



Investigation of MexAB-OprM and MexXY-OprM Efflux Pump Expression in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Saedeh Fetrati¹, Vajihe Sadat Nikbin^{*2}.

¹ Faculty of Biological Sciences, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran.

² Department of Bacteriology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Received: 2025/02/10

Accepted: 2025/05/17

Online Published: 2025/05/17

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a major causative agent of nosocomial and chronic infections, and its high resistance to antibiotics poses significant therapeutic challenges. One of the key mechanisms contributing to this resistance is the activity of multidrug efflux pumps, particularly MexAB-OprM and MexXY-OprM. This study aimed to investigate the expression of efflux pump genes *mexA* and *mexX* in multidrug-resistant (MDR) clinical isolates of *P. aeruginosa*. Clinical specimens were collected from patients at Imam Reza Hospital. Bacterial isolates were identified using standard culture and biochemical methods. Antibiotic susceptibility was evaluated against ceftazidime, chloramphenicol, piperacillin, colistin, and ceftazidime-clavulanic acid using disk diffusion, and minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined via agar dilution. The expression levels of *mexA* and *mexX* genes were quantified using real-time PCR (qRT-PCR). Antibiotic susceptibility testing showed that all isolates were resistant to ceftazidime. Resistance to tetracycline and colistin was 96.88% and 93.75%, respectively. Resistance rates to ceftazidime-clavulanic acid, chloramphenicol, and piperacillin were 85.42%, 70.83%, and 67.71%, respectively. More than 84% of isolates exhibited high MIC values. Gene expression analysis revealed a significant upregulation of *mexA* and *mexX* in several MDR isolates. The observed positive correlation between efflux pump overexpression and multidrug resistance suggests that these systems play a critical role in reducing antibiotic efficacy by actively exporting drugs from the bacterial cell. In conclusion, the high prevalence of efflux pump overexpression in MDR *P. aeruginosa* highlights the importance of targeting these mechanisms in future therapeutic strategies. The alarming levels of resistance observed in this study underscore the urgent need for the development of novel and effective antimicrobial approaches.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Multidrug Resistance, MexAB_OprM, MexXY_OprM, Hospital Infection, qRT-PCR.

Cite this article: Fetrati S, Nikbin VS. Investigation of MexAB-OprM and MexXY-OprM efflux pump expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2025;2(1):46-55.

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

Corresponding author: Vajihe Sadat Nikbin

Email: vsnikbin@yahoo.com

بررسی نقش پمپ‌های MexAB_OprM و MexXY_OprM در مقاومت چندگانه سودوموناس ائروجینوزا

سعیده فطرتی^۱، وجیهه سادات نیک‌بین^{۲*}

^۱ دانشکده علوم زیستی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران.

^۲ بخش باکتری‌شناسی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۲ پذیرش: ۱۴۰۴/۲/۲۷ انتشار آنلاین: ۱۴۰۴/۲/۲۷

چکیده

سودوموناس ائروجینوزا یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی و عفونت‌های مزمن است که به دلیل مقاومت بالای آن به آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان این باکتری با چالش‌های جدی همراه است. این مقاومت به واسطه مکانیسم‌های متنوعی ایجاد می‌شود که از میان آن‌ها، پمپ‌های خروج مقاوم چندگانه دارویی مانند MexAB_OprM MexXY_OprM نقش برجسته‌ای دارند. این مطالعه با هدف بررسی بیان ژن‌های مرتبط با این پمپ‌ها در سویه‌های مقاوم چندگانه سودوموناس ائروجینوزا انجام شده است. نمونه‌های بالینی از بیمارستان امام رضا (ع) جمع‌آوری شد و با استفاده از روش‌های کشت و شناسایی بیوشیمیایی، ایزوله‌های سودوموناس ائروجینوزا جداسازی گردید. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به سفتازیدیم، کلرامفنیکل، پیراسیلین، کلیستین و سفتازیدیم-کلاونیک اسید با روش انتشار از دیسک و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) با روش رقت‌سازی درآگار بررسی شد. سپس بیان ژن‌های *mexX* و *mexA* با تکنیک واکنش زنجیره پلیمرز در زمان واقعی (qRT-PCR) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تست آنتی‌بیوگرام نشان داد تمامی جدایه‌ها نسبت به سفتازیدیم مقاوم بودند. تتراسایکلین با ۹۶/۸۸ درصد و کلیستین با ۹۳/۷۵ درصد به ترتیب در مقام دوم و سوم قرار داشتند. مقاومت نسبت به سفتازیدیم-کلاونیک اسید، کلرامفنیکل و پیراسیلین به ترتیب ۸۵/۴۲ درصد، ۶۷/۷۱ درصد و ۷۰/۸۳ درصد بود. بالای ۸۴ درصد جدایه‌ها حداقل غلظت مهارکنندگی بالای ۵۱۲ نشان دادند. بیان ژن‌های *mexX* و *mexA* در برخی جدایه‌های MDR به‌طورمعناداری افزایش نشان داد. بنابراین همبستگی مثبت بین افزایش بیان ژن‌های پمپ‌های خروج و MDR بالا نشان می‌دهد که این پمپ‌ها با خروج دارو از سلول، اثربخشی درمان را مختل می‌کنند. همچنین میزان مقاومت بالا به آنتی‌بیوتیک استراتژی‌های درمانی جدید را می‌طلبد.

