



در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به فلوروکینولون ها *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* فراوانی ژن های

جدا شده از موارد کلینیکی

نادیه همه خانی^۱، حسین خدابنده^{۱*}

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخچه مقاله: دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۲۴ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۳۱ چاپ: تابستان ۱۴۰۴ DOI: کلمات کلیدی: فلوروکینولون ها، کلبسیلا پنومونیه، مقاومت آنتی بیوتیکی * نویسنده مسئول: Email: Hossein.khodabandeh.sh@gmail.com	جنس کلبسیلا از مهم ترین باکتری های روده ایی فرصت طلب است و علاوه بر این که می تواند عفونت های ریوی ایجاد نماید، در نقاط دیگر بدن هم عفونت به وجود آورده و باعث عفونت های بیمارستانی نیز می گردد. کلبسیلا پنومونیه به دلیل اکتساب پلاسمیدهایی که تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف را کد می کنند به تعدادی از آنتی بیوتیک ها از جمله سفالوسپورین های وسیع الطیف مقاوم شده اند. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی ژن های <i>qnrA</i>, <i>qnrB</i>, <i>qnrS</i> در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به فلوروکینولون ها جدا شده از عفونت های بیمارستانی شهرستان شهرکرد است. مطالعه ی حاضر بر روی ۵۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جدا شده از موارد کلینیکی شهرستان شهرکرد صورت گرفت، پس از تایید تشخیص باکتری های جدا شده با روش های بیوشیمیایی به روش مولکولی نیز تایید شدند. مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های مورد بررسی به آنتی بیوتیک های نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین مورد بررسی قرار گرفت. سپس در حضور پرایمرهای اختصاصی فراوانی ژن های <i>qnrA</i>, <i>qnrB</i>, <i>qnrS</i> مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید ۵۲ درصد، مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین ۲۸ درصد و مقاومت نسبت به نورفلوکساسین ۳۴ درصد گزارش گردید. هم چنین فراوانی ژن <i>qnrA</i>، ۱۵/۳۸ درصد، ژن <i>qnrB</i>، ۱۹/۲۳ درصد و ژن <i>qnrS</i> ۲۶/۹۲ درصد گزارش گردید. ظهور مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها موضوعی است که باید جدی گرفته شده و لذا ارزیابی مستمر باکتریولوژی و خط صحیح درمان و استفاده ی مناسب از دیسک های آنتی بیوگرام در آزمایشگاه باید انجام گیرد.

مقدمه

افزایش ظهور مقاومت چند دارویی در بین ایزوله‌های پاتوژن بیمارستانی اخیرا بسیار قابل توجه گردیده است. از جمله این پاتوژن‌های بیمارستانی می‌توان کلبسیلا پنومونیه را نام برد که گزینه‌های درمانی را برای درمان عفونت‌های ایجاد شده به‌وسیله این باکتری محدود کرده است (۲،۱). باکتری‌های جنس کلبسیلا پاتوژن‌های فرصت طلبی از خانواده انتروباکتریاسه هستند که مسئول ۱۰ درصد عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند و موجب سستی سمی، باکتریمی، آنتریت نوزادان، مننژیت و عفونت‌های دستگاه ادراری و بافت‌های نرم به ویژه نوزادان می‌شوند (۳). نوزادان به دلیل نداشتن سیستم ایمنی کامل آسیب پذیرتر هستند و درمان عفونت‌های نوزادان آلوده به ارگانیسم‌های مقاوم به چندین دارو، تبدیل به یک مشکل جدی شده است (۵،۴). کلبسیلا پنومونیه مقاومت بالایی در برابر آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام و آمینوگلیکوزیدها نشان داده است. مقاومت ضد میکروبی همواره به عنوان یک مشکل جدی برای سلامت انسان مطرح بوده است از این رو سازمان بهداشت جهانی سال ۲۰۱۱ را به عنوان سال مقاومت آنتی بیوتیکی نامیده، هم چنین این سازمان در نظر گرفتن موارد مهمی مانند ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی، استفاده صحیح از آنتی بیوتیک‌ها، فروش آنتی بیوتیک‌ها فقط با نسخه پزشک پیشگیری و کنترل عفونت را جهت کنترل و جلوگیری از مقاومت آنتی بیوتیکی به دولت‌ها توصیه نموده است (۶،۷). استفاده مداوم از آنتی بیوتیک‌ها باعث بروز مقاومت‌های نسبت به آنتی بیوتیک‌ها و باکتری‌های گرم منفی به ویژه کلبسیلا پنومونیه گردیده است (۸). ژن‌های مقاومت به کینولون که بر روی پلاسمید حمل می‌شوند در ۵ کلاس دسته بندی می‌شوند *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* این ژن‌ها پروتئین‌هایی را کد می‌نمایند که باعث جلوگیری از اتصال فلوروکینولون‌ها به توپوایزومراز

