



Frequency of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Kerman, Iran

Sohrab Rajaei, Nadia Kazemi-Pour, Farokh Rokhbakhsh-Zamin

Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2017/03/15

Accepted: 2017/06/17

Available online: 2017/08/08

Article Subject:

Drug Resistance

IJMM 2017; 11(3): 10-18

Corresponding author:

Dr. Nadia Kazemi-Pour

Department of Microbiology,
Kerman Branch, Islamic Azad
University, Kerman, Iran

Tel: 0989385625913

Email:

nadia_kazemi@yahoo.com

Abstract

Background and Aims: plasmid genes are responsible for resistance to quinolones and fluoroquinolones, so the present study aims to identify the presence of *qnr* and *aac* genes in clinical isolates of *P. aeruginosa*.

Materials and Methods: In 2016, 60 strains of *P. aeruginosa* were isolated from clinical specimens of patients in Kerman hospitals. Antibiotic resistance patterns were evaluated using Kirby-Bauer and microdilution methods against 10 antibiotics according to CLSI criteria. Specific primers and polymerase chain reaction were used to detect and amplify *qnr* and *aac(6)-Ib-cr* genes.

Results: Maximum antibiotic resistance was observed against cefexim (80%) and calidixic acid (75%) and minimum resistance against imipenem (25%) and ciprofloxacin (35%). The incidence rate of quinolone resistance genes were as follows: *qnr A* (16.66%), *qnrB* (13.33%), *qnrS* (11/66%) and *aac(6)-Ib-cr* (8/33%).

Conclusions: In the present study, *qnrA* gene had the highest incidence rates among the studied genes. Because of the importance of antibiotic resistance and the high prevalence of *qnr* genes found in this study, further studies need to be carried out on *qnr* resistance genes in the regional and national dimension.

KeyWords: *Pseudomonas aeruginosa*, PCR, *qnr*, *aac(6)-cr*, Antibiotic Resistance

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Rajaei S, Kazemi-Pour N, Rokhbakhsh-Zamin F. Frequency of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Kerman, Iran. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (3): 10-18



بررسی فراوانی ژن‌های مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید در جدایه های بالینی

سودوموناس آئروژینوزا در کرمان

سهراب رجائی، نادیا کاظمی پور، فرخ رخ بخش زمین

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: وجود ژن‌های پلاسمیدی در باکتری‌ها عامل ایجاد مقاومت به داروهای کینولونی و فلوروکینولونی می‌باشد. این مطالعه باهدف ارزیابی حضور ژن‌های *qnr* و *aac* در جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا انجام شد.

مواد و روش کار: در سال ۱۳۹۵ و در این مطالعه مقطعی تعداد ۶۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزا از منابع بالینی بیماران از آزمایشگاه سه بیمارستان در شهر کرمان جمع‌آوری شد. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش کربی-باثر و معیار CLSI نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک ارزیابی شد و در ادامه نیز مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید به روش براث میکرودایلوشن ارزیابی گردید. درنهایت با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و توسط روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز وجود ژن‌های *qnrSM* و *qnrBM* و *qnrAM* و *aac(6)-Ib-cr* ردیابی شد.

یافته‌ها: بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفکسیم (۸۰٪) و نالیدیکسیک اسید (۷۵٪) و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی پنم (۲۵٪) و سیپروفلوکساسین (۳۵٪) مشاهده گردید. بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نمونه‌ها، تعداد ۱۰ نمونه (۱۶/۶۶٪) *qnrA* مثبت، ۸ نمونه (۱۳/۳۳٪) دارای *qnrB* مثبت و ۷ نمونه (۱۱/۶۶٪) دارای *qnrS* مثبت و ۵ نمونه (۸/۳۳٪) *aac(6)-Ib-cr* مثبت بودند.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر ژن *qnrA* نسبت به بقیه ژن‌های مورد بررسی، آمار بیشتر شیوع را نمایانگر ساخت. باتوجه به فراوانی نسبتاً بالای ژن‌های *qnr* و اهمیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مطالعه بیشتر در بعد منطقه‌ای و ملی در مورد ژن‌های مقاومت *qnr* حائز اهمیت می‌باشد.

