بررسی مقاومت فلوروکینولونی وابسته به فعالیت پمپ افلاکس Mex-oprM در سویه‌های مقاوم چندگانه دارویی سودوموناس ائروجینوزا با استفاده از ممانعت‌گر کربونیل سیانید m–کلروفنیل هیدرازون (CCCP)

- **مهیا شهرابی**: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی ورامین، ایران
- **سحر هنرمندجهرمی***: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی ورامین، ایران
- **روزبه یلفانی**: گروه پرستاری، دانشکده پزشکی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی ورامین، ایران

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٦ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٦

چکیده

از مشکلات مهم عفونت‌های بیمارستانی مرتبط با سودوموناس ائروجینوزا مقاومت چند دارویی است. پمپ‌های تراوشی باکتری قادر هستند طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها و دترجنت‌ها را به خارج از سلول تراوش کنند. هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت پمپ افلاکس در سویه‌های مقاوم چندگانه دارویی سودوموناس آئروجینوزا ی مقاوم به فلوروکینولون‌ها است. مطالعه بر روی٥٠ ایزوله سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان میلاد تهران انجام گرفت. پس از شناسایی جدایه‌ها با انجام آزمون‌های بیوشیمایی، حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار در دیسک و طبق استاندارد CLSI ٢٠١٧ تعیین شد. پس از تعیین سویه‌های مقاوم چند دارو، کم‌ترین غلظت مهارکنندگی رشد آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین تعیین شد و با استفاده از کربونیل سیانید m-کلروفیل هیدرازون (CCCP) فعالیت پمپ افلاکس جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. ٣٤٪ سویه MDR سودوموناس آئروجینوزا که به بیش از دو کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاوم بودند، شناسایی شدند. با روش ممانعت‌گر CCCP برای سویه‌های MDR، ٢سویه برای آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و ٣سویه برای آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین کاهش ٤ برابری و یا بیش از ٤برابر MIC پس از تاثیر ممانعت‌گر CCCP داشته‌اند. فراوانی سویه‌های MDR سودوموناس آئروجینوزا مورد مطالعه پایین است. تنها ٤ ایزوله از بین سویه‌های MDR فعالیت پمپ افلاکس داشتند. بنابراین پمپ افلاکس مکانیسم اصلی برای مقاومت به سیپروفلوکساسین ولووفلوکساسین در بین این ایزوله‌ها نیست و برای مطالعات بعدی بررسی سایر مکانیسم‌های مقاومت فلورو کینولونی توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: پمپ افلاکس، سودوموناس آئروجینوزا، مقاوم چندگانه دارویی، CCCP

