مقاله پژوهشی

فراوانی سویه‌های مولد ژن‌های *algD*، *rhlR*، *rhlI* و *aprA* در جدایه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از بیماران بیمارستان‌های جنوب فارس

نویسندگان:

کرامت اله دری[۱]، فرزان مدرسی[۲*]، محمدرضا شکیبایی[۳]، الهام معظمیان[۴]

۱- دانشجوی دکتری، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۲- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

۳- گروه میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۴- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.20, No.2, Summer 2022

چکیده:

مقدمه: مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تولید *بیوفیلم دو عامل مهم در بیماری‌زایی و تداوم طولانی‌مدت عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا می‌باشند*. هدف از مطالعه حاضر بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ژن‌های دخیل در بیماری‌زایی و مقاومت این باکتری در منطقه جنوب فارس بود.

روش کار: جدایه‌ها بر اساس روش‌های استاندارد میکروب‌شناسی و بیوشیمیایی شناسایی شدند. سپس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* با آزمون آنتی بیوگرام دیسک دیفیوژن تعیین شد. ژن‌های *algD*، *rhlR*، *rhlI* و *aprA* به کمک PCR ردیابی شدند.

یافته‌ها: در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۴۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر در درمان این باکتری به ترتیب کلیستین و پلی‌میگزین- ب با صفر درصد، مروپنم، ۱ جدایه (۲/۵ درصد)، سیپروفلوکساسین، ۳ جدایه (۷/۵ درصد)، ایمی‌پنم، ۳ جدایه (۷/۵ درصد) و آمیکاسین، ۳ جدایه (۷/۵ درصد) بودند. در ردیابی ژن‌های *algD* ، rhlR ، rhlI و aprA ، صد درصد جدایه ها حامل ژن *algD* ، ۹۶ درصد حامل ژن rhlR، ۹۴ درصد حامل ژن rhlI و ۹۱ درصد حامل ژن aprA بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان‌دهنده حضور بالای ژن‌های *algD*، *rhlR*، *rhlI* و *aprA* در جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* بود. با توجه شیوع بالای ژن *algD* در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مطالعه حاضر که در تولید کپسول دخیل است، کنترل عفونت‌های این باکتری به دلیل وجود مقاومت چندگانه و توانایی تولید کپسول امری ضروری و مهم است.

واژگان کلیدی: مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سودوموناس آئروژینوزا، *algD*، *rhlR*، *rhlI* و *aprA*

Pars J Med Sci 2022;20(2):39-47

مقدمه:

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی با توانایی ایجاد عفونت‌های فرصت‌طلب در گیاهان، حیوانات و انسان است. امروزه این باکتری یکی از بیماری‌زاهای مهم بیمارستانی به‌ویژه در بخش سوختگی و پیوند محسوب می‌شود. *سودوموناس آئروژینوزا* عامل اولیه عفونت‌های ریوی در افراد مبتلابه فیروز سیستیک و بیماری مزمن انسداد ریوی نیز می‌باشد[۱]. این باکتری به دلیل داشتن ژنوم بزرگ ۷-۵/۵ میلیون جفت بازی قابلیت بقای بالا و توانایی انطباق با طیف وسیعی از محیط‌ها را دارد [۲]. در میان جمعیت‌های *سودوموناس آئروژینوزا* تنوع زیادی از مقاومت ذاتی و اکتسابی وجود دارد که باعث به وجود آمدن سویه‌های جدید با الگوی مقاومت چندگانه شده است.

در بسیاری از پژوهش‌ها، نقش ژن‌های مختلف در ایجاد بیماری‌زایی توسط عوامل مختلف با تکیه بر ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و عوامل وابسته شامل عوامل چسبندگی به سلول‌های اپیتلیال سلول زنده [۳]، اگزوتوکسین‌ها، همچون اگزوتوکسین A، با فعالیت آنزیمی که از خانواده ریبوزیل ترانس

* نویسنده مسئول، نشانی: گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران.

تلفن تماس: 09177919952 پست الکترونیک:Sadeghdorri159@gmail.com

دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۱ اصلاح:۱۴۰۱/۰۳/۲۹ پذیرش:۱۴۰۱/۰۷/۱۸

فرازها هستند [۴]، پروتئازها، همچون پروتئاز IV، که می‌تواند یکپارچگی پروتئین‌های عناصر بافت همبند همچون الاستین، کلاژن، فیبرونکتین، لامینن را به خطر انداخته و در نهایت باعث ایجاد آسیب به بافت میزبان شده و یا با تجزیه پروتئین‌های متصل شونده به آهن باعث ایجاد عفونت شود [۵] و رنگ‌دانه‌ها، همچون فنازین، که یکی از ترکیبات پیوسیانین بوده و به‌عنوان یکی از عوامل حدت باکتری قلمداد شده، تائید شده است [۶].

محصولات بیماری‌زایی ممکن است به‌طور غیرفعال از سلول‌های باکتریایی یا به‌صورت فعال از سیستم‌های ترشحی همچون سیستم ترشحی نوع اول (T1SS)، سیستم ترشحی نوع دوم (T2SS) و سیستم ترشحی نوع سوم (T3SS) باعث انتشار باکتری از محل عفونت، فرار باکتریایی از پاسخ ایمنی میزبان و مهار سنتز DNA، ترشح شوند [۷، ۸]. ژن‌های بیماری‌زای مختلفی که در بیماری‌زایی این باکتری ایفای نقش می‌کنند شامل عامل چسبندگی (algU و *algD*)، T1SS (aprA)، T2SS (lasA، lasB و toxA)، T3SS (exoS، exoU، exoT، exoY)، استرس اکسیداتیو (phzI، phzII، phzM، phzS، phzH) و کروم سنسینگ QS (lasI، lasR، rhlI، rhlR) هستند [۹، ۱۰].

