تعیین فراوانی ژن *oqxA* در *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از عفونت‌ها، در یکی از آزمایشگاه‌های تهران

فاطمه اشرفی* ؛شهلا محمدگنجی**؛ سیدمعین حسینی***

چکیده

مقاومت آنتی بیوتیکی همواره به عنوان مشکلی جدی برای سلامت انسان مطرح است. یکی از باکتری‌های مطرح در این بین کلبسیلا پنومونیه می‌باشد که متاسفانه نسبت به آنتی بیوتیک‌ها مقاومت زیادی از خود نشان می‌دهد. پمپ oqxAB یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی بیوتیکی در این دسته از باکتری‌ها است. هدف از این بررسی، مطالعه وجود ژن *oqxA* در کلبسیلا پنومونیه جداشده از عفونت‌های مجاری ادراری و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آن‌ها در یکی از آزمایشگاه‌های تهران می‌باشد.

در این مطالعه، از ۲۵۰ بیمار سرپایی مراجعه کننده به یکی از آزمایشگاه‌های استان تهران نمونه‌برداری و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از کشت، ۱۰۰ باکتری، کلبسیلا پنومونیه شناسایی و جداسازی شد. DNA توسط کیت سیناژن استخراج و فراوانی ژن *oqxA* با روش PCR بررسی گردید.

نتایج تست‌های میکروبی و بیوشیمیایی نشان داد که جدایه‌ها همگی کلبسیلا پنومونیه بود.PCR گویای آن است که از بین ۱۰۰ جدایهٔ کلبسیلا پنومونیه، ۵۰ % از نمونه‌ها دارای ژن *oqxA* بود.

پمپ‌های افلاکس OqxAB یکی از راه‌های مقابله با مقاومت آنتی بیوتیکی است که اهمیت زیادی دارد؛ زیرا در صورت عدم کنترل کلبسیلا پنومونیه‌های مقاوم به دارو، مشکلات جسمی و اقتصادی زیادی به بیماران و سیستم سلامت تحمیل می‌شود.

واژگان کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، عفونت ادراری، ژن *oqxA*.

* استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران ـ قم، دانشکده علوم پایه گروه میکروبیولوژی (shahlamg@yahoo.com).

** استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی.

*** دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی.

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه[1] شایع‌ترین گونه در بین سایر گونه‌های جنس کلبسیلا است که باسیل گرم منفی میله‌ای شکل، غیر متحرک دارای کپسول پلی ساکاریدی و تخمیرکنندهٔ لاکتوز و گلوکز است. این باکتری یکی از موارد مهم عفونت‌های اکتسابی از جامعه و بیمارستان و شایع‌ترین پاتوژن‌های بیمارستانی است که میزان مرگ و میر ناشی از آن بالا می‌باشد (۱و۲). این باکتری باعث انواع مختلفی از عفونت‌ها، به‌ویژه در نوزادان شده و موجب پنومونی، سپتی سمی، اسهال، عفونت‌های ادراری و باکتریمی می‌گردد (۳ و ٤). درمان عفونت‌های بیمارستانی با توجه به مقاومت اغلب جدایه‌ها میکروبی بسیار مشکل و به علت طولانی شدن زمان بستری بیماران، بسیار پرهزینه می‌باشد بر اساس گزارش‌های انتشار یافته، کلبسیلا پنومونیه یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های بیمارستانی است. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که اغلب جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه نسبت به اکثر آنتی بیوتیک‌هامقاوم شده‌اند و این جدایه‌های مقاوم به چند دارو، به سرعت در بین بیماران بستری در بیمارستان درحال گسترش می‌باشند که می‌تواند درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری را با مشکل مواجه کند. توانایی این ارگانیسم برای دستیابی به مکانیسم‌های متفاوتی از مقاومت آنتی بیوتیکی و نیز مقاوم شدن بعضی از سویه‌ها به اغلب آنتی بیوتیک‌های رایج و همچنین فقدان داروهای ضدمیکروبی جدید و مؤثر، از مهم‌ترین علت‌های ایجاد کننده خطر توسط این باکتری می‌باشند(۵و٦).

