

ارزیابی فنوتیپی و ژنوتیپی پمپ افلاکس (adeAB,abeM) سویه‌های بالینی اسیتوباکتر بومانی مقاوم به سیپروفلوکساسین و جنتامیسین

مهرانه اردستانی^۱، فاطمه نوربخش^{۱*}، رابعه خوشنویس زاده^۲

^۱گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران
^۲گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۵/۴ تاریخ پذیرش: ۹۹/۹/۲۵

مقدمه: اسیتوباکتر بومانی به دلیل توانایی بالا در کسب ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ایجاد سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR) اهمیت ویژه‌ای دارد. امروزه پمپ‌های افلاکس فعال به عنوان یکی از مهمترین مکانیسم‌های مقاومت ذاتی و اکتسابی آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها مطرح شده‌اند. هدف از این تحقیق بررسی بیان فنوتیپی و ژنوتیپی پمپ افلاکس سویه‌های بالینی اسیتوباکتر بومانی مقاوم به سیپروفلوکساسین و جنتامیسین می‌باشد.

روش کار: ۲۸ سویه اسیتوباکتر بومانی از نمونه زخم و تراشه بیماران بستری در بیمارستان قلب تهران جدا شد و با آزمون‌های بیوشیمیایی تشخیص داده شدند. حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها با روش انتشار دیسک بر اساس استاندارد CLSI تعیین شد. تعیین فعالیت فنوتیپی پمپ افلاکس به روش کارت ویل انجام شد و بعد از تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی میزان بیان ژن‌های adeA، adeB و abeM با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس بررسی گردید.

نتایج: تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های اسیتوباکتر بومانی نشان داد تمام سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، جنتامیسین، تتراسایکلین و ایمپینم مقاوم بودند. نتایج کارت ویل قبل و بعد از اثر دادن آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و جنتامیسین یکسان بود. میزان بیان ژنهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی پمپ افلاکس adeA، adeB و abeM حدود ۵۰٪ مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: بررسی نتایج فنوتیپی افلاکس و میزان بیان ژن‌های پمپ افلاکس نشان داد که بین پمپ افلاکس به روش فنوتیپی و روش مولکولی بیان ژن‌های adeA، adeB و abeM در حضور دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و جنتامیسین ارتباط معنی‌داری وجود ندارد.

کلمات کلیدی: اسیتوباکتر بومانی، مقاومت چند دارویی، ژن‌ها، سیپروفلوکساسین، جنتامیسین

نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد

۰۹۱۲۲۰۴۳۶۵۴

E-mail: nilooфар_noorbakhsh@yahoo.com

مقدمه

اسیتوباکتر بومانی یک کوکوباسیل گرم منفی غیر تخمیر کننده اکسیداز منفی و فاقد حرکت است.^۱ براساس طبقه بندی علمی اسیتوباکتر بومانی متعلق به خانواده موراکسلاسه و راسته سودومونادال‌ها^۲ و متعلق به کلاس Gammaproteobacteria است.^۳ این باکتری یک پاتوژن فرصت طلب در انسان است و در افراد دارای نقص ایمنی شدیداً بیماری‌زا بوده و باعث ایجاد عفونت‌های بیمارستانی میشود و تقریباً به طور انحصاری از محیط‌های بیمارستانی جدا شده است.^۴ همچنین باعث عفونت‌های فرصت طلب مانند پنومونی مرتبط با دستگاه تهویه، عفونت‌های پوستی و بافت‌های نرم، باکتری‌می، عفونت‌های دستگاه ادراری و سپتی سمی می‌شود.^۵ به علت بالا بودن سرعت دستیابی به عوامل ایجاد کننده مقاومت در برابر طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها^۶ یکی از مشکلات ایجاد شده توسط اسیتوباکتر بومانی بروز مقاومت چند دارویی می‌باشد.^۷ به طور کلی چندین فاکتور در ایجاد مقاومت در این باکتری دخیل هستند از جمله: پمپ‌های تراوشی ایجاد کننده مقاومت، پروتئین‌های غشا خارجی، تولید بتالاکتامازها و تولید آنزیم‌های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها می‌باشند.^۸ پمپ‌های افلاکس باکتریایی پروتئین‌هایی هستند که در غشا پلاسمایی باکتری قرار دارند و عملکرد آنها تشخیص عوامل مضر است که به دیواره سلولی باکتری و سیتوپلاسم نفوذ کرده و آنها را قبل از رسیدن به اهداف مورد نظر خود از سلول خارج میکنند.^۹ از مهم ترین پمپ‌های تراوشی که در ایجاد مقاومت در اسیتوباکتر بومانی نقش دارند پمپ تراوشی RND میباشد^{۱۰} که تاکنون سه نوع پمپ تراوشی سه جزئی از این دسته به نام‌های adeABC adeIJK adeFGH, در اسیتوباکتر بومانی شناسایی شده است^{۱۱}. adeABC اولین و مهم ترین پمپ افلاکس شناخته شده است که نوعی حمل کننده چند دارویی وابسته به ATP است در این پمپ‌های خروجی (افلاکس) عوامل ضد میکروبی میتوانند از طریق استفاده از نیروی محرکه پروتون از سلول خارج شوند.^{۱۲}

