مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره سوم (پیاپی ۲۸) پاییز ۱۳۹۵
صفحات ۲۰۷-۱۹۹

Original Article

بررسی فراوانی ژن های مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید در جدایه های بالینی *اشریشیا کلی* و گونه های *کلبسیلا* در تهران

معصومه محمدبیگی*[۱]، جعفر اکبرمهر[۲]، بهبود جعفری[۳]

[۱] کارشناس ارشد، گروه میکروب شناسی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، [۲] استادیار، گروه میکروب شناسی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، [۳] استادیار، گروه میکروب شناسی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر.

چکیده

سابقه و هدف: حضور ژن های پلاسمیدی *qnr* در باکتری ها عامل اصلی ایجاد مقاومت در برابر کینولون ها به شمار می آید. این مطالعه با هدف ارزیابی حضور ژن های *qnr* وابسته به پلاسمید و ژن های مقاوم *aac(6)-Ib-cr* در جدایه های بالینی *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا* جداسازی شده از تهران انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی تعداد ۱۳۲ جدایه *اشریشیاکلی* و ۹۸ جدایه *کلبسیلا* از بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به بیمارستان آیت الله طالقانی تهران جمع آوری گردید. مقاومت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش کربی-بائر و معیار CLSI انجام شد. پس از استخراج ژنوم، به منظور تکثیر ژن های *qnr* و *aac(6)-Ib-cr* از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) استفاده گردید.

یافته ها: در مجموع ۴۷/۷۲ درصد از جدایه های *اشریشیا کلی* نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و ۶۲/۱۲ درصد نسبت به نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند. همچنین ۳۸/۷۷ درصد از جدایه های *کلبسیلا* در برابر سیپروفلوکساسین و ۵۱/۰۲ درصد نسبت به نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند. در مطالعه حاضر شیوع ژن های *aac(6)-lb-cr*، *qnrA*، *qnrB* و qnrS در جدایه های *اشریشیا کلی* به ترتیب ۳۰/۱۸، ۳۷/۷۳، ۶۷/۹۲ و ۳۳/۹۶ درصد و در *کلبسیلا* به ترتیب ۳۱/۴۲، ۲۲/۸۵، ۶۸/۵۷ و ۳۱/۴۲ درصد گزارش شد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان دهنده فراوانی نسبتاً بالای ژن های *qnr* در جدایه های *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا* مقاوم به سیپروفلوکساسین در شهر تهران بود.

واژگان کلیدی: *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا*، ژن های *qnr*، ژن *aac(6)-Ib-cr* .

دریافت مقاله: بهمن ماه ۹۴ پذیرش برای چاپ: فروردین ماه ۹۵

مقدمه

امروزه یکی از مشکلات مطرح و قابل توجه بهداشت جهانی، افزایش شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی عوامل بیماری زا در جمعیت های مختلف انسانی و حیوانی می باشد. عامل اصلی افزایش مقاومت باکتری های عوامل بیماری زا، استفاده بیش از حد آنتی بیوتیک ها است. این امر موجب پیدایش و انتشار عوامل بیماری زا مقاوم و ژن های مقاومت در آن ها می شود. در جمعیت های انسانی و حیوانی از آنتی بیوتیک ها به منظور درمان و جلوگیری از بیماری های عفونی استفاده می‌گردد (۱). در سال های اخیر مقاومت بالایی نسبت به داروها به ویژه در ارتباط با حضور ژن های وابسته به پلاسمید *qnr* بروز نموده و درمان عفونت های یاد شده را بسیار پیچیده کرده است (۴-۲). مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید (PMQR) به دلیل گسترش سریع در بین *انتروباکتریاسه ها* نقش بسیار مهمی در مقاومت به این داروها ایفا می نماید (۵ و ۶).

*) آدرس برای مکاتبه: اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۲۵۴۱۵۸۰۰ پست الکترونیک: m_mohamadbigi@yahoo.com

تا کنون سه نوع مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید کشف شده است که مهم ترین آن ژن های *qnr* می باشد (٤). پلاسمید ها عناصر ژنتیکی خارج کروموزومی هستند که یکی از عوامل عمده القای مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها می باشند. اخیرا سه مکانیسم مقاومت وابسته به پلاسمید برای کینولون ها توصیف شده است. اولین مسیر مکانیسم وابسته به پروتئین های *qnr*، مربوط به تکرار خانواده پنتاپپتید می باشد که توپوایزومراز تیپ II را از مهار شدن توسط کینولون ها حفاظت می نماید.

