مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره یازدهم، شماره ۱، فروردین ۹۶
صفحه ۳۹ الی ۴۸

مقاله پژوهشی
(Original Article)

شیوع ژن‌های کدکننده پمپ‌های ترشحی *qepA* و *acrAB* در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه*، جداشده از بیماران بستری در بیمارستان‌های منتخب شهر تهران

محسن حیدری[1*]، حسین گودرزی[1]، علی هاشمی[1]، گیتا اسلامی[1]، سعید خشنود[2]، شکوه امرائی[1]

[1]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی،تهران، ایران.

[2]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: افزایش ظهور مقاومت فلوروکینولونی بین سویه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه*، گزینه‌های درمانی عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها را کاهش داده است. این مطالعه با هدف بررسی شیوع ژن‌های کدکننده پمپ‌های ترشحی *qepA* و *acrAB* در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* صورت گرفت.

روش بررسی: این مطالعه بر روی ۱۱۷ سویه *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از بیماران بستری در بیمارستان‌های منتخب شهر تهران، طی سالهای ۱۳۹۴-۱۳۹۳ انجام شد. تست‌های حساسیت ضدمیکروبی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (براساس رهنمودهای CLSI) و شناسایی ژن‌های *qepA*، *acrB* و *acrA*، با استفاده از تکنیک PCR انجام گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه کلیستین و تیجیسیکلین، بهترین تأثیر را علیه نمونه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* داشتند. طبق نتایج PCR؛ ۱۱۰ ایزوله (۹۴٪) دارای ژن *acrA* و ۱۰۲ ایزوله (۸۷٪) دارای ژن *acrB* بودند. ژن *qepA* در هیچ‌یک از سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* یافت نشد.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج مطالعه حاضر، شیوع ژن‌های کدکننده پمپ ترشحی *acrAB* در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* که باعث مقاومت به فلوروکینولون‌ها می‌شود، موجب نگرانی است. بنابراین، برای کنترل عفونت و جلوگیری از گسترش باکتری‌های مقاوم به دارو، نیاز به مدیریت دقیق در تجویز دارو و شناسایی ایزوله‌های مقاوم می‌باشد.

کلید واژه‌ها: *کلبسیلا پنومونیه*؛ پمپ ترشحی؛ فلوروکینولون‌ها؛ تست حساسیت میکروبی؛ سیپروفلوکسازین؛ *acrAB*؛ پمپ ترشحی.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
محسن حیدری، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی،تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
mohsenheidary40@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۳

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱/۱۹

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Heidari M, Goudarzi H, Hashemi A, Eslami G, Khoshnood S, Amraei Sh. Prevalence of genes encoding *AcrAB* and *QepA* efflux pumps among *klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients hospitalized in selected hospitals in Tehran City, Iran. Qom Univ Med Sci J 2017;11(1):39-48. [Full Text in Persian]

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه، یک پاتوژن فرصت‌طلب گرم منفی و یکی از عوامل شایع عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شود (۲،۱). افزایش ظهور مقاومت چنددارویی در بین سویه‌های بیمارستانی *کلبسیلا پنومونیه*، گزینه‌های درمانی را برای درمان عفونت‌های ایجادشده به‌وسیله این باکتری محدود کرده است (۳). این باکتری، یکی از موارد مهم عفونت‌های اکتسابی از جامعه و بیمارستان است (۴)، و در ایجاد انواع مختلفی از عفونت‌ها نقش دارد، به‌ویژه در نوزادان که موجب پنومونی، سپتی‌سمی، اسهال، ایجاد آبسه در کبد، مننژیت عفونت‌های ادراری و باکتری می‌شود (۱) (۸-۵). طبق گزارشها، ۴ میلیون نوزاد در هر سال فوت می‌کنند (۹). بیشترین میزان مرگ و میر در نوزادان مربوط به عفونت‌های پنومونی، سپتی‌سمی، مننژیت و اسهال بوده که به دلیل نداشتن سیستم ایمنی کامل، آسیب‌پذیرترند (۱۰). مقاومت ضدمیکروبی به‌عنوان یک مشکل جدی برای سلامت انسان مطرح است (۱۱)، و بیماران را در سرتاسر بیمارستان‌های جهان تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (۱۳،۱۲)، که به‌همین دلیل سازمان بهداشت جهانی، سال ۲۰۱۱ را به‌عنوان سال مقاومت آنتی‌بیوتیکی نامید (۱۵،۱۴). این سازمان توصیه‌های زیادی را برای کنترل و جلوگیری از مقاومت آنتی‌بیوتیکی به دولت‌ها کرده است که مهم‌ترین آنها شامل ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، استفاده صحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها، فروش آنتی‌بیوتیک‌ها فقط با نسخه پزشک، همچنین کنترل و جلوگیری از عفونت‌ها می‌باشد (۱۴). درمان عفونت‌های بیماران آلوده به ارگانیسم‌های مقاوم به چندین دارو، تبدیل به یک مشکل مهم شده است (۵). اگرچه فلوروکینولون‌ها، داروهای مناسب جهت درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی هستند، اما در حال حاضر مقاومت دارویی به این آنتی‌بیوتیک‌ها رو به افزایش است (۲). مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *کلبسیلا پنومونیه* شامل بتالاکتامازها، جهش در پورین‌ها و نیز پمپ‌های ترشحی بوده که پمپ‌های ترشحی به‌عنوان یکی از موارد اصلی دفاع این باکتری در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب می‌شوند (۱۷،۱۶). *qepA*، *acrAB* ازجمله مهم‌ترین پمپ‌های ترشحی هستند که باعث مقاومت *کلبسیلا پنومونیه* به فلوروکینولون‌ها می‌شوند.