پمپ تراوشی سه جزئی adeABC از پروتئین غشای خارجی کد شونده توسط ژن adeC, پروتئین فیوژن غشا کد شونده توسط ژن adeA و پروتئین غشا داخلی کد شونده توسط ژن adeB تشکیل

شده است.^{۱۳} آنتی بیوتیک‌های متعددی از جمله آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها، فلوروکینولون‌ها، تری متوپریم و کلرامفنیکل به عنوان سوسترهای سیستم adeABC مطرح میشود.^{۱۴} abeM یکی دیگر از پمپ‌های افلاکس چند دارویی متعلق به خانواده MATE در اسیتوباکتر بامانی میباشد.^{۱۵} سوسترهای این پمپ شامل جنتامیسین، سیپروفلوکساسین، اریترومایسین و تری متوپریم می‌باشد.^{۱۶} نیک آسا نشان داد در حضور ماده مهارکننده پمپ‌های افلاکس میزان MIC در سویه‌های اسیتوباکتر بامانی جدا شده از نمونه‌های بیمارستانی شهر تهران کاهش می‌یابد.^{۱۷} Wong با بررسی ایزوله‌های مقاوم به کاربایم نشان دادند که حضور ژنهای adeABC نقش مهمی در مقاومت سویه‌های اسیتوباکتر بامانی دارد.^{۱۸} Huang نشان داد افزایش بیان پمپ افلاکس adeABC نقش مهمی در کاهش حساسیت به مروپنم ایفا میکند.^{۱۹}

هدف از این تحقیق بررسی بیان فنوتیپی و ژنوتیپی پمپ افلاکس سویه‌های بالینی اسیتوباکتر بومانی مقاوم به سیپروفلوکساسین و جنتامیسین می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری کشت و جداسازی جدایه‌ها

این مطالعه بر روی ۲۸ سویه اسیتوباکتر بومانی ایزوله شده از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بخش مراقبت ویژه بیمارستان قلب تهران انجام گرفت. نمونه‌های بالینی مورد مطالعه مربوط به نمونه‌های زخم و تراشه بیماران بودند. نمونه‌های بالینی به آزمایشگاه انتقال داده شد و سپس هر نمونه روی محیط‌های بلادآگار و مک کانکی آگار کشت داده شدند. کشت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داری شدند. سپس تست‌های افتراقی (اوره از، MRVP, SIM, OF, TSI و همچنین تست‌های کاتالاز، اکسیداز، سیمون سیترات، بایل اسکولین و لایزین) جهت تشخیص گونه‌های مختلف اسیتوباکتر انجام شد.

تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی

برای این منظور از روش انتشار دیسک مطابق با دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی CLSI استفاده شد.