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:sahar_hj2@yahoo.com

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی از جمله مشکلات مهم پزشکی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه محسوب می‌شوند (Arvanitidou و همکاران، ۲۰۰۵). سوودوموناس آئروجینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) عامل ۹٪ عفونت‌های بیمارستانی و سومین عامل عفونت‌های بیمارستانی بعد از استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی است. این باکتری به‌طور وسیعی در طبیعت پراکنده بوده و برای انسان‌ها یک پاتوژن فرصت‌طلب محسوب می‌شود که اغلب منجر به عفونت‌های بیمارستانی خطرناک در افراد با سیستم ایمنی تضعیف شده می‌گردد (Jefferies و همکاران، ۲۰۱۲؛ Quinn و همکاران، ۲۰۱۱). امروزه معضل مهم درمان عفونت‌های سودوموناسی، مقاومت بالای این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی است که از نظر ساختاری و عملکردی هیچ شباهتی به یکدیگر ندارند (Quinn و همکاران، ۲۰۱۱). باکتری‌های گرم منفی به‌خصوص سودوموناس آئروجینوزا مقاومت ذاتی به پنی‌سیلین و اکثر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام دارند ولی به آنتی‌بیوتیک‌های پیپراسیلین، سیپروفلوکساسین، توبرامایسین و ایمی‌پنم حساسیت نشان می‌دهند و با مصرف زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها پیدایش سویه‌های سودوموناس ائروجینوزا مقاوم چندگانه دارویی (MDR) در سراسر جهان به‌طور افزاینده‌ای افزایش یافته است (Chanawong و همکاران، ۲۰۰۱). ایجاد مقاومت چند دارویی باکتری توسط سازوکارهای مختلفی مانند تولید آنزیم سفالوپوریناز (به‌دلیل وجود ژن AmpC)، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز، کاهش نفوذپذیری غشای خارجی، سنتز آنزیم‌هایی مانند فسفریل ترانسفرازها و استیل‌ترانسفرازها (مقاومت به آمینوگلیکوزیدها) و هم‌چنین تغییر در توپوایزومراز II و IV (مقاومت به کینولون‌ها) است (Poole، ۲۰۰۰). به‌علاوه پمپ‌های ارسال دارو به خارج یا پمپ‌های تراوشی (Efflux pumps) نیز از مکانیسم‌های مهم بروز مقاومت چندگانه دارویی هستند (Van Bambeke و همکاران، ۲۰۰۰). سیستم‌های افلاکس مکانیسم‌های مهمی هستند که توسط باکتری به‌کار گرفته می‌شود تا از اثرات زیان بار آنتی‌بیوتیک‌ها در امان باشند. سودوموناس ائروجینوزا پتانسیل بیان ۱۲ نوع پمپ تراوشی چند دارویی را دارد که از این میان ۵ پمپ MexAB-oprM. MexCD-oprY .MexEF-oprN. MexXY-oprM . MexJK-oprM از مهم‌ترین عوامل مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها به‌شمار می‌روند. MexAB-oprM تنها در سویه‌های وحشی سودوموناس ائروجینوزا بیان می‌شود و در مقاومت ذاتی این باکتری نقش دارد. سایر پمپ‌ها در اثر جهش بیان شده و در مقاومت اکتسابی این باکتری نقش دارند (Nehme و Poole، ۲۰۰۷). سیستم انتقالی Mex به خانواده RND (Resistance Nodulation Division cell family) تعلق دارد. اعضای این خانواده با به‌کارگیری نیروی محرکه پروتونی غشا ترکیبات ضدمیکروبی را از سلول خارج می‌کند (Mahamoud و همکاران، ۲۰۰۷).پمپ mexAB-oprM عامل مقاومت به‌بتالاکتام‌ها،فلوروکینولون‌ها،تتراسایکلین، ماکرولیدها، کلرامفنیکل، نوبیوسین و تری متوپریم می‌باشد. هم‌چنین قادر است طیف وسیعی از رنگ‌ها، دترجنت‌ها، مهارکننده‌های بیوسنتز اسیدچرب و حلال‌های آلی را تراوش نماید (Nehme و Poole، ۲۰۰۷). مطالعات نشان داده که پمپ‌های افلاکس می‌توانند میزان نفوذ پذیری غشاهای باکتریایی را برای خروج آنتی‌بیوتیک به بیرون تغییر دهند بنابراین منجر به کاهش غلظت درون سلولی آنتی‌بیوتیک‌ها و درنهایت مقاومت به آن‌ها می‌شوند (Wang و همکاران، ۲۰۰۱). مطالعات زیادی بر روی افزایش در میزانMIC آنتی‌بیوتیک‌ها پس از وقوع بیان ژن‌های پمپ‌های افلاکس برای کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیک صورت گرفته است و بروز مقاومت چندگانه دارویی توسط این پمپ‌ها را در برخی سویه‌های باکتریایی را به‌اثبات رسانده است (Wang و همکاران، ۲۰۰۱). یکی از روش‌های تعیین فعالیت پمپ‌های افلاکس استفاده از مهارکننده‌ها یا ممانعت‌گرهای پمپ افلاکس می‌باشد (Amaral و Fanning، ۲۰۱۱؛ Kristiansen و Amaral، ۱۹۹۷) که از مهم‌ترین این ترکیبات مسدود کننده پمپ‌های افلاکس، ممانعت‌گر کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون (CCCP۲) است که به‌طور وسیعی برای باکتری‌های گرم منفی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این مهارکننده با مهار دسترسی پمپ‌های افلاکس خانواده RND به انرژی ایجاد شده توسط نیروی محرکه پروتون عمل می‌کند (Ren و Paulsen، ۲۰۰۵). هدف از انجام این تحقیق بررسی فعالیت فنوتیپی پمپ افلاکس سویه‌های سودوموناس آئروجینوزای مقاوم به فلوروکینولون‌ها با استفاه از ممانعت‌گر CCCP است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و شناسایی باکتری‌ها: این مطالعه بر روی ۵۰ جدایه سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از ۱۵۰نمونه بالینی شامل ادرار، زخم، مدفوع و خون بیماران مراجعه کننده به بیمارستان میلاد تهران به‌صورت سرپایی و بستری از تاریخ ۱۸ دی ۱۳۹۵ تا اردیبهشت ۱۳۹۶ انجام گرفت. نمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت بلاد

