Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 24, No. 1, Spring 2024, Pages: 46-57

Original article

Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains in Northwest Iran

Maryam Nazari[1], Nilofar Saeli[1,2], Mohsen Arzanlou[1], Saghar Jafari-Ramedani[1, 2], Hafez Mirzanejad-Asl[1], Farzad Khademi*[1,3], Aida Alinezhad[2]

1. Department of Microbiology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
2. Students Research Committee, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
3. Arthropod-Borne Diseases Research Center, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

**** Corresponding author.*** Tel: +984533534684, Fax: +984533534684, E-mail: f.khademi@arums.ac.ir

Article info

Article history:
Received: Mar 2, 2024
Accepted: May 30, 2024

Keywords:
Pseudomonas aeruginosa
Plasmid
Fluoroquinolone
Resistance

ABSTRACT

Background: Antibiotic resistance represents a critical global concern within the medical community, posing significant challenges in the treatment of infections caused by drug-resistant pathogens. Over the years, broad-spectrum fluoroquinolones have been extensively used to treat infections caused by both Gram-positive and Gram-negative bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa*. In this study, we decided to assess the prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms among clinical isolates of *P. aeruginosa* in Ardabil hospitals.

Methods: We analyzed a total of 200 clinical isolates of *P. aeruginosa*, collected between June 2019 and May 2023. The antibiotic resistance profiles of these strains against various fluoroquinolone antibiotics were determined using the disk diffusion method. Additionally, we investigated the presence of *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, and *qnrS* genes through polymerase chain reaction (PCR) analysis. Furthermore, we assessed the expression levels of efflux pump genes and outer membrane porin genes using the quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) in fluoroquinolone-resistant *P. aeruginosa* strains.

Results: Our findings revealed that 69% of *P. aeruginosa* strains were resistant to fluoroquinolones. The resistance rates for different fluoroquinolones were as follows: ciprofloxacin 55.5%, ofloxacin 62%, norfloxacin 53.5%, lomefloxacin 55.3%, and levofloxacin 55.5%. Notably, 78.9% of these strains exhibited multidrug resistance (MDR). Among the *qnr* genes, *qnrB* was the most prevalent (2.9%). No other *qnr* genes were identified. Interestingly, 75% of *P. aeruginosa* strains carrying the *qnrB* gene showed overexpression of efflux pump genes, while 100% exhibited down-regulation of the *oprD* gene.

Conclusion: Given the high prevalence of fluoroquinolone-resistant *P. aeruginosa* clinical isolates in Ardabil hospitals and the multifactorial nature of resistance, continuous monitoring of antibiotic resistance trends and understanding the underlying resistance mechanisms are crucial for selecting appropriate treatment strategies.

How to cite this article: Nazari M, Saeli N, Arzanlou M, Jafari-Ramedani S, Mirzanejad-Asl H, Khademi F, Alinezhad A. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Pseudomonas aeruginosa Clinical Strains in Northwest Iran. J Ardabil Univ Med Sci. 2024;24(1): 46-57.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.46]

Extended Abstract

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most common and important Gram-negative opportunistic pathogens that cause hospital infections. This bacterium is responsible for a number of opportunistic infections, including pneumonia, septicemia, wound infections, and urinary tract infections. For many years, broad-spectrum fluoroquinolones, which target the bacterial DNA gyrase and topoisomerase IV enzymes and ultimately prevent nucleic acid synthesis, have been widely used to treat infections caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria, including *P. aeruginosa*. However, antibiotic resistance is one of the most important global concerns in the medical community, which has become a great challenge in the treatment of infections caused by drug-resistant pathogens, especially in hospitals. Therefore, knowledge of drug resistance trends along with resistance mechanisms in a specific geographic location is necessary for treating infections caused by drug resistant strains. The present study aimed to determine the prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance mechanism among *P. aeruginosa* clinical isolates in Ardabil hospitals.