کلمات کلیدی: سودوموناس ائروجینوزا، مقاومت چندگانه دارویی، MexAB_OprM، MexXY_OprM، عفونت بیمارستانی،

qRT-PCR.

مقدمه

فعالیت این پمپ‌ها نه تنها در مقاومت ذاتی، بلکه در ایجاد مقاومت اکتسابی نیز نقش دارد و یکی از دلایل اصلی شکست درمان‌های آنتی‌بیوتیکی در عفونت‌های بیمارستانی ناشی از *سودوموناس ائروجینوزا* محسوب می‌شود. بنابراین شناخت این مکانیسم‌ها برای طراحی داروهای جدید و مقابله با مقاومت دارویی اهمیت زیادی دارد.

این پمپ‌ها با خروج آنتی‌بیوتیک‌ها از سلول و کاهش غلظت داروها در داخل باکتری، مقاومت بالایی در برابر درمان ایجاد می‌کنند. پمپ‌های MexAB_OprM و MexXY_OprM، به‌عنوان دو سیستم اصلی در ایجاد این مقاومت، نقش مهمی در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر کارباپنم‌ها، فلوروکینولون‌ها و سفالوسپورین‌ها دارند. این سیستم‌ها به باکتری اجازه می‌دهند تا حتی در مواجهه با آنتی‌بیوتیک‌های قوی نیز زنده بماند و تکثیر یابد (۵).

افزایش نگران‌کننده مقاومت *سودوموناس ائروجینوزا* به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و نرخ بالای مرگ و میر مرتبط با این عفونت‌ها، تحقیقات گسترده‌ای را برای شناسایی دقیق‌تر مکانیسم‌های مقاومت و ارائه روش‌های درمانی نوین ضروری کرده است. بررسی بیان ژن‌های مرتبط با پمپ‌های MexAB_OprM و MexXY_OprM می‌تواند اطلاعات مهمی درباره سازوکار مقاومت این باکتری ارائه دهد و به توسعه مهارکننده‌های هدفمند این سیستم‌ها کمک کند (۶). این پژوهش با هدف شناسایی میزان بیان ژن‌های *mexA* و *mexX* در سویه‌های مقاوم چندگانه *سودوموناس ائروجینوزا* انجام شد تا ضمن ارائه بینش عمیق‌تر از مکانیسم‌های مقاومت، به توسعه راهکارهای درمانی مؤثر کمک کند.

مواد و روش‌ها

این مطالعه با هدف بررسی بیان ژن‌های مرتبط با پمپ‌های خروج مقاوم چندگانه دارویی *mexA* و *mexX* در سویه‌های مقاوم چندگانه *سودوموناس ائروجینوزا* انجام شد. روش تحقیق شامل جمع‌آوری نمونه‌های بالینی، شناسایی باکتری، ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، و تحلیل بیان ژن با استفاده از تکنیک Real-Time PCR بود.

نمونه‌گیری و شناسایی جدایه‌های *سودوموناس ائروجینوزا*

سودوموناس ائروجینوزا^۱، یکی از مهم‌ترین باکتری‌های گرم منفی و هوازی، نقش کلیدی در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی ایفا می‌کند و به دلیل تطبیق‌پذیری بالا با محیط‌های مختلف، یکی از عوامل اصلی عفونت‌های مزمن در بیماران بستری در بیمارستان به شمار می‌رود (۱). این باکتری به‌ویژه در بیماران دارای نقص ایمنی^۲، افراد مبتلا به فیبروز کیستیک^۳، بیماران تحت درمان در بخش‌های مراقبت ویژه (ICU)^۴ و افرادی با سوختگی‌ها و زخم‌های مزمن بسیار خطرناک است (۲). عفونت‌های ناشی از این باکتری معمولاً به دلیل مقاومت ذاتی و اکتسابی بالای آن به آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان‌پذیری سختی دارند و چالش‌های بزرگی را در پزشکی ایجاد کرده‌اند (۳).

سودوموناس ائروجینوزا یکی از باکتری‌های گرم منفی با مقاومت ذاتی بالا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هاست. این مقاومت عمدتاً ناشی از وجود عوامل ژنتیکی، نفوذپذیری پایین غشای سلولی، توانایی تشکیل بیوفیلم و به‌ویژه وجود پمپ‌های خروج چندارویی از خانواده RND است (۴). این پمپ‌ها که شامل MexAB-OprM، MexXY-OprM، MexCD-OprJ و MexEF-OprN هستند، با خارج کردن داروها از سلول موجب کاهش غلظت داخل سلولی آن‌ها و در نتیجه کاهش اثر درمانی می‌شوند (۵).

ساختار پمپ‌های خروج از سه بخش تشکیل شده است: یک پروتئین پری‌پلاسمی فیوژن^۴ (PMFP)، یک پروتئین ناقل از خانواده RND (RNDt) و یک پروتئین کانال‌ساز در غشای خارجی (OMF)^۵. برای مثال، در پمپ MexAB-OprM، اجزای MexA، MexB و OprM به ترتیب این نقش‌ها را ایفا می‌کنند. این پمپ به‌طور دائمی بیان می‌شود و با دفع طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند β -لاکتام‌ها، پپراسیلین و کلرامفنیکل در مقاومت دارویی نقش دارد (۶).

