



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 مرز (PCR) استفاده گردید.

یافته ها: در مجموع ۴۷/۷۲ درصد از جدایه های اشریشیا کلی نسبت به آنتی بیوتیک 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)-Ib-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. نتایج 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

می شود. در جمعیت های انسانی و حیوانی از آنتی بیوتیک ها به منظور درمان و جلوگیری از بیماری های عفونی استفاده می گردد (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).

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

(* آدرس برای مکاتبه: اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروب شناسی.

امروزه کلبسیلا نمونه 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، سیتی سمی، پنومونی و عفونت های داخل شکمی در بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان می گردد. عفونت های حاصل از این باکتری در خارج از بیمارستان کمتر دیده می شود (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 آنتی بیوتیک ها کمک خواهد کرد. امروزه تعداد ارگانیزم های مقاوم به آنتی بیوتیک 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 اشریشیا کلی جدا شده از عفونت ادراری در شهرستان تهران انجام شد، میزان مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکسین به ترتیب ۳/۴۹ و ۲/۴۰ درصد گزارش شد (۱۱).

ساید (Sayed) همکاران در سال های ۲۰۰۸ تا ۲۰۰۹ در عمان، فراوانی مقاومت به سیپروفلوکسین در اشریشیا کلی را ۲۷/۰۲ درصد اعلام نمودند (۱۲). کلودنر (Colodner) در سال ۲۰۰۸ مقاومت اشریشیا کلی به سیپروفلوکسین را ۵۰ درصد گزارش کرد (۱۳). سانتیسو (santiso) و همکاران در سال ۲۰۰۹ از ۹۵ گونه بالینی اشریشیا کلی، ۷۴ جدایه مقاوم به سیپروفلوکسین و ۲۱ گونه حساس به سیپروفلوکسین را مشاهده کردند (۱۴). ملاعباس زاده (Molla Abbaszadeh) و همکاران در سال ۲۰۱۳، میزان مقاومت سویه های کلبسیلا پنومونیه نسبت به

تا کنون سه نوع مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید کشف شده است که مهم ترین آن ژن های *qnr* می باشد (۴). پلاسمید ها عناصر ژنتیکی خارج کروموزومی هستند که یکی از عوامل عمده القای مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها می باشند. اخیراً سه مکانیزم مقاومت وابسته به پلاسمید برای کینولون ها توصیف شده است. اولین مسیر مکانیزم وابسته به پروتئین های *qnr* مربوط به تکرار خانواده پنتاپتید می باشد که توپوایزومراز تیپ II را از مهار شدن توسط کینولون ها حفاظت می نماید.

دومین مکانیزم 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 سیپروفلوکسین می شود. سومین راه که اخیراً توصیف شده، مکانیزم انتقال کینولون توسط پمپ پروتئینی *qepA* می باشد. ژن های پلاسمیدی *qnrA*، *B*، *S* باعث ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به سیپروفلوکسین 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 آنتی بیوتیکی 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 نمونه (*Klebsiella pneumonia*) یک باسیل گرم منفی روده ای از خانواده اتریباکتریاسه می باشد که بخشی از میکروفلور طبیعی بدن انسان را تشکیل می دهد. حدود یک سوم افراد سالم ناقل روده ای این میکروب هستند.

فارلند از جدایه های مورد بررسی تهیه و در محیط مولر هیتتون 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 ۱۸-۲۴ 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 (۱۹).

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 ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری گردید. به منظور استخراج ژنوم از کیت استخراج (Bionner, Korea) DNA و مطابق با دستورالعمل کیت استفاده شد.

ه) واکنش زنجیره ای پلی مرز (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 ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلیسیوس به مدت ۴۰ ثانیه (برای ژن های *qnrA*، *B*، *S*) و دمای ۵۸ درجه سلیسیوس به مدت ۱۵ ثانیه (برای ژن *aac(6')-Ib-cr*)، گسترش در دمای ۷۲ درجه

آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین را در سال های ۱۳۸۸، ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ به ترتیب برابر ۶۱/۶، ۶۰/۳ و ۵۷/۴ درصد گزارش نمودند (۱۵). زیبایی (Zibae) 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 ۱۴/۳ درصد از جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای ژن *qnrA* بودند (۱۶). 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 گلوکز و لاکتوز، تحرک، اوره، اندول، اکسیداز، TSI و SIM تأیید شدند (۱۷). 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 آنتی بیوتیکی جدایه های اشریشیاکلی و کلبسیلا با استفاده از روش کربی-بائر (Kirby Baur) مطابق با دستورالعمل استاندارد جهانی (CLSI) انجام شد (۱۸). سوسپانسیون معادل غلظت نیم مک

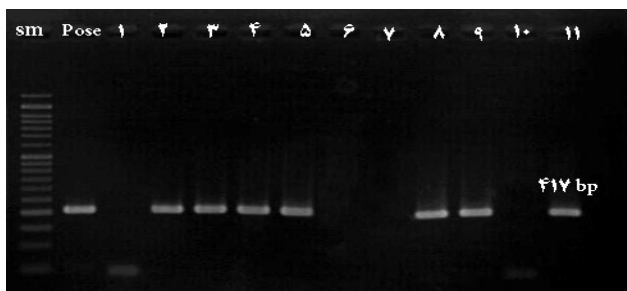
جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه (۲۰).

