

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

Roya Chegenelorestani¹,
Alisha Akya²,
Azam Elahi¹, Yazdan Hamzavi³

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-mediated 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-mediated resistant genes

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

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

رویا چگنه لرستانی¹

علیشا اکیا²

اعظم الهی¹

یزدان حمزوی³

چکیده

سابقه و هدف: مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید در توسعه مقاومت به کینولون ها در باکتری ها نقش مهمی دارد. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی ژن های PMQR در جدایه های /شرشیا کلی مولد بتالاکتامازهای طیف گسترده (ESBL) بود.

مواد و روش ها: این مطالعه بر روی 240 نمونه /شرشیا کلی جدا شده از نمونه ادرار بیماران در کرمانشاه انجام شد. تست تعیین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک های منتخب به روش دیسک دیفیوژن و میکرودايلوشن برات انجام گرفت. جدایه های تولید کننده ESBL با استفاده از آزمون دیسک ترکیبی شناسایی شدند. ژن های *qnrA*، *qnrB*، *qnrS*، *aac(6')*، *qepA* و *Ib* 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. داده ها توسط روش های آماری تحلیل شدند.

یافته ها: 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. ژن های *qnrA*، *qnrB*، *qnrS* و *qepA* به ترتیب در 28/7 درصد، 40/9 درصد، 4/5 درصد و 3 درصد از جدایه ها یافت شدند. ژن *aac(6')-Ib* در 65/1 درصد از جدایه ها یافت شد که از این ها 88/4 درصد از نوع واریانت *aac(6')-Ib-cr* بودند.

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

واژه های کلیدی: /شرشیا کلی، کینولون ها، ژن های مقاومت وابسته به پلاسمید.

مقدمه

با افزایش روند مقاومت جدایه های /شرشیا کلی به آنتی بیوتیک ها، درمان عفونت های آن، از جمله عفونت

Email: akya359@yahoo.com

مؤلف مسئول: علیشا اکیا - کرمانشاه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

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، دانشکده علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه

تاریخ دریافت: 1395/10/11 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1395/10/29 تاریخ تصویب: 1396/2/11

عفونت ادراری به کار 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* و *qnrD*) به خانواده پنتاپتیدهای 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 به وسیله N استیله کردن پیرازینیل 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 هیدروفلیک (سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین) می‌شود (6).

پژوهش‌ها یک ارتباط قوی مثبت بین جدایه‌های دارای ژن‌های *qnr* و جدایه‌های مولد ESBL را نشان داده‌اند (8). به طوری 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 *شرشیا لی* مولد بتالاکتامازهای طیف گسترده بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی تعداد 240 جدایه *شرشیا 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 علائم بالینی نداشتند از مطالعه حذف شدند. از طرفی اطلاعات بیماران از نظر سن و جنس گردآوری شد. پس از جمع‌آوری نمونه‌های ادراری، سویه‌های *شرشیا 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

CLSI (Institute شرکت MAST (England, Merseyside شامل سفنازیدیم (30 میکرو گرم)، سفوتاکسیم (30 میکرو گرم)، سفتریاکسون (30 میکرو گرم)، سیپروفلوکساسین (5 میکرو گرم)، لووفلوکساسین (5 میکرو گرم) و نالیدیکسیک اسید (30 میکرو گرم) انجام شد. جهت کنترل کیفی از سویه های استاندارد/شرشیا کلی ATCC25922 استفاده شد. در پایان قطر هاله عدم رشد اندازه گیری و بر اساس جداول CLSI تفسیر شد (13).