ژن *qepA (quinolone efflux pump)* بر روی پلاسمید قرار گرفته و دارای جزء ترانسپوزونی است که در دوطرف آن کپی‌هایی از IS26 وجود دارد (۱۸). این ژن کدکننده یک پمپ ترشحی کینولونی *qepA* است که متعلق به خانواده MFS (Major Facilitator Subfamily) می‌باشد (۲۰،۱۹). پروتئین *qepA* یک ترانسپورتر وابسته به پروتون است که باعث مقاومت کینولونی هیدروفیلیک، به‌ویژه به سیپروفلوکسازین، نورفلوکسازین و انروفلوکسازین می‌شود (۲۱). ژن‌های *acrB* و *acrA* بر روی کروموزوم قرار دارند و یک پمپ ترشحی چنددارویی را که در اکثر باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه وجود دارد، کد می‌کنند (۲۲). پمپ ترشحی *acrAB*، پمپ‌های اصلی ایجادکننده مقاومت ذاتی سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* علیه فلوروکینولون‌ها، به‌ویژه سیپروفلوکسازین از طریق تغییر نفوذپذیری در غشای پروکاریوتی، دفع آنتی‌بیوتیک به محیط خارجی و کاهش غلظت داخلی آنتی‌بیوتیک می‌باشد (۲۳). پمپ ترشحی *acrAB*، جزء افلاکس پمپ‌های خانواده RND طبقه‌بندی می‌شود که این خانواده از مهم‌ترین پمپ‌های ترشحی MDR بوده و نقش اصلی در مقاومت چنددارویی در برابر باکتری‌ها ایفا می‌کنند (۲۳). همچنین این ژن‌ها قادر هستند از یک باکتری به باکتری دیگر، از یک انسان به انسان دیگر؛ حتی از یک کشور به کشور دیگر منتقل شوند و به‌عنوان یک تهدید مهم در بیماران بستری‌شده در بیمارستان‌ها محسوب می‌شوند. اطلاعات کمی در مورد فراوانی این ژن‌ها در ایران وجود دارد، از این‌رو جهت تشخیص سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* حاوی ژن‌های مقاومت، به‌ویژه جهت درمان بهتر بیماران و جلوگیری از انتشار این ژن‌ها به دیگر باکتری‌ها، نیاز به بررسی دقیق میزان شیوع آنها می‌باشد. لذا این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی ژن‌های کدکننده پمپ‌های ترشحی *qepA*، *acrAB* در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه*، جداشده از بیماران بستری در بیمارستان‌های منتخب شهر تهران در سالهای ۱۳۹۴-۱۳۹۳ انجام شد.

روش بررسی

در این پژوهش، سویه‌های مشکوک به *کلبسیلا پنومونیه* از بیماران بستری در بیمارستان‌های امام حسین(ع)، کودکان مفید و طالقانی

جمع‌آوری شد. پس از انتقال نمونه‌های مشکوک به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، شناسایی تأییدی آنها با روش‌های استاندارد و افتراقی میکروب‌شناسی انجام گرفت که درمجموع، ۱۱۷ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* جمع‌آوری شد.

برای تأیید، نمونه‌ها بر روی محیط کشت EMB و مک‌کانکی آگار کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بعد از انکوباسیون، از کلنی‌های مشکوک به *کلبسیلا پنومونیه*، لام مستقیم تهیه و در صورت دیدن باسیل‌های گرم منفی، کارهای تشخیصی زیر انجام شد:

از تست‌های مرسوم آزمایشگاهی (تست اکسیداز، کشت در محیط‌های TSI، SIM، MR، VP، لیزین دکربوکسیلاز، سیترات، اوره و ....) استفاده گردید. مقاومت دارویی سویه‌های جداشده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم، مروپنم، آزترونام، سفوتاکسیم و سفتازیدیم، کلیسیتین، سیپروفلوکسازین، جنتامایسین، سفپیم، تتراسیکلین، آمپی‌سیلین، پیپراسیلین، سفتریاکسون، سفتریاکسن، تیجیسیلین، دوری‌پنم، ارتاپنم، پیپراسیلین/تازوباکتام و فسفومایسین؛ به روش انتشار دیسک در آگار (Disk Diffusion) انجام گرفت.

