



## ارتباط سنجی فعالیت پمپ‌های افلاکسی و فراوانی ژن‌های *pslABD* در ایزوله‌های بالینی

### سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از عفونت پای دیابتی

مژده جهانتیغ<sup>۱</sup>، حامد طهماسبی<sup>۲\*</sup><sup>۱</sup> - مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، پژوهشکده علوم سلولی و مولکولی بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.<sup>۲</sup> - دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۰، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۵

#### چکیده

**مقدمه:** هدف از این مطالعه بررسی ارتباط فعالیت پمپ افلاکس و فراوانی ژن‌های *pslABD* در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از عفونت پای دیابتی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی-تحلیلی با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی، ۹۱ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از عفونت پای دیابتی جدا شد. با روش انتشار از دیسک، الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک و حضور آنزیم‌های *ESBL* و *AmpC* بررسی شد. فعالیت پمپ افلاکس به روش کارت ویل آگار مشخص گردید. به منظور شناسایی لوکوس *pslABD* و ژن‌های *oprM* و *oprD* از روش *PCR* استفاده شد.

**نتایج:** از ۹۱ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا، ۶۸ سویه (۷۴/۷٪) تولیدکننده آنزیم *ESBL* و ۵۳ سویه (۵۸/۲٪) تولیدکننده آنزیم *AmpC* بودند. همچنین ۶۱ ایزوله (۶۷/۱٪) تشکیل دهنده بیوفیلیم و ۳۰ ایزوله (۳۲/۹٪) فاقد بیوفیلیم بودند. علاوه، ۱۹ (۲۰/۸٪)، ۲۲ (۲۴/۱٪)، ۲۷ (۲۹/۶٪)، ۱۹ (۲۰/۸٪)، ۳۶ (۳۹/۵٪) و ۴۱ (۴۵٪) ایزوله به ترتیب حامل ژن‌های *pslB pslA mexA* و *pslD* و *oprD pslD* و *ompM* بودند. آنالیزهای آماری نشان داد که، ارتباط معنی‌داری بین *pslA* ( $P=0/02$ )، *pslB* ( $P=0/019$ )، و *pslD* ( $P=0/03$ ) و توزیع فراوانی سویه‌های تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز وجود دارد. از طرفی، فعالیت پمپ افلاکس در ایزوله‌های حامل ژن‌های *pslA* ( $P=0/012$ )، *pslB* ( $P=0/049$ ) و *pslD* ( $P=0/025$ ) افزایش معنی‌داری را نشان دادند. نتیجه‌گیری: در سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از عفونت پای دیابتی، لوکوس *pslABD* نقش مهمی در افزایش فعالیت پمپ افلاکس و توزیع فراوانی سویه‌های تولیدکننده آنزیم‌های *AmpC* و *ESBL* دارد.

**واژه‌های کلیدی:** مقاومت به دارو، بیوفیلیم، سودوموناس آئروژینوزا، افلاکس پمپ، آنزیم بتالاکتاماز.

\*نویسنده مسئول: شاهرود، میدان هفت تیر، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، آزمایشگاه مرکزی، تلفن: ۰۲۳۳۲۳۹۵۰۵۴، نمابر: ۰۲۳۳۲۳۹۵۰۰۹. Email: tahmasebi87@yahoo.com

**ارجاع:** جهانتیغ مژده، طهماسبی حامد. ارتباط سنجی فعالیت پمپ‌های افلاکسی و فراوانی ژن‌های *pslABD* در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از عفونت پای دیابتی. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۳؛ ۱۹(۲): ۳۹-۳۱.



## مقدمه

عفونت‌های پای دیابتی یک عارضه بسیار شایع می‌باشد که در افراد مبتلا به دیابت رخ می‌دهد (۱). میکروارگانسیم‌هایی مانند استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، گونه‌های انتروکوک مقاوم به وانکومایسین و باسیل‌های گرم منفی تولیدکننده بتالاکتاماز با طیف گسترده نقش مهمی در عفونت‌های پای دیابتی دارند (۲-۴). توزیع واقعی این ارگانسیم‌ها در بین بیماران مبتلا به عفونت‌های پای دیابتی به خوبی مشخص نشده است و احتمالاً منجر به تجویز بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌های طیف گسترده در همه جا شده است (۵). بسیاری از پزشکان برای درمان عفونت‌های زخم دیابتی ناشی از سودوموناس آئروژینوزا با مشکلات متعددی مواجه شده‌اند (۶).

سودوموناس آئروژینوزا یکی از باکتری‌های گرم منفی و غیرتخمیری می‌باشد که تقریباً در تمامی عفونت‌ها، اعم از خون، ریه، پوست و دستگاه ادراری حضور دارد (۵). این باکتری به دلیل تشریح آنتی‌بیوتیک‌های بیماری‌زا و بتالاکتامازی بسیار گسترده، توانایی بالایی در ایجاد عفونت‌های شدید و مقاوم به درمان دارد (۱ و ۷). برای جلوگیری از رشد باکتری در زخم، یک آنتی‌بیوتیک باید بتواند از طریق سایت هدف خود به اورگانسیم نفوذ کند (۸). علاوه بر این، سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند بیوفیلم را از طریق یک مکانیسم پیچیده و بسیار تنظیم شده تولید کند، که در آن هر مرحله دارای یک فنوتیپ منحصر به فرد است (۹). منبع سنتز پلی ساکارید (Psl) یک آگزوپلی ساکارید است که از یک پنتامر تکرار شونده از زیر واحدهای D-مانوز، L-رامنوز و D-گلوکز تشکیل شده است. Psl برای تشکیل بیوفیلم بسیار مهم است. در مواقعی که چسبندگی باکتری به سطوح کاهش می‌یابد، رخ دادن برخی جهش‌ها در Psl توانایی تشکیل بیوفیلم را آغاز می‌کند. تولید بیش از حد Psl منجر به تجمع هایپرسل و افزایش چسبندگی به یک سطح شد. بیوفیلم‌ها، موجود در زخم‌های مزمن، مکانیزم دفاعی برای باکتری‌ها در برابر اثرات آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (۱۰).

سیستم‌های افلاکس پمپ یکی از مهمترین سیستم‌های دفاعی باکتریایی می‌باشد. سیستم‌های افلاکس پمپ خروج آنتی‌بیوتیک را از سلول افزایش می‌دهند و محتویات داخل سلولی باکتری را در برابر دارو محافظت می‌کنند (۱۱). برای جلوگیری از رشد باکتری در زخم، یک آنتی‌بیوتیک باید بتواند از طریق سایت هدف خود به اورگانسیم نفوذ کند (۱۲). با این حال، افلاکس پمپ‌ها در باکتری زمانی فعال می‌شود که مواد سمی مانند داروها، ضد عفونی‌کننده‌ها و سایر عوامل شیمیایی برای باکتری کشنده باشند (۷). باکتری گاهی با صرف انرژی پمپ افلاکس خود را فعال می‌کند. از این رو، امکان طبقه‌بندی آنها را به پنج خانواده فراهم می‌کند. خانواده ABC، خانواده MATE، MFS، خانواده RND و خانواده SMR پنج خانواده مهم سیستم‌های افلاکس می‌باشند (۱۳).

