نقش ژن mexZ در مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا در استان گیلان

نجمه رنجی[1×]، سعید رهبر تکرمی[2]

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۰۶/۲۹ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۹/۰۲

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت‌طلب و یکی از عوامل مرگ‌ومیر عفونت‌های بیمارستانی بخصوص در بیماران با سوختگی‌های شدید می‌باشد. یکی از مکانیسم‌های مقاومت دارویی در سودوموناس آئروژینوزا، جهش در ژن‌های تنظیم‌کننده منفی سیستم افلاکس پمپ MexXY می‌باشد. در این مطالعه نقش جهش‌های ژن *mexZ* در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا در استان گیلان بررسی شد.

مواد و روش کار: در این مطالعه مقطعی ۴۵ جدایه سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های کلینیکی از بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های شهر رشت و لاهیجان در بازه زمانی ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۵ جدا گردید و به کمک روش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شد. مقاومت جدایه‌ها نسبت به چهار آنتی‌بیوتیک به روش کربی بوئر و تعیین MIC بررسی گردید. سپس از روش PCR-sequencing جهت شناسایی جهش‌های ژن *mexZ* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین استفاده شد.

یافته‌ها: از ۴۵ جدایه سودوموناس آئروژینورا، همه نمونه‌ها به سه آنتی‌بیوتیک سفکسیم، سفالوتین و تری متو پریم مقاوم بودند. درحالی‌که ۱۷ جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. بالاترین میزان MIC سیپروفلوکساسین، 1024 µg/ml تعیین گردید. همچنین آنالیز PCR-sequencing نشان داد که هشت جدایه دارای جهش‌های بدمعنی ازجمله R143P و L111E در ژن *mexZ* بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: در این مطالعه جهش در *mexZ* به‌عنوان یک تنظیم‌کننده منفی *mexXY*، می‌تواند یکی از علل مقاومت به سیپروفلوکساسین در بعضی از نمونه‌های جداشده از استان گیلان باشد. به نظر می‌رسد جهش در *mexZ* باعث تغییر تمایل پروتئین mexZ در اتصال به DNA در بعضی از جدایه‌ها شده باشد.

کلیدواژه‌ها: سودوموناس آئروژینوزا، سیپروفلوکساسین، *mexXY*، *mexZ*

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره دهم، ص ۹۱۳-۹۰۲، دی ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: رشت، پل تالشان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه زیست‌شناسی، کد پستی: ۳۵۱۶ -۴۱۳۳۵، تلفن: ۰۹۱۱۹۴۱۲۱۷۴

Email: n_ranji@iaurasht.ac.ir

مقدمه

امروزه مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان یکی از مشکلات در حال گسترش مراکز بهداشتی و درمانی محسوب می‌شود. سودوموناس آئروژینوزا با توان بالقوه برای ایجاد مقاومت، باعث محدودیت در انتخاب دارو و افزایش میزان مرگ‌ومیر و افزایش هزینه‌های درمانی عفونت‌های ناشی از این باکتری شده است (۱). سودوموناس آئروژینوزا به‌طور ذاتی و اکتسابی، قابلیت کسب مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها را دارد(۲، ۳). به‌عنوان یک باکتری فرصت‌طلب باعث پنومونی‌های بیمارستانی، عفونت‌های مجرای ادراری (۴)، عفونت در محل جراحی، عفونت‌های خونی می‌شود(۵، ۶). همچنین این باکتری یکی از عوامل تهدیدکننده حیات در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی، سوختگی‌های شدید، سیستیک فیبروزیز و سرطان می‌باشد (۷، ۸). اگرچه فلوروکوئینولون‌هایی نظیر سیپروفلوکساسین اغلب برای درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا در دسترس هستند، اما این باکتری به‌آسانی از طریق جهش‌های کروموزومی و انتقال افقی ژن نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌شود. مقاومت سودوموناس آئروژینوزا به فلوئوروکوئینولون‌ها در اثر جهش در ژن‌هایی چون زیرواحدهای توپوایزومرازهای II و IV و یا افزایش فعالیت پمپ‌های سیستم افلاکس ایجاد می‌شود. تغییر در بیان پمپ‌های سیستم افلاکس نظیر MexAB-OprM و MexXY-OprM در اثر جهش در ژن‌هایی چون MexR، NfxB (۹) و MexZ ایجاد می‌شود (۱۰). MexXY-OprM یک پمپ افلاکس مهم ازنظر کلینیکی می‌باشد (۱۱،۱۲). فلوروکوئینولون‌ها، آمینوگلیکوزیدازها، تتراسایکلین،

[1] استادیار، ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران (نویسنده مسئول)

[2] دانشجوی کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی میکروبی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-16]

کلرامفنیکل و اریترومایسین، سوبسترای MexXY هستند(۱۳). MexXY-OprM یک سیستم منحصربه‌فرد در سودوموناس آئروژینوزا است. سیستم‌های پمپ افلاکس با خروج آنتی‌بیوتیک‌ها باعث کاهش تأثیر آن‌ها می‌شوند. اپران mexXY در نتیجه قرار گرفتن در معرض این آنتی‌بیوتیک‌ها، القاء می‌شود(۱۴). جهش در ژن کد کننده پروتئین MexZ که یک تنظیم‌کننده منفی ژن mexXY می‌باشد، منجر به بیان بیش‌ازحد اپرون mexXY می‌گردد(۱۵). این رویداد می‌تواند به همراه دیگر عوامل منجر به افزایش مقاومت دارویی در باکتری سودوموناس آئروژینوزا شود.