آگار و EMB آگار و مک کانکی آگار کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸-۲۴ گرمخانه‌گذاری گردید. جدایه‌های سودوموناس آئروجینوزا با انجام آزمون‌های بیوشیمیایی مانند کشت در محیط‌های TSI، SIM، MRVP و سیمون سیترات و اوره آز و رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد شناسایی شدند.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های سودوموناس آئروجینوزا با روش استاندارد انتشار در دیسک و براساس استاندارد CLSI ۲۰۱۶ بر روی محیط مولرهینتون آگار (Merck, Germany) تعیین شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده شامل سفتازیدیم (CAZ) ۳۰میکروگرم، سیپروفلوکساسین (CP) ۵ میکروگرم، ایمی‌پنم (IPM) ۱۰ میکروگرم، پیپراسیلین (PIP) ۱۰۰ میکروگرم، تیکارسیلین (TIC) ۷۵میکروگرم، جنتامایسین(GM) ۱۰ میکروگرم، آمیکاسین(AN) ۳۰ میکروگرم، لووفلوکساسین(LOM) ۵ میکروگرم، آزترونام(AZT) ۳۰ میکروگرم و مروپنم (MEN) ۱۰ میکرو گرم (شرکت پادتن طب ایران) بودند. بعد از ۲۴-۱۸ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک نتایج به‌صورت حساس (S)، نیمه‌حساس (I) و مقاوم (R) تعیین گردید. سویه‌هایی که به ۳ و بیش از ۳کلاس آنتی بیوتیکی مقاوم بودند به‌عنوان سویه MDR درنظر گرفته شدند. سویه استاندارد سودوموناس آئروجینوزا ATCC27853 (توسط مرکز علمی پژوهشی ایران) به‌عنوان کنترل کیفی استفاده شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکننده آنتی‌بیوتیک (MIC= Minimum inhibitory concentration): ابتدا آزمایش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد با روش میکروایلوشن براث و رقت‌سازی در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای براساس استانداردCLSI۲۰۱۶برای آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین با سه تکرار انجام شد. به چاهک‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث (مرک آلمان)به‌همه چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از استوک آنتی‌بیوتیک به چاهک‌های ردیف اول افزوده و به‌روش میکرودایلوشن براث تا چاهک آخر ادامه داده و در نهایت به همه چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از کشت میکروبی جدایه‌های سودوموناس آئروجینوزا پس از رساندن غلظت سوسپانسیون معادل نیم مک‌فارلند و تهیه رقت ۱ به ۱۰۰ از سوسپانسیون اضافه شد. در مورد چاهک کنترل مثبت، که شامل محیط کشت و سوسپانسیون باکتری می‌باشد، از نظرکدورت یا رشد بیش‌تر از۲ میلی‌متر که نشان دهنده رشد کافی در چاهک می‌باشد، باید مشاهده شود و برای چاهک کنترل منفی،که شامل محیط کشت و آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه است از نظر عدم وجود رشد، بررسی می‌شود.

بررسی فعالیت پمپ افلاکس در ایزوله‌های سودوموناس آئروجینوزا با استفاده از ممانعت‌گر CCCP: روش فنوتیپی برای تشخیص بیان بیش از حد پمپ‌های افلاکس برای آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین در سویه‌های مورد مطالعه، استفاده از ممانعت‌گر پمپ افلاکس کربونیل سیانید ۳-کلروفنیل هیدرازون (CCCP) (شرکت سیگما آمریکا) به‌صورت سینرژیک با آنتی‌بیوتیک‌ها است. برای این منظور پس از تعیین MIC آنتی‌بیوتیک‌ها یک‌بار بدون ممانعت‌گر، برای بار دوم به چاهک‌های میکرو تیتر پلیت حاوی محیط مولر هینتون براث، سوسپانسیون میکروبی و رقت‌های آنتی‌بیوتیکی، و ممانعت‌گر CCCP با غلظت نهایی ۲۵ میکروگرم/میکرولیتر اضافه شد. یک چاهک به‌عنوان کنترل مثبت (سوسپانسیون باکتری بدون آنتی‌بیوتیک به‌همراه غلظت ذکر شده CCCP در همه خانه‌ها) و یک چاهک به‌عنوان کنترل منفی (سوسپانسیون باکتری به‌همراه آنتی بیوتیک به‌همراه غلظت ذکر شده CCCP در همه خانه‌ها) درنظرگرفته شد. سویه استاندارد ۲۷۸۵۳*P. aeruginosa* ATCC به‌عنوان کنترل مثبت درنظر گرفته شد. کاهش MIC آنتی‌بیوتیک‌ها پس از ممانعت‌گر CCCP نسبت به MIC قبل از ممانعت‌گر به‌میزان ۴ برابر نشان‌دهنده فعالیت پمپ افلاکس است.

آنالیز آماری: آنالیز آماری داده با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد.آزمون مربع کای(x2)جهت بررسی اختلاف معنی‌داری فعالیت پمپ افلاکس برای آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین در جدایه‌های سودوموناس آئروجینوزا استفاده شد. سطح معنی‌داری کم‌تر از ۰/۰۵ درنظر گرفته شد.