در سال‌های اخیر، مطالعات بر روی پروموتورهای اختصاصی تشکیل بیوفیلم در سوبه‌های سودوموناس آئروژینوزا حکایت از وجود ارتباط بین تکثیر ژن‌های عامل مقاومت و میزان بیان پروموتورهای تنظیمی در تشکیل بیوفیلم دارد (۱۴). گرچه این موارد به‌خوبی بررسی شده‌اند، اما در زمینه ارتباط بین فعالیت پمپ افلاکس، آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بتالاکتامازی و لوکوس ژنی Psl زمینه روشنی وجود ندارد. از این رو، هدف از این مطالعه ارتباط سنجی فعالیت پمپ‌های افلاکسی و فراوانی ژن‌های اپرون pslABD در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم پای دیابتی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

طراحی مطالعه و جمع‌آوری سودوموناس آئروژینوزا از زخم پای دیابتی. در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، تجربی طی یک دوره ۱۱ ماهه (مهر تا شهریور ۱۴۰۰)، ۲۴۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از زخم پای دیابتی از بیماران بستری در مراکز درمانی شهر زاهدان جمع‌آوری شد. نمونه‌گیری بر اساس روش نمونه‌گیری آسان و در دسترس صورت گرفت. بر اساس معیار ورود، نمونه‌برداری از بیماران بستری در بیمارستان و مشکوک به عفونت پای دیابتی بودند صورت گرفت. در نهایت، ۹۱ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی جداسازی شدند.

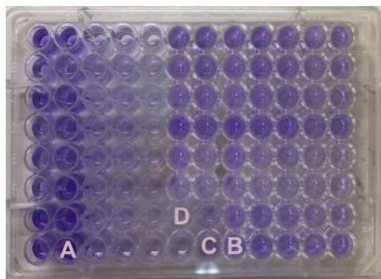
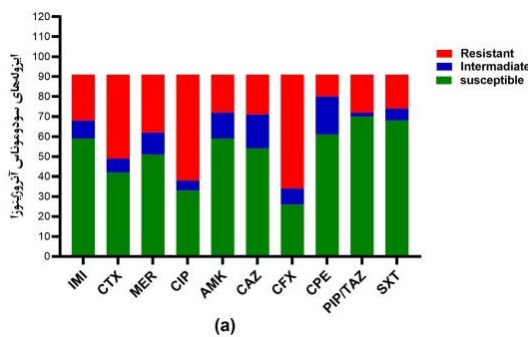
تعیین الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک و سوبه‌های تولیدکننده ESBL و AmpC برای تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و سوبه‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک‌های ESBL و AmpC به ترتیب با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (Bauer-Kirby) و دیسک‌های ترکیبی استفاده گردید. تمامی دیسک‌های استفاده شده از برند Hi-Media استفاده شد. نتایج به‌دست آمده با استفاده از CLSI نسخه ۲۰۲۳ ارزیابی شدند. به‌طور خلاصه، بعد از کشت اولیه در محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) به‌صورت سفراهی، دیسک‌های ایمپینم (۱۰IMI میکروگرم)، سفوتاکسیم (5 CTX میکروگرم)، مروپنم (۱۰MER میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵CIP میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰AMK میکروگرم)، سفنازیدیم (۱۰CAZ میکروگرم)، سفناریاکسون (۳۰CFX میکروگرم)، سفالوتین (۳۰CPE میکروگرم)، سولفومتوکسازول/تری‌متروپریم (SXT ۱۰/۳۰ میکروگرم) و پیپراسیلین/تازوباکتام (PIP/TAZ ۱۰/۳۰ میکروگرم)، در پلیت چیده شد. همچنین به‌منظور تعیین سوبه‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک بتالاکتامازی، در صورت وجود اختلاف قطر هاله عدم رشد دیسک ترکیبی با اسید کلاوولانیک با قطر هاله عدم رشد دیسک فاقد اسید کلاوولانیک به میزان بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر، آن نمونه از نظر حضور ESBL مثبت در نظر گرفته شد. همچنین اگر قطر هاله عدم رشد سفوکسیتین کم‌تر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر بود، تولیدکننده بالقوه AmpC در نظر گرفته شد (۱۵).

بررسی کمی تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا به روش میکروپلیت تیتراسیون. جهت بررسی کمی تشکیل بیوفیلم در

## نتایج

در این مطالعه ۲۴۰ نمونه از بیماران دارای زخم پای دیابتیک جداسازی شد. از این میان، ۹۱ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا بودند که ۴۷ ایزوله (۵۱/۶٪) از بیماران زن و ۴۴ نمونه (۴۸/۳٪) از بیماران مرد جداسازی شدند.

الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک و سوبه‌های تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز. با توجه به شکل ۱a، ۵۷ ایزوله مقاوم (۶۲/۶٪) به سفتریاکسون، ۵۳ ایزوله (۵۸/۲٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین، و ۴۲ ایزوله (۴۶/۱٪) مقاوم به سفوتاکسیم با بیشترین فراوانی بودند. همچنین ۱۱ ایزوله (۱۲٪) مقاوم به سفالوتین، ۱۹ ایزوله (۲۰/۸٪) مقاوم به پیپراسیلین-تازوباکتام و ۱۷ ایزوله (۱۸/۶٪) مقاوم به سولفومتوکسازول/تری‌متوپریم با کمترین فراوانی بودند. علاوه، ۵۴ ایزوله (۶۶/۲٪) به‌عنوان سوبه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک (MDR) و ۲۲ ایزوله (۱۲/۳٪) به‌عنوان سوبه‌های دارای مقاومت به طیف وسیع آنتی‌بیوتیک (XDR) تشخیص داده شد.



(b)

شکل ۱- فراوانی الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک و تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا

(a) الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف. (b) سوبه تشکیل‌دهنده بیوفیلم و فاقد بیوفیلم. IMI: ایمی‌پنم. CTX: سفوتاکسیم. MER: مروپنم. CIP: سیپروفلوکساسین. AMK: آمیکاسین. CAZ: سفتازیدیم. CFX: سفتریاکسون. CPE: سفالوتین. PIP/TAZ: پیپراسیلین/تازوباکتام. SXT: سولفومتوکسازول/تری‌متوپریم. A: سوبه‌های بیوفیلم قوی. B: سوبه‌های بیوفیلم متوسط. C: سوبه‌های بیوفیلم متوسط. D: سوبه‌های فاقد بیوفیلم

ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا از روش پورباران و همکاران با کمی اصلاح استفاده گردید (۱۳). در نهایت جذب نوری (OD) نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا خون، بررسی گردید.