دومین مکانیسم شامل حضور پروتئین *aac(6)-Ib-cr* است که آنزیم آمینوگلیکوزیداز استیل ترانسفراز جدیدی را تولید می کند. این آنزیم باعث استیله کردن و در نتیجه کاهش فعالیت نورفلوکسین و سیپروفلوکساسین می شود. سومین راه که اخیرا توصیف شده، مکانیسم انتقال کینولون توسط پمپ پروتئینی qepA می باشد. ژن های پلاسمیدی *qnrA*، *B*، *S* باعث ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید می شوند. با مقایسه نتایج به دست آمده از حضور یا عدم حضور این ژن و نتایج به دست آمده از مقاومت آنتی بیوتیکی می توان به همبستگی بین این ژن ها و همچنین اثر هم افزایی یا کاهشی توان مقاومتی با توجه به حضور هر یک از ژن ها پی برد (۷).

اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) فلور طبیعی روده انسان و تمامی حیوانات خونگرم می باشد. این باکتری از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی بوده که در ایجاد عفونت در قسمت های مختلف بدن مانند آپاندیس، دستگاه ادراری تناسلی، پرده صفاق، کیسه صفرا، جراحات و زخم ها نقش دارد. امروزه به دلیل مقاومت آنتی‌بیوتیکی به داروهای خط اول، کینولون ها و فلوروکینولون ها داروهای انتخابی درمان عفونت های ادراری ناشی از این باکتری را تشکیل می دهند (۸). *کلبسیلا نمونیه* (*Klebsiella pneumonia*) یک باسیل گرم منفی روده ای از خانواده انتروباکتریاسه می باشد که بخشی از میکروفلور طبیعی بدن انسان را تشکیل می دهد. حدود یک سوم افراد سالم ناقل روده ای این میکروب هستند.

امروزه *کلبسیلا نمونیه* به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب و یکی از مهم ترین باکتری های دخیل در عفونت های بیمارستانی مطرح می باشد. میزان مرگ و میر ناشی از آن بالا می باشد و باعث بروز بیماری های مختلفی مانند عفونت دستگاه ادراری، سپتی سمی، پنومونی و عفونت های داخل شکمی در بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان می‌گردد. عفونت های حاصل از این باکتری در خارج از بیمارستان کمتر دیده می‌شود (۹).

بروز مقاومت نسبت به گروه کینولون ها اکثراً به دلیل بروز موتاسیون در ژن های کروموزومی مانند DNA gyrase می باشد. با این وجود بروز مقاومت به واسطه ژن های پلاسمیدی مانند ژن های *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* در سویه های *کلبسیلا* علت بروز مقاومت نسبت به فلوروکینولون ها در سویه های *اشریشیا کلی* را نیز تغییر داده است. آگاهی از الگوی حساسیت باکتری های مقاوم در یک ناحیه جغرافیایی به مصرف صحیح و معقول آنتی‌بیوتیک ها کمک خواهد کرد. امروزه تعداد ارگانیسم های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در حال افزایش است و این مساله به عنوان یکی از بحران های موجود در درمان عفونت های ناشی از این باکتری ها مطرح می باشد (۱۰). در مطالعه ای که توسط نخجوانی (Nakhjavani) و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی سویه های *اشریشیاکلی* جدا شده از عفونت ادراری در شهرستان تهران انجام شد، میزان مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلاکسین به ترتیب ۳/٤۹ و ۲/٤۰ درصد گزارش شد (۱۱).

ساید (Sayed) همکاران در سال های ۲۰۰۸ تا ۲۰۰۹ در عمان، فراوانی مقاومت به سیپروفلوکساسین در *اشریشیاکلی* را ۲۷/۰۲ درصد اعلام نمودند (۱۲). کلودنر (Colodner) در سال ۲۰۰۸ مقاومت *اشریشیاکلی* به سیپروفلوکساسین را ۵۰ درصد گزارش کرد (۱۳). سانتیسو (santiso) و همکاران در سال ۲۰۰۹ از ۹۵ گونه بالینی *اشریشیاکلی*، ۷٤ جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین و ۲۱ گونه حساس به سیپروفلوکساسین را مشاهده کردند (۱٤). ملاعباس‌زاده (Molla Abbaszadeh) و همکاران در سال ۲۰۱۳، میزان مقاومت سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به

آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین را در سال های ۱۳۸۸، ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ به ترتیب برابر ٦١/٦، ٦٠/٣ و ٥٧/٤ درصد گزارش نمودند (١٥). زیبایی (Zibaee) و همکاران در سال ۲۰۱۳ با بررسی پراکندگی ژن *qnrA* در جدایه های *اشریشیا کلی* مقاوم به کینولون جدا شده از عفونت ادراری نشان دادند که ۱۲/۱ درصد از جدایه های مقاوم به نالیدیکسیک اسید و ١٤/٣ درصد از جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای ژن *qnrA* بودند (١٦). هدف از این پژوهش ارزیابی حضور ژن های *qnr* وابسته به پلاسمید و ژن های مقاوم *aac(6)-Ib-cr* در جدایه های بالینی *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا* در تهران بود.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه: در این مطالعه مقطعی تعداد ۱۳۲ جدایه *اشریشیاکلی* و ۹۸ جدایه *کلبسیلا* از بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به بیمارستان آیت الله طالقانی تهران در مدت یک سال جمع آوری گردید.

ب) جداسازی و شناسایی: پس از جداسازی اولیه، باکتری ها بر اساس آزمون های بیوشیمیایی مختلف مانند تخمیر قند گلوگز و لاکتوز، تحرک، اوره، اندول، اکسیداز، TSI و SIM تائید شدند (١٧). جدایه های تایید شده به محیط حاوی آبگوشت مغذی حاوی ۱۵ درصد گلیسرول، Skim milk و پرل های شیشه ای اضافه شدند و تا انجام آزمایشات بعدی در دمای ۸۰- درجه سلیسیوس نگه داری شدند.

ج) آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه های *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا* با استفاده از روش کربی-بائر (Kirby Baur) مطابق با دستورالعمل استاندارد جهانی (CLSI) انجام شد (١٨). سوسپانسیون معادل غلظت نیم مک فارلند از جدایه های مورد بررسی تهیه و در محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. در این مطالعه از دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم) و نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم) (HiMedia) استفاده شد. نمونه ها به مدت ٢٤-١٨ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس قرار گرفتند. در این مطالعه از سویه استاندارد *اشریشیا کلی* 25922 ATCC و *کلبسیلا* ATCC 700603 به عنوان کنترل استفاده شد (١٩).

د) استخراج ژنوم: در ابتدا تعداد سه یا چهار کلنی از باکتری در ۵ میلی لیتر محیط LB (مرک، آلمان) کشت داده شد و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری گردید. به منظور استخراج ژنوم از کیت استخراج DNA (Bionner, Korea) و مطابق با دستورالعمل کیت استفاده شد.

ه) واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR): به منظور تکثیر ژن های *qnrA*، *qnrB*، *qnrS* و *aac(6')-Ib-cr* از پرایمرهای اختصاصی موجود در جدول ۱ استفاده گردید. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۲ میکرولیتر از Master Mix (حاوی $MgCl_2$، dNTPs و Taq DNA Polymerase)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ پیکومول) و ۱ میکرولیتر از DNA الگو انجام گرفت. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Teche, UK) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۲ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ٩٤ درجه سلیسیوس به مدت ٤٥ ثانیه، اتصال در دمای ٥٥ درجه سلیسیوس به مدت ٤٠ ثانیه (برای ژن های *qnrA, B, S*) و دمای ٥٨ درجه سلیسیوس به مدت ١٥ ثانیه (برای ژن *aac(6')-Ib-cr*)، گسترش در دمای ٧٢ درجه

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه (٢٠).

نام ژن	توالی (5'→ 3')	اندازه محصول (جفت باز)
qnrA	F: 5'-AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG-3' R: 5'-TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC-3'	٥٧١
qnrB	F: 5'-ATG ACG CCA TTA CTG TAT AA-3' R: 5'-GAT CGC AAT GTG TGA AGT TT-3'	٥٦١
qnrS	F: 5' ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA-3' R: 5' TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC-3'	٤١٧
aac(6')-Ib-cr	F: 5'-TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA-3' R: 5'-CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT-3'	٤٨٢

جدول ۲: نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های مورد بررسی در مطالعه.

باکتری	مقاوم به CP تعداد (درصد)	حساس به CP تعداد (درصد)	مقاوم به NA تعداد (درصد)	حساس به NA تعداد (درصد)	مقاوم به هر دو آنتی بیوتیک تعداد (درصد)
اشریشیاکلی	۶۳ (۴۷/۷۲)	۶۹ (۵۲/۲۷)	۸۲ (۶۲/۱۲)	۵۰ (۳۷/۸۷)	۵۳ (۴۰/۲)
کلبسیلا	۳۸ (۳۸/۷۷)	۶۰ (۶۱/۲۲)	۵۰ (۵۱/۰۲)	۴۸ (۴۸/۹۷)	۳۵ (۳۵/۷)

CP: سیپروفلوکساسین، NA: نالیدیکسیک اسید.

