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, Divison 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 Medial 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

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و پنجم / خرداد و تیر ۱۳۹۹-۲۶/۱۴

بررسی بیان ژن پمپ افلاکس *marA* در سویه‌های بالینی *سالمونلا انتریتیدیس* مقاوم به سیپروفلوکساسین با استفاده از Real Time PCR

مرجان خسروانی [۱و۲]، محمد مهدی سلطان دلال [۳و۴]، مهدی نوروزی [۵و۶]

۱. دکتری تخصصی ،گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۵۴۱۹-۴۵۷۴

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:۰۲۱-۸۸۹۹۲۹۷۱، پست الکترونیک: msoltandallal@gmail.com،کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۳۴۲۱-۳۹۷۴

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: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۳۵۶۰-۹۵۰۸

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

چکیده

زمینه و هدف: سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین *سالمونلا انتریتیدیس* 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 سیپروفلوکساسین دارد. هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن پمپ افلاکس *marA* در سویه‌های بالینی *سالمونلا انتریتیدیس* مقاوم به سیپروفلوکساسین با استفاده از روش Real Time PCR است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، سویه‌های *سالمونلا انتریتیدیس* از نمونه بالینی مدفوع با استفاده از روش‌های میکروبی جداسازی شد و مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با روش دیسک دیفیوژن بررسی شد. سپس وجود پمپ افلاکس *marA* در سویه بالینی *سالمونلا انتریتیدیس* مقاوم و حدواسط به سیپروفلوکساسین با روش کارت ویل و PCR بررسی شد. هم چنین بیان ژن *marA* در سویه‌های *سالمونلا انتریتیدیس* 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 انتریتیدیس* جداسازی شد که بیشترین مقاومت مربوط به سیپروفلوکساسین ۹ سویه (۱۵٪) و ۱۱ سویه حد واسط (۱۸٪) و کمترین مقاومت به ایمی پنم وکلرامفنیکل (۱۰۰٪) حساس بودند. نتایج روش کارت ویل و PCR نشان داد که از میان ۲۰ سویه مقاوم و حد واسط به سیپروفلوکساسین، تمامی آن‌ها دارای ژن پمپ افلاکس *marA* بودند. به دنبال آن، بیان ژن پمپ افلاکس *marA* در سویه‌های مقاوم و حد واسط به سیپروفلوکساسین 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 انتریتیدیس* مقاوم به سیپروفلوکساسین است.

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

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

مقدمه

سالمونلا انتریکا زیرگونه انتریکا سروار 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، *سالمونلاانتریکا* زیر گونه انتریکا سروتایپ *انتریتیدیس* به عنوان شایع‌ترین عامل گاستروانتریت سالمونلایی در سرتاسر جهان مطرح و جایگزین *سالمونلا تیفی موریوم* گردید(۲). بیماری‌های ناشی از سالمونلا درکودکان و افراد بالغ و مسن شایع است و سالانه میلیون‌ها مورد بیماری سالمونلوز در دنیا رخ می‌دهد .سالمونلوز در ایران یک بیماری مطرح می باشد و گزارشاتی هرچند محدود در مورد شیوع برخی گونه های 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 کرده اند. ظهور مقاومت‌های دارویی در باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* هم در انسان و هم در حیوانات گزارش شده است و این مسئله به‌عنوان 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 آنتی بیوتیک‌ها در حال مقاوم شدن هستند. به دنبال تجویز سیپروفلوکساسین جهت درمان عفونت ناشی از این باکتری، مقاومت به این آنتی بیوتیک نیز رخ داده است، به‌طوری که در برخی از موارد میزان مقاومت به ۱۰۰٪ رسیده است(۴). به‌طور کلی مکانیسم‌های مختلفی جهت مقاوم‌شدن سویه‌های *سالمونلا انتریتیدیس* به آنتی-بیوتیک وجود دارد که یکی از مکانیسم‌ها ممانعت از تجمع دارو درون سلول به وسیله سیستم‌های افلاکس است. پمپ-های 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. به‌طور کلی پمپ‌های افلاکس باکتریایی بر اساس توالی اسید آمینه‌ای به پنج دسته تقسیم می‌شوند(۵). پمپ-های افلاکس از نظر بالینی به‌طور مؤثری در ارتباط با گروه‌های پمپ افلاکس Nodulation Division Resistance (RND) (تقسیم گره گذاری مقاومت) می‌باشند که با آزادسازی انرژی نیرو محرکه پروتون در خارج‌کردن آنتی‌بیوتیک نقش دارند. سیستم افلاکس RND یکی از سیستم‌های مهم افلاکس در باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* است که پمپ افلاکس Multiple antibiotic resistance factor A) (*marA*) یکی از پمپ‌های مهم این خانواده است و مطالعات نشان می‌دهد که پمپ افلاکس *marA* می‌تواند به نواحی خاصی از پروموتر ژن پمپ افلاکس *Acriflavin resistance AB* (*acrAB*) که یکی از مهم‌ترین پمپ‌های افلاکس سالمونلا است، متصل شده و می‌توانند بیان ژن *acrAB* را افزایش دهد(۶). مطالعات نشان می‌دهد که افزایش بیان ژن *marA* می‌تواند باعث مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های فلورئوکوئینولون 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(۶،۷،۸). Ferrari و همکارانش (۲۰۱۳)، بیان ژن‌های پمپ افلاکس *marA*، *soxS*، *acrB* 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

