از ۰/۰۰۰۱ با **** نمایش داده شده است.

Figure 3. Distribution of *mexE* gene expression in levofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates compared to two sensitive isolates (numbers 9 and 26) and the standard strain as a control. p-values less than 0.05 are indicated by *, and less than 0.01 by **, and less than 0.001 by ***, and less than 0.0001 by **** the result are shown in the figure.

میدهد. نتایج نشان می‌دهد که از ۱۸ ایزوله مقاوم بررسی شده، ۹ (۴۵ درصد) جدایه با بیان ژن معنادار بودند. در اغلب نمونه‌های باقی مانده گرچه افزایش بیان ژن مشاهده شد، ولی معنی‌دار نبود.

شکل شماره ۴ نیز توزیع بیان ژن *mexC* در ایزوله‌های مقاوم به لووفلوکساسین *Sudomonas auruginosa* در مقایسه با دو جدایه حساس (شماره ۹ و ۲۶) و سویه استاندارد به عنوان کنترل نشان



شکل ۴. توزیع بیان ژن *mexC* در ایزوله‌های مقاوم به لووفلوکساسین *Sudomonas auruginosa* در مقایسه با دو ایزوله حساس (شماره ۹ و ۲۶) و سویه استاندارد به عنوان کنترل. مقادیر p-value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان حالت معنی‌دار در نظر گرفته شده است. به صورت اختصاصی، مقادیر p-value کمتر از ۰/۰۵ با *، کمتر از ۰/۰۱ با **، کمتر از ۰/۰۰۱ با *** و کمتر از ۰/۰۰۰۱ با **** نمایش داده شده است.

Figure 4. Distribution of *mexC* gene expression in levofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates compared to two sensitive isolates (numbers 9 and 26) and the standard strain as a control. p-values less than 0.05 are indicated by *, less than 0.01 by **, and less than 0.001 by ***, and less than 0.0001 by ****. The data are presented in the figure.

جدول ۲. جدول فراوانی نمونه‌های جدا شده از بخش‌های مختلف بیمارستان.

Table 2. Frequency table of samples isolated from different hospital sections.

بخش‌های مختلف بیمارستان	فراوانی	درصد فراوانی (%)
ICU	۲۸	۲۷/۲
علوم اعصاب بالینی	۲	۱/۹
عفونی	۶	۵/۸
ارولوژی	۱۷	۱۶/۵
جراحی عمومی	۴	۳/۹
کبد و گوارش	۱	۱
سوختگی مردان	۲	۱/۹
اورژانس	۶	۵/۸
سوختگی زنان	۵	۴/۹
CCU	۳	۲/۹
پوست-آنژیوگرافی پریفرال	۱	۱
ریه	۳	۲/۹
داخلی	۱۷	۱۶/۵
مسمومین	۱	۱
آزمایشگاه مرکزی-سرپایی	۱	۱
ارتوپدی	۲	۱/۹
گوش، حلق و بینی	۲	۱/۹
اتاق عمل مرکزی	۲	۱/۹
کل	۱۰۳	۱۰۰

جدول ۳: جدول فراوانی جدایه‌های سودوموناس آئروجینوزا از نمونه‌های بالینی.

Table 3: Frequency table of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical samples.

نمونه بالینی	فراوانی	درصد فراوانی (%)
تراشه	۱۲	۱۱/۷
ترشحات	۳۵	۳۴
کشت ادرار	۴۲	۴۰/۸
مایعات بدن	۵	۴/۹
کشت خون	۴	۳/۹
زخم زانو	۱	۱
کاتتر	۳	۲/۹
بیوپسی	۱	۱
کل	۱۰۳	۱۰۰

بحث

مربوط به سویه‌های MDR بودند و ۴۹ نمونه با درصد فراوانی ۴۷/۶ درصد سویه‌های غیر MDR بودند. این نتیجه با بررسی بازقندی و همکاران که میزان MDR را حدود ۵۶ درصد و جهرمی و همکاران که ۵۸/۷ درصد سویه‌ها را از نوع MDR گزارش کرده بودند، مطابقت داشت (۲۱-۲۴).

