

Phenotypic and Genotypic Evaluation of Resistance to Fluoroquinolones in *Klebsiella pneumoniae* Collected from Hospitalized Patients in Sari, Iran

Seyed Razi Salimbahrami¹,
Mohammad Ahanjan²,
Hamid Reza Goli³,
Mohammad Akhoondian⁴,
Mehrdad Gholami^{3,5}

¹ Medical Student, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Associate Professor, Department of Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ MSc Student in Physiology, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

⁵ Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 3, 2021 ; Accepted February 23, 2021)

Abstract

Background and purpose: Antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* to quinolones is a serious concern in treatment of nosocomial infections. There are limited reports on the prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *K. pneumoniae* clinical isolates from Iran. The aim of this study was to investigate the rate of resistance to fluoroquinolone antibiotics, and also the frequency of *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* genes among *K. pneumoniae* isolates collected from hospitalized patients in Sari, Iran.

Materials and methods: In this descriptive cross-sectional study, bacterial isolates were identified by conventional methods and biochemical tests. Resistance to fluoroquinolone antibiotics was evaluated by disk diffusion method. After resistance assessment, amplification of *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* genes in isolates was performed by polymerase chain reaction (PCR).

Results: We analyzed 90 isolates and the antibiotic resistance of fluoroquinolone included: nalidixic acid (55%), ciprofloxacin (36%), ofloxacin (31%), levofloxacin (29%), and norfloxacin (22%). The PCR showed that 47 (52%), 22 (25%), and 21(23%) isolates harbored *qnrB*, *qnrA*, and *qnrS* genes, respectively.

Conclusion: The outbreak of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) leads to expand and increases bacterial resistance to fluoroquinolones. Therefore, continuous monitoring of antibiotic sensitivity patterns of *K. pneumoniae* strains to these agents is necessary.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic resistance, fluoroquinolone, *qnr*

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (196): 101-110 (Persian).

* Corresponding Author: Mehrdad Gholami - Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
(E-mail: me.gholami@mazums.ac.ir)

بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت نسبت به فلوروکینولون‌ها در *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بیماران بستری در مراکز آموزشی-درمانی شهر ساری

سید رضی سلیم بهرامی¹محمد آهنجان²حمید رضا گلی³محمد آخوندیان⁴مهرداد غلامی^{3و5}

چکیده

سابقه و هدف: مقاومت آنتی‌بیوتیکی *کلبسیلا پنومونیه* در برابر کینولون‌ها باعث ایجاد نگرانی‌های قابل توجهی در درمان عفونت‌های بیمارستانی شده است. گزارش‌های محدودی درباره شیوع ژن‌های مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* از ایران وجود دارد. لذا هدف از این مطالعه ارزیابی میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون و همچنین فراوانی ژن‌های *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* در میان ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بیماران بستری در شهر ساری بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به صورت توصیفی - مقطعی انجام شد. جدایه‌های باکتریایی با روش‌های معمول و آزمایش‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون با استفاده از روش انتشار دیسک بررسی شد. پس از ارزیابی مقاومت، شناسایی و تکثیر ژن‌های *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* در جدایه‌ها توسط PCR انجام شد.

یافته‌ها: از مجموع 90 ایزوله مورد آزمایش، مقاومت آنتی‌بیوتیک‌های خانواده فلوروکینولون از بیش‌ترین مقدار به کم‌ترین شامل نالیدیکسیک اسید (55 درصد)، سیپروفلوکساسین (36 درصد)، افلوکساسین (31 درصد)، لووفلوکساسین (29 درصد) و نورفلوکساسین (22 درصد) بود. براساس نتایج تکنیک polymerase chain reaction تعداد 47 (52 درصد)، 22 (25 درصد) و 21 (23 درصد) از ایزوله‌ها به ترتیب حامل ژن‌های *qnrB*، *qnrA* و *qnrS* بودند.

استنتاج: نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهند که ظهور مقاومت به کینولون با واسطه پلاسمید (PMQR) به افزایش گسترش سریع مقاومت باکتریایی به فلوروکینولون‌ها کمک می‌کند، از این رو، نظارت و ارزیابی مداوم الگوی حساسیت *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها یک ضرورت محسوب می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: *کلبسیلا پنومونیه*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، فلوروکینولون، *qnr*

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه یک عفونت بیمارستانی فرصت طلب محسوب می‌شود (1). این باکتری گرم منفی می‌تواند سبب بیماری‌های عفونی مانند پنومونی، عفونت دستگاه ادراری، باکتری می، استومیلیت، مننژیت و ترومبوفلیت شود (2).