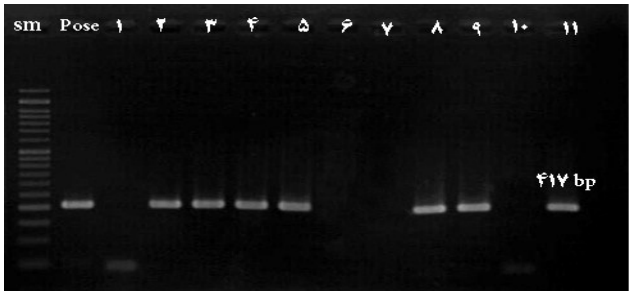
سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصولات PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفتند. *و) آنالیز آماری:* در این مطالعه از آمار توصیفی استفاده شد و برای نشان دادن فراوانی ژن های مورد مطالعه و مقاومت آنتی بیوتیکی از نمودار هیستوگرام استفاده گردید.

یافته ها

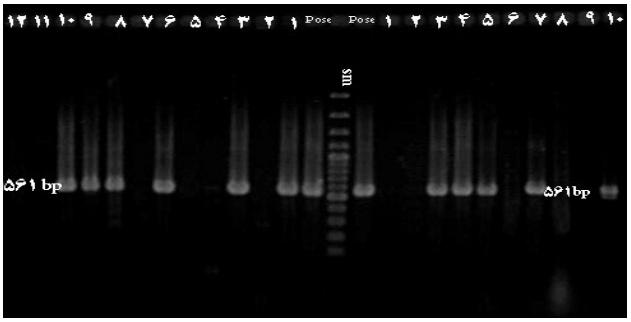
نتایج به دست آمده از آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های مورد بررسی در این مطالعه در جدول ۲ آورده شده است. از بین ۱۳۲ جدایه *اشریشیا کلی*، ۴۷/۷۲ درصد نسبت به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و ۶۲/۱۲ درصد نسبت به آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند. از میان ۹۸ جدایه *کلبسیلا*، ۳۸/۷۷ درصد در برابر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و ۵۱/۰۲ درصد نسبت به نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند. همچنین ۴۰/۲ درصد از جدایه های *اشریشیا کلی* و ۳۵/۷ درصد از نمونه های *کلبسیلا* نسبت به تمام غلظت های این دو آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند. نتایج واکنش زنجیره ای پلی مراز نشان دهنده تکثیر صحیح ژن های مورد بررسی بود (شکل های ۱ تا ۳). همچنین ارزیابی فراوانی ژن های مقاومت

جدول ۳: تفکیک جدا یه های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا* مقاوم در برابر هر

باکتری	ژن *aac(6)-lb-cr* تعداد (درصد)	ژن *qnrA* تعداد (درصد)	ژن *qnrB* تعداد (درصد)	ژن *qnrS* تعداد (درصد)
اشریشیاکلی	۱۶ (۱۸/۳۰)	۲۰ (۷۳/۳۷)	۳۶ (۹۲/۶۷)	۱۸ (۹۶/۳۳)
کلبسیلا	۱۱ (۴۲/۳۱)	۸ (۸۵/۲۲)	۲۴ (۵۷/۶۸)	۱۱ (۴۲/۳۱)



شکل ۱: الکتروفورز حاصل از PCR ژن *qnrS* در باکتری *اشریشیا کلی*. SM) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، Pose) کنترل مثبت، ستون های ۵-۲، ۸، ۹ و ۱۱) قطعه تکثیر یافته با طول ۴۱۷ جفت باز.



شکل ۲: الکتروفورز حاصل از PCR ژن *qnr B* در باکتری های *اشریشیا کلی* (سمت چپ) و *کلبسیلا* (سمت راست). SM) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، Pose) کنترل مثبت، ستون های ۳، ۴، ۵، ۷ و ۱۰ از سمت راست و ستون های ۳، ۶، ۸، ۹ و ۱۰ از سمت چپ) قطعه تکثیر یافته با طول ۵۶۱ جفت باز.

شکل ۳: الکتروفورز حاصل از PCR ژن *aac(6)-Ib-cr* در باکتری *اشریشیا کلی*. SM) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، Pose) کنترل مثبت، ستون های ۴ تا ۸) قطعه تکثیر یافته با طول ۴۸۲ جفت باز.

جدول ٤: فراوانی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های مورد بررسی.