در سال ۲۰۱۷، روستینی^۲ و همکارانش میزان مقاومت به سفالوسپورین‌ها را در ۹۶ سویه *سودوموناس ائروجینوزا* جدا شده از بخش‌های مختلف بیمارستانی، بین ۲۶ تا ۴۴ درصد گزارش کردند. بیشترین میزان مقاومت، مشابه تحقیق حاضر مربوط به سفتریاکسون بود. همین مطالعه مقاومت به کینولون‌ها را در حدود ۲۱ تا ۳۲ درصد و حدود ۳۷/۸ درصد سویه‌ها را MDR اعلام کرد که به مراتب کمتر از مقدار گزارش شده در مطالعه فعلی است (۲۵). دلیل این تفاوت می‌تواند به علت تفاوت در سیاست‌های سیستم درمانی در تجویز آنتی‌بیوتیک و مقدار آن در بیماران باشد. به نظر می‌رسد سیستم درمان در کشورهای غربی در تجویز آنتی-بیوتیک‌های طیف گسترده جانب احتیاط بیشتری را رعایت کرده و جز در موارد بیماری‌های شدید از مصرف بی‌رویه دارو جلوگیری می‌کنند. بنابراین فشار آنتی‌بیوتیکی و بالطبع آن بروز مقاومت در باکتری‌ها کاهش می‌یابد.

در سال ۲۰۱۸، مطالعه‌ای در اسپانیا به بررسی عفونت‌های اداری *سودوموناس ائروجینوزا* در طی سال‌های متمادی پرداخت. نتایج نشان داد که میزان مقاومت به سفتازیدیم از ۱۷/۲ درصد در سال ۲۰۱۳ به ترتیب روند نزولی داشته به طوری که ۹۶/۲ درصد در سال ۲۰۱۴، ۱۰۰ درصد در سال ۲۰۱۵، ۸۶/۷ درصد در سال ۲۰۱۶ و ۸۲/۹ درصد در سال ۲۰۱۷ گزارش شد. همچنین میزان مقاومت به کینولون‌ها در طی همه این سالها بالاتر از ۹۰ درصد بوده است. (۲۶). این نتایج با بررسی تحقیق حاضر در افزایش میزان مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سوم مطابقت ندارد. برعکس گزارش‌های به ثبت رسیده از کشور ما، شاهد کاهش میزان مقاومت در کشورهای اروپایی هستیم که به دلایل متعدد از جمله کنترل عفونت در بیمارستان‌ها و بخش‌ها با مداخلات ساده، عدم تجویز بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و بررسی مقاومت باکتری‌ها پیش از تجویز به بیماران، این روند رو به کاهش است.

در مطالعه مشترک در سال ۲۰۱۹ بین سه کشور اروپایی، ۵۳ بیمار با علائم پنومونی ناشی از ونتیلاتور مورد بررسی قرار گرفتند. از بین این سویه‌ها ۳۰/۲ درصد MDR بودند بیشترین میزان مقاومت به ایمپنم و سیپروفلوکساسین گزارش شد. در این

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *سودوموناس ائروجینوزا* به یک مشکل جهانی تبدیل شده است. وجود چندین فاکتور بالقوه بیماری‌زا، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کاربردی در درمان بالینی و به ویژه ظهور سویه‌های MDR، نگرانی از این باکتری را تشدید کرده است. توانایی آنها در انتقال ژن‌های مقاومت به باکتری‌های دیگر مانند خانواده *انتروباکتریاسه* و سایر باکتری‌های غیر تخمیری گرم منفی (مانند گونه‌های *اسینتوباکتر* و *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*)^۱، آنها را به موضوع بررسی دقیق‌تر در تحقیقات علمی تبدیل کرده است (۱۵). به دلیل اهمیت *سودوموناس ائروجینوزا* در عفونت‌های انسانی، مطالعات زیادی در ایران و جهان در مورد مقاومت ایزوله‌های بالینی این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت انجام شده است (۱۶-۱۹).