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 غیرفعال‌شدن 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 جداسازی‌شده 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 میکروب‌شناسی و سرولوژیک انجام گرفت. برای تائید فنوتیپی تشخیص جنس و گونه سالمونلا، از محیط کشت غنی کننده سلنیتF و محیط انتخابی MAC، XLD آگارکشت داده شد. پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی مورد نظر جهت جداسازی و تائید سالمونلا بر روی جدایه-های مشکوک (مالونات، تست‌های گالری انتروباکتریاسه تست‌های (MR-، Urease,lysin decarbocylase Simmon citrate agar، TSA، SIM،VP) استفاده شده و ایزوله جداشده با ویژگی‌های بیوشیمیایی: لاکتوز منفی، حرکت مثبت، واکنش دکربوکسیلاسیون لیزین مثبت، سیترات مثبت، هیدرولیز اوره منفی و متیل رد مثبت به‌عنوان 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 ایزوله ها نسبت به آنتی-بیوتیک‌ها

پس از شناسایی و تائید سویه‌های *سالمونلا انتریتیدیس*، حساسیت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن بر اساس استاندارد CLSI۲۰۱۷ (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 (۱۰میکروگرم)، سولفومتاکسازول/تریمتوپریم (۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، آموکسی‌سیلین (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

سالمونلا ATCC۱۳۰۷۶ 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 انتریتیدیس*، از روش آگار حاوی اتیدیوم بروماید (روش کارت ویل) استفاده شد. سویه‌های دارای پمپ افلاکس توانایی پمپ‌کردن 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 انتریتیدیس*، 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 فلورسنت هر ایزوله با استفاده از دستگاه ژل داک اندازه-گیری شد. سویه‌هایی که خاصیت فلورسنت ندارند، دارای پمپ افلاکس بودند و سویه‌هایی که خاصیت فلورسنت دارند، فاقد پمپ افلاکس بودند(۱۲).

استخراج DNA

استخراج DNA به روش دستی (فنل کلروفرم) انجام شد. به‌طور خلاصه، به رسوب تهیه شده از کشت باکتری‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، به ترتیب ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز (Tris-Hcl, pH7.4; EDTA۵۰ mM، ۱۳ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات (SDS۲۵٪)، ۳ میکرولیتر پروتئین از K (۲۰mg/ml) اضافه نموده و آن را در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار می‌دهیم. به دنبال آن ۶۰۰ میکرولیتر محلول فنل- کلروفرم – ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵ تهیه شده) می‌افزاییم تا یک‌فاز شیری‌رنگ یکنواخت تشکیل شود. سپس با دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و فاز بالایی (فاز آبی) را به لوله های 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 (1M) 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 خشک‌کردن و حل‌کردن در بافر به عنوان DNA مورد استفاده قرار می‌دهیم و در نهایت برای تائید 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 انتریتیدیس* 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)(۱x)، 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 (جدول۱) با برنامه دمایی مناسب (جدول ۲) در طی ۳۵ سیکل انجام گردید که انتظار محصول PCR با اندازه ۱۵۰bp می-رفت(۱۴).