پمپ MexXY-OprM نیز به مقاومت در برابر آمینوگلیکوزیدها کمک می‌کند و بیان آن تحت کنترل ژن‌های سرکوب‌گر مانند MexZ و سیستم‌های تنظیمی ParRS قرار دارد. در برخی سویه‌ها مانند PA7، این پمپ با OprA جفت می‌شود. همچنین پمپ MexCD-OprJ که علیه کلرامفنیکل، ماکرولیدها و فلوروکینولون‌ها فعال است، و MexEF-OprN که در شرایط خاص فعال شده و نقش مهمی در مقاومت به کارباپنم‌ها دارد، از دیگر سیستم‌های مهم خروج در این باکتری هستند.

⁴ Intensive Care Unit⁴ Preplasmic fusion protein⁵ Outer membrane factor¹ *Pseudomonas aeruginosa*² Immunodeficiency³ Cystic Fibrosis

معادل 10^5 cfu/ml از سوسپانسیون باکتریایی استفاده شد. بعد از یک شبانه روز گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، عدم رشد در هر کدام از غلظت‌ها به عنوان MIC (همچنین MBC) تعیین گردید.

استخراج RNA و سنتز cDNA

برای بررسی بیان ژن‌های *mexA* و *mexX*، استخراج RNA کل از ایزوله‌های منتخب سودوموناس *اثروجینوزا* انجام شد. استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA پارس توس (ایران) انجام شد. برای این منظور باکتری‌ها در محیط آبگوشتی لوریا برتانی (LB) ^۵ کشت داده شدند و بعد از ۱۲ ساعت گرماگذاری سانتی‌فیوژ شدند. سپس مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج انجام شد. برای بررسی خلوص RNA استخراج شده، میزان جذب نور در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد.

پس از تأیید کیفیت RNA، فرآیند سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA پارس توس (ایران) انجام شد. کیت سنتز شامل مخلوط بافر RT 2X، حاوی بافر RT 2X، ۱ میلی‌مولار مخلوط dNTP، ۸ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، الیگو d(t)16، هگزامر تصادفی^۶ به عنوان پرایمر و تثبیت کننده می‌باشد. مخلوط آنزیم^۷ نیز حاوی H-minus MMLV مقاوم در برابر حرارت، مهارکننده RNase و تثبیت کننده^۸ و آب DEPC می‌باشد. تمامی مواد همراه با RNA خالص و عاری از DNA مطابق دستورالعمل شرکت تولید کننده مخلوط و سنتز صورت گرفت. مخلوط واکنش تهیه شده جهت سنتز cDNA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه گرماگذاری شد. مرحله بعد در دمای ۴۷ سانتی‌گراد گرماگذاری به مدت ۶۰ دقیقه و سپس متوقف کردن واکنش ۵ دقیقه در ۸۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در نهایت محصول واکنش به مدت ۵ دقیقه روی یخ سرد شد. cDNA های بدست آمده تا زمان استفاده در دمای -۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (qRT-PCR) و بررسی بیان ژن‌های *mexA* و *mexX*

در مرحله نخست، نمونه‌های باکتریایی شامل ۱۰۰ جدایه از بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان امام رضا (ع) در مشهد تهیه شدند. نمونه‌ها از محل‌های مختلف عفونت شامل دستگاه تنفسی، ادراری، زخم‌های مزمن و سوختگی جمع‌آوری گردید. تمامی نمونه‌ها در آزمایشگاه با تست‌های بیوشیمیایی - شامل تولید اوره‌آز، سترات، اکسیداز، کاتالاز و آزمون‌های MRVP و تست تحرک تأیید شدند. همچنین از کشت اختصاصی سترمیاید آگار برای جداسازی و خالص سازی و گرماگذاری در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد جهت تأیید نهایی جدایه‌های سودوموناس *اثروجینوزا* استفاده شد. سودوموناس *اثروجینوزا* معمولاً کلنی‌هایی با ظاهر صاف، گرد و غالباً دارای رنگ سبز یا آبی به دلیل تولید پیوسین و پیوروردین تولید می‌کند.

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

پس از شناسایی ایزوله‌ها، بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش انتشار از دیسک^۱ روی محیط مولر-هینتون آگار (ایبرسکو، ایران) انجام شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده شامل دیسک آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم-کلاونیک اسید ($30/10 \mu g$)، سفنازیدیم ($30 \mu g$)، پیراسیلین ($30 \mu g$)، کلیستین ($10 \mu g$)، تتراسایکلین ($30 \mu g$) و کلرامفنیکل ($30 \mu g$) بودند. آزمون حساسیت مطابق دستورالعمل CLSI^۲ انجام شد و پس از یک شبانه روز گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری و نتایج مطابق CLSI^۳ تفسیر شد. سوبه‌های مقاوم چندگانه (MDR)^۴ بر اساس مقاومت به سه یا بیش از سه کلاس آنتی‌بیوتیک تعریف شدند.