تولید کپسول از جنس آلژینات یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی *سودوموناس آئروژینوزا* محسوب می‌شود. ژن *algD* کد کننده آنزیم GDP مانوز دهیدروژناز بوده که آنزیم کلیدی در سنتز آلژینات است [۱۱]. عملکردهای بیماری‌زای مرتبط با آلژینات در این باکتری شامل مهار و تداخل مستقیم فاگوسیتوز، حفاظت باکتری از آنتی‌بیوتیک‌ها و هر نوع پاسخ حفاظتی میزبان، ساخت بیوفیلم، ممانعت از کموتاکسی لکوسیت‌ها، گرفتن رادیکال‌های آزاد سمی، توانایی تولید آنتی‌بادی از طریق عملکرد ادجوانتی، تحریک پاسخ لکوسیت‌های پلی مورفو نوکلئر، اتصال به موسین‌ها، تسهیل فعالیت کمپلمان، افزایش رادیکال‌های اکسیژن سمی و شکل‌گیری میکروکلونی باکتریایی در شرایط زنده است [۱۲].

ازآن جایی‌که تاکنون فراوانی ژن *algD* و نیز ژن‌های rhlI ,rhlR و aprA در جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* بیماران بستری در بیمارستان‌های جنوب فارس مورد بررسی قرار نگرفته و همچنین با توجه به میزان بالای سویه‌های مولد ژن‌های مذکور در بیماری‌زایی این باکتری، پژوهش حاضر انجام شد.

روش کار:

جمع‌آوری نمونه‌ها

در این مطالعه توصیفی، نمونه‌های کلینیکی مختلف شامل نمونه‌های زخم‌های سوختگی، گلو، بینی و چشم از بیماران بستری و یا مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های جنوب استان فارس با عفونت‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان معیار ورود و عفونت‌های غیر *سودوموناس آئروژینوزا* از عفونت‌های فوق به عنوان معیار خروج بررسی شدند. بر اساس مطالعات پیشین [۱۳] و با در نظر گرفتن خطای نوع اول برابر با ۰/۰۵ و توان آزمون ۸۰٪، میزان مقاومت تیکارسیلین ۲۷/۳۷ درصد و اندازه اثر، ۸ ٪ ، مقدار حجم نمونه، ۱۱۹ نفر محاسبه شد. از این تعداد، ۴۰ نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از نمونه‌های کلینیکی به‌طور تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند.

شناسایی و تأیید جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* جمع‌آوری‌شده جدایه‌ها بر اساس روش‌های استاندارد میکروب‌شناسی و بیوشیمیایی از جمله رنگ‌آمیزی گرم، تولید رنگ‌دانه در محیط کشت آگاردار، اکسیداز و کاتالاز، کشت بر روی محیط TSI، SIM (سولفید، ایندول، حرکت)، اکسیداتیو- تخمیری بر روی محیط (OF) و در نهایت رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد تعیین هویت شدند [۱۴، ۱۵].

بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* توسط آزمون آنتی بیوگرام دیسک دیفیوژن انجام شد که متداول‌ترین آزمون برای بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر روی آگار است. این آزمون بر اساس انتشار در دیسک و بر اساس دستورالعمل کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه بالینی (CLSI) با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، سفپیم (۳۰ میکروگرم)، آزترونام (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، ارتاپنم (۱۰ میکروگرم)، فسفومایسین (۲۰۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، پیپراسیلین (۱۰۰ میکروگرم)، کلیستین (۱۰ میکروگرم)، پلی میکسین ب (۲۰۰ میکروگرم)، ریفامپین (۳۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، تیکارسیلین (۱۰میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰میکروگرم)، تری‌متوپریم (۵ میکروگرم)، تیگه سیکلین (۱۵ میکروگرم) و مروپنم (۱۰ میکروگرم) شرکت Mast انگلستان انجام شد. برای این کار ابتدا سوسپانسیون باکتریایی معادل غلظت نیم مک فارلند تهیه شد. سپس چند کلنی خالص *سودوموناس آئروژینوزا* در لوله‌های ۲ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی تلقیح شده، لوله‌ها در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا به کدورت معادل نیم مک فارلند برسند. در مرحله بعد به کمک سواب، کشت چمنی بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه از زمان کشت، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی بر روی محیط کشت قرار داده شدند. سپس پلیت ها در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوبه شدند. قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه‌گیری و بر

اساس استانداردهای CLSI تفسیر شدند. جدایه ها برحسب قطر هاله عدم رشد تقسیم‌بندی شدند. در این آزمایش از *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC27853 به عنوان کنترل آزمون استفاده شد [۱۶،۱۰].

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

همه جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* از نظر حضور ژن‌های *algD*، rhlR، rhlL و aprA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بررسی شدند (جدول ۱).

بدین ترتیب که پس از کشت جدایه‌های تعیین هویت شده *سودوموناس آئروژینوزا* بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار، DNA تمام جدایه‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA (Sinaclon) استخراج شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر انجام شد. این واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (Amplicon، دانمارک)، ۱/۵ میکرو لیتر از پرایمر رفت و ۱/۵ میکرو لیتر از پرایمر برگشت (شرکت بایونیرکره)، ۲/۵ میکرو لیتر DNA الگو و ۷ میکرو لیتر آب مقطر است. الکتروفورز محصولات PCR توسط ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. باندها به‌وسیله دستگاه ژل داک عکس‌برداری شدند. از مارکر ۱۰۰ bp محصول شرکت Genedirex تولید مشترک تایوان و آمریکا برای شناسایی محصولات PCR استفاده شد. *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC27853 به‌عنوان کنترل مثبت و آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند[۲۰].