به‌طور خلاصه، چند کلنی از کشت ۲۴ ساعته باکتری از محیط مولر هینتون براث برداشته و در ۰/۹٪ محلول نمکی حل شد تا به غلظت ۰/۵مک‌فارلند رسید، سپس مقدار مشخصی از سوسپانسیون میکروبی تهیه‌شده، برداشته و بر روی پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی با فاصله مناسب بر روی محیط گذاشته شد و پلیت‌ها برای مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس نتایج با استفاده از دستورالعمل CLSI بررسی گردید.

استخراج DNA طبق پروتکل کیت شرکت Genetbio انجام گرفت. برای انجام واکنش PCR، ابتدا مخلوط واکنش در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری تهیه شد. برای تهیه این مخلوط، ابتدا مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش برای یک نمونه، محاسبه و سپس بسته به تعداد نمونه، مقادیر برای تعداد نمونه مورد نظر محاسبه گردید. به‌منظور دقت و صحت انجام تست برای هربار انجام واکنش، نمونه‌های کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شدند. به‌همین دلیل در محاسبه مقادیر واکنش، کنترل‌های مثبت و منفی نیز منظور گردید. برای تکثیر ناحیه درونی ژن‌های نام‌برده‌شده، مجموعه‌ای از پرایمرها مورد استفاده قرار گرفت. توالی پرایمرها با اطلاعات توالی نوکلئوتیدی موجود در Gene Bank (سیستم blast) طراحی شد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	ژن‌های شناسایی‌شده	توالی پرایمر	اندازه(جفت باز)
qeA-F	*qepA*	CTGCAGGTACTGCGTCATG	۴۰۳
qepA-R		CGTGTTGCTGGAGTTCTTC	
acr A-F	*acrA*	TCTGATCGACGGTGACATCC	۱۵۷
acr A-R		TCGAGCAATGATTTCCTGCG	
acr B-F	*acrB*	CAATACGGAAGAGTTTGGCA	۶۴
acr B-R		CAGACGAACCTGGGAACC	

مقادیر لازم برای انجام PCR در جدول شماره ۲ آورده شده است.

جدول شماره ۲: شرایط لازم برای انجام PCR

مراحل PCR	دما (سانتیگراد)			زمان		
چرخه	۳۶	۳۶	۳۶			
----------	*acrB*	*acrA*	*qepA*	*acrB*	*acrA*	*qepA*
دناتوراسیون اولیه	۹۴	۹۴	۹۴	۵دقیقه	۵دقیقه	۵دقیقه
دناتوراسیون	۹۴	۹۴	۹۴	۴۵ثانیه	۴۵ثانیه	۴۵ثانیه
آنلینگ	۵۲	۵۷	۵۱	۴۵ثانیه	۴۵ثانیه	۴۵ثانیه
طویل‌سازی	۷۲	۷۲	۷۲	۴۵ثانیه	۴۵ثانیه	۴۵ثانیه
طویل‌سازی نهایی	۷۲	۷۲	۷۲	۵دقیقه	۵دقیقه	۵دقیقه

محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ با بافر TBE (Tris-borate EDTA) ران شد، سپس ژل با اتیدیوم بروماید رنگ گردید. پس از پایان الکتروفورز، ژل با دستگاه Gel doc و در طول موج ۲۸۰ نانومتر از نظر وجود باندهای هدف در کنار مارکر مولکولی و کنترل مثبت و منفی مورد بررسی قرار گرفت.

پس از انجام PCR، محصول آن ران شده و با استفاده از کیت، باندهای ژن مورد نظر، استخراج و جهت تأیید، بعضی از سویه‌های حاوی ژن‌های *qepA*، *acrB* و *acrA* به شرکت Bioneer (شور کره جنوبی) برای انجام Sequencing ارسال شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار Chromas 1.45 و Blast در NCBI مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