Methods: A total of 200 *P. aeruginosa* clinical isolates were used, which were collected during June 2019 and May 2023. The antibiotic resistance pattern of these strains to different fluoroquinolone antibiotics (ciprofloxacin 5 µg, ofloxacin 5 µg, norfloxacin 10 µg, lomefloxacin 10 µg, and levofloxacin 5 µg) was determined using the disk diffusion method. In addition, *P. aeruginosa* strains resistant to at least one antibiotic in ≥ 3 different antibiotic classes were considered as multidrug- resistant (MDR). The presence of *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, and *qnrS* genes were detected using the polymerase chain reaction (PCR) method. For this purpose, initially, genomic DNA was extracted from fluoroquinolone-resistant clinical strains by the boiling method and then their quality was confirmed by nanodrop spectrophotometer. Amplification of genes was performed in a final volume of 15 µL (10 µL of PCR Master Mix, 3 µL of template DNA, and 2 µL of primers (10 µmol/L)). All PCR reactions were performed according to the following thermal conditions: 1 cycle of primary denaturation at 95 °C for 5 min and 30 to 34 cycles including three steps of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at different temperatures for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min. The presence of fluoroquinolone resistance genes was confirmed using agarose gel electrophoresis (1%). Furthermore, the expression rates of the efflux pumps and outer membrane porin genes were measured using the quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) method among the *qnr* gene positive, fluoroquinolone-resistant *P. aeruginosa* clinical strains. For this purpose, total RNA extraction was performed using TRIZol™ reagent and cDNA synthesis according to the manufacturer's instructions. Each qRT-PCR reaction was done in a final volume of 15 µL containing 7 µL of SYBR Green PCR Master Mix, 2 µL of primers (10 µmol/L), 1 µL of cDNA, and 5 µL of diethylpyrocarbonate (DEPC) water. The *rpsL* gene, as a reference gene, and the standard strain of *P. aeruginosa* (ATCC 27853), as a reference strain, were used to calculate changes in the expression levels of target genes using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Results: In the current study, 102 *P. aeruginosa* clinical isolates were obtained from men (51%) and 98 isolates from women (49%) patients. These clinical strains were collected from Imam Khomeini (105 strains), Alavi (55 strains), Imam Reza (25 strains), Bu Ali and Sabalan (6 strains each), Fatemi (2 strains), and Qaem (1 strain) hospitals. Additionally, these strains were isolated from urine (n=90, 45%), sputum (n=55, 27.5%), wound (n= 28, 14%), blood (n=26, 13%), and cerebrospinal fluid (n=1, 0.5%) samples. The prevalence of fluoroquinolone-resistant *P. aeruginosa* strains was determined to be 69%. The resistance to different fluoroquinolones was as follows: ciprofloxacin 55.5% (111 out of 200), ofloxacin 62% (93 out of 150),

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.46]

norfloxacin 53.5% (107 out of 200), lomefloxacin 55.3% (57 out of 103), and levofloxacin 55.5% (111 out of 200). Furthermore, 78.9% (109 out of 138), 65.9% (91 out of 138), and 15.2% (21 out of 138) of *P. aeruginosa* strains resistant to fluoroquinolones were multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR), and pandrug-resistant (PDR), respectively. The highest prevalence of the *qnr* genes was related to *qnrB* (2.9%). The frequency of *qnrA*, *qnrC*, *qnrD*, and *qnrS* genes among clinical strains of *P. aeruginosa* resistant to fluoroquinolones in the PCR method was 0%. Additionally, 75% of *P. aeruginosa* strains carrying the *qnrB* gene showed efflux pump genes overexpression and 100% of them down-regulation of the *oprD* gene. All *P. aeruginosa* strains carrying the *qnrB* gene showed resistance to the ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin, lomefloxacin, and levofloxacin antibiotics. These strains also showed mutations in GyrA (Thr83Ile and Asp87Asn) and ParC (Ser87Leu and Ser87Trp) subunits of bacterial enzymes involved in nucleic acid synthesis. ***Conclusion:*** The results of the present study highlight two important points: 1) resistance of clinical isolates of *P. aeruginosa* to fluoroquinolones was high in Ardabil hospitals, and 2) fluoroquinolone resistance was multifactorial. Considering the continuous change of the antibiotic resistance patterns in each region, constant monitoring of the drug resistance trend along with the involved resistance mechanisms are necessary to choose the most appropriate treatment options.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.46]

مجله دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دوره بیست و چهارم، شماره اول، بهار ۱۴۰۳

مقاله اصیل

شیوع ژن‌های مقاومت به کینولون با واسطه پلاسمید در سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا در شمال غرب ایران

مریم نظری[۱]، نیلوفر سائلی[۱،۲]، محسن ارزنلو[۱]، ساغر جعفری- رمدانی[۱،۲]، حافظ میرزانژاد اصل[۱]، فرزاد خادمی[۱،۳*]، آیدا علینژاد[۲]

۱. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۲. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۳. مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله بوسیله بندپایان، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۵۳۴۶۸۴ فاکس: ۰۴۵۳۳۵۳۴۶۸۴ پست الکترونیک: f.khademi@arums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از مهمترین نگرانی‌های جهانی در پزشکی است که بصورت یک چالش بزرگ در درمان عفونت‌های ناشی از پاتوژن‌های مقاوم به دارو تبدیل شده است. برای سالیان طولانی، فلوروکینولون‌های وسیع‌الطیف به‌طور گسترده برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، از جمله سودوموناس آئروژینوزا، استفاده می‌شوند. مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان شیوع و مکانیسم مقاومت به کینولون با واسطه پلاسمید در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا در بیمارستان‌های اردبیل انجام شد.

