Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 17:54 +0330 on Monday December 18th 2017

ORIGINAL ARTICLE

Frequency of Plasmid-mediated Quinolone Resistance Genes in Extended-spectum β-lactamase-producing Escherichia coli

Roya Chegenelorestani[1],
Alisha Akya[2],
Azam Elahi[1], Yazdan Hamzavi[3]

[1] MSc Student in Microbiology, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
[2] Associate Professor, Department of Microbiology, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
[3] Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

(Received December 31, 2017 Accepted May 1, 2017)

Abstract

Background and purpose: Plasmid-medicated quinolone resistance (PMQR) genes play an important role in resistance to quinolones. The aim of this study was to determine the frequency of PMQR genes in extended-spectrum β-lactamase-producing (ESBL*) Escherichia coli.*

Materials and methods: This study was done on 240 isolates of *E.coli* from urine samples of patients in Kermanshah, Iran. The susceptibility of isolates to selected antibiotics was tested using disc diffusion and broth microdilution methods. The isolates were screened for ESBL-producing phenotype by combined disc diffusion test. The *qnrA, qnrB, qnrS, aac (6')-Ib*, and *qepA* genes were detected by PCR. All PCR products for *aac(6')-Ib* gene were digested by BtsCI for detection of aac(6')-Ib-cr variant. Data analysis was done using statistical methods.

Results: Of 66 ESBL-producing isolates, 45 (68.1%) were resistant to ciprofloxacin and levofloxacin and 56 (84.8%) were found to be resistant to nalidixic acid. The *qnrA, qnrB, qnrS*, and *qepA* genes were detected in 28.7%, 40.9%, 4.5%, and 3% of the isolates, respectively. The *aac(6')-Ib* gene was found in 65.1% of the isolates amongst which 88.4% were *aac(6')-Ib-cr* variant.

Conclusion: Our results indicate a high prevalence of PMQR genes in ESBL-producing *E.coli* isolates in Kermanshah. A correlation was observed between resistance to beta-lactams and quinolones which may indicate the cotransfer of quinolone genes by plasmids carrying the ESBL. As a result, identifying *E. coli* strains with ESBL may indicate a high resistance to quinolones. So, before using quinolones, the screening test for ESBL is recommended to prevent the increasing resistance to this class of drugs.

Keywords: *Escherichia coli*, quinolones, plasmid-medicated resistant genes

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (151):41-51 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره 151 مرداد سال 1396 (51-41)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 17:54 +0330 on Monday December 18th 2017

فراوانی ژن های مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید (PMQR) در جدایه های *اشرشیا کلی* مولد بتالاکتامازهای طیف گسترده

رویا چگنه لرستانی[1]
علیشا اکیا[2]
اعظم الهی[1]
یزدان حمزوی[3]

چکیده

سابقه و هدف: مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید در توسعه مقاومت به کینولون‌ها در باکتری‌ها نقش مهمی دارد. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی ژن‌های PMQR در جدایه‌های *اشرشیا کلی* مولد بتالاکتامازهای طیف گسترده (ESBL) بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی 240 نمونه *اشرشیا کلی* جدا شده از نمونه ادرار بیماران در کرمانشاه انجام شد. تست تعیین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های منتخب به روش دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن براث انجام گرفت. جدایه‌های تولید کننده ESBL با استفاده از آزمون دیسک ترکیبی شناسایی شدند. ژن‌های *qnrA*، *qnrB*، *qnrS*، *aac (6')-Ib* و *qepA* با PCR تشخیص داده شد. تمام محصولات PCR برای ژن *aac(6´)-Ib* جهت تشخیص واریانت *aac(6´)-Ib-cr* با آنزیم BtsCI هضم شدند. داده‌ها توسط روش‌های آماری تحلیل شدند.

یافته‌ها: از 66 جدایه مولد ESBL، 45 (68/1 درصد) جدایه به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین و 56 (84/8 درصد) جدایه به نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند. ژن‌های *qnrA*، *qnrB*، *qnrS* و *qepA* به ترتیب در 28/7 درصد، 40/9 درصد ، 4/5 درصد و 3 درصد از جدایه‌ها یافت شدند. ژن *aac (6´)-Ib* در 65/1 درصد از جدایه‌ها یافت شد که از این‌ها 88/4 درصد از نوع واریانت *aac(6´)-Ib-cr* بودند.

استنتاج: نتایج بیانگر شیوع بالای ژن‌های PMQR در جدایه‌های *E.coli* مولد ESBL در کرمانشاه است. بین مقاومت به بتالاکتام‌ها و کینولون‌ها همبستگی مشاهده شد که می‌تواند بیانگر انتقال مشترک ژن‌های کینولونی به وسیله پلاسمیدهای حامل ESBL باشد. در نتیجه شناسایی سویه های *E.coli* مولد ESBL می‌تواند نشانگر مقاومت بالا به کینولون ها باشد. بنابراین پیش از استفاده کینولون‌ها آزمایش غربالگری ESBL پیشنهاد می‌شود تا از افزایش مقاومت به این دسته دارویی جلوگیری شود.

واژه های کلیدی: *اشرشیا کلی*، کینولون‌ها، ژن‌های مقاومت وابسته به پلاسمید.