برای بررسی میزان فلورسنت و تجزیه و تحلیل نتایج از روش مارتینز و همکاران استفاده گردید (۱۶). در ابتدا سوبه‌های مقاوم به چند دارو بر روی پلیت‌های نوترینت آگار (مرک، آلمان) حاوی غلظت‌های ۰/۲۵ تا ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر اتیدیوم بروماید به‌صورت یک خط از مرکز محیط به سمت کنار محیط کشت داده شدند. کشت سودوموناس آئروژینوزا PAO-1 و PAO-1EtBr به‌ترتیب به‌عنوان کنترل منفی و مثبت برای فعالیت پمپ افلاکس استفاده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت ساعت انکوبه شدند و پس از آن حداقل غلظت اتیدیوم بروماید مرتبط با توده باکتریایی که تحت نور UV فلورسنت ایجاد شده بود، در دستگاه Gel-Doc XR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ثبت شد. ایزوله‌هایی که میزان فلورسنت را در غلظت‌های پایین‌تر اتیدیوم بروماید نشان دادند، نسبت به ایزوله‌هایی که میزان فلورسنت را در غلظت‌های بالاتر EtBr نشان دادند، فعالیت پمپ افلاکس کمتری دارند. ایزوله‌هایی که انتشار فلورسانس را تنها در حداکثر غلظت اتیدیوم بروماید آزمایش شده (۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) نشان دادند، فعالیت پمپ افلاکس بیشتری را نشان دادند.

PCR برای انجام استخراج DNA ژنومیک از کیت استخراج شرکت کایژن استفاده شد. تمامی مراحل با توجه به پروتکل کیت، انجام گرفت. سپس، با استفاده از پرایمرهای جدول ۱، مراحل آماده‌سازی واکنش PCR برای هر ژن در دامنه دمایی مشخص، انجام شد. حجم نهایی واکنش ۵۰ میکرولیتر که شامل ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۲۵ پیکومولار و ۲۵ میکرولیتر مسترمیکس (Ampliqon، آلمان) تعیین شد. برای تکثیر ژن‌های مورد مطالعه از ترموسایکلر MJ Mini BioRad (ساخت آمریکا) استفاده گردید. از سوبه‌های سودوموناس آئروژینوزا ATCC27853 و سودوموناس آئروژینوزا ATCC19429 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. در نهایت، حضور ژن‌ها بر روی آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۷۸۵ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز گردید.

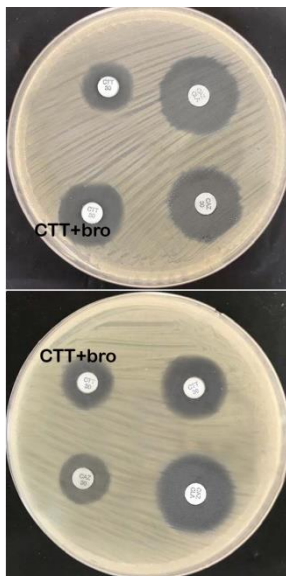
بررسی کیفی داده‌ها، با استفاده از روش‌های آمار توصیفی (تعیین فراوانی، درصد و میانگین)، نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ و آزمون آماری  $\chi^2$  صورت گرفت. به‌منظور بررسی ارتباط بین متغیرهای مختلف از آزمون‌های آماری آنوا دوطرفه و آزمون-تی استفاده گردید. در این مطالعه مقدار  $P \geq 0/05$  و  $P \geq 0/001$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

پراکنش سوبه‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم. بر اساس شکل ۱b، از مجموع ۹۱ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا، ۶ ایزوله (۳۰/۳۳٪) تشکیل‌دهنده بیوفیلم قوی، ۲۴ ایزوله (۱۹/۱۰٪) تشکیل‌دهنده بیوفیلم متوسط و ۳۱ ایزوله (۱۰/۱۱٪) تشکیل‌دهنده بیوفیلم ضعیف بودند. همچنین، ۳۰ ایزوله (۳۸/۲۰٪) فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم بودند.

جدول ۱- لیست پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

ژن	توالی نوکلئوتیدی	تنظیمات دمایی	طول قطعه (bp)	رفرنس
mexA	F: CTCGACCCGATCTACGTC R: GTCTTACCTCGACACCC	۹۴°C به مدت ۵ دقیقه سیکل (۳۰ ثانیه ۹۴°C، ۳۰ ثانیه ۵۶°C، ۴۰ ثانیه ۷۳°C) به مدت ۵ دقیقه	۵۰۳	(۱۷)
oprD	F: ATCTACCGCACAAACGATGAG R: GCCGAAGCCGATATAATCAAAC	۹۴°C به مدت ۵ دقیقه سیکل (۳۰ ثانیه ۹۴°C، ۳۰ ثانیه ۵۶°C، ۴۰ ثانیه ۷۳°C) به مدت ۵ دقیقه	۱۵۶	(۱۷)
oprM	F: GATC CCCGACTACCAGCGCCCG R: ATGCGGTAAGTGCGCCCGAAGGC	۹۴°C به مدت ۵ دقیقه سیکل (۳۰ ثانیه ۹۴°C، ۳۰ ثانیه ۵۶°C، ۴۰ ثانیه ۷۳°C) به مدت ۵ دقیقه	۱۴۷	(۱۷)
psIA	F: GTTCTGCCTGCTGTTGTTC R: GGTGCGTACCAGGTATTCG	۹۴°C به مدت ۵ دقیقه سیکل (۳۰ ثانیه ۹۴°C، ۳۰ ثانیه ۵۶°C، ۴۰ ثانیه ۷۳°C) به مدت ۵ دقیقه	۲۳۰	(۱۸)
psIB	F: GCTTCAAGATCAAGCGCATC R: ACCTCGATCATCACCAGGTC	۹۴°C به مدت ۸ دقیقه سیکل (۳۰ ثانیه ۹۴°C، ۴۵ ثانیه ۵۹°C، ۴۵ ثانیه ۷۲°C) به مدت ۵ دقیقه	۲۲۰	(۱۸)
psID	F: TGTACACCGTGCTCAACGAC R: CTTCGCGCCCGATCTTCATC	۹۴°C به مدت ۸ دقیقه سیکل (۳۰ ثانیه ۹۴°C، ۴۵ ثانیه ۵۹°C، ۴۵ ثانیه ۷۳°C) به مدت ۵ دقیقه	۱۵۰	(۱۹)
16s rRNA	F: GGGGGATCTTCGGACCTCA R: TCCTTAGAGTGCCACCCG	۹۴°C به مدت ۵ دقیقه سیکل (۳۰ ثانیه ۹۴°C، ۳۰ ثانیه ۵۶°C، ۴۰ ثانیه ۷۳°C) به مدت ۵ دقیقه	۹۵۶	(۲۰)

به‌طور معنی‌داری در ایزوله‌های حامل ژن‌های *psIA*، *psIB* و *psID* (با سطوح  $P=0/015$ ،  $P=0/011$ ،  $P=0/019$ ،  $P=0/015$  و  $P=0/003$ ) افزایش داشت.