روش کار: در این مطالعه از ۲۰۰ ایزوله‌ی بالینی سودوموناس آئروژینوزا استفاده شد که طی خرداد ۱۳۹۸ تا اردیبهشت ۱۴۰۲ جمع‌آوری شده بودند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها به آنتی بیوتیک‌های مختلف فلوروکینولون با استفاده از روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. حضور ژن‌های *qnrA*، *qnrB*، *qnrC*، *qnrD* و *qnrS* با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، و بیان ژن‌های کدکننده پمپ‌های ایفلاکس و پورین غشای خارجی، با روش PCR رونویسی معکوس کمی (qRT-PCR)، در میان سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به فلوروکینولون‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: شیوع سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به فلوروکینولون‌ها ۶۹ درصد تعیین شد. میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف فلوروکینولون به شرح زیر بود: سیپروفلوکساسین ۵۵/۵ درصد، افلوکساسین ۶۲ درصد، نورفلوکساسین ۵۳/۵ درصد، لومفلوکساسین ۵۵/۳ درصد، و لووفلوکساسین ۵۵/۵ درصد. همچنین، ۷۸/۹ درصد از این سویه‌ها مقاوم به چند دارو (MDR) بودند. بالاترین شیوع ژن‌های *qnr* مربوط به *qnrB* بود (۲/۹ درصد). ژن‌های دیگر شناسایی نشدند. علاوه بر این، ۷۵ درصد از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا حامل ژن *qnrB* افزایش بیان در ژن‌های کدکننده‌ی پمپ‌های ایفلاکس و ۱۰۰ درصد آن‌ها کاهش بیان در ژن پورین OprD را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با توجه به مقاومت بالای ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا نسبت به فلوروکینولون‌ها در بیمارستان‌های اردبیل و چندفاکتوری بودن مقاومت، نظارت مستمر بر روند مقاومت آنتی‌بیوتیکی به همراه مکانیسم‌های دخیل در مقاومت برای انتخاب مناسب‌ترین گزینه‌های درمانی ضروری هستند.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، فلوروکینولون، پلاسمید، مقاومت

دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲ **پذیرش:** ۱۴۰۳/۳/۱۰

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.46]

این مقاله تحت شرایط Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License قابل بازنشر است.

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا[1] یکی از شایعترین و مهمترین پاتوژن‌های فرصت‌طلب گرم منفی است که باعث عفونت‌های بیمارستانی می‌شود. این باکتری مسئول تعدادی از عفونت‌های فرصت‌طلب از جمله پنومونی، سپتی سمی، عفونت زخم، و عفونت مجاری ادراری می‌باشد [۱-٤]. اما فشار آنتی‌بیوتیکی ناشی از مصرف بی‌رویه آن‌ها منجر به رشد سریع مقاومت باکتریایی شده است که بدلیل مقاومت ذاتی، اکتسابی و انطباقی سودوموناس آئروژینوزا به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها است. این مقاومت دارویی گزینه‌های درمانی علیه عفونت‌های فرصت‌طلب ناشی از این باکتری را به چند آنتی‌بیوتیک محدود کرده است [۱-٤]. در میان این آنتی‌بیوتیک‌ها، فلوروکینولون‌ها یکی از رایجترین داروهای ضدمیکروبی مؤثر در برابر عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا محسوب می‌شوند که آنزیم‌های باکتریایی DNA ژیراز و توپوایزومراز IV را هدف قرار داده و در نهایت از سنتز اسید نوکلئیک ممانعت بعمل می‌آورند [۳]. این آنتی‌بیوتیک‌های قوی و وسیع‌الطیف از اواخر دهه ۱۹۸۰ به دلیل اثربخشی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به‌طور گسترده در پزشکی انسانی برای درمان عفونت‌های شدید یا مقاوم و نیز در دامپزشکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۵]. متأسفانه، در سال‌های اخیر، استفاده بیش از حد از فلوروکینولون‌ها در حوزه پزشکی منجر به افزایش مقاومت باکتریایی به این آنتی‌بیوتیک‌ها و ایجاد یک چالش بزرگ در درمان ضدمیکروبی عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا شده است. از اینرو، نظارت مستمر بر روند حساسیت/مقاومت دارویی برای انتخاب عوامل ضدمیکروبی موثر در درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این باکتری بسیار مهم است [۶].

تحقیقات علمی نشان داده است مقاومت سودوموناس آئروژینوزا به فلوروکینولون‌ها چندفاکتوری بوده و می‌تواند مرتبط با یک یا ترکیبی از موارد زیر باشد: ۱) جهش‌های نقطه‌ای در ژن‌های DNA ژیراز (*gyrA*) و توپوایزومراز IV (*parC*) (QRDR[2])، ۲) حضور ژن‌های پلاسمیدی قابل انتقال مقاومت به کینولون[3] (PMQR)، ۳) جهش در ژن‌های تنظیم کننده بیان پمپ‌های ایفلاکس، و ٤) کاهش بیان پورین‌های غشای خارجی [۳، ۵]. در مطالعه قبلی، ما جهش‌های نقطه‌ای در ژن‌های *gyrA* و *parC* و نقش آن‌ها در ظهور سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به فلوروکینولون‌ها در بیمارستان‌های اردبیل را بررسی کردیم [۳]. با این وجود، مقاومت با واسطه ژن‌های پلاسمیدی PMQR هم به‌عنوان یک مکانیسم رایج در ایجاد مقاومت نسبت به فلوروکینولون‌ها در بین باسیل‌های گرم منفی در نظر گرفته می‌شود.

