

Investigation of *marA* Efflux Pump Gene Expression in Ciprofloxacin Resistant *Salmonella enteritidis* Clinical Strains Using Real-Time PCR

Marjan Khosravani^{1,2}, Mohammad Mehdi Soltan Dallal^{3,4}, Mehdi Norouzi^{5,6}

1. Ph.D. Department of Microbiology, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran. ORCID ID: 0000-0001-5419-4574

2. Ph.D. Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

3. Professor, Division of Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran., (Corresponding Author), Tel: +98-21-66402640, Email: msoltandallal@gmail.com, ORCID ID: 0000-0002-3421-3974

4. Professor, Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran.

5. Associate Professor, Department of Virology, School of Public Health, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-3560-9508

6. Associate Professor, Research Center for Clinical Virology, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Background and Aim: Ciprofloxacin-resistant *Salmonella* spp. are among the most important causative agents of food-borne infections. The *marA* efflux pump in this bacterium plays a significant role in the development of drug resistance. The aim of this study was to investigate *marA* efflux pump gene expression in Ciprofloxacin resistant *Salmonella enteritidis* clinical strains by Real Time PCR.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, strains of *Salmonella enteritidis* were isolated from clinical specimens of feces using microbial methods. Antibiotic resistance of ciprofloxacin-resistant strains was evaluated by disk diffusion method. The presence of *marA* efflux pump in the clinical strain of *Salmonella enteritidis*, intermediate ciprofloxacin-resistant, was evaluated using Cart-wheel and PCR. The results of this study were analyzed using SPSS 21 software and one-way ANOVA.

Results: From the 1200 fecal clinical specimens, 60 *Salmonella enteritidis* were isolated. The highest resistance was related to 9 strains (15%) and 11 intermediate strains (18%) ciprofloxacin. and the least resistance was related to imipenem and chloramphenicol (100% sensitive). The results of cartwheel and PCR methods showed that all strains intermediate or resistant to ciprofloxacin had a *marA* efflux pump. Finally, Real-Time PCR results showed a significant up-regulation of *marA* gene in *S. enteritidis* strains.

Conclusion: According to the results of Real-Time PCR, it seems that the *marA* efflux pump gene is one of the resistance agents in ciprofloxacin-resistant *Salmonella enteritidis*.

Keywords: *Salmonella enteritidis*, Efflux Pump, *marA*, Real Time PCR

Received: Mar 2, 2019

Accepted: Nov 19, 2019

How to cite the article: Marjan Khosravani, Mohammad Mehdi Soltan Dallal, Mehdi Norouzi. Investigation of *marA* Efflux Pump Gene Expression in Ciprofloxacin Resistant *Salmonella enteritidis* Clinical Strains Using Real-Time PCR. SJKU 2020; 25(1): 14-26

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

بررسی بیان ژن پمپ افلاکس *marA* در سویه‌های بالینی *سالمونلا انترتیدیس* مقاوم به

سیروفلوکساسین با استفاده از Real Time PCR

مرجان خسروانی^{۱*}، محمد مهدی سلطان دلال^{۲*}، مهدی نوروزی^{۳*}

۱. دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران. کد ارکید: ۴۵۷۴-۵۴۱۹-۰۰۰۰-۰۰۰۰-۰۰۰۰

۲. دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.

۳. استاد، بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران (نویسنده مسئول)، تلفن: ۸۸۹۹۲۹۷۱-۰۲۱، پست

الکترونیک: msoltandallal@gmail.com. کد ارکید: ۳۹۷۴-۳۴۲۱-۰۰۰۰-۰۰۰۰-۰۰۰۰

۴. استاد، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۵. دانشیار، گروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. کد ارکید: ۳۵۶۰-۹۵۰۸-۰۰۰۰-۰۰۰۰-۰۰۰۰

۶. دانشیار، مرکز تحقیقات ویروس شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سویه‌های مقاوم به سیروفلوکساسین *سالمونلا انترتیدیس* یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌زای انتقال‌دهنده از راه مواد غذایی می‌باشند، به طوری که پمپ افلاکس *marA* در این باکتری نقش بسزایی در ایجاد مقاومت به سیروفلوکساسین دارد. هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن پمپ افلاکس *marA* در سویه‌های بالینی *سالمونلا انترتیدیس* مقاوم به سیروفلوکساسین با استفاده از روش Real Time PCR است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، سویه‌های *سالمونلا انترتیدیس* از نمونه بالینی مدفوع با استفاده از روش‌های میکروبی جداسازی شد و مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مقاوم به سیروفلوکساسین با روش دیسک دیفیوژن بررسی شد. سپس وجود پمپ افلاکس *marA* در سویه بالینی *سالمونلا انترتیدیس* مقاوم و حدواسط به سیروفلوکساسین با روش کارت ویل و PCR بررسی شد. هم چنین بیان ژن *marA* در سویه‌های *سالمونلا انترتیدیس* با استفاده از روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. در انتها، نتایج این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANNOVA) تحلیل گردید.