در یک بازه زمانی ۱/۵ ساله، ۱۱۷ سویه *کلبسیلا پنومونیه* از بیمارستان‌های شهر تهران جدا شد. در این میان، ۵۵ ایزوله (۴۷٪) از بیمارستان طالقانی، ۵۵ ایزوله (۴۷٪) از بیمارستان کودکان مفید و ۷ ایزوله (۶٪) از بیمارستان امام حسین (ع) بود. ۶۷ نمونه (۵۷/۲۶٪) از مردان و ۵۰ نمونه از زنان (۴۲/۷۴٪) جدا شد که به ترتیب ۲۷ (۲۳/۷۱٪)، ۱۰ (۸/۵٪)، ۹ (۷/۵٪)، ۸ (۶/۸۳٪)، ۹ (۷/۵٪)، ۹ (۷/۵٪) و ۴۵ (۳۸/۴۶٪) ایزوله مربوط به سنین بالای ۶۰ سال، ۵۹-۵۰، ۴۹-۴۰، ۳۹-۳۰، ۲۹-۲۰، ۱۹-۸ و ۷-۰ سال بود. ۴۹ ایزوله از بخش کودکان، ۱۶ ایزوله از بیماران سرپایی، ۱۳ ایزوله از بخش مراقبت‌های ویژه، ۹ ایزوله از بخش جراحی، ۱۲ ایزوله از NICU، ۴ ایزوله از واحد پیوند استخوان، ۴ ایزوله از هماتولوژی، ۳ ایزوله از اندوکاردیت، ۳ ایزوله از واحد گوارش و ۴ ایزوله از قسمت‌های دیگر جدا شده بود. ۴۶ ایزوله از نمونه مدفوع، ۳۶ ایزوله از نمونه خون، ۱۲ ایزوله از نمونه زخم، ۱۲ ایزوله از نمونه خلط، ۸ ایزوله از نمونه خارج شکمی و ۳ ایزوله از مایع مغزی - نخاعی بود.

الگوی مقاومت دارویی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* که با استفاده از دیسک‌های شرکت Mast انگلستان انجام شد، در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از روش PCR برای ژن‌های کدکننده پمپ‌های ترشحی *qepA*، *acrB* و *acrA*، از تعداد کل ۱۱۷ نمونه مورد آزمایش؛ ۵ سویه (۴٪) برای ژن *qepA*، ۱۱۰ سویه (۹۴٪) برای ژن *acrA* و ۱۰۲ سویه (۸۷٪) برای ژن *acrB* مثبت بودند. نتایج دیسک دیفیوژن برای سیپروفلوکسازین، میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک را ۷۷٪ گزارش کرد که این نتیجه با میزان شیوع ژن‌های *acrB* و *acrA* که مقاومت به سیپروفلوکسازین را کد می‌کنند همخوانی داشت.

جدول شماره ۳: نتایج تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی

آنتی‌بیوتیک	حدواسط تعداد (درصد)	حساس تعداد (درصد)	مقاوم تعداد (درصد)
آزترونام (۱۰ میکروگرمی)	۵(٪۵)	۳۷(٪۳۱)	۷۵(٪۶۴)
مروپنم (۱۰ میکروگرمی)	۱۲(٪۱۰)	۷۷(٪۶۶)	۲۸(٪۲۴)
جنتامایسین (۱۰ میکروگرمی)	۱(٪۲)	۶۵(٪۵۵)	۵۱(٪۴۳)
آمیکاسین (۳۰ میکروگرمی)	۱(٪۲)	۷۶(٪۶۵)	۴۰(٪۳۴)
ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرمی)	۱۲(٪۱۰)	۷۷(٪۶۶)	۲۸(٪۲۴)
سیپروفلوکسازین (۳۰ میکروگرمی)	۱(٪۲)	۳۹(٪۳۳)	۷۷(٪۶۶)
سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرمی)	۱(٪۲)	۳۹(٪۳۳)	۷۷(٪۶۶)
تتراسیکلین (۱۰ میکروگرمی)	۴(٪۴)	۴۳(٪۳۶)	۷۰(٪۶۰)
آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرمی)	۲۴(٪۲۱)	۲۰(٪۱۷)	۷۳(٪۶۲)
پیپراسیلین (۱۰۰ میکروگرمی)	۴(٪۴)	۴۰(٪۳۴)	۷۳(٪۶۲)
سفپودوکسیم (۳۰میکروگرمی)	۳(٪۲)	۳۰(٪۲۶)	۸۴(٪۷۲)
تیجی سیکلین (۱۵ میکروگرمی)	۶۵(٪۵۵)	۳۵(٪۳۰)	۱۷(٪۱۵)
دوری‌پنم (۱۰ میکروگرمی)	۱۲(٪۱۰)	۷۷(٪۶۶)	۲۸(٪۲۴)
ارتاپنم (۱۰ میکروگرمی)	۱۲(٪۱۰)	۷۷(٪۶۴)	۲۸(٪۲۴)
سفتازیدیم (۳۰ میکروگرمی)	۵(٪۵)	۳۹(٪۳۳)	۷۳(٪۶۲)
کلسیتین (۱۰ میکروگرمی)	۰(٪۰/۰)	۱۱۲(٪۹۶)	۵(٪۴)