شکل ۲- تشخیص سویه‌های تولیدکننده ESBL و AmpC در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا به روش انتشار از دیسک در صورتی که هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک همراه با برونیک اسید، بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر بود، ایزوله تولیدکننده AmpC می‌باشد. سویه‌هایی که

پراکنش سویه‌های تولیدکننده آنزیم‌های AmpC و ESBL بر اساس شکل ۲، از ۹۱ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا، ۶۸ ایزوله (۷۴/۷٪) تولیدکننده ESBL و ۵۳ ایزوله (۵۸/۲٪) تولیدکننده AmpC بودند.

پراکنش ژن‌های *mexA*، *oprD*، *ompM* و لوکوس *psI* بر اساس شکل ۳ و جدول ۲، از مجموع ۹۱ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا، ژن *mexA* در ۱۹ ایزوله (۱۹/۵٪)، ژن *psIA* در ۲۲ ایزوله (۲۴/۱٪)، ژن *oprD* در ۲۷ ایزوله (۲۹/۶٪)، ژن *psID* در ۱۹ ایزوله (۱۹/۵٪)، ژن *psIB* در ۳۶ ایزوله (۳۹/۵٪)، ژن *oprM* در ۴۱ ایزوله (۴۵/۰٪) شناسایی شدند.

بر اساس شکل ۴، مطالعه فنوتیپی بیان سیستم پمپ افلاکس با استفاده از اتیدیوم بروماید در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا نشان‌دهنده حضور پمپ افلاکس در ۳۴ ایزوله (۴۲/۸٪) بود. از ۹۱ ایزوله مورد بررسی، ۱۹ مورد در غلظت ۵٪ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۱۰ مورد بدون فلورسانس در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۱۱ مورد بدون فلورسانس در غلظت ۱/۵ میلی‌لیتر بر لیتر، ۱۴ مورد بدون فلورسانس در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۹ مورد بدون فلورسانس در غلظت‌های مختلف بودند.

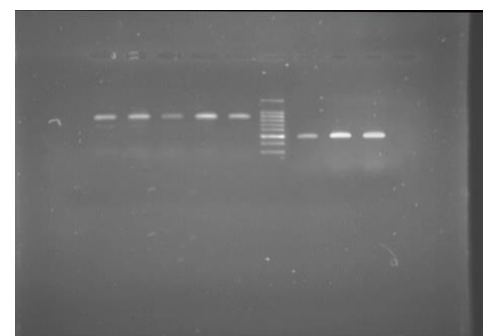
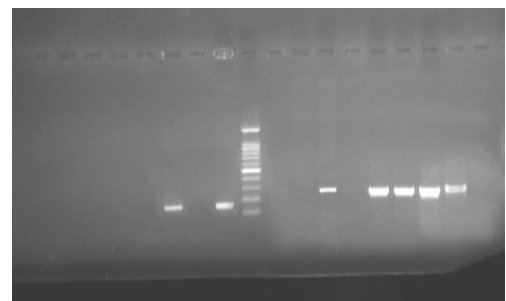
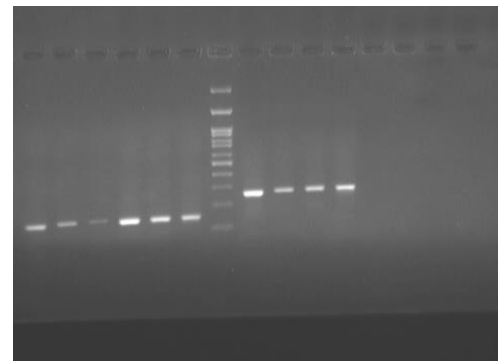
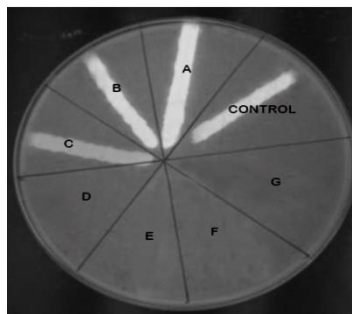
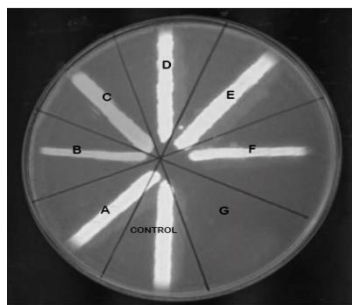
با توجه به جدول ۴ و سطح معنی‌دار بودن مقادیر  $P \leq 0/05$  و  $P \leq 0/001$ ، شیوع سویه‌های مقاوم به دارو و حساس به دارو تفاوت معنی‌داری در سویه‌های حامل لوکوس *psIABD* را نشان داد ( $P \leq 0/05$ ). علاوه بر این، در شکل ۴ ارتباط میزان بیان فنوتیپی سیستم پمپ افلاکس و پروموتور *psIABD* گزارش شد. به‌طوری‌که میزان فعالیت پمپ افلاکس

ATCC BAA-1143 به‌عنوان کنترل مثبت و از سویه ATCC 25922 *E. coli* به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

درای هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک و آنتی‌بیوتیک همراه با برونیک اسید می‌باشند، تولیدکننده AmpC نمی‌باشند. از سویه *Enterobacter cloacae*

جدول ۲- فراوانی ژن‌های *oprD*، *amexA*، *ompM* و لوکوس *pslABD* در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