یافته‌ها: از میان ۱۲۰۰ نمونه بالینی مدفوع، ۶۰ نمونه *سالمونلا انترتیدیس* جداسازی شد که بیشترین مقاومت مربوط به سیروفلوکساسین ۹ سویه (۰/۱۵) و ۱۱ سویه حد واسط (۰/۱۸) و کمترین مقاومت به ایمی پنم و کلرامفنیکل (۰/۱۰۰) حساس بودند. نتایج روش کارت ویل و PCR نشان داد که از میان ۲۰ سویه مقاوم و حد واسط به سیروفلوکساسین، تمامی آن‌ها دارای ژن پمپ افلاکس *marA* بودند. به دنبال آن، بیان ژن پمپ افلاکس *marA* در سویه‌های مقاوم و حد واسط به سیروفلوکساسین افزایش معنی‌داری داشته است ($P < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: بر پایه نتایج Real Time PCR، ژن پمپ افلاکس *marA* به عنوان یکی از عوامل مقاومت *سالمونلا انترتیدیس* مقاوم به سیروفلوکساسین است.

کلمات کلیدی: *سالمونلا انترتیدیس*، پمپ افلاکس، Real Time PCR *marA*

وصول مقاله: ۹۷/۱۲/۱۱ اصلاحیه نهایی: ۹۸/۷/۱ پذیرش: ۹۸/۷/۲۸

مقدمه

سالمونلا/انتریکا زیرگونه انتریکا سرووار انتریتیدیس یکی از باکتری‌های بیماری‌زای انتقال‌دهنده از راه مواد غذایی است که اخیراً به اغلب درمان‌های کوئینولون مقاوم شده است (۱). سالمونلا/انتریتیدیس یک باکتری گرم منفی بی‌هوازی اختیاری بوده که به عنوان یکی از عوامل مهم ایجادکننده گاستروانتریت در نظر گرفته می‌شود (۱). بر طبق آمار سازمان بهداشت جهانی از سال ۱۹۹۰، سالمونلا/انتریکا زیرگونه انتریکا سروتایپ/انتریتیدیس به عنوان شایع‌ترین عامل گاستروانتریت سالمونلایی در سرتاسر جهان مطرح و جایگزین سالمونلا تیفی موریوم گردید (۲). بیماری‌های ناشی از سالمونلا در کودکان و افراد بالغ و مسن شایع است و سالانه میلیون‌ها مورد بیماری سالمونلوز در دنیا رخ می‌دهد. سالمونلوز در ایران یک بیماری مطرح می‌باشد و گزارشاتی هرچند محدود در مورد شیوع برخی گونه‌های آن در کشور به ثبت رسیده است (۲). بسیاری از کشورها طغیان‌های مرتبط با جداسازی سالمونلاهای مقاوم به چند دارو را از ماکیان، دام‌ها و خوک گزارش کرده‌اند. ظهور مقاومت‌های دارویی در باکتری سالمونلا/انتریتیدیس هم در انسان و هم در حیوانات گزارش شده است و این مسئله به عنوان یکی از مشکلات سلامت عمومی محسوب می‌شود. سویه‌های سالمونلا/انتریتیدیس دارای مقاومت‌های چندگانه دارویی مشکلات عدیده‌ای را در درمان ایجاد کرده‌اند، به طوری که یکی از دلایل مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در این باکتری استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها است (۳). سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین از جمله مهم‌ترین سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک سالمونلا/انتریتیدیس می‌باشند که به تدریج به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها در حال مقاوم شدن هستند. به دنبال تجویز سیپروفلوکساسین جهت درمان عفونت ناشی از این باکتری، مقاومت به این آنتی‌بیوتیک نیز رخ داده است، به طوری که در برخی از موارد میزان مقاومت به ۱۰۰٪ رسیده است (۴). به طور کلی مکانیسم‌های مختلفی

جهت مقاوم‌شدن سویه‌های سالمونلا/انتریتیدیس به آنتی‌بیوتیک وجود دارد که یکی از مکانیسم‌ها ممانعت از تجمع دارو درون سلول به وسیله سیستم‌های افلاکس است. پمپ‌های افلاکس مواد سمی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها را به محیط خارج پمپ می‌کنند و دارا بودن پمپ‌های افلاکس یکی از توانایی‌های این باکتری برای مقاوم شدن به آنتی‌بیوتیک‌ها است. به طور کلی پمپ‌های افلاکس باکتریایی بر اساس توالی اسید آمینه‌ای به پنج دسته تقسیم می‌شوند (۵). پمپ‌های افلاکس از نظر بالینی به طور مؤثری در ارتباط با گروه‌های پمپ افلاکس Nodulation Division Resistance (RND) (تقسیم گره گذاری مقاومت) می‌باشند که با آزادسازی انرژی نیرو محرکه پروتون در خارج کردن آنتی‌بیوتیک نقش دارند. سیستم افلاکس RND یکی از سیستم‌های مهم افلاکس در باکتری سالمونلا/انتریتیدیس است که پمپ افلاکس Multiple antibiotic resistance factor (*marA*) یکی از پمپ‌های مهم این خانواده است و مطالعات نشان می‌دهد که پمپ افلاکس *marA* می‌تواند به نواحی خاصی از پروموتور ژن پمپ افلاکس *Acriflavin resistance AB (acrAB)* که یکی از مهم‌ترین پمپ‌های افلاکس سالمونلا است، متصل شده و می‌تواند بیان ژن *acrAB* را افزایش دهد (۶). مطالعات نشان می‌دهد که افزایش بیان ژن *marA* می‌تواند باعث مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکوئینولون مانند سیپروفلوکساسین در سویه‌های بالینی سالمونلا/انتریتیدیس شود (۶). مطالعات زیادی در زمینه بررسی بیان ژن‌های پمپ افلاکس در سویه‌های سالمونلا/انتریتیدیس انجام گرفته است (۷، ۸، ۹). Ferrari و همکارانش (۲۰۱۳)، بیان ژن‌های پمپ افلاکس *acrB*، *soxS*، *marA* و *ramA* مرتبط با پمپ افلاکس AcrAB-TolC را در سویه‌های سالمونلا/انتریکا مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید، ژن‌های