افزایش ظهور مقاومت چند دارویی در بین ایزوله‌های بیمارستانی کلبسیلا پنومونیه، گزینه‌های درمانی را برای درمان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این باکتری محدود کرده است(۷). بیش‌تر ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به چندین دارو مقاوم می‌باشند. پمپ‌های افلاکس در مقاومت دارویی کلبسیلا پنومونیه داری نقش مهمی است. در بین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی بیوتیک، پمپ‌های ترشحی oqxAB موجب مقاومت به فلوروکینولون‌ها می‌شوند. فلوروکینولون‌ها به طور مؤثری بر علیه باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند(۸).

به طور کلی مقاومت دارویی کلبسیلا پنومونیه روز به روز افزوده می‌شود. بنابراین، اجرای تست‌های مقاومت دارویی، قبل از تجویز آنتی بیوتیک، ضروری به نظر می‌رسد. یکی از اهداف این مطالعه، تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی گونه‌های کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های بالینی بیماران است. هم‌چنین از آن‌جا که افزایش بیان سیستم‌های افلاکس دارای نقش مهمی در مقاومت آنتی بیوتیکی است؛ هدف از این مطالعه بررسی حضور ژن *oqxA* جزو پمپ افلاکس oqxAB در ایجاد مقاومت کلبسیلا پنومونیه و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آن می‌باشد.

[1]. klebsiella pneumonia

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، ۲۰۰ بیمار مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به یکی از آزمایشگاه‌های شهر تهران، مورد بررسی قرار گرفت. همه ایشان پرسشنامه تخصصی و رضایت نامه شرکت در این مطالعه را پر کردند. نمونه ادرار همه بیماران مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که کشت داده شد و سویه‌های کلبسیلا پنومونیه از آن‌ها جداسازی گردید. این سویه‌ها توسط آزمایش‌های انتخابی و افتراقی مورد تأیید قرار گرفتند. سپس از این باکتری‌ها توسط روش جوشاندن DNA استخراج شد. DNA استخراج شده با تست‌های الکتروفورز آگارز و اسپکتروفتومتری مورد بررسی کیفی و کمی قرار گرفت. در ادامه پرایمر اختصاصی برای ژن مورد نظر طراحی و به شرکت ژن فناوران سفارش داده شد تا سنتز شود. توالی مربوط به این ژن به شرح زیر است: ۳- F:۵'- ACATTCACCTGACCGCGC و R:۵'- GGCATACCCGGCATAAACAC -۳'.

آزمایش PCR با پرایمر اختصاصی با مستر میکس Amplicon دانمارک انجام گردید. برای اجرای PCR، مواد زیر با میزان مشخص شده در یک میکروتیوب ریخته شد. سپس ۱۰ میکرو لیتر محتویات ویال را خوب مخلوط کرده و اسپین می‌کنیم. DNA الگو با غلظت ۱۰۰۰ng/ µl: ۰/۵ µl، ۰/۵ µl از هر یک از پرایمرهای F و R با غلظت ۱۰ µM، ۵ µl از Taq DNA Polymerase ۲x Master Mix Red ، و ۳/۵ µl آب مقطر استریل. سپس میکروتیوب‌ها در برنامه‌ای بر اساس دمای اتصال آن‌ها به الگو تنظیم شد. برنامه دمایی بهینه شده برای این ژن به صورت زیر بود: یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه، ۲۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجهٔ سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۹۰ ثانیه و سیکل نهایی ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه. شناسایی محصولات PCR با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵% و سپس رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، در بافر TBE و زیرنور UV صورت گرفت و کیفیت محصول PCR از نظر وجود یا عدم باند با آزمایش الکتروفورز آگارز بررسی شد.

در نهایت توسط نرم افزار spss v۲۱ و آزمون‌های آماری Independent t test sample و Fisher Exact test انجام شد و در مواردی که سطح احتمال از ۰/۰۵ کم‌تر بود، P-value معنادار معرفی گردید.

