

نقش ژن *mexZ* در مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا در استان گیلاننجمه رنجی^۱، سعید رهبر تکریمی^۲

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 آئروژینوزا، 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 از جمله 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 جدا شده 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، *mexZ*، *mexXY*

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

فیبروز 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 فلوروکوئینولون‌ها 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 از نظر کلینیکی می‌باشد (۱۱، ۱۲). فلوروکوئینولون‌ها، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین،

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). همچنین این باکتری یکی از عوامل تهدیدکننده حیات در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی، سوختگی‌های شدید، سیستمیک

^۱ استادیار، ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران (نویسنده مسئول)^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی میکروبی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

پس از شناسایی جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی با انجام تست آنتی‌بیوگرام از طریق روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Baur-Kirby) و طبق استاندارد CLSI¹ (19) 2013، 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 اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت گردید.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC):

از آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین به روش برات میکروداپلوشن (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 برات (Quelab) در غلظت‌های مختلف دارو کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C نگهداری شدند. سپس اولین لوله‌ای که کدورت قابل مشاهده نداشت و به عبارتی عدم رشد در آن دیده شد به عنوان MIC^۲ 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 برات کشت داده شدند و به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. سپس از کیت TOP General Genomic DNA Purification (شرکت توپاززن، ایران) جهت استخراج DNA استفاده شد. نمونه‌های استخراج شده DNA، در ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفتند. سپس اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ 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 ۹۴°C 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 به صورت زیر می‌باشد: پرایمر مستقیم 5'

کلرامفینیکل و اریترومایسین، سوبسترای MexXY هستند (۱۳). MexXY-OprM یک سیستم منحصر به فرد 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 بیش از حد 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 به سرعت 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 سیستمیک فیبروز لازم است اطلاعات کامل و جامعی از مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در جمعیت تحت درمان داشته باشیم. با توجه به اینکه نوع جهش‌ها از نظر 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 در خطر مرگ در استان‌های مختلف کشور صورت گیرد. با توجه به اینکه سیپروفلوکساسین جزء داروهای تزریقی مورد استفاده در درمان بیماران ذکر شده 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) مورد بررسی 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:

² Minimum inhibitory concentration

¹ Clinical and Laboratory Standard institute

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 در این بین 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 ($P < 0.05$) از نظر 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 $MIC=1024 \mu\text{g/ml}$ در ۵ مورد و کم‌ترین میزان آن ($MIC=32 \mu\text{g/ml}$) در ۴ جدایه تعیین شد (نمودار ۲).

3'-ATTGGATGTGCATGGGTG و پرایمر برگشتی 5'-TGGAGATCGAAGGCAGC (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 سکونسیک به کمک نرم‌افزار CLC main workbench v3.5 و نرم‌افزار آنلاین بلاست (BLAST) از نظر وجود جهش در نمونه‌های مقاوم در مقایسه با نمونه استاندارد رفرنس (PAO1) موجود در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون آماری:

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

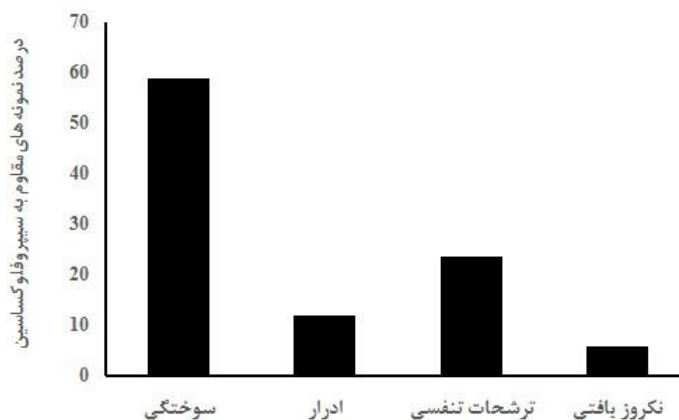
یافته‌ها

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

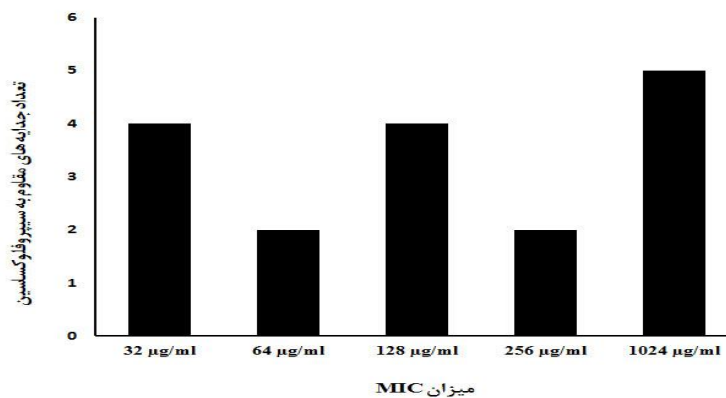
نام آنتی‌بیوتیک	قطر هاله (mm)			تعداد جدایه‌ها (درصد)		
	حساس	نیمه حساس	مقاوم	حساس	نیمه حساس	مقاوم
سیپروفلوکساسین	≥ 21	۱۶-۲۰	≤ 15	۲۸ (۶۲/۳٪)	۳ (۶/۷٪)	۱۴ (۳۱/۱٪)
سفکسیم	≥ 19	۱۶-۱۸	≤ 15	-	-	۴۵ (۱۰۰٪)
سفالوتین	≥ 18	۱۵-۱۷	≤ 8	-	-	۴۵ (۱۰۰٪)
تری متوپریم/سولفامتوکسازول	≥ 16	۱۱-۱۵	≤ 10	-	-	۴۵ (۱۰۰٪)

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

نام آنتی‌بیوتیک	مقدار MIC ($\mu\text{g/ml}$)			تعداد نمونه (درصد)		
	حساس	نیمه حساس	مقاوم	حساس	نیمه حساس	مقاوم
سیپروفلوکساسین	≤ 1	۲	≥ 4	۲۵ (۵۵،۶٪)	۳ (۶/۷٪)	۱۷ (۳۷،۷٪)



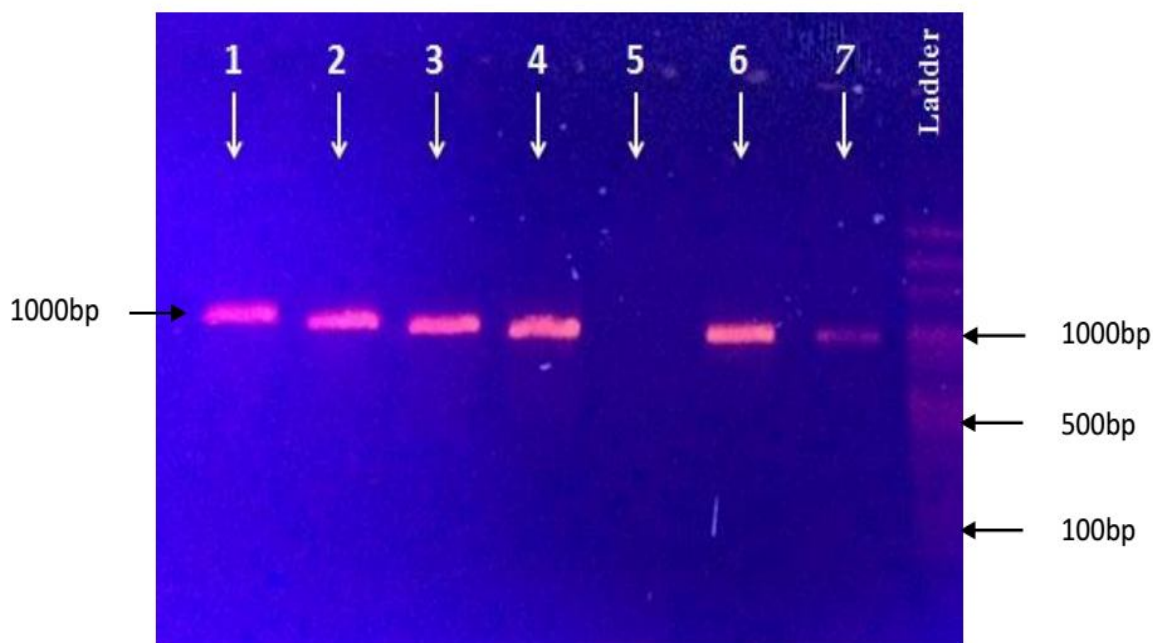
نمودار (۱): توزیع عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا ی مقاوم به سیپروفلوکساسین برحسب موضع عفونت



نمودار (۲): توزیع میزان MIC از نظر فنوتیپی در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا ی مقاوم به سیپروفلوکساسین

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. به طوری که جهش خاموش E146E در همه نمونه‌ها رخ داده بود و جهش‌های T31T و L123L و G195G در چندین نمونه رخ داده بود.

