Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 3 (July - August)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

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

Downloaded from ijmm.ir at 19:26 +0430 on Thursday April 26th 2018

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 methodsagainst 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 , furthur 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

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۳ – مرداد و شهریور ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

Downloaded from ijmm.ir at 19:26 +0430 on Thursday April 26th 2018

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

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۵

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۲۷

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۵/۱۷

موضوع:

مقاومت داوریی

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

چکیده

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-بائر 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 پلیمراز 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 پلیمراز 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 میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

امروزه یکی از مشکلات مطرح و قابل‌توجه 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 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. پلاسمید ها عناصر ژنتیکی خارج کروموزومی هستند که یکی از عوامل القای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها می‌باشند. اخیراً سه مکانیسم مقاومت وابسته به پلاسمید برای کینولون ها توصیف شده است. اولین

Downloaded from ijmm.ir at 19:26 +0430 on Thursday April 26th 2018

مسیر مکانیسم وابسته به پروتئین‌های *qnr*، مربوط به تکرار خانواده پنتاپپتید می‌باشد که توپوایزومراز تیپ دو را از مهار شدن توسط کینولون ها حفاظت می‌نماید. دومین مکانیسم شامل حضور پروتئین *aac(6)-Ib-cr* است که آنزیم آمینوگلیکوزیداز استیل ترانسفراز جدیدی را تولید می‌کند. این آنزیم باعث استیله کردن و درنتیجه کاهش فعالیت نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین می‌شود. سومین راه که اخیراً توصیف شده، مکانیسم انتقال کینولون توسط پمپ پروتئینی qepA می‌باشد. ژن‌های پلاسمیدی *qnrSM* و *qnrBM* و *qnrAM* باعث ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به سیپرو فلوکساسین و نالیدیکسیک اسید می‌شوند. با مقایسه نتایج به‌دست آمده از حضور یا عدم حضور این ژن و نتایج به‌دست‌آمده از مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توان به همبستگی بین این ژن‌ها و همچنین اثر هم‌افزایی یا کاهشی توان مقاومتی با توجه به حضور هر یک از ژن‌ها پی برد (۱).

سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت‌طلب به‌ویژه در افراد با ضعف سیستم ایمنی می‌باشد. این باکتری عامل مرگ و میر در بیماران مبتلابه سیستیک فیبروزیس، لنفوم و سوختگی‌های شدید می‌باشد. حدود ۳۰ درصد از عفونت‌های بیمارستانی مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری می‌باشد. *سودوموناس آئروژینوزا* سومین عامل شایع و متداول عفونت‌های بیمارستانی پس از *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* است (۲،۳).

سودوموناس آئروژینوزا به فراوانی در طبیعت پخش‌شده و از محیط بیمارستان، وسایل پزشکی و پرسنل بیمارستان به‌آسانی جدا می‌گردد. این باکتری نسبت به بسیاری از مواد ضدعفونی‌کننده نظیر ترکیبات آمونیم، هگزا کلروفن، صابون‌ها و محلول‌های یددار مقاومت ذاتی دارد. استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف را به همراه داشته است. ایجاد سویه‌های با مقاومت چندگانه دارویی، چالش اصلی در درمان این باکتری در بخش‌های مهم بیمارستانی مانند مراقبت‌های ویژه و سوختگی می‌باشد (۴).

سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* می‌توانند از روش‌های مختلف مقاومت آنتی‌بیوتیکی را کسب کنند. یکی از این راه‌ها مقاومت در اثر کسب ژن‌های *qnr* و *aac* می‌باشد. این ژن‌ها باعث مقاومت نسبت به کینولون ها و فلوروکینولون ها می‌شوند، ژن‌های *qnr* بر روی پلاسمید حمل می‌شوند.