تجزیه‌وتحلیل داده ها:

فراوانی داده ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ تعیین شد. سطح معناداری آماری ۵٪ در نظر گرفته شد.

جدول ۱: پرایمر های مورد استفاده

gene	Primer	Product length (bp)	Reference
algD -F	TTCCCTCGCAGAGAAAACATC	520	17
algD -*R*	CCTGGTTGATCAGGTCGATCT		
rhlR-F	TGCATTTTATCGATCAGGGC	133	18
rhlR-R	CACTTCCTTTTCCAGGACG		
rhlI-F	TTCATCCTCCTTTAGTCTTCCC	155	18
rhlI-R	TTCCAGCGATTCAGAGAGC		
aprA-F	ACCCTGTCCTATTCGTTCC	140	19
aprA-R	GATTGCAGCGACAACTTGG		

یافته‌ها:

جمع‌آوری نمونه‌ها

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، تعداد ۴۰ جدایه *سودوموناس آئروژینوزا* از زخم‌های سوختگی، ترشحات گلو، بینی و چشم شامل ۱۳ جدایه (۳۲/۵ درصد) از بیمارستان‌های استاد مطهری و پیمانیه شهر جهرم، ۱۰ جدایه (۲۵ درصد) از بیمارستان امام رضا شهر لار، ۹ جدایه (۲۲/۵ درصد) از بیمارستان ولیعصر شهر لامرد و ۸ جدایه (۲۰ درصد) از بیمارستان امیدوار شهر اوز جمع‌آوری شد.

توزیع فراوانی جدایه های جمع‌آوری‌شده بر اساس جنسیت و نوع نمونه بالینی

از تعداد ۴۰ جدایهِ سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری‌شده از نمونه‌های بالینی، ۲۶ جدایه (۶۵ درصد) مربوط به نمونه‌های زخم سوختگی، ۷ جدایه (۱۷/۵ درصد) مربوط به نمونه‌های بینی، ۵ جدایه (۱۲/۵ درصد) مربوط به نمونه‌های ترشحات گلو و ۲ جدایه (۵ درصد) مربوط به نمونه چشم بود. از نمونه‌های بالینی مورد بررسی ۲۶ نمونه (۶۵ درصد) مربوط به مردان با متوسط سنی ۳۸ سال و ۱۴ نمونه (۳۵ درصد) مربوط به زنان با متوسط سنی ۳۵ سال بود.

حساسیت آنتی‌بیوتیکی

بیشترین فراوانی مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین، تتراسایکلین، تری متوپریم، تیگه سیکلین با ۴۰ جدایه (۱۰۰ درصد)، ارتاپنم، ۲۵ جدایه (۶۲/۵ درصد) و فسفومایسین، ۲۱ جدایه (۵۲/۵ درصد) و کمترین فراوانی مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های کلیستین، پلی‌میگزین هیچ جدایه (۰درصد)، مروپنم، ۱ جدایه (۲/۵ درصد)، سیپروفلوکساسین، ایمی‌پنم و آمیکاسین هر کدام ۳ جدایه (۷/۵ درصد)، سفتازیدیم، ۴ جدایه (۱۰ درصد)، سفپیم، ۶ جدایه (۱۵ درصد) و آزترونام با ۹ جدایه (۲۲/۵ درصد) بود.

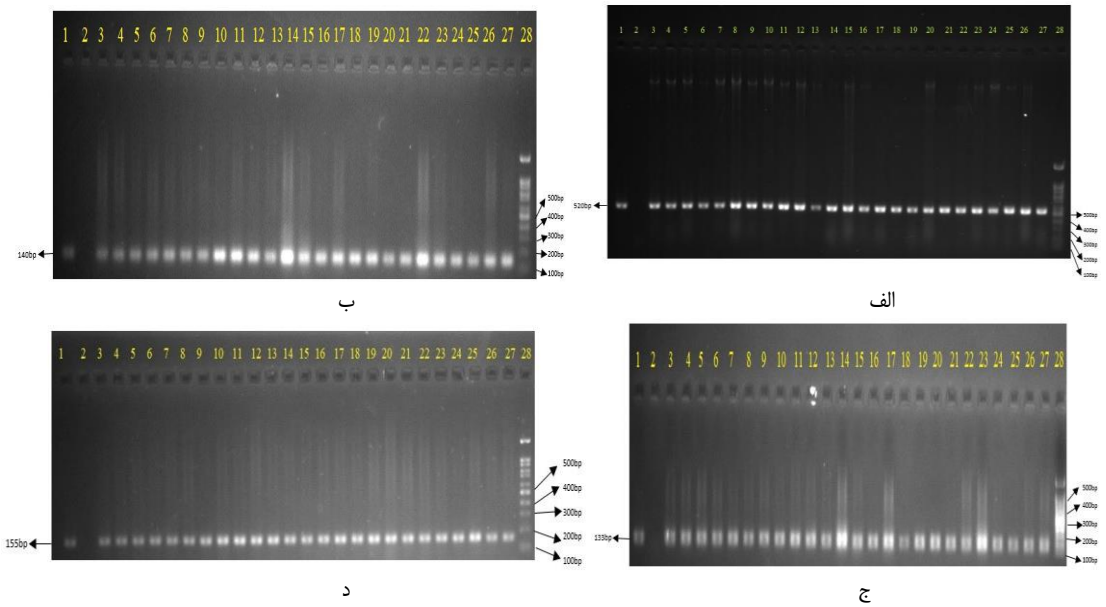
الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا

فراوانی تشخیص ژن‌های *algD* *rhlR* *rhlI* و *aprA*

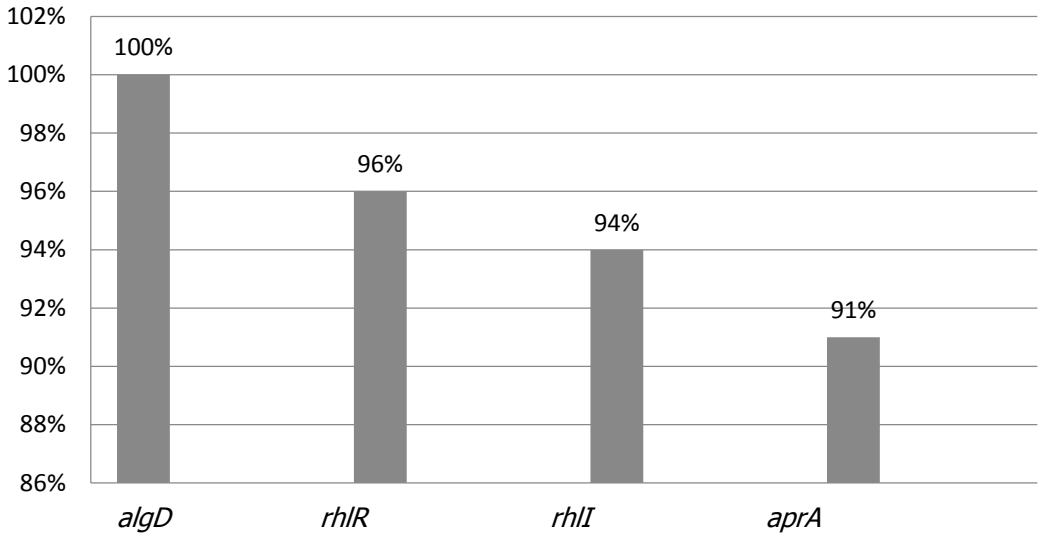
در شکل ۱ ، از تعداد ۴۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا، صد درصد جدایه‌ها حامل ژن *algD* ، ۹۶ درصد حامل ژن rhlR، ۹۴ درصد حامل ژن rhlI و ۹۱ درصد حامل ژن aprA بودند. از آن جائی که امروزه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به گذشته افزایش یافته است، حضور ژن‌های فوق که از عوامل مؤثر در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند، بررسی شد. طبق نتایج به‌دست آمده شیوع این ژن‌ها در جدایه های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* زیاد بوده که خود نشان‌دهنده نقش آن‌ها در مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه های مورد ارزیابی است.

جدول ۲: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا*

آنتی‌بیوتیک	مقاوم تعداد (درصد)	حساس تعداد (درصد)
تتراسایکلین	۴۰ (۱۰۰)	۰
تری‌متوپریم	۴۰ (۱۰۰)	۰
ریفامپین	۴۰ (۱۰۰)	۰
تیگه سایکلین	۴۰ (۱۰۰)	۰
ارتاپنم	۲۵ (۶۲/۵)	۱۵ (۳۷/۵)
فسفومایسین	۲۱ (۵۲/۵)	۱۹ (۴۷/۵)
تیکارسیلین	۱۰ (۲۵)	۳۰ (۷۵)
آزترونام	۹ (۲۲/۵)	۳۱ (۷۷/۵)
جنتامایسین	۶ (۱۵)	۳۴ (۸۵)
سفپیم	۶ (۱۵)	۳۴ (۸۵)
پیپراسیلین	۵ (۱۲/۵)	۳۵ (۸۷/۵)
توبرامایسین	۵ (۱۲/۵)	۳۵ (۸۷/۵)
سفتازیدیم	۴ (۱۰)	۳۶ (۹۰)
آمیکاسین	۳ (۷/۵)	۳۷ (۹۲/۵)
ایمی‌پنم	۳ (۷/۵)	۳۷ (۹۲/۵)
سیپروفلوکساسین	۳ (۷/۵)	۳۷ (۹۲/۵)
مروپنم	۱ (۲/۵)	۳۹ (۹۷/۵)
پلی‌میگزین ب	۰	۴۰ (۱۰۰)
کلیسین	۰	۴۰ (۱۰۰)



شکل ۱: (الف) الکتروفورز ژن *algD* . (ب) الکتروفورز ژن *aprA*. (ج) الکتروفورز ژن *rhlR*. (د) الکتروفورز ژن *rhlL*. ۱) کنترل مثبت، ۲)کنترل منفی، ستون‌های ۲۷-۳ ، نمونه مثبت، ۲۸) مارکر ۱۰۰جفت بازی،



نمودار ۱: فراوانی ژن‌های *algD* ، *rhlR*، *rhlI* و *aprA* در جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا*

جدول ۳: فراوانی نسبی و (درصدی) ژن‌های *algD* ، *rhlR*، *rhlI* و *aprA* در جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

Ab / Gene	سیپروفلوکساسین	ایمی پنم	آمیکاسین	آزترونام	سفپیم	سفتازیدیم	ارتاپنم	فسفومایسین	جنتامایسین
algD	۳ (۷/۵)	۳ (۷/۵)	۳ (۷/۵)	۹ (۲۲/۵)	۶ (۱۵)	۴ (۱۰)	۲۵ (۶۲/۵)	۲۱ (۵۲/۵)	۶ (۱۵)
rhl.R	۳ (۷/۵)	۳ (۷/۵)	۳ (۷/۵)	۹ (۲۲/۵)	۶ (۱۵)	۴ (۱۰)	۲۵ (۶۲/۵)	۲۱ (۵۲/۵)	۶ (۱۵)
rhlI	۳ (۷/۵)	۱ (۲/۵)	۳ (۷/۵)	۹ (۲۲/۵)	۶ (۱۵)	۴ (۱۰)	۲۵ (۶۲/۵)	۲۱ (۵۲/۵)	۶ (۱۵)