نام ژن	توالی (3' → 5')	اندازه محصول (جفت باز)
<i>qnrA</i>	F: 5'-AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG-3' R: 5'-TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC-3'	۵۷۱
<i>qnrB</i>	F: 5'-ATG ACG CCA TTA CTG TAT AA-3' R: 5'-GAT CGC AAT GTG TGA AGT TT-3'	۵۶۱
<i>qnrS</i>	F: 5' ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA-3' R: 5' TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC-3'	۴۱۷
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	F: 5'-TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA-3' R: 5'-CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT-3'	۴۸۲

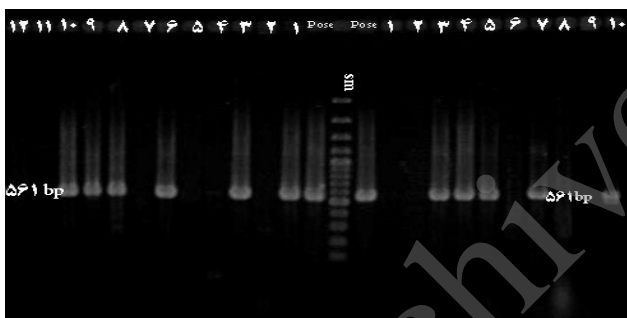
جدول ۲: نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های مورد بررسی در مطالعه.

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)
<i>اشریشیا کلی</i>	۶۳ (۴۷/۷۲)	۶۹ (۵۲/۲۷)	۸۲ (۶۲/۱۲)	۵۰ (۳۷/۸۷)	۵۳ (۴۰/۲)
<i>کلبسیلا</i>	۳۸ (۳۸/۷۷)	۶۰ (۶۱/۲۲)	۵۰ (۵۱/۰۲)	۴۸ (۴۸/۹۷)	۳۵ (۳۵/۷)

CP: سیپروفلوکساسین، NA: نالیدیکسیک اسید.



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



شکل ۲: الکتروفورز حاصل از PCR ژن *qnrB* در باکتری‌های *اشریشیا کلی* (سمت چپ) و *کلبسیلا* (سمت راست). (SM) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، (Pose) کنترل مثبت، ستون‌های ۳، ۴، ۵، ۷ و ۱۰ از سمت راست و ستون‌های ۳، ۶، ۸، ۹ و ۱۱ 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، ستون‌های ۴ تا ۸) قطعه تکثیر یافته با طول ۴۸۲ جفت باز.

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 ژن‌های مورد مطالعه و مقاومت آنتی بیوتیکی از نمودار هیستوگرام استفاده گردید.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده از آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌های 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 آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و ۵۱/۰۲ درصد نسبت به نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند. همچنین ۴۰/۲ درصد از جدایه‌های *اشریشیا کلی* و ۳۵/۷ درصد از نمونه‌های *کلبسیلا* نسبت به تمام غلظت‌های این دو آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند. نتایج واکنش زنجیره ای پلی مرز نشان دهنده تکثیر صحیح ژن‌های مورد بررسی بود (شکل‌های ۱ تا ۳). همچنین ارزیابی فراوانی ژن‌های مقاومت

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

باکتری	ژن <i>aac(6)-Ib-cr</i> تعداد (درصد)	ژن <i>qnrA</i> تعداد (درصد)	ژن <i>qnrB</i> تعداد (درصد)	ژن <i>qnrS</i> تعداد (درصد)
<i>اشریشیا کلی</i>	۱۶ (۱۸/۳۰)	۲۰ (۲۳/۳۷)	۳۶ (۴۲/۶۷)	۱۸ (۹۶/۳۳)
<i>کلبسیلا</i>	۱۱ (۴۲/۳۱)	۸ (۸۵/۲۲)	۲۴ (۵۷/۶۸)	۱۱ (۴۲/۳۱)

جدول ۴: فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌های مورد بررسی.

ژن‌های مورد بررسی	<i>اشریشیا کلی</i> تعداد (درصد)	<i>کلبسیلا</i> تعداد (درصد)
<i>qnrA</i> و <i>qnrB</i>	۱۵ (۲۸/۳۰)	۸ (۲۲/۸۵)
<i>qnrS</i> و <i>qnrB</i>	۱۱ (۲۰/۷۵)	۴ (۱۱/۴۲)
<i>qnrS</i> و <i>qnrB</i> - <i>qnrA</i>	۱ (۱/۸۸)	-
<i>qnrB</i> و <i>aac(6)-Ib-cr</i>	۹ (۱۶/۹۸)	۷ (۲۰)
<i>aac(6)-Ib-cr</i>	۷ (۱۱/۳۲)	۴ (۱۱/۴۲)
<i>qnrS</i>	۶ (۱۱/۳۲)	۷ (۲۰)
<i>qnrA</i>	۴ (۷/۵۴)	-
<i>qnrB</i>	-	۵ (۱۴/۲۸)