E-mail: me.gholami@mazums.ac.ir

مؤلف مسئول: مهرداد غلامی - ساری: 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

1. دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 2. دانشیار، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 3. استادیار، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 4. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
 5. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
- تاریخ دریافت: 1399/10/15 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/10/27 تاریخ تصویب: 1399/12/5

کلبسیلا پنومونیه شایع ترین عامل پنومونی باکتریایی کسب شده از اجتماع در بین باکتری های گرم منفی است (3) و انسان به عنوان میزبان اولیه کلبسیلا پنومونیه می باشد. در عموم جوامع 5-13 درصد افراد این ارگانیسم را در مدفوع و 1-6 درصد افراد در ناحیه حلق نگه می دارند (4). پنومونی ناشی از کلبسیلا پنومونیه به طور کلی، تقریباً 8-11 درصد از کل پنومونی بیمارستانی را در جهان تشکیل می دهد (5). کلبسیلا پنومونیه شایع ترین باکتری مقاوم به فلوروکینولون ها در بین انتروباکتریاسه ها می باشد (6) و همچنین مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری به سایر آنتی بیوتیک ها مانند بتالاکتام ها، کارباپنم ها، آمینو گلیکوزیدها و... به طور فزاینده ای در حال گسترش می باشد (7).

در سال 1962، نالیدیکیسک اسید به عنوان اولین عضو کینولون ها معرفی شد (8). این دسته از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف به طور گسترده ای در درمان عفونت های باکتریایی ناشی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه در انسان استفاده می شود (9). فلوروکینولون ها از مشتقات کینولون فلورین هستند، مانند سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین که دارای مکانیسم عملکرد مشابه می باشند (10). فعالیت ضد باکتریایی کینولون ها با تأثیر آن ها بر روی آنزیم های شناخته شده توپوایزومراز به نام DNA ژیراز (توپوایزومراز II) و توپوایزومراز IV که توسط ژن های *gyrA* و *parC* بیان می شوند، انجام می شود (11). اگرچه کینولون ها آنتی بیوتیک های مناسبی برای درمان عفونت های باکتریایی گرم منفی هستند، اما در حال حاضر مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آن ها در حال افزایش است (12).

مقاومت کلبسیلا پنومونیه به فلوروکینولون ها به واسطه چندین مکانیسم رخ می دهد. مکانیسم اساسی که باعث افزایش عوامل مقاومت به فلوروکینولون می شود از طریق انتقال افقی ژن به واسطه پلاسمید یا (PMQR: quinolone resistance plasmid-mediated) می باشد (13). این مکانیسم توسط ژن های *qnr* کنترل

می شود که اولین بار در سال 1998 گزارش شده است (14). امروزه، گروه های ژنی *qnr* شناسایی شده به 5 دسته شامل *qnrA*، *qnrB*، *qnrC*، *qnrD* و *qnrS* تقسیم شده اند (15). PMQR توسط *aac-ib-cr* (آمینو گلیکوزید استیل ترانسفراز که حساسیت به سیپروفلوکساسین را کاهش می دهد) و پمپ های *qepA* و *oqxAB* که با محافظت فیزیکی از DNA ژیراز و توپوایزومراز IV از اثر کینولون بر آن ها، مقاومت به کینولون را ایجاد می کند (16). این شرایط ممکن است یک مزیت انتخابی برای ایجاد مقاومت به کینولون ایجاد کند که در نهایت می تواند منجر به شکست درمان با کینولون ها شود (17). با توجه به افزایش استفاده از آنتی بیوتیک ها، افزایش مقاومت به آن ها و متغیر بودن حساسیت ایزوله های کلبسیلا پنومونیه در هر منطقه، تخمین بار و کنترل گسترش سویه های مقاوم به کینولون در بیمارستان ها ضروری است. هدف از انجام این پژوهش بررسی میزان مقاومت جدایه های کلبسیلا پنومونیه نسبت به آنتی بیوتیک های فلوروکینولون و همچنین بررسی حضور ژن های *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* در سویه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری در شهر ساری بود.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران به شماره IR.MAZUMS.REC.1399.5188 تصویب شد. در این مطالعه توصیفی - مقطعی، بر اساس فرمول تعیین حجم نمونه و با توجه به مطالعه قبلی انجام شده در مراکز آموزشی درمانی ساری (18)، تعداد 90 ایزوله در نظر گرفته شد. بدین ترتیب که 90 ایزوله جدا شده از بیماران بستری شده در بخش های مختلف در یک بازه 6 ماهه (از شهریور 98 تا اسفند 98) از بیمارستان های امام خمینی (ره)، بوعلی سینا و شهید زارع شهرستان ساری مورد بررسی قرار گرفت. پس از تشخیص کلبسیلا پنومونیه در آزمایشگاه بیمارستان ها، ایزوله ها به