مقدمه

با افزایش روند مقاومت جدایه‌های *اشرشیا کلی* به آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان عفونت‌های آن، از جمله عفونت ادراری مشکل ساز شده است. فلوروکینولون‌ها در سال‌های اخیر به عنوان داروهای جایگزین مناسب در

مولف مسئول: علیشا اکیا - کرمانشاه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه Email: akya359@yahoo.com
1. کارشناس ارشد میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
2. دانشیار میکروب شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
3. دانشیار انگل شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، گروه انگل شناسی & قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه
تاریخ دریافت : 1395/10/11 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1395/10/29 تاریخ تصویب : 1396/2/11

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 17:54 +0330 on Monday December 18th 2017

عفونت ادراری به‌کار رفته‌اند، اما استفاده وسیع سبب مقاومت به آن‌ها شده است(1). مقاومت به کینولون‌ها در انتروباکتریاسه عمدتاً به علت موتاسیون در ژن‌های کروموزومی کدکننده توپوایزومرازها رخ می‌دهد(2). اما اخیراً گزارش‌هایی از مقاومت به کینولون‌ها با واسطه ژن‌های پلاسمیدی منتشر شده است(3). ژن‌های مقاومت به کینولون وابسته به پلاسمید (PMQR) اولین بار در سال 1998 در یک جدایه کلبسیلا پنومونیه در آمریکا تشخیص داده شد(3). سه گروه از ژن‌های PMQR شامل *qnr*، *aac(6)-Ib-cr* و *qepA* تشخیص داده شد و برای هر گروه نیز تعدادی ژن زیر گروه شناسایی شده است. پروتیین‌های Qnr (qnrA، qnrB، qnrS، qnrC وqnrD) به خانواده پنتاپپتیدهای تکراری تعلق دارند و آن‌ها با مهار اتصال کینولون‌ها به DNA ژیراز و توپوایزومراز IV از DNA حفاظت می‌کنند(4). این ژن‌ها منجر به افزایش 8 تا 32 برابری در میزان MIC کینولون‌ها می‌شوند. سه نوع از ژن‌های *qnr* یعنی *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* در گونه‌های مختلف انتروباکتریاسه یافت شده‌اند(5). گروه دوم ژن‌های PMQR، یک واریانت از آمینوگلیکوزید استیل ترانسفراز (*aac(6´)-Ib-cr*) است که به‌وسیله N استیله کردن پیپرازینیل آمین سبب کاهش حساسیت به سیپروفلوکساسین می‌شود(4). این گروه اولین بار در سال 2003 گزارش شد و می‌تواند سبب افزایش 2 تا 4 برابری در میزان MIC شود(6). ژن *aac(6´)-Ib-cr* در نقاط مختلف جهان در جدایه‌های انتروباکتریاسه گزارش شده است(7). آخرین گروه ژن‌های PMQR، یعنی *qepA* یک انتقال دهنده وابسته به پروتون است که سبب افزایش 32 تا 64 برابری در میزان MIC فلوروکینولون‌های هیدروفیلیک (سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین) می‌شود(6).

پژوهش‌ها یک ارتباط قوی مثبت بین جدایه‌های دارای ژن‌های *qnr* و جدایه‌های مولد ESBL را نشان داده‌اند(8). به‌طوری که ژن‌های PMQR با فراوانی بالا در میان جدایه‌های ESBL مثبت در سراسر جهان گزارش شده است(9). هم‌چنین نشان داده شده است که که پلاسمیدهایی که ژن‌های *qnr* را حمل می‌کنند دارای انواعی از بتالاکتامازها نیز هستند(10). نظر به اهمیت ژن‌های PMQR در باکتری‌های شایع پاتوژن و نبود اطلاعات کافی در این زمینه در منطقه ما، هدف این مطالعه تعیین فراوانی ژن‌های *qnr*، *aac(6´)-Ib-cr* و *qepA* در جدایه‌های *اشرشیا لی* مولد بتالاکتامازهای طیف گسترده بود.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی تعداد240 جدایه *اشرشیا کلی* از 3200 نمونه ادراری بیماران سرپایی مراجعه کننده به دو مرکز پزشکی (آزمایشگاه مرکزی و کلینیک ویژه دانشگاه) در شهر کرمانشاه در طی سال‌های 1393 و 1394 جمع‌آوری شدند. نمونه میانی ادرار (Mid stream clean catch) در ظرف‌های استریل جمع‌آوری شد و بر روی محیط‌های اختصاصی EMB و بلاد آگار (Blood agar) (Merck, Germany) با استفاده از لوپ استاندارد کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت 24 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس تعداد کلنی‌ها شمارش شد و وجود تعداد 10^5 یا بیش تر کلنی باکتری در هر میلی لیتر حجم ادرار افراد مشکوک به عفونت ادراری، عفونت در نظر گرفته شد(11). مواردی که علایم بالینی نداشتند از مطالعه حذف شدند. از طرفی اطلاعات بیماران از نظر سن و جنس گرد آوری شد. پس از جمع‌آوری نمونه‌های ادراری، سویه‌های *اشرشیا کلی* بر اساس روش استاندارد و با استفاده از واکنش گرم، ریخت‌شناسی، خصوصیات کشت و تست‌های تکمیلی بیوشیمیایی متداول (اکسیداز، سیمون سیترات، اوره آز، فنیل آلانین دآمیناز، لیزین دکربوکسیلاز، MRVP، TSI، SIM) شناسایی و جداسازی شدند(12). ابتدا سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش Disk Diffusion طبق دستورالعمل (Clinical and Laboratory Standards