برای درمان عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا استفاده هم‌زمان از چندین آنتی‌بیوتیک مؤثرتر می‌باشد (۱۶، ۱۷) چراکه سویه‌ها به‌سرعت به انواعی از آن‌ها مقاوم می‌شوند و این پدیده درمان این گروه از عفونت‌ها را با مشکل مواجه می‌کند. برای درمان مناسب و جلوگیری از مرگ‌ومیر افراد با این گروه از عفونت‌ها بخصوص در سوختگی‌ها، مبتلایان به سرطان و سیستیک فیبروزیز لازم است اطلاعات کامل و جامعی از مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در جمعیت تحت درمان داشته باشیم. با توجه به اینکه نوع جهش‌ها ازنظر جغرافیایی و منشأ کسب و یا ایجاد آن می‌تواند متفاوت باشد، لازم است مطالعاتی در این زمینه برای داروهای رایج در درمان عفونت‌ها در افراد درخطر مرگ در استان‌های مختلف کشور صورت گیرد. با توجه به اینکه سیپروفلوکساسین جزء داروهای تزریقی مورداستفاده در درمان بیماران ذکرشده بخصوص در سوختگی‌ها می‌باشد و با توجه به اینکه مقاومت نسبت به آن در حال افزایش است، در مطالعه حاضر با تهیه جدایه‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا از بعضی مراکز درمانی و آزمایشگاهی استان گیلان یکی از عوامل مقاومت به سیپروفلوکساسین (جهش‌های ژن *mexZ*) موردبررسی و آنالیز مولکولی قرار گرفت.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه و شناسایی باکتری:

در این مطالعه مقطعی، ۱۲۰ جدایه مشکوک به سودوموناس آئروژینوزا در بازه زمانی یک‌ساله ۹۳-۹۴ از نمونه‌های بالینی از بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های سطح استان گیلان (بیمارستان‌های سوانح و سوختگی ولایت، قائم و رازی رشت، همچنین آزمایشگاه‌های مهر و رازی لاهیجان) جمع‌آوری گردید. جدایه‌ها بر اساس رنگ گرم، تست اکسیداز، تولید رنگ‌دانه و رشد در دمای ۴۲°C تشخیص داده شدند(۱۸).

سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی:

پس از شناسایی جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی با انجام تست آنتی‌بیوگرام از طریق روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Baur-Kirby) و طبق استاندارد CLSI[1] 2013(19)، با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفکسیم (۵µg)، سفالوتین (۳۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg) و تری متوپریم/سولفامتوکسازول (۷۶µg/۴µg) و در مقایسه با سویه استاندارد (ATCC 9027) تعیین گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت High Media (هند) خریداری شد. بعد از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷° C، قطر هاله عدم رشد اطـراف هـر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت گردید .

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC):

از آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین به روش براث مایکرودایلوشن (غلظت‌های 1-2048µg/ml) بر اساس استاندارد CLSI 2013 برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد استفاده شد. به این منظور جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا در محیط کشت مولر هینتون براث (Quelab) در غلظت‌های مختلف دارو کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷° C نگهداری شدند. سپس اولین لوله‌ای که کدورت قابل‌مشاهده نداشت و به عبارتی عدم رشد در آن دیده شد به‌عنوان MIC[2] در نظر گرفته شد. جهت تعیین MIC از سیپروفلوکساسین تزریقی (200mg/20ml) ساخت شرکت روناک دارو استفاده گردید(۲۰).

واکنش PCR و تعیین توالی ژن mexZ:

در ابتدا جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا در محیط کشت مولر هینتون براث کشت داده شدند و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷° C انکوبه شدند. سپس از کیت TOP General Genomic DNA Purification (شرکت توپازژن، ایران) جهت استخراج DNA استفاده شد. نمونه‌های استخراج‌شده DNA، در ژل آگارز ۱/۵ درصد موردبررسی قرار گرفتند. سپس اجزای واکنش PCR در حجم نهایی۲۵ µl با استفاده از کیت AccuPower® PCR PreMix (شرکت BIONEER، کره جنوبی) با افزودن DNA ژنومی، جفت پرایمر (۲۰ µM) و آب استریل به محلول PreMix (حاوی آنزیم، کوفاکتور و بافر مخصوص) آماده شد. بعد از سنتز پرایمرها (شرکت Bioneer)، واکنش PCR با استفاده از ترموسایکلر Analaytikjena طبق برنامه ذیل انجام شد: یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در ۹۴° C به مدت ۱ دقیقه، ۳۰ چرخه در دمای ۹۴C° به مدت ۱ دقیقه، ۵۸° C به مدت ۱ دقیقه، ۷۲° C به مدت ۱ دقیقه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه. توالی پرایمرها به‌صورت زیر می‌باشد: پرایمر مستقیم -5'

[1] Clinical and Laboratory Standard institute

[2] Minimum inhibitory concentration

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-16]

ATTGGATGTGCATGGGTG -3' و پرایمر برگشتی 5'- TGGAGATCGAAGGCAGC -3' (۲۱). بعد از اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR با طول ۱۰۰۰ جفت باز، نمونه‌ها با حفظ زنجیره سرمایی توسط شرکت تکاپو زیست (ایران، تهران) به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. نمونه‌ها توسط شرکت Bioneer تعیین توالی شد. سپس نتایج حاصل از سکونسینگ به کمک نرم‌افزار CLC main workbench v3.5 و نرم‌افزار آنلاین بلاست (BLAST) ازنظر وجود جهش در نمونه‌های مقاوم در مقایسه با نمونه استاندارد رفرنس (PAO1) موجود در سایت NCBI موردبررسی قرار گرفت.

آزمون آماری:

جهت بررسی معنی‌دار بودن نتایج تحقیق شامل سه وضعیت مقاوم، نیمه حساس و حساس به هر دارو از آزمون آماری $\chi 2$ بهره برده شد. برای معنی‌دار بودن نتایج P value<0.05 لحاظ شد.

یافته‌ها

در این تحقیق ۴۵ جدایه از ۱۲۰ جدایه، سودوموناس آئروژینوزا تشخیص داده شد که مربوط به نمونه‌های سوختگی، تنفسی، ادرار و نکروز بافتی بود (نمودار ۱) که دراین‌بین ۲۸ مورد از جدایه‌ها از زنان و ۱۷ مورد از مردان جداسازی شد. نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت این باکتری نسبت به ۴ آنتی‌بیوتیک در جدول ۱ نشان داده شده است که تفاوت معنی‌دار (P <0.05) ازنظر فراوانی بین نمونه‌های مقاوم، نیمه حساس و حساس مشاهده گردید. در این آزمون همه نمونه‌ها به سه آنتی‌بیوتیک سفکسیم، سفالوتین و تری متوکسی پریم مقاوم بودند. نتایج دیسک دیفیوژن نشان داد که حدود ۳۱ درصد نمونه‌ها به سیپروفلوکساسین مقاوم‌اند اما برای اطمینان از این نتایج، تمامی ۴۵ نمونه به روش MIC نیز بررسی و آزمون نشان داد که حدود ۳۷ درصد موارد مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند (جدول ۲). در این مطالعه بالاترین میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین MIC=1024 µg/ml در ۵ مورد و کم‌ترین میزان آن (MIC= 32µg/ml) در ۴ جدایه تعیین شد (نمودار ۲).