نتایج بررسی نمونه‌های بالینی بدست آمده از بخش‌های مختلف بیمارستان امام رضا (ع) نشان داد که بیشترین سویه‌های جدا شده مربوط به بخش ICU (۲۷/۱ درصد) و سپس داخلی و اورولوژی (۱۶/۵ درصد) بوده که مشابه نتیجه میرباقری و همکارانش در بیمارستان فوق به مدت یکسال بوده است (۲۰). این نتایج با مطالعه جهرمی و همکارانش در اردبیل مطابقت داشت. در مطالعه جهرمی و همکاران نیز بیشترین سویه‌ها از بخش ICU جدا سازی شده بود (۳۲/۱ درصد) و به دنبال آن بخش داخلی (۳۱ درصد)، اورژانس (۱۶/۶ درصد)، نورولوژی (۱۷/۹ درصد) و اطفال (۲/۴ درصد) گزارش شد (۲۱).

نتایج آنتی‌بیوگرام نشان داد که تمامی جدایه‌ها نسبت به سفتریاکسون مقاوم بودند و ۹۳ درصد جدایه‌ها به سفتیوفور مقاومت نشان دادند. میزان مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سه و چهار در این مطالعه از مطالعه رضایی و همکاران در سال ۲۰۱۶ بیشتر بود. به طوریکه میزان مقاومت را نسبت به سفالوسپورین-های نسل سوم در حدود ۳۶ درصد گزارش کردند (۲۲). علت این تفاوت می‌تواند به تعداد بیماران و یا روش‌های مورد بررسی مقاومت مرتبط باشد.

۶۵ و ۵۴/۴ درصد ایزوله‌ها به ترتیب به سفپیم و آزترونام مقاومت نشان دادند. این میزان افزایش قابل ملاحظه‌ای در مقاومت سویه‌ها نسبت سفالوسپورین‌های نسل سه و چهار و فلوروکینولون‌ها در مقایسه با مطالعات سایر شهرهای ایران نشان می‌دهد. دلیل آن می‌تواند به میزان فشار آنتی‌بیوتیکی و نوع ایزوله‌های مورد بررسی باشد. آنالیزهای انجام شده نشان داد که از ۱۰۳ جدایه بالینی در *سودوموناس ائروجینوزا*، ۵۴ نمونه با درصد فراوانی ۵۳/۴ درصد

² Rustini

¹ *Stenotrophomonas maltophilia*

آماری معنی‌دار نبود. این یافته ممکن است منعکس کننده ناهمگونی در مکانیسم‌های مقاومت باشد، و نشان می‌دهد که در حالی که پمپ‌های جریان یک جزء حیاتی مقاومت هستند، ممکن است با عوامل دیگری مانند جهش‌های محل هدف (به عنوان مثال، در *gyrA* یا *parC*)، کاهش نفوذپذیری غشای خارجی، یا غیرفعال‌سازی آنزیمی به صورت هم‌افزایی عمل کنند (۳۴-۳۶). همچنین ممکن است مکانیسم‌های پس از رونویسی یا تنظیمی بر تأثیر عملکردی پمپ‌های جریان در این جدایه‌ها تأثیر بگذارد (۳۷-۳۸).

قابل ذکر است، جدایه‌های ۹ و ۲۶ که از نظر فنوتیپی به لووفلوکسازین حساس بودند ($MIC < 4$) میکروگرم در میلی‌لیتر، افزایش بیان ژن *mexE* یا *mexC* را نشان ندادند. این مشاهدات ویژگی دخالت پمپ جریان در مقاومت را تقویت می‌کند و نشان می‌دهد که بیان بیش از حد آنها یک مشخصه پایه برای همه سویه‌های سودوموناس *اثروجینوزا* نیست، بلکه پاسخی به فشار انتخابی یا سازگاری ژنتیکی در جمعیت‌های مقاوم است (۳۹).

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، مقاومت بالایی نسبت به آنتی-بیوتیک‌ها در ایزوله‌های بیمارستانی در نمونه‌های بیمارستان امام رضا در بازه زمانی مشخص، مشاهده شد. این مسأله در درمان عفونت‌های بیمارستانی مشکلاتی عدیده‌ای را برای سیستم بهداشت ایجاد کرده است. از طرف دیگر شیوع بالای سویه‌های MDR در نمونه‌ها، افزایش هر چه بیشتر این ایزوله‌ها را در نمونه‌های بیمارستانی نشان می‌دهد که معضل درمان‌های عفونت‌های بیمارستانی را بالا برده است. بررسی بیان دو پمپ خروج *MexC* و *MexE* و میزان مقاومت در برخی از سویه‌های سودوموناس *اثروجینوزا*ی جدا شده از نمونه‌ها در ایجاد مقاومت به فلوروکینولون‌ها و کمک بالقوه به فنوتیپ‌های MDR به طور معنی‌داری نشان داده شده است. در کل مطابق نتایج مشاهده شده در این مطالعه می‌توان بر ماهیت چند عاملی مقاومت ضد میکروبی در سودوموناس *اثروجینوزا* تاکید داشت. تحقیقات بیشتر، از جمله ارزیابی عوامل تعیین‌کننده مقاومت اضافی و مسیرهای تنظیمی، برای روشن شدن جامع مکانیسم‌های مقاومت و اطلاع‌رسانی استراتژی‌های درمانی مؤثرتر، ضروری می‌باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از شرکت داروسازی تولید دارو به دلیل در اختیار قرار