کلمات کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، PCR، *qnr*، *aac(6)-cr* مقاومت آنتی‌بیوتیکی

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۵

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۲۷

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۵/۱۷

موضوع:

مقاومت داوری

IJMM 1396; 11(3): 10-18

نویسنده مسئول:

دکتر نادیا کاظمی پور

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم

پایه، واحد کرمان، دانشگاه آزاد

اسلامی، کرمان، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۳۸۵۶۲۵۹۱۳

پست الکترونیک:

nadia_kazemi@yahoo.com

مقدمه

ژن‌های وابسته به پلاسمید *qnr*، بروز نموده و درمان عفونت‌های یادشده را بسیار پیچیده کرده است. مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید (PMQR) به دلیل گسترش سریع در بین باکتری‌ها نقش بسیار مهمی در مقاومت به این داروها ایفا می‌نماید. تاکنون سه نوع مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید کشف شده است که مهم‌ترین آن ژن‌های *qnr* می‌باشد. پلاسمیدها عناصر ژنتیکی خارج کروموزومی هستند که یکی از عوامل القای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها می‌باشند. اخیراً سه مکانیسم مقاومت وابسته به پلاسمید برای کینولون‌ها توصیف شده است. اولین

امروزه یکی از مشکلات مطرح و قابل توجه بهداشت جهانی، افزایش شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی عوامل بیماری‌زا در جمعیت‌های مختلف انسانی و حیوانی می‌باشد. عامل اصلی افزایش مقاومت باکتری‌های عوامل بیماری‌زا، استفاده بیش‌ازحد آنتی‌بیوتیک‌ها است. این امر موجب پیدایش و انتشار عوامل بیماری‌زا مقاوم و ژن‌های مقاومت در آنها می‌شود. در جمعیت‌های انسانی و حیوانی از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌منظور درمان و جلوگیری از بیماری‌های عفونی استفاده می‌گردد. در سال‌های اخیر مقاومت بالایی نسبت به داروها به‌ویژه در ارتباط با حضور

مقاومت نسبت به کینولون ها و فلوروکینولون ها می شوند، ژن های *qnr* بر روی پلاسمید حمل می شوند.

کینولون ها و فلورو کینولون ها برای درمان عفونت سویه های مقاوم استفاده می شوند، اما مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها بدون توجه به الگوهای مقاومتی منجر به ظهور سویه های جدید و مقاوم به درمان های چندگانه آنتی بیوتیکی شده است (۵). هدف از انجام این تحقیق ارزیابی حضور ژن های پلاسمیدی *qnr* در جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا در شهر کرمان بود.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه

در این مطالعه مقطعی و در طول یک سال از اردیبهشت ۱۳۹۴ لغایت اردیبهشت ۱۳۹۵ از بیماران سه بیمارستان سید الشهداء (ع)، افضلی پور و پیامبر اعظم کرمان تعداد ۶۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا جمع آوری گردید.

جداسازی و شناسایی

پس از جداسازی اولیه، تشخیص و تأیید سودوموناس آئروژینوزا بر مبنای جدول استاندارد تشخیصی و با استفاده از محیط های بلاداگار، SIM و MRVP (بیولایف - ایتالیا)، ائوزین متیلن بلو و سیمون سیترات (مرک - آلمان)، TSI، OF و اوره آگار (هایمدیا-هند) و تست های اکسیداز و کاتالاز (روسکو-دانمارک) و آزمون تخمیر قندها و استفاده از اسیدهای آمینه و توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس انجام شد (۶،۷).

سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های سودوموناس آئروژینوزا با روش استاندارد کربی - بائر (Kirby - Bauer) مطابق با دستورالعمل استاندارد جهانی (Clinical and Laboratory Standards Institute) بررسی شد. بدین منظور از کشت ۲۴ ساعته باکتری، سوسپانسیونی با کدورت نیم مک فارلند در سرم فیزیولوژی تهیه و سپس با استفاده از سوآب سترون از سوسپانسیون باکتری به صورت یکنواخت در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار (بیولایف - ایتالیا) تلقیح گردید. پس از چند دقیقه، دیسک های آنتی بیوتیکی را با استفاده از پنس سترون در سطح محیط کشت قرار داده شد. دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده شامل سیپروفلوکساسین (۵μg)،