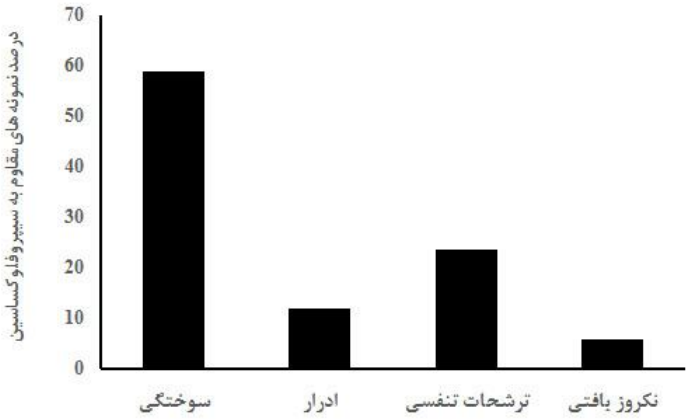
جدول (۱): قطر هاله عدم رشد استاندارد برای سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا بر اساس روش رفرانس CLSI

نام آنتی‌بیوتیک	قطر هاله (mm)			تعداد جدایه‌ها (درصد)		
	حساس	نیمه حساس	مقاوم	حساس	نیمه حساس	مقاوم
سیپروفلوکساسین	≥۲۱	۲۰-۱۶	≤۱۵	۲۸ (۶۲/۲ ٪)	۳ (۶/۷ ٪)	۱۴ (۳۱/۱ ٪)
سفکسیم	≥۱۹	۱۸-۱۶	≤۱۵	-	-	۴۵ (۱۰۰ ٪)
سفالوتین	≥۱۸	۱۷-۱۵	≤۸	-	-	۴۵ (۱۰۰ ٪)
تری متوپریم/سولفامتوکسازول	≥۱۶	۱۵-۱۱	≤۱۰	-	-	۴۵ (۱۰۰ ٪)

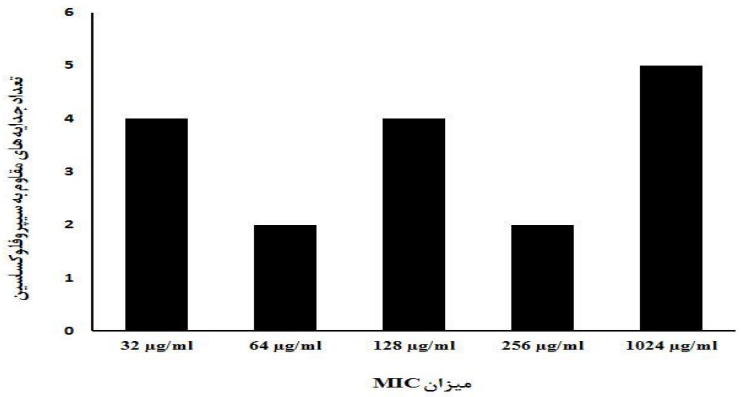
جدول (۲): مقادیر MIC استاندارد برای سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا بر اساس روش رفرانس CLSI

نام آنتی‌بیوتیک	مقدار MIC (µgr/ml)			تعداد نمونه (درصد)		
	حساس	نیمه حساس	مقاوم	حساس	نیمه حساس	مقاوم
سیپروفلوکساسین	≤۱	۲	≥۴	۲۵ (۵۵،۶ ٪)	۳ (۶/۷ ٪)	۱۷ (۳۷،۷ ٪)

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-16]



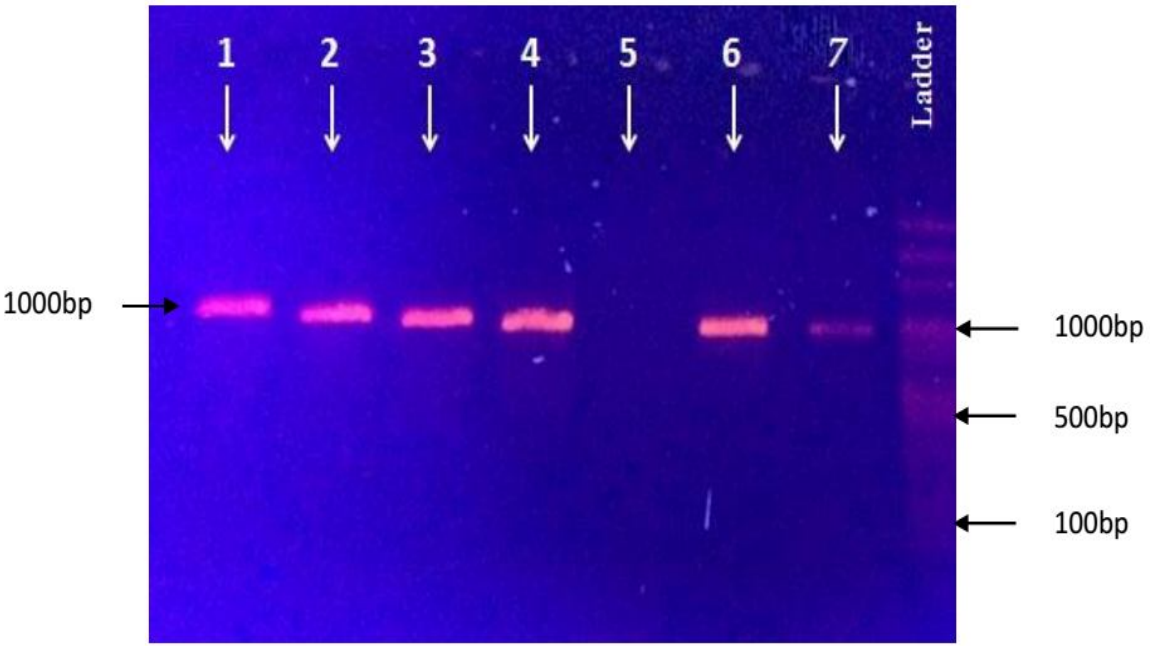
نمودار (۱): توزیع عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا ی مقاوم به سیپروفلوکساسین برحسب موضع عفونت