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 17:54 +0330 on Monday December 18th 2017

CLSI(Institute با استفاده از دیسک‌های آنتی بیوتیکی شرکت MAST (England, Merseyside) شامل سفتازیدیم (30 میکروگرم)، سفوتاکسیم (30 میکروگرم)، سفتریاکسون (30 میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (5 میکروگرم)، لووفلوکساسین (5 میکروگرم) و نالیدیکسیک اسید (30 میکروگرم) انجام شد. جهت کنترل کیفی از سویه‌های استاندارد *اشرشیا کلی* ATCC25922 استفاده شد. در پایان قطر هاله عدم رشد اندازه گیری و بر اساس جداول CLSI تفسیر شد(13).

برای تشخیص جدایه‌های مولد ESBL از میان کل جدایه‌ها از تست فنوتیپی تائیدی (Phenotypic confirmatory tests) استفاده شد. در این روش از دیسک‌های ترکیبی شامل سفتازیدیم (30 میکروگرم) همراه اسید کلاولانیک (10 میکروگرم) و سفوتاکسیم (30 میکروگرم) همراه اسید کلاولانیک MAST (10 میکروگرم) استفاده شد. در صورتی که قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف دیسک ترکیبی، حداقل 5 میلی‌متر یا بیش‌تر از قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک منفرد همان آنتی‌بیوتیک بود، به عنوان جدایه مولد ESBL قلمداد گردید(13). از سویه استاندارد *اشرشیا کلی* ATCC 35218 به منظور کنترل کیفی جدایه‌های مولد ESBL استفاده شد(13). سپس برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) جدایه‌های مولد ESBL نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید (Sigma, USA) از روش میکرودایلوشن براث استفاده شد. در این روش ابتدا از کشت 24 ساعته جدایه‌ها روی محیط مولر هینتون آگار، رقتی معادل کدورت نیم مک فارلند تهیه و طبق دستور کار CLSI رقیق شد. به‌طوری که غلظت نهایی باکتری‌ها در هر چاهک میکروپلیت 10^5 باکتری بود. غلظت‌های 0/015 میکروگرم در هر میلی لیتر تا 1024 میکروگرم در هر میلی لیتر برای هر سه آنتی‌بیوتیک به‌کار رفت. هر چاهک میکروپلیت حاوی حجم نهایی 200 میکرولیتر شامل محیط کشت، آنتی‌بیوتیک و سوسپانسیون باکتری بود. محیط مولر هینتون براث به همراه باکتری و بدون آنتی‌بیوتیک به عنوان کنترل مثبت و هم‌چنین محیط مولر هینتون براث به تنهایی بدون باکتری به‌عنوان کنترل منفی به‌کار رفت. پانل‌ها 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و کم‌ترین غلظت آنتی‌بیوتیک در چاهکی که هیچ کدورتی از رشد باکتری در آن مشاهده نشد، معادل MIC بر آورد گردید(13). از سویه *اشرشیاکلی* ATCC 25922 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. میزان MIC Breakpoints پیشنهادی توسط CLSI برای نالیدیکسیک اسید بصورت حساس (≥16 میکروگرم در هر میلی‌لیتر) مقاوم (≤32 میکروگرم در هر میلی لیتر) ، برای سیپروفلوکساسین حساس (≥1 میکروگرم در هر میلی لیتر) و مقاوم (≤4 میکروگرم در هر میلی‌لیتر) و در مورد لووفلوکساسین حساس (≥2میکروگرم در هر میلی لیتر) و مقاوم (≤ 8 میکروگرم در هر میلی لیتر) بود(13). DNA جدایه‌ها با روش جوشاندن استخراج شد. وجود ژن‌های *qnrA*، *qnrB*، *qnrS*، *qepA* و *aac (6´)-Ib* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (سینا کلون، تهران) مشخص شدند. واکنش PCR در حجم نهایی 25 میکرولیتر (12/5 میکرولیتر مسترمیکس شرکت سیناکلون، 2 میکرولیتر از هر پرایمر و 2 میکرولیتر DNA باکتری و بقیه آب مقطر استریل) در طی 35 سیکل، شامل: مرحله اولیه باز شدن دو رشته DNA به مدت 5 دقیقه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد، مرحله باز شدن دو رشته DNA 1 دقیقه در 94 درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال پرایمرها 1 دقیقه در 55 درجه سانتی گراد برای *qnrA* و *qepA*، 53 درجه سانتی‌گراد برای *qnrB* و *qnrS* و 57 درجه سانتی گراد برای *aac (6´)-Ib*، مرحله طویل شدن رشته هدف به مدت 1 دقیقه در 72 درجه سانتی‌گراد و مرحله طویل شدن نهایی به مدت 5 دقیقه در 72 درجه سانتی گراد انجام شد. محصول PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز 1 درصد، مورد

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 17:54 +0330 on Monday December 18th 2017

ارزیابی قرار گرفت. سپس تعدادی از محصولات PCR توالی یابی (Applied Biosystem ABI3130, USA) شد و نتیجه آن با استفاده از نرم افزار BLAST آنالیز گردید.