ژن های مورد بررسی	*اشریشیا کلی* تعداد (درصد)	*کلبسیلا* تعداد (درصد)
qnrA* و *qnrB	۱۵ (۲۸/۳۰)	۸ (۲۲/۸۵)
qnrB* و *qnrS	۱۱ (۲۰/۷۵)	٤ (۱۱/٤۲)
qnrA*، *qnrB* و *qnrS	۱ (۱/۸۸)	–
aac(6)-Ib-cr* و *qnrB	۹ (۱٦/۹۸)	۷ (۲۰)
aac(6)-Ib-cr	۷ (۱۱/۳۲)	٤ (۱۱/٤۲)
qnrS	٦ (۱۱/۳۲)	۷ (۲۰)
qnrA	٤ (۷/٥٤)	–
qnrB	–	٥ (۱٤/۲۸)

به آنتی بیوتیک های کینولون نشان داد که از میان ژن های مورد بررسی، ژن *qnrB* در هر دو باکتری دارای بیشترین فراوانی می باشد (جدول ۳). نتایج بررسی حالت های مختلف حضور ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های مورد بررسی در جدول ٤ آورده شده است. در این مطالعه بیشترین الگوی حضور ژن ها با فراوانی ۲۸/۳۰ و ۲۲/۸۵ درصد متعلق به حضور هم زمان ژن های *qnrA* و *qnrB* در *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا* بود (جدول ٤).

بحث

در بیشتر موارد به دلیل استفاده بی رویه و خود سرانه آنتی بیوتیک ها، شاهد موارد زیادی از مقاومت های داروئی در باکتری های بیماری زا هستیم. این امر سبب عدم موفقیت درمان و پیدایش بسیاری از عوارض با وجود صرف هزینه های زیادی درمانی می شود. مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک ها در مناطق مختلف ایران و جهان می تواند به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه های ایجاد کننده، تفاوت در میزان مصرف آنتی بیوتیک ها و وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و جدید باشد. از زمان پیدایش آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید در سال ۱۹٦۲ تا کنون از این دارو در درمان عفونت های ادراری استفاده می شود.

بنابراین انتظار می رود که مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک از دیگر آنتی بیوتیک های خانواده کینولونی بالاتر باشد. در بین کینولون ها آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بیشترین تاثیر را بر روی باکتری های گرم منفی و گرم مثبت ها دارد (۲۱). سیپروفلوکساسین با مهار آنزیم DNA جیراز در باکتری های گرم منفی و توپوایزومراز IV در باکتری های گرم مثبت، از بازسازی، ترجمه و ترمیم DNA باکتری جلوگیری می نماید (۲۲ و ۲۳). در مطالعه حاضر بر اساس نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی مشخص گردید که جدایه های *اشریشیا کلی* نسبت به *کلبسیلا* به ترتیب مقاومت بیشتری نسبت به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین داشتند.

در مطالعه جمشیدی (Jamshidi) و همکاران مقاومت *اشریشیاکلی* نسبت به سیپروفلوکساسین ٤٦ درصد و نالیدیکسیک اسید ۳/٦۹ درصد گزارش شد (۲۰). میر مصطفوی (Mirmostafa) و همکاران در سال ۲۰۱۳ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی نمونه‌های بالینی *اشریشیا کلی* جمع آوری شده از سطح شهر کرج را مورد ارزیابی قرار دادند. یافته های آنها نشان داد که ۳٥/٥ درصد نمونه ها به سیپروفلوکساسین و ٥٦/٦ درصد نسبت به نالیدیکسیک اسید مقاوم هستند (۲٤). اوکتم (Oktem) و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ترکیه ۷۸ جدایه انتروباکتریاسه (۳۳ جدایه *اشریشیاکلی* و ٤٤ جدایه *کلبسیلا نمونیه*) با طیف گسترده بتالاکتاماز (Extended-spectrum beta-lactamase= ESBLs) را مورد بررسی قرار دادند. از این تعداد، ۳۷ جدایه (٤۷/٤ درصد) به تنهایی به نالیدیکسیک اسید مقاوم بوده و تعداد ۳۹ جدایه (۷۸/٦ درصد) نیز هم زمان به سیپروفلوکساسین مقاومت داشتند (۲٥).

بنابراین، نتایج حاصل از تحقیق حاضر هم چون بررسی های قبلی نشان می دهد که مقاومت در نالیدیکسیک اسید نسبت به سیپروفلوکساسین بیشتر می باشد. با مقایسه نتیجه مطالعه حاضر با مطالعات انجام شده در تهران مشاهده می گردد که میزان مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین در حال افزایش می باشد. این امر می تواند به دلیل فشار انتخابی حاصل از مصرف بالای این داروها باشد. مطالعات نشان می دهد که ژن های *qnr* نقش مهمی در بروز مقاومت به کینولون ها دارند.