II و در نتیجه مهار فلوروکینولون‌ها می‌شوند. مهم ترین ژن‌های مقاومت کلبسیلا پنومونیه به کینولون شامل *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* می‌باشد. بررسی و پیگیری مداوم روند گسترش ژن‌های *qnr* به شناخت وضعیت مقاومت دارویی مربوط به این دسته از ژن‌ها کمک کرده (۹) که علاوه بر اعلان خطر، باعث یافتن راه‌های هوشمندانه تر جهت انتخاب داروی مناسب از طرف پزشک برای درمان بیماران آلوده می‌نمایند. ژن مقاومت به کینولون پلاسمید واسطه (PMQR) نه تنها نقش مهمی در مقاومت کینولون بازی بلکه مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌های دیگر به خصوص بتالاکتاماز و آمینوگلیکوزیدها نشان داده است این ژن‌ها به طور عمده با سویه‌های بالینی انتروباکتریاسه همراه است. هم چنین نشان داده شده است که باکتری کلبسیلا پنومونیه به طور فزاینده ای مقاومت هم‌زمان نسبت به کینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها دارد و این عوامل مقاومت، بر روی پلاسمیدهایی وجود دارند که می‌توانند به وسیله کونژوگاسیون به دیگر سویه‌ها نیز انتقال یابند (۱۱). کینولون‌ها فعالیت DNA توپوایزومراز نوع II (DNA ژیراز) یا DNA توپوایزومراز نوع IV (که برای همانندسازی DNA، نوترکیبی و ترمیم مورد نیاز هستند) را مهار می‌کنند. در باکتری‌های گرم منفی زیر واحد A از DNA ژیراز هدف اصلی کینولون بوده در حالی‌که در باکتری‌های گرم مثبت هدف اصلی کینولون‌ها توپوایزومراز نوع IV می‌باشد تغییر در دو حلقه مرکزی کینولون موجب تولید کینولون‌های جدیدتر شده که تحت عنوان فلوروکینولون‌ها مطرح می‌باشند. فلوروکینولون‌ها به‌طور موفقیت آمیزی برای درمان شیگلوزیس و عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم به چند آنتی بیوتیک استفاده می‌شوند. جهش در ژن *gyrA* و حمل ژن *qnr* از مکانیسم‌های اصلی ایجاد مقاومت کینولونی در سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون به شمار می‌روند. فلوروکینولون‌ها از آنتی بیوتیک‌های قوی با طیف گسترده

می‌باشند که برای عفونت‌های کسب شده از جامعه و عفونت‌های بیمارستانی از جمله عفونت‌های ناشی از باکتری‌های تولید کننده ESBL قرار مورد استفاده می‌گیرند. یکی از مکانیسم‌های مقاومت که برای اولین بار در سال ۱۹۹۸ در کلبسیلا پنومونیه مورد شناسایی قرار گرفت. مقاومت فلوروکینولون‌ها با واسطه پلاسمید (*qnrA*) می‌باشد که سبب کد کردن پروتئین می‌گردد که باعث محافظت DNA ژیراز در برابر فلونئوروکینولون‌ها می‌گردد. بعد از آن دو ژن دیگر مولد مقاومت موسوم به *qnrB*, *qnrS* مورد شناسایی قرار گرفت که ۴۰ درصد و ۵۹ درصد از اسیدهای آمینه مورد شناسایی آن‌ها با *qnrA* مشترک بود (۱۲). ژن‌های قابل انتقال *qnr* معمولاً توسط پلاسمیدهای کونژوگاتیو با اندازه ۱۸۰-۵۰ کیلو باز که اغلب ژن‌های بتالاکتاماز با طیف گسترده را نیز حمل می‌شود (۱۳). در حقیقت در مطالعات اپیدمیولوژیکی در ارتباط با گسترش ژن *qnr* نشان داده است که سویه‌های مثبت از نظر *qnr* غالباً ESBL را هم بیان می‌کنند (۱۴). در ایران به دلیل استفاده خودسرانه و بیش از حد دارو توسط بیماران، مقاومت دارویی به شدت و به نحو غیرقابل کنترلی افزایش یافته است و متأسفانه اطلاعات اندکی در این زمینه وجود دارد با توجه به شیوع باکتری‌های مولد *qnr* و فقدان اطلاعات لازم در منطقه و اهمیت ارگانیزم‌های مقاوم به فلونئوروکینولون‌ها پرداختن به آن‌ها ضروری است. استفاده از یافته‌های این تحقیق به منظور شناسایی و تعیین وضعیت مقاومت کلبسیلا پنومونیه به فلوروکینولون‌ها و انتخاب صحیح آنتی بیوتیک‌ها برای بیماران درگیر با عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌باشد (۱۵).

روش کار:

نمونه‌های مورد بررسی در این تحقیق از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از ۲۵۰ مورد کلینیکی مختلف شامل: ادرار، ترشحات چشم و کشت خون در افراد مراجعه

کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان شهرکرد صورت گرفت که در طی حدود ۶ ماه جمع آوری شده اند. پس از جداسازی باکتری کلبسیلا پنومونیه در محیط کشت اختصاصی، تشخیص نوع باکتری توسط آزمون‌های بیوشیمیایی صورت گرفت و باکتری از طریق آزمون PCR تعیین هویت شد. به منظور شناسایی باکتری نمونه ی مورد نظر بر روی محیط‌های سالمونلا شیگلا آگار و مک کانکی آگار کشت داده شد. کلنی‌های رشد یافته از نظر رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل چگونگی تخمیر قندها در محیط سه قندی، مک کانکی، سالمونلا شیگلا آگار هم-چنین دکربوکسیلاسیون اسید آمینه لایزین در محیط لایزین آیرون آگار، تولید اندول، عدم حرکت در محیط SIM و واکنش در محیط MRVP broth، رشد در محیط سیمون سترات و اوره آگار و در نهایت بررسی نتایج با استفاده از جداول استاندارد شناسایی گردیدند (۱۶).

برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها از روش کربی بایر بر طبق دستور العمل CLSI (مدرج در راهنمای ارایه شده توسط شرکت پادتن طب) استفاده شد. در این تحقیق از سویه ی استاندارد از کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (۱۷).

آزمایشات مولکولی

استخراج DNA

به منظور تشخیص قطعی و بررسی فراوانی ژن‌های *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* مراحل استخراج DNA با روش جوشاندن^۱ بر روی کلنی‌های رشد کرده، صورت گرفت. برای این منظور کشت یک شبه باکتری در محیط پپتون واتر ساخت شرکت مرک آلمان، به عنوان منبع برای استخراج

^۱ - Boiling

نانومتر میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید. نمونه DNAهایی که دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم بودند جهت مراحل بعدی و انجام آزمایش PCR انتخاب گردیدند.

تایید ایزوله‌ها با استفاده از PCR

بعد از استخراج DNA با استفاده از زوج پرایمرهای طراحی شده مربوط به ژن *16srRNA* کلبسیلا پنومونیه که در جدول نشان داده شده است، به تشخیص قطعی ایزوله‌ها پرداخته شد. در این تحقیق از سویه استاندارد از کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 (تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

DNA، مورد استفاده قرار گرفت. برای این کار ۱۲۰ ماکرولیتتر از محیط پپتون واتر که حاوی باکتری رشد یافته در محیط‌های کشت مورد بررسی بود (هر نمونه به شکل جداگانه)، را با ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل^۲ مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در بشر حاوی آب جوش، جوشانده شد.

کیفیت و کمیت سنجی DNA

جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد مطالعه از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز استفاده شد. بدین منظور ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده روی ژل ۱ درصد آگاروز الکتروفورز گردید. به منظور کمیت سنجی DNA تخلیص شده از دستگاه بیوفوتومتر استفاده شد و با اندازه گیری میزان DNA در نمونه در طول موج نوری ۲۸۰

جدول (۱): توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه

اندازه محصول (جفت باز)	توالی پرایمر (۳-۵)	ژن
۱۳۰	F ATT TGA AGA GGT TGC AAA CGA T R TTC ACT CTG AAG TTT TCT TGT TT C	<i>16S rRNA</i>

واکنش PCR به منظور ردیابی ژن *16srRNA* در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر متشکل از DNA استخراج شده، PCR buffer 10x، Mix و پرایمرهای F و R (1μM)، آنزیم Smar Taq DNA Polymerase و آب مقطر صورت گرفت.

واکنش PCR به منظور ردیابی ژن *16srRNA* در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر متشکل از DNA استخراج شده، PCR buffer 10x، Mix و پرایمرهای F و R (1μM)، آنزیم Smar Taq DNA Polymerase و آب مقطر صورت گرفت.

²-Distilled Water

جدول (۲): اجزای واکنش و برنامه ی دمایی واکنش PCR جهت ردیابی ژن *16srRNA* در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه

ژن	حجم واکنش PCR (۲۵ میکرولیتر)	برنامه دمایی PCR
<i>16srRNA</i>	۲/۵ میکرولیتر بافر PCR	۱ سیکل
	۲/۵ میلی مول کلرید منیزیم (فرمنتاس)	۵ دقیقه ----- ۹۴
	۱۰۰ میکرومول dNTP Mix (فرمنتاس)	۳۰ سیکل
	واحد آنزیم پلی مراز DNA پلی مراز (فرمنتاس)	۱۵ ثانیه ----- ۹۴
	۲ میکرولیتر DNA مربوط به هر نمونه	۶۰ ثانیه ----- ۵۵
		۶۰ ثانیه ----- ۷۲
		۱ سیکل
		۵ دقیقه ----- ۷۲

واکنش زنجیره ایی پلی مراز جهت ردیابی ژن های *qnrA, qnrB, qnrS* جهت ردیابی ژن های *qnrA, qnrB, qnrS* در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه توالی پرایمرهای نشان داده شده در جدول (۲) استفاده گردید.