ادامه جدول ۳: فراوانی نسبی و (درصدی) ژن‌های *algD*, *rhlL*, *rhlR* و *aprA* در جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

Ab / Gene	پیراسیلین	ریفامپیسین	تتراسایکلین	تیکارسیلین	توبرامایسین	تری متو پریم سولفامتوکسازول	تیگه سایکلین	مروپنم
algD	۵ (۱۲/۵)	۴۰ (۱۰۰)	۴۰ (۱۰۰)	۱۰ (۲۵)	۵ (۱۲/۵)	۴۰ (۱۰۰)	۴۰ (۱۰۰)	۱ (۲/۵)
rhl.R	۵ (۱۲/۵)	۴۰ (۱۰۰)	۴۰ (۱۰۰)	۱۰ (۲۵)	۵ (۱۲/۵)	۴۰ (۱۰۰)	۴۰ (۱۰۰)	۱ (۲/۵)
rhlI	۵ (۱۲/۵)	۴۰ (۱۰۰)	۴۰ (۱۰۰)	۱۰ (۲۵)	۵ (۱۲/۵)	۴۰ (۱۰۰)	۴۰ (۱۰۰)	۱ (۲/۵)
aprA	۵ (۱۲/۵)	۴۰ (۱۰۰)	۴۰ (۱۰۰)	۱۰ (۲۵)	۵ (۱۲/۵)	۴۰ (۱۰۰)	۴۰ (۱۰۰)	۱ (۲/۵)

بحث:

بر اساس نتایج پژوهش حاضر روی بیماران بستری در بیمارستان‌های جنوب فارس مشخص شد که باکتری مذکور حامل ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و الگوی مقاومت باکتریایی است. در حال حاضر *سودوموناس آئروژینوزا* یکی از میکروارگانیسم‌های فرصت‌طلب است که باعث عفونت‌های حاد به‌ویژه در میان بیماران بستری‌شده در بخش مراقبت ویژه می‌شود. بروز عفونت و مرگ‌ومیر در بخش مراقبت‌های ویژه به‌طور قابل‌توجهی بیشتر از سایر بخش‌های بیمارستان است که

با وضعیت پیچیده بیماران قابل توجیه است [۲۱]. در مطالعه صدقوا و همکاران در بنگلادش روی جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* از ۱۳۸ جدایه، بیشترین جدایه ها از نمونه زخم (۶۴ درصد) و کمترین جدایه از نمونه ادرار (۱۲/۵ درصد) جداسازی شد. همچنین ۷۵/۳۶ درصد جدایه ها از مردان و ۲۴/۶۴ درصد مربوط به زنان بود [۲۲]. در مطالعه دیگری که توسط فرهان و همکاران در مصر انجام شد، ۱۵۰ جدایه *سودوموناس آئروژینوزا* شناسایی و تعیین هویت شد که بیشترین جدایه مربوط به نمونه زخم (۴۳/۳ درصد) و کمترین جدایه مربوط به نمونه ادرار (۴ درصد) بود [۲۳].

در مطالعه حاضر نیز بیشتر جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مربوط به زخم افراد دچار سوختگی بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بود. با توجه به این که در مطالعات انجام‌شده و مطالعه حاضر بیشترین جدایه‌ها مربوط به زخم در افراد دچار سوختگی است می‌توان گفت که افراد با نقص در سیستم ایمنی به دلیل سوختگی و موارد دیگر بیشتر مستعد عفونت با این باکتری هستند. در مطالعه حاضر ۶۵ درصد جدایه‌ها مربوط به مردان و بقیه مربوط به زنان بود.

در مطالعه دیگر که توسط المرزوقی و الطایی در کشور عراق انجام شد، ۲۸۵ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* شناسایی و تعیین هویت شد که ۷۴/۰۴ درصد از جدایه ها از مردان و ۲۵/۹۶ درصد از زنان جداسازی شده بود [۲۴]. با توجه به نتایج مطالعات انجام‌شده و مطالعه حاضر مردان بیشتر از زنان مستعد عفونت با *سودوموناس آئروژینوزا* هستند. امروزه به دلیل گسترش مقاومت *سودوموناس آئروژینوزا* در برابر تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌ها، کنترل عفونت‌های آن به چالش بزرگی تبدیل‌شده است، به‌طوری‌که با گذشت زمان گزینه‌های درمانی در برابر این باکتری روز به روز کمتر می‌شود [۲۵،۲۶]. در مطالعه حاضر مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین، ۴۰ جدایه (۱۰۰ درصد)، تتراسایکلین، ۴۰ جدایه (۱۰۰ درصد)، تری‌متو پریم، ۴۰ جدایه (۱۰۰ درصد)، *تیگه سیکلین*، ۴۰ جدایه (۱۰۰ درصد)، ارتاپنم، ۲۵ جدایه (۶۲/۵ درصد) و فسفومایسین، ۲۱ جدایه (۵۲/۵ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های کلیستین و پلی‌میگزین ب، (۰ درصد)، مروپنم، ۱ جدایه (۲/۵ درصد)، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین و ایمی‌پنم هر کدام با ۳ جدایه (۷/۵ درصد)، سفتازیدیم، ۴ جدایه (۱۰ درصد)، سفپیم، ۶ جدایه (۱۵ درصد) و آزترونام، ۹ جدایه (۲۲/۵ درصد) بود.