نمودار (۲): توزیع میزان MIC ازنظر فنوتیپی در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به سیپروفلوکساسین

جهت بررسی مولکولی مقاومت به سیپروفلوکساسین، ژن *mexZ* در نمونه‌های جداشده به روش PCR تکثیر شدند (شکل ۱) و بعد از اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR، نمونه‌ها با روش سکونسینگ آنالیز شدند. بر اساس نتایج سکونسینگ از ۱۷ نمونه، در هشت نمونه جهش‌های بدمعنی شناسایی شد (جدول ۳). دراین‌بین یک نمونه دارای جهش R143P بود که در کدون ۱۴۳، آمینواسید آرژنین به پرولین تبدیل شده بود که در اثر جهش بدمعنی تغییر G به C در باز ۴۲۸ این ژن رخ داده بود (شکل ۲). یک نمونه نیز دارای جهش L111E بود که در کدون ۱۱۱، آمینو اسید لوسین به گلوتامیک اسید تبدیل شده بود که در اثر جهش بدمعنی تغییر C به A در باز ۳۳۳ این ژن رخ داده بود (شکل ۳). نمونه دیگر دارای دو جهش بدمعنی R153W و L174Q به ترتیب در کدون‌های ۱۵۳ و ۱۷۴ به ترتیب آمینواسیدهای آرژنین به تریپتوفان و لوسین به گلوتامین تبدیل شده بود که در اثر جهش‌های بدمعنی به ترتیب، تغییر بازهای C به T در باز ۴۵۷ ژن و T به A در باز ۵۲۱ ژن رخ داده بودند (شکل ۴ و ۵). یک نمونه دارای جهش بدمعنی L174Q بود که در کدون ۱۷۴ آمینواسید لوسین به گلوتامین تبدیل شده بود که علت آن تغییر باز T به A در باز ۵۲۱ ژن بود. سه نمونه دیگر نیز دارای جهش‌های A2T و L192F بودند که در کدون‌های ۲ و ۱۹۲ به ترتیب آمینواسیدهای الانین به ترئونین و لوسین به فنیل الانین تبدیل شده بود که در اثر جهش‌های بدمعنی، به ترتیب تغییر G به A در باز ۴ ژن و تغییر T به A در باز ۵۷۶ ژن رخ داده بودند (شکل ۶ و ۷). همچنین چندین جهش خاموش نیز در نمونه‌های مختلف شناسایی شد. به‌طوری‌که جهش خاموش E146E در همه نمونه‌ها رخ داده بود و جهش‌های T31T وL123L و G195G در چندین نمونه رخ داده بود.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-16]

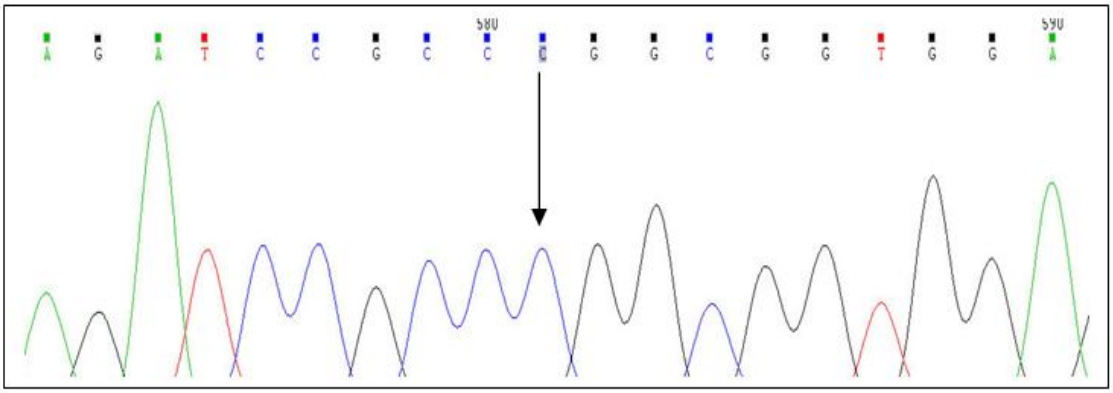


شکل (۱): الکتروفورز محصولات PCR ژن *mexZ* بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. DNA لدر 100bp مورداستفاده قرار گرفته است. نمونه شماره ۵ مربوط به کنترل منفی است و بقیه موارد محصولات PCR مربوط به ژن *mexZ* در جدایه‌های موردمطالعه می‌باشد.

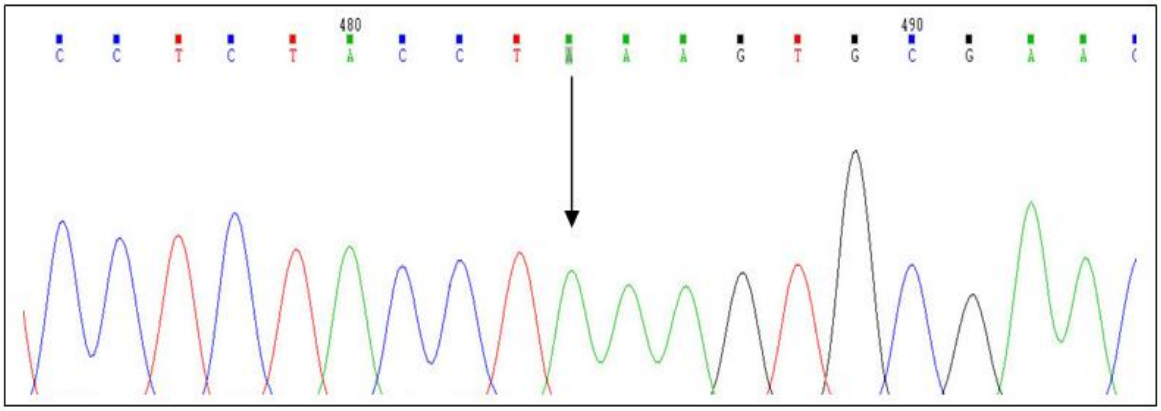
جدول (۳): تغییرات بازی و آمینواسیدی ایجادشده در ژن *mexZ* سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به سیپرو فلوکساسین