نتایج

در این تحقیق، ۲۵۰ نمونه ادراری از بیماران سرپایی مراجعه کننده به یکی از آزمایشگاه‌های تهران از دی ماه ۱۳۹۴تا فروردین ۱۳۹۵ جمع‌آوری شد. از این تعداد، ۱۰۰ نمونه باکتری مربوط به کلبسیلا پنومونیه بودند. درصد فراوانی نمونه‌ها از لحاظ جنسیت، ۵۰% به مردان و ۵۰% درصد به زنان مربوط بود. پس از کشت نمونه‌های

ادراری در محیط EMB و بلاد آگار کلنی‌هایی که از لحاظ ظاهری به کلبسیلا پنومونیه نزدیک‌تر بودند، روی آن‌ها رنگ‌آ میزی گرم صورت گرفت. آن‌هایی که در رنگ آمیزی به صورت باسیل‌های گرم منفی دیده می‌شدند، در مرحله اول به صورت کلبسیلا پنومونیه در نظر گرفته شدند. در مرحله بعد به منظور تعیین هویت باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه بر اساس روش‌های استاندارد بیوشیمیایی افتراقی میکروب شناسی، از جمله آزمون‌های اکسیداز، کشت بر روی محیط TSI، آزمون‌های متیل رد و ووگس پروسکوئر، آزمون TSI، سیترات، اوره، لیزین دکربوکسیلاز صورت گرفت. نتایج صفات بیوشیمیایی عبارت بود از جواب منفی برای تست‌های متیل رد، اکسیداز وSIM و جواب مثبت برای تست‌های VP، لیزین دکربوکسیلاز و سیترات که دال بر تأیید کلبسیلا پنومونیه می‌باشد.

نتایج بررسی ژن OqxA باروش PCR

در بررسی محصول PCR در ژل اگارز ۱% در چاهک نمونه کنترل منفی (آب مقطر بدون DNA) هیچ‌گونه باندی دیده نشد و در چاهک نمونه کنترل مثبت دارای ژن *OqxA*، باند خوبی مشاهده شد. به منظور بررسی حضور ژن *OqxA*در جدایه‌ها ی مورد بررسی، DNA های تخلیص شده از جدایه‌ها، همراه پرایمرهای *OqxA* درواکنش وارد گردید و نتایج مثبت به صورت باند واضحی به طول ۱۱۰۲ جفت باز در الکتروفورز مشاهده شد. ازبین ۱۰۰ جدایه، ۵۰ جدایه دارای ژن *OqxA* (۵۰%) بودند.

بحث

نتایج مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد که از بین ۱۰۰ جدایهٔ کلبسیلا پنومونیه، ۵۰% دارای ژن *oqxA* بود. جست‌وجوهای اینترنتی نشان داد که مطالعات بیش‌تری در داخل کشور و خارج از کشور توسط محققان انجام شده است که در زیر به برخی از گزارش‌های مهم اشاره می‌شود:

در مطالعه علی هاشمی و همکاران در سال ۱۳۹۳ بر روی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه، نتایج PCR ژن‌های *oqxA* و *oqxB*، شیوع هر دو ژن در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه را۵۰ %نشان داد (۹).

در تحقیقی که جینیی یوآن و همکاران در سال ۲۰۱۲ در کشور چین با هدف بررسی ژن پمپ افلاکس oqxAB در نمونه‌های بالینی جدا شده از کلبسیلا پنومونیه توسط روش PCR انجام دادند، تمام طول ژن oqxAB تعیین توالی شد. از ۱۵٤ نمونهٔ کلبسیلا پنومونیه، ٦٦/۹% غیرحساس به سیپروفلوکساسین و ۵۰/۷ % درصد غیرحساس به لووفلوکساسین بودند. در مطالعهٔ ما به طور ۱۰۰% به سیپروفلوکساسین حساس بودند. ژن‌های oqxA و oqxB در تمامی نمونه‌ها حضور داشتند؛ در نتیجه شناسایی ژنوم کلبسیلا پنومونیه به عنوان یک مخزن