جدول شماره 1: توالی پرایمرهای بکار رفته در PCR و اندازه محصولات آن ها

نام ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)	منبع
qnrA	5´-TCAGCAAGAGGATTTCTCA-3´ 5´-GGCAGCACTATTACTCCCA-3´	516	14
qnrB	5´-GATCGTGAAAGCCAGAAAGG-3´ 5´-ACGATGCCTGGTAGTTGTCC-3´	469	14
qnrS	5´-ACGACATTCGTCAACTGCAA-3´ 5´-TAAATTGGCACCCTGTAGGC-3´	417	14
qepA	5´-GGACATCTACGGCTTCTTCG-3´ 5´-AGCTGCAGGTACTGCGTCAT-3´	720	6
aac(6´)-Ib	5´-TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA-3´ 5´-CTCGAATGCCTGGCGTGTTT-3´	482	15

برای تمایز ژن *aac (6´)-Ib* از واریانت *aac -cr Ib-(6´)* آن‌که در ارتباط با مقاومت به کینولون‌هاست، هضم آنزیمی انجام شد. محصول PCR برای ژن *aac Ib-(6´)* با آنزیم BtsCI هضم شد (Fermentase, England). در صورت برش آن به قطعات 272-bp و 210-bp نشان دهنده *aac (6´)-Ib*، اما عدم برش نشان دهنده واریانت *aac (6´)-Ib-cr* بود.

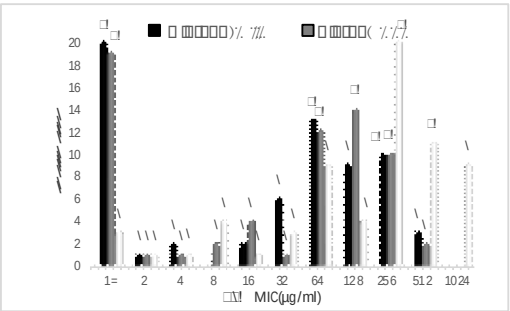
در پایان، داده‌ها با استفاده از نسخه 20 نرم‌افزار SPSS به‌وسیله تست‌های آماری کای دو (Chi-square) و T-Test تحلیل شدند. مقادیر p کم‌تر از 0/05 معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

در مطالعه حاضر از مجموع 3200 نمونه ادراری، 240 جدایه *اشرشیا کلی* جداسازی شد (7/5 درصد)، از میان کل جدایه‌ها *اشرشیا کلی*، تعداد 66 جدایه (27/5 درصد) مولد ESBL بودند که متعلق به 57 نفر زن (86/4 درصد) و 9 نفر (13/6 درصد) مرد بودند. میانگین سنی بیماران 22/1± 43/5 سال و ماکزیمم سن 97 سال و مینیمم سن 1 سال بود. از نظر توزیع سنی بیماران مورد مطالعه، در گروه سنی زیر 20 سال 12 نفر (18/2 درصد)، 40-21 سال 14 نفر (21/2 درصد) و گروه سنی بالای 40 سال 40 نفر (60/6 درصد) بودند. بر اساس نتایج حاصل از آزمون دیسک دیفیوژن میزان مقاومت به کینولون‌ها در جدایه‌های مولد ESBL بالاتر بود (جدول شماره 2) و بر طبق نتایج آزمون میکرودایلوشن براث تعداد 56 جدایه (84/8 درصد) نسبت به نالیدیکسیک اسید و 45 جدایه (68/1 درصد) نسبت به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین مقاوم بودند. در کل 45 جدایه (68/1 درصد) به هر سه آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه مقاوم بودند و فقط 9 جدایه (13/6 درصد) به آن‌ها حساسیت داشتند. در بیشتر جدایه‌ها میزان مقاومت به کینولون‌ها بالا MIC≥ (64 میکروگرم در هر میلی‌لیتر) بود (نمودار شماره 1).

جدول شماره 2: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های *اشرشیا کلی* ESBL مثبت و منفی با روش دیسک آگار دیفیوژن

آنتی بیوتیک ها / ESBL	ESBL مثبت 66(27/5)			ESBL منفی 174(72/5)		
	مقاوم	نیمه‌مقاوم	حساس	مقاوم	نیمه مقاوم	حساس
سفتازیدیم	33(5)	17(25/7)	16(24/3)	4(2/3)	5(2/9)	165(94/8)
سفوتاکسیم	63(95/5)	1(1/5)	2(3)	6(3/5)	3(1/7)	165(94/8)
سفتریاکسون	65(98/5)	0	1(1/5)	4(2/3)	5(2/9)	165(94/8)
سیپروفلوکساسین	43(65/2)	4(6)	19(28/8)	35(20/1)	6(3/5)	133(76/4)
لووفلوکساسین	44(66/7)	3(4/5)	19(28/8)	37(21/3)	4(2/3)	133(76/4)
نالیدیکسیک اسید	56(84/8)	0	10(15/2)	37(21/3)	0	137(78/7)