مسیر مکانیسم وابسته به پروتئین های *qnr*، مربوط به تکرار خانواده پنتاپتید می باشد که توپوایزومراز تیپ دو را از مهار شدن توسط کینولون ها حفاظت می نماید. دومین مکانیسم شامل حضور پروتئین *aac(6)-Ib-cr* است که آنزیم آمینوگلیکوزیداز استیل ترانسفراز جدیدی را تولید می کند. این آنزیم باعث استیله کردن و در نتیجه کاهش فعالیت نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین می شود. سومین راه که اخیراً توصیف شده، مکانیسم انتقال کینولون توسط پمپ پروتئینی *qepA* می باشد. ژن های پلاسمیدی *qnrSM* و *qnrBM* و *qnrAM* باعث ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید می شوند. با مقایسه نتایج به دست آمده از حضور یا عدم حضور این ژن و نتایج به دست آمده از مقاومت آنتی بیوتیکی می توان به همبستگی بین این ژن ها و همچنین اثر هم افزایی یا کاهش توان مقاومتی با توجه به حضور هر یک از ژن ها پی برد (۱).

سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب به ویژه در افراد با ضعف سیستم ایمنی می باشد. این باکتری عامل مرگ و میر در بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس، لنفوم و سوختگی های شدید می باشد. حدود ۳۰ درصد از عفونت های بیمارستانی مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری می باشد. سودوموناس آئروژینوزا سومین عامل شایع و متداول عفونت های بیمارستانی پس از اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس است (۲،۳).

سودوموناس آئروژینوزا به فراوانی در طبیعت پخش شده و از محیط بیمارستان، وسایل پزشکی و پرسنل بیمارستان به آسانی جدا می گردد. این باکتری نسبت به بسیاری از مواد ضد عفونی کننده نظیر ترکیبات آمونیم، هگزا کلروفن، صابون ها و محلول های یددار مقاومت ذاتی دارد. استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها، مقاومت این باکتری به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف را به همراه داشته است. ایجاد سویه های با مقاومت چندگانه دارویی، چالش اصلی در درمان این باکتری در بخش های مهم بیمارستانی مانند مراقبت های ویژه و سوختگی می باشد (۴).

سویه های سودوموناس آئروژینوزا می توانند از روش های مختلف مقاومت آنتی بیوتیکی را کسب کنند. یکی از این راه ها مقاومت در اثر کسب ژن های *qnr* و *aac* می باشد. این ژن ها باعث

جهت طراحی و ساخت پرایمرهای مورد نیاز، نخست توالی ژن‌های مورد نظر از پایگاه NCBI استخراج و سپس یک جفت پرایمر اختصاصی برای هرژن با استفاده از نرم‌افزار Primer ۳ به آدرس <http://frodo.wi.mit.edu/primer> طراحی گردید، اختصاصی بودن پرایمرها توسط Primer-blast به آدرس <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> ارزیابی و ساختار ثانویه پرایمرها توسط نرم‌افزار oligo analyzer تأیید شد (۵).

جهت انجام PCR غلظت نهایی ۲۰ μL برای هرکدام از تیوب‌ها شامل پرایمرهای پیشرو و پیرو (۱۰ pmol) ۰/۶ μL MgCl₂ (۵۰ mM)، ۰/۸ μL آنزیم Taq DNA polymerase (۵ واحد) ۰/۳ μL بافر (۱۰×)، ۲ μL DNA الگو (۲ μg) (۵ μL)، ۵ μL dNTP (۱۰ mM) (۱ μL) (شرکت سیناژن - ایران) و ۶/۱ μL آب مقطر استریل در نظر گرفته شد (۲). در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (مدل TC9610D شرکت نیک تک - ایران) با شرایط دمایی ۵ دقیقه و اسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل و اسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگارز ۱ درصد واجد اتیدیوم بروماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. قطعات DNA به کمک دستگاه ژل داکيومنتیشن مشاهده و عکس برداری شدند.

نالیدیکسیک اسید (۳ μg)، لوفلوکسازین (۵ μg)، اوفلوکسازین (۵ μg)، نورفلوکسازین (۱۰ μg)، سفکسیم (۵ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، ایمی پنم (۱۰ μg)، تتراسایکلین (۳۰ μg) و سفتریاکسون (۳۰ μg) (روسکو - دانمارک) بودند. بعد از ۱۸-۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله ممانعت از رشد اطراف هر دیسک با استفاده از خط کش اندازه‌گیری شد و با استفاده از جدول استاندارد، وضعیت مقاومت و حساسیت ایزوله‌ها به هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها مشخص و ثبت شد. در این مطالعه از ایزوله استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC27853 (مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) به‌عنوان کنترل کیفی استفاده شد. بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکسازین و نالیدیکسیک اسید با روش میکرودايلوشن و مطابق استانداردهای CLSI تعیین گردید (۷).