آزمایشگاه تحقیقات دپارتمان میکروب شناسی و ویروس شناسی دانشگاه علوم پزشکی مازندران منتقل شدند و تست‌های تاییدی کلبسیلا پنومونیه که شامل: کشت بر روی محیط مکانیکی آگار، رنگ‌آمیزی گرم (گرم منفی) و بررسی میکروسکوپی، انجام آزمون اکسیداز (منفی)، کشت بر روی محیط triple sugar iron (TSI) (سطح و عمق محیط زرد و اسیدی به همراه تولید گاز)، آزمایش اندول (منفی)، آزمایش متیل رد (منفی)، آزمایش ووگس پروسکوئر (مثبت)، آزمایش سترات (مثبت)، آزمایش هیدرولیز اووه (مثبت)، تست حرکت (غیرمتحرک) و آزمایش لیزین دکربوکسیلاز (مثبت) بود، بر روی نمونه‌های منتقل شده از بیمارستان، صورت گرفت (19). پس از تایید نهایی، ایزوله‌ها در محیط کشت حاوی TSB (Tryptic Soy broth) (Merck, Germany) 20 درصد گلیسرول و در دمای 70- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی

برای تعیین حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی از روش انتشار دیسک در آگار با متد استاندارد کربی بوئر و بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای بین‌المللی آزمایشگاهی (CLSI; 2018) انجام شد (20). ابتدا بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck, Germany) تهیه شد و در کنار شعله، در قطر مناسب در پلیت‌های 10 سانتی‌متری ریخته شد. پلیت‌ها برای کنترل آلودگی به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از کنترل عدم آلودگی، سوسپانسیون میکروبی از سوش‌های تازه (مطابق با استاندارد نیم مک فارلند) (1.5×10^8 CFU/mL) تهیه شد و این سوسپانسیون توسط سوآپ‌های استریل به صورت چمنی بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح شد. پس از دیسک‌گذاری در فواصل استاندارد با استفاده از پنس استریل، پلیت‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت

18 ساعت انکوبه شدند. دیسک‌های آنتی بیوتیکی استفاده شده در این مطالعه شامل نالیدیکسیک اسید (30 میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (5 میکروگرم)، افلوکساسین (5 میکروگرم)، لووفلوکساسین (5 میکروگرم) و نورفلوکساسین (10 میکروگرم) بودند (MAST Diagnostics, Merseyside, UK). در تست حساسیت سنجی از *E. coli* ATCC 25922 به عنوان سویه استاندارد استفاده شد.

استخراج ژنوم باکتریایی و انجام واکنش زنجیره ای پلی مرارز (PCR)

برای تعیین فراوانی ژن‌های مورد مطالعه از پرایمرهای اختصاصی (تکاپوزیست، ایزان) استفاده شد. مراحل انجام آزمون مولکولی بدین صورت بود که پس از کشت تازه میکروبی از سویه‌های مورد بررسی، DNA ایزوله‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA mini-Extraction kit (کیاژن) استخراج شد. پس از استخراج برای اطمینان از خلوص DNA، از دستگاه نانودراپ استفاده شد. در نهایت با به کارگیری روش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و شرایط مندرج در جدول شماره 1، تکثیر ژن‌های مورد مطالعه (*qnrA*، *qnrB* و *qnrS*)، در دستگاه ترمال سایکلر (بایورد) انجام شد. واکنش PCR به حجم نهایی 25 میکرولیتر شامل 5/5 میکرولیتر PCR master mix (2x) (سیناکلون، ایران) حاوی Tag DNA polymerase (0/05 U/ml)، $MgCl_2$ (3mM) و dNTPs (0.4 mM)، 1 میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای فوروارد و ریورس به غلظت 0/8 میکرومولار، 2 میکرولیتر از DNA الگو (10 نانوگرم) و 10/5 میکرولیتر از آب دو بار تقطیر انجام شد. در این مرحله از انجام تست‌های مولکولی از کنترل‌های مثبت و منفی برای تایید صحت انجام آزمایش استفاده شد (21). محصولات تکثیر یافته از نظر حضور ژن‌های مورد نظر، با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شدند.