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)^۴

جهت ارزیابی حداقل غلظت مهارتی (MIC) سفنازیدیم روی جدایه‌های سودوموناس *اثروجینوزا*، از روش رقت‌سازی در آگار انجام شد. این روش یکی از روش‌های استاندارد برای تعیین MIC یک آنتی‌بیوتیک در برابر یک باکتری است. که بر اساس تهیه رقت‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی بر روی محیط کشت جامد انجام می‌شود. در این مطالعه، حساسیت ۵۶ جدایه نسبت به سفنازیدیم با روش رقت‌سازی در آگار، بررسی شد. لازم به ذکر است که جهت تلقیح سوسپانسیون باکتریایی روی محیط آگار دار، ۵ میکرولیتر

⁵ Luria-bertani

⁶ Random hexamer

⁷ Enzyme Mix

⁸ Stabilizer

¹ Disk Diffusion

² Clinical & Laboratory Standards Institute

³ Multidrug resistance

⁴ Minimum inhibitory concentration

مدت ۲۰ ثانیه انجام شد. اطلاعات به دست آمده، با کمک نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۱۰ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج مطابق pfaffl با استفاده از میزان Ct در فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (کنترل ΔC_T - نمونه ΔC_T) محاسبه شد. داده‌های بیان ژن‌ها و میزان بیان نسبی ژن‌های *mexX* و *mexA* در سویه‌های مقاوم چندگانه با سویه‌های حساس مقایسه شد. تمامی داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری مناسب شامل تی تست و تحلیل واریانس (ANOVA) مورد ارزیابی قرار گرفتند تا ارتباط بین بیان ژن‌ها و مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشخص شود.

qRT-PCR با استفاده از مستر میکس سایبرگرین پارس توس (ایران) و پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *mexX* و *mexA* انجام شد (جدول ۱). ژن ۱۶S rRNA به عنوان کنترل داخلی برای نرمال‌سازی داده‌ها به کار رفت.

مخلوط واکنش شامل مستر میکس ۱۰ میکرولیتر، پرایمرهای پیشرو و پسرو (جدول ۱) هر کدام یک میکرولیتر، cDNA دو میکرولیتر بود که با آب مقطر به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. qRT-PCR توسط دستگاه Rotor-Gene Q 2.1.0.9 انجام 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 طویل‌سازی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده.

Table 1. Sequence of primers.

Target gene	Oligonucleotide sequences (5'-3')	Product size(bp)
<i>mexA</i>	F: ACCTACGAGGCCGACTACCAGA R: GTTGGTCACCAGGGCGCCTT	151 bp
<i>mexX</i>	F: TTCCTGCTGGGCTGCGAAGA R: AGCTCGCTGGTGATGCCGATAG	109 bp
16S rRNA	F: CAGCTCGTGTCGTGAGATGT R: CGTAAGGGCCATGATGACTT	150 bp

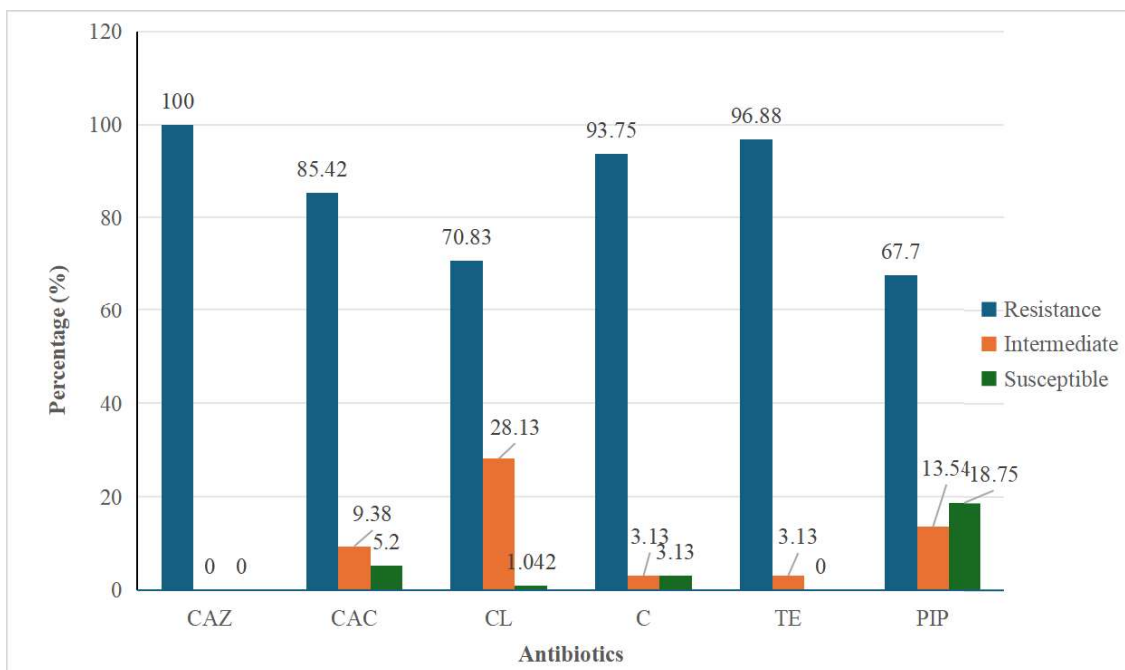
نتایج

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

در این مطالعه، تست MIC نشان داد که ۸۴/۹ درصد از جدایه‌ها، حداقل غلظت مهارکننده بالاتر از ۵۱۲ $\mu\text{g/ml}$ دارند که نشان‌دهنده مقاومت بالای این سویه‌ها نسبت به سفنازیدیم است. ۷/۵ درصد از ایزوله‌ها، MIC معادل ۶۴ $\mu\text{g/ml}$ داشتند که احتمالاً ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی و میزان بیان پمپ‌های خروج بوده است. تقریباً سه درصد جدایه‌ها حداقل غلظت مهارکننده ۵۱۲ $\mu\text{g/ml}$ و ۱۲۸ نشان دادند (شکل ۲).