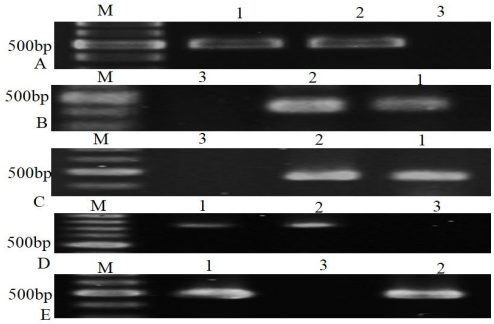
نمودار شماره 1: توزیع جدایه‌های *اشرشیا کلی* مولد ESBL بر حسب مقدار MIC(µg/ml) برای سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید

محصول PCR حاصل از ژن‌های *qnrA*، *qnrB*، *qnrS*، *aac(6')-Ib* و *qepA* به ترتیب 516، 469، 417، 482 و 720 جفت باز بود (تصویر شماره 1). در مورد ژن‌های PMQR در جدایه‌های *اشرشیا کلی*، از میان 66

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 17:54 +0330 on Monday December 18th 2017

جدایه، 51 (77/2 درصد) جدایه حداقل یکی از ژن‌های PMQR را دارا بودند. ژن *qnrB* در 27 جدایه (40/9 درصد)، *qnrA* در 19 جدایه (28/7 درصد)، *qnrs* در 3 جدایه (4/5 درصد) و *qepA* در 2 جدایه (3 درصد) تشخیص داده شد. تعداد 43 جدایه (65/1 درصد) دارای ژن *aac(6´)-Ib* بودند که 38 (88/4 درصد) مورد آن‌ها با آنزیم BtsCI برش نخوردند که نشانگر واریانت *cr* بودند. در مورد ارتباط بین ژن *aac(6´)-Ib-cr* و مقاومت به سیپروفلوکساسین، مشخص شد که در میان جدایه‌های دارای این ژن، 48/5 درصد به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند که از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p=0/002). اما در مورد ژن *qepA* علی‌رغم این که تنها در جدایه‌های مقاوم یافت شدند، اما بین حضور این ژن و مقاومت به سیپروفلوکساسین ارتباط معنی‌داری وجود نداشت (p =0/559). ارتباط بین حضور ژن‌های *qnr* و مقاومت به سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید نیز از لحظ آماری بررسی شد (جدول شماره 3).

از میان 51 جدایه‌هایی که دارای ژن‌های PMQR، 31 (60/8 درصد)، 34 (66/6 درصد) و 43 (84/3 درصد) جدایه به ترتیب دارای MIC بالا (MIC≥64 میکروگرم در هر میلی لیتر) برای سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید بودند. در حالی که از 15 جدایه فاقد ژن‌های PMQR، فقط 4 جدایه (26/6 درصد) برای سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین دارای MIC≥ 64 بودند. آنالیز آماری داده‌های فوق یک رابطه معنی‌دار بین افزایش MIC آنتی‌بیوتیک‌ها و ژن‌های PMQR را نشان داد (سیپروفلوکساسین p= 0/024، لووفلوکساسین p=0/045 و نالیدیکسیک اسید p=0/02). از نظر آماری اختلاف قابل توجهی بین میزان MIC جدایه‌های دارای یک ژن مقاومت PMQR با جدایه‌هایی که بیش از یک ژن داشتند وجود نداشت (سیپروفلوکساسین p=0/2، لووفلوکساسین p=0/3 و نالیدیکسیک اسید p=0/8). با این وجود میزان MIC در جدایه‌هایی که ژن‌های بیش‌تری داشتند بالاتر بود. در جدایه‌های دارای ژن‌های *qnrA*، *qnrB* و *aac(6´)-Ib-cr* مقدار MIC سیپروفلوکساسین نسبت به جدایه‌هایی که دارای ژن‌های *qnrB* و *aac(6´)-Ib-cr* بالاتر بود (سیپروفلوکساسین p=0/008). هم‌چنین در جدایه‌های دارای ژن‌های *qnrA* و *aac(6´)-Ib-cr* میزان MIC سیپروفلوکساسین نسبت به جدایه‌هایی که دارای ژن‌های *qnrB* و *aac(6´)-Ib-cr*، بالاتر بود (سیپروفلوکساسین p=0/007). مقدار MIC لووفلوکساسین جدایه‌هایی که دارای ژن *qnrA بودند* نسبت به جدایه‌های دارای *qnrB*، بالاتر بود (لووفلوکساسین p= 0/05) (جدول شماره 4).



تصویر شماره 1: الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR ژن های qnrA (A)، qnrB (B)، qnrS (C)، qepA (D) و aac(6')-Ib (E). ردیف M: مارکر (DNA ladder, 100bp)، ردیف1: کنترل مثبت، ردیف2 : qnrA، qnrB، qnrS، qepA، aac(6´)-Ib ردیف3: کنترل منفی

جدول شماره 3: ارتباط بین ژن‌های PMQR با مقاومت به سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید

ژن های PMQR	سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین				سطح معنی داری	نالیدیکسیک اسید				سطح معنی داری
	دارای ژن		بدون ژن			دارای ژن		بدون ژن		
	مقاوم	حساس	مقاوم	حساس		مقاوم	حساس	مقاوم	حساس	
qnrA	(25/7) 17	(3/1) 2	(42/4) 28	(28/8) 19	0/021	(25/7) 17	(3/1) 2	(42/4) 28	(28/8) 19	0/021
qnrB	(33/4) 22	(7/6) 5	(34/8) 23	(24/2) 16	0/065	(36/4) 24	(4/5) 3	(31/8) 21	(27/3) 18	0/003
qnrs	(4/5) 3	(0) 0	(63/7) 42	(31/8) 21	0/546	(4/5) 3	(0) 0	(63/7) 42	(31/8) 21	0/546