PMQRبرای اولین بار در سال ۱۹۹۸ بر روی یک پلاسمید در ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه گزارش شد [۷]. تاکنون، سه مکانیسم مقاومت به فلوروکینولون‌ها با واسطه ژن‌های پلاسمیدی PMQR شناسایی شده است که عبارتند از: ژن‌های *qnr* (کدکننده پروتئین‌های Qnr)، آنزیم استیل ترانسفراز *aac(6')-Ib-cr*، واریانتی از آنزیم دخیل در مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، و پمپ‌های ایفلاکس پلاسمیدی مانند QepA و OqxAB [۷]. داده‌های حاصل از آنالیز ساختاری پروتئین Qnr نشان می‌دهد که مقاومت باکتری به فلوروکینولون‌ها با اتصال پروتئین Qnr باکتریایی به آنزیم‌های توپوایزومراز و تداخل فیزیکی در اتصال آنتی‌بیوتیک به این آنزیم‌ها حاصل می‌شود [۵]. علاوه بر پمپ‌های ایفلاکس پلاسمیدی، سیستم‌های ایفلاکس کروموزومی نیز قادر به برداشت فعال فلوروکینولون‌ها و سایر داروها از سلول باکتری هستند [۵]. لازم به ذکر است، جهش‌هایی که منجر به

[1] *Pseudomonas aeruginosa*

[2] Quinolone Resistance Determining Region

[3] Plasmid-mediated Quinolone Resistance

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.46]

کاهش بیان پروتئین‌های پورین در غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی می‌شوند، حداقل غلظت مهاری[1] (MIC) فلوروکینولون‌ها و سایر داروها را افزایش می‌دهند [۵].

اطلاعات کمی در مورد شیوع ژن‌های پلاسمیدی PMQR در بین ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به فلوروکینولون‌ها در سراسر جهان، به ویژه در ایران، وجود دارد [۷]. با توجه به قرار گرفتن ژن‌های مقاومت فلوروکینولونی PMQR روی پلاسمید و اهمیت انتقال ژن‌های مقاومت دارویی بین باکتری‌ها از طریق عوامل ژنتیکی متحرک و از آنجائیکه تاکنون شیوع این ژن‌ها در بیمارستان‌های اردبیل بررسی نشده است، مطالعه حاضر با هدف بررسی شیوع ژن‌های *qnrA*، *qnrB*، *qnrC*، *qnrD* و *qnrS* در میان سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف فلوروکینولونی انجام شد.

روش کار

ایزوله‌های بالینی و تست حساسیت ضدمیکروبی

در این مطالعه از ۲۰۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا که از پنج بیمارستان وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، طی خرداد ۱۳۹۸ تا اردیبهشت ۱۴۰۲ جمع‌آوری شده بودند، استفاده شد. این سویه‌ها قبلا بر اساس آزمایشات فنوتیپی و ژنوتیپی استاندارد شناسایی شده بودند.

پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف فلوروکینولون (سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم، افلوکساسین ۵ میکروگرم، نورفلوکساسین ۱۰ میکروگرم، لومفلوکساسین ۱۰ میکروگرم، و لووفلوکساسین ۵ میکروگرم) (پادتن طب، ایران) با استفاده از روش دیسک دیفیوژن[2] و بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی[3] (CLSI) تعیین شد [۸]. سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به حداقل یک آنتی‌بیوتیک در ≤ ۳ کلاس مختلف آنتی‌بیوتیکی بعنوان مقاوم به چند دارو[4] (MDR) در نظر گرفته شدند [۱]. روش دیسک دیفیوژن بر اساس مطالعه قبلی انجام شد [۱] و از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853) به‌عنوان کنترل کیفیت محیط کشت و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی استفاده شد.

شناسایی ژن‌های مقاومت به فلوروکینولون‌ها

شناسایی مولکولی ژن‌های *qnrA*، *qnrB*، *qnrC*، *qnrD* و *qnrS* در میان سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به فلوروکینولون‌ها با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[5] (PCR) انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه همراه با دمای اتصال پرایمرها به DNA برای شناسایی هر ژن در جدول ۱ آورده شده است. برای انجام PCR، ابتدا DNA ژنومی از سویه‌های بالینی مقاوم به فلوروکینولون سودوموناس آئروژینوزا به روش جوشاندن[6] استخراج و سپس کیفیت آن‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ تایید شد. تکثیر ژن‌ها در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر (۱۰ میکرولیتر مستر میکس PCR (آمپلیکون، دانمارک)، ۳ میکرولیتر DNA الگو، و ۲ میکرولیتر پرایمرها (۱۰ میکرومول در لیتر) (متابیون، آلمان)) انجام شد. تمام واکنش‌های PCR بر اساس شرایط حرارتی زیر انجام شدند: ۱ سیکل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ تا ۳۴ سیکل شامل سه مرحله دناتوراسیون ثانویه DNA در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر به DNA در دماهای مختلف (جدول ۱) به مدت ۱ دقیقه، و مرحله سنتز DNA در دمای ۷۲ درجه

[1] Minimum Ihibitory Concentration
[2] Disk Diffusion Method
[3] Clinical and Laboratory Standards Institute
[4] Multidrug-resistant
[5] Polymerase Chain Reaction
[6] Boiling