شماره نمونه	تغییر بازی	جهش
16	CGG>CCG	R143P
23	CTC>CTA	L111E
27	CGG>TGG	R153W
	CTG>CAG	L174Q
28	CTG>CAG	L174Q
43	GCC>ACC	A2T
	TTG>TTT	L192F
44	GCC>ACC	A2T
	TTG>TTT	L192F
45	GCC>ACC	A2T
	TTG>TTT	L192F

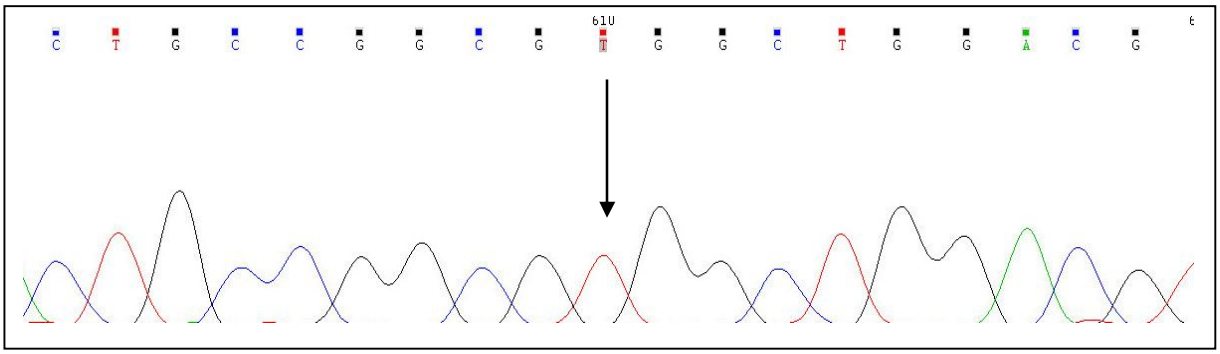
[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-16]



شکل (۲): نتیجه تعیین توالی ژن *mexZ*: پیکان سیاه‌رنگ تغییر باز G در موقعیت ۴۲۸ به C را نشان می‌دهد که باعث تبدیل آمینواسید آرژنین به پرولین (CGG(Arg) >CCG(Pro در کدون ۱۴۳ این ژن (R143P) شد.

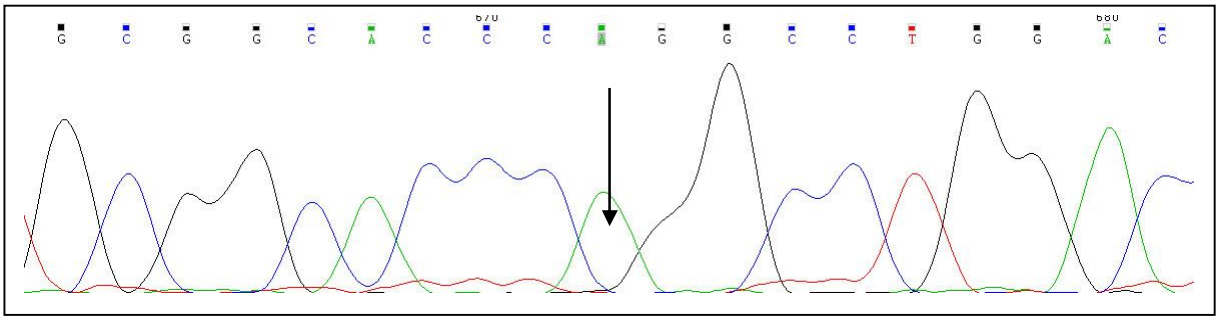


شکل (۳): نتیجه تعیین توالی ژن *mexZ*: پیکان سیاه‌رنگ تغییر باز C در موقعیت ۳۳۳ به A را نشان می‌دهد که باعث تبدیل آمینواسید لوسین به گلوتامیک اسید (CTC(Leu) >CTA(Glu در کدون ۱۱۱ این ژن (L111E) شده است.

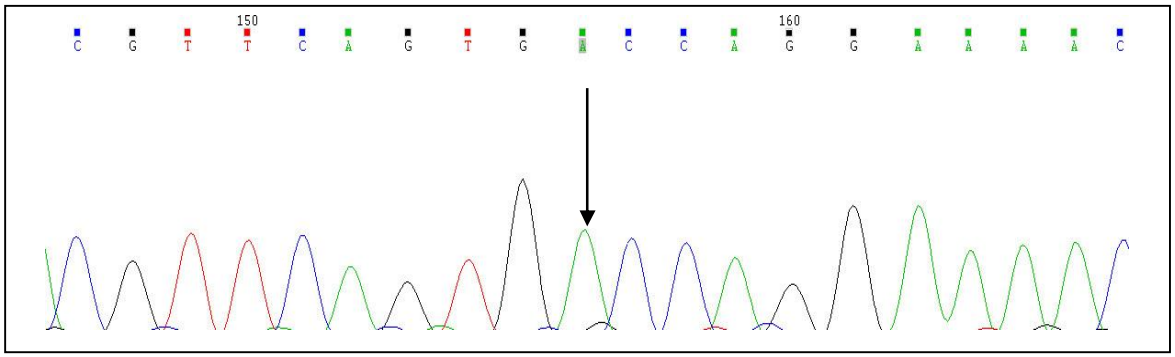


شکل (۴): نتیجه تعیین توالی ژن mexZ: پیکان سیاه‌رنگ، تغییر باز C در موقعیت ۴۵۷ به T را نشان می‌دهد که باعث تبدیل آمینواسید آرژنین به تریپتوفان (CGG(Arg) >TGG(Trp در کدون ۱۵۳ این ژن (R153W) شده است.