بحث

به‌کارگیری مؤثر از آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی برای تشخیص صحیح و جلوگیری از گسترش پاتوژن‌های مقاوم باعث کاهش نیاز به استفاده از داروها می‌شود. کنترل عفونت برای بیماران بسیار سودمند بوده و موجب کاهش میزان مرگ و میر در سرتاسر جهان می‌گردد. تجربه در آزمایشگاه میکروب‌شناسی برای تشخیص باکتری‌های مقاوم، بسیار حیاتی است. بسیاری از باکتری‌ها ممکن است درست تشخیص داده نشوند و در تست‌های آزمایشگاهی به اشتباه مقاوم و یا حساس گزارش شوند که این امر موجب می‌گردد تا بیماران داروهای نامناسب دریافت کرده و باعث انتقال باکتری‌ها به دیگر بیماران شوند. از این‌رو شناسایی باکتری‌های با مقاومت مخفی، ضروری و سنجش‌های مفید برای شناسایی مکانیسم‌های مقاومت نیز مورد نیاز است. مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *کلبسیلا پنومونیه* شامل: بتالاکتامازها، جهش در پورین‌ها، همچنین پمپ‌های ترشحی بوده که پمپ‌های ترشحی به‌عنوان یکی از موارد اصلی دفاع این باکتری در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب می‌شوند (۱۷،۱۶). *qepA*، *acrB* و *acrA* ازجمله مهم‌ترین پمپ‌های ترشحی هستند که در این تحقیق وجود ژن‌های کدکننده آنها به‌عنوان یکی از دلایل مؤثر در بروز مقاومت دارویی در این باکتری مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق، سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* بیشترین حساسیت را به آنتی‌بیوتیک‌های فسفومایسین و تیجیسیکلین و بیشترین مقاومت را به داروی سفپودوکسیم داشتند. همچنین در این مطالعه مقاومت به سفالسپورین‌ها ازجمله سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفپودوکسیم به‌ترتیب ۶۱٪، ۶۴٪ و ۷۰٪ بود که در میان سفالسپورین‌ها، سفتازیدیم آنتی‌بیوتیک نسل سوم، بهترین اثر را داشت. در تحقیقی که شاهچراغی و همکاران (سال ۱۳۸۶) در شهر تهران

انجام دادند، ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به ترتیب ۳۱٪ و ۳۲٪ به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم و سفوتاکسیم مقاوم بودند (۲۴). مقایسه میزان مقاومت در دو مطالعه نشان می‌دهد به مرور زمان به‌علت کسب ژن‌های مقاوم، میزان مقاومت در سال ۲۰۱۳ افزایش یافته است. در این مطالعه، ۴۲٪ مقاومت به جنتامایسین و ۳۳٪ به آمیکاسین گزارش شد. فیض‌آبادی و همکاران (سال ۱۳۸۹) در شهر تهران نشان دادند فقط یک ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به ایمی‌پنم بوده و ۴۴٪ به آمیکاسین و ۲۵٪ به سیپروفلوکساسین مقاوم هستند (۲۵). کاربا‌پنم‌ها ازجمله آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که در برابر ارگانیسم‌های $ESBL^{+}$ پایدارند. در این تحقیق، ۲۳٪ از سویه‌های مورد بررسی به آنتی‌بیوتیک کاربا‌پنم مقاوم بودند. استفاده از کاربا‌پنم‌ها به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی در درمان عفونت‌های ناشی از ارگانیسم‌های واجد ESBL، در تحقیقات علمی دیگر نیز به اثبات رسیده است. به‌عنوان مثال در مطالعه رستگار و همکاران در شهر تهران (سال ۱۳۹۲)، از ۳۵ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* فقط ۱۹ ایزوله (۵۴٪)، مقاوم به ایمی‌پنم بودند (۲۶). همچنین در مطالعه‌ای‌که شاهچراغی و همکاران (سال ۱۳۹۱) در شهر تهران انجام دادند، ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* ۶/۳٪ به مروپنم، ۳٪ به ارتاپنم و ۱/۱٪ مقاوم به ایمی‌پنم بودند (۲۷). در تحقیق رستگار و همکاران نیز میزان مقاومت در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از مطالعه حاضر بیشتر بود که علت آن را می‌توان در نوع نمونه مطرح کرد؛ چراکه نمونه‌های جداشده از بیماران سوختگی، مقاومت بیشتری دارند. باید توجه داشت حساسیت سویه‌ها نسبت به ایمی‌پنم و مروپنم نباید ما را در مصرف و تجویز بی‌رویه این دارو ترغیب کند، چه بسا این‌گونه اقدامات باعث پیدایش و شیوع سوش‌های مقاوم به ایمی‌پنم و مروپنم می‌شود. پمپ‌های ترشحی از عوامل مؤثر در افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون می‌باشند. میکروارگانیسم‌هایی که دارای این پمپ‌ها هستند، باعث افزایش مقاومت دارویی و در نتیجه بیماری‌زایی در بین بیماران شده و جامعه را با خطر جدی مواجه خواهند کرد. بنابراین، تشخیص صحیح آزمایشگاهی، عامل عفونت و انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب، برای جلوگیری از شکست درمان بسیار حایز اهمیت است (۲،۱).