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]
[DOI: 10.61186/jarums.24.1.46]

سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه. حضور ژن‌های مقاومت به فلوروکینولون‌ها با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز (۱٪) تایید شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده برای PCR و qRT-PCR همراه با دمای اتصال پرایمر به DNA برای هر ژن

ژن	توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمر	اندازه محصول	دمای اتصال پرایمر	منبع
qnrA	F: ATTTCTCACGCCAGGATTTG R: GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	۵۱۶	۵۳	[۷]
qnrB	F: GATCGTGAAAGCCAGAAAG R: ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	۴۶۹	۵۳	[۹]
qnrC	F: GGGTTGTACATTTATTGAATCG R: CACCTACCCATTTATTTTCA	۳۰۷	۵۰	[۷]
qnrD	F: ATGGAAAAGCACTTTATCAATGA R: ACAATAACACCTAAACTCTCAACAA	۶۳۶	۶۰	[۹]
qnrS	F: TCGGCACCACAACTTTTCAC R: TCACACGCACGGAACTCTAT	۲۵۵	۶۰	[۹]
mexA	F: CCTGCTGGTCGCGATTTCGG R: CCAGCAGCTTGTAGCGCTGG	۳۳۲	۶۴	[۱۰]
mexC	F: TTGGCTATGGCCATCGCGTT R: ATCGAAGTCCTGCTGGCTGA	۳۹۰	۵۹	[۱۰]
mexE	F: ATCCCACTTCTCCTGGCGCT R: GGTCGCCTTTCTTCACCAGT	۲۶۰	۵۹	[۱۰]
mexY	F: CCGCTACAACGGCTATCCCT R: AGCGGGATCGACCAGCTTTC	۲۴۶	۶۲	[۱۰]
oprD	F: CGACCTGCTGCTCCGCAACTA R: TTGCATCTCGCCCCACTTCAG	۳۰۱	۶۴	[۱۱]
rpsL	F: GCTGCAAAACTGCCCGCAACG R: ACCGCAGGTGTCCAGCGAACC	۲۵۰	۶۴	[۱۰]

ارزیابی بیان ژن‌های کدکننده پمپ‌های ایفلاکس و پورین غشای خارجی

سطوح بیان ژن‌های *mexA*، *mexC*، *mexE*، *mexY* و *oprD* در بین سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به فلوروکینولون‌ها و نیز حامل ژن‌های *qnr* با استفاده از روش PCR رونویسی معکوس کمی[1] (qRT-PCR) تعیین شد. توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرها و دمای اتصال آن‌ها به DNA در جدول ۱ نمایش داده شده است. برای این منظور، استخراج RNA توتال با استفاده از معرف TRIZol™ (بایوبیسیک، کانادا) و سنتز cDNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده (یکتا تجهیز آزما، ایران) انجام شد. هر واکنش qRT-PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل ۷ میکرولیتر مستر میکس سایبر گرین (آمپلیکون، دانمارک)، ۲ میکرولیتر پرایمرها (۱۰ میکرومول در لیتر) (متابیون، آلمان)، ۱ میکرولیتر cDNA، و ۵ میکرولیتر دی اتیل پیروکربنات (DEPC) انجام شد. ژن *rpsL*، به‌عنوان ژن مرجع، و سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853)، به‌عنوان سویه مرجع، برای محاسبه تغییرات در سطوح بیان ژن‌های هدف با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شدند [۱۰]. افزایش بیان حداقل ۲ برابری برای ژن *mexA*، ۲ برابری برای ژن *mexC*، ۱۰ برابری برای ژن *mexE*، و ۴ برابری برای ژن *mexY* بعنوان بیان بیش از حد ژن در مقایسه با سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا در نظر گرفته شد [۱۰]. همچنین، یک میزان بیان ≥ ۳۰ درصد در مقایسه با سویه مرجع به‌عنوان کاهش بیان ژن *oprD* در نظر گرفته شد [۱۱].

یافته‌ها

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، در مجموع ۲۰۰ سویه بالینی سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی

[1] Quantitative Reverse Transcription PCR

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.46]

قرار گرفت. تعداد ۱۰۲ مرد (۵۱ درصد) و ۹۸ زن (۴۹ درصد) به باکتری سودوموناس آئروژینوزا آلوده بودند. از این افراد مبتلا، ۹ نفر سن بین ۰ و ۱۲، ۸ نفر سن بین ۱۳ تا ۳۰، ۲۵ نفر سن بین ۳۱ تا ۴۵، ۵۶ نفر سن بین ۴۶ تا ۶۰، ۶۶ نفر سن بین ۶۱ تا ۷۵، و ۳۶ نفر سن بالای ۷۵ سال داشتند.