در مطالعه رستنی و همکاران در اندونزی بیشترین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون (۴۲/۲۱ درصد)، سفوتاکسیم (۴۱ درصد) و سفوپرازون (۳۷/۸۹ درصد) و کمترین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های کلیستین (۰ درصد) و آمیکاسین (۱۰ درصد) گزارش شد [۲۷] که نتایج حاصل با مطالعه حاضر هم خوانی دارد. در مطالعه‌ای که فاضلی و همکاران روی ۶۶ جدایه *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از بیماران انجام دادند، ۷۵/۵ درصد از جدایه ها نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم و ۷۲/۷ درصد نسبت به پیپراسیلین مقاومت داشتند [۲۸] که میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های فوق در مطالعه حاضر (به ترتیب با ۱۰ درصد و ۱۲/۵ درصد) کمتر از این مطالعه است. یکی از دلایل تفاوت احتمالاً می‌تواند ناشی از اندک بودن تعداد نمونه‌های مطالعه حاضر باشد [۲۸].

در مطالعه دیگر انجام شده در ایران، کرمی و همکاران بیشترین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک تیکارسیلین/کلاوولانیک اسید (۷۵/۸ درصد) و آزترونام (۷۲/۴ درصد) و کمترین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک کلیستین (۰ درصد) و مروپنم (۲/۳ درصد) گزارش کردند [۲۹] که با نتایج مطالعه حاضر هم خوانی دارد. در مطالعه حاضر کمترین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک کلیستین (۰ درصد) و مروپنم (۲/۵ درصد) مشاهده شد.

در مطالعه سید احمد روی جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* در کشور قطر بیشترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک سفپیم (۹۶/۶ درصد)، سیپروفلوکساسین (۹۱ درصد) و پیپراسیلین/تازوباکتام (۹۰/۷ درصد) و کمترین میزان مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک کلیستین (۳/۳ درصد) مشاهده شد [۳۰] که با نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا نیست. در مطالعه حاضر مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۷/۵ درصد) و سفپیم (۱۵ درصد) بود. با توجه مطالعات انجام‌شده امروزه بهترین گزینه برای درمان عفونت‌های این باکتری، آنتی‌بیوتیک کلیستین است و همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کشور قطر بیشتر و نگران‌کننده‌تر از دیگر نقاط است.

در مطالعه دیگری که منیری و همکاران روی ۶۹ جدایه *سودوموناس آئروژینوزا* انجام دادند مشخص شد از بین آنتی‌بیوتیک‌ها، ایمی پنم و مروپنم به ترتیب ۴۷/۶ درصد و ۳۹ درصد مقاوم بودند. در مطالعه حاضر این مقادیر به ترتیب ۷/۵ درصد و ۲/۵ درصد بود که تفاوت احتمالاً ناشی از کم بودن تعداد و همچنین عدم تشابه الگوی مقاومتی می‌باشد [۳۱].

سودوموناس آئروژینوزا اگرچه به‌عنوان بیماری‌زای فرصت‌طلب در نظر گرفته می‌شود، اما بسیاری از محصولات بیماری‌زایی می‌تواند بر وضعیت بالینی بیمار مؤثر باشد. در واقع ترکیبی از چندین ژن و عوامل بیماری‌زایی می‌تواند بر بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی تاثیر داشته باشد و نتیجه یک فرایند عفونی را تعیین می‌کند [۳۳، ۳۲].

در مطالعه حاضر وجود ژن‌های *algD*، *rhlR*، *rhlI* و *aprA* را بررسی که در بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایفای نقش می‌کنند. در این مطالعه تمامی جدایه‌ها حامل ژن *algD* ، ۹۶ درصد حامل ژن rhlR، ۹۴ درصد حامل ژن rhlI و ۹۱ درصد جدایه ها حامل ژن aprA بودند. در مطالعه استلینگ و همکاران گزارش شده است که تعداد ۱۲۰ جدایه مورد مطالعه حامل ژن *algD* بودند. این ژن کد کننده آلژینات است. تولید آلژینات در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان عامل مهم بیماری‌زایی در نظر گرفته می‌شود که سبب تقویت شدت بیماری‌زایی این باکتری در بافت هدف می‌شود [۳۴]. در مطالعه انتونو و همکارانش در روسیه روی جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* وجود ژن *algD* را در تمام سویه‌ها گزارش کردند [۳۵]. ژنaprA یکی از مهم‌ترین عوامل حدت در *سودوموناس آئروژینوزا* است و بیان بیش‌از اندازه آن باعث تولید یک عامل بیماری‌زای دیگر بنام پیوسیانین می‌شود که از آن به عنوان "واکنش متقاطع بین عوامل بیماری‌زایی" یاد می‌شود. بنابراین، *سودوموناس آئروژینوزا* با بیان بیش‌از اندازه ژن aprA ممکن است با یک اثر هم‌افزایی، افزایش حدت را نشان داده و به عنوان یک تهدید برای سلامتی بیماران باشد. این ژن همچنین می‌تواند به عنوان یک عامل مؤثر در بیماری‌زایی عمل کند، زیرا سرکوب ژن aprA ممکن است منجر به کاهش بیان ژن aprA و پیوسیانین شود. بنابراین، مطالعه تداخل بین عوامل حدت بیماری‌زایی در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و ایجاد راهبردهای مناسب و جدید درمانی بسیار حائز اهمیت است [۳۶].

در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* که عامل عفونت‌های مزمن ریوی نظیر فیبروز سیستیک است، ژن‌های rhlI، rhlR، LasI و LasR و خود القاگر آسیل هوموسرین لاکتون در حدت بیماری‌زایی طی پدیده حس حدنصاب (کروم سنسینگ) نقش دارند. LasI و LasR در فعال کردن بسیاری از ژن‌های بیماری‌زا از جمله rhlI، rhlR مورد نیاز می‌باشد [۳۷].