کینولون ها و فلورو کینولون ها برای درمان عفونت سویه‌های مقاوم استفاده می‌شوند، اما مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها بدون توجه به الگوهای مقاومتی منجر به ظهور سویه‌های جدید و مقاوم به درمان‌های چندگانه آنتی‌بیوتیکی شده است (۵). هدف از انجام این تحقیق ارزیابی حضور ژن‌های پلاسمیدی *qnr* درجدایه های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* در شهر کرمان بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

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

جداسازی و شناسایی

پس از جداسازی اولیه، *تشخیص و تأیید سودوموناس آئروژینوزا* بر مبنای جدول استاندارد تشخیصی و با استفاده از محیط‌های بلادآگار، SIM وMRVP (بیولایف - ایتالیا)، ائوزین متیلن بلو و سیمون سیترات (مرک- آلمان)، OF، TSI و اوره آگار (هایمدیا-هند) و تست‌های 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 آنتی‌بیوتیکی

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* با روش استاندارد کربی- بائر (Kirby - Bauer) مطابق با دستورالعمل استاندارد جهانی CLSI (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 به‌صورت یکنواخت در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار (بیولایف - ایتالیا) تلقیح گردید. پس از چند دقیقه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی را با استفاده از پنس سترون در سطح محیط کشت قرار داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورداستفاده شامل سیپروفلوکساسین (۵µg)،

Downloaded from ijmm.ir at 19:26 +0430 on Thursday April 26th 2018

نالیدیکسیک اسید (۳µg)، لوفلوکساسین (۵µg)، اوفلوکساسین (۵µg)، نورفلوکساسین (۱۰µg)، سفکسیم (۵µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، ایمی پنم (۱۰µg)، تتراسایکلین (۳۰µg) و سفتریاکسون (۳۰µg) (روسکو - دانمارک) بودند. بعد از ۲۴-۱۸ 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 پژوش های علمی وصنعتی ایران) به‌عنوان کنترل کیفی استفاده شد. بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید با روش میکرودایلوشن 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 پلیمراز جداسازی گردید. استخراج DNA توسط کیت مرکز ذخایر ژنتیکی انجام شد. تکثیر ژن‌های *qnrS* و *qnrB* و *qnrA* و *aac(6)-Ib-cr* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) و به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد (۸،۹).

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 پرایمر ها توسط Primer-blast به آدرس tools/primer-blasthttp://www.ncbi.nih.gov/ 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 (۱۰pmol) ۰/۶ µL، $MgCl_2$ (۵۰mM) ۰/۸ µL، آنزیم Taq DNA polymerase (۵ واحد) ۰/۳ µL، بافر (۱۰x) ۲µL، DNA الگو (۲ µg) ۵µL، dNTP (۱۰mM) ۱ µL (شرکت سیناژن - ایران) و ۶/۱µL 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 واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و درنهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگارز ۱درصد واجد اتیدیوم بروماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. قطعات DNA به کمک دستگاه ژل داکیومنتیشن مشاهده و عکس‌برداری شدند.

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 TTTGCYGYYCGCCAGTCGAAC	qnrB1 to qnrB6	۲۸۳–۳۰۲ ۵۲۶–۵۴۵	۲۶۴	**This study**
QnrSm-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	qnrS1 to qnrS6	۱۳۷–۱۵۶	۴۲۸	**Cayci et al**
QnrSm-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		۵۴۵-۵۶۳		
aac(6)-Ib-cr-F	TTGCGATGCTCTATGAAGTGGCTA		۵۰۱-۵۲۰	۴۲۸	**Cayci et al**
aac(6)-Ib-cr-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		۳۴۲- ۳۶۲		

Downloaded from ijmm.ir at 19:26 +0430 on Thursday April 26th 2018

آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آمار توصیفی و نرم‌افزار SPSS ویراست ۲۲ SPSS v21 (IBM, Armonk, NY, USA) 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 ایمی پنم (۲۵٪) و سیپروفلوکساسین (۳۵٪) مشاهده گردید (جدول۲). نتایج حداقل غلظت بازدارندگی آنتی‌بیوتیکی نشان‌گر آن بود که بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمی پنم و بیشترین مقاومت نسبت به سفکسیم وجود داشت (جدول۳). در این مطالعه دامنه حداقل غلظت بازدارنده رشد ۶۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* برای سیپروفلوکساسین ۱-۶۴µg/mL، نالیدیکسیک اسید ۴-۱۲۸µg/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 *qnrAM* و *aac(6)-Ib-cr* مثبت بودند (جدول۴).