نتایج مربوط به MDR نشان داد که ۵۳/۴ درصد جدایه‌ها مربوط به سویه‌های MDR و ۴۷/۶ درصد سویه‌ها غیر MDR بودند.

نتایج تست آنتی‌بیوگرام نشان داد که: ۱۰۰ درصد جدایه‌ها نسبت به سفنازیدیم مقاوم بودند. بعد از آن تتراسایکلین با ۹۶/۸۸ درصد و کلیستین با ۹۳/۷۵ درصد به ترتیب در مقام دوم و سوم قرار داشتند. مقاومت نسبت به سفنازیدیم-کلاوولانیک اسید، کلرامفنیکل و پیراسیلین به ترتیب ۸۵/۴۲ درصد، ۷۰/۸۳ درصد و ۶۷/۷۱ درصد بود. نمودار مربوط به حساسیت، مقاومت و حساسیت بینابینی را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در بین جدایه‌های سودوموناس *اثروجینوزا* در شکل ۱ نشان داده شده است.

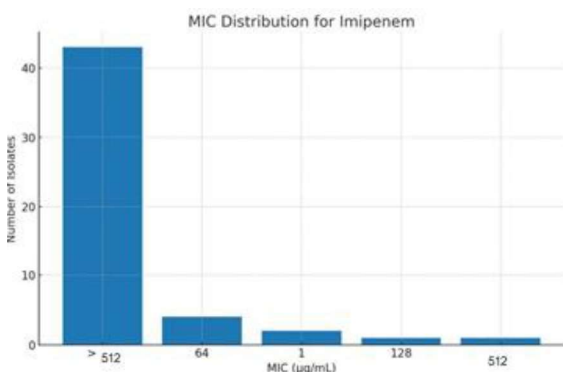


شکل ۱. نمودار مربوط به توزیع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های سودوموناس اثروجینوزا (شامل حساس، مقاوم و حساسیت بینابینی). CAZ: سفنازیدیم، CAC: سفنازیدیم + کلاوونیک اسید، C: کلیستین، PIP: پپراسیلین، TE: تتراسایکلین، CL: کلرامفنیکل.

Figure 1. Histogram representing the distribution of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates (susceptibility, resistance, and intermediate). CAZ: Ceftazidime; CAC: Ceftazidime + Clavulanic Acid; C: Colistin; PIP: Piperacillin; TE: Tetracycline; CL: Chloramphenicol.

بیان ژن mexX و mexA با روش qRT-PCR

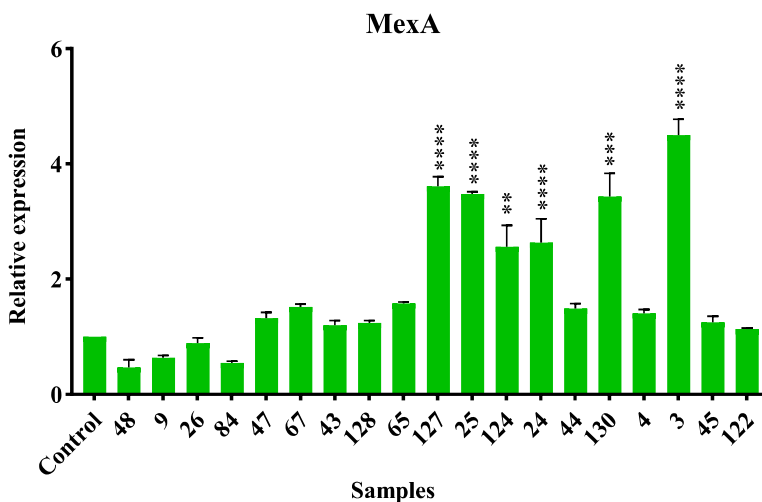
نشان داد که بیان ژن mexA در برخی از جدایه‌های مقاوم به سفنازیدیم ۳ تا ۴/۵ برابر افزایش یافته است.



شکل ۲. نمودار مربوط به نتایج MIC

Figure 2. Histogram representing the distribution of MIC results.