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 17:54 +0330 on Monday December 18th 2017

جدول شماره 4: توزیع جدایه های دارای ژن های PMQR بر حسب مقدار(MIC(µg/ml سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید

ژن های PMQR	تعداد جدایه ها	سیپروفلوکساسین			لووفلوکساسین			نالیدیکسیک اسید		
		<0/5–4	8-64	128–256<	<0/5–4	8-64	128–256<	<0/5–4	8-64	128–256<
Aac(6´)-Ib-cr +qnrA+qnrB+qepA	1		1			1				1
Aac(6´)-Ib-cr +qnrA+qnrB+qnrS	1			1			1			5
Aac(6´)-Ib-cr +qnrA+qnrB	5		3	2		3	2			5
qnrA+qnrB	1		1			1				1
qnrA+ Aac(6´)-Ib-cr	7	1	2	4	1	1	5	1	1	5
qnrB+ Aac(6´)-Ib-cr	13	2	7	4	2	4	7		2	11
qepA+ Aac(6´)-Ib-cr	1	1			1				1	
qnrA	4	1	1	2	1	1	2	1	1	2
qnrB	6	3	3		3	3		1	1	4
Aac(6´)-Ib-cr	10	1	2	5	3	2	5	1	4	5
qnrS	2		1	1		1	1			2

بحث

جدایه‌های مولد ESBL معمولاً به گروه‌های مختلف آنتی بیوتیک‌ها از جمله کینولون‌ها مقاومت بالایی دارند، به‌طوری که تحقیقات نشان داده که مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه‌های *اشرشیاکلی* مولد ESBL بالاتراز جدایه‌های فاقد ESBL است(19، 16). در مطالعه حاضر نیز میزان بالای مقاومت به نالیدیکسیک‌اسید، سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین در جدایه‌های *اشرشیاکلی* مولد ESBL دیده شد که با یافته‌های فوق هماهنگی دارد. البته مقاومت به نالیدیکسیک‌اسید نسبت به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین بالاتر بود که احتمالاً با استفاده بیش از پنج دهه از این آنتی بیوتیک قابل توجیه می‌باشد(20). گرچه عامل اصلی مقاومت به کینولون‌ها موتاسیون در ژن‌های هدف کینولون‌ها است اما در سال‌های اخیر ژن‌های مقاومت به کینولون وابسته به پلاسمید (PMQR) به دلیل قابلیت بالای انتقال پذیری افقی در گسترش جدایه‌های مقاوم به کینولون‌ها نقش داشته‌اند(21). نتایج مطالعه حاضر بیانگر فراوانی بالای ژن‌های *qnr* ، *aac(6')-Ib-cr* و *qepA* در میان جدایه‌های *اشرشیا کلی* مولد ESBL در شهر کرمانشاه است. به طوری که در مطالعه حاضر، فراوانترین ژن PMQR، ژن *aac(6´)-Ib-cr* بود. این ژن اولین بار در سال 2003 روی پلاسمیدی که ژن *CTX-M15* را حمل می‌کرد در میان جدایه‌های انتروباکتریاسه تشخیص داده شد(22). فراوانی بالای این ژن در میان جدایه‌های مولد ESBL قبلاً در دیگر مطالعات نیز گزارش شده است، به طوری که در مطالعه‌ای که Karah و همکارانش در نروژ و سوئد انجام دادند ژن‌های *aac(6´)-Ib-cr* و *qnr* در میان جدایه‌های مولد ESBL فراوانی بالاتری داشتند. در مطالعه ای که گودرزی و همکاران درتهران روی جدایه‌های *اشرشیاکلی* مولد ESBL انجام دادند نیز این ژن فراوانی بالایی (74/7 درصد) داشت. هم‌چنین در گزارشی از سوریه توسط Alheib و همکارانش، فراوانی ژن *aac(6´)-Ib-cr* در میان جدایه‌های *اشرشیا کلی* مولد ESBL، 78/7 درصد بود(23، 19، 4).

در مطالعه حاضر، فراوانی ژن‌های *qnrA* ، *qnB* و *qnrS* بالاتر از نتایج تعدادی از مطالعات پیشین بود(27، 24) و فراوان‌ترین ژن *qnr*، ژن *qnrB* بود به طوری که در دیگر مطالعات نیز گزارش شده(21، 23) البته نتایج تعدادی از مطالعات پیشین در ایران از جمله مطالعه حریفی و همکاران در مشهد و مطالعه پاکزاد و همکاران در مرکز ایران فراوانی ژنهای *qnr* در میان جدایه‌های *اشرشیا کلی* مولد ESBL به این مطالعه نزدیک است(28، 18). به نظر می‌رسد ارتباطی بین ESBL با ژن‌های *qnr* و *aac(6´)-Ib-cr* وجود داشته باشد و اغلب پلاسمیدهایی که ژن‌های بتالاکتاماز را حمل می‌کنند توانایی حمل ژن‌های PMQR را هم دارند(29، 19).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 17:54 +0330 on Monday December 18th 2017