جدول۲: ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* با روش انتشار دیسک

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

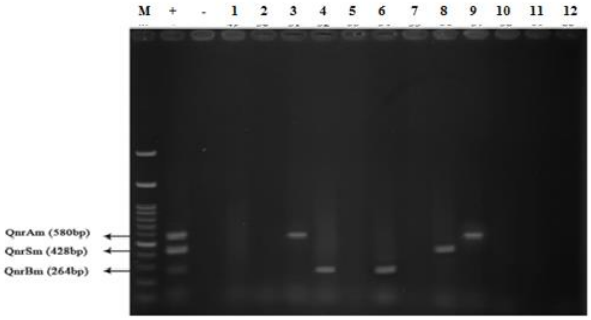
جدول۳: ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* با روش براث میکرودایلوشن

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

Downloaded from ijmm.ir at 19:26 +0430 on Thursday April 26th 2018

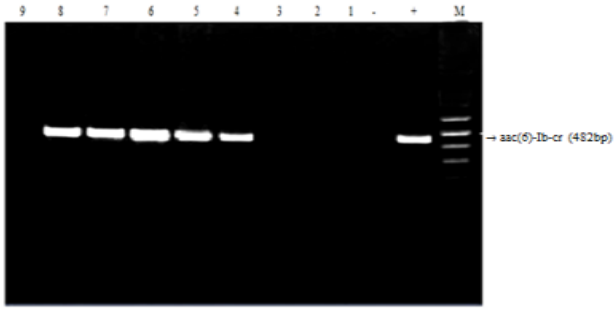
جدول ۴: درصد فراوانی ژن‌های *qnr* در ایزو له‌های *سودوموناس آئروژینوزا*

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



شکل ۱:تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر *qnrSM*, *qnrBM*, *qnrAM* در *سودوموناس آئروژینوزا* نمونه‌های ۳ و ۹ *qnrAM* 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 *aac(6)-Ib-cr* 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 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 نالدیکسیک 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 کینولون ها آنتی‌بیوتیک سیپرو فلوکساسین بیشترین تأثیر را بر روی باکتری ها 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 باواسطه 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 بتالاکتام ها، آمینو گلیکوزید ها و کینولون ها 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٪)

Downloaded from ijmm.ir at 19:26 +0430 on Thursday April 26th 2018

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

مقاومت نسبت به فلوئوروکینولون ها در حال افزایش می‌باشد. یکی از مکانیسم‌های مقاومت که برای اولین بار در سال ۱۹۹۸ در *سودوموناس آئروژینوزا* مورد شناسایی قرار گرفت. مقاومت فلوئوروکینولون‌ها با واسطه پلاسمیدی (*qnrA*) می‌باشد که سبب کد کردن پروتئینی می‌گردد که باعث محافظت DNA ژیراز در برابر فلوئوروکینولون ها 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* جداشده از نمونه‌های بالینی بیماران 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 سیپرو فلوکساسین، 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 میکروب‌شناسی 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 بررسی‌شده در تحقیق حاضرشده 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).

به‌طورکلی 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 کینولون ها در حال افزایش می‌باشد. این موضوع می‌تواند به علت فشار انتخابی حاصل از مصرف بالای داروهای مذکور باشد.

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

Downloaded from ijmm.ir at 19:26 +0430 on Thursday April 26th 2018

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 میکروارگانیسم 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 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)، افضلی پور 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 منافعی وجود ندارد.

References

1. 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]
2. 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]
3. Dashtizadeh Y, Moattari A, Gorzin A. Phenotypic and genetically evaluation of the prevalence of efflux pumpsand antibiotic resistance in clinical isolates of *Pseudomonasaeruginosa* among burned patients admitted to Ghotbodin Shirazi Hospital, Journal of Microbial World (JMW) 2014; 7(2):118-127. [in Persian]
4. Sepehrisaresht S, Najarpyrayeh 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]
5. Moghbeli M, Behnood V, Ranjbar R. A study to determine antibiotic resistance and recognition qnr genesin *Shigella* strains isolated from patients admitted to Mofid's Children Medical Center, Tehran, J Microbial World (JMW) 2014; 7(1):49-57. [in Persian]
6. Mardaneh J, Ahmadi Kh, Jahansepas 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]
7. 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 Nosocominal Chinical *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]

Downloaded from ijmm.ir at 19:26 +0430 on Thursday April 26th 2018