جدول (۲) توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن های *qnrA, qnrB, qnrS* ایزوله های کلبسیلا پنومونیه

ژن	توالی (3' -- 5')	اندازه باند (جفت باز)
<i>qnrS</i>	F:ACGACATTCGTCAACTGCAA R:TTAATTGGCACCCTGTAGGC	۴۲۸
<i>qnrA</i>	F:ATTTCTCAGCCAGATGTTG R:GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	۵۸۰
<i>qnrB</i>	F:GTTGGCGAAAAAATTGACAGAA R:ACTCCGAATTGGTCAGATCG	۲۶۴

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر متشکل از DNA استخراج شده، 10x PCR buffer، dNTP Mix، پرایمرهای F و R، آنزیم *Mgcl2* (50mM)، (10mM) گرفت. مواد مطابق با جدول (۳) مخلوط شده و واکنش PCR انجام شد.

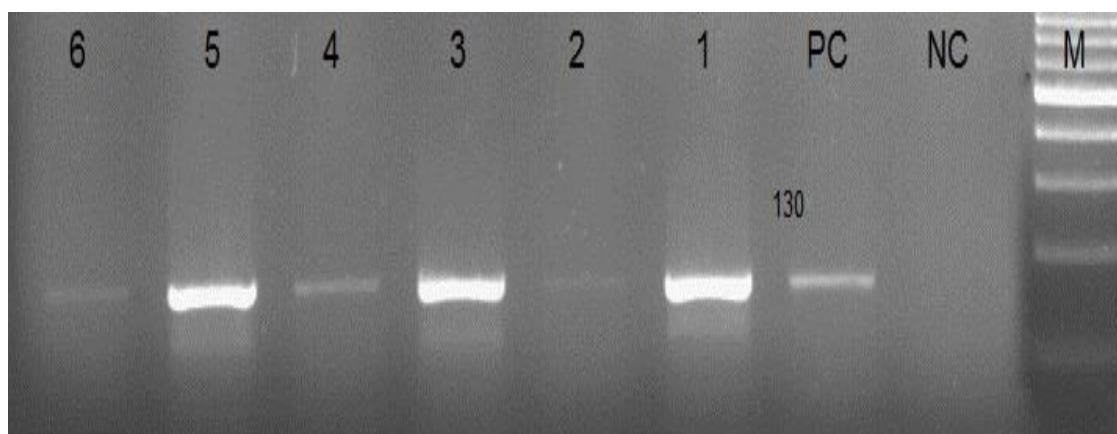
جدول (۳): اجزای واکنش و برنامه ی دمایی واکنش PCR جهت ردیابی ژن *qnrA, qnrB, qnrS* در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه

برنامه دمایی PCR	حجم واکنش PCR (۲۵ میکرولیتر)	ژن
۱ سیکل	۲/۵ میکرولیتر بافر PCR	
۶ دقیقه ----- ۹۵	۲/۵ میلی مول کلرید منیزیم (فرمنتاس)	<i>qnrA, qnrB, qnrS</i>
۳۰ سیکل	۱۰۰ میکرومول dNTP Mix (فرمنتاس)	
۴۵ ثانیه ----- ۹۴	واحد آنزیم پلی مرار DNA پلی مرار (فرمنتاس)	
۶۰ ثانیه ----- ۵۸	۲ میکرولیتر DNA مربوط به هر نمونه	
۶۰ ثانیه ----- ۷۲		
۱ سیکل		
۵ دقیقه ----- ۷۲		

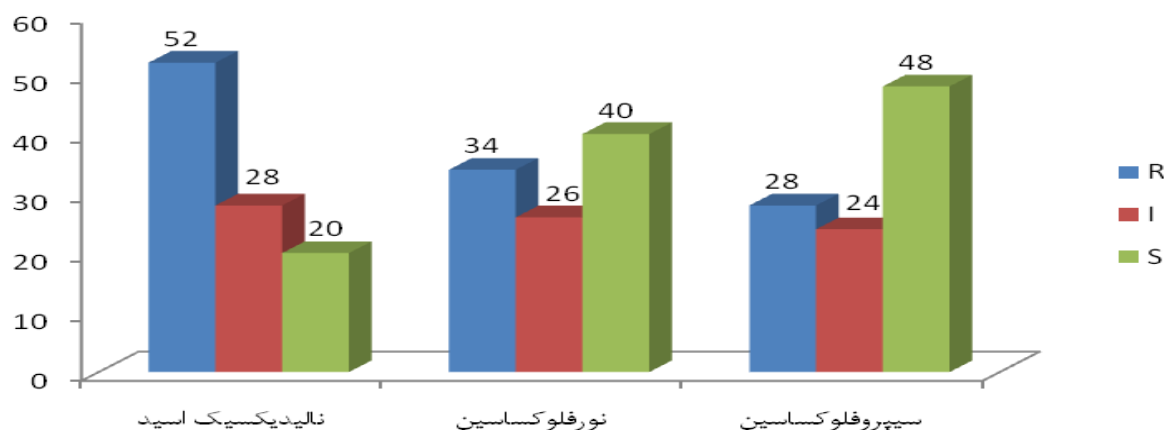
یافته‌ها:

درصد و مقاومت نسبت به نورفلوکساسین ۳۴ درصد گزارش گردید. مشاهده ی باند ۱۳۰ جفت بازی نشان دهنده ی تایید مولکولی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشد. نتایج در تصویر و نمودار (۱) نشان داده شده است.

در تحقیق حاضر پس از تایید مولکولی سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* و انجام واکنش PCR جهت ردیابی ژن‌های مقاومت به فلوروکینولون‌ها، مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید ۵۲ درصد، مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین ۲۸



تصویر (۱). ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *16srRNA* ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* (ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز).



نمودار ۱: میزان مقاومت به آنتی بیوتیک‌های فلوروکینولونی در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه

قرار می‌دهد. همچنین تغییر فلور میکروبی به وسیله آنتی بیوتیک‌ها باعث تهاجم باکتری‌های فرصت طلب و قارچ‌ها می‌شود (۱۹). قابلیت باکتری کلبسیلا پنومونیه در ایجاد بیماری به علت کاسته شدن دفاع میزبان در نتیجه اعمال جراحی پیچیده و طولانی و نیز مصرف داروهای متفاوت رو به ازدیاد می‌باشد و از آن جایی که باکتری کلبسیلا پنومونیه در افراد با ضعف سیستم ایمنی بیماری ایجاد می‌کند. بنابراین افزایش میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها در این باکتری می‌تواند تهدید جدی به حساب آید. بنابراین تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌های بیماری‌زای شایع جهت درمان اختصاصی علیه یک پاتوژن خاص، حایز اهمیت است. در اکثر موارد به علت استفاده بی رویه و خودسرانه آنتی بیوتیک‌ها، شاهد موارد زیادی از مقاومت‌های دارویی در پاتوژن‌ها هستیم که این خود سبب عدم موفقیت در درمان و پیدایش بسیاری از عوارض علیرغم صرف هزینه‌های زیاد درمانی می‌شود مقاومت‌های دارویی نسبت به آنتی بیوتیک‌ها در مناطق مختلف ایران و جهان به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه‌های ایجاد کننده و تفاوت در میزان مصرف آنتی بیوتیک‌ها، وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی بیوتیک‌های وسیع طیف و جدید متفاوت می‌باشند. نتایج به دست

هم چنین فراوانی ژن *qnrA*، ۱۵/۳۸ درصد، ژن *qnrB*، ۱۹/۲۳ درصد و ژن *qnrS* ۲۶/۹۲ درصد گزارش گردید. که براساس آزمون دقیق فیشر بین مقاومت به نالیدیکسیک اسید و ژن *qnrA* ارتباط آماری معنی دار مشاهده گردید که این امر نشان دهنده بروز مقاومت به این آنتی بیوتیک از طریق ژن *qnrA* می‌باشد.

بحث:

باکتری کلبسیلا پنومونیه یک باسیل گرم منفی رودهای و از اعضای خانواده ی انتروباکتریاسه می‌باشد و جزئی از میکروفلور طبیعی بدن انسان را تشکیل می‌دهد. حدود یک سوم افراد سالم ناقل روده ای این میکروب هستند و امروزه به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب و یکی از مهم‌ترین باکتری‌های دخیل در عفونت‌های بیمارستانی مطرح می‌باشد. میزان مرگ و میر ناشی از آن بالا می‌باشد و باعث بیماری‌های مختلفی مانند عفونت دستگاه ادراری، سپتی سمی، پنومونی و عفونت‌های داخل شکمی در بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان می‌شود، عفونت‌های حاصل از این باکتری در خارج از بیمارستان کمتر دیده می‌شود. مقاومت ضد میکروبی همواره به عنوان یک مشکل جدی برای سلامت انسان مطرح بوده و بیماران را در سراسر بیمارستان‌های جهان تحت تأثیر

آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که موثرترین آنتی بیوتیک فلوروکینولونی برای سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از نمونه‌های بالینی در شهرستان شهرکرد، سیپروفلوکساسین می‌باشد لذا بهتر است در درمان اولیه این عفونت از آنتی بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید و نورفلوکساسین کمتر استفاده شود، زیرا نتایج بیان کننده ی میزان بالای مقاومت باکتری *کلبسیلا پنومونیه* در نمونه‌های بالینی جدا شده نسبت به این آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد. فلوروکینولون‌ها به طور موفقیت آمیزی برای درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌هایی با مقاومت چند گانه ی آنتی بیوتیکی استفاده می‌کردند. اما به مرور زمان سویه‌های مقاوم به آن نیز به وجود آمده است. اهمیت این موضوع به این دلیل است که مصرف بی رویه و غیر منطقی آنتی بیوتیک بدون توجه به الگوهای مقاومتی می‌تواند باعث ظهور سویه‌هایی شود که حتی به درمان‌های جدید نیز مقاومت داشته باشند. ظهور سویه‌هایی جدید مقاوم به نالیدیکسیک اسید روشن کننده این واقعیت می‌باشد. بنابراین بررسی مولکولی این مقاومت‌ها بسیار حائز اهمیت خواهد بود. مقاومت بالا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کینولونی می‌تواند ناشی از مصرف بی رویه و بدون نظارت داروهای فوق باشد. افزایش مقاومت به سیپروفلوکساسین در انتروباکتریاسه با افزایش شیوع ژن‌های *PMQR* مرتبط است و این تغییر در مقاومت شامل افزایش در تنوع ژن‌های *PMQR* و شیوع جهش در ژن‌های *parC* و *gyrA* یا هر دو در سویه‌های *PMQR* مثبت است.

ژن‌های *qnr* جزء عوامل مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید (*PMQR*) هستند که به دلیل قرار گیری بر روی اینتگرون‌های مختلف باعث گسترش بسیار سریع مقاومت در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه می‌شوند. کینولون‌ها خانواده‌ای از آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف صناعی هستند. این عوامل به عنوان داروی انتخابی اول در درمان عفونت‌های دستگاه ادراری ناشی از باکتری‌های گرم منفی مورد استفاده

قرار می‌گیرند، اما به دلیل استفاده بی رویه از این داروها روز به روز میزان مقاومت نسبت به این داروها در حال افزایش می‌باشد به طوری که طی سال‌های اخیر مقاومت سطح بالا به داروهای با اهمیت فوق که در ارتباط با ژن‌های وابسته به پلاسمید *qnr* می‌باشند، بروز نموده و درمان‌های عفونت‌های ذکر شده را بسیار پیچیده نموده است مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید (*PMQR*) به دلیل گسترش سریع در بین انتروباکتریاسه‌ها نقش بسیار مهمی در مقاومت به این داروها دارد (۲۰، ۲۱).

در تحقیق حاضر مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید ۴۶ درصد، مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین ۲۸ درصد و مقاومت نسبت به نورفلوکساسین ۳۴ درصد گزارش گردید هم چنین فراوانی ژن *qnrA* ۱۵/۳۸ درصد، ژن *qnrB* ۱۹/۲۳ درصد و ژن *qnrS* ۲۶/۹۲ درصد گزارش گردید. که براساس آزمون دقیق فیشر بین مقاومت به نالیدیکسیک اسید و ژن *qnrA* ارتباط آماری معنی دار مشاهده گردید که این امر نشان دهنده بروز مقاومت به این آنتی بیوتیک از طریق ژن *qnrA* می‌باشد. آمار نشان می‌دهد که الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در بخش‌های مختلف ایران متفاوت است.

طی مطالعه ای که توسط قلی پور و همکاران در اصفهان انجام شد، میزان مقاومت به آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید، ۲۳/۴ درصد گزارش شد که پایین تر از های ما در این مطالعه می‌باشد (۲۲). بررسی دلال و همکاران در تهران، الگوی حساسیت اشیریشیا کلی برای آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید ۷۴ درصد گزارش گردید که تقریباً با نتایج حاصل از تحقیق ما مشابه می‌باشد (۲۳). در تحقیق انجام شده توسط محمدی مهر و همکاران که به منظور تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌های گرم منفی مسئول عفونت بیمارستانی بخش مراقبت ویژه بیمارستان بعثت تهران صورت گرفت، مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین ۶۰ درصد گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما بسیار زیاده‌تر می‌باشد (۲۴). در تحقیق

منظم و تجویز آن قبل از آنتی بیوگرام خودداری شود تا میزان مقاومت کمتری داشته باشیم.

انجام شده توسط سلیمانی اصل و همکاران که بر روی ۱۴۰ ایزوله/شریشیا کلی عامل عفونت ادراری در سال ۱۳۹۱ انجام گرفت مقاومت به آنتی بیوتیکهای نالیدیکسیک اسید ۸/۸۲ درصد و ۴۳ درصد گزارش گردید که نسبت به نتایج حاصل از تحقیق ما از فراوانی بالاتری برخوردار می باشد. در این تحقیق مشخص گردید ۱/۱۲ درصد از ایزوله های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای ژن *qnrA* می باشند (۲۵).