غنی کننده سلنیت F و محیط انتخابی MAC، XLD آگار کشت داده شد. پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی مورد نظر جهت جداسازی و تأیید سالمونلا بر روی جدایه‌های مشکوک (مالونات، تست‌های گالری انتروباکتریاسه تست‌های (MR-، Urease, lysin decarboxylase، SIM، VP، TSA، Simmon citrate agar) استفاده شده و ایزوله جدا شده با ویژگی‌های بیوشیمیایی: لاکتوز منفی، حرکت مثبت، واکنش دکربوکسیلاسیون لیزین مثبت، سترات مثبت، هیدرولیز اوره منفی و متیل رد مثبت به عنوان یک ایزوله متعلق به جنس سالمونلا قلمداد می‌گردید (۹). تمامی محیط‌های مورد استفاده از شرکت مرک بوده است (Merck, Germany). سپس آزمون سروتایپینگ جهت مشخص نمودن آنتی‌ژن‌های O و H با آنتی سرم اختصاصی مربوطه انجام گردید (Staten Serum Institut, Copenhagen, Denmark).

بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها نسبت به آنتی-بیوتیک‌ها

پس از شناسایی و تأیید سویه‌های سالمونلا /انتریتیدیس، حساسیت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن بر اساس استاندارد CLSI ۲۰۱۷ (Clinical and Laboratory Standards Institute) مورد بررسی قرار گرفت (۱۰). حساسیت ایزوله‌های سالمونلا /انتریتیدیس نسبت به دیسک‌های آنتی بیوتیکی سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم)، سولفومتاکسازول/تریمتوپریم (۵ میکروگرم)، تراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، آموکسی سیلین (۱۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم) و مروپنم (۱۰ میکروگرم) (MAST, UK) در محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck-Germany) بررسی شد (۱۱). لازم به ذکر است در تمامی انجام آزمایش‌ها، از سویه استاندارد

پمپ افلاکس مرتبط با AcrAB-TolC را بیان می‌کنند (۷). Blair و همکارانش (۲۰۱۵)، بیان ژن‌های پمپ افلاکس RND را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن پمپ افلاکس RND در اثر غیرفعال شدن ژن *acr* کاهش می‌یابد. مهارکننده‌های پمپ افلاکس بیان ژن‌های پمپ افلاکس را کاهش می‌دهد (۸). با توجه به بروز مقاومت‌های دارویی در سویه‌های بیماری‌زای سالمونلا /انتریتیدیس و از آنجا که پمپ افلاکس *marA* یکی از فاکتورهای مهم در سویه‌های بالینی سالمونلا /انتریتیدیس مقاوم به سیپروفلوکساسین است نتایج این مطالعه می‌تواند برای مراکز تحقیقاتی و درمانی حائز اهمیت باشد و در استراتژی‌های پیشگیری و درمان، مورد استفاده قرار گیرد. هدف از این مطالعه بررسی بیان پمپ افلاکس *marA* در سویه‌های سالمونلا /انتریتیدیس مقاوم به سیپروفلوکساسین جداسازی شده از نمونه‌های مدفوع از بیمارستان‌های شهر تهران است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری، کشت و تشخیص ایزوله‌های باکتریایی سالمونلا /انتریتیدیس

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، در فاصله زمانی حدوداً ۶ ماه از اردیبهشت‌ماه تا آبان‌ماه سال ۱۳۹۵ از تعداد ۱۲۰۰ نمونه مدفوع مشکوک به سالمونلا از بیمارستان‌های امام خمینی (ره)، شریعتی و مرکز طبی کودکان شهر تهران از بیماران جداسازی شد. نمونه‌ها در ۲ سوآپ در ۲ محیط انتقالی Carry-Blair به همراه فرم خطی که مربوط به اطلاعات فردی بیمار بوده به آزمایشگاه مرجع سلامت دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل شدند. شناسایی سویه‌های سالمونلا /انتریتیدیس بر اساس تست‌های میکروپشناسی و سرولوژیک انجام گرفت. برای تأیید فنوتیپی تشخیص جنس و گونه سالمونلا، از محیط کشت

سالمونلا ATCC ۱۳۰۷۶ از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به عنوان کنترل مثبت مقاوم به سیپروفلوکساسین (حاوی ژن *marA*) استفاده شد.