جدول شماره 1: توالی پرایمرهای مورد استفاده در آزمون PCR و شرایط انجام آن

Final Extension	Cycle	Extension	Annealing	Denaturation	Initial Denaturation	Product bp	توالی نوکلئیدی (5'-3')	ژن
72°C for 5 m	32	72°C for 60 s	53°C for 45 s	94°C for 45 s	94°C for 2 m	516	5'-ATTTCACGCGCAGGATTTG 5'-GATCGGCAAAGTTAGGTCA	<i>qnrA</i>
72°C for 5 m	32	72°C for 60 s	53°C for 45 s	95°C for 45 s	95°C for 2 m	469	5'-GATCGTGAAAGCCAGAAAGG 5'-ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	<i>qnrB</i>
72°C for 5 m	32	72°C for 45 s	53°C for 45 s	94°C for 45 s	94°C for 2 m	417	5'-ACGACATTGCTCAACTGCAA 5'-TAAATTGGCACCTGTAGGC	<i>qnrS</i>

آنالیز آماری داده ها

اطلاعات به دست آمده به کمک نرم افزار SPSS 16 مورد تحلیل قرار گرفتند. جهت تحلیل داده ها از آمار توصیفی (فراوانی، درصد و میانگین) استفاده شد.

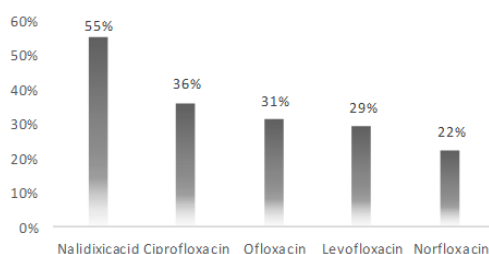
یافته ها

در مطالعه حاضر در مجموع 90 ایزوله کلبسیلا پنومونیه جمع آوری شده از نمونه های بالینی از بخش های مختلف بیمارستان های امام خمینی (ره) (49 ایزوله)، بوعلی (31 ایزوله) و زارع (10 ایزوله) بررسی گردید. نمونه ها در این پژوهش برگرفته از افراد با رنج سنی 2-89 سال با میانگین سنی 36 سال بود که در بیمارستان های مذکور بستری شده بودند. همچنین فراوانی نسبی مردان و زنان به ترتیب شامل 51 درصد و 49 درصد بود. 50 (55 درصد) ایزوله مربوط به نمونه های ادرار، 22 (24 درصد) ایزوله مربوط به نمونه های خون، 11 (12 درصد) ایزوله مربوط به نمونه های خلط و 7 (8 درصد) ایزوله مربوط به سایر نمونه ها (آسیت و زخم) بود. ارزیابی میزان مقاومت و حساسیت ایزوله ها نسبت به آنتی بیوتیک های خانواده کینولون ها مورد ارزیابی قرار گرفت (تصویر شمار 1).



تصویر شماره 1: نتیجه آزمایش انتشار دیسک برای کلبسیلا پنومونیه در برابر عوامل ضد میکروبی

براساس نتایج حاصله از آنتی بیوگرام، ترتیب درصد مقاومت آنتی بیوتیک های خانواده کینولون ها از بیش ترین مقدار به کم ترین شامل: نالیدیکسیک اسید (55 درصد)، سیپروفلوکساسین (36 درصد)، افلوکساسین (31 درصد)، لووفلوکساسین (29 درصد) و نورفلوکساسین (22 درصد) بوده است. نتایج آزمایشات مولکولی نشان داد که از 90 ایزوله بررسی شده، 47 ایزوله (52 درصد) دارای ژن *qnrB* بودند. همچنین ژن های *qnrA* و *qnrS* به ترتیب در 22 (25 درصد) و 21 (23 درصد) از ایزوله ها مشاهده شد. نمودارهای شماره 1 و 2 به ترتیب میزان مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های کلبسیلا پنومونیه و فراوانی ژن های مورد بررسی در ایزوله ها را نشان می دهند.