برای تشخیص جدایه های مولد ESBL از میان کل جدایه ها از تست فنوتیپی تائیدی (Phenotypic confirmatory tests) استفاده شد. در این روش از دیسک های ترکیبی شامل سفنازیدیم (30 میکرو گرم) همراه اسید کلانولانیک (10 میکرو گرم) و سفوتاکسیم (30 میکرو گرم) همراه اسید کلانولانیک MAST (10 میکرو گرم) استفاده شد. در صورتی که قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف دیسک ترکیبی، حداقل 5 میلی متر یا بیش تر از قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک منفرد همان آنتی بیوتیک بود، به عنوان جدایه مولد ESBL قلمداد گردید (13). از سویه استاندارد/شرشیا کلی ATCC 35218 به منظور کنترل کیفی جدایه های مولد ESBL استفاده شد (13). سپس برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) جدایه های مولد ESBL نسبت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید (Sigma, USA) از روش میکرو دایلوژن برات استفاده شد. در این روش ابتدا از کشت 24 ساعته جدایه ها روی محیط مولر هیتون آگار، رقتی معادل کدورت نیم مک فارلند تهیه و طبق دستور کار CLSI رقیق شد. به طوری که غلظت نهایی باکتری ها در هر چاهک میکرو پلیت 10^5 باکتری بود. غلظت های 0/015 میکرو گرم در هر میلی لیتر تا 1024 میکرو گرم در هر میلی لیتر برای هر سه آنتی بیوتیک به کار رفت. هر چاهک میکرو پلیت حاوی

حجم نهایی 200 میکرو لیتر شامل محیط کشت، آنتی بیوتیک و سوسپانسیون باکتری بود. محیط مولر هیتون برات به همراه باکتری و بدون آنتی بیوتیک به عنوان کنترل مثبت و هم چنین محیط مولر هیتون برات به تنهایی بدون باکتری به عنوان کنترل منفی به کار رفت. پانل ها 24 ساعت در 37 درجه سانتی گراد انکوبه شدند و کم ترین غلظت آنتی بیوتیک در چاهکی که هیچ کدورتی از رشد باکتری در آن مشاهده نشد، معادل MIC بر آورد گردید (13). از سویه/شرشیا کلی ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی استفاده شد. میزان Breakpoints پیشنهادی توسط CLSI برای نالیدیکسیک اسید بصورت حساس (≥ 16 میکرو گرم در هر میلی لیتر) مقاوم (≤ 32 میکرو گرم در هر میلی لیتر)، برای سیپروفلوکساسین حساس (≥ 1 میکرو گرم در هر میلی لیتر) و مقاوم (≤ 4 میکرو گرم در هر میلی لیتر) و در مورد لووفلوکساسین حساس (≥ 2 میکرو گرم در هر میلی لیتر) و مقاوم (≤ 8 میکرو گرم در هر میلی لیتر) بود (13). DNA جدایه ها با روش جوشاندن استخراج شد. وجود ژن های *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*, *aac (6)-Ib* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (سینا کلون، تهران) مشخص شدند. واکنش PCR در حجم نهایی 25 میکرو لیتر (12/5 میکرو لیتر مسترمیکس شرکت سینا کلون، 2 میکرو لیتر از هر پرایمر و 2 میکرو لیتر 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 سانتی گراد، مرحله باز شدن دو رشته DNA 1 دقیقه در 94 درجه سانتی گراد، مرحله اتصال پرایمرها 1 دقیقه در 55 درجه سانتی گراد برای *qnrA* و *qnrB*، 53 درجه سانتی گراد برای *qnrS* و *aac (6)-Ib*، مرحله طولیل شدن رشته هدف به مدت 1 دقیقه در 72 درجه سانتی گراد و مرحله طولیل 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

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
<i>qnrA</i>	5'-TCAGCAAGAGGATTCTCA-3' 5'-GCCAGCACTATTACTCCA-3'	516	14
<i>qnrB</i>	5'-GATCGTGAAAGCCAGAAAGG-3' 5'-ACGATGCCTGGTAGTTGTC-3'	469	14
<i>qnrS</i>	5'-ACGACATTCTGCACTGCA-3' 5'-TAAATTGGCACCCTGTAGGC-3'	417	14
<i>qepA</i>	5'-GGACATCTACGGCTTCTCG-3' 5'-AGCTGCAGGTACTGCGTCAT-3'	720	6
<i>aac(6)-Ib</i>	5'-TTGCGATGCTCTATGAGTGGTA-3' 5'-CTCGAATGCCTGGCGTGTT-3'	482	15

برای تمایز ژن *aac(6)-Ib* از واریانت *aac-cr* *aac(6)-Ib* آن که در ارتباط با مقاومت به کینولون هاست، هضم آنزیمی انجام شد. محصول PCR برای ژن *aac(6)-Ib* 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، داده ها با استفاده از نسخه 20 نرم افزار SPSS به وسیله تست های آماری کای دو (Chi-square) و T-Test تحلیل شدند. مقادیر p کم تر از 0/05 معنی دار در نظر گرفته شد.