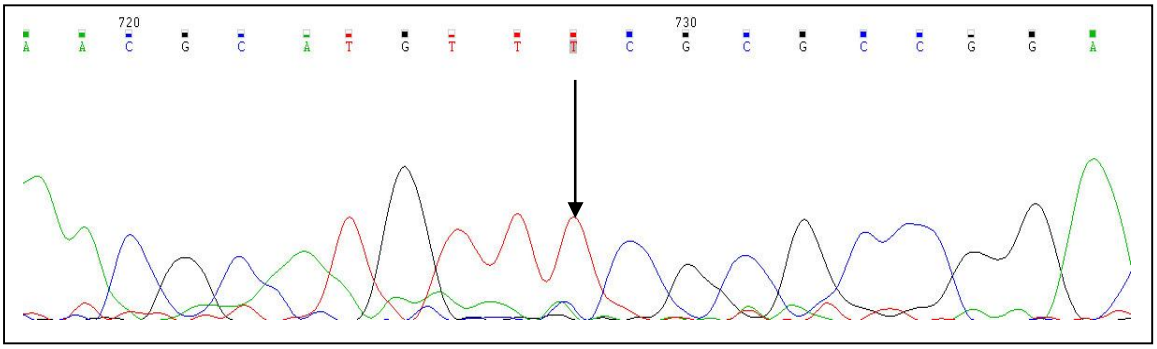
[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-16]



شکل (۵): نتیجه تعیین توالی ژن mexZ: پیکان سیاه‌رنگ، تغییر باز T در موقعیت ۵۲۱ به A را نشان می‌دهد که باعث تبدیل آمینواسید لوسین به گلوتامین CTG(Leu) > CAG(Gln) در کدون ۱۷۴ این ژن (L174Q) شده است.



شکل (۶): نتیجه تعیین توالی ژن mexZ: پیکان سیاه‌رنگ، تغییر باز G در موقعیت ۴ به A را نشان می‌دهد که باعث تبدیل آمینواسید الانین به ترئونین GCC (Ala) > ACC (Thr) در کدون ۲ این ژن (A2T) شده است.



شکل (۷): نتیجه تعیین توالی ژن mexZ: پیکان سیاه‌رنگ، تغییر باز T در موقعیت 576 به A را نشان می‌دهد که باعث تبدیل آمینواسید لوسین به فنیل الانین TTG (Leu) > TTT (Phe) در کدون 192 این ژن (L192F) شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

سودوموناس آئروزینوزا به علت داشتن مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، یک باکتری پاتوژن بیمارستانی بسیار خطرناک محسوب می‌شود. ازجمله مکانیسم‌های مقاومت آن به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان به نفوذپذیری کم غشاء، کسب آنزیم‌های تغییردهنده ساختار آنتی‌بیوتیک، جهش در آنزیم‌های هدف آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش بیان پمپ‌های افلاکس چند دارویی اشاره نمود (۲۲). با توجه به‌سرعت بالای این باکتری پاتوژن در کسب مقاومت چه از طریق انتقال افقی و چه از طریق جهش‌های ژنی، لازم است روش‌های مناسبی را جهت شناسایی انواع مقاوم در بیمارستان‌ها بخصوص مورداستفاده قرار داد تا با انتخاب داروهای جایگزین مناسب، درمان افراد مبتلا با موفقیت بیشتری همراه باشد.

در مطالعه فاضلی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در تهران نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا از عفونت‌های زخم، تنفسی، مجاری ادراری،

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-16]

سوختگی و زخم بستر جداسازی گردید (۲۳). در مطالعه صالحی و همکاران، در سال ۱۳۹۱ در تهران نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا از عفونت‌های زخم، مجاری ادراری، ترشحات خلط، عفونت خون و عفونت چشم جدا گردید (۲۴). در مطالعه دیهم و همکاران در سال ۱۳۹۰ در دزفول جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا از کشت ادرار، ترشحات ریوی، کشت خون و کشت زخم تهیه شد (۲۵). در مطالعه حاضر نیز تنوع در موضع عفونت همانند دیگر مطالعات مشاهده گردید که بیشترین آن‌ها از نمونه‌های ادراری جدا گردید. از سوی دیگر در مطالعه کلانتر و همکاران در استان کردستان در سال ۲۰۰۹ و ۲۰۱۰ از نمونه‌های به‌دست‌آمده از بیماران سوختگی میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین حدود ۴۳درصد مشاهده شد(۲۶). در مطالعه فاضلی و همکاران، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین حدود ۴۰درصد گزارش گردید (۲۳). همچنین در مطالعه Negi و همکاران در هندوستان در سال ۲۰۱۴ بر روی ۱۷۰ جدایه کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا حدود ۵۷درصد موارد، مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند(۲۷). در مطالعه حاضر نیز حدود ۳۷ درصد موارد سودوموناس آئروژینوزا مقاومت به سیپروفلوکساسین نشان دادند که از وجود میزان مشابهی مقاومت به این دارو در کشور در این گروه از عفونت‌های بیمارستانی حکایت دارد.