بررسی نیز میزان مقاومت به کینولون‌ها بیش از سایر گروه‌های آنتی‌بیوتیکی بود (۲۸، ۲۷).

نقش پمپ‌های خروجی مانند *MexCD-OprJ*، *MexAB-OprM*، *MexXY* و *MexEF-OprN* که آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله کینولون‌ها، سفالوسپورین‌ها، کارباپنم‌ها، آمینوگلیکوزیدها و مواد سمی را از سلول خارج می‌کند در مقاومت سودوموناس *اثروجینوزا* به اثبات رسیده است. در این پژوهش بیان دو ژن مربوط به پمپ خروج *MexE* و *MexC* جهت بررسی انتخاب شدند. نتایج Real time PCR نشان داد که سویه‌های مقاوم میزان بیان بیشتری نسبت به سویه‌های حساس نشان دادند. توزیع بیان ژن *mexE* و *mexC* در ایزوله‌های مقاوم به لووفلوکسازین سودوموناس *اثروجینوزا* در کنار سویه‌های MDR به ترتیب در ۱۱ و ۹ جدایه معنی‌دار بود، ولی در بقیه نمونه‌ها با اینکه افزایش در بیان نشان داده شده، معنی‌دار نبود. همچنین دو جدایه (شماره ۹ و ۲۶) با MIC کمتر از ۴ که حساس به آنتی‌بیوتیک بودند افزایش بیان در پمپ *mexE* و *mexC* نشان داده نشده است. نتایج بررسی بیان مطالعه حاضر با جمال و همکاران مشابهت داشت. در هر دو مطالعه میزان بیان دو ژن *MexE* و *MexC* در سویه‌های MDR نسبت به کنترل بیشتر است. به طوری که به نظر می‌رسد این دو ژن نقش اساسی در ایجاد الگوی MDR باکتریایی دارند (۲۹).

نتایج به دست آمده از بیان ژن‌های این مطالعه مشابه با بررسی Terzi و همکاران در سال ۲۰۱۴ بود. در بررسی آنها مشخص شد که میزان بیان دو ژن *MexE* و *MexC* در سویه‌های مقاوم به کینولون بالاتر از سایرین است. مشابه آنچه که در این بررسی به دست آمد میزان بیان ژن *MexC* در مقایسه با *MexE* بیشتر بود (۳۰).

یافته‌های مطالعه حاضر بینش‌های مهمی را در مورد نقش بیان ژن پمپ خروجی به‌ویژه *mexE* و *mexC* در مکانیسم‌های مقاومت سودوموناس *اثروجینوزا*، به ویژه در رابطه با مقاومت به لووفلوکسازین و پروفایل‌های مقاوم به چند دارو (MDR) ارائه می‌کند. در بین جدایه‌های مقاوم به لووفلوکسازین و MDR سودوموناس *اثروجینوزا*، بیان بیش از حد قابل توجهی ژن‌های *mexE* و *mexC* به ترتیب در ۱۱ و ۹ جدایه مشاهده شد. این نشان می‌دهد که ارتباط قوی بین افزایش تنظیم پمپ جریان و فنوتیپ‌های مقاومت وجود دارد، که نشان می‌دهد بیان بیش از حد سیستم‌های جریان *MexEF-OprN* و *MexCD-OprJ* می‌تواند به طور قابل توجهی به کاهش تجمع داخل سلولی فلوروکینولون‌ها و سایر عوامل ضد میکروبی کمک کند (۳۱-۳۳). جالب توجه است، در زیر مجموعه‌ای از جدایه‌ها، اگرچه سطوح بیان ژن *mexE* و *mexC*، افزایش یافته بود، اما این افزایش از نظر

صمیمانه قدردانی می‌گردد.