که در آن خاصیت فلورسنت نشان میدادند ۰/۲۵ در نظر گرفته شد، فاقد فعالیت افلاکس و سویه‌هایی که کمترین غلظت اتیدیوم بروماید آنها ۰/۲۵ نبود، دارای فعالیت افلاکس بودند. سویه‌هایی که در هیچ یک از غلظتهای اتیدیوم بروماید خاصیت فلورسنت نداشتند به عنوان سویه‌های فعال شدید پمپ افلاکس در نظر گرفته شدند. سپس به منظور بررسی تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و جنتامیسین در تست کارت ویل هم زمان با افزودن اتیدیوم بروماید داخل پلیت، هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها به میزان ۱/۲ غلظت MIC افزوده شد و به روش کارت ویل کشت داده شد و میزان فلورسنت بررسی گردید.

بررسی مولکولی بیان ژن‌های پمپ افلاکس

ابتدا RNA تمام سویه‌های جداسازی شده به روش فنوتیپی با استفاده از محلول‌های تریزول کلروفرم ایزوپروپانول و DEPC استخراج گردید. سپس واکنش رونویسی معکوس (سنتز cDNA) انجام شد.

به منظور بدست آوردن رقت‌های یکسان از نمونه‌های RNA استخراج شده، OD تمام نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شده و رقت‌های یکسان از RNA جهت ساخت cDNA مورد محاسبه قرار گرفت. cDNA توسط کیت شرکت آمپلیکون کره و بر اساس پروتکل کیت ساخته شد و در دمای -۲۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

پس از سنتز cDNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) میزان بیان ژن‌های مورد نظر در اسینتوباکترهای جدا شده از نمونه‌های بالینی توسط تکنیک RT-PCR بررسی شد.

حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، ایمینم (۱۰ میکروگرم)، جنتامیسین (۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، (شرکت پاتن طب ایران) بررسی شد. به این منظور ابتدا از باکتری‌های مورد مطالعه سوسپانسیونی با کدورتی برابر با کدورت نیم مک فارلند تهیه شد، سپس به کمک سوآپ از سوسپانسیون میکروبی برداشته و در تمام جهات روی محیط مولر هیتون آگار به صورت روش متراکم (چمنی) کشت داده شد، سپس به کمک پنس استریل، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی در سطح پلیت قرار داده شده به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در انکوباتور در ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. بعد با استفاده از یک خط کش، قطر هاله عدم رشد را بر حسب میلی متر اندازه گرفته و بر طبق استاندارد CLSI (۲۰۱۷) باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش شدند. از سویه استاندارد آسینتوباکتر بومانی (ATCC19606) به عنوان سویه کنترل کیفی استفاده شد.

بررسی فنوتیپی فعالیت پمپ افلاکس با روش کارت ویل

به منظور بررسی فعالیت پمپ‌های افلاکس به صورت فنوتیپی تمامی سویه‌های اسینتوباکتریومانی مقاوم به چنددارو با تکنیک آگار حاوی اتیدیوم بروماید با روش کارت ویل مورد بررسی قرار گرفتند. در ابتدا سویه‌های مقاوم به چند دارو بر روی پلیت‌های نوترینت آگار (Merck) حاوی غلظتهای ۰/۲۵ تا ۲/۵ میلی گرم برلیتر اتیدیوم بروماید به صورت یک خط از مرکز محیط به سمت کنار محیط کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. میزان فلورسنت به این صورت بررسی شد: سویه‌هایی که کمترین غلظت اتیدیوم بروماید

جدول ۱: توالی پرایمرهای ژن‌های پمپ افلاکس (*abeM* و *adeB-adeA*)

منابع	توالی	اندازه باند	ژن
۲۰	TTGATCGTGCTTCTATTCTCAAG GGCTCGCCACTGATATTACGTT	73bp	adeA
۱۹	TACGCTTATTCCAGCGATTG CCGAACATGGTGAGTACGTT	99bp	adeB
۱۹	GCTATTCCGAAGCATTAGGC CCAAAGCAGGTATTGGTCCT	120bp	abeM
۲۰	GACGTA CTC GCA GAA TAA GC TTA GTC TTG CGA CCG TAC TC	427 bp	16S rRNA

جنتامیسین ۹۲/۸٪ مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشاهده شد. بنابراین همه سویه‌ها دارای مقاومت چند دارویی می‌باشند (مقاومت چند دارویی عبارتست از مقاومت حداقل به ۳ کلاس آنتی‌بیوتیکی).