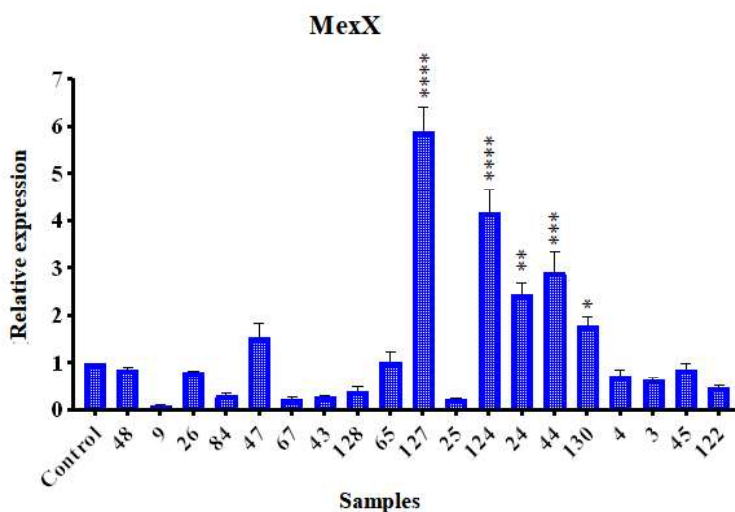
بیان پمپ‌های خروج MexX و MexA در نمونه‌های منتخب MDR انجام شد. در بررسی بیان ژن، آنالیز منحنی ذوب برای عدم حضور پیک‌های غیر اختصاصی پرایمرهای مورد استفاده، اجرا شد. تغییرات مربوط به بیان ژن mexE mexC در باکتری‌های مختلف بر مبنای مقایسه نسبی تغییرات آنها با سویه استاندارد سودوموناس اثروجینوزا PAO1 سنجیده شد. بررسی نتایج نشان داد که اکثر ایزوله‌های انتخاب شده با فنوتیپ MDR افزایش بیان در ژن mexA داشتند که این افزایش از نظر آماری معنادار بود (p-value ≤ 0.05) دو سویه باکتریایی شماره ۲۶ و ۹ که فنوتیپ MDR نداشتند (شکل ۳)، کاهش بیان مشاهده شد که این کاهش از نظر آماری معنادار بود. با این حال ایزوله‌هایی با فنوتیپ MDR نیز بودند که در بررسی دو پمپ افزایش بیان نشان ندادند که این مسئله می‌تواند مربوط به سایر مکانیسم‌های مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک مربوطه باشد. نتایج آنالیز بیان



شکل ۳. توزیع بیان ژن *mexA* در ایزوله‌های منتخب MDR سودوموناس ائروجینوزا. 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 *mexA* gene expression in MDR *P. aeruginosa* isolates. 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.

نتایج نشان داد که بیان نسبی ژن *mexX* در ۵ نمونه از ۲۰ نمونه MDR معنی‌دار بود که این نتیجه در نمونه‌های ۱۲۸، ۱۲۴، ۲۴ و ۴۴ دارای بالاترین سطح بیان معنی‌داری نسبت به سویه کنترل را نشان داد. بیشتر نمونه‌های MDR مورد بررسی در بیان ژن *mexX* افزایش چشمگیر نداشتند (شکل ۴).



شکل ۴. توزیع بیان ژن *mexX* در ایزوله‌های منتخب MDR سودوموناس ائروجینوزا. 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 *mexX* gene expression in MDR *P. aeruginosa* isolates. 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.

بحث

مختلف غلظتی انجام شد. درصد بالایی از جدایه‌ها (۸۶ درصد) که میزان MIC بالای ۵۱۲ داشتند را نشان داد. چنین افزایش مقاومتی در جدایه‌های ایرانی در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (۱۲-۱۰).

بررسی‌های مولکولی نشان داد که بیان ژن‌های *mexX* و *mexA* در برخی جدایه‌های MDR به‌طورمعناداری افزایش یافته است. به‌ویژه، بیان ژن *mexA* در برخی نمونه‌ها تا ۴/۵ برابر و ژن *mexX* تا ۶ برابر نسبت به نمونه کنترل افزایش داشت. این نتایج نشان می‌دهد که پمپ‌های خروج *MexAB-OprM* و *MexXY* نقش مهمی در مقاومت دارویی *سودوموناس ائروجینوزا* دارند. همبستگی مثبت بین افزایش بیان ژن‌های پمپ‌های خروج و MDR بالا نشان می‌دهد که این پمپ‌ها با خروج دارو از سلول، غلظت داخل سلولی آن را کاهش داده و اثربخشی درمان را مختل می‌کنند. همچنین جدایه‌هایی با فنوتیپ بالای MDR و بیان پایین این دو ژن مشاهده شد که نشان می‌دهد علاوه بر فعالیت پمپ‌های خروجی، مکانیسم‌های دیگری مانند کاهش نفوذپذیری غشای خارجی، تشکیل بیوفیلم و تولید آنزیم‌های غیرفعال‌کننده آنتی‌بیوتیک نیز می‌توانند در ایجاد این مقاومت نقش داشته باشند. از طرف دیگر جهش‌ها در نواحی تنظیمی یا پروموتور ژن‌ها می‌توانند باعث افزایش یا کاهش بیان آنها شوند (۱۳). غیر از عوامل ژنتیکی شرایط محیطی مانند غلظت آنتی‌بیوتیک، نوع محیط کشت، دما و pH، تفاوت‌های فیزیولوژیکی و تفاوت‌های اپی‌ژنتیکی می‌توانند بر بیان این ژن‌ها تأثیر بگذارند.