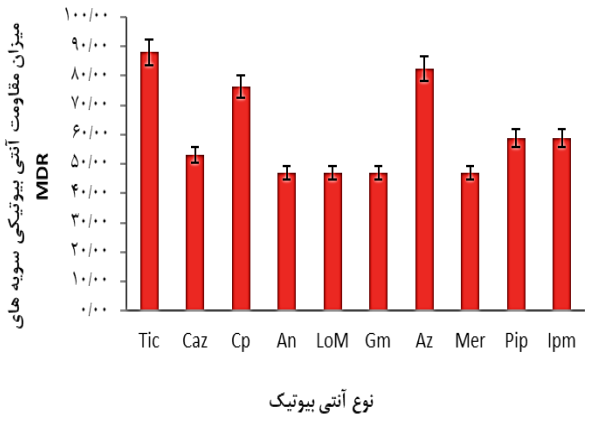
نتایج

پس از انجام آنتی‌بیوگرام ۵۰ جدایه سودوموناس آئروجینوزا، بیش‌ترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای آنتی‌بیوتیک‌های تیکارسیلین (۴۸٪) و ایمی‌پنم (۳۶٪) و بیش‌ترین حساسیت برای آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۸۴٪) گزارش شد (جدول۱). سویه‌هایی که به سه و بیش از ۳ کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاوم بودند به‌عنوان سویه سودوموناس ائروجینوزای MDR درنظر گرفته شدند. ۱۷ سویه MDR و ۳۳ سویه غیرMDR گزارش شد.

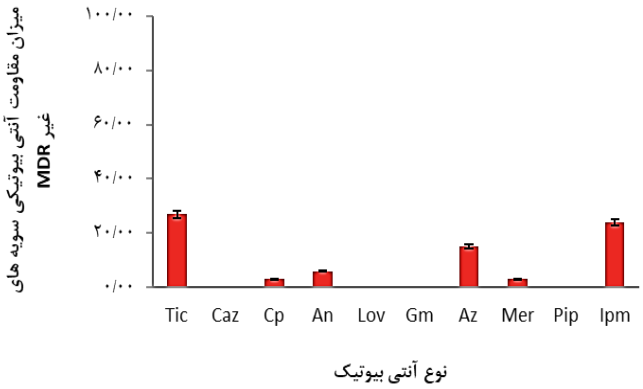
جدول۱: تعیین درصد فراوانی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری سودوموناس آئروجینوزا (تعداد کل نمونه‌ها ۵۰)

آنتی‌بیوتیک‌ها	حساس	نیمه‌حساس	مقاوم
TIC	۷ (۱۴ ٪)	۱۹ (۳۸ ٪)	۲۴ (۴۸ ٪)
CAZ	۳۷ (۴۷ ٪)	۴ (۸ ٪)	۹ (۱۸ ٪)
CP	۳۶ (۷۲ ٪)	۰	۱۴ (۲۸ ٪)
AN	۳۵ (۷۰ ٪)	۵ (۷ ٪)	۱۰ (۲۰ ٪)
LOM	۳۲ (۶۴ ٪)	۸ (۱۶ ٪)	۱۰ (۲۰ ٪)
GM	۴۲ (۸۴ ٪)	۰	۸ (۱۶ ٪)
AZT	۲۵ (۵۰ ٪)	۶ (۱۲ ٪)	۹ (۱۸ ٪)
MEN	۳۳ (۶۶ ٪)	۸ (۱۶ ٪)	۹ (۱۸ ٪)
PIP	۳۱ (۶۲ ٪)	۹ (۱۸ ٪)	۱۰ (۲۰ ٪)
IPM	۲۳ (۴۶ ٪)	۹ (۱۸ ٪)	۱۸ (۳۶ ٪)

مقایسه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های MDR و غیر MDR نشان داد که بیش‌ترین میزان مقاومت به همه آنتی‌بیوتیک‌ها در جدایه‌های MDR مشاهده می‌شود و جدایه‌های غیرMDR کم‌ترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه دارند (شکل‌های ۱ و ۲). آنالیز آماری بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و سویه‌های MDR سودوموناس آئروجینوزا ارتباط معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۱). نتایج MIC آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین در ۱۷ سویه MDR سودوموناس آئروجینوزا نشان داد که MIC آنتی‌بیوتیک‌ها برای نیمی از جدایه‌ها بالا (>۶۴) است که نشان‌دهنده میزان مقاومت بالای این جدایه‌ها می‌باشد.



شکل۱: نمودار الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های MDR سودوموناس آئروجینوزا



شکل۲: نمودار الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های غیرMDR سودوموناس آئروجینوزا

از بین ۱۴ سویه MDR مقاوم به سیپروفلوکساسین، نتایج MIC آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در حضور ممانعت‌گر CCCP برای دو سویه (۷و ۳۴) کاهش ۴ برابری نسبت به MIC قبل از ممانعت‌گر نشان داد و از بین ۸ سویه MDR مقاوم به لووفلوکساسین، نتایج MIC آنتی‌بیوتیک لووفلوکساسین در حضور ممانعت‌گر CCCP برای سه سویه (۳۴، ۴۴و ۴۹) کاهش ۴ برابری نشان داد (جدول۲).