نتایج تشخیص فنوتیپی پمپ افلاکس سویه‌های/اسینتوباکتر بومانی به روش کارت ویل قبل و بعد از اثر دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و جنتامیسین:

برای این منظور همه ایزوله‌های مورد مطالعه با تکنیک آگار حاوی اتیدیوم بروماید به روش چرخ دنده ای یا کارت ویل کشت داده شدند که نتایج آن به صورت ۶۰/۷۱٪ از نمونه‌ها افلاکس قوی و ۳۹/۲۸٪ از نمونه‌ها افلاکس متوسط داشتند.

برای این منظور همه ایزوله‌های مورد مطالعه با تکنیک آگار حاوی اتیدیوم بروماید به همراه نصف غلظت MIC به روش کارت ویل کشت داده شدند بررسی‌ها نشان داد که نتایج تشخیص فنوتیپی پمپ افلاکس سویه‌های اسینتوباکتر بومانی به روش کارت ویل بعد از اثر آنتی‌بیوتیک با نتایج قبل از اثر آنتی‌بیوتیک یکسان بود.

نتایج بررسی بیان ژنوتیپی پمپ افلاکس *adeA*, *adeB*, *abeM* در حضور دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و جنتامیسین:

میزان تغییرات بیان ژن *adeA*, *adeB*, *abeM* در باکتری‌های رشد یافته در حضور آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین و سیپروفلوکساسین به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. اندازه باند *AdeA* 73bp، اندازه باند *AdeB* 99bp، اندازه باند *AbeM* 120bp که به همراه *16srRNA* 427bp به عنوان ژن house keeping تکثیر گردید. نتایج به صورت زیر به دست آمد (نمودار ۱، شکل ۱).

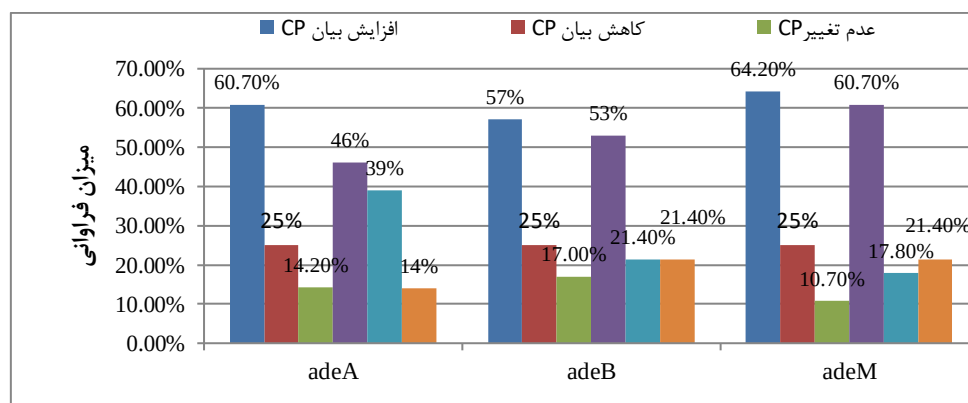
مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR عبارت است از Distilled water به مقدار ۹/۵ میکرولیتر، Master Mix PCR 2X به مقدار ۱۲/۵ میکرولیتر، Primer (F&R) به غلظت ۱۰۰pmol DNA به مقدار ۱۰-۲۰ng/ml و Total Volume به مقدار ۲۵ میکرولیتر در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی مشخص به صورت واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۵۵ ثانیه و طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد و در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید و بیان ژن‌های *AbeM*, *AdeB*, *AdeA* برای هر سویه تعیین گردید.