استخراج DNA و واکنش PCR

پس از انجام کلیه تست‌های تشخیصی و تکمیلی بیوشیمیایی و تأیید آلودگی و اثبات ابتلای نمونه دهنده به عفونت سودوموناس آئروژینوزا، نهایتاً تعداد ۶۰ ایزوله جهت استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جداسازی گردید. استخراج DNA توسط کیت مرکز ذخایر ژنتیکی انجام شد. تکثیر ژن‌های *qnrS*، *qnrB* و *qnrA* و *aac(6)-Ib-cr* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) و به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد (۸،۹).

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

Primer	Sequence (5'→3')	Gene	Position	Size of PCR-amplified product (bp)	Reference or source
QnrAm-F QnrAm-R	AGAGGATTTCTCACGCCAGG TGCCAGGCACAGATCTTGAC	qnrA1 to qnrA6	۳۰-۴۹ ۵۸۹-۶۰۸	۵۸۰	This study
QnrBm-F QnrBm-R	GGMATHGAAATTCGCCACTGC TTTGCYGYCCAGTCGAAC	qnrB1 to qnrB6	۲۸۳-۳۰۲ ۵۲۶-۵۴۵	۲۶۴	This study
QnrSm-F QnrSm-R	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	qnrS1 to qnrS6	۱۳۷-۱۵۶ ۵۴۵-۵۶۳	۴۲۸	Cayci et al
aac(6)-Ib-cr-F aac(6)-Ib-cr-R	TTGCGATGCTCTATGAAGTGGCTA CTCGAATGCCTGGCGTGT		۵۰۱-۵۲۰ ۳۴۲-۳۶۲	۴۲۸	Cayci et al

آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آمار توصیفی و نرم‌افزار SPSS v21 (IBM, Armonk, NY, USA) ۲۲ ویراست استفاده و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفکسیم (۸۰٪) و نالیدیکسیک اسید (۷۵٪) و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمپنم (۲۵٪) و سیپروفلوکساسین (۳۵٪) مشاهده گردید (جدول ۲). نتایج حداقل غلظت بازدارندگی آنتی‌بیوتیکی نشان‌گر آن بود که بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمپنم و بیشترین مقاومت

نسبت به سفکسیم وجود داشت (جدول ۳). در این مطالعه دامنه حداقل غلظت بازدارنده رشد ۶۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا برای سیپروفلوکساسین ۱-۶۴ μg/mL، نالیدیکسیک اسید ۴-۱۲۸ μg/mL گزارش گردید. نتایج PCR ۶۰ نمونه جمع‌آوری شده در ژل آگاروز، نشان دهنده وجود ۲۵ نمونه مثبت و دارای ژن‌های *qnr* و ۳۵ نمونه منفی می‌باشد (شکل ۲ و ۱). از نمونه‌های مثبت، تعداد ۱۰ مورد *qnrAM* مثبت و ۸ نمونه *qnrBM* مثبت و ۷ نمونه نیز *qnrSM* مثبت بود. یک مورد از نمونه‌های مثبت به‌طور مشترک دارای ژن‌های *qnrAM* و *qnrBM* و یک نمونه نیز به‌طور مشترک دارای ژن‌های *qnrAM* و *qnrSM*، تعداد ۱ نمونه *aac(6)-Ib-cr* مثبت و ۴ نمونه *aac(6)-Ib-cr* مثبت بودند (جدول ۴).