در جدایه‌های مورد بررسی ژن *qepA* تنها در دو جدایه (3 درصد) یافت شد. پمپ برونریز *qepA*، اولین بار در سال 2007 در دو جدایه *اشرشیا کلی* از ژاپن و بلژیک مطرح شد(30، 31) و یک واریانت جدید آن (QepA2) در فرانسه یافت شد(32). بنابراین شیوع این ژن هنوز گسترش نیافته است و در بیش‌تر مطالعات صفر یا بسیار پایین گزارش شده که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد(7، 19، 23) همچنین جدایه‌هایی که ژن *qnrA* را حمل می‌کردند مقدار MIC بالاتری داشتند که این احتمال را مطرح می‌کند این ژن می‌تواند در ایجاد سطح بالای مقاومت به کینولون‌ها نقش داشته باشد.

فراوانی ژن *aac(6´)-Ib-cr* در میان جدایه‌های دارای ژن *qnr* (71 درصد) نسبت به جدایه‌های فاقد ژن *qnr* (29 درصد) بالاتر بود که با مطالعه Yan Jiang و همکارانش در چین هم خوانی دارد که می‌تواند بیانگر انتقال مشترک این ژن‌ها باشد(5).

yugendran و همکارانش در هند نشان دادند که بین افزایش MIC و حضور ژن‌های PMQR ارتباط وجود دارد(34). در این مطالعه نیز ژن‌های *qnr* و *aac(6´)-Ib-cr* در جدایه‌های با MIC بالاتر (64 ≤MIC) فراوانی بیشتری داشتند. حضور آن‌ها ایجاد موتاسیون‌ها در ژن‌های کروموزومی مثل DNA ژیراز و توپوایزومراز IV را تسهیل می‌کند و احتمالاً این ژن‌ها در ایجاد سطح بالای مقاومت نقش دارند(35). بنابراین درمان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله جدایه های دارای ژن‌های PMQR با کینولون‌ها، ممکن است سبب افزایش میزان شکست در درمان شود(4).

نتایج این مطالعه بیانگر فراوانی نسبتاً بالای ژن‌های PMQR در جدایه‌های *اشرشیا کلی* مولد بتالاکتامازهای طیف گسترده در کرمانشاه است. ژن‌های *aac(6´)-Ib-cr* و *qnrB* شایع‌ترین بودند. هم‌چنین ژن *qepA* در جدایه‌ها یافت شد که به ندرت در ایران گزارش شده است. ارتباطی بین مقاومت به بتالاکتام‌ها و کینولون‌ها مشاهده شد که می‌تواند بیانگر انتقال مشترک ژن‌های مقاومت کینولونی به وسیله پلاسمیدهای ناقل ESBL باشد. در نتیجه شناسایی سویه‌های *اشرشیا کلی* عامل عفونت ادراری که دارای ESBL هستند می تواند نشان دهنده احتمال داشتن مقاومت بالا به کینولون‌ها باشد. هم چنین در این مطالعه ارتباط بین ژن‌های PMQR با افزایش میزان MIC جدایه‌ها معنی‌دار بود. بنابراین قبل از تجویز کینولون‌ها انجام آزمایش غربالگری ESBL پیشنهاد می‌شود تا بتوان از روند روبه افزایشی مقاومت به این دسته دارویی پیشگیری نمود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی کرمانشاه تقدیر و تشکر می‌گردد.این مقاله بخشی از پایان نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی می‌باشد.

References

1. Akya A, Najafi F, Sohrabi N, Vaziri S, Mansouri F, Aziziand M, et al. The systematic review of quinolones resistance of Escherichia coli isolated from urinary tract infections in Iran over the last ten years)2001-2011). Annu Res Rev Biol .2015;6(4):234-244.

2. Briales A, Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, Diaz de Alba P, Rodriguez-Bano, Martinez-Martinez L, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6')-Ib-cr in Escherichia coli and klebsiella pneumonia producing extended-spectrum β-lactamase in

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 17:54 +0330 on Monday December 18th 2017

spain. Int J Antimicrob Agents 2012; 39(5):431-434.