دادن پودر آنتی‌بیوتیک و همچنین از کلیه عوامل محترم بیمارستان امام رضا (ع) بابت در اختیار گذاشتن نمونه‌های بالینی،

References

1. Patel, J, Sharma, M, & Rao, R. Antimicrobial resistance. Impacts, challenges, and future prospect. *Curr Opin Pharmacol.* 2024;72;102547. doi:10.1016/j.coph.2024.102547
2. Saharman Y.R, Katuniawati, A, Severin J.A, Verbrugh HA. Infections and antimicrobial resistance in intensive care units in lower middle income countries. *Antimicrob Resist Infect Control.* 10, 22(2021). doi: /10.1186/s13756-020-00871-x
3. Nathwani D, Raman G, Sulham K, Gavaghan M, Menon V. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2014;3(1):32. doi:10.1186/2047-2994-3-32.
4. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018 Mar;18(3):318–27. doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
5. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):582–610. doi:10.1128/CMR.00040-09
6. Venter H, Mowla R, Ohene-Agyei T, Ma S. RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. *Front Microbiol.* 2015;6:377. doi:10.3389/fmicb.2015.00377
7. Alvarez-Ortega C, Olivares J, Martínez JL. RND multidrug efflux pumps: what are they good for? *Front Microbiol.* 2013;4:7. doi:10.3389/fmicb.2013.00007
8. Morita Y, Komori Y, Mima T, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. Construction of a series of mutants lacking all of the four major *mex* operons for multidrug efflux pumps or possessing each one of the operons from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: MexCD-OprJ is an inducible pump. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;202(2):139-143. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10794.x.
9. Fetar H, Gilmour C, Klinoski R, Daigle DM, Dean CR, Poole K. MexEF-OprN multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: Regulation by the MexT activator in response to nitrosative stress and chloramphenicol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(5):2062-2071. doi: 10.1128/AAC.00830-10.
10. Aendekerk S, Ghysels B, Cornelis P, Baysse C. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology.* 2002;148:2371-81.
11. Wolter DJ, Smith-Moland E, Goering RV, Hanson ND, Lister PD. Multidrug resistance associated with *mexXY* expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Texas hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;50:43-50. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2004.05.004
12. Mesaros N, Glupczynski Y, Avrain L, Caceres NE, Tulkens PM, Van Bambeke F. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(3):378-386. doi: 10.1093/jac/dkl504.
13. 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. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(1):105-116. doi: 10.1128/AAC.45.1.105-116.2001.
14. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-281. doi:10.1111/j.14690691.2011.03570.x.
15. Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context.* 2018;7:1–12. doi:10.7573/dic.212527
16. Sader HS, Castanheira M, Duncan LR, Flamm RK. Antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from United States medical centers stratified by infection type: results from the International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) surveillance program, 2015–2016. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018;92(1):69–74. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2018.04.012
17. Jamal Z, Gholami M, Ebrahimzadeh MA, Goli HR. The role of MexCD-OprJ and MexEF-OprN efflux systems in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples. *Curr Microbiol.* 2023;80(7):221. doi:10.1007/s00284-023-03330-z
18. Mirzaei B, Bazgir ZN, Goli HR, Iranpour F, Mohammadi F, Babaei R. Prevalence of multi-drug resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated in clinical samples from Northeast of Iran. *BMC Res Notes.* 2020;13:1–6. doi:10.1186/s13104-020-05224-w
19. Rahbar M, Hamidi-Farahani R, Asgari A, Esmailkhani A, Soleiman-Meigooni S. Expression of RND efflux pumps mediated antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Microb Pathog.* 2021;153:104789. doi:10.1016/j.micpath.2021.104789
20. Mirbagheri SZ, Meshkat Z, Naderinasab M, Rostami S, Nabavinia MS, Rahmati M. Study on imipenem resistance and prevalence of blaVIM1 and blaVIM2 metallo-beta lactamases among clinical isolates of