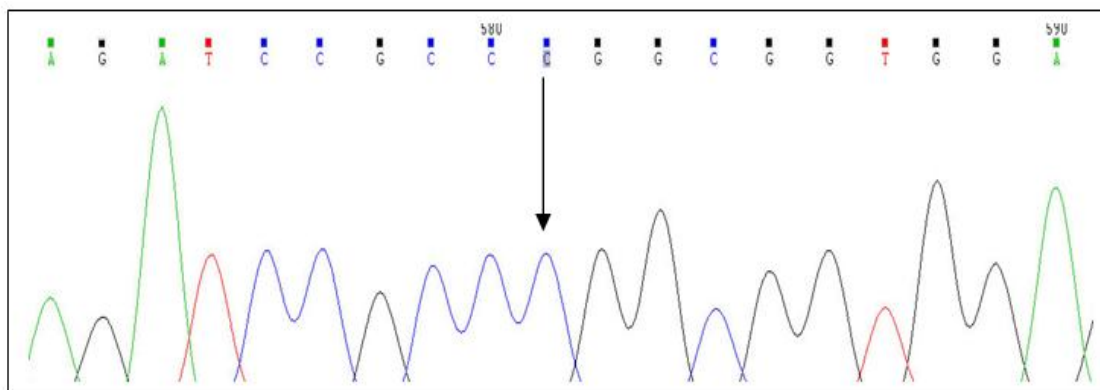
جهت بررسی مولکولی مقاومت به سیپروفلوکساسین، ژن *mexZ* در نمونه‌های جدا شده به روش PCR تکثیر شدند (شکل ۱) و بعد از اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR، نمونه‌ها با روش سکونسیگ آنالیز شدند. بر اساس نتایج سکونسیگ از ۱۷ نمونه، در هشت نمونه جهش‌های بدمعنی شناسایی شد (جدول ۳). در این بین یک نمونه دارای جهش 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



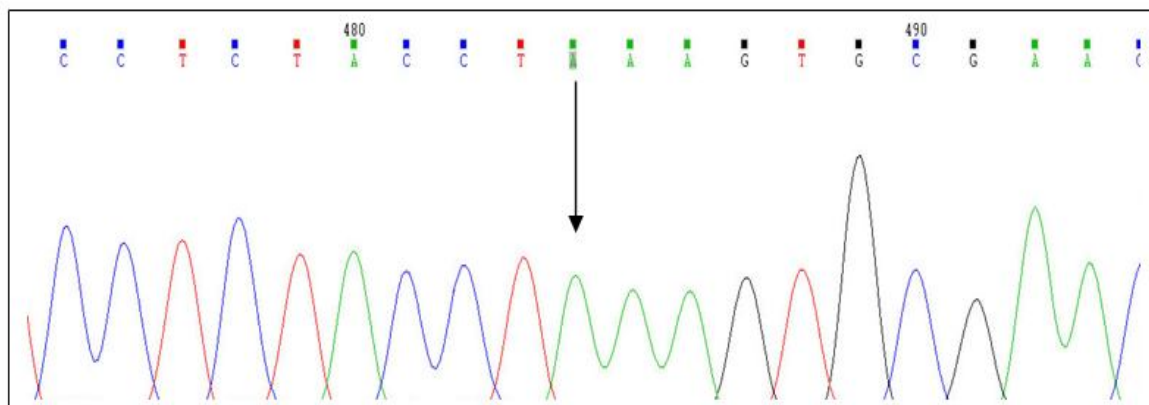
شکل (۱): الکتروفورز محصولات PCR ژن *mexZ* بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. DNA لدر 100bp مورد استفاده قرار گرفته است. نمونه شماره ۵ مربوط به کنترل منفی است و بقیه موارد محصولات PCR مربوط به ژن *mexZ* در جدایه‌های مورد مطالعه می‌باشد.