این سویه‌ها از ۹۰ نمونه ادرار (۴۵٪)، ۵۵ نمونه خلط (۲۷/۵٪)، ۲۸ نمونه زخم (۱۴٪)، ۲۶ نمونه خون (۱۳٪)، و ۱ نمونه مایع مغزی- نخاعی (۰/۵٪) بدست آمدند. سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان‌های امام خمینی (۱۰۵ سویه)، علوی (۵۵ سویه)، امام رضا (۲۵ سویه)، بوعلی و سبلان (هر کدام ۶ سویه)، فاطمی (۲ سویه)، و قائم (۱ سویه) جداسازی شدند. شیوع سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک ۶۹ درصد (۱۳۸ از ۲۰۰) تعیین شد. میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف فلوروکینولون به شرح زیر بود: سیپروفلوکساسین ۵۵/۵ درصد (۱۱۱ از ۲۰۰)، افلوکساسین ۶۲ درصد (۹۳ از ۱۵۰)، نورفلوکساسین ۵۳/۵ درصد (۱۰۷ از ۲۰۰)، لومفلوکساسین ۵۵/۳ درصد (۵۷ از ۱۰۳)، و لووفلوکساسین ۵۵/۵ درصد (۱۱۱ از ۲۰۰). همچنین، ۷۸/۹ درصد (۱۰۹ از ۱۳۸)، ۶۵/۹ درصد (۹۱ از ۱۳۸)، و ۱۵/۲ درصد (۲۱ از ۱۳۸) از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به فلوروکینولون‌ها به ترتیب MDR، XDR[1]، و PDR[2] بودند.

شیوع ژن‌های *qnrA*، *qnrB*، *qnrC*، *qnrD* و *qnrS* در میان سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به فلوروکینولون‌ها در روش PCR به ترتیب ۰ درصد، ۲/۹ درصد (۴ از ۱۳۸)، ۰ درصد، ۰ درصد، و ۰ درصد بود. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، هر ۴ سویه سودوموناس آئروژینوزا حامل ژن *qnrB* مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، نورفلوکساسین، لومفلوکساسین، و لووفلوکساسین را نشان دادند. این سویه‌ها همچنین دارای جهش در زیرواحدهای GyrA (Thr83Ile و Asp87Asn) و ParC (Ser87Leu و Ser87Trp) آنزیم‌های باکتریایی دخیل در سنتز اسید نوکلئیک بودند. قابل ذکر است که ۷۵ درصد از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا حامل ژن *qnrB* افزایش بیان در ژن‌های کدکننده یکی از پمپ‌های ایفلاکس و نیز همه آن‌ها کاهش بیان در ژن پورین OprD را نشان دادند.

[1] Extensively Drug-resistant
[2] Pandrug-resistant

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.46]

جدول ۲. مشخصات سویه‌های *qnrB* مثبت سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به فلوروکینولون‌ها

پورین OprD	مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی (ژنوتیپی)				مقاومت چندداروی	پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی (فنوتیپی)	بیمارستان	نوع نمونه	شماره ایزوله
	افزایش بیان پمپ‌های ایفلاکس	QRDR		PMQR					
		parC	*gyrA*						
کاهش بیان	*mexA, mexC, mexY*	Ser87Leu Ser87Trp	Thr83Ile Asp87Asn	*qnrB*	MDR	OFX, CIP, NOR, LOM, LVX, IPM, MEM, GEN, AMK, TOB, PIP, FEP	سبلان	ادرار	۲۹
کاهش بیان	*mexY*	Ser87Leu Ser87Trp	Thr83Ile Asp87Asn	*qnrB*	MDR	OFX, CIP, NOR, LOM, LVX, IPM, MEM, GEN, AMK, TOB, PIP, FEP, CAZ, TZP	علوی	خلط	۳۸
کاهش بیان	*mexA, mexC, mexY*	Ser87Leu Ser87Trp	Thr83Ile Asp87Asn	*qnrB*	MDR	OFX, CIP, NOR, LOM, LVX, IPM, MEM, GEN, AMK, TOB, PIP, FEP, NET, CAZ, TZP	علوی	خلط	۶۵
کاهش بیان		Ser87Leu Ser87Trp	Thr83Ile Asp87Asn	*qnrB*	MDR	OFX, CIP, NOR, LOM, LVX, IPM, MEM, GEN, AMK, TOB, PIP, FEP, NET, CAZ	علوی	ادرار	۶۶

اختصارات: سیپروفلوکساسین: CIP، افلوکساسین: OFX، نورفلوکساسین: NOR، لومفلوکساسین: LOM، لووفلوکساسین: LVX، ایمیپنم: IPM، مروپنم: MEM، جنتامایسین: GEN، آمیکاسین: AMK، توبرامایسین: TOB، پیپراسیلین: PIP، سفپیم: FEP، نتیل مایسین: NET، سفتازیدیم: CAZ، پیپراسیلین-تازوباکتام: TZP.