جدول ۲: ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا با روش انتشار دیسک

نتایج حساسیت ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا			آنتی‌بیوتیک
مقاوم (درصد)	نیمه حساس (درصد)	حساس (درصد)	
۷۵	۱۵	۱۰	نالیدیکسیک اسید (NAL)
۳۵	۵	۶۰	سیپروفلوکساسین (CIPR)
۶۰	۲۰	۲۰	لوفلوکساسین (LEVOF)
۶۵	۲۵	۱۰	اوفلوکساسین (OFL)
۴۰	۱۰	۵۰	نورفلوکساسین (NORFX)
۸۰	۱۰	۱۰	سفکسیم (CFM)
۴۰	۲۰	۴۰	جنتامایسین (GEN)
۲۵	۵	۷۰	ایمپنم (IMI)
۶۰	۲۰	۲۰	تتراسایکلین (TET)
۴۰	۲۵	۳۵	سفترایکسون (CTR)

جدول ۳: ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا با روش برات میکروداپلوشن

نتایج حساسیت ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا			آنتی‌بیوتیک
مقاوم (درصد)	نیمه حساس (درصد)	حساس (درصد)	
۳۰	۱۰	۶۰	سیپروفلوکساسین (CIPR)
۷۰	۱۵	۱۵	نالیدیکسیک اسید (NAL)



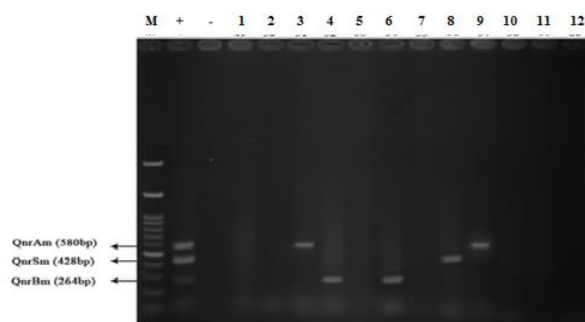
جدول ۴: درصد فراوانی ژن‌های *qnr* در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

ژن	تعداد مثبت	درصد
<i>qnrA</i>	۱۰	۱۶/۶۶
<i>qnrB</i>	۸	۱۳/۳۳
<i>qnrS</i>	۷	۱۱/۶۶
<i>qnrAM</i> و <i>qnrBM</i>	۱	۱/۶۶
<i>qnrAM</i> و <i>qnrSM</i>	۱	۱/۶۶
<i>aac(6)-Ib-cr</i> و <i>qnrA</i>	۴	۶/۶۶
<i>aac(6)-Ib-cr</i>	۱	۱/۶۶
منفی	۳۵	۵۸/۳۳

علی‌رغم صرف هزینه‌های زیاد درمانی می‌شود. مقاومت دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه‌های ایجادکننده، تفاوت در میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و وجود اختلاف در میزان دسترسی به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف و جدید باشد. نظر به اینکه از زمان کشف آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید در سال ۱۹۶۲ تاکنون از این دارو جهت درمان عفونت‌های ادراری استفاده می‌شود. بنابراین در مقایسه با سایر آنتی‌بیوتیک‌های خانواده کینولونی مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک بالاتر می‌باشد. در بین کینولون‌ها آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بیشترین تأثیر را بر روی باکتری‌ها دارد (۱).

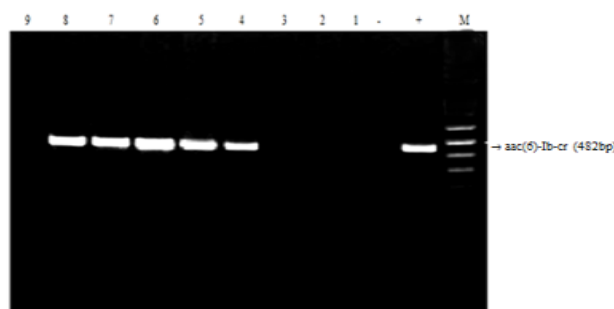
با افزایش سهولت مسافرت و جابجایی افراد و بیماران در جهان، انتقال ارگانیسم‌های مقاوم به دارو در بین کشورهای جهان و حتی بین استان و شهرهای یک کشور به سهولت امکان‌پذیر می‌گردد. مقاومت با واسطه پلاسمید R (R-Plasmid) به فراوانی و به شیوه‌های مختلف از طریق باکتری‌های انتقال‌دهنده این پلاسمید، امکان‌پذیر می‌گردد. انتقال از این طریق سبب مقاومت به ۳ یا ۵ آنتی‌بیوتیک و یا حتی بیشتر می‌گردد. مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی متعدد به کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی مؤثر نظیر بتالاکتام‌ها، آمینو گلیکوزیدها و کینولون‌ها به‌طور عمومی در حال پیدایش است و به میزان فراوانی در باکتری‌های گرم منفی دیده می‌شود (۵).