نمودار شماره 1: میزان مقاومت دارویی ایزوله های تحت بررسی نسبت به آنتی بیوتیک ها



نمودار شماره 2: توزیع ژن های مورد مطالعه در جدایه های بالینی کلبسیلا پنومونیه

همچنین حضور همزمان ژن‌های مورد مطالعه نیز ارزیابی شد و بر این اساس بیش‌ترین حضور همزمان ژن‌ها به ترتیب مربوط به ژن‌های $qnrB+qnrS$ (11 ایزوله)، $qnrA+qnrB$ (8 ایزوله) بود. نتایج حاصل از آزمون مولکولی نشان داد که از مجموع تمامی ایزوله‌های تحت مطالعه، 4 ایزوله واجد هر دو ژن $qnrA$ و $qnrS$ بودند. همچنین حضور همزمان $qnrA$ ، $qnrB$ و $qnrS$ تنها در 2 ایزوله مشاهده شد. با استفاده از آزمون‌های آماری و با توجه به P به دست آمده، ارتباط معنی‌داری بین حضور ژن $qnrB$ و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین مشاهده شد ($P < 0/001$). نمودارهای شماره 1 و 2 به ترتیب میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه و فراوانی ژن‌های مورد بررسی در بین ایزوله‌ها را نشان می‌دهند.

بحث

مقاومت‌های باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده کینولون‌ها در طی سالیان متمادی افزایش پیدا کرده است (22-25)، البته باید در نظر داشت که میزان مقاومت‌های باکتریایی در مناطق گوناگون یک قاره (از آن‌جا که رژیم دارویی مختلفی بر سازمان بهداشتی هر منطقه حاکم است)، ممکن است متفاوت باشد؛ مانند آنچه که در تحقیقات Mahto در نپال به دست آمده است که این میزان را 75 درصد گزارش نموده بود (26). در مطالعه حاضر، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید (55 درصد)، سیپروفلوکساسین (36 درصد)، افلوکساسین (31 درصد)، لووفلوکساسین (29 درصد) و نورفلوکساسین (22 درصد) بود. در مطالعه‌ای که توسط Magesh و همکاران در سال 2011 در کشور هند بر روی 23 ایزوله کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو انجام شد، نتایج نشان داد که 61 و 56 درصد از ایزوله‌ها به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین مقاوم بودند (27). این تفاوت و حساسیت بیش‌تر ممکن

است ناشی از ورود تنها ایزوله‌های مقاوم به چند دارو (MDR: multidrug-resistance) به مطالعه Magesh، نسبت به مطالعه ما که بر روی تمامی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه انجام شد، دانست. در مقایسه با این نتیجه، Grillon و همکاران (28)، در پژوهشی که در سال 2016 به انجام رساندند، میزان مقاومت 25 درصد را نسبت به سیپروفلوکساسین شناسایی کردند. این تفاوت اندک می‌تواند ناشی از تفاوت‌های مناطق جغرافیایی و تفاوت در زمان مطالعه باشد (29). در سال 2012 در پژوهشی که توسط Hennequin انجام گرفت (29)، بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های کلبسیلا صورت گرفت. شواهد این مطالعه نشانگر بروز مقاومت به افلوکساسین تنها در 20 درصد ایزوله‌ها بود، البته این اختلاف مقاومت در دو پژوهش می‌تواند مربوط به اختلاف زمانی دو پژوهش با یکدیگر باشد. همسو با مطالعه حاضر، در مطالعه‌ای که توسط شکوهی‌زاده در زنجان صورت گرفت، میزان مقاومت به نوروفلوکساسین 15 درصد گزارش شد (10). البته این موضوع نیز باید مورد توجه قرار بگیرد که این آنتی‌بیوتیک در رژیم درمانی کشور ما هنوز وارد نشده و ایزوله‌های جدا شده از افراد در پژوهش آنچنان برخوردی با این آنتی‌بیوتیک نداشتند، اما در قاره اروپا که این دارو مورد استفاده قرار گرفته است میزان مقاومت تا 80 درصد نیز افزایش یافته است (30).

در مطالعه‌ای که در مشهد توسط ایزدی و همکاران انجام شد (31)، ژن‌های $qnrA$ ، $qnrB$ ، $qnrS$ به ترتیب در 11، 15 و 21 درصد از ایزوله‌های کلبسیلا شناسایی شد، که این تفاوت در شیوع ژن‌ها نسبت به مطالعه حاضر را می‌توان به تفاوت در زمان و مکان دو مطالعه نسبت به یکدیگر مرتبط دانست. در مطالعه‌ای که در مراکش توسط Barguigua (32) انجام شد، میزان شیوع ژن‌های $qnrA$ ، $qnrB$ و $qnrS$ به ترتیب 23 درصد، 2 درصد و 10 درصد گزارش شد که با یافته‌های این پژوهش بسیار متفاوت است. همچنین اخیراً در مطالعه‌ای که توسط Geetha انجام شد میزان فراوانی ژن‌های qnr به ترتیب