متأسفانه در کشور، بروز مقاومت‌های باکتریایی و عوامل دخیل در افزایش این قبیل مقاومت‌ها، آنچنان که شایسته است مورد بررسی و توجه قرار نگرفته و لذا امروزه شاهد آن هستیم که عفونت‌های بیمارستانی، به‌ویژه عفونت‌های مربوط به *کلبسیلا پنومونیه*، آمار قابل‌توجهی را به خود اختصاص داده‌اند. همچنین در سالهای اخیر، بروز و شیوع پمپ‌های ترشحی افزایش‌یافته و به‌نظر می‌رسد موقعیت جغرافیایی در نحوه پراکنش و توزیع این ژن‌ها مؤثرند؛ زیرا کشورهایی که به لحاظ موقعیت جغرافیایی به کشور نزدیکتر هستند، الگوی نسبتاً مشابهی از نظر توزیع ژن‌های *qepA*، *acrB* و *acrA* نشان می‌دهند (۲۹،۲۸). همچنین سیاست درمانی و بهداشتی بیمارستان‌ها در کشورهای مختلف می‌تواند در توزیع و انتشار ژن‌های فوق‌الذکر تأثیر به‌سزایی داشته باشد. با توجه به مقاومتی که سویه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* در برابر فلوروکینولون‌ها از خود نشان می‌دهند و با در نظرگرفتن اینکه مقاومت این سویه‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها با گذشت زمان افزایش پیدا می‌کند، استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های ناشی از میکروارگانیسم‌ها، همچنین تجویز و ممارست درخصوص استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولونی به جهت تأثیری که در افزایش خطر پیدایش و شیوع ارگانیسم مقاوم به دارو دارند تا حدی شبهه‌برانگیز است و نیاز به بحث‌های دقیق و موشکافانه دارد. در مطالعه‌ای‌که Kim و همکاران (سال ۲۰۰۹)، در کشور کره انجام دادند وجود ژن *qepA* به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت که تنها ۴ مورد (۰/۶٪) از این تعداد، مثبت گزارش شد (۳۰)، این نتایج با مطالعه پژوهش حاضر همخوانی داشت. همچنین در مطالعه Ma و همکاران (سال ۲۰۰۹) که در کشور چین برای تشخیص ژن‌های *qnr*، a*ac(6')-Ib-cr* و *qepA* انجام شد، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای سیپروفلوکسازین و لووفلوکسازین گزارش شد و از مجموع ۱۰۱سویه بررسی‌شده، ۳۵ باکتری (۳۴/۷٪) دارای ژن‌های *qnr*، *aac(6')-Ib-cr* و *qepA* بودند (۳۱). ازجمله معدود مطالعات انجام‌شده در کشور، مربوط به مطالعه پاکزاد و همکاران (سال ۱۳۹۲) می‌باشد که در آن نقش افلاکس پمپ *acrAB* در ۵۲ سویه *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از بیماران دچار سوختگی، بررسی و از روش PCR جهت شناسایی ژن *acrA* در

سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکسازین استفاده شده است، در نتایج این مطالعه مشاهده گردید ۴۰ سویه (۷۶/۹۲٪) از باکتری‌های بررسی‌شده به سیپروفلوکسازین مقاوم بوده و طبق نتایج PCR همه سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکسازین دارای ژن *acrA* بوده‌اند (۳۲). در مطالعه‌ای که توسط Swick و همکاران (سال ۲۰۱۱) در تگزاس انجام شد، ۲۴۱ سویه *اشرشیاکلی* جهت بررسی ارتباط بین پمپ‌های ترشحی با عملکرد فلوروکینولون‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی فلوروکینولون‌ها، MIC انجام شد که با حذف در ژن‌های *acrB* و *acrA* مقدار MIC کاهش یافت. نتیجه به‌دست‌آمده نشان داد افزایش بیان *acrB* و *acrA* به‌طور قطع مرتبط با مقاومت فلوروکینولونی می‌باشد (۳۳).

نتیجه‌گیری

طبق نتایج مطالعه حاضر، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌ویژه در بیمارستان کودکان مفید، بالا بوده است. بنابراین، پیشنهاد می‌شود پزشکان در تجویز دارو، دقت لازم را داشته باشند و نمونه مورد نظر را برای انجام تست آنتی‌بیوگرام به آزمایشگاه ارسال کنند تا به‌عنوان بهترین گزینه دارویی برای بیماران مورد استفاده قرار گیرد. همچنین کارشناسان آزمایشگاه باید بر روی نمونه مورد نظر تست آنتی‌بیوگرام انجام دهند و درضمن باید بتوانند مکانیسم‌های مقاومت به داروها ازجمله پمپ‌های ترشحی را شناسایی و به پزشکان اطلاع دهند. کارکنان آزمایشگاه، پرستاران و کسانی‌که با بیماران در بیمارستان در تماس هستند نیز باید برای وجود این ایزوله‌های مقاوم مورد بررسی قرار گیرند تا درصورتی‌که به این باکتری‌ها آلوده هستند، درمان شوند. همچنین نیاز به اقدامات کنترل عفونت ازجمله مدیریت مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و شناسایی سریع ایزوله‌های مقاوم پیشنهاد می‌گردد.