مطالعات متعددی در زمینه مقاومت دارویی در باکتری‌ها، به‌ویژه *سودوموناس ائروجینوزا*، انجام شده است. این باکتری به دلیل توانایی‌های خاص خود در توسعه مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و پمپ‌های خروج مانند *MexAB-OprM* و *MexXY-OprM*، از چالش‌های عمده در درمان‌های آنتی‌بیوتیکی به شمار می‌آید (۱۴-۱۶). در این راستا، پژوهش‌های مختلفی با هدف بررسی مکانیزم‌های مولکولی و ژنتیکی مقاومت دارویی و ارزیابی روش‌های آزمایشگاهی نظیر تست آنتی‌بیوگرام، تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و بررسی بیان ژن‌های مربوط به پمپ‌های خروج صورت گرفته است. نتایج این مطالعات اغلب با یکدیگر هم‌خوانی دارند و نشان‌دهنده مکانیزم‌های مشترک در مقاومت دارویی *سودوموناس ائروجینوزا* هستند. در زمینه تست آنتی‌بیوگرام، مطالعات متعدد مقاومت گسترده *سودوموناس ائروجینوزا* به آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر سفتازیدیم، ایمپنم و جنتامایسین را گزارش کرده‌اند. Smith و همکاران (۲۰۲۰) در پژوهشی به این نتیجه رسیدند که مقاومت *سودوموناس ائروجینوزا*

توسعه مکانیسم مقاومت دارویی در باکتری‌های گرم منفی تا حد زیادی تحت تأثیر سیستم‌های پمپ خروج دارو قرار دارد. این سیستم‌ها ترکیبات محلول را به خارج از سلول پمپ می‌کنند که باکتری‌ها را قادر می‌سازد با حذف مواد بالقوه مضر، محیط داخلی خود را تغییر دهند. این مواد شامل متابولیت‌ها، عوامل ضد میکروبی و مولکول‌های سیگنال سنجش حد نصاب هستند. در باکتری‌های گرم منفی مقاوم به چند دارو (MDR) که از نظر درمانی اهمیت دارند، میزان قابل توجهی از مقاومت دارویی وجود دارد که توسط ناقل‌های خروج دارو ایجاد می‌شود (۷ و ۸). نکته جالب توجه این‌که *mexA* در تمام ایزوله‌ها شناسایی شده است. تولید بیش از حد *mexAB-oprM* توسط *سودوموناس ائروجینوزا* نقش مهمی در تولید سویه‌های مقاوم به چند دارو دارد، زیرا پروتئین‌های همجوشی غشای پری‌پلاسمی (*MexA*، *MFP*، *MexX*، *MexC* و *MexF*) اجزای سیستم پمپ خروج دارو از نوع RND هستند. مقاومت دارویی ضد میکروبی به کینولون‌ها، ماکرولیدها، تتراسایکلین‌ها، لینکومایسین، کلرامفنیکل، نوویوسین و بتالاکتام‌ها به سیستم خروج دارو از *MexAB-OprM* مرتبط دانسته شده است (۹).

در این مطالعه، عملکرد سویه‌های باکتریایی *سودوموناس ائروجینوزا* که از بیمارستان امام رضا مشهد جمع‌آوری شدند، از طریق سه آزمایش انتشار در آگار، تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC) و واکنش زنجیره‌ای در زمان واقعی برای بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بیان ژن‌های *mexA* و *mexX* مرتبط با پمپ‌های خروج بررسی شد.

آزمایش آنتی‌بیوگرام برای تعیین حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف شامل سفتازیدیم، کلرامفنیکل، پیراسیلین، کلیستین و سفتازیدیم-کلانوتیک اسید صورت گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های *سودوموناس ائروجینوزا* جدا شده از نمونه‌های بالینی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی بسیار بالایی نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. یافته‌های حاصل از تست آنتی‌بیوگرام تأیید کرد که بیش از ۹۶ درصد از جدایه‌ها نسبت به تتراسایکلین و ۹۳ درصد نسبت به کلیستین مقاوم بودند. این میزان مقاومت، به‌ویژه برای کلیستین که به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک خط آخر در درمان عفونت‌های *سودوموناس* مقاوم استفاده می‌شود، بسیار نگران‌کننده است. زیرا که اکثر سویه‌ها دارای سطح بالای مقاومت این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است. نتایج آزمون MIC نیز برای ارزیابی غلظت‌های مهارکننده سفتازیدیم و شناسایی مقاومت دارویی در سطوح

نتیجه‌گیری

به طور کلی می‌توان گفت جدایه‌های سودوموناس *اِثروجینوزا* جدا شده از نمونه‌های بالینی مشهد، مقاومت آنتی‌بیوتیکی بسیار بالایی نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها نشان دادند. کمترین غلظت مهارت سفتازیدیم برای اکثر جدایه‌ها بالای ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد که بیانگر چالش‌های جدی در درمان عفونت‌های ناشی از *سودوموناس اِثروجینوزا* مقاوم به چند دارو می‌باشد. نقش پمپ‌های MexAB_OprM و MexXY_OprM به عنوان عوامل کلیدی مقاومت در برابر جدایه‌های MDR تأیید شد. بنابراین افزایش مقاومت به داروهایی که بیشتر اثر بخشی بالایی داشتند، نیازمند اقدامات فوری در مدیریت درمان و پیشگیری از گسترش عفونت است.