بررسی فنوتیپی وجود پمپ افلاکس *marA* با روش کارت ویل

به منظور بررسی فنوتیپی وجود پمپ افلاکس در ایزوله‌های سالمونلا/نترتیدیس، از روش آگار حاوی اتیدیوم بروماید (روش کارت ویل) استفاده شد. سویه‌های دارای پمپ افلاکس توانایی پمپ کردن اتیدیوم بروماید به خارج از سلول را دارند؛ بنابراین در تست به رنگ تیره و آن‌هایی که فاقد پمپ افلاکس هستند، اتیدیوم بروماید به داخل سلول نفوذ کرده و فلوروسنت (روشن) مشاهده می‌شوند. در ابتدا سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین سالمونلا/نترتیدیس، روی پلیت‌های نوترینت آگار حاوی غلظت‌های متفاوت اتیدیوم بروماید (از ۰/۲۵ تا ۲/۵ میلی گرم برلیتر) به صورت یک خط از مرکز محیط کشت به سمت کنار کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در نهایت میزان فلوروسنت هر ایزوله با استفاده از دستگاه ژل داک اندازه‌گیری شد. سویه‌هایی که خاصیت فلوروسنت ندارند، دارای پمپ افلاکس بودند و سویه‌هایی که خاصیت فلوروسنت دارند، فاقد پمپ افلاکس بودند (۱۲).

استخراج DNA

استخراج DNA به روش دستی (فل کلروفرم) انجام شد. به‌طور خلاصه، به رسوب تهیه شده از کشت باکتری‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، به ترتیب ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز (۱۳ mM EDTA, pH 7.4; Tris-HCl, ۳ میکرولیتر پروتئین سدیم دودسیل سولفات (۲۵٪ SDS)، ۲۰ mg/ml K اضافه نموده و آن را در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار می‌دهیم. به دنبال آن ۶۰۰ میکرولیتر محلول فل-کلروفرم - ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵ تهیه شده) می‌افزاییم تا یک‌فاز شیری‌رنگ

یکنواخت تشکیل شود. سپس با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و فاز بالایی (فاز آبی) را به لوله‌های جدید منتقل می‌کنیم. این مرحله دو بار تکرار شده و به منظور رسوب DNA، هم حجم فاز آبی اتانول سرد و خالص به همراه ۰/۱ میکرولیتر استات سدیم (IM) اضافه می‌کنیم و آن را به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم. بعد از آن، لوله مورد را سانتریفیوژ (۵ دقیقه ۱۳۰۰۰ دور) نموده و رسوب حاصله را پس از خشک کردن و حل کردن در بافر به عنوان DNA مورد استفاده قرار می‌دهیم و در نهایت برای تأیید صحت استخراج ژنوم از الکتروفورز ژل آگاروز ۱٪ استفاده شد (۱۳).

واکنش PCR برای ژن پمپ افلاکس *marA*

واکنش PCR به منظور وجود ژن پمپ افلاکس *marA* در ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین سالمونلا/نترتیدیس انجام گرفت، به‌طوری که واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده به عنوان الگو (۱۰۰ نانوگرم)، ۰/۵ میکرو لیتر از پرایمر رفت، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر برگشت (۰/۴ میلی مولار)، ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس (sina gen, iran)، ۱۰/۵ میکرولیتر آب از مقطر دو بار تقطیر انجام گرفت. در ادامه واکنش PCR برای ژن *marA* با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت (جدول ۱) با برنامه دمایی مناسب (جدول ۲) در طی ۳۵ سیکل انجام گردید که انتظار محصول PCR با اندازه ۱۵۰ bp می‌رفت (۱۴).

بررسی بیان ژن پمپ افلاکس *marA* در سویه‌های بالینی سالمونلا/نترتیدیس

استخراج RNA با استفاده از ریزول (sina gen, iran) بر طبق دستورالعمل انجام گرفت. سپس جهت تعیین غلظت و کیفیت RNA استخراج شده OD از RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ خوانده شد. نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ خلوص RNA را نسبت به آلودگی پروتئین نشان می‌دهد

۲۳ باز و $16S\ rRNA-R5'-3'$ CCGCTGGCAACAAAGGATAA با طول ۲۰ باز بود.

تجزیه و تحلیل آماری

محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام گردید و داده‌های Real Time PCR در مقایسه با ژن house keeping ($16S\ rRNA$) با آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) آنالیز و با استفاده از نرم افزار REST مورد بررسی قرار گرفت و هم چنین $P < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر قرار گرفته شد.