برای oqxAB بود (۱۰). در مطالعه‌ای که توسط لیو و همکاران در سال ۲۰۱۲ در کشور چین بر روی ۲۱۵ نمونه حاوی پمپ‌های oqxAB انجام شد، ۱۱۷ نمونه، به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و شیوع این پمپ‌ها در ایزوله‌های حساس به سیپروفلوکساسین ۳۰/۹% و در ایزوله‌های مقاوم ٤٧/٦% بود. (۱۱). مطالعه‌ای توسط رودریگوئز مارتینز و همکاران در سال ۲۰۱۳ در کشور اسپانیا، بر روی ۱۱٤ ایزوله با هدف تجزیه وتحلیل حضور ژن‌های oqxA و oqxB در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و تجزیه و تحلیل سطح بیان در مورد حساسیت به کینولون انجام شد؛ شیوع هر دو ژن با استفاده از روش PCR به ترتیب ۷٦ و ۷۵% بود. میزان بیان ژن oqxA در نمونه‌های با کاهش حساسیت به سیپروفلوکساسین چهار برابر بیش‌تر از ایزوله‌های حساس به این آنتی بیوتیک بود(۱۲). مطالعه‌ای درسال ۲۰۱۵ توسط سان و همکارانش در بیمارستان هنگ کنگ به منظور ارزیابی و انتشار پمپ افلاکس oqxAB و مقاومت به کینولون در انتروباکتریاسه‌ها صورت گرفت؛ از ۸۵ نمونه بالینی جداشده از کلبسیلا پنومونیه، ۱۵ سویه از لحاظ حضور پمپ افلاکس oqxAB، مثبت بودند. همچنین از ۸۵ سویهٔ بالینی جداشده، ۱٤ نمونه به سیپروفلوکساسین و ۲۸ نمونه به نالیدیک اسید مقاوم بودند(۱۳). در مطالعه‌ای که از سوی لیو و همکاران در سال ۲۰۱۱ در کشور چین بر روی نمونه‌های اشریشیاکلی انجام شد، یک ایزوله اشریشیاکلی دارای ژن‌های oqxA و oqxB بودند(۲). های گین ژنگ وهمکارانش در سال ۲۰۱۳ بر روی مقاومت به سیپروفلوکساسین ناشی از فعالیت پمپ افلاکس از کلبسیلا پنومونیه مطالعاتی انجام دادند. آنان در مطالعهٔ خود عنوان کردند پمپ افلاکس یکی از مکانیسم‌های اصلی مقاومت آنتی بیوتیکی در کلبسیلا پنومونیه است. مقاومت به سیپروفلوکساسین را در حضور و عدم مهار کننده پمپ افلاکس بررسی کردند. در حضور این مهارکننده، مقاومت ۵۰% از باکتری‌ها، ۲تا٤ برابر از غیاب این بازدارنده کم‌تر بود(۱٤).

به طور کلی حضور پمپ OqxAB در کشور کره جنوبي٠/٤%، در کشور سوئد ۱/۸% و در چین ۷٦% بود (۱۲و ۱۵). به طور کلی ۷۱% از نمونه‌ها در مطالعهٔ ما، یا دارای ژن oqxA ویا ژن oqxB ویا هر دو ژن ژن oqxB و oqxA (پمپOqxAB) بودند که با فاصلهٔ بسیار کم فقط از کشور چین کم‌تر بود.

این تحقیق، نگرشی مختصر به تعیین فراوانی ژن oqxA در کلبسیلا پنومونیه جدا شده از عفونت‌ها بود؛ در حالی‌که راه‌های مقابله با مقاومت آنتی بیوتیکی، از جمله پمپ‌های افلاکس OqxAB و سایر پمپ‌های افلاکس همواره پرسش‌هایی را در بر داشته، که لازم است سایر محققان در تحقیقات بعدی، به دنبال پاسخ آن‌ها باشند تا راهی قطعی برای درمان آن ارائه شود.