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

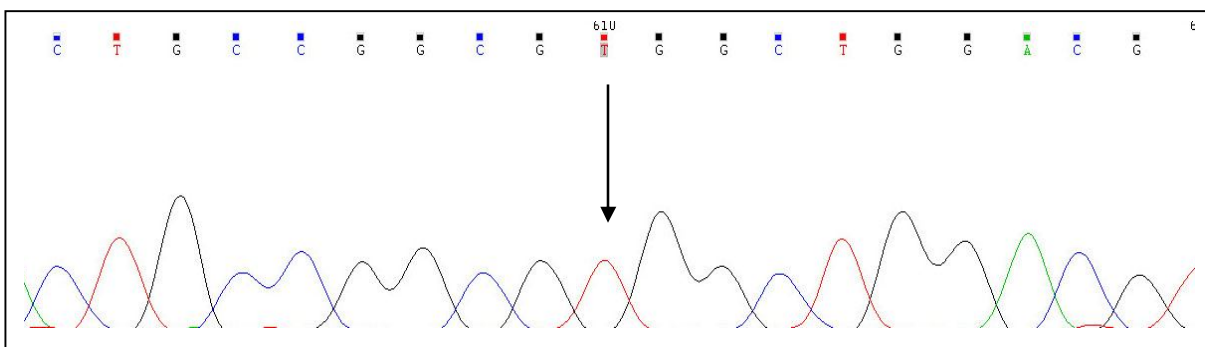
شماره نمونه	تغییر بازی	جهش
16	CGG>CCG	R143P
23	CTC>CTA	L111E
27	CGG>TGG	R153W
	CTG>CAG	L174Q
28	CTG>CAG	L174Q
43	GCC>ACC	A2T
	TTG>TTT	L192F
44	GCC>ACC	A2T
	TTG>TTT	L192F
45	GCC>ACC	A2T
	TTG>TTT	L192F



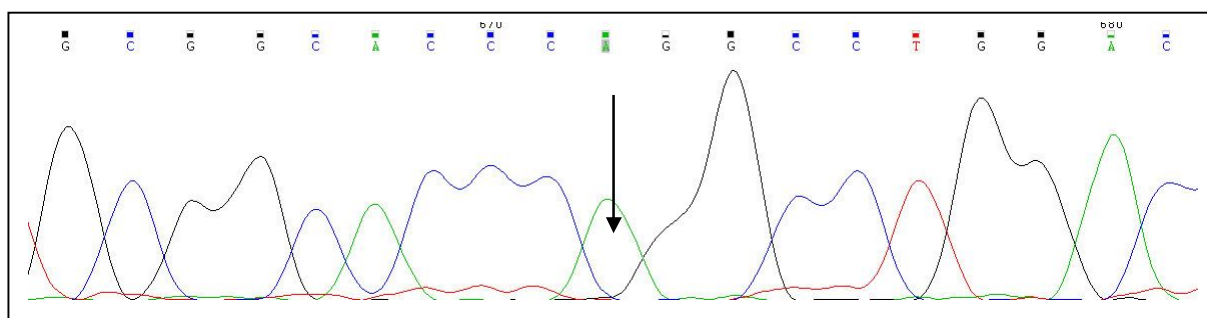
شکل (۲): نتیجه تعیین توالی ژن *mexZ* پیکان سیاه‌رنگ تغییر باز G در موقعیت ۴۲۸ به C را نشان می‌دهد که باعث تبدیل آمینواسید آرژنین به پرولین (CGG(Arg) > CCG(Pro) در کدون ۱۴۳ این ژن (R143P) شد.



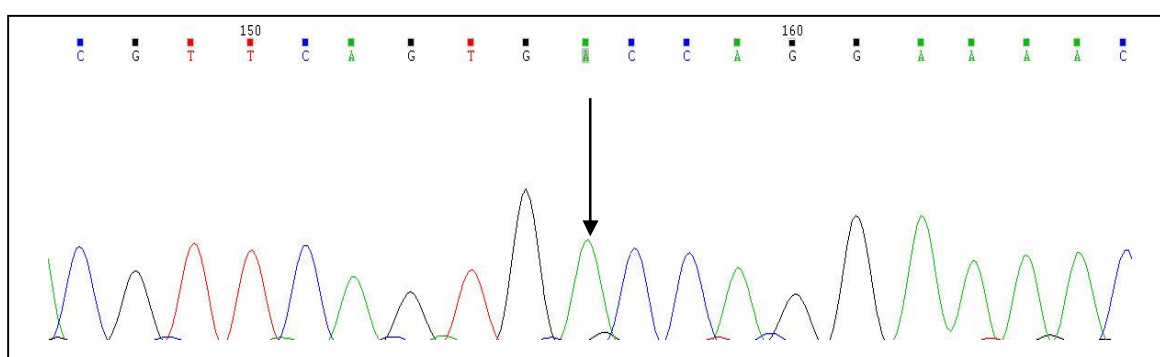
شکل (۳): نتیجه تعیین توالی ژن *mexZ* پیکان سیاه‌رنگ تغییر باز C در موقعیت ۳۳۳ به A را نشان می‌دهد که باعث تبدیل آمینواسید لوسین به گلوتامیک اسید (CTC(Leu) > CTA(Glu) در کدون ۱۱۱ این ژن (L111E) شده است.