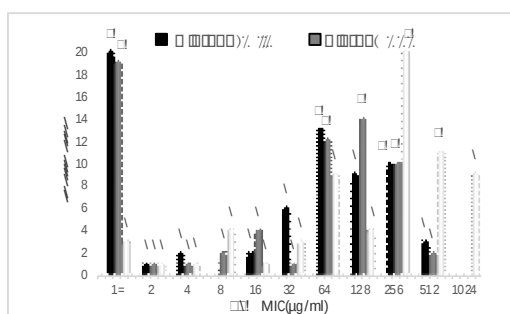
یافته ها

در مطالعه حاضر از مجموع 3200 نمونه اداری، 240 جدایه /شرشیا کلی جداسازی شد (7/5 درصد)، از میان کل جدایه ها /شرشیا 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 $43/5 \pm 22/1$ سال و ماکزیم سن 97 سال و مینیم سن 1 سال بود. از نظر توزیع سنی بیماران مورد مطالعه، در گروه سنی زیر 20 سال 12 نفر (18/2 درصد)، 21-40 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 کینولون ها در جدایه های مولد ESBL بالاتر بود (جدول شماره 2) و بر طبق نتایج آزمون میکرودايلوژن برات تعداد 56 جدایه (84/8 درصد) نسبت به نالیدیسیک اسید و 45 جدایه (68/1 درصد) نسبت به سیروفلو کساسین و لووفلو کساسین مقاوم بودند. در کل 45 جدایه (68/1 درصد) به هر سه آنتی بیوتیک مورد مطالعه مقاوم بودند و فقط 9 جدایه (13/6 درصد) به آن ها حساسیت داشتند. در بیشتر جدایه ها میزان مقاومت به کینولون ها بالا $\leq MIC$ (64 میکرو گرم در هر میلی لیتر) بود (نمودار شماره 1).

جدول شماره 2: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های /شرشیا کلی ESBL مثبت و منفی با روش دیسک دیفیوژن

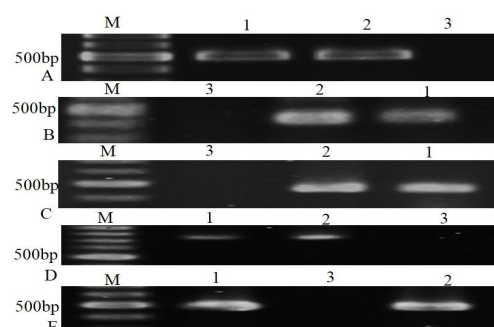
آنتی بیوتیک ها	ESBL	ESBL مثبت (66/27/5)			ESBL منفی (174/72/5)		
		مقاوم	نیمه مقاوم	حساس	مقاوم	نیمه مقاوم	حساس
مفترایم	(5)33	17(25/7)	16(24/3)	4(2/3)	5(2/9)	165(94/6)	165(94/6)
مفروکسیم	(63)95/6	1(1/5)	2(3)	6(3/5)	3(1/7)	165(94/6)	165(94/6)
مفراکین	(65)98/6	0	1(1/5)	4(2/3)	5(2/9)	165(94/6)	165(94/6)
سیروفلو کسین	(43)65/2	4(6)	19(28/8)	35(20/1)	6(3/5)	133(76/4)	133(76/4)
لووفلو کسین	(44)66/7	3(4/5)	19(28/8)	37(21/3)	4(2/3)	133(76/4)	133(76/4)
نالیدیسیک اسید	(56)84/8	0	10(15/2)	37(21/3)	0	137(78/7)	137(78/7)



نمودار شماره 1: توزیع جدایه های /شرشیا کلی مولد ESBL بر حسب مقدار MIC (μg/ml) برای سیروفلو کساسین، لووفلو کساسین و نالیدیسیک اسید

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

جدایه، 51 (77/2 درصد) جدایه حداقل یکی از ژن های 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 آن ها 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 جدایه های دارای این ژن، 48/5 درصد به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند که از لحاظ آماری معنی دار بود ($p=0/002$). اما در مورد ژن *qepA* علی رغم این که تنها در جدایه های مقاوم یافت شدند، اما بین حضور این ژن و مقاومت به سیپروفلوکساسین ارتباط معنی داری وجود نداشت ($p=0/559$). ارتباط بین حضور ژن های *qnr* و مقاومت به سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید نیز از لحاظ آماری بررسی شد (جدول شماره 3).