مورد بررسی یافت نشد، اما ژن‌های *qnrS* و *qnrB*، به ترتیب در 76 و 36 درصد از ایزوله‌ها مشاهده شد (37). مقدسی و همکاران در سال 2016 تعداد 94 ایزوله کلبسیلا پنومونیه از بیماران بستری در دو بیمارستان شهرستان بروجرد را پس از انجام آزمایش‌های میکروبی و بیوشیمیائی تعیین هویت کردند و به بررسی شیوع ژن‌ها *qnr* در آن‌ها پرداختند. براساس نتایج حاصل از آزمون انتشار دیسک آگار 29، 27، 28 و 27 درصد از جدایه‌ها به ترتیب به نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و اوفلوکساسین مقاوم بودند در این میان 46 و 3 درصد از ایزوله‌ها به ترتیب دارای ژن‌های *qnrB* و *qnrC* بودند (38). همچنین در تحقیق آزادپور و همکاران در سال 2014، از میان 107 جدایه بالینی کلبسیلا پنومونیه در خرم آباد، 34 ایزوله به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند، 7 ایزوله حساسیت نسبی و 66 ایزوله نیز حساس بودند. 18 ایزوله از 107 جدایه (16/8 درصد) *qnr* مثبت بودند که از آن میان 16 ایزوله (88/9 درصد) و 1 ایزوله (5/55 درصد) به ترتیب برای ژن‌های *qnrB* و *qnrS* مثبت بودند (39). همچنین نتایج مطالعه حاضر از نظر شیوع ژن‌های *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* در ایزوله‌ای کلبسیلا پنومونیه، با نتایج به دست آمده از مطالعه Kim و هکارانش همخوانی نداشت (40). یافته‌های به دست آمده نشان می‌دهد که ظهور PMQR به افزایش سریع و گسترش مقاومت باکتریایی نسبت به فلوروکینولون‌ها کمک می‌کند، که این امر نیاز به نظارت مداوم بر استفاده از آنتی‌بیوتیک و اقدامات پیشگیرانه جدی دارد. با توجه به مطالعات محدود درباره شیوع ژن‌های PMQR¹ در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه در ایران، بررسی و مطالعه دلایل ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های بیماری‌زای شایع بیمارستانی بسیار با اهمیت است. همین‌طور با توجه به افزایش شیوع مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در *اِتروباکتریاسه‌ها*، مدیریت و انتخاب

در انواع S و B شامل 5 و 12 درصد بوده است، هرچند که تمامی ایزوله‌ها از نظر حضور *qnrA* منفی گزارش شدند (16). در مطالعه Akinbami و همکاران 4/5 درصد و 2/3 درصد از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه دارای ژن‌های *qnrA* و *qnrB* بودند، اما هیچ یک از ایزوله‌ها دارای ژن *qnrS* نبودند (33).

در مطالعه‌ای که در کشور توگو توسط Salah و همکاران در سال 2019 به بررسی شیوع ژن‌های *qnr* در بین باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه و *اشرشیاکلی* پرداخته بودند مشاهده شد که از میان 46 ایزوله متعلق به کلبسیلا پنومونیه، 31 و 15 درصد از ایزوله‌ها به ترتیب دارای ژن‌های *qnrB* و *qnrS* بودند. اما ژن *qnrA* تنها در 1 درصد از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مشاهده شد (34). نتایج مطالعه Salah، از نظر شیوع ژن *qnrA* با یافته‌های Akinbami تقریباً به یک اندازه بود که نشان دهنده میزان شیوع این نوع ژن در قاره افریقا است. البته این دسته از داروها نیز در کنار دیگر مکمل‌های غذایی می‌توانند اثربخشی بهتر بر روند درمانی داشته باشند، چنانچه در مطالعات Tan و همکاران که در چین در سال 2020 انجام شد، همراه نمودن این خانواده از آنتی‌بیوتیک با یک فرآورده غذایی حاصل از قهوه سبز به نام اسید کولینرژیک، باعث تأثیرات سینرژیک بر روند کاهش مقاومت باکتریایی چه در *in vivo* و چه در *invitro* شده بود (35). در دیگر تحقیقات، انواع ژن‌های مقاومت دیگری با درصد بالاتر نیز دیده شده‌اند، مانند پژوهشی که در تهران در سال 2019 انجام گرفت، علاوه بر حضور ژن‌های *qnrA*، *B* و *S* که به ترتیب شامل 13 درصد، 31 درصد و 35 درصد بوده است، ژن‌های دیگری مانند نوع *C* و *D* نیز مشاهده شد، که نیازمند مطالعات بیش‌تر در زمینه ارزیابی حضور این مجموعه از ژن‌های *qnr* می‌باشد (36). البته در منطقه خاورمیانه ژن‌های *qnrS* و *qnrB*، نسبت به *qnrA*، در درصد بالاتری از ایزوله‌ها مشاهده شد. به‌طوری که در مطالعه‌ای که در سال 2020 در عراق انجام شد، *qnrA* در هیچ یک از ایزوله‌های کلبسیلای

1. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR)

حاضر و مطالعات مشابه، انجام تحقیقات گسترده‌تر با تعداد نمونه‌های بیش‌تر جهت شناسایی هرچه بهتر این فرآیند و بررسی سایر ژن‌های مقاومت توصیه می‌شود.

الگوی مناسب، درمان ترکیبی آنتی‌بیوتیکی می‌تواند به عنوان یک راهکار جهت جلوگیری از شیوع مقاومت به این داروها استفاده شود. در پایان با توجه به نتایج مطالعه

References

1. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 2016; 80(3): 629-661.
2. Girometti N, Lewis RE, Giannella M, Ambretti S, Bartoletti M, Tedeschi S, et al. *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: epidemiology and impact of inappropriate empirical therapy. *Medicine (Baltimore)* 2014; 93(17): 298-309.
3. Sahly H, Podschun R. Clinical, bacteriological, and serological aspects of *Klebsiella* infections and their spondylarthropathic sequelae. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4(4): 393-399.
4. Esposito EP, Cervoni M, Bernardo M, Crivaro V, Cuccurullo S, Imperi F, et al. Molecular epidemiology and virulence profiles of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* blood isolates from the hospital agency "Ospedale dei Colli," Naples, Italy. *Front Microbiol* 2018;9:1463.
5. Walter J, Haller S, Quinten C, Kärki T, Zacher B, Eckmanns T, et al. Healthcare-associated pneumonia in acute care hospitals in European Union/European Economic Area countries: an analysis of data from a point prevalence survey, 2011 to 2012. *Euro Surveill* 2018; 23(32): 1700843.
6. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 2006; 6(10): 629-640.
7. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2017; 41(3): 252-275.
8. Minarini LAR, Darini ALC. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in *Enterobacteriaceae* isolates from Brazil. *Braz J Microbiol* 2012; 43(4): 1309-1314.
9. Sarkozy G. Quinolones: a class of antimicrobial agents. *Vet Med* 2001; 46(9/10): 257-274.
10. Shokoohizadeh L, Saniee M, Mirzaee M, Taheri M. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in quinolone-resistant *klebsiella pneumoniae* isolates from borujerd hospitals. *J Adv Med Biomed Res* 2019; 27(120): 1-7.
11. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci* 2015; 1354(1): 12-31.
12. Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(8): 5638-5642.
13. San Millan A, Santos-Lopez A, Ortega-Huedo R, Bernabe-Balas C, Kennedy SP, Gonzalez-Zorn B. Small-plasmid-mediated antibiotic resistance is enhanced by increases in plasmid copy number and bacterial fitness. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(6): 3335-3341.
14. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ V. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* 2014; 22(8): 438-445.
15. Chen X, Zhang W, Pan W, Yin J, Pan Z, Gao S, et al. Prevalence of *qnr*, *aac* (6')-Ib-cr,