در مطالعه ایی در پاکستان در سال ۲۰۱۱ مقاومت در ایزوله های ادراری/شریشیا کلی نسبت به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید به ترتیب ۳۶/۴۵ درصد و ۸۴/۱۶ درصد گزارش گردید (۲۶). در آمریکا و کانادا اکثریت جدایه های بالینی/شریشیا کلی به فلوروکینولون ها حساسند، با این حال جدایه های مقاوم به این آنتی بیوتیک ها در حال افزایش می باشند (۲۷).

Okten و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ترکیه ۳۴ ایزوله/شریشیا کلی *ESBL* مثبت را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق ۴۷/۴ درصد نسبت به نالیدیکسیک اسید حساس بودند و ۷۶/۸ درصد ایزوله ها هم زمان به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید حساسیت داشتند. در این تحقیق ۶/۳ درصد از ایزوله ها حامل ژن *qnr* بودند (۲۸).

Periera و همکاران در سال ۲۰۰۷ با بررسی ۱۴۴ ایزوله/شریشیا کلی جدا شده از موارد عفونت ادراری مقاوم به سیپروفلوکساسین تنها در یک مورد ژن *qnr* گزارش کردند (۲۹).

نتیجه گیری

ظهور مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها موضوعی است که باید جدی گرفته شده و لذا ارزیابی مستمر باکتریولوژی و خط صحیح درمان و استفاده ی مناسب از دیسک های آنتی بیوگرام در آزمایشگاه باید انجام گرفته و به منظور پیشگیری از مقاومت نسبت به داروهای جدید از مصرف بی رویه و نا

مراجع

1. Green VL, Verma A, Owens RJ, Phillips SE, Carr SB. Structure of New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1). 2011; 67 (10):1160-1164.
2. García-Sureda L, Juan C, Doménech-Sánchez A, Albertí S. Role of *Klebsiella pneumoniae* LamB porin in antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(4):1803-1805.
3. Luo Y, Yang J, Zhang Y, Ye L, Wang L, Guo L. Prevalence of β -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.
4. Green VL, Verma A, Owens RJ, Phillips SE, Carr SB. Structure of New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1). Acta Crystallogr Sec. 2011; 67(10):1160-1164.
5. Lye DC, Kwa AL, Chlebicki P. Antimicrobial resistance and practical solutions. Ann Acad Med Singapore. 2011; 40(4):156-162.
6. Mustafa OA, Yusuf D. Investigation of some antibiotic susceptibility plasmid profiles and ESBL characteristic of *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary system infection. World applied Sci J. 2009; 6(5):630-636.
7. Nordmann P. Emergence of plasmid mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. Pathol Biol (Paris). 2006; 54 (1):7-9
8. Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem? Clin Microbiol Infect. 2008; 14(4):295-7.
9. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. Lancet Infect Dis. 2006; 6(10):629-40
10. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2005; 56(3):463-
11. Karisik E, Ellington MJ, Pike R, Warren RE, Livermore DM, Woodford N. Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 beta-lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom. J Antimicrob Chemother. 2006; 58(3):665-8.
12. Poirel L, Schrenzel J, Cherkaoui A, Bernabeu S, Renzi G, Nordmann P. Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland. J Antimicrob Chemother. 66 (4): 2011; 1730-1733
13. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. J Antimicrob Chemother. 2005; 60 (5): 394-397.
14. Ferreira S, Toleman M, Ramalheira E, Da Silva GJ, Walsh T, Mendo S. First description of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates carrying both *qnrA* and *qnrB* genes in Portugal. Int J Antimicrob Agents. 2010; 35(6):584-586.
15. Garnier F, Raked N, Gassama A, Denis F, Ploy MC. Genetic environment of quinolone resistance gene *qnrB2* in a complex *sul1*-type integron in the newly described *Salmonella enterica* serovar

Keurmassar. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(9):3200-3227/

۱۶. امیرمظفری ن، فروهش تهرانی ه، طواف لنگرودی ز. عبدالمهی، ع. (۱۳۸۶). بررسی مقاومت دارویی ناشی از بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) در کلبسیلا پنومونیه با مقاومت دارویی چندگانه در بیماران بستری. مجله پژوهشی دانشکده پزشکی، دوره ۳۱، شماره ۳، صفحات ۲۴۱ تا ۲۴۵.

17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; 20th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, 2010.

18. Turton JF, Perry C, Elgohari S, Hampton CV. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. J Med Microbiol. 2010; 59 (4): 541-547

۱۹. رنجبران م، ذوالفقاری م، ژاپونی نژاد ع، آموزنده نوباوره، ع، ابطحی، ح، طبیبی نژاد م. بررسی مولکولی اینتگرین‌ها در/شریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه های جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری. مجله ی دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۱۳۹۲؛ ۲۳(۱۰۵): ۲۰-۲۷.