References:

1. Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, et al. Klebsiella pneumoniae outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence Antimicrob Agents Chemother 2011;55(4):1485–93.
2. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. Korean J Intern Med 2012;27(2):128-42.
3. Garcia-Sureda L, Juan C, Domenech-Sanchez A, Alberti S. Role of Klebsiella pneumoniae LamB Porin in antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother 2011;55(4):1803-5.
4. Luo Y, Yang J, Zhang Y, Ye L, Wang L, Guo L. Prevalence of beta-lactamases and 16S rRNA methylase genes amongst clinical Klebsiella pneumoniae isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance determinants. Int J Antimicrob Agents 2011;37(4):352-5.
5. Roy S, Viswanathan R, Singh AK, Das P, Basu S. Sepsis in neonates due to imipenem-resistant Klebsiella pneumoniae producing NDM-1 in India. J Antimicrob Chemother 2011;66(6):1411-3.
6. Padilla E, Llobet E, Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Bengoechea JA, Alberti S. Klebsiella pneumoniae AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob Agents Chemother 2010;54(1):177-83.
7. Yang J, Ye L, Wang W, Luo Y, Zhang Y, Han L. Diverse prevalence of 16S rRNA methylase genes armA and rmtB amongst clinical multidrug-resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates. Int J Antimicrob Agents 2011;38(4):348-51.
8. Zhou X, Gao J, Huang Y, Fu S, Chen H. Antibiotic resistance pattern of Klebsiella pneumoniae and Enterobacter sakazakii isolates from powdered infant formula. African J Microbiol Res 2011;5(19):867.
9. Maramba-Lazarte CC. Etiology of neonatal sepsis in five urban hospitals in the philippines PIDSP J 2011;12(2):75-85.

10. Lubell Y, Ashley EA, Turner C, Turner P, White NJ. Susceptibility of community-acquired pathogens to antibiotics in Africa and Asia in neonates–an alarmingly short review. Trop Med Int Health 2011;16(2):145-51.

11. Green VL, Verma A, Owens RJ, Phillips SE, Carr SB. Structure of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 (NDM-1). Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 2011;67(Pt 10):1160-4.

12. Jean SS, Hsueh PR. High burden of antimicrobial resistance in Asia. Int J Antimicrob Agents 2011;37(4):291-5.

13. Fernandez A, Pereira MJ, Suarez JM, Poza M, Trevino M, Villalon P, et al. Emergence in Spain of a multidrug-resistant Enterobacter cloacae clinical isolate producing SFO-1 extended-spectrum beta-lactamase. J Clin Microbiol 2011;49(3):822-8.

14. Tseng SH, Lee CM, Lin TY, Chang SC, Chang FY. Emergence and spread of multi-drug resistant organisms: think globally and act locally. J Microbiol Immunol Infect 2011;44(3):157-65.

15. Lye DC, Kwa AL, Chlebicki P. World health day 2011: Antimicrobial resistance and practical solutions. Ann Acad Med Singapore 2011;40(4):156-7.

16. Pages J-M, Lavigne J-P, Leflon-Guibout V, Marcon E, Bert F, Noussair L, et al. Efflux pump, the masked side of ß-Lactam resistance in Klebsiella pneumoniae clinical isolates. PLoS One 2009;4(3):e4817.

17. Kumar V, Sun P, Vamathevan J, Li Y, Ingraham K, Palmer L, et al. Comparative genomics of Klebsiella pneumoniae strains with different antibiotic resistance profiles. Antimicrob Agents Chemother 2011;55(9):4267-76.

18. Wang D, Wang H, Qi Y, Liang Y, Zhang J, Yu L. Characteristics of Klebsiella pneumoniae harboring QnrB32, Aac (6')-Ib-cr, GyrA and CTX-M-22 genes. Folia Histochem Cytobiol 2012;50(1):68-74.

19. 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 Chemother 2009;53(2):639-45.

20. Ma J, Zeng Z, Chen Z, Xu X, Wang X, Deng Y, et al. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr, aac (6′)-Ib-cr, and qepA among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. Antimicrob Agents Chemother 2009;53(2):519-24.

21. Pasom W, Chanawong A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Kenprom S, Puang-Ngern P. Plasmid-mediated quinolone resistance genes, aac (6′)-Ib-cr, qnrS, qnrB, and qnrA, in urinary isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae at a Teaching Hospital, Thailand. Jpn J Infect Dis 2013;66(5):428-32.