که در محدوده ۲ بود. همچنین نسبت ۲۶۰ به ۲۳۰ که نشان دهنده وجود آلودگی‌هایی از قبیل فنل و سایر ترکیبات هنگام استخراج است در محدوده ۲ تا ۲/۲ برای تمامی نمونه ها به دست آمد که غلظت خوبی از RNA که فاقد آلودگی پروتئین و مناسب برای سنتز cDNA بود به دست آمد. در ادامه، سنتز cDNA با استفاده از کیت Quanti Tect Reverse Transcription kit (Takara, Japan) انجام گرفت. در انتها، غلظت cDNAهای استخراج توسط نانودراپ تعیین غلظت شدند (۱۰۰ تا ۱۵۰ نانوگرم). به منظور بررسی ارزیابی بیان ژن پمپ افلاکس $marA$ از روش Real Time PCR کمی Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) با استفاده مستر میکس حاوی سایر گرین (Ampliqon, Denmark) انجام گرفت. مواد مورد استفاده در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر از cDNA با غلظت ۵ نانوگرم، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر رفت و ۰/۵ میکرولیتر پرایمر از پرایمر برگشت با غلظت ۰/۱۵ میکرو مولار و ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس حاوی سایر گرین (۱X) بود که در دستگاه Corbett استرالیا انجام گرفت. برنامه دمایی مورد استفاده در qPCR طبق (جدول ۳) شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه بود که در ۴۰ سیکل انجام شد. همچنین ژن $16S\ rRNA$ به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت (۱۵). در انتها بیان نسبی ژن $marA$ توسط روش $\Delta\Delta C_T$ محاسبه گردید. لازم به ذکر است پرایمرهای مورد استفاده در این قسمت $marA\ F\ 5'-3'$ GACCCGGACGTTCAAAAACCTAT با $marAR-5'-3'$ TCGCCATGCATATTGGTGAT با ۲۰ باز و همچنین $16SrRNAF5'-3'$ CGTGTGTGTGAAATGTTGGGTAA با ۲۲ باز و

جدول ۱. پرایمر مورد استفاده برای ژن *marA*

پرایمر (۵ به ۳)	نام ژن	اندازه قطعه
F GACCCGGACGTTCAAAAACTA T R TCGCCA TGCATATTGGTGAT	<i>MarA</i>	۲۲ باز ۲۰ باز

جدول ۲. برنامه دمایی مورد استفاده در PCR

نام مرحله	دما (سانتی گراد)	زمان
واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation)	۹۵	۵ دقیقه
واسرشتگی (Denaturation)	۹۵	۳۰ ثانیه
اتصال پرایمرها به DNA الگو (Annealing)	۵۵	۳۰ ثانیه
طویل شدن رشته الگو (Extension)	۷۲	۳۰ ثانیه

جدول ۳. برنامه دمایی مورد استفاده در Real Time PCR

نام مرحله	دما (سانتی گراد)	زمان
واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation)	۹۵	۵ دقیقه
واسرشتگی (Denaturation)	۹۵	۳۰ ثانیه
اتصال پرایمرها به DNA الگو (Annealing)	۶۰	۳۰ ثانیه
طویل شدن رشته الگو (Extension)	۷۲	۳۰ ثانیه

جدول ۴. الگوی مقاومت میکروبی سوبه‌های بالینی مقاوم به سیپروفلوکساسین و حد واسطه *سالمونلا انتریتیدیس*.

سیپروفلوکساسین	ایمپینم	کلرامفنیکل	مروپنم	آموکسی سیلین	تری متوپریم	تتراسایکلین	سفترایکسون	استرپتومایسن	سفتواکسیم	سفتازیدیم	شماره نمونه
CIP	IMI	C	MEM	A	TS	T	CRO	S	CTX	CAZ	
نیمه حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	۲
نیمه حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	۳
نیمه حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	۴
مقاوم	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	نیمه حساس	حساس	حساس	۵
نیمه حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	نیمه
نیمه حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	۶
مقاوم	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	۹

۱۳	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	نیمة حساس
۱۴	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس	حساس	نیمة حساس
۱۵	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	نیمة حساس
۱۶	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
۱۹	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس	حساس	مقاوم
۲۲	حساس	حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس	حساس	حساس	نیمة حساس
۲۸	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	نیمة حساس
۳۱	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس	حساس	مقاوم
۳۲	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس	حساس	مقاوم
۳۳	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	نیمة حساس
۳۸	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
۴۰	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	نیمة حساس
۴۱	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
۶۶	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم

یافته‌ها

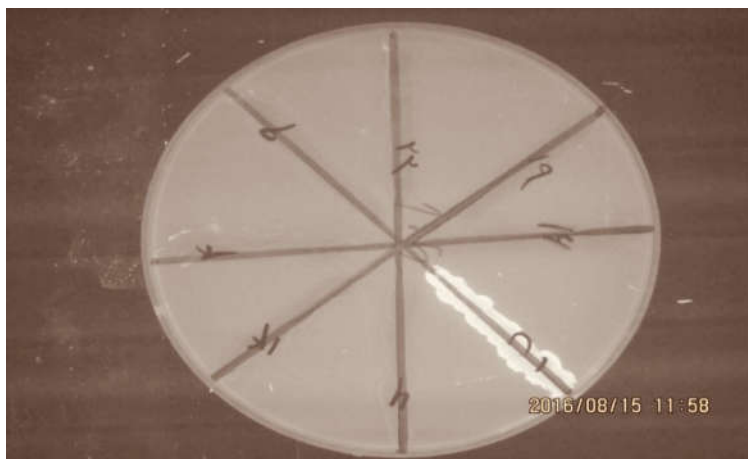
جداسازی و بررسی الگوی مقاومت میکروبی سویه‌های *سالمونلا/انتریتیدیس* در این مطالعه، از میان ۱۲۰۰ نمونه مدفوع مشکوک به سالمونلا، تعداد ۶۰ سویه سالمونلا جداسازی گردید. در ادامه ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *سالمونلا/انتریتیدیس* با استفاده از روش دیسک دیفیوژن انجام گرفت. نتایج نشان داد که از میان ۶۰ سویه *سالمونلا/انتریتیدیس* بیشترین مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین با ۲۰ سویه (۳۳ درصد) مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند که ۹ سویه (۱۵ درصد) مقاوم و ۱۱ سویه (۱۸ درصد) حد واسطه (Intermediate) بودند و کمترین میزان مقاومت به کلرامفنیکل و ایمی پنم (۱۰۰ درصد) حساس بودند (جدول ۳).