در مطالعه حاضر شیوع ژن های *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* در جدایه های *اشریشیا کلی* به ترتیب ۳۷/۷۳ ، ۶۷/۹۲ و ۳۳/۹۶ درصد و در *کلبسیلا* به ترتیب ۲۲/۸۵، ۶۸/۵۷ و ۳۱/۴۲ درصد بود. نتایج مطالعه کارا (Karah) و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داد که فراوانی ژن های *qnr* و aac(6)-Ib-cr در *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا* مقاوم به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید به ترتیب برابر ۹/۱ و ۵۲/۳ درصد می‌باشد (۲۶). در مطالعه ای که توسط ژو(Zhou) و همکاران در سال های ۲۰۰۵-۲۰۰۲ در چین انجام شد، فراوانی ژن های *qnrA, qnrB, qnrS* در ۵۱۴ جدایه *اشریشیاکلی* را به ترتیب ۰/۴، ۱/۲، ۲/۷ درصد گزارش شد، که نسبت به تحقیق حاضر شیوع کمتری را نشان می دهد. این اختلاف می تواند به دلیل وجود برنامه های نظارتی دقیق در آن کشور و دسترس نبودن داروهای با اهمیت یاد شده باشد (۲۷).

جمشیدی (Jamshidi) و همکاران در سال ۲۰۱۳ فراوانی ژن های *qnr* را در جدایه های *اشریشیا کلی* مقاوم به سیپروفلوکساسین بررسی نمودند. یافته های آنها نشان داد که ۴۶ درصد از جدایه ها نسبت به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و فراوانی ژن های *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* به ترتیب برابر ۳۸/۸، ۵۶/۵ و ۲۸/۹ درصد بود. همچنین ۱۰/۱ درصد از نمونه ها حاوی هر سه ژن *qnrA*، *qnrB* و *qnrS*، ۲۸/۹ درصد دارای دو ژن *qnrA*، *qnrB*، ۹/۱۵ درصد دو ژن *qnrB* و *qnrS* و ۱۱/۵ درصد دارای دو ژن *qnrA* و *qnrS* بودند (۲۳). همچنین آزادپور (Azadpour) و همکاران در سال ۲۰۱۴ با بررسی ۱۰۷ جدایه *کلبسیلا نمونیه* گزارش نمودند که ۱۸ جدایه حامل ژن های *qnr* هستند. از این تعداد ۱۶ جدایه (۸۸/۹ درصد) حامل ژن *qnrB*، ۱ جدایه (۵/۵۵ درصد) حامل ژن *qnrS* و ۱ جدایه (۵/۵۵ درصد) حامل هر دو ژن *qnrB* و *qnrS* می باشند. این یافته تایید کننده این موضوع است که این ژن ها به تنهایی یا به طور هم زمان در انتقال مقاومت موثر هستند (۲۸).

شین (Shin) و همکاران در سال ۲۰۰۹ فراوانی ژن *aac(6)-Ib-c* را در جدایه های بالینی *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا* تولید کننده ESBLs بررسی نمودند. یافته های آنها نشان داد که ۶۱/۱ درصد جدایه ها حامل این ژن بودند و فراوانی ژن *aac(6)-Ib-c* در جدایه های حامل ژن های *qnr* (۶۷/۴ درصد) بیشتر از جدایه های فاقد ژن های *qnr* (۵۱/۷ درصد) می باشد (۲۹). نتایج این مطالعات نشان گر آن است که ژن های دیگری مانند *aac(6)-Ib-cr* نیز در بروز مقاومت آنتی بیوتیکی موثر هستند. تفاوت های موجود در نتایج مربوط به حضور ژن های *qnr* و *aac(6)-Ib-cr* می تواند به دلیل تفاوت های جمعیتی، نوع نمونه‌ها، تفاوت در نحوه مصرف آنتی‌بیوتیک ها، اختلاف سطح اجتماعی و اقتصادی، شرایط جغرافیایی و شیوع عفونت های ناشی از باکتری های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا* باشد. بررسی مقاومت های آنتی بیوتیکی می تواند کمک شایانی به جلوگیری از انتشار سویه های مقاوم و یا انتقال مقاومت به سویه های حساس نماید. آگاهی از فراوانی ژن های *qnr* در نمونه های بالینی، این امکان را فراهم می سازد تا رژیم درمانی مناسب برای درمان بیماران اتخاذ گردد. با درمان مناسب افراد حامل ژن *qnr* می توان از افزایش مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها جلوگیری نمود. بنابراین نتایج تحقیق حاضر می تواند مورد استفاده پزشکان برای انتخاب تدابیر مناسب به منظور درمان و جلوگیری از تجویز نا مناسب آنتی بیوتیک ها قرار گیرد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که ژن های *qnr* نقش مهمی در مقاومت نسبت به کینولون ها در باکتری های بیماری زای مورد بررسی دارند. فراوانی بالای این ژن ها در سویه ها و نیز حمل توسط پلاسمیدها که موجب تسهیل انتقال و گسترش سریع آنها می شود، از نظر بالینی دارای اهمیت می باشد. بنابراین، ضرورت پایش و بررسی کامل الگوی ژنتیکی مقاومت، وجود برنامه های مراقبتی و نظارتی دقیق و اقدامات پیشگیرانه جدی وجود دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مرکز تحقیقات ویراویژه و بیمارستان طالقانی تهران به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Van den Bogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. Int J Antimicrob Agent. 2000; 14(4): 327-335.