- qepA, and oqxAB in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(6): 3423-3427.
16. Geetha PV, Aishwarya KVL, Mariappan S, Sekar U. Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates of *Klebsiella Pneumoniae*. *J Lab Physicians* 2020; 12(2): 121-125.
 17. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005; 41(Suppl2): S120-126.
 18. Ahanjan M, Naderi F, Solimanii A. Prevalence of Beta-lactamases genes and antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* isolated from teaching hospitals, Sari, Iran, 2014. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2017; 27(149): 79-87 (Persian).
 19. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology-e-book. 6th Ed. Philadelphia: Saunders; 2018.
 20. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI Supplement M100. 30th Ed. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute; 2019.
 21. Rezazadeh M, Baghchesaraei H, Peymani A. Plasmid-mediated quinolone-resistance (qnr) genes in clinical isolates of *Escherichia coli* collected from several hospitals of Qazvin and Zanzan Provinces, Iran. *Osong Public Health Res Perspect* 2016; 7(5): 307-312.
 22. Bagheri-Nesami M, Rafiei A, Eslami G, Ahangarkani F, Rezai MS, Nikkhah A, et al. Assessment of extended-spectrum β -lactamases and integrons among Enterobacteriaceae in device-associated infections: multicenter study in north of Iran. *Antimicrob Resist Infect Control* 2016; 5(1): 1-8.
 23. Aky A, Chegenelorestani R, Elahi A, Hamzavi Y. Frequency of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2017; 27(151): 41-51 (Persian).
 24. Hashemi B, Rafiei A, Valadan R, Abdollahi M, Ahanjan M, Nazar E, et al. Evaluating the gyrA Gene Mutation in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Sari Imam Khomeini Hospital, Iran. *J Mazand Univ Med Sci* 2018; 28(164): 21-30.
 25. Szymankiewicz M, Wróblewski M, Janicka G, Sekowska A, Wojda M, Klyszejko C. Resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains producing and not producing ESBL (extended-spectrum beta-lactamase) type enzymes to selected non-beta-lactam antibiotics. *Med Sci Monit* 2002; 8(3): BR100-4.
 26. Mahto M, Raghubanshi BR, Manandhar R. Antibiotic Resistance Pattern of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Specimens. *J KIST Med Coll* 2019; 1(2): 42-46.
 27. Magesh H, Kamatchi C, Vaidyanathan R, Sumathi G. Identification of plasmid-mediated quinolone resistance genes qnrA1, qnrB1 and aac (6')-1b-cr in a multiple drug-resistant isolate of *Klebsiella pneumoniae* from Chennai. *Indian J Med Microbiol* 2011; 29(3): 262-268.
 28. Grillon A, Schramm F, Kleinberg M, Jehl F. Comparative activity of ciprofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* assessed by minimum inhibitory concentrations and time-kill studies. *PLoS One* 2016; 11(6): e0156690.
 29. Hennequin C, Aumeran C, Robin F, Traore O, Forestier C. Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a CTX-M-15-producing *Klebsiella*

- pneumoniae isolate. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(9): 2123-2130.
30. Woldu MA. *Klebsiella pneumoniae* and its growing concern in healthcare settings. *Clin Exp Pharmacol* 2016; 6(1): 1-7.
 31. Izadi N, Nasab MN, Mood EH, Meshkat Z. The Frequency of *qnr* Genes in Extended-Spectrum β -lactamases and non-ESBLs *Klebsiella pneumoniae* Species Isolated from Patients in Mashhad, Iran. *Iran J Pathol* 2017; 12(4): 377-383.
 32. Barguigua A, El Otmani F, Talmi M, Reguig A, Jamali L, Zerouali K, et al. Prevalence and genotypic analysis of plasmid-mediated β -lactamases among urinary *Klebsiella pneumoniae* isolates in Moroccan community. *J Antibiot (Tokyo)* 2013; 66(1): 11-16.
 33. Akinbami OR, Olofinsae S, Ayeni FA. Prevalence of extended spectrum beta lactamase and plasmid mediated quinolone resistant genes in strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Leclercia adecarboxylata* and *Citrobacter freundii* isolated from poultry in South Western Nigeria. *PeerJ* 2018; 6: e5053.
 34. Salah FD, Soubeiga ST, Ouattara AK, Sadji AY, Metuor-Dabire A, Obiri-Yeboah D, et al. Distribution of quinolone resistance gene (*qnr*) in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Lomé, Togo. *Antimicrob Resist Infect Control* 2019; 8(1): 104.
 35. Tan S, Gao J, Li Q, Guo T, Dong X, Bai X, et al. Synergistic effect of chlorogenic acid and levofloxacin against *Klebsiella pneumoniae* infection in vitro and in vivo. *Sci Rep* 2020; 10: 20013.
 36. Abossedgh R, Ghane M, Babaeekhou L. High Frequency of *qnr* Genes in Urinary Isolates of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* in Tehran, Iran. *Shiraz E-Medical J* 2020; 21(3): e92032.
 37. Mustafa MS, Abdullah RM. Prevalence of Quinolones Resistance Proteins Encoding Genes (*qnr* genes) and Co-Resistance with β -lactams among *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Iraqi Patients. *Baghdad Sci J* 2020; 17(2): 406-414.
 38. Moghadasi M, Mirzaee M, Mehrabi MR. Frequency of Quinolone Resistance and *qnrB* and *qnrC* Genes in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Medical Bacteriology* 2016; 5(5-6): 39-45.
 39. Azadpour M, Soleimani Y, Rezaie F, Rezaeifar M. Antibiotic susceptibility pattern and identification of quinolone-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* clinical specimens from Khorramabad, Iran. *Trop Biomed* 2017; 34(2): 412-418.
 40. 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): 639-645.