22. Bratu S, Landman D, George A, Salvani J, Quale J. Correlation of the expression of acrB and the regulatory genes marA, soxS and ramA with antimicrobial resistance in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae endemic to New York City. J Antimicrob Chemother 2009;64(2):278-83.

23. Heidary M, Bahramian A, Hashemi A, Goudarzi M, Omrani VF, Eslami G, et al. Detection of acr A, acr B, aac (6′)-Ib-cr, and qep A genes among clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 2016(In press).

24. Shahcheraghi F, Moezi H, Feizabadi MM. Distribution of TEM and SHV beta-lactamase genes among Klebsiella pneumoniae strains isolated from patients in Tehran. Med Sci Monit 2007;13(11):BR247-250.

25. Feizabadi MM, Mahamadi-Yeganeh S, Mirsalehian A, Mirafshar SM, Mahboobi M, et al. Genetic characterization of ESBL producing strains of Klebsiella pneumoniae from Tehran hospitals. J Infect Dev Ctries 2010;4(10):609-15.

26. Rastegar Lari A, Azimi L, Rahbar M, Fallah F, Alaghehbandan R. Phenotypic detection of Klebsiella pneumoniae carbapenemase among burns patients: First report from Iran. Burns 2013;39(1):174-6.

27. Shahcheraghi F, Nobari S, Rahmati Ghezelgeh F, Nasiri S, Owlia P, Nikbin VS, et al. First report of New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing Klebsiella pneumoniae in Iran. Microb Drug Resist 2013;19(1):30-6.

28. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother 2005;56(3):463-9.

29. Andres P, Lucero C, Soler-Bistué A, Guerriero L, Albornoz E, Tran T, et al. Differential distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical enterobacteria with unusual phenotypes of quinolone susceptibility from Argentina. Antimicrob Agents Chemother 2013;57(6):2467-75.

30. Kim ES, Jeong JY, Choi SH, Lee SO, Kim SH, Kim MN, et al. Plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump gene, qep A, in Escherichia coli clinical isolates in Korea. Diagn Microbiol Infect Dis 2009;65(3):335-8.

31. Ma J, Zeng Z, Chen Z, Xu X, Wang X, Deng Y, et al. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr, aac (6′)-Ib-cr, and qep A among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. Antimicrob Agents Chemother 2009;53(2):519–24.

32. Pakzad I, Karin MZ, Taherikalani M, Boustanshenas M, Lari AR. Contribution of AcrAB efflux pump to ciprofloxacin resistance in Klebsiella pneumoniae isolated from burn patients. GMS Hyg Infect Control 2013;8(2).

33. Swick MC, Morgan-Linnell SK, Carlson KM, Zechiedrich L. Expression of multidrug efflux pump genes acr AB-tolC, mdfA, and norE in Escherichia coli clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. Antimicrob Agents Chemother 2011;55(2):921-4.

Original Article

Prevalence of Genes Encoding AcrAB and QepA Efflux Pumps among Klebsiella pneumoniae Strains Isolated from Patients Hospitalized in Selected Hospitals in Tehran City, Iran

Mohsen Heidari[1*], Hossein Goudarzi[1], Ali Hashemi[1], Gita Eslami[1], Saeed Khoshnood[2], Shokouh Amraei[1]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[2]Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Corresponding Author:
Mohsen Heidari,
Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email:
mohsenheidary40@gmail.com

Received: 2 Jan, 2016

Accepted: 7 Apr, 2016

Abstract

***Background and Objectives*:** Increasing emergence of fluoroquinolone resistance among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae (K. pneumoniae)*, has limited the treatment options for treatment of infections caused by these bacteria. The aim of this study was to investigate the dissemination of genes encoding AcrAB and QepA efflux pumps among *K. pneumoniae* strains.

***Methods*:** This study was carried out on 117 *K. pneumoniae* strains isolated from patients hospitalized in selected hospitals in Tehran city, 2015-2016, Iran. Antimicrobial susceptibility tests were performed using disk diffusion method (based on CLSI guidelines) and identification of *acr A*, *acr B* and *qep A* genes using PCR assay.

***Results*:** In this study, colistin and tigecycline had the best effect against clinical isolates of *K. pneumoniae*. According to PCR results, 110 (94%) isolates had *acrA* gene and 102 (87%) isolates had *acrB* gene, respectively. The *qepA* gene was not found in any of the *K. pneumonia*e strains.

***Conclusion*:** According to the results of the present study, dissemination of the genes encoding AcrAB efflux pumps among *K. pneumoniae* strains, which cause resistance to fluoroquinolones, is a matter of concern. Therefore, infection control and prevention of the spread of drug-resistant bacteria requires careful management in drug prescription and identification of resistant isolates.

***Keywords*:** *Klebsiella pneumonia;* AcrAB efflux pump; Fluoroquinolones; Microbial sensitivity tests.