بحث

ظهور سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به آنتی‌بیوتیک چالش‌های درمانی قابل توجهی را ایجاد کرده است. در ایالات متحده، آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولونی، سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین، فعالیت ضدسودوموناسی قوی در شرایط آزمایشگاهی از خود نشان می‌دهند. با این حال، به دلیل استفاده گسترده از آن‌ها در دهه گذشته به‌عنوان رایجترین کلاس آنتی‌بیوتیکی تجویز شده برای بزرگسالان، مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها به

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.46]

موازات محبوبیت آن‌ها در درمان ایجاد شده است [۱۲]. در مطالعه حاضر، شیوع کلی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به فلوروکینولون‌ها ۶۹ درصد بود (سیپروفلوکساسین ۵۵/۵٪، افلوکساسین ۶۲٪، نورفلوکساسین ۵۳/۵٪، لومفلوکساسین ۵۵/۳٪، و لووفلوکساسین ۵۵/۵٪) که بالاتر از مطالعه ساکی و همکاران در اهواز، ایران (۶۴/۹٪) و دو مطالعه ی دیگر از مصر (۵۷/۲٪) و عربستان (۴۲/۴٪) بود [۷]. یادآور می‌شود میزان مقاومت باکتری به سیپروفلوکساسین (۵۵/۵٪) در این مطالعه بالاتر از متوسط کشوری بود (۴۷/۳٪) [۱۳]. این میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین بالاتر از گزارشات انتشار یافته از زاهدان (۳/۴٪)، همدان (۴/۷٪)، زنجان (۳۲/۵٪)، ارومیه (۳۴/۲٪)، و اهواز (۴۶/۸٪)، اما کمتر از استان‌های تهران (۸۱/۵٪)، اصفهان (۷۸/۷٪)، گیلان (۶۶/۳٪)، و تبریز (۶۵٪) بود [۱۳]. موضوع نگران‌کننده این است که بخش قابل توجهی از این سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها مقاومت چندداروی را هم نشان می‌دهند [۱۲]. در این مطالعه، ۷۸/۹ درصد از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به فلوروکینولون‌ها MDR بودند.

عناصر ژنتیکی متحرک حامل ژن‌های مقاومت می‌توانند حساسیت میکروارگانیسم‌ها به کینولون‌ها یا فلوروکینولون‌ها را کاهش دهند. این‌ها اغلب بر روی پلاسمیدها کدگذاری می‌شوند [۵]. این مطالعه اولین گزارش از حضور ژن‌های پلاسمیدی *qnr* در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به فلوروکینولون‌ها جدا شده از بیمارستان‌های اردبیل بود. در این مطالعه، ژن *qnrB* تنها ژن پلاسمیدی *qnr* بود که در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به فلوروکینولون‌ها شناسایی شد (۲/۹٪). نتیجه مشابهی توسط میکالسکا[1] و همکاران از لهستان گزارش شد [۱۴]. همچنین، در مطالعه ساکی و همکاران، ژن *qnrB* شایعترین نوع *qnr* در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا در اهواز بود (۲۹/۲٪) [۷]. نتایج مغایر با یافته‌های مطالعه حاضر نیز گزارش شده است. برای مثال، در مطالعه انجام شده توسط مولاپور و همکاران در شهر تهران، هیچ ژنی از ژن‌های پلاسمیدی *qnr* در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کینولون یافت نشد [۱۵].

قابل ذکر است مقاومت سودوموناس آئروژینوزا نسبت به فلوروکینولون‌ها عمدتاً مرتبط با جهش در ژن‌های ناحیه QRDR است [۱۲]. مقایسه نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های حاصل از مطالعه قبلی محققین (جدول ۲) ضمن تایید این مطلب نشان داد که در همه سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا حامل ژن *qnrB* جهش در زیرواحدهای GyrA (Thr83Ile و Asp87Asn) و ParC (Ser87Leu و Ser87Trp) در مقاومت باکتری به سیپروفلوکساسین نقش دارد [۳].

مکانیسم‌های دیگر مقاومت عبارتند از بیان بیش از حد پمپ‌های ایفلاکس و همچنین نفوذناپذیری ذاتی دیواره سلولی باکتری. پمپ‌های ایفلاکس در ظهور باکتری‌های مقاوم به چند دارو نقش دارند. آن‌ها انواع مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی مانند رنگ‌ها، حلال‌های آلی، دترجنت‌ها، مولکول‌های دخیل در ارتباط سلول- سلول، بیوسیدها، و محصولات متابولیک را دفع می‌کنند [۱۶]. تنها ۵ نوع از ۱۲ نوع پمپ ایفلاکس شناخته شده در سودوموناس آئروژینوزا در مقاومت به طیفی وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها نقش دارند. این پمپ‌ها شامل MexAB-OprM، MexCD-OprJ، MexEF-OprN، MexXY-OprM، و MexJK-OprM هستند [۱۰]. سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین، و لووفلوکساسین سوبسترای اختصاصی برای پمپ‌های MexAB-OprM، MexCD-OprJ، MexEF-OprN، و MexXY-OprM هستند [۱۷]. نتایج مطالعه حاضر که در جدول ۲ آورده شده است مطالب مذکور را تایید می‌کند. بر اساس نتایج جدول ۲، مکانیسم احتمالی

[1] Michalska

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.46]

مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های افلوکساسین و لومفلوکساسین مرتبط با حضور ژن *qnrB*، جهش در ژن‌های ناحیه QRDR و یا کاهش بیان پورین OprD می‌باشد.