یک سویه پس از تعیین MIC با حضور ممانعت‌گر برای آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین به‌ترتیب کاهش MIC ۳۲ برابری و ۱۲۸ برابری نشان داد. سویه شماره ۳۴ به‌عنوان سویه با بیان بیش از حد فعالیت پمپ افلاکس درنظر گرفته شد(جدول۲). آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌دار بین آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین از نظر فعالیت پمپ افلاکس سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا وجود ندارد (p>۰/۰۵).

جدول۲: میزان کاهش MIC آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین پس از حضور ممانعت‌گرCCCP در مقایسه با MIC قبل از ممانعت‌گر

شماره نمونه	MIC CP	CCCP	میزان کاهش MIC	MIC LOM	CCCP	میزان کاهش MIC
۶	>۶۴	>۶۴	۱	>۶۴	۶۴	۱
۷	۶۴	۱۶	*۴	۳۲	۱۶	۲
۸	۱۶	۱۶	۱	۱	۱	۱
۹	۶۴	۶۴	۱	۶۴	۶۴	۱
۱۰	۶۴	۶۴	۱	۴	۴	۱
۱۴	۶۴	۶۴	۱	۶۴	۶۴	۱
۱۹	۱۶	۱۶	۱	۲	۲	۱
۲۲	۱۶	۱۶	۱	۱	۱	۱
۲۵	>۶۴	>۶۴	۱	>۶۴	>۶۴	۱
۳۲	۰/۵	۱	۰/۵	۱	۰/۵	۲
۳۴*	>۶۴	۲	*۳۲	>۶۴	۰/۵	*۱۲۸
۳۶	۸	۸	۱	۴	۴	۱
۴۰	۸	۸	۱	۴	۴	۱
۴۱	۲	۲	۱	۲	۴	۰/۵
۴۴	۲	۲	۱	۱۶	۴	*۴
۴۸	۳۲	۱۶	۲	۲	۲	۱
۴۹	۱۶	۸	۲	۳۲	۸	*۴

بحث

مقاومت چندگانه دارویی یا MDR که امروزه در بسیاری از جدایه‌های مهم باکتریایی از نظر بالینی گزارش شده تبدیل به یک نگرانی عمده در سراسر جهان گردیده و علی‌رغم آنتی‌بیوتیک‌های موجود، از فقدان انتخاب‌های درمانی مناسب برای این نوع عفونت‌ها حکایت دارد (Piddock، ۲۰۰۶؛ Ren و Paulsen، ۲۰۰۵). امروزه سطح مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در سودوموناس آئروجینوزا در حال افزایش است. این نوع مقاومت چند دارویی می‌تواند به‌وسیله حضور هم‌زمان چندین مکانیسم مقاومت ایجاد شود. سیستم‌های افلاکس که طیف وسیعی از ترکیبات ضدمیکروبی را از باکتری با یک روش وابسته به انرژی بدون تغییر در دارو بیرون می‌رانند، در بروز فنوتیپ MDR پاتوژن‌های باکتریایی سهیم هستند (Tenover، ۲۰۰۶؛ Saier Jr و Paulsen، ۲۰۰۱). نقشی که سیستم‌های افلاکس در مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های MDR ایفا می‌کنند موضوع مهمی است که در سال‌های اخیر به‌طور وسیعی مورد بحث قرار گرفته است (Tenover، ۲۰۰۶؛ Kumar و Schweizer، ۲۰۰۵). در این تحقیق فراوانی سویه‌های MDR سودوموناس آئروجینوزا ۳۴٪ بود و مقاومت این سویه‌ها نسبت به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در مقایسه با سویه‌های غیرMDR بالا گزارش شد. در مطالعه‌ای که Ali و همکاران (۲۰۱۴) بر روی شیوع سویه‌های MDR سودوموناس آئروجینوزا در پاکستان انجام دادند، نشان داده شد ۷۷/۵ درصد از آن‌ها به درمان بیش از سه نوع آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. روند مشابه در مورد باکتری سودوموناس آئروجینوزا در ایران ۷۷ درصد (Farshad و همکاران، ۲۰۱۲) و در هند ۹۲ درصد (Akram و همکاران، ۲۰۰۷) و در اسلوونی ۴۲ درصد (Tajbakhsh و همکاران، ۲۰۱۶) و در امریکا ۷/۱ درصد (Sotto و همکاران، ۲۰۰۱) بوده است. در برخی کشورها مانند پاکستان میزان شیوع بالایی از سویه MDR دیده می‌شود (Ali و همکاران، ۲۰۱۴). در مطالعه‌ای که توسط Rodrigues و همکاران (۲۰۰۹) در انگلستان صورت گرفت نشان از افزایش ۶۱ ٪ شیوع MDR سودوموناس آئروجینوزا بود. در مطالعه‌ای که Saderi و همکاران (۲۰۱۰) بر روی سویه MDR سودوموناس آئروجینوزا انجام دادند به این نتیجه رسیدند که درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی به آمیکاسین، جنتامایسین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین به‌ترتیب برابر با ۷۳٪، ۸۶٪، ۷۳٪ و ۵۵٪ است. با توجه به این‌که مقاومت چندگانه دارویی می‌تواند نتیجه تجلی بیش از حد سیستم‌های پمپ افلاکس باکتریایی باشد (Piddock، ۲۰۰۶). نیاز به تکوین و پیاده‌سازی روش‌های نوین و تأیید شده برای شناسایی سریع فنوتیپ‌های مقاوم به چنددارو به‌واسطه افلاکس وجود دارد (Viveiros و همکاران، ۲۰۰۸). در این تحقیق ممانعت‌گر CCCP جهت بررسی فعالیت پمپ‌های افلاکس باکتری سودوموناس آئروجینوزا مورد استفاده قرار گرفت. به‌طوری‌که MIC آنتی‌بیوتیک‌های لووفلوکساسین و سیپروفلوکساسین در سویه‌های MDR مورد مطالعه یک‌بار قبل و یک‌بار پس از تاثیر ممانعت‌گر مورد مقایسه قرار گرفت. سویه‌هایی که پس از تاثیر ممانعت‌گر تا ۴ برابر کاهش داشتند دارای فعالیت قوی پمپ افلاکس برای خارج راندن آنتی‌بیوتیک مورد نظر بودند. در بین ۱۴ سویه MDR سودوموناس آئروجینوزا مقاوم به سیپروفلوکساسین ۲ (۱۱/۸٪) سویه کاهش ۴ برابری MIC و یا بیش از ۴برابر داشته‌اند و از ۸ سویه MDR مقاوم به لووفلوکساسین، ۳ (۳۷٪) کاهش ۴ برابر MIC و یا بیش از داشتند.