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش و سایر پژوهش های انجام‌شده در این زمینه، اهمیت نقش حضور ژن‌های *algD* ، rhlR، rhlI وaprA در بیماری‌زایی جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف است.

نتیجه‌گیری:

نتایج این پژوهش حاکی از وجود *سودوموناس آئروژینوزا* با مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه در بیمارستان‌های جنوب استان فارس است. گزینه‌های پیشنهادی درمان برای این باکتری شامل آنتی‌بیوتیک‌های کلیسین، پلی‌میگزین ب و مروپنم می‌باشند. همچنین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده افرادی که دارای بافت آسیب‌دیده و نقص در سیستم ایمنی می‌باشند، بیشتر مستعد ابتلا به این باکتری می‌باشند. از طرف دیگر نتایج این مطالعه نشان‌دهنده حضور بالای ژن‌های *algD*، *rhlR*، *rhlI* و *aprA* در جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* دارای مقاومت چندگانه بود که خود بیانگر نقش این ژن‌ها در بیماری‌زایی این ارگانیسم است، بنابراین شناسایی به‌موقع جدایه های مقاوم این میکروارگانیسم در انتخاب راه کارهای پیشگیری، کنترل و درمان عفونت ضروری است.

References:

1. Fredi Langendonk R, Daniel R. Neill and Joanne L. Fothergill. The Building Blocks of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for Current Resistance-Breaking Therapies. Front Cell Infect Microbiol. 2021:665759.
2. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013;11(3):297-308.
3. Larrosa M, Truchado P, Espín JC, Tomás-Barberán FA, Allende A, García-Conesa MT. "Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) adhesion to human alveolar epithelial cells A549 using SYTO 9 dye .Mol Cell Probes 2012;26(3):121-6.
4. Michalska M, Philipp Wolf P. *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. Front Microbiol 2015; 6:963.
5. Conibear TCR, Willcox MDP, Flanagan JL, Zhu H. Characterization of protease IV expression in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. J Med Microbiol. 2012; 61:180–90.
6. Hall S, McDermott C, Anoopkumar-Dukie S, McFarland JA, Forbes A, Anthony V. Perkinset AV et al. Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. Toxins (Basel). 2016;8(8):236.
7. Jabalameli F, Mirsalehian A, Khoramian B, Aligholi M, Khoramrooz SS, Asadollahi P, et al. Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. Burns. 2012; 38(8):1192–7.
8. Senturk S, Ulusoy S, Bosgelmez-Tinaz G, Yagci A. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during urinary tract infections. J Infect Dev Ctries. 2012; 6(6):501–7.
9. Bradbury RS, Roddam LF, Merritt A, Reid DW, Champion AC. Virulence gene distribution in clinical nosocomial and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol. 2010; 59(Pt8):881–90.