20. Bashir S, Haque A, Sarwar Y, Anwar A, Anwar M. Virulence profile of different phylogenetic groups of locally isolated community acquired uropathogenic *E.coli* from Faisalabad region of Pakistan. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2012; 11(23) 1-6.

۲۱. عبدی ح ع، راشکی ا، راشکی قلعه نو ز، شاه کرمی ف، شهرکی ز. (۱۳۹۲). بررسی رابطه فیلوژنی با توزیع ژن‌های کد کننده ی فاکتورهای بیماری‌زا در ایزوله‌های/شریشیا کلی جدا شده از دستگاه تناسلی زنان مراجعه کننده به کلینیک زنان شهرستان زابل به روش Multiplex-PCR. مجله ی میکروب شناسی پزشکی ایران. ۱۳۹۲؛ ۲۶(۴): ۴۵-۵۳.

22. Gholipour A, Soleimani N, Shokri D, Mobasherizadeh S, Kardi M, Baradaran A. Phenotypic and Molecular Characterization of Extended-Spectrum beta-Lactamase Produced by *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in an Educational Hospital. Jundishapur J Microbiol. 2014; 7(10): e11758.

23. Dallal MS, Sabbaghi A, Aghamirzaie HM, Lari AR, Eshraghian MR, Mehrabad JF, et al. Prevalence of AmpC and SHV β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* from Tehran Hospitals. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6 (2): 176-80.

۲۴. محمدی مهر م، فیض آبادی م م، بهادری ع، متشکرآرانی م، خسروی م. بررسی فراوانی و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌های گرم منفی مسئول عفونت بیمارستانی بخش مراقبت ویژه بیمارستان بعثت تهران. مجله ی میکروب شناسی پزشکی ایران. (۱۳۸۸). ۳ (۳-۲). ۵۴-۴۷.

25. Soleimani-Asl Y, Zibaei M, Firoozeh F. Detection of *qnrA* gene among quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Khorram Abad during; Feyz. 2012; 17(5): 488-495

26. Muhammad I, Uzma M, Yasmin B, Mehmood Q, Habib B. Prevalence of antimicrobial resistance and integrons in *Escherichia coli* from Punjab, Pakistan. Braz J Microbiol. 2011; 42(3): 462-466.

27. Karlowsky JA, Hoban DJ, Decorby MR, Laing M L, Zhanel GG. Fluoroquinolone resistant urinary isolates of *Escherichia coli* from outpatient are frequently multidrug resistant: result from the North American urinary tract infection collaborative alliance-quinolone resistance study. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(6): 2251-2254.

28. Oktem IM, Gulay Z, Bicmen M, Gur D. *QnrA* prevalence in extended-spectrum β -lactamase positive *Enterobacteriaceae* isolates from Turkey. *Jpn J Infect Dis.* 2008; 61(5): 13-17.

29. Pereira AS, Andrade SS, Montero J, Sader HS, Pignatary ACC, Gales AC. Evaluation of the susceptibility profiles, genetic similarity and presence of *qnr* genes in *Escherichia coli* resistant to ciprofloxacin isolated in Brazilian hospitals. *Braz J Infect Dis.* 2007; 11(1): 40-43.

Frequency of *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* genes in fluoroquinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from clinical samples

Nadieh Hamekhani¹, Hossein Khodabandeh^{1*}

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Corresponding Author: Hossein.khodabandeh.sh@gmail.com

Abstract

Klebsiella is one of the most important opportunistic intestinal bacteria and in addition to causing pulmonary infections, it also causes infections in other parts of the body and causes nosocomial infections. *Klebsiella pneumoniae* has become resistant to a number of antibiotics, including extended-spectrum cephalosporins, due to the acquisition of plasmids that encode the production of extended-spectrum beta-lactamases. The aim of this study is to determine the frequency of *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* genes in fluoroquinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospital infections in Shahrekord city. The present study was conducted on 56 *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from clinical cases in Shahrekord city. After confirming the diagnosis of the isolated bacteria by biochemical methods, they were also confirmed by molecular methods. The antibiotic resistance of the studied bacteria to the antibiotics nalidixic acid, ciprofloxacin and norfloxacin was investigated. Then, in the presence of specific primers, the frequency of the *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* genes was investigated. In this study, resistance to nalidixic acid was 46%, resistance to ciprofloxacin was 28% and resistance to norfloxacin was 34%. Also, the frequency of the *qnrA* gene was 15.38%, the *qnrB* gene was 19.23% and the *qnrS* gene was 26.92%. The emergence of resistance to antibiotics is an issue that must be taken seriously and therefore continuous evaluation of bacteriology and the correct line of treatment and appropriate use of antibiogram discs in the laboratory should be carried out.

Keywords: Fluoroquinolones, *Klebsiella pneumoniae*, Antibiotic resistance.