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)، ردیف 1: کنترل مثبت، ردیف 2: *qnrA*، *qnrB*، *qnrS*، *qepA*، *aac(6')-Ib*؛ ردیف 3: کنترل منفی

از میان 51 جدایه هایی که دارای ژن های PMQR، 31 (60/8 درصد)، 34 (66/6 درصد) و 43 (84/3 درصد) جدایه به ترتیب دارای MIC بالا ($MIC \geq 64$ میکروگرم در هر میلی لیتر) برای سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید بودند. در حالی که از 15 جدایه فاقد ژن های PMQR، فقط 4 جدایه (26/6 درصد) برای سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین دارای $MIC \geq 64$ بودند. آنالیز آماری داده های فوق یک رابطه معنی دار بین افزایش MIC آنتی بیوتیک ها و ژن های PMQR را نشان داد (سیپروفلوکساسین $p=0/024$ ، لووفلوکساسین $p=0/045$ و نالیدیکسیک اسید

جدول شماره 3: ارتباط بین ژن های 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

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<
<i>Aac(6')-Ib-cr + qnrA+qnrB+qepA</i>	1		1			1				1
<i>Aac(6')-Ib-cr + qnrA+qnrB+qnrS</i>	1			1			1			5
<i>Aac(6')-Ib-cr + qnrA+qnrB</i>	5		3	2		3	2			5
<i>qnrA+qnrB</i>	1		1			1				1
<i>qnrA+ Aac(6')-Ib-cr</i>	7	1	2	4	1	1	5	1	1	5
<i>qnrB+ Aac(6')-Ib-cr</i>	13	2	7	4	2	4	7		2	11
<i>qepA+ Aac(6')-Ib-cr</i>	1	1			1				1	
<i>qnrA</i>	4	1	1	2	1	1	2	1	1	2
<i>qnrB</i>	6	3	3		3	3		1	1	4
<i>Aac(6')-Ib-cr</i>	10	1	2	5	3	2	5	1	4	5
<i>qnrS</i>	2		1	1		1	1			2

بحث

جدایه های مولد ESBL معمولاً به گروه های مختلف آنتی بیوتیک ها از جمله کینولون ها مقاومت بالایی دارند، به طوری که تحقیقات نشان داده که مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه های اشرشیاکلی مولد ESBL بالاتر از جدایه های فاقد ESBL است (19)، (16). در مطالعه حاضر نیز میزان بالای مقاومت به نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین در جدایه های اشرشیاکلی مولد ESBL دیده شد که با یافته های فوق هماهنگی دارد. البته مقاومت به نالیدیکسیک اسید نسبت به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین بالاتر بود که احتمالاً با استفاده بیش از پنج دهه از این آنتی بیوتیک قابل توجیه می باشد (20). گرچه عامل اصلی مقاومت به کینولون ها موتاسیون در ژن های هدف کینولون ها است اما در سال های اخیر ژن های مقاومت به کینولون وابسته به پلاسمید (PMQR) به دلیل قابلیت بالای انتقال پذیری افقی در گسترش جدایه های مقاوم به کینولون ها نقش داشته اند (21). نتایج مطالعه حاضر بیانگر فراوانی بالای ژن های *qnr*، *Aac(6')-Ib-cr* و *qepA* در میان جدایه های اشرشیاکلی 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

می کرد در میان جدایه های انتروباکتریاسه تشخیص داده شد (22). فراوانی بالای این ژن در میان جدایه های مولد ESBL قبلاً در دیگر مطالعات نیز گزارش شده است، به طوری که در مطالعه ای که Karah و همکارانش در نروژ و سوئد انجام دادند ژن های *Aac(6')-Ib-cr* و *qnr* در میان جدایه های مولد ESBL فراوانی بالاتری داشتند. در مطالعه ای که گودرزی و همکاران در تهران روی جدایه های اشرشیاکلی مولد ESBL انجام دادند نیز این ژن فراوانی بالایی (74/7 درصد) داشت. هم چنین در گزارشی از سوریه توسط Alheib و همکارانش، فراوانی ژن *Aac(6')-Ib-cr* در میان جدایه های اشرشیاکلی مولد ESBL، 78/7 درصد بود (4، 19، 23).