در مطالعه حاضر واکنش PCR حضور ژن‌های *qnr* را در ۴۱/۶۵ درصد ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا نشان داد، در نتیجه ارزیابی آنتی‌بیوتیکی این ایزوله‌ها، بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفکسیم (۸۰٪) و نالیدیکسیک اسید (۷۵٪)



شکل ۱: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر *qnrAM*, *qnrBM*, *qnrSM* در سودوموناس آئروژینوزا نمونه‌های ۳ و ۹ مثبت و نمونه ۸ *qnrSM* مثبت و نمونه‌های ۴ و ۶ *qnrBM* مثبت بودند.

M: Marker 100bp; +: Positive Control; -: Negative Control



شکل ۲: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر *aac(6)-Ib-cr* در سودوموناس آئروژینوزا نمونه‌های ۴ و ۵ و ۶ و ۷ و ۸ مثبت بودند.

M: Marker 100bp; +: Positive Control; -: Negative Control

بحث

استفاده خودسرانه و غیرمنطقی از آنتی‌بیوتیک‌ها موجب بروز مقاومت دارویی در باکتری‌های بیماری‌زا گردیده است. این موضوع منجر به عدم موفقیت در درمان و پیدایش عوارض

و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی پنم (۲۵٪) و سیپروفلوکساسین (۳۵٪) مشاهده گردید.

مقاومت نسبت به فلئوروکینولون‌ها در حال افزایش می‌باشد. یکی از مکانیسم‌های مقاومت که برای اولین بار در سال ۱۹۹۸ در سودوموناس آئروژینوزا مورد شناسایی قرار گرفت. مقاومت فلئوروکینولون‌ها با واسطه پلاسمیدی (*qnrA*) می‌باشد که سبب کد کردن پروتئینی می‌گردد که باعث محافظت DNA ژیراز در برابر فلئوروکینولون‌ها می‌گردد این نوع مقاومت در این مطالعه با بیشترین فراوانی گزارش گردید. بعد از آن دو ژن دیگر مولد مقاومت موسوم به *qnrS* و *qnrB* مورد شناسایی قرارگرفت که ۵۹٪ و ۴۰٪ از اسیدهای آمینه آن‌ها با *qnrA* مشترک بود (۸).

Al Marjani در سال ۲۰۱۴ در شهر بغداد تعداد ۷۸ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا (۳۸ نمونه بالینی و ۴۰ نمونه محیطی) را مورد بررسی قرارداد، نمونه‌های بالینی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، لووفلوکساسین، نورفلوکساسین و افلوکساسین به ترتیب ۲۸/۹، ۳۹/۴، ۴۲/۱، ۴۲/۱ و ۳۶/۸ درصد مقاوم بودند. فراوانی ژن‌های *qnrA* و *qnrS* به ترتیب ۵ مورد (۱۳/۱ درصد) و ۸ مورد (۲۱ درصد) بود و ۲۲ مورد (۵/۲ درصد) به‌طور مشترک دارای هر دو ژن مذکور بود (۱۱). نتایج این تحقیق تقریباً با نتایج تحقیق حاضر مشابه بود که می‌تواند به علت نزدیک بودن الگوی درمانی و تشابه نسبی آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی باشد.

Saleh و همکاران در سال ۲۰۱۷ در کشور مصر تعداد ۱۱۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان بیمارستان دانشگاه الزهرا را که طی ژانویه ۲۱۰۲ تا اکتبر ۲۱۰۵ جمع‌آوری شده بود مورد بررسی قرار دادند. میزان مقاومت نمونه‌های مورد مطالعه به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین، افلوکساسین و لووفلوکساسین، به ترتیب ۲۳/۶، ۳۳/۶، ۲۱/۸ و ۱۴/۵ درصد بود و فراوانی ژن‌های *qnrB* و *qnrS* به ترتیب ۲ مورد (۱/۸ درصد) و ۳ مورد (۲/۷ درصد) بود. ژن *aac(6)-Ib-cr* در هیچ کدام از ایزوله‌های مورد مطالعه مشاهده نشد (۱۲). تفاوت نتایج دو تحقیق می‌تواند ناشی از تفاوت در الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و نوع نمونه‌ها باشد.