جمع کل	سویه‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا (n=91)				ژن‌های پمپ افلاکس
	XDR (n=22)	MDR (n=54)	AmpC (n=68)	ESBL (n=53)	
۱۹	۱۹ (۸۶/۳٪)	۱۹ (۳۵/۱٪)	۱۹ (۲۷/۹٪)	۱۷ (۳۲/۱٪)	<i>mexA</i>
۳۶	۱۱ (۵۰٪)	۲۹ (۵۳/۷٪)	۳۶ (۵۲/۹٪)	۳۱ (۵۸/۴٪)	<i>oprD</i>
۴۱	۲۱ (۹۵/۴٪)	۳۸ (۷۰/۳٪)	۳۹ (۵۷/۳٪)	۴۰ (۷۵/۴٪)	<i>oprM</i>
۲۲	۲۲ (۱۰۰٪)	۲۲ (۴۰/۷٪)	۲۲ (۳۲/۳٪)	۲۲ (۴۱/۵٪)	لوکوس ژنی <i>psl</i>
۲۷	۱۹ (۸۶/۳٪)	۲۷ (۵۰٪)	۲۴ (۳۵/۲٪)	۲۷ (۵۰/۹٪)	<i>pslA</i>
۱۹	۱۱ (۵۰٪)	۱۹ (۳۵/۱٪)	۱۹ (۲۷/۹٪)	۱۹ (۳۵/۸٪)	<i>pslB</i>
					<i>pslD</i>



*pslB* برابر با ۲۲۰ جفت باز، برای ژن *pslD* برابر با ۱۵۰ جفت باز و برای ژن *rRNA* 16s برابر با ۹۵۶ جفت باز، چاهک ۱ کنترل منفی، M: مارکر ۱۰۰-جفت بازی

شکل ۴- میزان بیان فنوتیپی پمپ افلاکس در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا به روش کانتویل آگار

خط کشت دارای هاله قوی و درخشان نشان‌دهنده تجمع اتیدیوم بروماید داخل باکتری و عدم فعالیت پمپ افلاکس می‌باشد. CONTROL: سویه کنترل *P. aeruginosa* ATCC 27853. نمونه A: غلظت ۲/۵٪ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر. B: غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر. C: غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر. D: غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر. E: غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر. F: غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر. G: غلظت ۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر.

شکل ۳- الکتروفورز ژن‌های مطالعه شده در ایزوله‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا

طول محصولات سنتز شده برای ژن *mexA* برابر با ۵۰۳ جفت باز، برای ژن *oprD* برابر با ۱۵۶ جفت باز، برای ژن *oprM* برابر با ۱۴۷ جفت باز، برای ژن *pslA* برابر با ۲۳۰ جفت باز، برای ژن



جدول ۳- تجزیه و تحلیل آماری و بررسی ارتباط بین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک، آنزیم‌های بتالاکتاماز و لوکوس pslABD در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

آنزیم‌های بتالاکتامازی		pslABD لوکوس			الگوی مقاومت
سویه‌های تولیدکننده AmpC	سویه‌های تولیدکننده ESBL	pslD	pslB	pslA	آنتی‌بیوتیک
۰/۰۱۸	۰/۰۵۹	۰/۰۰۷	۰/۰۱۱	*۰/۰۰۲	IMI
۰/۰۳۸	۰/۱۲۲	۰/۰۳۳	۰/۰۸۲	۰/۰۲۴	CTX
۰/۰۰۱	۰/۰۷۷	۰/۰۱۲	۰/۰۱۴	۰/۰۵۲	MER
۰/۰۰۹	۰/۰۲۲	۰/۰۶۹	۰/۰۲۵	۰/۰۴۴	CIP
۰/۰۴۴	۰/۰۵۲	۰/۰۶۶	۰/۰۹۲	۰/۲۱	AMK
۰/۰۲۵	۰/۳۹	۰/۰۲۸	۰/۴۱۳	۰/۳۲۴	CAZ
۰/۰۱۵	۰/۰۸۲	۰/۰۲۸	۰/۰۱۰	۰/۰۴۲	CPE
۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	PIP/TAZ
۰/۰۰۲	۰/۰۸۹	۰/۰۲۹	۰/۰۳۷	۰/۰۴۲	SXT
۰/۰۴۱	۰/۳۱	۰/۰۰۲	۰/۰۶۲	۰/۰۵۵	XDR
ژن‌های سیستم پمپ افلاکس					
۰/۲۵	۰/۹۸	۰/۰۵۵	۰/۰۹۳	۰/۰۵۹	mexA
۰/۰۳۶	۰/۰۸۲	۰/۱۹	۰/۰۷۷	۰/۴۹	oprD
۰/۰۱۳	۰/۰۶۰	۰/۰۵۶	۰/۰۴۵	۰/۰۱۸	oprM

\*مقادیر مشخص شده جهت ارتباط‌سنجی بین متغیرهای مختلف. مقادیر  $P \leq 0.05$  و  $P \leq 0.01$  معنی‌دار در نظر گرفته شد. IMI: ایمی‌نم، CTX: سفوناکسیم، MER: مروپنم، CIP: سیپروفلوکساسین، AMK: آمیکاسین، CAZ: سفنازیدیم، CFX: سفتریاکسون، CPE: سفالوتین PIP/TAZ: پیراسیلین/تازوباکتام، SXT: سوفلومتوکسازول/تری‌متوپریم.

## بحث

پلی‌ساکارید کدگذاری شده توسط اپرون psl برای حفظ ساختار بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا ضروری است. طی گزارشات مختلف تنوع این اپرون در ایزوله‌های بالینی متفاوت می‌باشد. همچنین عملکرد هر یک از زیر مجموعه‌های اپرون psl نقش مهمی در افزایش فراوانی آن دارد. گزارشات ما نشان داد که ژن pslA در ۲۴/۱٪، ژن pslB در ۲۹/۶٪ و ژن pslD در ۱۹/۵٪ از ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شد. برخلاف نتایج مطالعه حاضر، قداکساز و همکاران و متوسل و همکاران شیوع بالایی از اپرون‌های ژن pslA و pslB را نشان دادند (۲۵ و ۲۶).

در مطالعه حاضر، ۶۷٪ از ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا تولیدکننده بیوفیلم بودند و در ۳۲/۹٪ درصد از این ایزوله‌ها تشکیل بیوفیلم مشاهده نشد. این درصد بالا از ایزوله‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم مشخص کرد که سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم‌های سطحی قدرت بیشتری در تشکیل بیوفیلم دارند. برخی مطالعات نشان داده‌اند که در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا عامل عفونت زخم قدرت تشکیل بیوفیلم در مقایسه با ایزوله‌های عامل عفونت ادراری و عفونت خون بیشتر می‌باشد. این مطالعه نشان داد که با توجه به افزایش مقاومت سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و توانایی آنها در ایجاد عفونت و همچنین وجود ایزوله‌هایی که به‌طور غالب واجد ژن‌های psl بوده و قادر به تولید بیوفیلم نیز می‌باشند، ضرورت غربالگری بیماران قبل از مصرف آنتی‌بیوتیک بدیهی می‌باشد چرا که در غیر این صورت احتمال انتشار انواع باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک در جمعیت افزایش خواهد یافت (۲۵).