بررسی وجود پمپ افلاکس توسط تست کارت ویلدر این مطالعه، سویه‌های *سالمونلا/انتریتیدیس* مقاوم و حد واسطه به سیپروفلوکساسین جهت بررسی وجود پمپ افلاکس توسط تست روش کارت ویل مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج تست کارت ویل نشان داد که تمامی سویه‌های مقاوم و حد واسطه به سیپروفلوکساسین دارای پمپ افلاکس *marA* هستند، به طوری که سویه‌های دارای پمپ افلاکس، اتیدیوم بروماید را به سمت بیرون پمپ می‌کنند؛ ولی سویه‌های فاقد پمپ افلاکس این توانایی را ندارند و اتیدیوم بروماید در داخل سلول وارد می‌شود و از خود خاصیت فلوروسنت دارند (شکل ۱).

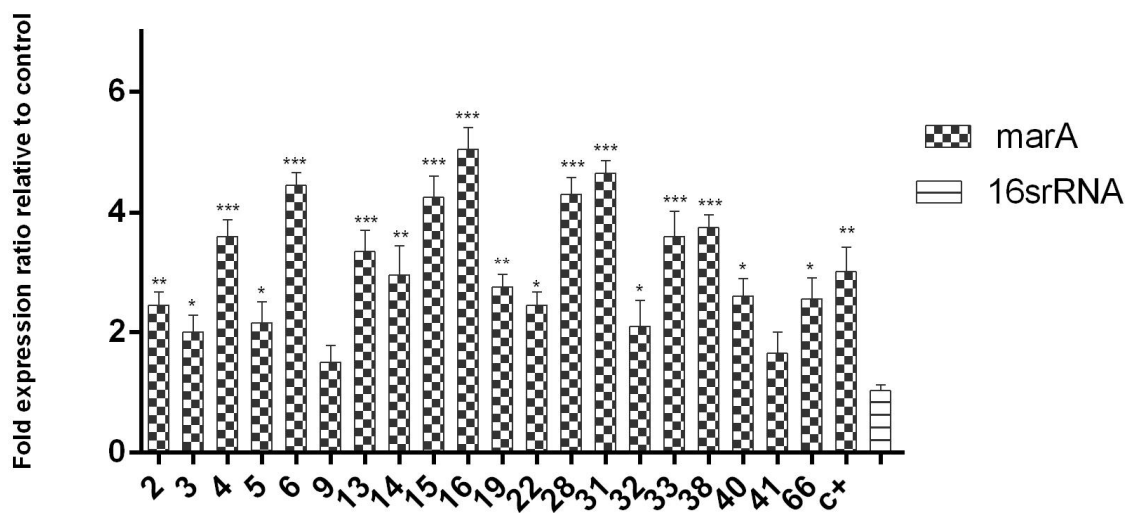
نتایج PCR ژن *marA* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین به منظور بررسی وجود ژن پمپ افلاکس *marA* در سویه‌های *سالمونلا/انتریتیدیس* جداسازی شده، از پرایمرهای اختصاصی این ژن استفاده شد و انتظار وجود باند ۱۵۰ جفت باز وجود داشت که در ژل الکتروفورز مشاهده شد. ژن *marA* در تمامی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین دیده شد (۲۰ نمونه) و ارتباط معنی‌داری

بین وجود ژن *marA* و مقاومت به سیپروفلوکساسین در بین سویه‌ها وجود داشت ($P < ۰/۰۵$).

بررسی بیان ژن *marA* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین در سویه‌های *سالمونلا/انتریتیدیس* در این مطالعه، بیان نسبی ژن پمپ افلاکس *marA* توسط روش Real Time PCR کمی (qRT-PCR) مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۲). تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت‌شدن آغازگرها و عدم تکثیر قطعات غیر اختصاصی برای ژن با استفاده از منحنی ذوب تعیین شد. نتایج نشان داد که بیان ژن *marA* در تمامی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین افزایش داشتند و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین بیان ژن *marA* با بیان ژن *SrRNA* وجود داشت ($P < ۰/۰۵$).