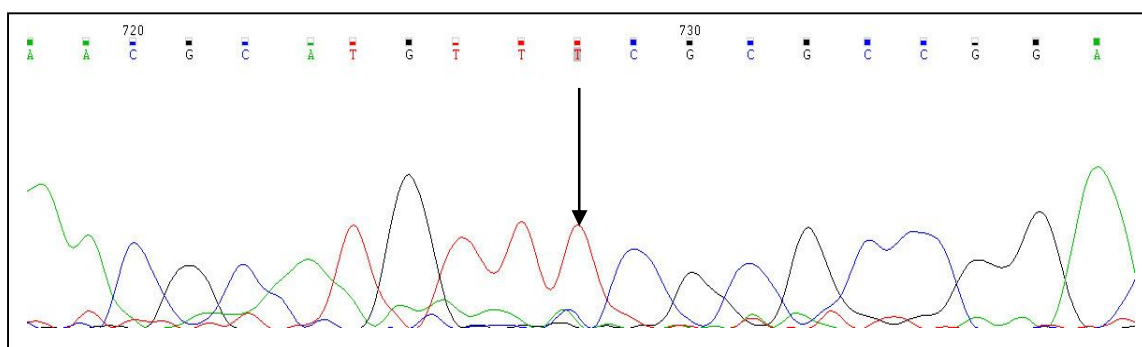
شکل (۴): نتیجه تعیین توالی ژن *mexZ* پیکان سیاه‌رنگ، تغییر باز C در موقعیت ۴۵۷ به T را نشان می‌دهد که باعث تبدیل آمینواسید آرژنین به تریپتوفان (CGG(Arg) > TGG(Trp) در کدون ۱۵۳ این ژن (R153W) شده است.



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 (CAG(Gln) > CTG(Leu) 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 آلانین 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 آلانین (TTT (Phe) > TTG (Leu) در کدون 192 این ژن (L192F) شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

سودوموناس آئروژینوزا به علت داشتن مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، یک باکتری پاتوژن بیمارستانی بسیار خطرناک محسوب می‌شود. از جمله 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 به سرعت 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 مورد استفاده 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،

پاتوژن مقاوم بالینی سودوموناس آئروژینوزا دارد (۲۹). افزایش بیان MexXY-OprM در مقاومت سودوموناس آئروژینوزا به آمینوگلیکوزیدها، اریترومايسين 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 از جمله 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 مورد بررسی 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 در این بین 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 آئروژینوزا چندین جهش از جمله 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 در نتیجه تمایل آن به اتصال به پروموتور اپران *mexXY* نقش داشته باشند که نیاز به مطالعات بیوانفورماتیک این ساختارها و همچنین آنالیز آزمایشگاهی آن‌ها می‌باشد.

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

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 به دست آمده از بیماران سوختگی میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین حدود ۴۳ درصد مشاهده شد (۲۶). در مطالعه فاضلی و همکاران، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین حدود ۴۰ درصد گزارش گردید (۲۳). همچنین در مطالعه Negi و همکاران در هندوستان در سال ۲۰۱۴ بر روی ۱۷۰ جدایه کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا حدود ۵۷ درصد 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^۱ هستند که باعث افزایش بیان دو ژن *mexX* و *mexY* می‌شود. یکی از دلایل ایجاد مقاومت ذاتی و اکتسابی در سودوموناس آئروژینوزا 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 ها کویت و همکارانش دریافتند که سفیپیم (FEP) و سفنازیدیم (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 آئروژینوزا دارای چندین جهش از جمله L138R و W176S و G195E می‌باشد. همچنین در این مطالعه نشان داده شد که ژن MexXY-OprM نقش مهمی در افزایش مقاومت به سفیپیم در سویه‌های

^۱. Loss of function

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.

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 آنروژینوزا بخصوص در موارد سوختگی می‌طلبد. همان‌طور که یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ‌ومیر در سوختگی‌ها عفونت‌هایی چون سودوموناس آنروژینوزا می‌باشد، لازم است در

References:

- 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.
- Sherertz RJ, Sarubbi FA. A three-year study of nosocomial infections associated with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1983;18(1):160-4.
- 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.
- 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.
- 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.
- Tumbarello M, Repetto E, Treccarichi 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.
- 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.
- Kruczek C, Kottapalli KR, Dissanaik S, Dzvoza 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 2012;3:408.
- Poole K. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Pharm Biotechnol* 2002;3(2):77-98.

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 *Pseudomonas 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 Microbiol 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.

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.

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

Najmeh Ranji^{1*}, Saeid Rahbar Takrami²

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