آنالیز آماری

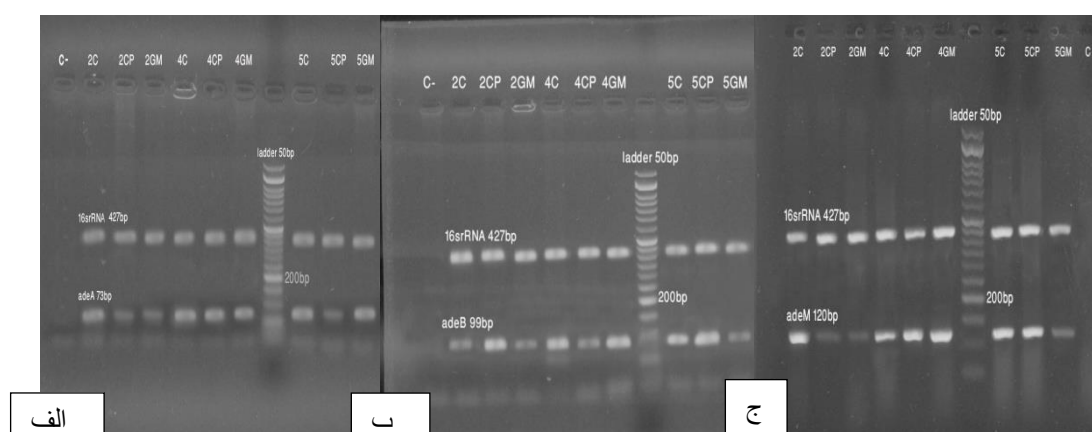
جهت بررسی بیان ژنهای مورد مطالعه از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ و آزمون تست مربع کای و آزمون ناپارامتریک اسپیرمن استفاده شد.

نتایج

براساس نتایج به دست آمده از تست‌های تعیین حساسیت به روش دیسک دیفیوژن در سویه‌های اسینتوباکتر بومانی نسبت به سیپروفلوکساسین ۱۰۰٪، تتراسایکلین ۴۷/۴٪، ایمپنم ۱۰۰٪ و



نمودار ۱: میزان بیان ژن‌های *adeA*, *adeB*, *abeM* تحت تاثیر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و جنتامیسین



شکل ۱: الف: بیان ژن AdeA (ب: بیان ژن AdeB ج: میزان بیان adeM، نمونه‌های C: کنترل که تحت تاثیر آنتی‌بیوتیک نبودند، نمونه‌های CP: تاثیر آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین، نمونه‌های GM: تحت تاثیر آنتی‌بیوتیک جنتامیسین

افزایش بیان مشاهده شد.

Ruzin و همکاران در سال ۲۰۱۰ با مطالعه ایزوله‌های بالینی نشان دادند که ارتباط معنی داری میان میزان بیان پمپ افلاکس و میزان MIC سیپروفلوکساسین و جنتامیسین وجود دارد. علاوه بر این نشان داده شد که افزایش بیان پمپ افلاکس *adeABC* یک مکانیسم رایج کاهش حساسیت به تاییدی سایکلین در این باکتری می‌باشد.^{۲۳} در این مطالعه مشخص شد که بین بیان پمپ افلاکس و MIC آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین ($pvalue:0.205$) و جنتامیسین ($pvalue:0.498$) رابطه معنی داری وجود ندارد.

Wong و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی ایزوله‌های مقاوم به کاربامپ نشان دادند که حضور ژن‌های *adeABC* نقش مهمی در مقاومت سویه‌های *اسیتوباکتریومانی* دارد.^{۱۷} در این مطالعه مشخص شد مقاومت بالا به دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و جنتامیسین ارتباطی به وجود ژن‌های *adeAB* و *abeM* ندارد.