در مطالعه حاضر، فراوانی ژن های *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* بالاتر از نتایج تعدادی از مطالعات پیشین بود (27)، (24). و فراوان ترین 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 ژن های *qnr* در میان جدایه های اشرشیاکلی مولد ESBL به این مطالعه نزدیک است (28)، (18). به نظر می رسد ارتباطی بین ESBL با ژن های *qnr* و *Aac(6')-Ib-cr* وجود داشته باشد و اغلب پلاسمیدهایی که ژن های بتالاکتاماز را حمل می کنند توانایی حمل ژن های PMQR را هم دارند (19، 29).

دارای ژن های PMQR با کینولون ها، ممکن است سبب افزایش میزان شکست در درمان شود (4).

نتایج این مطالعه بیانگر فراوانی نسبتاً بالای ژن های PMQR در جدایه های اشرشیا کلی مولد بتالاکتامازهای طیف گسترده در کرمانشاه است. ژن های *aac(6)-Ib-cr* و *qnrB* شایع ترین بودند. هم چنین ژن *qepA* در جدایه ها یافت شد که به ندرت در ایران گزارش شده است. ارتباطی بین مقاومت به بتالاکتامها و کینولون ها مشاهده شد که می تواند بیانگر انتقال مشترک ژن های مقاومت کینولونی به وسیله پلاسمیدهای ناقل ESBL باشد. در نتیجه شناسایی سویه های اشرشیا کلی عامل عفونت ادراری که دارای ESBL هستند می تواند نشان دهنده احتمال داشتن مقاومت بالا به کینولون ها باشد. هم چنین در این مطالعه ارتباط بین ژن های PMQR با افزایش میزان MIC جدایه ها معنی دار بود. بنابراین قبل از تجویز کینولون ها انجام آزمایش غریالگری ESBL پیشنهاد می شود تا بتوان از روند روبه افزایشی مقاومت به این دسته دارویی پیشگیری نمود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی میکروپزشناسی دانشکده پزشکی کرمانشاه تقدیر و تشکر می گردد. این مقاله بخشی از پایان نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد میکروپزشناسی می باشد.

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.

در جدایه های 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 بیش تر مطالعات صفر یا بسیار پایین گزارش شده که با نتایج مطالعه حاضر هم خوانی دارد (7، 19، 23). همچنین جدایه هایی که ژن *qnrA* را حمل می کردند مقدار MIC بالاتری داشتند که این احتمال را مطرح می کند این ژن می تواند در ایجاد سطح بالای مقاومت به کینولون ها نقش داشته باشد.

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

yugendran و همکارانش در هند نشان دادند که بین افزایش MIC و حضور ژن های PMQR ارتباط وجود دارد (34). در این مطالعه نیز ژن های *qnr* و *aac(6)-Ib-cr* در جدایه های با MIC بالاتر (64 $\geq$ MIC) فراوانی بیشتری داشتند. حضور آن ها ایجاد موتاسیون ها در ژن های کروموزومی مثل DNA ژیراز و توپوایزومراز IV را تسهیل می کند و احتمالاً این ژن ها در ایجاد سطح بالای مقاومت نقش دارند (35). بنابراین درمان عفونت های ایجاد شده به وسیله جدایه های

2. Briaies 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

- 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, Eftekhari F, Feizabadi MM. Prevalence of Quinolone Resistance Among Extended-Spectrum beta-Lactamase Producing Uropathogenic *Klebsiella pneumoniae*. *Jundishapur J Microbiol* 2014;7(6):e10887 (persian).

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 resistance in *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.

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.