2. Wada K, Kariyama R, Mitsuhata R, Uehara S, Watanabe T, Monden K. Experimental and clinical studies on fluroquinolone- insusceptible *Escherichia coli* isolated from patient with urinary tract infections from 1994-2007. Acta Med Okayama. 2009; 63(5): 263-272.

3. Nazik H, Bektore B, Ongen B, Ozuyrt M, Baylan O, Haznedaroglu T. Co-expression of plasmid-mediated quinolone resistance-*qnrA1* and *blaVEB1* gene in Providensia staturii strain. New Microbiol. 2011; 34(2): 225-228.

4. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide, emergence of plasmid mediated quinolone resistance. Lancet Infect Dis. 2006; 6(1): 629-640.

5. Zhou TL, Chen XJ, Zhou MM, Zhao YJ, Luo HZ, Bao QU. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolated in Wenzhou, southern China, 2002-2008. Jpn J Infect Dis. 2011; 64(1): 55-57.

6. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordman P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing entrobacterial isolated. J Antimicrob Chemother. 2007; 60(4): 394-397.

7. Corkill JE, Anson JJ, Hart CA. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from blood cultures in Liverpool, UK. J Antimicrob Chemother. 2005; 56(6): 1115-1117.

8. Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual Á. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J Infection Chemotherapy. 2011; 17(2): 149-182.

9. DiPersio JR, Deshpande LM, Biedenbach DJ, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Evolution and dissemination of extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and molecular report from the sentry antimicrobial surveillance program (1997–2003). Diagn Microb Infect Dis. 2005; 51(1): 1-7.

10. Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim E-C, Jacoby GA, Hooper DC. Prevalence of plasmid- mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. Antimicrob Agents Chemotherapy. 2009; 53(2): 639-645.

11. Akbari-Nakhjavani F, Mirsalehi A, Hamidian M, Kazemi B, Mirafshar M, Jabal Ameli F. Antimicrobial susceptibility testing of *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections to fluoroquinolones and detection of *gyrA* mutations in resistant strains. Daru. 2007; 15(2): 94-99.

12. Syeda QA, Ale Z, Baquar SN, Shahjahan Sh, Rabia B. Resistance pattern of ciprofloxacin against different pathogens. Oman Med J. 2010; 25(4): 294.

13. Colodner R, Kometiani I, Chazan B, Raz R. Risk factors for community-acquired urinary tract infection due to quinolone-resistant *E. coli*. Infection. 2008; 36(1): 41-45.

14. Santiso R, Tamayo M, Fernández JL, del Carmen Fernández M, Molina F, Villanueva R. Rapid and simple determination of ciprofloxacin resistance in clinical strains of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2009; 47(8): 2593-2595.

15. Molla Zadeh H, Sheikh Haji Zadeh B, Aslamyk, Hamidi M, Bahmanabadi R. Susceptibility patterns of antibiotic resistance in *K. pneumoniae* strains isolated from clinical samples Arad hospital

in Tehran. Iran J Infectious Dis Trop Med J. 2013; 18(62): 37-41.

16. Zibaei M, Firoozeh F. Detection of *qnrA* gene among quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Khorram Abad during 2011-2012. Kashan Uni Med Sci J. 2013;17(5): 488-494.

17. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(4): 657-686.