بر اساس نتایج این مطالعه، فراوانی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به پنی‌سیلین و نورفلوکساسین در به ترتیب ۶۲/۶٪ و ۵۸/۲٪ بود. با این حال، ۱۲٪ از ایزوله‌ها مقاوم به سفالوتین و ۱۸/۶٪ از ایزوله‌ها مقاوم به سوفلومتوکسازول/تری‌متوپریم بودند. نتایج مشابهی در مطالعات ماکلین و همکاران (۲۱) و مینگ و همکاران (۹) گزارش شد. در برخی مطالعات از آفریقای جنوبی (۸) و ترکیه (۸)، فراوانی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به سفالوتین بیش از ۹۰ درصد گزارش شد.

با این حال، سویه‌های MDR و XDR به ترتیب در ۶۶/۲٪ و ۱۲/۳٪ ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شدند که با نتایج ارائه شده توسط اوکافور و همکاران مشابهت داشت (۸). همچنین، از ۹۱ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا، ۷۴/۷٪ تولیدکننده ESBL و ۵۸/۲٪ تولیدکننده AmpC بودند. گزارشات مشابهی در مطالعات ماکلین و همکاران مبنی بر شیوع بالایی سویه‌های تولیدکننده ESBL و AmpC وجود دارد که نشان دهنده افزایش روزافزون مقاومت گسترده به بتالاکتام‌هاست (۲۱). با این حال زینا و همکاران شیوع پایین سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا تولیدکننده AmpC را گزارش کرده‌اند (۲۲).

در این مطالعه، ژن‌های mexA، oprM و oprD به ترتیب در ۱۹/۵٪، ۳۹/۵٪ و ۴۵/۰٪ از ایزوله‌ها شناسایی شد. نتایج به‌دست آمده با مشاهدات وی وی و همکاران مشابهت داشت (۳۳). با این حال، محمود و همکاران در مطالعه خود فراوانی پایین ژن‌های mexA، oprM را نشان دادند (۲۴).

نقش مهمی در کنترل و درمان سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به درمان دارند.

نتایج ما فعالیت بالای پمپ‌های افلاکس در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم پای دیابتی را نشان داد. همچنین نشان داده شد که تشکیل بیوفیلم در این ایزوله‌ها می‌تواند نقش مهمی در افزایش مقاومت باکتری به دارو و در کنار آن افزایش فعالیت پمپ‌های افلاکسی داشته باشد. از این رو چنین می‌توان استنتاج کرد که، سویه‌های جدا شده از زخم‌های دیابتی (جدا شده از زخم‌های سطحی) به واسطه تماس بیشتر با موارد ضد عفونی و عوامل ضد میکروبی که جهت شستن و تمیز کردن زخم‌ها استفاده می‌شود، برای حفظ بقای خود تمایل بیشتری به افزایش فعالیت پمپ‌های افلاکس دارند. پس، در افرادی که دارای زخم پای دیابتی و عفونت ناشی از آن می‌باشند، باید فعالیت این پمپ‌ها را مدنظر قرار داد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت محترم پژوهش دانشگاه علوم پزشکی زاهدان اعلام می‌دارند.

### تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی را اعلام نکردند.

### مشارکت نویسندگان

تمامی اعضای نویسندگان در پژوهش و آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشته‌اند.

### حمایت مالی

این مقاله از با حمایت‌های مالی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان از رساله کارشناسی ارشد خانم مژده جهانتیغ استخراج شده است.

### ملاحظات اخلاقی

این تحقیق با اصول اخلاقی معاهده هلسینکی و منشور اخلاق پژوهش معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی زاهدان انجام شده است. تهیه سویه‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا و نمونه‌های این پژوهش مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی زاهدان با کد اخلاق IR.ZAMUS.REC.1396.140 می‌باشد.

### کد اخلاق

این مقاله دارای کد اخلاق IR.ZAMUS.REC.1396.140 می‌باشد.

## References

- Zhang Y, Zhao J, Han J, Fan Y, Xiong Z, Zou X, et al. Synergistic Activity of Imipenem in Combination with Cefazidime/Avibactam or Avibactam against Non-MBL-Producing Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Spectr* 2022;10:e02740-21. doi: 10.1128/spectrum.02740-21
- Arabestani MR, Tahmasebi H, Zeyni B. Diagnostic value of melting curve analysis based on multiplex-real time PCR in identification of Enterococci species. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2017;26:234-47.

تنظیم‌کننده psl نقش مهمی در تشکیل بیوفیلم دارد. کالوین و همکاران وقوع بیوفیلم در ایزوله‌های جهش psl را نشان داد، زیرا کمبود Psl با رونویسی بالای ژن *pelA* جبران شد (۲۷). به‌طور مشابه، در مطالعه ما، بر خلاف ژن *psl*، تفاوت در توزیع ژن *pelA* با توجه به تشکیل بیوفیلم معنی‌دار بود. بنابراین، ژن *pelA* به‌عنوان نشانگر تشکیل بیوفیلم برای ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا در نظر گرفته شده است.

نتایج حاصل از تست کارت ویل مشخص کرد که، ۹ ایزوله در هیچ غلظتی جذب فلورسانت را نشان نداد. همچنین مشخص شد که این سویه‌ها حامل آنزیم‌های ESBL و AmpC بودند. علاوه بر این، همه این سویه‌ها در گروه XDR دسته‌بندی شدند. این در حالی بود که، فراوانی لوکوس ژنی *psl* در این سویه‌ها در مقایسه با سویه‌های دارای فعالیت افلاکس پمپ، بیشتر بود. به‌طوری‌که ارتباط معنی‌داری میان *pslB*، *pslA* و *pslD* با  $P=0/03$ ،  $P=0/015$ ،  $P=0/019$ ،  $P=0/011$ ،  $P=0/015$  و  $P=0/03$  و میزان بیان فوتوبیسی سیستم پمپ افلاکس دیده شد. مطالعه اودوی و همکاران نشان داد که سویه‌های مقاوم به دارو و دارای آنزیم‌های بتالاکتامازی دارای بیشتری فعالیت پمپ افلاکسی می‌باشند. مطالعه آنها همچنین مشخص کرد که فراوانی ژن‌های عامل مقاومت به کار با پنم‌ها در سویه‌های با فعالیت پمپ افلاکس بیشتر در مقایسه با سویه‌های حساس به دارو، بیشتر بود (۲۸). بررسی‌های صورت گرفته توسط ویلانکورت و همکاران نیز نشان داد که سویه‌های مقاوم به چند دارو حامل آنزیم‌های بتالاکتامازی مختلف، دارای بیشتر فعالیت افلاکس پمپ می‌باشند (۷).