Cayci و همکاران در سال ۲۰۱۴ در شهر آنکارا تعداد ۳۰۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا را که بین نوامبر ۲۰۰۹ تا

آوریل ۲۰۱۰ از آزمایشگاه میکروبی‌شناسی یک بیمارستان دانشگاهی جمع‌آوری شده بود را بررسی نمودند، مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید و حضور ژن‌های *qnrC* و *qnrS* و *qnrB* و *qnrA* و *aac(6)-Ib-cr* در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا را مورد بررسی قراردادند. ژن‌های مذکور در هیچ یک از ایزوله‌ها مشاهده نشدند (۱۳).

اختلاف مشاهده شده در نتایج این تحقیق با مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از اعمال محدودیت و نظارت شدید در مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها بوده که مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در کشور ما منجر به بروز، شیوع و انتقال ژن‌های مقاومت مورد مطالعه در نمونه‌های بررسی شده در تحقیق حاضر شده است.

نتایج مطالعات مختلف بیانگر بروز نوساناتی در مقاومت دارویی در ایزوله‌های باکتریال می‌باشد که علت را می‌توان در تفاوت روش‌های تشخیصی اعم از دیسک دیفیوژن، MIC یا E-test و سایر روش‌های ارزیابی فنوتیپی مقاومت جستجو کرد. مطمئناً الگوی انتشار جغرافیایی ایزوله‌های مقاوم و الگوی درمان بیماری‌های عفونی در منطقه و بیمارستان در بروز چنین اختلافاتی نقش بسزایی دارند. نکته حائز اهمیت این است که یکی از علل اصلی ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها مصرف بیش‌ازحد این داروهاست که به‌مرور زمان منجر به پیدایش ایزوله‌های مقاوم می‌شود (۱۴).

به‌طور کلی می‌توان گفت که تفاوت‌های موجود در نتایج مربوط به حضور ژن‌های *qnr* و *aac(6)-Ib-cr* در ایزوله‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا بررسی شده در تحقیقات مختلف می‌تواند به علت تفاوت در پروتکل آنتی‌بیوتیک درمانی، نوع نمونه‌ها، اختلاف سطح اجتماعی و اقتصادی، شرایط جغرافیایی و شیوع عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا باشد.

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات مشابه مشاهده می‌گردد که: بین وجود ژن‌های *qnr* و *aac(6)-Ib-cr* در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کینولونی رابطه مستقیم وجود دارد. در سال‌های اخیر میزان مقاومت نسبت به کینولون‌ها در حال افزایش می‌باشد. این موضوع می‌تواند به علت فشار انتخابی حاصل از مصرف بالای داروهای مذکور باشد.

یکی از نگرانی‌های جامعه پزشکی افزایش ارگانسیم‌های MDR و مشکلات عدیده آن است، فرد آلوده با میکروارگانسیم

میزان بالایی برخوردار می‌باشد. فراوانی زیاد ژن‌های فوق در میان سویه‌های با اهمیت بالینی و همچنین حمل وابسته به پلاسمید آن‌ها که انتقال و گسترش سریع آن‌ها را تسهیل می‌نماید، بسیار حائز اهمیت می‌باشد و لزوم بررسی‌های بیشتر با بهره‌گیری از تکنیک‌های مولکولی به‌منظور بررسی کامل الگوی ژنتیکی مقاومت، وجود برنامه‌های مراقبتی و نظارتی دقیق و اقدامات پیشگیرانه جدی را نشان می‌دهد. با تحقیق بیشتر بر روی تمام ژن‌ها، این امکان میسر خواهد گردید که در مناطقی که شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی وجود دارد از مدیریت دارویی مناسب‌تری استفاده شود.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از مدیریت و پرسنل آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های سید الشهداء (ع)، افضل‌پور و پیامبر اعظم کرمان به جهت همکاری صمیمانه در انجام این پژوهش کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

MDR بیشتر احتیاج به مراقبت و بستری شدن دارد چون خطر مرگ در این بیماران افزایش بیشتری دارد. و همچنین درمان این افراد هزینه بیشتری داشته و به داروهای گران‌تر و مراقبت‌های ویژه نیازمند می‌باشد. تجویز دوز های بالاتر آنتی‌بیوتیک‌ها در بیماران می‌تواند باعث تسهیل تغییرات ژنتیکی در برخی سویه‌ها شود و این فشار آنتی‌بیوتیکی مداوم می‌تواند سبب ظهور ایزوله‌های با مقاومت وسیع الطیف به گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیک گردد (۱۵).