به آنتی بیوتیک‌های کینولون نشان داد که از میان ژن‌های مورد بررسی، ژن *qnrB* در هر دو باکتری دارای بیشترین فراوانی می‌باشد (جدول ۳). نتایج بررسی حالت‌های مختلف حضور ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌های مورد بررسی در جدول ۴ آورده شده است. در این مطالعه بیشترین الگوی حضور ژن‌ها با فراوانی ۲۸/۳۰ و ۲۲/۸۵ درصد متعلق به حضور هم‌زمان ژن‌های *qnrA* و *qnrB* در *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا* بود (جدول ۴).

بحث

در بیشتر موارد به دلیل استفاده بی‌رویه و خود سرانه آنتی بیوتیک‌ها، شاهد موارد زیادی از مقاومت‌های دارویی در باکتری‌های بیماری‌زا هستیم. این امر سبب عدم موفقیت درمان و پیدایش بسیاری از عوارض با وجود صرف هزینه‌های زیادی درمانی می‌شود. مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک‌ها در مناطق مختلف ایران و جهان می‌تواند به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه‌های ایجاد کننده، تفاوت در میزان مصرف آنتی بیوتیک‌ها و وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف و جدید باشد. از زمان پیدایش آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید در سال ۱۹۶۲ تا کنون از این دارو در درمان عفونت‌های ادراری استفاده می‌شود.

بنابراین انتظار می‌رود که مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک از دیگر آنتی بیوتیک‌های خانواده کینولونی بالاتر باشد. در بین

کینولون‌ها آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بیشترین تاثیر را بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت‌ها دارد (۲۱). سیپروفلوکساسین با مهار آنزیم DNA جیراز در باکتری‌های گرم منفی و توپوایزومراز IV در باکتری‌های گرم مثبت، از بازسازی، ترجمه و ترمیم DNA باکتری جلوگیری می‌نماید (۲۲ و ۲۳). در مطالعه حاضر بر اساس نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی مشخص گردید که جدایه‌های *اشریشیا کلی* نسبت به *کلبسیلا* به ترتیب مقاومت بیشتری نسبت به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین داشتند.

در مطالعه جمشیدی (Jamshidi) و همکاران مقاومت *اشریشیا کلی* نسبت به سیپروفلوکساسین ۴۶ درصد و نالیدیکسیک اسید ۳/۶۹ درصد گزارش شد (۲۰). میر مصطفوی (Mirmostafa) و همکاران در سال ۲۰۱۳ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی نمونه‌های بالینی *اشریشیا کلی* جمع‌آوری شده از سطح شهر کرج را مورد ارزیابی قرار دادند. یافته‌های آنها نشان داد که ۳۵/۵ درصد نمونه‌ها به سیپروفلوکساسین و ۵۶/۶ درصد نسبت به نالیدیکسیک اسید مقاوم هستند (۲۴). اوکتیم (Oktem) و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ترکیه ۷۸ جدایه انتروباکتریاسه (۳۳ جدایه *اشریشیا کلی* و ۴۴ جدایه *کلبسیلا* نمونه) با طیف گسترده بتالاکتاماز (Extended-spectrum beta-lactamase = ESBLs) را مورد بررسی قرار دادند. از این تعداد، ۳۷ جدایه (۴۷/۴ درصد) به تنهایی به نالیدیکسیک اسید مقاوم بوده و تعداد ۳۹ جدایه (۷۸/۶ درصد) نیز هم‌زمان به سیپروفلوکساسین مقاومت داشتند (۲۵).

بنابراین، نتایج حاصل از تحقیق حاضر هم‌چون بررسی‌های قبلی نشان می‌دهد که مقاومت در نالیدیکسیک اسید نسبت به سیپروفلوکساسین بیشتر می‌باشد. با مقایسه نتیجه مطالعه حاضر با مطالعات انجام شده در تهران مشاهده می‌گردد که میزان مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین در حال افزایش می‌باشد. این امر می‌تواند به دلیل فشار انتخابی حاصل از مصرف بالای این داروها باشد. مطالعات نشان می‌دهد که ژن‌های *qnr* نقش مهمی در بروز مقاومت به کینولون‌ها دارند.

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 نمونه ها، تفاوت در نحوه مصرف آنتی بیوتیک 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 ویروایزه و بیمارستان طالقانی تهران به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را 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 می باشد (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 اشریشیا کلی 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 نمونه 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

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 fluoroquinolone-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 *Providencia 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 enterobacterial 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.



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

Masomeh Mohamadbigi¹, Jafar Akbarmehr², Behbuod Jafari³

¹MS.c., Department of Microbiology, Ahar branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

²Assistant Professor, Department of Microbiology, Sarab branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.

³Assistant 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)-Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* 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* gene 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.