3. Rodriguez-Martinez JM, Cano ME, Velasco C, Martinez-Martinez L, Pascual Al. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J Infect Chemother 2011;17(2):149–182.
4. Karah N, Poirel L, Bengtsson S, Sundqvist M, Kahlmeter G, Nordmann P, et al. plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6)-Ib-cr in Escherichia coli and klebsiella spp. From Norway and Sweden. Diagn Microbiol Infect Dis 2010; 66(4): 425-431.
5. Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(60)- Ib-cr in extended-spectrum b-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in China. J Antimicrob Chemother. 2008; 61(5): 1003-1006.
6. Kang HY, Tamang MD, Seol SY, Kim J. Dissemination of Plasmid-mediated qnr, aac(6')-Ib-cr, and qepA Genes Among 16S rRNA Methylase Producing Enterobacteriaceae in Korea. J Bacteriol Virol 2009; 39(3) :173-182
7. Hassan WM, Hashim A, Domany R. Plasmid mediated quinolone resistance determinants qnr, aac(6')-Ib-cr, and qep in ESBL-producing Escherichia coli clinical isolates from Egypt. Indian J Med Microbiol 2012;30(4):442-447.
8. Cattoir V, Poire 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 2007; 60(2): 394-397.
9. Shams E, Firoozeh F, Moniri R, Zibaei M. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes among Extended-Spectrum -Lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae Human Isolates in Iran. J Pathog 2015: 2015: 434391.
10. Lavilla S, Gonzalez-Lopez JJ, Sabate M, Garcia-Fernandez A, Larrosa MN, Bartolome RM, et al. Prevalence of qnr genes among extended-spectrum beta-¬lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. J Antimicrob Chemother 2008; 61(2):291-295.
11. Fauci S, Braunwald E, Kasper DL, et al. Harrison's principles of internal medicine. 17th ed. USA: McGraw-Hill; 2008
12. Koneman EW. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Washington C; LWW. 2006
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-second Informational Supplement M100-S22. Wayne, PA, USA: CLSI; 2012.
14. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. qnr Prevalence in Ceftazidime-Resistant Enterobacteriaceae Isolates from the United States. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(8):2872-2874
15. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of aac(6)-Ib-cr Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. Antimicrob Agents Chemother 2006;50(11): 3953–3955.
16. Raei F, Eftekhar F, Feizabadi MM. Prevalence of Quinolone Resistance Among Extended-Spectrum beta-Lactamase Producing Uropathogenic Klebsiella pneumoniae. Jundishapur J Microbiol 2014;7(6):e10887 (persian).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 17:54 +0330 on Monday December 18th 2017

17. Hsueh P R. Study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART) in the Asia-Pacific region, 2002–2010. Int J Antimicrob Agents 2012;40(1):S1–S3.
18. Pakzad I, Ghafourian S, Taherikalani M, sadeghifard N, Abtahi H, Rahbar M, et al. qnr Prevalence in Extended Spectrum Beta-lactamases (ESBLs) and None-¬ESBLs Producing Escherichia coli Isolated from Urinary Tract Infections in Central of Iran. Iran J Basic Med Sci 2011;14(5):458-464.(persian).
19. Goudarzi M, Azad M, Seyedjavadi SS. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in extended-spectrum β-lactamase producing Escherichia coli isolated from patients with nosocomial urinary tract infection in Tehran, Iran. Scientifica .2015; 2015
20. Firoozeh F, Zibaei M, Soleimani-Asl Y. Detection of plasmid-mediated qnr genes among the quinolone-resistant Escherichia coli isolates in Iran. J Infect Dev Ctries 2014; 8(7):818-822.
21. Bouchakour M, Zerouali Kh, Perrier Gros Claude JD, Amarouch H, Mdaghri NE, Courvalin P, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae in Morocco. J Infect Dev Ctries 2010; 4(12):799-803.
22. Ambrozic Avgustin J, Keber R, Zerjavic K, Orazem T, Grabnar M. Emergence of the quinolone resistance-mediating gene aac(6')-Ib-cr in extended-spectrum-beta- lactamase-producing Klebsiella isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005. Antimicrob Agents Chemother 2007;51(11):4171-4173.
23. Alheib O, Al Kayali R, Abajy MY. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Determinants Among Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBL)-Producing Isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Aleppo, Syria. Arch Clin Infect Dis 2015; 10(3): e20631.(Persian)
24. Jacoby GA, Chow N, Waites KB. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother 2003;47(2):559–562.
25. Kim NH, Choi EH, Sung JY, Oh CE, Kim HB, Kim EC, et al. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes and Ciprofloxacin Resistance in Pediatric Bloodstream Isolates of Enterobacteriaceae over a 9-Year Period. Jpn J Infect Dis 2013; 66(2): 151-154.
26. Zhou TL, Chen XJ, Zhou MM, Zhao YJ, Luo XH, Bao QY. prevalence of plasmid-mediated quinolone resistancein Escherichia coli isolates in Wenzhou, southern china, 2002-2008. Jpn J Infect Dis .2011; 64(1): 55-57.
27. Yang H, Chen H, Yang Q, Chen M, Wang H. High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes qnr and aac(6)-Ib-cr in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae from Nine Teaching Hospitals in China. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(12): 4268-4273.
28. Harifi Mood E, Meshkat Z, Izadi N, Rezaei M, Jamehdar SA, Naderi Nasab M, et al. Prevalence of Quinolone Resistance Genes Among Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing Escherichia coli in Mashhad, Iran. Jundishapur J Microbiol .2015; 8(12): e16217.
29. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. Lancet Infect Dis 2006; 6(10): 629-640.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 17:54 +0330 on Monday December 18th 2017

30. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an Escherichia coli clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(9): 3354–3360.

31. Perichon B, Courvalin P, Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(7): 2464–2469.

32. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an Escherichia coli isolate from France. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(10): 3801–3804.

33. Yang HY, Nam YS, Lee HJ. prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes among ciprofloxacin-nonsusceptible Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from blood cultures in Korea. Can J Infect Dis Med Microbiol 2014; 25 (3): 163-169.

34. Yugendran T, Harish B N. High incidence of plasmid-mediated quinolone resistance genes among ciprofloxacin-resistant clinical isolates of Enterobacteriaceae at a tertiary care hospital in Puducherry, India. PeerJ. 2016 4:e1995.

35. ¬Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. Lancet Infect Dis 2006; 6(10): 629-640.