بررسی بیان ژن پمپ افلاکس *marA* در سویه‌های بالینی *سالمونلا انتریتیدیس*

استخراج RNA با استفاده ترایزول (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

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 مسترمیکس حاوی سایبرگرین (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 مسترمیکس حاوی سایبر گرین (۱x) بود که در دستگاه Corbett استرالیا انجام گرفت. برنامه دمایی مورد استفاده در qPCR طبق (جدول ۳) شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه بود که در ۴۰ سیکل انجام شد. هم‌چنین ژن *۱۶ S r*RNA به‌عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت(۱۵). در انتها بیان نسبی ژن *marA* توسط روش ΔΔCT محاسبه گردید. لازم به ذکر است پرایمرهای مورد استفاده در این قسمت -*marA* F 5′ GACCCGGACGTTCAAAAACTAT -3’ با ۲۲ باز و -*marA*R-5’ TCGCCATGCATATTGGTGAT -3’ با ۲۰ باز و همچنین -*16SrRNA*F5’ CGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAA-3’ با ۲۳ باز و -*16S rRNA*-R5’ CCGCTGGCAACAAAGGATAA-3’ 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 (*۱۶ S r*RNA) با آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) آنالیز و با استفاده از نرم افزار REST مورد بررسی قرار گرفت و هم چنین P< ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر قرار گرفته شد.

جدول ۱. پرایمر مورد استفاده برای ژن *marA*

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

جدول ۲. برنامه دمایی مورد استفاده در PCR

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

جدول ۳. برنامه دمایی مورد استفاده در Real Time PCR

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

جدول ۴. الگوی مقاومت میکروبی سویه‌های بالینی مقاوم به سیپروفلوکساسین و حد واسط *سالمونلا انتریتیدیس*.

شماره نمونه	سفتازیدیم CAZ	سفوتاکسیم CTX	استرپتومایسن S	سفتریاکسون CRO	تتراسایکلین T	تریمتوپریم TS	آموکسی سیلین A	مروپنم MEM	کلرامفنیکل C	ایمیپنم IMI	سیپروفلوکساسین CIP
۲	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	نیمه حساس
۳	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	نیمه حساس
۴	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	نیمه حساس
۵	حساس	حساس	نیمه حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم
۶	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	نیمه حساس
۹	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم

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

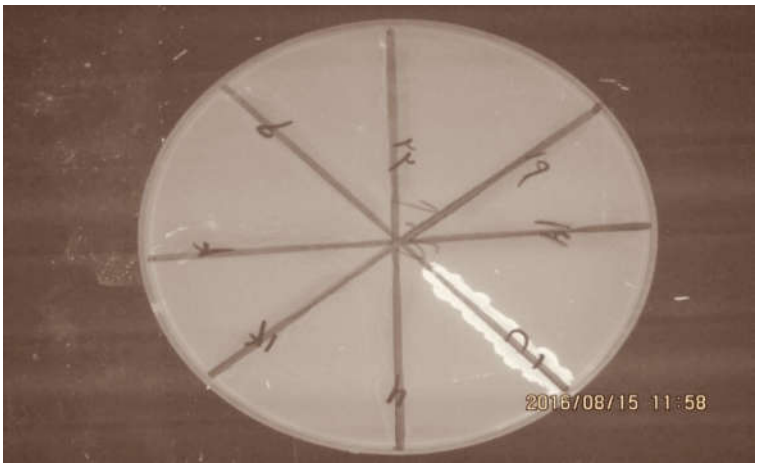
یافته‌ها

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 واسط (Intermediate) بودند و کمترین میزان مقاومت به کلرامفنیکل و ایمی پنم (۱۰۰ درصد) حساس بودند (جدول ۳).