منابع

۱. Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, Siu LK. ۲۰۱۱. Klebsiella pneumoniae outer membrane Porins OmpK۳۵ and OmpK۳۶ play roles in both antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob Agents Chemother, ۵۵(۴):۱۴۸۵-۹۳.

۲. Liu BT, Wang XM, Liao XP, Sun J, Zhu HQ, Chen XY, et al. ۲۰۱۱. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants oqxAB and aac(۶')-Ib-cr and extended-spectrum beta-lactamase gene blaCTX-M-۲۴ co-located on the same plasmid in one Escherichia coli strain from China. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, ۶۶(۷):۱۶۳۸-۹.

۳. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. ۲۰۱۰. Klebsiella pneumonia AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob Agents Chemother , ۵۴(۱):۱۷۷-۸۳.

۴. Roy S, Viswanathan R, Singh AK, Das P, Basu S. ۲۰۱۱. Sepsis in neonates due to imipenem-resistant klebsiella pneumoniae producing NDM-۱ in India. J Antimicrob Chemother, ۶۶(۶):۱۴۱۱-۳.

۵. Jala pour A., ۱۳۹۰. Antibiotic resistance patterns Antibacterial pneumonia strains produce broad-spectrum antibodies that are isolated from patients with disease infections. Journal of Isfahan Medical School. ۲۹(۲): ۱۴۲.

۶. Kaye KS, Kaye D. ۲۰۰۵. Multidrug-resistant pathogens: Mechanisms of resistance and epidemiology. Current Infectious Disease Reports, ۲(۵): ۳۹۱-۸.

۷. García-Sureda L, Juan C, Doménech-Sánchez A, Albertí S. ۲۰۱۱. Role of klebsiella pneumoniae LamB Porin in antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother, ۵۵(۴):۱۸۰۳-۵.

۸. Nordmann P, Naas T, Poirel L. ۲۰۱۱. Global spread of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis , ۱۷(۱۰):۱۷۹۱-۸.

۹. Hasjemi A. Fallah F, Taher pour A. ۱۳۹۳. Study of genetic pattern and role of oqxA pump in Klebsiella pneumoniae isolates. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. ۲۴(۱۱۹): ۴۸-۶۱.

۱۰. Yuan J, Xu X, Guo Q, Zhao X, Ye X, Guo Y, et al. ۲۰۱۲. Prevalence of the oqxAB gene complex in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli clinical isolates. Journal of Antimicrobial Chemotherap, ۶۷(۷):۱۶۵۵-۹.

۱۱. Liu BT, Liao XP, Yang SS, Wang XM, Li LL, Sun J, et al. ۲۰۱۲. Detection of mutations in the gyrA and parC genes in Escherichia coli isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance genes from diseased food-producing animals. Journal of Medical Microbiology, ۶۱(Pt ۱۱):۱۵۹۱-۹.

۱۲. Rodriguez-Martinez JM, Diaz de Alba P, Briales A, Machuca J, Lossa M, Fernandez-Cuenca F, et al. ۲۰۱۳. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, ۶۸(۱):۶۸-۷۳.

۱۳. Sun J, Deng Z, Yan A. ۲۰۱۵. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. Biochemical and Biophysical Research ommunications, ۱۱;۴۶۵(۱):۱۶۵.

۱۴. Zhong HQ, Zhang S, Pan H, Cai T. ۲۰۱۳. Influence of induced ciprofloxacin resistance on efflux pump activity of Klebsiella pneumoniae. J Zhejiang Univ Sci B, ۱۴(۹):۸۳۷-۴۳.

۱۵. Zhao J, Chen Z, Chen S, Deng Y, Liu Y, Tian W, et al. ۲۰۱۰. Prevalence and dissemination of oqxAB in Escherichia coli isolates from animals, farmworkers, and the environment Antimicrob Agents Chemother ,۵۴(۱۰): ۴۲۱۹-۴۲۲۴.