گرچه در مطالعه ما یک ارتباط مستقیم بین فعالیت‌های افلاکس پمپ و الگوی مقاومت به دارو و بیماری‌زایی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا گزارش شد، اما نتایج الرحمن و همکاران بیان‌کننده عدم ارتباط بین تشکیل بیوفیلم و فعالیت پمپ‌های افلاکسی وجود ندارد. آنها همچنین نشان دادند که سویه‌های حساس به برخی داروها نیز می‌توانند فعالیت بالای پمپ افلاکسی داشته باشند که این مورد بر خلاف نتایج ما می‌باشد (۲۹). همسو با مطالعه حاضر، ایوکاپلی و همکاران نشان دادند که سویه‌های با فعالیت بالای افلاکس پمپ توانایی تولید بیوفیلم را نیز دارند. البته آنها همچنین بیان کردند که برخی سویه‌های حساس به دارو نیز می‌توانند فعالیت بالای افلاکس پمپ داشته باشند (۳۰). باید در نظر داشت که فعالیت پمپ‌های افلاکس به عوامل مختلفی بستگی دارد. غلظت دارو، عوامل بیماری‌زای باکتری، نوع نمونه بالینی و حتی بخشی که بیمار بستری شده است نقش مهمی در افزایش یا کاهش فعالیت این پمپ‌ها دارند (۲۹). اگر سویه‌های جدا شده از بخش‌های عفونی را که بیشترین میزان مواد ضدباکتریایی استفاده می‌شود، را مورد ارزیابی قرار داد مشخص می‌شود که عوامل ضد میکروبی می‌توانند سبب ظهور باکتری‌هایی با فعالیت بالای پمپ‌های افلاکسی شوند (۳۱). از این رو، توجه به میزان فعالیت پمپ‌های افلاکسی

3. Zeyni B, Arabestani MR, Yousefi Mashuf R, Tahmasebi H. Evaluation of real-time PCR-based DNA melting method for detection of enterococcus faecalis and enterococcus faecium in clinical isolates. *J Babol Univ Med Sci* 2017;19:26-33.
4. Heydari N, Alikhani MY, Tahmasebi H, Asghari B, Arabestani MR. Design of melting curve analysis (MCA) by real-time polymerase chain reaction assay for rapid distinction of staphylococci and antibiotic resistance. *Arch Clin Infect Dis* 2019;14:e81604. doi: [10.5812/archcid.81604](https://doi.org/10.5812/archcid.81604)
5. Suresh M, Nithya N, Jayasree PR, Vimal KP, Manish Kumar PR. Mutational analyses of regulatory genes, mexR, nalC, nalD and mexZ of mexAB-oprM and mexXY operons, in efflux pump hyperexpressing multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *World J Microbiol Biotechnol* 2018;34:83. doi: [10.1007/s11274-018-2465-0](https://doi.org/10.1007/s11274-018-2465-0)
6. Garousi M, MonazamiTabar S, Mirazi H, Farrokhi Z, Khaledi A, Shakerimoghaddam A. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in diabetic foot infections: a global systematic review and meta-analysis. *Germes* 2023;13:362-72. doi: [10.18683/germes.2023.1406](https://doi.org/10.18683/germes.2023.1406)
7. Vaillancourt M, Limsuwanarot SP, Bressee C, Poopalrajah R, Jorth P. *Pseudomonas aeruginosa* mexR and mexEF antibiotic efflux pump variants exhibit increased virulence. *Antibiotics* 2021;10. doi: [10.3390/antibiotics10101164](https://doi.org/10.3390/antibiotics10101164)
8. Okafor JU, Nwodo UU. Antibigram profile and detection of resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* recovered from hospital wastewater effluent. *Antibiotics* 2023;6:12:1517. doi: [10.3390/antibiotics12101517](https://doi.org/10.3390/antibiotics12101517)
9. Meng L, Liu H, Lan T, Dong L, Hu H, Zhao S, et al. Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from raw milk revealed by whole genome sequencing. *Front Microbiol* 2020;11. doi: [10.3389/fmicb.2020.01005](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01005)
10. Dehbashi S, Tahmasebi H, Alikhani MY, Vidal JE, Seifalian A, Arabestani MR. The healing effect of *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) with co-infection of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*: A preclinical animal co-infection model. *Journal of Infection and Public Health* 2023;17:329-38. doi: [10.1016/j.jiph.2023.12.016](https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.12.016)
11. Pongchaikul P, Mongkolsuk P. Comprehensive analysis of imipenemase (IMP)-type metallo-beta-lactamase: A global distribution threatening Asia. *Antibiotics* 2022;11:236. doi: [10.3390/antibiotics11020236](https://doi.org/10.3390/antibiotics11020236)
12. Tahmasebi H, Dehbashi S, Arabestani MR. High resolution melting curve analysis method for detecting of carbapenemases producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University* 2018;7:70-7.
13. Porbaran M, Tahmasebi H, Arabestani M. A Comprehensive study of the relationship between the production of  $\beta$ -lactamase enzymes and iron/siderophore uptake regulatory genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Microbiol* 2021;2021:5565537. doi: [10.1155/2021/5565537](https://doi.org/10.1155/2021/5565537)
14. Vianna JS, Machado D, Ramis IB, Silva FP, Bierhals DV, Abril MA, et al. The contribution of efflux pumps in mycobacterium abscessus complex resistance to clarithromycin. *Antibiotics* 2019;8:153. doi: [10.3390/antibiotics8030153](https://doi.org/10.3390/antibiotics8030153)
15. Bokaeian M, Tahmasebi H. Molecular identification of genes responsible for resistance to aminoglycosides and methicillin in clinical samples of *Staphylococcus aureus*. *J Babol Univ Med Sci* 2017;19:38-46.
16. Martins M, McCusker MP, Viveiros M, Couto I, Fanning S, Pagès JM, et al. A simple method for assessment of mdr bacteria for over-expressed efflux pumps. *Open Microbiol J* 2013;7:72-82. doi: [10.2174/1874285801307010072](https://doi.org/10.2174/1874285801307010072)
17. Zahedani SS, Tahmasebi H, Jahantigh M. Coexistence of virulence factors and efflux pump genes in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of biofilm-forming strains from Iran. *Int J Microbiol* 2021;2021:5557361. doi: [10.1155/2021/5557361](https://doi.org/10.1155/2021/5557361)
18. Divyashree M, Mani MK, Karunasagar I. Association of exopolysaccharide genes in biofilm developing antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater. *Journal of Water and Health* 2021;20:176-84. doi: [10.2166/wh.2021.223](https://doi.org/10.2166/wh.2021.223)
19. Rajabi H, Salimizand H, Khodabandehloo M, Fayyazi A, Ramazanzadeh R. Prevalence of algD, pslD, pelF, PpgI, and PAPI-1 genes involved in biofilm formation in clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *BioMed Research International* 2022;2022:1716087. doi: [10.1155/2022/1716087](https://doi.org/10.1155/2022/1716087)
20. Hematzadeh A, Haghkhal M. Biotyping of isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human infections by RAPD and ERIC-PCR. *Heliyon* 2021;7:e07967. doi: [10.1016/j.heliyon.2021.e07967](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07967)
21. Maclean K, Njamo F, Serepa-Dlamini MH, Kondiah K, Green EI. Antimicrobial susceptibility profiles among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from professional SCUBA divers with otitis externa, swimming pools and the ocean at a diving operation in south africa. *Pathogens* 2022;11. doi: [10.3390/pathogens11010091](https://doi.org/10.3390/pathogens11010091)
22. Alkhulaifi Z, Mohammed K. Prevalence and molecular analysis of antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and environmental specimens in Basra, Iraq. *Iran J Microbiol* 2023;15:45-54. doi: [10.18502/ijm.v15i1.11917](https://doi.org/10.18502/ijm.v15i1.11917)
23. Veve MP, Mercurio NJ, Sangiovanni RJ, Santarossa M, Patel N. Prevalence and predictors of *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients with diabetic foot infections. *Open Forum Infect Dis* 2022;9. doi: [10.1093/ofid/ofac297](https://doi.org/10.1093/ofid/ofac297)
24. Rashid Mahmood A, Mansour Hussein N. Study of antibiotic resistant genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burns and wounds. *Archives of Razi Institute* 2022;77:403-11. doi: [10.22092/ari.2021.356681.1893](https://doi.org/10.22092/ari.2021.356681.1893)
25. Motevasel M, Haghkhal M. Antimicrobial Resistance Profiles and Virulence Genes of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Originated from Hospitalized Patients in Shiraz, Iran. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases* 2018;6:72-6. doi: [10.29252/JoMMID.6.2.3.72](https://doi.org/10.29252/JoMMID.6.2.3.72)
26. Ghadaksaz A, Imani Fooladi AA, Hosseini HM, Amin M. The prevalence of some *Pseudomonas* virulence genes related to biofilm formation and alginate production among clinical isolates. *Journal of Applied Biomedicine* 2015;13:61-8. doi: [10.1016/j.jab.2014.05.002](https://doi.org/10.1016/j.jab.2014.05.002)
27. Colvin KM, Gordon VD, Murakami K, Borlee BR, Wozniak DJ, Wong GC, et al. The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* 2011;7:e1001264. doi: [10.1371/journal.ppat.1001264](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001264)
28. Odoi H, Boamah VE, Boakye YD, Agyare C. Prevalence and phenotypic and genotypic resistance mechanisms of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical, environmental, and poultry litter samples from the ashanti region of Ghana. *J Environ Public Health* 2021;2021:9976064. doi: [10.1155/2021/9976064](https://doi.org/10.1155/2021/9976064)
29. Abd El-Rahman OA, Rasslan F, Hassan SS, Ashour HM, Wasfi R. The RND efflux pump gene expression in the biofilm formation of *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics (Basel)* 2023;12. doi: [10.3390/antibiotics12020419](https://doi.org/10.3390/antibiotics12020419)
30. Al-Ouqaili M, Jal'oot A, Suleiman Badawy A. Identification of an OprD and bla IMP gene-mediated carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* among patients with wound infections in Iraq. *Asian Journal of Pharmaceutics Supplementary Issue* 2018; 12. doi: [10.22377/ajp.v12i03.2634](https://doi.org/10.22377/ajp.v12i03.2634)
31. Ayoub Moubareck C, Hammoudi Halat D, Akkawi C, Nabi A, AlSharhan MA, AlDeesi ZO, et al. Role of outer membrane permeability, efflux mechanism, and carbapenemases in carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* from Dubai hospitals: Results of the first cross-sectional survey. *Int J Infect Dis* 2019;84:143-50. doi: [10.1016/j.ijid.2019.04.027](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.04.027)