Bratu و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که افزایش بیان *adeABC* نقش چندانی در مقاومت به آمینوگلیکوزیدها یا فلوروکینولون‌ها ایفا نمی‌کند، ولی با کاهش حساسیت به تاییدی سایکلین مرتبط است. علاوه بر این نشان دادند که بیان *adeM* با مقاومت آنتی بیوتیکی ارتباطی ندارد.^{۲۴} مطالعه انجام شده در این تحقیق مطابق نتایج Bratu بود که نشان داد افزایش بیان *adeAB* نقشی در مقاومت به آمینوگلیکوزید (جنتامیسین) و فلوروکینولون

در بررسی آماری که به روش آزمون مربع کای و آزمون ناپارامتریک اسپیرمن انجام شد بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سیپروفلوکساسین و بیان ژن *adeA* ($pvalue:0.211$), *adeB* ($pvalue:0.92$) و *adeM* ($pvalue:0.211$) ارتباط معنی داری مشاهده نشد. همچنین بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جنتامیسین و بیان ژن *adeA* ($pvalue:0.605$), *adeB* ($pvalue:0.327$) و *adeM* ($pvalue:0.845$) ارتباط معنی داری مشاهده نشد.

بحث

اسیتوباکترها به عنوان یکی از علل عمده عفونت‌های اکتسابی بیمارستانی از جمله، پنومونی، سپتی سمی، عفونت‌های دستگاه ادراری، عفونت زخم و مننژیت شناخته شده است و به علت ظهور سویه‌هایی با مقاومت چند دارویی (MDR: Multi Drug Resistant) و آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون‌ها یا اغلب کلاس‌ها مقاوم‌اند.^{۲۱}

طی مطالعه Wiczorek و همکاران در سال ۲۰۰۸ نقش اصلی در مقاومت دارویی نسبت به اریترومایسین و سایر داروهای همچون کلرآمفنیکل را افزایش بیان ژن *adeABC* عنوان کردند.^{۲۲} در حالی که در این مطالعه مشخص شد که در حضور سیپروفلوکساسین *adeAB* حدود ۶۰٪ افزایش بیان و در حضور جنتامیسین حدود ۵۰٪

(سیپروفلوکساسین) ندارد.

مطالعه شده در حضور سیپروفلوکساسین و جنتامیسین و نوع پمپ افلاکس ارتباط معنی داری وجود ندارد و همچنین بین مطالعه پمپ افلاکس به روش فنوتیپی و روش مولکولی بیان ژن‌های مورد بررسی در حضور سیپروفلوکساسین و جنتامیسین نیز ارتباط معنی داری وجود ندارد که این مطالعه مشابه مطالعه Bratu و همکاران در سال ۲۰۰۸ بود.

نتیجه‌گیری

با توجه به بررسی فنوتیپی کارت ویل در حضور و عدم حضور آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین و سیپروفلوکساسین در بیان فنوتیپی تغییری مشاهده نشد، در حضور سیپروفلوکساسین *AdeAB* حدود ۶۰٪ افزایش بیان و در حضور جنتامیسین حدود ۵۰٪ افزایش بیان مشاهده شد. بنابراین در سویه‌های با مقاومت چند دارویی ژن‌های پمپ افلاکس بیان می‌گردد و پروتئین‌های درگیر در افلاکس به صورت غیر اختصاصی در انتقال دارو به خارج سلول باکتری نقش دارد. در نتیجه نیمی از موارد مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به پمپ افلاکس است و در نیم دیگر موارد مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به عوامل دیگری است که البته در این مورد باید بطور همزمان بیان ژن‌های اختصاصی و پمپ افلاکس در سویه‌ها مورد مطالعه قرار گیرد.

Nemec و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که ژن‌های *adeABC* به وفور در سویه‌های *اسیتوباکتر بومانی* یافت می‌شوند ولی در برخی سویه‌های کاملاً حساس وجود ندارد، علاوه بر این نشان داده شد که مقاومت چند دارویی نمایانگر افزایش بیان *adeABC* می‌باشد^{۲۵}. مطابق با مطالعه Nemec در این مطالعه مشاهده شد در سویه‌های با مقاومت چند دارویی میزان بیان *adeAB* و *abeM* بالاست.