18. Clinical and laboratory standard institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. M100-S25: CLSI; 2015.

19. Hokmi vala M, Abdi Sh, Bagheri bejestani F. *QnrA* gene in fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates scattering isolated from the urine of patients referred to Imam Khomeini Tehran. J Infect Dis. 2014; 19(64): 63-66. [In Persian]

20. Mansouri Jamshidi N1, Pakzad I, Tabaraei B, Hadadi A. Evaluating the frequency of ciprofloxacin resistance *qnr* genes in *Escherichia coli* strains isolated from clinical samples of Imam Khomani and Milad Hospitals in Ilam and Tehran, Iran. J Isfahan Univ Med Sci. 2013; 21(6): 16-22. [In Persian]

21. Nkat G, Muller G, Braissant O, Frei R, Tschudin-Suter S, Rieken M. Increasing prevalence of ciprofloxacin resistance in extended spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli* urinary isolates. World J Urol. 2013; 31: 1427-1432.

22. Nsal S, Tandon V. Contribution of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes to ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. Int J Antimicrob Agent. 2011; 37: 253-255.

23. In JH, Jung HJ, Lee JY, Kim HR, Lee JN, Chang CL. High rates of plasmid-mediated quinolone resistance *qnrB* variants among ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* and *K. pneumoniae* from urinary tract infections in Korea. Microb Drug Resist. 2008; 14: 221-226.

24. Mirmostafa S, haddadi A, Mozaffari Sabet3 N. Determination of plasmid profile and antibiotic resistance pattern in clinical *Escherichia coli* strains, isolated from different region of Karaj city. New Cell Mol Biotechnol J. 2014; 3(12): 93-97.

25. Oktem IMA, Gulay Z, Biçmen M, Gur D, Group HPS. *qnrA* prevalence in extended-spectrum beta-lactamase-positive Enterobacteriaceae isolates from Turkey. Jpn J Infect Dis. 2008; 61(1): 13.

26. Karah N, Poirel L, Bengtsson S, Sundqvist M, Kahlmeter G, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac* (6′)-Ib-cr in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from Norway and Sweden. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010; 66(4): 425-431.

27. Zhou T-L, Chen X-J, Zhou M-M, Zhao Y-J, Luo X-H, Bao Q-Y. Prevalence of plasmid- mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates in Wenzhou, Southern China, 2002-2008. Jpn J Infect Dis. 2011; 64(1): 55-57.

28. Azadpour M, Soleimani Y, Rezaie F, Nikanpour E, Mahmoudvand H, Jahanbakhsh S. Prevalence of *qnr* genes and antibiotic susceptibility patterns among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in West of Iran. J Bacteriol Parasitol. 2014; 5(5): 1. [In Persian]

29. Shin SY, Kwon KC, Park JW, Song JH, Ko YH, Sung JY. Characteristics of aac (6')-Ib-cr gene in extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *K. pneumoniae* isolated from Chungnam area. Korean J Lab Med. 2009; 29(6): 541-550.

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 3, September 2016

Original Article

Evaluation of the frequency of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Tehran

Masomeh Mohamadbigi[1], **Jafar Akbarmehr**[2], **Behbuod Jafari**[3]

[1]MS.c., Department of Microbiology, Ahar branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Sarab branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Microbiology, Ahar branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

Abstract

Background & Objectives: The *qnr* gene is a plasmid carrying resistant genes involved in bacterial resistance to quinolone resistance plasmid factors. The aim of this study was to evaluate the presence of either gene *qnr*, a plasmid resistant gene, and *aac (6) -Ib-cr*, from *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp isolated from clinical samples.

Materials & Methods: In this sectional study, 132 *E. coli* and 98 *Klebsiella* isolates were collected from patients with the UTI referred to the ayatollah Taleghani Hospital in Tehran. Antibiotic resistance was evaluated using Kirby-Bauer and CLSI criteria. After DNA extraction, *qnr* and *aac (6)-Ib-cr* genes were amplified using PCR method.

Results: In this study, *E. coli* strains were resistant to ciprofloxacin and nalidixic acid in a ratio of 47.72 % and 62.12 %, respectively. Also, *Klebsiella* isolates were resistant to ciprofloxacin and nalidixic acid in a ratio of 38.77 % and 51.02 %, respectively. In the present study, the frequency of *aac(6)-lb-cr, qnrA* , *qnrB,* qnr*S* genes in *E. coli* were 30.18, 37.73, 67.92, 33.96 %. Also these frequency were 31.42, 22.58, 68.57, 31.42 % in *Klebsiella.*

Conclusion: This study showed high frequency of the ciprofloxacin resistant *qnr* gense in *E. coli* and *Klebsiella* isolates from Tehran.

Keywords: Escherichia coli, Klebsiella, qnr genes, aac(6)-Ib-cr gene.

Correspondence to: Masomeh Mohamadbigi
Tel: +98 9125415800
E-mail: m_mohamadbigi@yahoo.com

Journal of Microbial World 2016, 9(3): 199-207.