در مطالعه‌ای که توسط Kishk و همکاران (۲۰۱۴) بر روی سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا انجام شد، همه سویه‌ها در ابتدا مقادیر بسیار بالایی از MIC را نشان دادند ولی در حضور مهارکننده CCCP کاهش قابل ملاحظه‌ای در MIC مربوط به کلروهگزیدین مشاهده شد. در مطالعه‌ای که توسط UMAR Farooq و همکاران (۲۰۱۴) برروی سنجش فعالیت پمپ افلاکس توسط مهارکننده CCCP بر روی جدایه‌های MDR سودوموناس آئروجینوزا انجام گرفت،کاهش مقدار MIC آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی یعنی تتراسایکلین، کلرامفنیکل و سیپروفلوکساسین برای سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا مشاهده شد. درحالی‌که MIC برای سویه‌های کنترل فاقد پمپ افلاکس تغییر نکرده و حتی در حضور ممانعت‌گر ثابت ماند (Rana و همکاران، ۲۰۱۵). در مطالعه‌ای که توسط Abdi-Ali و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد، کاهش MIC آنتی‌بیوتیکی لووفلوکساسین با استفاده از ممانعت‌گر CCCP نشان دادند. نتایج نشان داد که مقاومت دارویی در جدایه‌های بالینیMDRسودوموناس آئروجینوزا به‌واسطه پمپ افلاکس فعال انجام می‌شود. طی مطالعه‌ای که توسط Parisa Nikasa (۲۰۱۳) انجام شد، فعالیت پمپ افلاکس سویه‌های باکتری MDR اسینتوباکتر بومانئی را با استفاده از ممانعت‌گر CCCP با غلظت ۳۰ میکرومول و تعیینMIC آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بررسی کردند و مشاهده کردند که در بین سویه‌های مقاوم کاهش MIC تا ۱۶ برابر ولی در سویه حساس کاهشی مشاهده نشد. Lomovskaya و همکاران (۲۰۰۱) یکی از ترکیبات ممانعت‌گر پمپ‌های افلاکس Mex را برای بررسی فعالیت پمپ برای افلاکس فلوروکینولون‌ها،در باکتری سودوموناس ائروجینوزا مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که با بیان بالای فنوتیپی پمپ افلاکس مقاومت باکتری کاهش می‌یابد به‌طوری‌که ۳۲ تا ۶۴ برابر حتی بیش از ۶۴ برابر در MIC لووفلوکساسین کاهش رخ می‌دهد. Pourmandو همکاران(۲۰۱۴)با استفاده از مشتق هگزاهیدروکینولون به‌عنوان ممانعت‌گر پمپ افلاکس توانستند فعالیت پمپ افلاکس در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس سویه ATCC8325/4 MCRSA، را مورد مطالعه قرار دهند. آن‌ها گزارش دادند که MIC سیپروفلوکساسین در ترکیب با هگزا هیدروکینولون به‌ترتیب ۴ و ۲ برابر کاهش داشت. Rana (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای که بر روی باکتری‌های سودوموناس آئروجینوزاوکلبسیلا پنومونیه انجام دادندگزارش دادندکه‌باکتری‌هایی که پمپ افلاکس دارند MIC بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین و کلروامفنیکل داشتند ولی زمانی‌که با ممانعت‌گر ترکیب می‌شدند یک کاهش قابل چشمگیری در MIC آنتی‌بیوتیک‌ها مشاهده می‌شد. Pakzad و همکاران (۲۰۱۳) گزارش دادند که از بین ۴۰ سویه کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه ۱۹ سویه (۴۷/۵٪) پس از استفاده از ممانعت‌گر CCCP کاهش ۲ تا ۳۲ برابری MIC برای آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین نشان دادند. Adabi و همکاران(۲۰۱۵)طی مطالعه‌ای فعالیت پمپ‌افلاکس مرتبط با مقاومت آنتی‌بیوتیکی سیپروفلوکساسین در ایزوله‌های سودوموناس آئروجینوزا در بیماران دچار سوختگی با استفاده از مهارکننده پمپ افلاکس (CCCP) را اثبات کردند.