از دست دادن یا کاهش بیان پورین OprD رایجترین مکانیسم مقاومت سودوموناس آئروژینوزا در برابر ایمیپنم است [۱۱]. با این حال، در این مطالعه سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به فلوروکینولون‌ها (حامل ژن *qnrB*) هم کاهش بیان در ژن پورین OprDرا نشان دادند. بررسی پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به فلوروکینولون‌ها در جدول ۲ نشان می‌دهد که این باکتری‌ها علاوه بر فلوروکینولون‌ها به کارباپنم‌ها هم مقاوم هستند. علاوه بر این، پمپ‌های ایفلاکس نیز در خروج مروپنم (MexAB-OprM) و ایمیپنم (MexEF-OprN) از سلول دخالت دارند. بنابراین، اثبات نقش پورین OprD در مقاومت باکتری به فلوروکینولون‌ها نیاز به بررسی دقیق‌تر دارد.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر دو نکته مهم را تایید می‌کند: ۱) مقاومت ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا نسبت به فلوروکینولون‌ها در اردبیل بالا است و ۲) مقاومت به فلوروکینولون‌ها چندفاکتوری است. با توجه تغییر مداوم الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در هر منطقه، بررسی مستمر مقاومت آنتی‌بیوتیکی به همراه مکانیسم‌های دخیل در مقاومت به منظور انتخاب مناسب‌ترین گزینه‌های درمانی علیه عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا ضروری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از طرح کمیته تحقیقات دانشجویی و مصوب معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، با کد سند ۴۰۱۰۰۰۵۰۹ و کد اخلاق IR.ARUMS.REC.1403.015 می‌باشد.

References

1- Bazghandi SA, Safarirad S, Arzanlou M, Peeri-Dogaheh H, Ali-Mohammadi H, Khademi F. Prevalence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in Ardabil. J Ardabil Univ Med Sci. 2020;20(2):280-6. [Full text in Persian]

2- 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):1-7.

3- Khademi F, Maarofi K, Arzanlou M, Peeri-Dogaheh H, Sahebkar A. Which missense mutations associated with DNA gyrase and topoisomerase IV are involved in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates resistance to ciprofloxacin in Ardabil?. Gene Rep. 2021;24:101211.

4- Khademi F, Ashrafi SS, Neyestani Z, Vaez H, Sahebkar A. Prevalence of class I, II and III integrons in multidrug-resistant and carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Gene Rep. 2021;25:101407.

5- Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. Trends Microbiol. 2014;22(8):438-45.

6- Yang X, Xing B, Liang C, Ye Z, Zhang Y. Prevalence and fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital of South China. Int J Clin Exp Med. 2015;8(1):1386.

7- Saki M, Farajzadeh Sheikh A, Seyed-Mohammadi S, Asareh Zadegan Dezfuli A, Shahin M, Tabasi M, et al. Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimens in southwest Iran: a multicentral study. Sci Rep. 2022;12(1):2296.

8- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 31th ed. Wayne, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023. Available from: https://webstore.ansi.org/

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.46]

standards/clsi/clsim100ed31?gad_source=1&gclid=CjwKCAjw34qzBhBmEiwAOUQcF_X3clYuNfv_8czNc9HxFJmfu9YdDd7GusT0aKzjgy5nluR9x77kHxoCF7sQAvD_BwE
9- Neyestani Z, Khademi F, Teimourpour R, Amani M, Arzanlou M. Prevalence and mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients, healthy carriers, and wastewaters in Iran. BMC Microbiol. 2023;23(1):191.
10- Yousefi S, Nazari M, Ramazanzadeh R, Sahebkar A, Safarzadeh E, Khademi F. Association of carbapenem and multidrug resistance with the expression of efflux pump-encoding genes in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Acta Microbiol Immunol Hung. 2023;70(2):161-6.
11- Nazari M, Ahmadi H, Hosseinzadeh S, Sahebkar A, Khademi F. Imipenem resistance associated with amino acid alterations of the OprD porin in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Acta Microbiol Immunol Hung. 2023;70(3):206-212.
12- Agnello M, Wong-Beringer A. Differentiation in quinolone resistance by virulence genotype in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS ONE. 2012;7(8):e42973.
13- Vaez H, Salehi-Abargouei A, Ghalehnoo ZR, Khademi F. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Iran: A systematic review and metaanalysis. J Global Infect Dis. 2018;10:212-7.
14- Michalska AD, Sacha PT, Ojdana D, Wieczorek A, Tryniszewska E. Prevalence of resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones among *Pseudomonas aeruginosa* strains in a University Hospital in Northeastern Poland. Braz J Microbiol. 2014;45:1455-8.
15- Molapour A, Peymani A, Saffarain P, Habibollah-Pourzereshki N, Rashvand P. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in Tehran, Iran. Infect Disord Drug Targets. 2020;20(1):49-55.
16- Askoura M, Mottawea W, Abujamel T, Taher I. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. Libyan J Med. 2011;6(1):1-8.
17- Aeschlimann JR. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria: insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. Pharmacother. 2003;23(7):916-24.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.46]