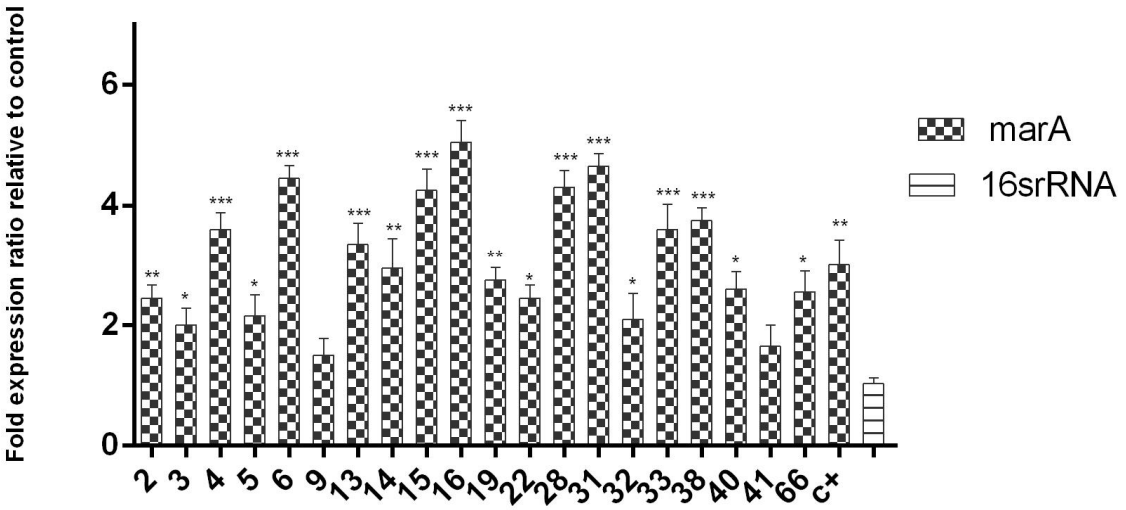
بررسی وجود پمپ افلاکس توسط تست کارت ویلدر این مطالعه، سویه‌های *سالمونلا انتریتیدیس* مقاوم و حد واسط به سیپروفلوکساسین جهت بررسی وجود پمپ افلاکس توسط تست روش کارت ویل مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج تست کارت ویل نشان داد که تمامی سویه‌های مقاوم و حد واسط به سیپروفلوکساسین دارای پمپ افلاکس *marA* هستند، به‌طوری‌که 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 فلورئوسنت 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 *S* *۱۶rRNA* 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 فلورئوسنس 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 سویه ها را نشان می‌دهد. به صورت چند برابر شدن بیان در مقایسه با ژن کنترل *۱۶S rRNA* بیان شده است. (*:P <۰/۰۵ ، **:P <۰/۰۱ ، *** P <۰/۰۰۱ : n= ۳).

بحث

در این مطالعه میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *سالمونلا انتریتیدیس* 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 نگران-کننده 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). عبدالهی 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 هیچ‌کدام 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 *rRNA۱۶ s* وجود داشت.

در پژوهشی پمپ های افلاکس را در ۵۲ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به سیپروفلوکساسین با استفاده از اتیدیوم بروماید مورد مطالعه قراردادند. نتایج این مطالعه نشان داد که پمپ‌های افلاکس نقش مهمی را در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارد(۱۸). طی تحقیقی که روی - بیان ژن های پمپ های افلاکس در باکتری - *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش quantitative Real time PCR انجام دادند ، نشان دادند که بیشتر مکانیسم - مقاومت دارویی از تغییر در بیان ژن های پمپ های افلاکس دارویی ازجمله ژن های 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 ژن-های پمپ‌های افلاکس در سویه‌های *سودوموتوس ائروژینوزا* داشتند نشان دادند افزایش بیان این ژن ها 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 *استوباکتر بومانی* غیرکلونال 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*

در تمامی سویه های 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 انتریتیدیس است* که در ایجاد مقاومت باکتری به سیپروفلوکساسین نقش مهمی دارد که می‌توان با مهار این ژن سبب کاهش حساسیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری شود.

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 میکروب‌شناسی دانشگاه تهران-دانشکده بهداشت و تمام کسانی که در انجام این پروژه همکاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

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.