در این تحقیق از بین سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها تنها ۴ سویه از نظر پمپ افلاکس فعال بودند. بنابراین این امکان وجود داردکه‌سایرسویه‌ها از طریق مکانیسم‌های دیگر مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به این دو نوع آنتی‌بیوتیک مقاوم شده باشند که در این خصوص انجام بررسی‌های بعدی توصیه می‌شود. با این‌حال سودوموناس آئروجینوز ا به سبب ماهیت ژنتیکی می‌تواند سریعاً نسبت به انواع آنتی‌بیوتیک‌هامقاوم‌شود.بنابراین باتوجه‌به قابلیت بالای این ارگانیسم درکسب مقاومت‌نسبت‌به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌ویژه ژن‌های پمپ افلاکس، نظارت مستمر بر تغییرات حساسیت این باکتری و فعالیت این پمپ‌ها جهت خروج داروها به بیرون سلول باکتری امری ضروری است.

منابع

۱. **Abdi-Ali, A.; Mohammadi-Mehr, M. and Alaei, Y.A., 2006.** Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing Pseudomonas aeruginosa. International Journal of Antimicrobial Agents. Vol. 27, pp: 196-200.

۲. **Adabi, M.; Talebi-Taher, M.; Arbabi, L.; fshar, M.; Fathizadeh, A.S.; Minaeian, S.; Moghadam-Maragheh, N. and Majidpour, A., 2015.** Spread of efflux pump overexpressing-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in Pseudomonas aeruginosa by using an efflux pump inhibitor. Infection and chemotherapy. Vol. 47, pp: 98-104.

۳. **Akram, M., M. Shahid, and A. U. Khan.** 2007. Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in JNMC Hospital Aligarh, India. Annals of clinical microbiology and antimicrobials **6:**4.

۴. **Ali, I.; Kumar, N.; Ahmed, S. and Dasti, J.I., 2014.** Antibiotic resistance in uropathogenic E. coli strains isolated

from non-hospitalized patients in Pakistan. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR **8:**DC01.

۵. **Amaral, L. and Fanning, S., 2011.** An original deal for new molecule: reversal of efflux pump activity, a rational strategy to combat gram-negative resistant bacteria. Current medicinal chemistry. Vol. 18, pp: 2969-2980.

۶. **Arvanitidou, M.; Katikaridou, E.; Douboyas, J. and Tsakris, A., 2005.** Prognostic factors for nosocomial bacteraemia outcome: a prospective study in a Greek teaching hospital. Journal of Hospital Infection. Vol. 61, pp: 219-224.

۷. **Chanawong, A.; M'zali, F.; Heritage, H.J.; Lulitanond, A. and Hawkey, P.M., 2001.** SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum β-lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 48, pp: 839-852.

۸. **Farshad, S.; Ranjbar, R.; Japoni, A.; Hosseini, M.; Anvarinejad, M. and Mohammadzadegan, R., 2012.** Microbial Susceptibility, Virulance Factor, and Plasmid profiles of Uropathogenic E. Coli Strains Isolated from Children in Jahrom Arch Iran Med. Vol. 15, 5 p.

۹. **Jefferies, J.; Cooper, T.; Yam, T. and Clarke, S., 2012.** Pseudomonas aeruginosa outbreaks in the neonatal intensive care unit a systematic review of risk factors and environmental sources. Journal of medical microbiology. Vol. 61, pp: 1052-1061.

۱۰. **Kishk, R.; Mandour, M.; Hessam, W. and Nemr, N., 2014.** Efflux pump genes and chlorhexidine resistance: Clue for Klebsiella pneumoniae infections in intensive care units, Egypt. African Journal of Microbiology Research. Vol. 8, pp: 2162-2167.

۱۱. **Kristiansen, J.E. and Amaral, L., 1997.** The potential management of resistant infections with non-antibiotics. The Journal of antimicrobial chemotherapy. Vol. 40, pp: 319-327.

۱۲. **Kumar, A. and Schweizer, H.P., 2005.** Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. Advanced drug delivery reviews. Vol. 57, pp: 1486-1513.