شکل ۱. نتایج تست کارت ویل به منظور تعیین وجود پمپ افلاکس. سویه‌های فاقد پمپ افلاکس فلوروسانس و سویه‌های فاقد پمپ افلاکس فاقد فلوروسانس می‌باشند.



شکل ۲. نمودار بیان ژن *marA* در سویه‌های مختلف سالمونلا مقاوم به سیپروفلوکساسین. اعداد محور عمودی میزان بیان ژن را نشان می‌دهند (Fold expression) و اعداد محور افقی شماره سویه‌ها را نشان می‌دهد. به صورت چند برابر شدن بیان در مقایسه با ژن کنترل *16S rRNA* بیان شده است. (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; n=3).

بحث

در این مطالعه میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *سالمونلا انترتیدیس* و هم چنین میزان بیان ژن پمپ افلاکس *marA* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که از میان ۶۰ سویه *سالمونلا انتریکا* جداسازی شده، ۲۰ سویه مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. با توجه به این نتایج، درمان و کنترل عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم امری نگران‌کننده به نظر می‌رسد. هم چنین، با توجه به اثرات جانبی آنتی‌بیوتیک ایمی پنم و مروپنم، این دارو برای درمان عفونت‌های *سالمونلا* مناسب نیست. مطالعات مختلف در دنیا بر روی بررسی میزان مقاومت سویه‌های *سالمونلا* به سیپروفلوکساسین انجام شده است (۱۱). عبدالحی و همکارانش (۱۳۹۰)، میزان مقاومت دارویی *سالمونلا انتریکا* جداسازی از نمونه‌های بالینی مختلف را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که هیچ مقاومتی نسبت به ایمی پنم و سیپروفلوکساسین وجود نداشت (۱۶). رنجبر و همکارانش (۱۳۸۸)، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *سالمونلا تیفی موریوم* جداسازی شده از نمونه‌های بالینی را مورد مطالعه نشان دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که هیچ کدام از ایزوله‌ها نسبت به سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون و جنتامایسین مقاومتی نشان ندادند (۱۷). با مقایسه نتایج این مطالعه و سایر مطالعات می‌توان به این نتیجه رسید که میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در سویه‌های *سالمونلا* در حال افزایش است و گزارش‌های مختلفی از میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین وجود دارد. یکی از دلایل میزان متفاوت مقاومت به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در برخی از کشورها است. در ادامه، میزان وجود ژن پمپ افلاکس *marA* و بیان آن در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن *marA* در تمامی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین افزایش داشتند و از نظر آماری تفاوت

معنی‌داری بین بیان ژن *marA* با بیان ژن *rRNA16S* وجود داشت.

در پژوهشی پمپ‌های افلاکس را در ۵۲ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به سیپروفلوکساسین با استفاده از اتیدیوم بروماید مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که پمپ‌های افلاکس نقش مهمی را در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارد (۱۸). طی تحقیقی که روی بیان ژن‌های پمپ‌های افلاکس در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش quantitative Real time PCR انجام دادند، نشان دادند که بیشتر مکانیسم مقاومت دارویی از تغییر در بیان ژن‌های پمپ‌های افلاکس دارویی از جمله ژن‌های پمپ افلاکس *norA* و *norB* است. میزان بیان ژن‌های پمپ افلاکس تا ۱۲٪ در حضور آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش می‌یابد که با مطالعه ما همخوانی داشت (۱۹).

Goli و همکاران (۲۰۱۸) طی پژوهشی که روی بیان ژن‌های پمپ‌های افلاکس در سویه‌های *سودومونوس انتروژینوزا* داشتند نشان دادند افزایش بیان این ژن‌ها منجر به ایجاد مقاومت دارویی می‌گردد و این موضوع را به روش quantitative Real time PCR بررسی نمودند و این روش را بهترین روش جهت بررسی افزایش بیان ژن عنوان نمودند که در مطالعه ما ژن پمپ افلاکس *marA* در سویه‌های مقاوم افزایش بیان داشته است (۲۰).

در پژوهشی دیگر در ایران با عنوان بررسی بیان و عملکرد ژن پمپ‌های افلاکس ایزوله‌های مقاوم به چند دارو در *استیویاکتر بومانی* غیر کلونال به روش Real-time PCR تفاوت میزان مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نشان داده شد (۲۱). Pourmand و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای وجود ژن پمپ افلاکس *norA* / *استافیلوکوکوس اورئوس* و بیان آن را در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با روش Real Time PCR مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که ژن *norA*

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی به شماره ۳۱۳۲۰ است که از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که حامی مالی این طرح تحقیقاتی است، کمال سپاس-گزاری و تشکر را داریم. این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجویی خانم مرجان خسروانی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز است که بدین‌وسیله از تلاش همکاران آزمایشگاه میکروپزشناسی دانشگاه تهران-دانشکده بهداشت و تمام کسانی که در انجام این پروژه همکاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

در تمامی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین وجود دارد و بیان ژن آن در مجاورت بیوساید هگزا هیدروکوئینولون افزایش می‌یابد (۲۲).