تقدیر و تشکر

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از حمایت‌ها و همکاری‌های مسئولان محترم بیمارستان امام رضا (ع) در فراهم آوردن نمونه‌های بالینی این مطالعه، صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند. همچنین از سرکار خانم دکتر شکرزاده به دلیل مشاوره‌های علمی راهگشا و مشارکت ارزشمند در مسیر اجرای این پژوهش، نهایت تشکر و سپاسگزاری را دارند.

References

- Li X-Z, Zhang L, Poole K. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000;45(4):433-6. <https://doi.org/10.1093/jac/45.4.433>
- Nature A, et al. Overexpression of MexAB-OprM due to mutations in MexR and NalC in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Microbiology*. 2023;4(6):20. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-00420-x>
- Johnson M, et al. The role of MexXY-OprM efflux pump and its regulation by MexZ in the development of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*. 2021;11(1):11800. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.11800>
- Brown L, et al. Mutations in MexR and MexZ regulate the efflux pumps MexAB-OprM and MexXY-OprM in *Pseudomonas aeruginosa*, contributing to antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019;3(7):14 <https://doi.org/10.1128/AAC.00307-19>.
- Nikaido H, Takatsuka Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2009;1794(5):769-81. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.10.004>

به سفالوسپورین‌های نسل سوم مانند سفتازیدیم و کارباپنم‌ها به دلیل تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز و حضور پمپ‌های خروج (مانند MexAB-OprM) است (۱۵). مشابه نتایج به دست آمده در این پژوهش، این مقاومت در سویه‌های بیمارستانی مشاهده شده است. Brown و همکاران (۲۰۱۹) نیز در مطالعه‌ای نشان دادند که جهش در ژن‌های MexZ و MexR، تنظیم‌کننده‌های پمپ‌های خروج، باعث افزایش بیان ژن‌های مقاومت دارویی شده است که این امر به مقاومت گسترده *سودوموناس اِثروجینوزا* در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها کمک می‌کند (۱۶). احمدی و همکاران (۱۳۹۸) در بیمارستان‌های مشهد گزارش کردند که سویه‌های *سودوموناس اِثروجینوزا* در ۶۰ درصد موارد نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم و در ۵۰ درصد موارد نسبت به کارباپنم‌ها مقاوم هستند. این مطالعه نیز مشابه نتایج به دست آمده در این پژوهش و علت این مقاومت‌ها را به وجود پمپ‌های خروج و جهش در ژن‌های تنظیم‌کننده MexR نسبت داده‌اند (۱۷).

محدودیت مطالعه هزینه بالای تکنیک qRT-PCR در ایران و عدم بررسی پمپ‌های دیگر درگیر در مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. بررسی سایر پمپ‌ها و همچنین بررسی مکانیسم‌های دیگر مانند کاهش نفوذپذیری غشا و تولید آنزیم‌های مقاوم می‌تواند دیدگاه جامع‌تری نسبت به استراتژی‌های درمانی فراهم کند.

- Dreier J, Ruggerone P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:66 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00660>
- Lee J, Kim H, Park S, Choi J, Lim D, Song W, et al. Increased MIC values for carbapenems and cephalosporins in *Pseudomonas aeruginosa* linked to MexAB-OprM overexpression. *Microbial Resistance*. 2018;4(8):17. doi:10.1016/j.micres.2018.04.017.
- Kareem SM. Emergence of mcr- and fosA3-mediated colistin and fosfomycin resistance among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Iraq. *Meta Gene*. 2020;25:100708. doi:10.1016/j.mgene.2020.100708.
- Kishk RM, Abdalla MO, Hashish AA, Nemr NA, El Nahhas N, Alkahtani S, Abdel-Daim MM, Kishk SM. Efflux MexAB-mediated resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with healthcare-associated infections. *Pathogens*. 2020;9(6):471. doi:10.3390/pathogens9060471.
- Ahmadi N, Salimizand H, Zomorodi AR, Abbas JE, Ramazanzadeh R, Haghi F, et al. Genomic diversity of β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Iran; the impact of global high-risk clones. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2024;23(1):5.
- Hocquet D, Vogne C, El Garch F, Vejux A, Gotoh N, Lee A, et al. MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to

- aminoglycosides. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2003;47(4):1371-5. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1371-1375.2003>
12. Fernández-Billón M, Llambías-Cabot AE, Jordana-Lluch E, Oliver A, Macià MD. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Biofilm*. 2023;5:100129. doi:10.1016/j.biofilm.2023.100129.
13. 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.
14. Johnson M, et al. The role of MexXY-OprM efflux pump and its regulation by MexZ in the development of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*. 2020;3(7):20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.12020>
15. Smith J, et al. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to third-generation cephalosporins and carbapenems due to the production of β -lactamases and efflux pumps. *Journal of Clinical Microbiology*. 2020;7:32. <https://doi.org/10.1128/JCM.00732-20>
16. Brown L, et al. Mutations in MexR and MexZ regulate the efflux pumps MexAB-OprM and MexXY-OprM in *Pseudomonas aeruginosa*, contributing to antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019;3(7):14 <https://doi.org/10.1128/AAC.00307-19>
17. Ahmadi N, Salimizand H, Zomorodi AR, Abbas JE, Ramazanzadeh R, Haghi F, et al. Genomic diversity of β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Iran; the impact of global high-risk clones. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2024;23(1):5. <https://doi.org/10.1186/s12941-024-00668-5>