۱۳. **Lomovskaya, O.; Lee, A.; Hoshino, K.; Ishida, H.; Mistry, A.; Warren, M.S.; Boyer, E.; Chamberland, S. and Lee, V.J., 1999.** Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 43, pp: 1340-1346.

۱۴. **Mahamoud, A.; Chevalier, J.; Alibert-Franco, S.; Kern, W.V. and Pagès, J.M., 2007.** Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 59, pp: 1223-1229.

۱۵. **Nehme, D. and Poole, K., 2007.** Assembly of the MexAB-OprM multidrug pump of Pseudomonas aeruginosa: component interactions defined by the study of pump mutant suppressors. Journal of bacteriology. Vol. 189, pp: 6118-6127.

۱۶. **Nikasa, P.; Abdi-Ali, A.; Rahmani-Badi, A. and Al-Hamad, A., 2013.** In vitro Evaluation of Proton Motive Force-Dependent Efflux Pumps Among Multidrug Resistant Acinetobacter baumannii Isolated From Patients at Tehran Hospitals. Jundishapur Journal of Microbiology. Vol. 6.

۱۷. **Pakzad, I.; Karin, M.Z.; Taherikalani, M.; Boustanshenas, M. and Lari, A.R., 2013.** Contribution of AcrAB efflux pump to ciprofloxacin resistance in Klebsiella pneumoniae isolated from burn patients. GMS hygiene and infection control. Vol. 8.

۱۸. **Piddock, L.J., 2006.** Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clinical microbiology reviews. Vol. 19, pp: 382-402.

۱۹. **Poole, K., 2000.** Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 44, pp: 2233-2241.

۲۰. **Pourmand, M.R.; Yousefi, M.; Salami, S.A. and Amini, M., 2014.** Evaluation of expression of NorA efflux pump in ciprofloxacin resistant Staphylococcus aureus against hexahydroquinoline derivative by Real-Time PCR. Acta Medica Iranica. Vol. 52, 424 p.

۲۱. **Quinn, P.J.; Markey, B.K.; Leonard, F.C.; Hartigan, P.; Fanning, S. and Fitz Patrick, E., 2011.** Veterinary microbiology and microbial disease. John Wiley & Sons.

۲۲. **Rana, T.; Kaur, N.; Farooq, U.; Khan, A. and Sngh, S., 2015.** Efflux as an arising cause of drug resistance in Punjab-India. IJBPAS. Vol. 4, pp: 5967-5979.

۲۳. **Ren, Q. and Paulsen, I.T., 2005.** Comparative analyses of fundamental differences in membrane transport capabilities

in prokaryotes and eukaryotes. PLoS Computational Biology. Vol. 1, 27 p.

۲۴. **Rodrigues, P.M.D.A.; Neto, C.; Santos, L.R.D.C. and Knibel, M.F., 2009.** Ventilator-associated pneumonia: epidemiology and impact on the clinical evolution of ICU patients. Jornal brasileiro de pneumologia. Vol. 35, pp: 1084-1091.

۲۵. **Saderi, H.; Lotfalipour, H.; Owlia, P. and Salimi, H., 2010.** Detection of metallo-β-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients in Tehran, Iran. Laboratory Medicine. Vol. 41, pp: 609-612.

۲۶. **Saier Jr, M.H. and Paulsen, I.T., 2001.** Presented at the Seminars in cell & developmental biology.

۲۷. **Sotto, A.; De Boever, C.M.; Fabbro-Peray, P.; Gouby, A.; Sirot, D. and Jourdan, J., 2001.** Risk Factors for Antibiotic-ResistantEscherichia coli Isolated from Hospitalized Patients with Urinary Tract Infections: a Prospective Study. Journal of clinical microbiology. Vol. 39, pp: 438-444.

۲۸. **Tajbakhsh, E.; Ahmadi, P.; Abedpour-Dehkordi, E.; Arbab-Soleimani, N. and Khamesipour, F., 2016.** Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic E. coli isolated from clinical samples in Iran. Antimicrobial Resistance and Infection Control. Vol. 5, 11 p.

۲۹. **Tenover, F.C., 2006.** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. The American journal of medicine. Vol. 119, pp: 3-10.

۳۰. **Van Bambeke, F.; Balzi, E. and Tulkens, P.M., 2000.** Antibiotic efflux pumps. Biochemical pharmacology. Vol. 60, pp: 457-470.

۳۱. **Viveiros, M.; Martins, A.; Paixão, L.; Rodrigues, L.; Martins, M.; Couto, I.; Fähnrich, E.; Kern, W.V. and Amaral, L., 2008.** Demonstration of intrinsic efflux activity of Escherichia coli K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. International Journal of Antimicrobial Agents. Vol. 31, pp: 458-462.

۳۲. **Wang, H.; Dzink-Fox, J.L.; Chen, M. and Levy, S.B., 2001.** Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical Escherichia coli strains from China: role ofacrR mutations. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 45, pp: 1515-1521.