در مطالعات مختلف دلایل مقاومت چند دارویی شامل جهش در ژن‌هایی نظیر *mexZ* و افزایش بیان ژن‌های سیستم‌های افلاکس نظیر *mexXY* مشخص شده *است .mexZ* یک فاکتور مهارکننده بیان سیستم افلاکس پمپ *mexXY* می‌باشد. جهش در این ژن باعث افزایش بیان *mexXY* می‌شود که نتیجه آن ایجاد مقاومت دارویی در باکتری‌ها است. نیمی از جهش‌های این ژن از نوع فقدان عملکرد[1] هستند که باعث افزایش بیان دو ژن *mexX* و *mexY* می‌شود. یکی از دلایل ایجاد مقاومت ذاتی و اکتسابی در سودوموناس آروژینوزا افزایش بیان ژن‌های سیستم افلاکس پمپ‌ها می‌باشد. خانواده‌ی RND به‌عنوان مهم‌ترین سیستم افلاکس پمپ در باکتری‌های گرم منفی می‌باشد (۲۸). در این مطالعه جهش در *mexZ* در چندین جدایه شناسایی شد. در سال ۲۰۰۷ هاکویت و همکارانش دریافتند که سفیپیم (FEP) و سفتازیدیم (CAZ)، آنتی‌بیوتیک‌های نوع β-lactam بسیار مقاوم با مقدار MIC (۱ تا ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مشابه برای نوع حیوانی سودوموناس آئروژینوزا است. همچنین آن‌ها نشان دادند که mexZ در نمونه‌های مقاوم سودوموناس آرژینوزا دارای چندین جهش ازجمله L138R و W176S و G195E می‌باشد. همچنین در این مطالعه نشان داده شد که ژن MexXY-OprM نقش مهمی در افزایش مقاومت به سفپیم در سویه‌های پاتوژن مقاوم بالینی سودوموناس آئروژینوزا دارد(۲۹). افزایش بیان MexXY-OprM در مقاومت سودوموناس آئروژینوزا به آمینوگلیکوزیدها، اریترومایسین و فلوروکوئینولون‌ها مشاهده شده است(۳۰). در مطالعه حاضر نیز میزان مقاومت به بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها بررسی شد که نمونه‌های دارای جهش در ژن *mexZ* به بعضی از این داروها ازجمله سفکسیم، سفالوتین، تری متوپریم و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند که به نظر می‌رسد در این گروه از نمونه‌های مقاوم، جهش در ژن *mexZ* در افزایش بیان سیستم افلاکس پمپ mexXY نقش داشته باشد.

در مطالعه‌ای که توسط Lianes و همکاران در سال ۲۰۰۴ در فرانسه بر روی ۱۲ سویه کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا انجام شد، میزان بیان در پمپ‌های افلاکس mexAB-oprM و mexXY-oprM به روش Real time-PCR موردبررسی قرار گرفت. نتایج تعیین توالی DNA نشان داد که ۹ سویه در ژن *mexZ* دچار جهش بودند که این امر سبب افزایش بیان اپرون mexXY شده بود. هشت سویه دیگر جهش‌هایی در ژن‌های مسئول کنترل رونویسی از اپران mexAB-oprM داشتند که دراین‌بین ۴ سویه جهش در ژن *nalB* و ۳ سویه جهش در ژن *nalC* و ۳ سویه دارای جهش در هر دو ژن بودند(۳۱). در مطالعات مشخص شده که علت افزایش بیان این سیستم افلاکس جهش در *mexZ* است. mexZ یک تنظیم‌کننده منفی بیان MexXY می‌باشد (۲۱). بنابراین غیرفعال شدن آن باعث افزایش بیان این سیستم افلاکس می‌گردد (۳). در مطالعه حاضر وجود جهش در ژن *mexZ* در بعضی از نمونه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، نقش این ژن را در مهار بیان سیستم‌های افلاکس پمپ تأیید می‌نماید. Henrichfreise و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در نمونه‌های مقاوم سودوموناس آئرژینوزا چندین جهش ازجمله Leu138Arg و deletion C595 و Gln134Stop و Tyr49Cys و Leu123Stop و Val58Ala و Gly89Ser و Arg143Gln و Asp155Gly را در ژن *mexZ* گزارش نمودند(۳). در مطالعه حاضر نیز چندین جهش ژنی در نواحی مختلف ژن *mexZ* رخ داده است که به نظر می‌رسد این جهش‌ها در تغییر ساختار پروتئین حاصل و درنتیجه تمایل آن به اتصال به پروموتر اپران mexXY نقش داشته باشند که نیاز به مطالعات بیوانفورماتیک این ساختارها و همچنین آنالیز آزمایشگاهی آن‌ها می‌باشد.

شیوع بالای مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های موردمطالعه بخصوص سیپروفلوکساسین در موارد جداشده از بیمارستان‌های سطح استان گیلان و همچنین مقاومت به دوز بالای داروهای آنتی‌بیوتیکی در این مطالعه خطر خاموش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی را در جامعه

[1]. Loss of function

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-16]

نشان می‌دهد. همچنین وقوع جهش‌های جدید در ژن *mexZ* در بعضی جدایه‌ها توجه بیشتر کادر درمانی و بهداشتی استان را در استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در درمان عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا بخصوص در موارد سوختگی می‌طلبد. همان‌طور که یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ‌ومیر در سوختگی‌ها عفونت‌هایی چون سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد، لازم است در استفاده از این داروها در این گروه از بیماران دقت بیشتری نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، ریاست و کارکنان دلسوز بیمارستان‌های ولایت، قائم و رازی و همچنین آزمایشگاه‌های مهر و رازی لاهیجان کمال تشکر را دارند.

References:

1. Messadi AA, Lamia T, Kamel B, Salima O, Monia M, Saida BR. Association between antibiotic use and changes in susceptibility patterns of Pseudomonas aeruginosa in an intensive care burn unit: a 5-year study, 2000-2004. Burns :J Int Soc Burn Injuries 2008;34(8):1098-102.
2. Sherertz RJ, Sarubbi FA. A three-year study of nosocomial infections associated with Pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol 1983;18(1):160-4.
3. Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. Resistance mechanisms of multiresistant Pseudomonas aeruginosa strains from Germany and correlation with hypermutation. Antimicrob Agents Chemother 2007;51(11):4062-70.
4. Cole SJ, Records AR, Orr MW, Linden SB, Lee VT. Catheter-associated urinary tract infection by Pseudomonas aeruginosa is mediated by exopolysaccharide-independent biofilms. Infect Immun 2014;82(5):2048-58.
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.
6. Tumbarello M, Repetto E, Trecarichi EM, Bernardini C, De Pascale G, Parisini A, et al. Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa bloodstream infections: risk factors and mortality. Epidemiol Infect 2011;139(11):1740-9.
7. May TB, Shinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, DeVault JD, et al. Alginate synthesis by Pseudomonas aeruginosa: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Rev 1991;4(2):191-206.
8. Kruczek C, Kottapalli KR, Dissanaike S, Dzvova N, Griswold JA, Colmer-Hamood JA, et al. Major Transcriptome Changes Accompany the Growth of Pseudomonas aeruginosa in Blood from Patients with Severe Thermal Injuries. PloS one 2016;11(3):e0149229.
9. Higgins PG, Fluit AC, Milatovic D, Verhoef J, Schmitz FJ. Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa.Int J Antimicrob Agents 2003;21(5):409-13.
10. Morita Y, Sobel ML, Poole K. Antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa: involvement of the antibiotic-inducible PA5471 gene product. J Bacteriol 2006;188(5):1847-55.
11. Aires JR, Kohler T, Nikaido H, Plesiat P. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of Pseudomonas aeruginosa to aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother 1999;43(11):2624-8.
12. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. MexXY multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa. Front Microbiol 2012;3:408.
13. Poole K. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. Curr Pharm Biotechnol 2002;3(2):77-98.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-16]

14. 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.
15. Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Morrow BJ, Davies TA, Foleno BD, He W, et al. Effect of MexXY overexpression on ceftobiprole susceptibility in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 2009;53(7):2785-90.
16. Hoiby N. Recent advances in the treatment of Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis. BMC Medicine 2011;9:32.
17. Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. Clin Microbiol Rev 2012;25(3):450-70.
18. Dubois V, Arpin C, Melon M, Melon B, Andre C, Frigo C, et al. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of Pseudomonas aeruginosa P12: efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. J Clin Microbiol 2001;39(6):2072-8.
19. Wayne PA. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 2007;17.
20. Rahnamay Roodposhti F, Ranji N, L A. Mutations of GyrA Gene in Fluoroquinolone Resistant Isolates of Pseudomonas aeruginosa in Guilan Province. J Mazandaran Univ Med Sci 2015;26(139):84-92.
21. Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2006;50(5):1633-41.
22. Tohidpour A, Peerayeh SN, Najafi S. Detection of DNA Gyrase Mutation and Multidrug Efflux Pumps Hyperactivity in Ciprofloxacin Resistant Clinical Isolates of Pseud-omonas aeruginosa. J Med Microbiol 2013;1(1):2.
23. Fazeli N, Momtaz H. Virulence Gene Profiles of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Isolated From Iranian Hospital Infections. Iran Red Crescent Med J 2014;16(10):e15722.
24. Zolali M, Salehi M, Mosavari N, Bolfion M, Taheri M, Mirzaei M. investigation of mexX gene in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical samples. Quarterly J Microbioly Knowledge 2010;2(6):1-6.
25. Deiham B, Basikhasteh M. The pattern of antibiotic resistance and Metallo-β-lactamases production in pseudomonas aeruginosa isolated from Clinical samples of Dr Ganjavian Hospital in Dezful. J Microbial Biotechnol 2012;4(14):21-8.
26. Kalantar E, Taherzadeh S, Ghadimi T, Soheili F, Salimizand H, Hedayatnejad A. Pseudomonas aeruginosa, an emerging pathogen among burn patients in Kurdistan Province, Iran. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2012;43(3):712-7.
27. Negi N ,Prakash P, Gupta ML, Mohapatra TM. Possible Role of Curcumin as an Efflux Pump Inhibitor in Multi Drug Resistant Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa. J Clin Diagn Res 2014;8(10):DC04-7.
28. Yamamoto M, Ueda A, Kudo M, Matsuo Y, Fukushima J, Nakae T, et al. Role of MexZ and PA5471 in transcriptional regulation of mexXY in Pseudomonas aeruginosa. Microbiol 2009;155(Pt 10):3312-21.
29. Hocquet D, Berthelot P, Roussel-Delvallez M, Favre R, Jeannot K, Bajolet O ,et al. Pseudomonas aeruginosa may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. Antimicrob Agents Chemother 2007;51(10):3531-6.
30. Geyik MF, Aldemir M, Hosoglu S, Tacyildiz HI. Epidemiology of burn unit infections in children. Am J Infection Control 2003;31(6):342-6.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-16]

31. Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plesiat P. Clinical strains of Pseudomonas aeruginosa overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. Antimicrob Agents Chemother 2004;48(5):1797-802.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-16]

Original Article

ROLE OF MEXZ GENE IN CIPROFLOXACIN RESISTANCE IN PSEUDOMONAS AERUGINOSA ISOLATES IN GUILAN PROVINCE

Najmeh Ranji[1], Saeid Rahbar Takrami[2]*

Received: 20 Sep, 2016; Accepted: 23 Nov, 2016

Abstract

***Background & Aims*:** Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen and one of mortality causes of nosocomial infections specifically in severely burned patients. One of the drug resistant mechanisms in pseudomonas aeruginosa is mutation in negative regulator genes of mexXY efflux pump system. In this study, the role of mexZ mutations was investigated in ciprofloxacin resistant development in Pseudomonas aeruginosa isolates in Guilan province.

***Materials & Methods*:** In this study, 45 strains of pseudomonas aeruginosa isolated from different clinical samples of Rasht and Lahijan hospitals and laboratories between 2014 to 2016 were identified by biochemical tests. The antibiotic resistance and susceptibility of the strains were investigated by Kirby Bauer method and MIC determination. Then PCR-sequencing was performed to assess MexZ gene mutations in ciprofloxacin resistant strains.

***Results*:** From 45 isolates of pseudomonas aeruginosa, all were resistant to cefixime, cephalothin and trimethoprim; whereas 17 isolates were ciprofloxacin resistant. The highest MIC of ciprofloxacin was determined 1024 µg/ml. Also, PCR-sequencing analysis showed that 8 isolates had missense mutations in MexZ gene such as L111E and R143P.

***Conclusion*:** In this study, mutation in mexZ as negative regulator of mexXY can be a reason of multi-drug resistance in some strains in Guilan province. It appears that mexZ mutation led to affinity modification in mexZ protein binding to DNA in some isolates.

***Keywords*:** Ciprofloxacin, MexXY, MexZ, Pseudomonas Aeruginosa

Address: Department of Biology, Faculty of Science, Rasht Branch, Islamic Azad University. P.O. Box: 41235-3516. Rasht, Iran.
Tel: +989119412174
Email: n_ranji@iaurasht.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2016: 26(10): 913 ISSN: 1027-3727

[1] *Assistant Professor in Molecular Genetics, Department of Biology, Faculty of Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran (Corresponding Author)*
[2] *MSc in Microbial Biotechnology, Young Researchers and Elite Club, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran*

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-16]