## Correlation between Efflux Pumps Activity and Frequency of *psl*ABD Genes in Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* Collected from Diabetic Foot Infections

Mojdeh Jahantigh (Ph.D.)<sup>1</sup>, Hamed Tahmasebi (M.Sc.)<sup>2\*</sup>

1- Infection Diseases and Tropical Medicine Research Center, Research Institute of Cellular and Molecular Sciences in Infection Diseases, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

2- School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

Received: 31 December 2023, Accepted: 25 May 2024

### Abstract:

**Introduction:** The aim of this study is to investigate the correlation between efflux pump activity and the frequency of *psl*ABD genes in clinical isolates of *P. aeruginosa* collected from diabetic foot infections.

**Methods:** In this descriptive-analytical study, we obtained 91 isolates of *P. aeruginosa* from diabetic ulcers through biochemical testing. We assessed the antibiotic resistance patterns and identified ESBL- and AmpC-producing strains using the disc diffusion method. The activity of the efflux pumps was evaluated using the agar cartwheel method. Additionally, we investigated the *psl*ABD locus along with the *mexA*, *oprD*, and *oprM* genes using PCR.

**Results:** Out of the 91 *P. aeruginosa* isolates, 68 (74.7%) were identified as ESBL strains, and 53 (58.2%) as AmpC strains. Additionally, 61 isolates (67.1%) formed biofilms, while 30 isolates (32.9%) did not. Furthermore, the presence of the following genes was noted: *mexA* in 19 isolates (20.8%), *pslA* in 22 isolates (24.1%), *pslB* in 27 isolates (29.6%), *pslD* in 19 isolates (20.8%), *oprD* in 36 isolates (39.5%), and *ompM* in 41 isolates (45%). A significant relationship was observed between the presence of *pslA* ( $P=0.02$ ), *pslB* ( $P=0.019$ ), and *pslD* ( $P=0.03$ ) and the frequency distribution of beta-lactamase-producing strains. Moreover, isolates carrying the *pslA* ( $P=0.012$ ), *pslB* ( $P=0.49$ ), and *pslD* ( $P=0.025$ ) genes exhibited significantly increased efflux pump activity.

**Conclusion:** In *P. aeruginosa* from diabetic foot, the *psl* locus is crucial in enhancing the activity of efflux pumps and influencing the distribution of AmpC and ESBL-producing strains.

**Keywords:** Drug resistance, Biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, Efflux pump, Beta-lactamase.

Conflict of Interest: No

\*Corresponding author: H. Tahmasebi, Email: h.tahmasebi87@yahoo.com

**Citation:** Jahantigh M, Tahmasebi H. Correlation between efflux pumps activity and frequency of *psl*ABD genes in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* collected from diabetic foot infections. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2024;19(2):31-39.