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند کمک شایانی به جلوگیری از انتشار سویه‌های مقاوم و همچنین انتقال مقاومت به سویه‌های حساس نماید. اطلاع از فراوانی ژن‌های پلاسمیدی در نمونه‌های بالینی، این امکان را فراهم می‌سازد تا رژیم درمانی مناسب برای بیماران اتخاذ گردد. با درمان مناسب افراد آلوده به میکروارگانیزم های حامل این ژن‌ها، می‌توان از افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها جلوگیری نمود. بنابراین نتایج تحقیق حاضر می‌تواند مورد استفاده پزشکان برای انتخاب تدابیر مناسب به منظور درمان بیماران و جلوگیری از تجویز نامناسب آنتی‌بیوتیک‌ها قرار گیرد.

مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق و دیگر کارهای انجام شده، نشان می‌دهد که فراوانی ژن‌های فوق در شهر کرمان از

References

- Mohamadbigi M, Akbarmehr J, Jafari B. Evaluation of frequency of Plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp in Tehran: J Microbial World (JMW) 2016; 9(3):199-207. [in Persian]
- Amini B, Kamali M, Zarei Mahmoud Abadi A, Bayat A, Javadi H, Mansori M., et al. Isolation and rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* by PCR, Quarterly J Biological Sci, Islamic Azad Univ, Zanjan. 2009; 3(1):6-59. [in Persian]
- Dashtizadeh Y, Moattari A, Gorzin A. Phenotypic and genetically evaluation of the prevalence of efflux pumps and antibiotic resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* among burned patients admitted to Ghotbodini Shirazi Hospital, Journal of Microbial World (JMW) 2014; 7(2):118-127. [in Persian]
- Sepehrisaresht S, Najarpayrah Sh, Sattari M, Ahangarzadeh M, Rezaei B. Evaluation of plasmid mediated Beta Lactamase production in *pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burns, Hakim Res J. 2007; 10 (1). [in Persian]
- Moghbeli M, Behnood V, Ranjbar R. A study to determine antibiotic resistance and recognition qnr genes in *Shigella* strains isolated from patients admitted to Mofid's Children Medical Center, Tehran, J Microbial World (JMW) 2014; 7(1):49-57. [in Persian]
- Mardaneh J, Ahmadi Kh, Jahansapas A. Antibiotic resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients at Taleghani hospital in Ahvaz during 2011- 2012, J Fasa Univ Med Sci (GFUMS) 2013; 3. [in Persian]
- Salehi M, Hekmatdoost M, Hosseini F. Quinolone resistance associated with mexAB-oprM secretory pump from *Pseudomonas aeruginosa* isolates, J Microbial world (JMW) 2013; 4 (17): 290-298.

8. Cayci YT, Coban AY, Gunaydin M. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Indian J Med Microbiol* 2014 Jul-Sep;32(3):285-9.
9. Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram negative bacterial species: An update. *Curr Med Chem* 2009;16:1028-46.
10. Soleimani-asl Y, Zibaei M, Firoozeh F. Detection of *qnrA* gene quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Khorram Abad during 2011-2012. *Feyz* 2013;17(5): 488-494. [in Persian]
11. Al- Marjani M. Presence of *qnr* gen in Environmental and Clinical *pseudomonas aeruginosa* Isolates in Baghdad. *International J Microbiology and Applied sci Issn* 2014; 3 (7): 853-857.
12. Saleh M, Balboula M. Plasmid Mediated Quinolone Resistance Determinants among Nosocomial Clinical *pseudomonas12 aeruginosa* Isolates. *International J Microbiology and Applied sci Issn* 2017; 6 (1): 42-50.
13. Cayci YT, Coban AY, Gunaydin M. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Indian J Med Microbiol*. 2014; 32(3):285-9.
14. Deyhim B, Bessikhasteh M. The pattern of antibiotic resistance and MBL production of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples from Dr. Ganjavian hospital, Islamic Azad University of Dezful. *J Microbial Biotechnology* 2012; 4 (4): 21-28. [in Persian]
15. Anvarinezhad M, japoni A, Rafatpour N, Alipour A, Abbasi P, Manelyshahidi M, et al. Antimicrobial susceptibility patterns and molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Armaghane Danesh, Scientific and research J med scie Yasooj Univ*. 2014; 19 (8): 91. [in Persian]