در سال ۱۳۹۶ بهداد و همکاران اثرات ضد پمپ افلاکسی نانوذرات نقره در سویه‌های بالینی مقاوم به دارو *اسیتوباکتر بومانی* را بررسی کردند و نتایج روش کارت ویل نشان داد که از میان ۲۱ سویه *اسیتوباکتر بومانی* ۱۲ سویه دارای پمپ افلاکس فعال هستند. همچنین میزان MIC اتیدیوم بروماید در سویه‌های مقاوم به همراه نانوذرات نقره با کاهش همراه بود^{۲۶}.

در سال ۱۳۹۷ طاهریان فرد و همکاران با بررسی فنوتیپی فعالیت پمپ افلاکس و اثر مهار نانوذره‌ها بر این پمپ با روش کارت ویل آگار اتیدیوم بروماید به این نتیجه رسیدند که ۷۵٪ سویه‌ها دارای پمپ افلاکس فعال بودند و نانوذره آلبومین ۰/۵ گرم، پمپ افلاکس ۳۷٪ از سویه‌ها را در حداقل غلظت اتیدیوم بروماید مهار کرد^{۲۷}.

نتایج این مطالعه بیانگر این است که از لحاظ آماری بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سیپروفلوکساسین و جنتامیسین و بیان ژن‌های

References

- Montefour K, Frieden J, Hurst S, Helmich C, Headley D, et al. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. Crit Care Nurse 2008; 28,15-25
- James h. Jorgensen, karen c. Carroll, guidofunke, michael a. Pfaller, Manual of clinical microbiology 2015: 11th edition., ch44. P:813,
- Bitrian, Mariana; González, Rodrigo H.; Paris, Gaston; Hellingswerf, Klaas J.; Nudel, Clara B.. "Blue-light-dependent inhibition of twitching motility in *Acinetobacter baylyi* ADP1: additive involvement of three BLUF-domain-containing proteins". Microbiology 2013, 159 (Pt 9): 1828–1841.
- Antunes, LCS; Visca, P; Towner, KJ. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. Pathogens and Disease 2014; 71(3); 292–301.
- Richmond GE, Chua KL, Piddock LJ. Efflux in *Acinetobacter baumannii* can be determined by measuring accumulation of H33342 (bis-benzamide). J Antimicrob Chemother 2013; 68; 1594-1600..
- Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(10):3471–84.
- Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, et al. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2008;52:557-62.

8. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011;55:947-53.
9. Pagès, J. M., Amaral, L., and Fanning, S. An original deal for new molecule: reversal of efflux pump activity, a rational strategy to combat Gram-negative resistant bacteria. *Curr. Med. Chem.* 2011;18; 2969–2980
10. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011;55:947-53.
11. Coyne S, Guigon G, Courvalin P, et al. Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* with a microarray. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010;54:333-40.
12. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007 ; 59: 1210-121.
13. Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:3298-304.
14. Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19; 382-402.
15. Vila J, Martínez JL. Clinical impacts of the over-expression of efflux pump in nonfermentative Gram-negative bacilli, development of efflux pump inhibitors. *Curr Drug Targets* 2008; 9:797-807.
16. Nikasa P. Antibiotic resistance of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in the presence of efflux pump inhibitor. *Infect Dis Trop Med* 1387; 42:19-23.
17. Wong EW, Yusof MY, Mansor MB, Anbazhagan D, Ong SY, Sekaran SD. Disruption of *adeB* gene has a greater effect on resistance to meropenems than *adeA* gene in *Acinetobacter* spp. isolated from University Malaya Medical Centre. *Singapore Med J* 2009;50:822-26.
18. Huang L, Sun L, Xu G, Xia T. Differential susceptibility to carbapenems due to the AdeABC efflux pump among nosocomial outbreak isolates of *Acinetobacter baumannii* in a Chinese hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; 62:326-32.
19. Bratu S, Landman D, Martin DA, Georgescu C, Quale J. Correlation of Antimicrobial Resistance with β -Lactamases, the OmpA-Like Porin, and Efflux Pumps in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* Endemic to New York City. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 2008;52(9); 2999–3005.
20. Ruzin A, Keeney D, Bradford PA. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 59;1001–1004.
21. Hindiye M, Smollen G, Grossman Z, Ram D, Davidson Y, Mileguir F. Rapid Detection of *blaKPC* Carbapenemase Genes by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(9): 2879–83.
22. Wiczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórawski M, Krawczyk M, Tryniszewska E. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*—the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008; 46:257-67.
23. Ruzin A, Immermann FW, Bradford PA. RT-PCR and statistical analyses of *adeABC* expression in clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex. *Microb Drug Resist.* 2010; 16:87-89.
24. Bratu S, Landman D, Martin DA, Georgescu C, Quale J. Correlation of antimicrobial resistance with β -lactamases, the OmpA-like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:2999-3005.
25. Nemec A, Maixnerová M, van der Reijden TJ, van den Broek PJ, Dijkshoorn L. Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60:483-89.
26. Behdad R, Mirzaie A, ShohrehZareKarizi, Green synthesis of silver nanoparticle using *Acroptilon repense* extract and evaluation of its anti-efflux activity against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates, *Journal of Microbial World* 2017 ; Volume 10, No. 3.
27. Taherian S, Aghdami A. Design and manufacture of nano-inhibitor drugs in a clinical strain of *Acinetobacter baumannii* Resistant to imipenem. *NCMBJ* 1397;8(32);31-42.

Mehraneh Ardestani¹, Fatemeh Noorbakhsh^{1*}, Rabee Khoshnevis Zade²

¹ Department of Microbiology, Biological Science college, Varamin-pishvabbranch, Islamic Azad university, Varamin-Pishva, Iran

² Department of Biophysics, Biological Science college, Varamin-pishvabbranch, Islamic Azad university, Varamin-Pishva, Iran

Evaluation of Phenotypic and Genotypic Expression of Efflux Pump in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* Resistant to Ciprofloxacin and Gentamicin

Received: 26 Jul 2019 ; Accepted: 15 Dec 2020

Abstract

Introduction: *Acinetobacter baumannii* is an important bacteria because of high ability to obtain antibiotic resistance genes and creation of multi-drug resistant strains (MDR). Today, the active efflux pumps has been suggested as one of the most important mechanisms of intrinsic and acquired resistance of antibiotics in bacteria. The aim of this study was Evaluation of phenotypic and genotypic expression of efflux pump in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin and gentamicin.

Method: Twenty eight strains of *Acinetobacter baumannii* were isolated from wound of patients were admitted to Tehran heart hospital and diagnosed by biochemical tests. Antibiotic susceptibility of isolates was determined by disc diffusion method according to CLSI. Cartwheel method was used to determine the activity of the efflux pump after determining the antibiotic resistant profile, the expression of *adeA*, *AdeB* and *AbeM* gene evaluated by RT-PCR

Results: Antibiotic susceptibility test of isolated *Acinetobacter baumannii* show a high resistance to ciprofloxacin, gentamicin, tetracycline and imipenem antibiotics in all strains. The results of the cartwheel were identical before and after the administration of the ciprofloxacin and gentamicin antibiotics. Also Antibiotic resistance to the gene expression of *adeA*, *adeB* and *abeM* were up to 50%.

conclusion: Evaluation of phenotypic result of efflux and gene expression of the efflux pump indicates that, there is no significant relationship between the efflux pump in phenotypic method and the molecular method of gene expression of *adeA*, *adeB*, *abeM* in presences of to ciprofloxacin and gentamicin.

Keyword: *Acinetobacter baumannii*, MDR, Genes, Ciprofloxacin, Gentamicin

*Corresponding Author:

Department of Pediatric Surgery, Maryam Hospital, Karaj, Iran

Tel: 09122043654

E-mail: niloofar_noorbakhsh@yahoo.com