نتیجه‌گیری

به‌صورت کلی، با مقایسه نتایج مطالعه ما و سایر محققان می‌توان به این نتیجه رسید که ژن *marA* پمپ افلاکس یکی از مکانیسم‌های مهم بیماری‌زایی در باکتری *سالمونلا* /*نتریتیدیس* است که در ایجاد مقاومت باکتری به سیپروفلوکساسین نقش مهمی دارد که می‌توان با مهار این ژن سبب کاهش حساسیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری شود.

منابع

1. Sánchez-Vargas FM, Abu-El-Haija MA, Gómez-Duarte OG. Salmonella infections: an update on epidemiology, management, and prevention. Travel Med Infect Dis. 2011;9(6):263-277.
2. Ranjbar R, Naghoni A, Izadi M, Joneidi Jafari N, Panahi Y. Isolation and antibiotics resistance pattern determination of *Salmonella typhimurium*. Iran J of Public Health. 2008;11(2): 115-118.
3. Fernández J, Guerra B, Rodicio MR. Resistance to Carbapenems in Non-Typhoidal *Salmonella enterica* Serovars from Humans, Animals and Food. Vet Sci. 2018;5(2):40.
4. Gong J, Kelly P, Wang C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* Serovar *Indiana* in China (1984-2016). Zoonoses Public Health. 2017; 64(4):239-251.
5. Duraes FAPM, Pinto MMM, de Sousa MESP. Medicinal Chemistry Updates on Bacterial Efflux Pump Modulators. Curr Med Chem. 2018; 9:43-56.
6. Shen J, Yang B, Gu Q, Zhang G, Yang J, Xue F, et al. The Role of AcrAB-TolC Efflux Pump in Mediating Fluoroquinolone Resistance in Naturally Occurring *Salmonella* Isolates from China. Foodborne Pathog Dis. 2017;14(12):728-734.
7. Ferrari RG, Galiana A, Cremades R, Rodríguez JC, Magnani M, Tognim MC, et al. Expression of the *marA*, *soxS*, *acrB* and *ramA* genes related to the AcrAB/TolC efflux pump in *Salmonella enterica* strains with and without quinolone resistance-determining regions *gyrA* gene mutations. Braz J Infect Dis. 2013;17(2):125-130.
8. Blair JM, Buckner MM, La Ragione RM, Newcombe J, Dwyer DJ, Ivens A, et al. Beyond Antimicrobial Resistance: Evidence for a Distinct Role of the AcrD Efflux Pump in *Salmonella* Biology. M Bio. 2013; 22 (6): 1916-1919.

9. Busse M. Media for Salmonella. Inter J food microbial. 1995; 26(1):117-131.
10. Clinical and laboratory standards institute (CLSI), Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. CLSI, Wayne Pa. 2015; 10: 16- 26.
11. Stephen J, Ivonne D, Ronald J. Manual of antimicrobial susceptibility testing. ASM J. 2005;4: 616-619.
12. Martins M1, 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; 22(7):72-82.
13. Saremi M, Tavallaei M, Rapid genomic DNA extraction. Forensic science International: Genetics supplement series. 2008;1: 63-65.
14. Kim KY, Woo GJ. Expression of *acrB* and *ramA* in fluoroquinolone resistant mutants from multi-drug resistant *Salmonella enterica* serovar *Haardt*. Lett Appl Microbiol . 2011;52(5):484-490.
15. Furutani S, Kajiya M, Aramaki N , Kubo J. Rapid detection of *Salmonella enterica* in food using a compact disc-shaped device. Micromachines (Basel). 2016;7(1):10-17.
16. Abdollahi A, Najafipour S, Kouhpayeh S A, Meshkibaf M H, Naghdi M. *salmonella enterica*. Serotyping, Drug Resistance & Extended Spectrum of – Lactamase (FSBLs). J fasa Univ Med Sci. 2011;1(1):38-44.
17. Ranjbar R, Naghoni A, Izadi M, Joneidi Jafari N, Panahi Y. Isolation and antibiotics resistance pattern determination of *Salmonella typhimurium*. Iran J Public Health. 2009;11(2): 115-118.
18. Costa SS, Junqueira E, Palma C, Viveiros M, Melo-Cristino J, Amaral L, et al. Resistance to antimicrobials mediated by efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. Antibiotics Basel. 2013; 13:2(1):83-99 .
19. Dumas JL, van Delden C, Perron K, Köhler T. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. FEMS Microbiol Lett. 2006;254(2):217-225.
20. Goli HR, Nahaei MR, Rezaee MA, Hasani A, Kafil HS, Aghazadeh M, et al. Role of MexAB-OprM and MexXY-OprM efflux pumps and class 1 integrons in resistance to antibiotics in burn and Intensive Care Unit isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Public Health. 2018;11(3):364-372.
21. Goudarzi H, Doraghi M, Dabiri H, Ghalavand Z. Functional analysis of multidrug efflux pumps genes of *Acinetobacter baumannii* strains. Pejouhesh. 2013; 37 (2): 107-112.
22. Pourmand MR, Yousefi M, Salami SA, Amini M. Evaluation of expression of NorA efflux pump in ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* against hexahydroquinoline derivative by real-time PCR. Acta Med Iran. 2014; 52(6):424-429.