- Pseudomonas aeruginosa* from Mashhad, Northeast of Iran. *Iran J Microbiol.* 2015;7(2):72–6. <http://ijm.tums.ac.ir>
21. Jahromi SIP, Mardaneh J, Sharifi A, Pezeshkpour V, Behzad-Behbahani A, Seyyedi N, et al. Occurrence of a multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in hospitalized patients in southwest of Iran: characterization of resistance trends and virulence determinants. *Jundishapur J Microbiol.* 2018;11(4). doi:10.5812/ijm.57341
 22. Rezaei F, Saderi H, Boroumandi S, Faghihzadeh S. Relation between resistance to antipseudomonal β -lactams and ampC and mexC genes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Pathol.* 2016;11(1):47–53. <http://www.ijp.iranpath.org/>
 23. Bazghandi SA, Arzanlou M, Peeridogaheh H, Vaez H, Sahebkar A, Khademi F. Prevalence of virulence genes and drug resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens. *Jundishapur J Microbiol.* 2021;14(8).doi:10.5812/ijm.118452
 24. Vaez H, Salehi-Abargouei A, Ghalehnoo ZR, Khademi F. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Iran: A systematic review and metaanalysis. *J Glob Infect Dis.* 2018;10(4):212–217. doi:10.4103/jgid-113-17
 25. Rustini R, Jamsari J, Marlina M, Zubir N, Yuliandra Y. Antibacterial resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples at a General Hospital in Padang, West Sumatra, Indonesia. *Asian J Pharm Clin Res.* 2017;10(8):158–60. doi:10.22159/ajpcr.2017.v10i8.18539
 26. Jiménez-Guerra G, Heras-Cañas V, Gutiérrez-Soto M, Aznarte-Padial MP, Expósito-Ruiz M, Navarro-Marí JM, et al. Urinary tract infection by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: evolution of antimicrobial resistance and therapeutic alternatives. *J Med Microbiol.* 2018;67(6):790–797. doi:10.1099/jmm.0.000742
 27. Nasrin S, Hegerle N, Sen S, Nkeze J, Sen S, Permala-Booth J, et al. Distribution of serotypes and antibiotic resistance of invasive *Pseudomonas aeruginosa* in a multi-country collection. *BMC Microbiol.* 2022;22(1):13. doi:10.1186/s12866-021-02427-4
 28. Pérez A, Gato E, Pérez-Llarena J, Fernández-Cuenca F, Gude MJ, Oviaño M, et al. High incidence of MDR and XDR *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(5):1244–52. doi:10.1093/jac/dkz030
 29. Jamal Z, Gholami M, Ebrahimzadeh MA, Goli HR. The role of MexCD-OprJ and MexEF-OprN efflux systems in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples. *Curr Microbiol.* 2023;80(7):221. doi:10.1007/s00284-023-03330-z.
 30. Terzi HA, Kulah C, Ciftci IH. The effects of active efflux pumps on antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014;30:2681–7. doi: org/10.1007/s11274-014-1692-2
 31. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(1):20–51. z doi:10.1093/jac/dki171
 32. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(9):2242–6. doi:10.1128/aac.44.9.2242-2246.2000
 33. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2012;3:408. doi:10.3389/fmicb.2012.00408
 34. Spencer AC, Panda SS. DNA gyrase as a target for quinolones. *Biomedicines.* 2023;11(2):371. doi: 10.3390/biomedicines11020371
 35. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrA gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(6):1271–2. doi:10.1128/aac.34.6.1271
 36. Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis.* 1998;27(Suppl 1):S93–9. doi:10.1086/514909
 37. Liu Y, Zhu R, Liu X, Li D, Guo M, Fei B, Ren Y, You X, Li Y. Effect of piperine on the inhibitory potential of MexAB-OprM efflux pump and imipenem resistance in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog.* 2023;178:106397. doi: 10.1016/j.micpath.2023.106397.
 38. Linares JF, López JA, Camafeita E, Albar JP, Rojo F, Martínez JL. Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2005;187(4):1384–1391. doi: 10.1128/JB.187.4.1384-1391.2005.
 39. Srikumar R, Kon T, Gotoh N, Poole K. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug resistance efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a MexR-deficient clinical isolate. *J Antimicrob Chemother.* 1998;42(4):475–8. doi: 10.1128/aac.42.1.