10. Rodrigues YC, Furlaneto IP, Maciel AHP, Quaresma AJPG, de Matos ECO, Conceição ML, et al. High prevalence of atypical virulotype and genetically diverse background among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a referral hospital in the Brazilian Amazon. PLoS One. 2020;15(9): e0238741.
11. Vetrivel A, Ramasamy M, Vetrivel P, Natchimuthu S, Arunachalam S, Kim G-S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Its Control. *Biologics*. 2021; 1(3):312-36.
12. Leid JG, Willson CJ, Shirtliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. J. Allergy Clin. Immunol. 2005;175(11):7512-8.
13. Rustini R, Jamsari J, Marlina M, Zubir N, Yuliandra Y. Antibacterial resistance pattern of *Pseudomonas aeroginusa* isolated from clinical samples at a general hospital in padang west Sumatra, Indonesia. Asian J Pharm Clin Res 2017;10(8): 158-60.
14. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology E-book 2020: Elsevier Health Sciences.
15. Gaby W, Hadley CJJob. Practical laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*. J bacteriol 1957;74(3):356-8.
16. Adabi M, Talebi-Taher M, Arbabi L, Afshar M, Fathizadeh S, Minaeian S, et al. Spread of Efflux Pump Overexpressing-Mediated Fluoroquinolone Resistance and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by using an Efflux Pump Inhibitor. Infect Chemother 2015; 47(2): 98-104.
17. Rashno Taee S, Khansarinejad B, Abtahi H, Najafimosleh M, Ehsanollah Ghaznavi-Rad E. Detection of *algD* , *oprL* and *exoA* Genes by New Specific Primers as an Efficient, Rapid and Accurate Procedure for Direct Diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* Strains in Clinical Samples. Jundishapur J Microbiol. 2014;7(10): e13583.
18. Sabharwal N, Dhall S, Chhibber S, Harjai K. Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. Int J Mol Epidemiol Genet. 2014; 5(3): 125–134.
19. Kadhim D and Ali MR. Prevalence study of quorum sensing groups among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Int. J Curr Microbiol Appl Sci. 2014; 3(11): 204-15.
20. Saderi H, Lotfalipour H, Owlia P, Salimi H. Detection of metallo-β-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients in Tehran, Iran. Labmedicine 2010;41(10):609-12.
21. Tam VH, Chang KT, Abdelraouf K, Brioso CG, Ameka M, McCaskey LA, et al. Prevalence, resistant mechanisms, and susceptibility of multidrugresistant bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother 2010; 54(3):1160-4.
22. Siddiqua M, Nawsher A, Akter A, Akter S, Ferdousi RS. Antibiotic resistance pattern in *pseudomonas aeruginosa* isolated from a private Medical College Hospital. Khwaja Yunus Ali Medical College J. 2018;9(1): 16-9.
23. Farhan SM, Ibrahim RA, Mahran KM, Hetta HF, Abd El-Baky RM. Antimicrobial resistance pattern and molecular genetic distribution of metallo-β-lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals in Minia, Egypt. Infect Drug Resist. 2019; 12:2125-33.
24. Al-Marzoqi AH, Al Taee ZM. *Pseudomonas aeruginosa*: Antibiotic resistance pattern to different isolates in Al-Hillah city, Iraq. Int. res. j. nat. sci. .2013;3(3): 69-74.
25. Khety Z, Mohanta G, Jain S, Dawoodi S. Changing Antimicrobial Resistance Pattern of Isolates from an ICU Over a 3 Year period. J Assoc Physicians India. 2017;65(2):13-6.
26. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv. 2019;37(1):177-92.
27. Rustini R, Jamsari J, Marlina M, Zubir N, Yuliandra Y. Antibacterial Resistance Pattern of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Clinical Samples at a General Hospital in Padang, West Sumatra, Indonesia. Asian J Pharm Clin Res. 2017;10(8):158-60.
28. Fazeli H, Havaei SA, Solgi H, Shokri D, Motallebirad T. Pattern of Antibiotic Resistance in *Pesudomonas aeruginosa* Isolated from Intensive Care Unit, Isfahan, Iran. J Isfahan Med. Sch. 2013; 31(232): 433-8.
29. Karami P,Khaledi A, Yousefi Mashoof R , Yaghoobi M, Karami M, Dastan D, Alikhani M. The correlation between biofilm formation capability and antibiotic resistance pattern in *Pseudomonas aeruginosa*. Gene Rep.2019; 18: 100561.
30. Ahmed MS, Hassan A, Jarir SA, Hadi HA, Bansal D, Wahab AA, et al. Emergence of multidrug-and pandrug-resistant Pseudomonas aeruginosa from five hospitals in Qatar. Infection Prevention in Practice;1(3-4):100027.
31. Moniri R, Mosayebi Z, Movahedian AH, Mousavi GA. Emergence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in neonatal septicemia. J Infect Dis Antimicrob Agents. 2005; 22:39-44.
32. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. Int J Mol Sci. 2021; 22(6):3128.
33. Hadadi-Fishani M, Khaledi A, Fatemi-Nasab ZS. Correlation between biofilm formation and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: a meta-analysis. Infez Med. 2020;28(1):47-54.
34. Stehling EG, da Silveira WD, da Silva Leite D. Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. Braz J Infect Dis. 2008; 12(1): 86-8.
35. Antonov VA, Altukhova VV, Savchenko SS, Tkachenko GA, Zamaraev VS, Zhukova SI, et al. Molecular genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from environment and patients in health care facilities. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 2010; (2):8-13.
36. Iiyama1 K, Takahashi E, Lee JM, Mon H, Morishita M, Kusakabe T, et al. Alkaline protease contributes to pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Letters, 2017, Vol. 364, No. 7, doi: 10.1093/femsle/fnx051
37. Kostylev M, Kim DY, Smalley NE, Salukhe I, Greenberg EP, Dandekar AA. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing hierarchy. Proc Natl Acad Sci USA. 2019; 116 (14) 7027-32.

Original Article

Frequency of Gene-Producing Strains (*aprA, rhlI, rhlR, algD*) in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, Isolated from Hospitals of South Fars

Keramat Dorri[1], Farzan Modaresi[2*], Mohammad Reza shakibaie[3], Elham Moazamian[4]

Received:2022.01.11 Revised:2022.06.19 Accepted: 2022.10.10

1.PhD student, Department of Microbiology, College of Sciences, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
2.Department of Bacteriology and Virology, Jahrom Medical School, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran
3. Department of Microbiology and Virology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
4.Department of Microbiology, College of Sciences, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.20, No.2, Summer 2022

Pars J Med Sci 2022;20(2):39-47

Abstract:

Introduction:
Antibiotic resistance and biofilm production are recognized as two significant factors in the pathogenesis of this bacterium, which are responsible for the long-term persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections. The present study is designed to examine the antibiotic resistance and the genes involved in the pathogenicity and resistance of this bacterium in the southern region of fars.

Material and Methods:
The isolates were detected and identified based on standard microbiological and biochemical methods. The antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolates was then determined by antibiotic susceptibility testing (AST) or the antibiogram (disk diffusion) test. The PCR technique was used to detect *algD, rhlR, rhlL, and aprA* genes.

Results:
In the study of antibiotic resistance of 40 isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, the effective antibiotics in the treatment of this bacterium were Colistin with 0% resistance Polymyxin B 0%, Meropenem 1 isolate (2.5%), Ciprofloxacin 3 isolates (7.5%), Imipenem 3 isolates (7.5%) and Amikacin 3 isolates (7.5%). In the detection of *algD, rhlR, rhlL and aprA* genes, 100% of the isolates carried the *algD* gene, 96% of the isolates carried the *rhlR* gene, 94% of the isolates carried the *rhlL* gene and 91% of the isolates carried the *aprA* gene.

Conclusion:
The results demonstrated the high presence of *algD, rhlR, rhlL*, and *aprA* genes in the *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Considering the high prevalence of the *algD* gene in the *Pseudomonas aeruginosa* strains of the current study, which is involved in the capsule production process, it seems essential and vital to control the infections of this bacterium due to the existence of multiple resistance and its ability to produce capsules.

Keywords: Antibiotic Resistance, *Pseudomonas Aaeruginosa, algD, rhlR, rhlI, aprA*

* Corresponding author Email: