DOI: 10.22122/jims.v35i454.7726 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ٤٥٤/هفته‌ی دوم دی ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۵

بررسی فراوانی ژن‌های پلاسمیدی مقاومت به کینولون qepA و aac(6')-Ib-cr در جدایه‌های Klebsiella Pneumoniae بیماران مبتلا به عفونت ادراری در یزد

گلنار ایزدی[۱]، هنگامه زندی[۲]، امین دهقان بنادکوکی[۳]، سحرالسادات عمادی[۱]، محمود وکیلی[۴]، اکرم آستانی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Klebsiella pneumoniae باکتری شایع در عفونت‌های بیمارستانی به خصوص عفونت دستگاه ادراری است. با توجه به افزایش مقاومت به فلوروکینولون‌ها و نبود گزارش‌های دقیق از شیوع ژن‌های پلاسمیدی، هدف از انجام این مطالعه، تعیین فراوانی ژن‌های پلاسمیدی qepA و aac(6')-Ib-cr در Klebsiella pneumonia جدا شده از نمونه‌های ادرار بیماران در شهر یزد بود.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی توصیفی- مقطعی، در سال ۱۳۹۳ طی ۹ ماه تعداد ۷۰ جدایه‌ی Klebsiella pneumonia از ادرار بیماران جدا شد. الگوی مقاومت برای فلوروکینولون‌های رایج به روش دیسک دیفیوژن تعیین و میزان حداقل غلظت مهار کنندگی به روش Epsilometer test (Etest) انجام شد. واکنش Polymerase chain reaction (PCR) جهت بررسی حضور ژن‌های qepA و aac(6')-Ib-cr با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS واکاوی شد.

یافته‌ها: نتایج دیسک دیفیوژن نشان داد بیشترین و کمترین مقاومت به ترتیب مربوط به نالیدیکسیک اسید (۴۰/۰ درصد) و لووفلوکساسین (۲۷/۱ درصد) بود. بر اساس نتایج حداقل غلظت مهار کنندگی برای نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین به ترتیب ۴۵/۷ درصد و ۳۸/۶ درصد جدایه‌ها مقاوم شناخته شدند. ژن aac(6')-Ib-cr در ۲۱ جدایه (۳۰/۰ درصد) مشاهده شد، اما ژن qepA در هیچ یک از جدایه‌ها ردیابی نشد.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، مقاومت بالایی نسبت به فلوروکینولون‌هایی که به طور عمومی مورد استفاده قرار می‌گیرند، کسب شده است. فراوانی بالای ژن aac(6')-Ib-cr زنگ خطری برای منطقه می‌باشد. از این رو، باید نظارت بر وضعیت مقاومت ضد میکروبی این باکتری قبل از شروع درمان به طور جدی مورد بازبینی قرار گیرد و به طور مستمر مقاومت با واسطه‌ی پلاسمید و مقاومت کروموزومی بررسی شود.

واژگان کلیدی: Klebsiella pneumoniae، فلوروکینولون‌ها، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ژن

ارجاع: ایزدی گلنار، زندی هنگامه، دهقان بنادکوکی امین، عمادی سحرالسادات، وکیلی محمود، آستانی اکرم. **بررسی فراوانی ژن‌های پلاسمیدی مقاومت به کینولون qepA و aac(6')-Ib-cr در جدایه‌های Klebsiella Pneumoniae بیماران مبتلا به عفونت ادراری در یزد.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۵۴): ۱۵۸۶-۱۵۷۹

مقدمه

Klebsiella pneumoniae، به عنوان ساپروفیت در نازوفارنکس، پوست و مجرای روده‌ی انسان‌ها حضور دارد. گونه‌های Klebsiella به طور معمول عامل عفونت بیمارستانی هستند و به عنوان پاتوژن فرصت‌طلب، افراد با ضعف ایمنی را درگیر می‌کنند (۱). بروز عفونت ناشی از Klebsiella در بیمارستان‌ها، حدود ۷-۵ درصد است و این میزان، این باکتری را در زمره‌ی مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای بیمارستان قرار می‌دهد (۲). این باکتری، بعد از Escherichia coli شایع‌ترین عامل عفونت دستگاه ادراری (Urinary tract infection یا UTI) است (۳). فلوروکینولون‌ها (Fluoroquinolones یا FQs) به دلیل طیف وسیع فعالیتشان، جزء پرمصرف‌ترین داروها می‌باشند. این آنتی‌بیوتیک‌ها علاوه بر درمان عفونت‌های دستگاه ادراری، برای

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشکده‌ی بهداشت و گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
۳- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- دانشیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
۵- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های مشترک انسان و حیوان، دانشکده‌ی بهداشت و گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: اکرم آستانی
Email: astani_ir@yahoo.com

درمان عفونت‌های تنفسی، گوارش، عفونت‌های داخل شکمی و پوستی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴). اگر چه مقاومت به فلوروکینولون‌ها می‌تواند توسط طیف وسیعی از مکانیزم‌ها به وجود آید، اما بزرگ‌ترین نگرانی در مواردی است که باکتری حامل عوامل مقاومت قابل انتقال با واسطه‌ی پلاسمید (Plasmid-mediated quinolone resistance یا PMQR)، مانند آلل‌های qnr، oqxAB، qepA و aac(6')Ib-cr باشد (۵).

aac(6′)-Ib-cr که اولین بار در سال ۲۰۰۳ گزارش شد، یک آمینوگلیکوزید استیل‌ترانسفراز را کد می‌کند که قادر به تغییر آمینوگلیکوزیدها و کینولون‌های دارای جایگزینی پیپرازینیل (مانند سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین) از طریق استیله کردن نیتروژن آمینه در این گروه شیمیایی می‌باشد (۶). qepA نیز توسط Yamane و همکاران در ژاپن کشف شد و کد کننده‌ی پمپ افلاکس ابر خانواده‌ی تسهیل کننده‌ی اصلی (Major facilitator superfamily) برای خروج فلوروکینولون‌ها از باکتری است (۷). مقاومت به فلوروکینولون‌ها در Klebsiella pneumonia در ایران بین ۸۰-۲۱ درصد گزارش شده است (۱۱-۸). فلوروکینولون‌ها به طور گسترده در درمان عفونت‌های ادراری استفاده می‌شوند و عوامل مقاومت به کینولون‌ها با واسطه‌ی پلاسمید در جدایه‌های Klebsiella pneumoniae در ایران به طور محدود مورد بررسی قرار گرفته‌اند و شناسایی از طریق فنوتیپی قابل انجام نیست. از این رو، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی فراوانی این عوامل با روش‌های مولکولی جهت کنترل مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها انجام شد.

روش‌ها

نمونه‌گیری، جداسازی و شناسایی Klebsiella pneumonia: در این مطالعه‌ی توصیفی- مقطعی، از دی ماه ۱۳۹۲ تا شهریور ماه ۱۳۹۳، پلیت‌های حاوی پرگنه‌های باسیل گرم منفی جدا شده از نمونه‌ی ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری از آزمایشگاه‌های دانشگاهی شهر یزد به همراه پرسش‌نامه‌ی تکمیل شده شامل اطلاعات دموگرافیک به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه شهید صدوقی یزد منتقل شدند. پس از کشت مجدد بر روی محیط ائوزین-متیلن‌بلو (Eosin-methylene blue یا EMB) و گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت، باسیل‌های گرم منفی لاکتوز مثبت مشکوک با بررسی ریخت‌شناسی، رنگ‌آمیزی گرم و آزمایش‌های بیوشیمیایی افتراقی با استفاده از محیط Triple sugar iron agar (TSI)، Urea agar، Simmon's citrate، Sulfide Indole Motility (SIM) و Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP) (Merck Darmstadt, Germany) و سپس، تأیید مولکولی به کمک تکثیر ژن 16S rRNA به عنوان شاهد داخلی بررسی و در نهایت، تعداد ۷۰ جدایه به عنوان Klebsiella pneumonia وارد مطالعه شدند.

سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی: جهت سنجش حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) طبق دستورالعمل Clinical and Laboratory Standards Institute-2015 (CLSI-2015) (۱۲) استفاده شد. بدین منظور، سوسپانسیونی با کدورتی معادل کدورت لوله‌ی ۰/۵ McFarland (معادل $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ واحد تشکیل کلنی/میلی‌لیتر) به محیط کشت Muller- Hinton agar شد. بعد از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری در اطراف دیسک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و به صورت حساس، نیمه‌حساس و مقاوم گزارش گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده (MAST, England) شامل نالیدیکسیک اسید، نورفلوکساسین، لووفلوکساسین، گتی‌فلوکساسین، جمی‌فلوکساسین و سیپروفلوکساسین بودند. جهت کنترل کیفی، از سویه‌ی استاندارد ATCC25922 Escherichia coli استفاده گردید.

تعیین میزان حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum Inhibitory Concentration یا MIC): جهت بررسی حداقل غلظت مهار کنندگی نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین، به عنوان نماینده‌های پرکاربرد کینولون‌ها و فلوروکینولون‌ها در درمان عفونت‌های ادراری، از روش Epsilometer test (E-test) استفاده شد. در این روش، تهیه‌ی سوسپانسیون باکتریایی و تلقیح بر روی محیط کشت Muller- Hinton agar همانند روش دیسک دیفیوژن انجام گردید. سپس، نوارهای E-test (Liofilchem, Italy) بر روی محیط کشت قرار داده شد و پس از ۱۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، غلظتی از آنتی‌بیوتیک که محل برخورد انتهای هاله‌ی عدم رشد باکتری در دو جهت نوار بود، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. با توجه به CLSI، برای آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین میزان ۴ میکروگرم/میلی‌لیتر ≤ MIC به عنوان مقاوم، ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر = MIC به عنوان نیمه‌حساس و ۱ میکروگرم/میلی‌لیتر ≤ MIC به عنوان حساس و برای آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید میزان ۳۲ میکروگرم/میلی‌لیتر ≤ MIC به عنوان مقاوم و ۱۶ ≤ MIC میکروگرم/میلی‌لیتر به عنوان حساس در نظر گرفته شد. جهت کنترل کیفی از سویه‌ی استاندارد Escherichia coli ATCC25922 استفاده گردید.

ارزیابی ژن‌های مورد بررسی: استخراج ژنوم به روش Salting out صورت گرفت (۱۳). سنجش کمی و کیفی DNA

استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری (Biotech Epoch, USA) و ژل آگارز الکتروفورز (ژل آگارز ۰/۷ درصد) (پدیده‌ی نوژن پارس، ایران) انجام شد. برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر در هر ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش، ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر Forward و Reverse (۱۰ پیکومول)، ۱۰ میکرولیتر Master mix 2X (Amplicon, Denmark) و ۶ میکرولیتر آب DNase free وجود داشت. شرایط Polymerase chain reaction (PCR) شامل ۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، در ادامه ۳۵ چرخه به صورت ۳۰ ثانیه واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، یک دقیقه اتصال پرایمرها در ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد و یک دقیقه بسط در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. درآخر، بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت.

پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه 16sF-5′-ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT-3′ و 16sR-5′-TTCACTCTGAAGTTTTCTTGTGTTC-3′ (۱۳۰ جفت باز) بودند (۱۴). جهت تکثیر ژن qepA از پرایمرهای اختصاصی F-5′- GCGCTGGTGATGATGATCTC-3′ و R-5′-GTCATCGGTTCGCTGTTGTC-3′ (۲۰۶ جفت باز) و جهت تکثیر ژن aac(6′)-Ib-cr از F-5′-TTGCGATGCTCTATGAGTGG-3′ و R-5′-GCGTGTTCGCTCGAATGCC-3′ (۴۹۱ جفت باز) استفاده شد (۱۵). وجود ژن‌های مورد بررسی با استفاده از ژل آگارز الکتروفورز (ژل آگارز ۱/۵ درصد) و در کنار Ladder ۱۰۰ جفت بازی ارزیابی شد. برای تأیید قطعات تکثیر شده از نظر وجود ژن‌های مورد نظر، قطعات تکثیر یافته جهت تعیین توالی به شرکت پیشگام ارسال و توالی دریافت شده، با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین Blast شد.

آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۳ (version 23, IBM Corporation, Armonk, NY) بر اساس اهداف تعیین شده، مورد واکاوی قرار گرفتند.

یافته‌ها

در این مطالعه، با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی از بین ۴۶۶ کشت مثبت بیماران مبتلا به عفونت ادراری، تعداد ۷۰ جدایه‌ی Klebsiella pneumonia (۱۵/۰۲ درصد) از ۳۶ نفر (۵۱/۴ درصد) بیمار مرد و ۳۴ نفر (۴۸/۶ درصد) بیمار زن جمع‌آوری گردید. بیشترین تعداد نمونه به ترتیب مربوط به بخش‌های داخلی (۳۹/۹ درصد)، مراقبت‌های ویژه (۲۸/۶ درصد) و جراحی (۱۵/۷ درصد) بود. جدایه‌های مورد بررسی بیشترین و کمترین مقاومت را به ترتیب نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید (۴۰/۰ درصد) و لووفلوکساسین (۲۷/۱ درصد) نشان دادند (جدول ۱). مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر حسب جنس، سن و بخش بستری از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > ۰/۰۵۰$).

جدول ۱. الگوی مقاومت جدایه‌های Klebsiella pneumonia به آنتی‌بیوتیک های مورد بررسی

آنتی‌بیوتیک‌ها	حساس تعداد (درصد)	نیمه‌حساس تعداد (درصد)	مقاوم تعداد (درصد)
سیپروفلوکساسین	۴۲ (۶۰/۰)	۳ (۴/۳)	۲۵ (۳۵/۷)
نالیدیکسیک اسید	۳۸ (۵۴/۳)	۴ (۵/۷)	۲۸ (۴۰/۰)
لووفلوکساسین	۴۶ (۶۵/۷)	۵ (۷/۱)	۱۹ (۲۷/۱)
گتی‌فلوکساسین	۴۱ (۵۸/۶)	۲ (۲/۹)	۲۷ (۳۸/۶)
نورفلوکساسین	۴۲ (۶۰/۰)	۳ (۴/۳)	۲۵ (۳۵/۷)
جمی‌فلوکساسین	۳۶ (۵۱/۴)	۷ (۱۰/۰)	۲۷ (۳۸/۶)

طیف حداقل غلظت مهاری سیپروفلوکساسین بین ۰/۰۰۴-۳۲/۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر (با میانگین ۹/۰۵۲) و نالیدیکسیک اسید بین ۱/۵-۲۵۶ < میکروگرم/میلی‌لیتر بود. در مورد آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، بیشترین فراوانی مربوط به MIC > ۳۲ میکروگرم/میلی‌لیتر (۲۲/۹ درصد) و در مورد نالیدیکسیک اسید، MIC > ۲۵۶ میکروگرم/میلی‌لیتر (۳۵/۷ درصد) بود. درصد جدایه‌های حساس و غیر حساس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی در روش Etest در جدول ۲ آمده است.

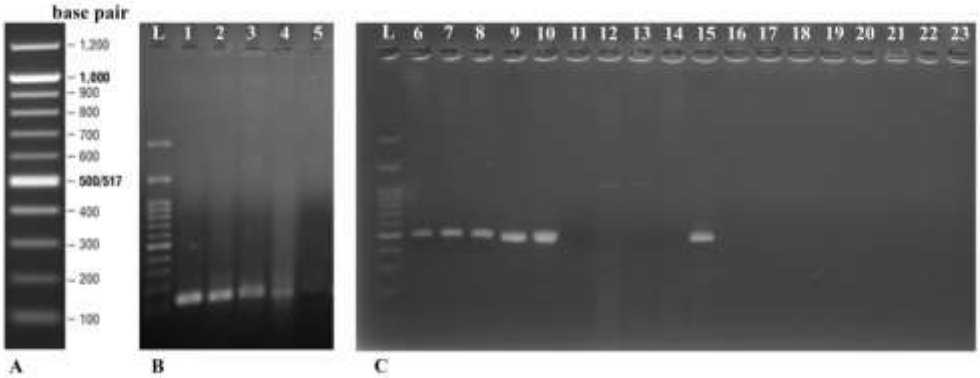
جدول ۲. تعداد و درصد جدایه‌های Klebsiella pneumonia حساس و غیر حساس به روش (Etest)

آنتی‌بیوتیک	حساس تعداد (درصد)	غیر حساس تعداد (درصد)
سیپروفلوکساسین	۴۳ (۶۱/۴)	۲۷ (۳۸/۶)
نالیدیکسیک اسید	۳۸ (۵۴/۳)	۳۲ (۴۵/۷)

بر اساس نتایج ژن aac(6′)-Ib-cr در ۲۱ مورد (۳۰/۰ درصد) از جدایه‌ها یافت شد. جدول ۳، فراوانی ژن aac(6′)-Ib-cr در جدایه‌های مقاوم را نشان می‌دهد.

جدول ۳. فراوانی ژن در جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه

نام آنتی‌بیوتیک (تعداد جدایه‌ی مقاوم)	aac(6′)-Ib-cr تعداد (درصد)
نالیدیکسیک اسید (۲۸)	۱۵ (۵۳/۵)
گتی فلوساسین (۲۷)	۱۵ (۵۵/۵)
جمی فلوکساسین (۲۷)	۱۵ (۵۵/۵)
نورفلوکساسین (۲۵)	۱۵ (۶۰/۰)
سیپروفلوکساسین (۲۵)	۱۵ (۶۰/۰)
لووفلوکساسین (۱۹)	۱۰ (۵۲/۶)



شکل ۱. A: Ladder ۱۰۰ جفت بازی، B: چاهک‌های ۴-۱ باند مربوط به ژن 16S rRNA (۱۳۰ جفت بازی)، چاهک ۵ شاهد منفی، C: چاهک‌های ۱۰-۶ و ۱۵ باند مربوط به ژن aac(6′)-Ib-cr، چاهک‌های ۱۴-۱۱: نمونه‌های منفی، چاهک ۱۶: شاهد منفی. چاهک‌های ۲۲-۱۶ مربوط به ژن qepA، چاهک ۲۳: شاهد منفی.

در این مطالعه، ژن qepA یافت نشد (شکل ۱). لازم به ذکر است که جهت حصول اطمینان از عدم ردیابی ژن qepA آزمایش‌های مولکولی سه بار تکرار گردید.

بحث

عفونت‌های دستگاه ادراری با بروز سالانه حداقل ۲۵۰ میلیون مورد، یکی از بیماری‌های معمول در کشورهای در حال توسعه است (۱۶). در مطالعات گزارش شده است که Escherichia coli (۵۸/۰ درصد) و به دنبال آن Klebsiella pneumonia (۱۵/۰ درصد) از شایع‌ترین عوامل ایجاد کننده‌ی عفونت‌های دستگاه ادراری می‌باشند (۷). در سایر مطالعات، شیوع Klebsiella در عفونت‌های ادراری در ایران ۱۰ درصد، در اروپا ۱۰/۰ درصد و در آمریکا ۱۲/۰ درصد گزارش شده است (۱۸-۱۷). در مطالعه‌ی حاضر، این میزان برابر ۱۵/۰ درصد محاسبه شد که با یافته‌های سایر مطالعات هم‌خوانی دارد. به هر حال، باید در نظر داشت که داده‌های ما به مراجعین به آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های دانشگاهی محدود بود. از این رو، مطالعه‌ی حاضر ممکن است شیوع واقعی UTI در یزد را منعکس نکند. چنانچه بسیاری از بیماران تحت درمان تجربی نیز قرار می‌گیرند و جهت کشت میکروبی به آزمایشگاه مراجعه نمی‌شود. تا همین اواخر، به دلیل نرخ پایین مقاومت و بازده بالا، فلوروکینولون‌ها به عنوان داروهای ارجح برای بیماران مبتلا به عفونت ادراری شناخته می‌شدند (۱۹)، اما استفاده‌ی مداوم از این آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف در سال‌های اخیر در ایران باعث شده است مقاومت پاتوژن‌های ادراری روز به روز بیشتر و با شیوه‌های جدیدتری کسب شود (۲۰).

تا سال ۱۹۹۸، جهش‌های کروموزومی تنها عامل شناخته شده‌ی مقاومت به کینولون‌ها بودند، اما با شناسایی مقاومت با واسطه‌ی پلاسمید، این نوع مقاومت توجه زیادی را به خود معطوف کرد (۲۱). AAC(6′)-Ib-cr یک آنزیم تغییر دهنده‌ی دارو و QepA افلاکس پمپی از ابر خانواده‌ی تسهیل کننده‌ی اصلی (MFS-type) مثال‌هایی از مقاومت با واسطه‌ی پلاسمید هستند (۷-۶). این مطالعه، با هدف بررسی الگوی مقاومت و فراوانی ژن‌های پلاسمیدی مقاومت به فلوروکینولون‌ها در باکتری Klebsiella pneumonia جدا شده از ادرار انجام گرفت. بیشترین میزان مقاومت به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید (۴۰/۰ درصد)، جمی‌فلوکساسین (۳۸/۶ درصد)، گتی‌فلوکساسین (۳۸/۶ درصد)، سیپروفلوکساسین (۳۵/۷ درصد)، نورفلوکساسین (۳۵/۷ درصد) و لووفلوکساسین (۲۷/۱ درصد) بود که نسبت به تعدادی از مطالعات بالاتر است و نشان دهنده‌ی افزایش مقاومت Klebsiella pneumonia به آنتی‌بیوتیک‌های پرمصرف فلوروکینولون در سال‌های اخیر است. در مطالعه‌ی حاضر، میزان مقاومت به فلوروکینولون‌ها هم در بیماران بستری و هم سرپایی صورت گرفت؛ از این رو، این افزایش مقاومت قابل توجیه است.

در بررسی کاشف و همکاران در تهران، گونه‌های Klebsiella کمترین مقاومت را در میان سایر اوروپاتوژن‌ها به سیپروفلوکساسین (۱۸/۷ درصد) داشتند. همچنین، مقاومت این گونه‌ها به نورفلوکساسین ۸/۳ درصد و به نالیدیکسیک اسید ۵۶/۸ درصد بود (۲۰). در مطالعه‌ی Chowdhury و همکاران در بنگلادش، از ۷۳ سویه‌ی Klebsiella pneumonia جدا شده از ادرار، ۹/۹ درصد آن‌ها به سیپروفلوکساسین و ۲۴/۷ درصد آن‌ها به نالیدیکسیک اسید مقاومت نشان دادند (۱۹). در مطالعات مشابه، میزان مقاومت به فلوروکینولون‌ها در اروپا ۶/۹ درصد و در ایتالیا تا ۳۰/۰ درصد در سال ۲۰۰۲ نیز گزارش شده است (۲۳-۲۲).

از سوی دیگر، در برخی مطالعات میزان بالایی از مقاومت به کینولون‌ها گزارش شده است. جزایری مقدس و ایرجیان، میزان مقاومت سویه‌های Klebsiella pneumonia به سیپروفلوکساسین را در شهر سمنان ۹۲ درصد گزارش نمودند (۲۴). در مطالعه‌ی Sharma و همکاران در هند، در طول ۳ سال جدایه‌های ادراری Klebsiella میزان بالایی (۷۲/۷ درصد) از مقاومت در برابر فلوروکینولون‌ها را نشان دادند (۱۶). در پاکستان، ۵۲/۱۷ درصد مقاومت به سیپروفلوکساسین و ۵۰/۰۰ درصد به گتی‌فلوکساسین گزارش شد (۲۵). علت این اختلاف، می‌تواند مربوط به نمونه‌های مورد بررسی باشد. در مطالعاتی که نرخ بالایی از مقاومت گزارش می‌شود، به طور معمول تمام نمونه‌های بالینی بررسی می‌شود، اما در مطالعه‌ی حاضر، بررسی به نمونه‌های ادراری محدود بود. اختلاف میزان سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها در نواحی مختلف را می‌توان مربوط به تفاوت در سیستم کنترل عفونت و رژیم دارویی یا میزان دسترسی به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در هر منطقه‌ی جغرافیایی دانست. تفاوت ژنتیکی در کلون‌های مولد عفونت در هر منطقه نیز باعث ظهور مقادیر متفاوتی از مقاومت حتی بین دو بیمارستان در یک منطقه می‌شود. در مطالعات پیش‌گفته و همچنین مطالعه‌ی حاضر، بیشترین مقاومت مربوط به نماینده‌ی پرکاربرد کینولون و فلوروکینولون‌ها (نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین) به علت تجویز بی‌رویه و کمترین مقاومت مربوط به لووفلوکساسین می‌باشد.

در مطالعاتی مانند مطالعه‌ی آرچین و همکاران در شیراز، بیشترین باکتری‌های مقاوم به دارو از بخش مراقبت‌های ویژه‌ی داخلی جدا شدند (۱۰). در مطالعه‌ی Singh و همکاران، الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا شده از عفونت بیمارستانی Intensive care unit (ICU) بررسی و مقاومت به سیپروفلوکساسین بین ۱۰۰-۵۰ درصد گزارش شد (۲۶). در مطالعه‌ی حاضر نیز بیشترین مقاومت به هر شش آنتی‌بیوتیک بعد از بخش داخلی، مربوط به بخش‌های ICU و جراحی بود. علت این امر، می‌تواند مربوط به ضعف سیستم ایمنی و بیماری‌های زمینه‌ای و گاهی بیماری‌های شدید بیماران بستری در بخش‌های مراقبت‌های ویژه باشد که آن‌ها را مستعد آلوده شدن با ارگانیسم‌های مقاوم در بیمارستان می‌کند.

به طورکلی، درصد شیوع ژن qepA در مطالعات مختلف، پایین است و در آسیا، اروپا و آمریکا در بین گونه‌های Enterobacteriaceae جدا شده از انسان، حیوان و محیط نیز درصد قابل توجهی دیده نشده است (۲۸-۲۷، ۲۱). در مطالعه‌ی حاضر نیز عدم شناسایی این ژن با توجه به تعداد و نوع محدود نمونه با سایر مطالعات مطابقت دارد.

ژن استیل ترانسفراز aac-(6')-Ib-cr در بیشتر مطالعات، شایع‌ترین نوع PMQR شناخته شده است (۲۹، ۲۷). در مطالعه‌ی گودرزی و همکاران در تهران، از میان ۲۴۷ Klebsiella pneumonia جدا شده از عفونت ادراری، گونه‌ی aac(6')-Ib شایع‌ترین ژن پلاسمیدی با شیوع بالای ۶۸/۸ درصد بود و qepA تنها در ۲/۰ درصد نمونه‌ها یافت شد (۳۰). در این مطالعه نیز ژن aac(6')-Ib-cr در ۳۰ درصد جدایه‌ها ردیابی شد که تا حدی نسبت به سایر مطالعات انجام شده در ایران کمتر می‌باشد. جای امیدواری است که این ژن پلاسمیدی هنوز به طور گسترده در میان جدایه‌های بیمارستانی Klebsiella pneumonia در یزد شیوع نیافته است. همچنین، حضور ژن aac(6')-Ib-cr در جدایه‌های حساس، بیانگر این موضوع تأیید شده است که ژن‌های پلاسمیدی، همیشه باعث مقاومت سطح بالا به فلوروکینولون‌ها نیستند، اما MIC را در محدوده‌ی حساس و یا متوسط افزایش می‌دهند. اگر چه این افزایش از سطح تعیین شده به عنوان مقاومت بالینی (نقطه‌ی انفصال مقاومت یا Break point) بالاتر نیست، اما در انتخاب سطوح بالاتر مقاومت و تبدیل به ارگانیسم‌های مقاوم در محیط بیمارستان دخالت دارد.

همان‌طور که گفته شد، راه اصلی ایجاد مقاومت سطح بالا، جهش‌های کروموزومی هستند و ژن‌های پلاسمیدی به میزان کمتری در مقاومت بالینی نقش دارند. در این جا نیز علت مقاومت در نمونه‌هایی که فاقد ژن‌های مورد مطالعه هستند، می‌تواند جهش‌های شایع کروموزومی یا سایر عوامل پلاسمیدی مانند خانواده‌ی qnr باشد که در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفت.

در نهایت، می‌توان چنین نتیجه گرفت که بر اساس تحقیق حاضر، میزان مقاومت به فلوروکینولون‌ها در منطقه در حال افزایش است. این افزایش MIC، ممکن است توسط پرسنل آزمایشگاه مورد توجه قرار نگیرد؛ مگر این که آزمایش‌های تأییدی ژنوتیپی به کار برده شوند. تشخیص نادرست گونه‌های مقاوم Klebsiella، ممکن است به درمان نامناسب و ضعیف شدن بیمار منجر شود. یکی از عوامل مؤثر در جلوگیری از انتشار میکروارگانیسم‌های مقاوم، شناسایی و غربالگری مستمر آن‌ها با روش‌های مختلف فنوتیپی و مولکولی می‌باشد. پیشنهاد می‌شود از تجویز غیر ضروری آنتی‌بیوتیک‌ها به طور جدی خودداری شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله، برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۴۳۶۴ می‌باشد که در گروه میکروب‌شناسی دانشگاه شهید صدوقی یزد انجام شده است. از همکاری خانم‌ها سعیده حسینی، نیری و عبداللهی صمیمانه قدردانی می‌گردد.

References

1. Hsueh PR, Hoban DJ, Carmeli Y, Chen SY, Desikan S, Alejandria M, et al. Consensus review of the epidemiology and appropriate antimicrobial therapy of complicated urinary tract infections in Asia-Pacific region. J Infect 2011; 63(2): 114-23.
2. Brisse S, Milatovic D, Fluit AC, Verhoef J, Schmitz FJ. Epidemiology of quinolone resistance of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19(1): 64-8.
3. Ahmad TA, El-Sayed LH, Haroun M, Hussein AA, El Ashry SH. Development of immunization trials against Klebsiella pneumoniae. Vaccine 2012; 30(14): 2411-20.
4. Dalhoff A. Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implictions for clinical use. Interdiscip Perspect Infect Dis 2012; 2012: 976273.
5. Kao CY, Wu JJ. The challenge of fluoroquinolone resistance: Epidemiology, mechanisms, and clinical impact. Journal of Biomedical and Laboratory Sciences 2015; 27(3): 77-86. [In Chinese].
6. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: A new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat Med 2006; 12(1): 83-8.
7. 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): 3354-60.
8. Aminzadeh Z, Sadat KM, Sha'bani M. Bacteriuria by extended-spectrum Beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: Isolates in a governmental hospital in South of Tehran, Iran. Iran J Kidney Dis 2008; 2(4): 197-200.
9. 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.
10. Archin T, Afzalian E, Kargar M, Ghasemi Y. Molecular identification of SHV, TEM, CTX-M β lactamases Genes and antibiotics resistance pattern of k.pneumoniae isolates collected from ICU patients of Namazi Hospital, Shiraz, Iran. Armaghane-danesh 2014; 18(10): 816-25. [In Persian].
11. Hadadi A, Rasoulinejad M, Maleki Z, Mojtahedzadeh M, Younesian M, Ahmadi SA, et al . Antimicrobial resistance patterns among Gram-negative bacilli isolated from patients with nosocomial infections: Disk diffusion versus E-test. Tehran Univ Med J 2007; 65(4): 1-10. [In Persian].
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard (CLSI document M07-A10). 10th ed. Wayne, PA: CLSI; 2015.
13. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16(3): 1215.
14. Turton JF, Perry C, Elgohari S, Hampton CV. PCR characterization and typing of Klebsiella pneumoniae using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. J Med Microbiol 2010; 59(Pt 5): 541-7.
15. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related Escherichia coli strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. Emerg Infect Dis 2008; 14(2): 195-200.
16. Sharma N, Gupta AK, Walia G, Bakhshi R. A retrospective study of the changing trends of antimicrobial resistance of Klebsiella pneumoniae isolated from urine samples over last 3 years (2012-2014). J Nat Sci Biol Med 2016; 7(1): 39-42.
17. Wagenlehner FM, Cek M, Naber KG, Kiyota H, Bjerklund-Johansen TE. Epidemiology, treatment and prevention of healthcare-associated urinary tract infections. World J Urol 2012; 30(1): 59-67.
18. Didgar F, Sarmadian H, Ghasemikhah R. Antimicrobial resistance pattern of Gram–negative bacilli isolated of Vali-Asr Hospital wards in Arak. Iran South Med J 2014; 17(5): 938-47. [In Persian].
19. Chowdhury FFK, Ahsan S, Kabir MS. Antibiotic resistance patterns of pathogenic Gram negative bacteria isolated from UTI patients in Sirajganj district. Stamford Journal of Microbiology 2013; 3(1): 17-20.
20. Kashef N, Djavid GE, Shahbazi S. Antimicrobial susceptibility patterns of community-acquired uropathogens in Tehran, Iran. J Infect Dev Ctries 2010; 4(4): 202-6.
21. Chen X, Zhang W, Pan W, Yin J, Pan Z, Gao S, et al. Prevalence of qnr, aac(6′)-Ib-cr, qepA, and oqxAB in Escherichia coli isolates from humans, animals, and the environment. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(6): 3423-7.
22. Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, Amicosante G, Toniolo A, Fadda G. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: Implications for resistance to beta-lactams and other antimicrobial drugs. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(1): 196-202.
23. Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, Verhoef J. Antimicrobial resistance among urinary tract infection (UTI) isolates in Europe: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997. Antonie Van Leeuwenhoek 2000; 77(2): 147-52.
24. Jazayeri Moghadas A, Irajian G. Asymptomatic urinary tract infection in pregnant women. Iran J Pathol 2009; 4(3): 105-8.
25. Ullah F, Malik SA, Ahmed J. Antimicrobial susceptibility pattern and ESBL prevalence in Klebsiella pneumoniae from urinary tract infections in the North-West of Pakistan. African Journal of Microbiology Research 2009; 3(11): 676-80.
26. Singh AK, Sen MR, Anupurba S, Bhattacharya P. Antibiotic sensitivity pattern of the bacteria isolated from nosocomial infections in ICU. J Commun Dis 2002; 34(4): 257-63.

27. Ruiz E, Saenz Y, Zarazaga M, Rocha-Gracia R, Martinez-Martinez L, Arlet G, et al. qnr, aac(6')-Ib-cr and qepA genes in Escherichia coli and Klebsiella spp.: Genetic environments and plasmid and chromosomal location. J Antimicrob Chemother 2012; 67(4): 886-97.

28. Veldman K, Cavaco LM, Mevius D, Battisti A, Franco A, Botteldoorn N, et al. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in Salmonella enterica and Escherichia coli isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. J Antimicrob Chemother 2011; 66(6): 1278-86.

29. Pasom W, Chanawong A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Kenprom S, Puang-Ngern P. Plasmid-mediated quinolone resistance genes, aac(6')-Ib-cr, qnrS, qnrB, and qnrA, in urinary isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae at a teaching hospital, Thailand. Jpn J Infect Dis 2013; 66(5): 428-32.

30. Goudarzi M, Azad M, Seyedjavadi SS. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and OqxAB Efflux pumps among extended-spectrum beta-lactamase producing Klebsiella pneumoniae isolated from patients with nosocomial urinary tract infection in Tehran, Iran. Scientifica (Cairo) 2015; 2015: 518167.

DOI: 10.22122/jims.v35i454.7726 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School Received: 19.04.2017

Vol. 35, No. 454, 2nd Week, January 2018 Accepted: 16.09.2017

Frequency of qepA and aac(6')-Ib-cr Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Klebsiella Pneumoniae isolated from Patients with Urinary Tract Infection in Yazd City, Iran

Golnar Izadi[1], Hengameh Zandi[2], Amin Dehghan-Banadkouki[3], Sahar Sadat Emadi[1], Mahmoud Vakili[4], Akram Astani[5]

Original Article

Abstract

Background: Klebsiella pneumoniae is a common bacterium in nosocomial infections, especially urinary tract infection. Considering rising in fluoroquinolone resistance and lack of accurate reports of frequency of plasmid-mediated genes, this study aimed to determine the frequency of qepA and aac(6')-Ib-cr genes among Klebsiella pneumoniae isolated from urinary tract infection in Yazd City, Iran.

Methods: In this cross-sectional study, 70 Klebsiella pneumoniae strains were isolated from the urine cultures during 9 months (March to November 2014). Antibiotic resistance pattern for common fluoroquinolones were determined via disk diffusion method and the minimum inhibitory concentration (MIC) via Epsilometer test (Etest). Polymerase chain reaction (PCR) method was used for detection of qepA and aac(6')-Ib-cr genes by specific primers. The results were analyzed using SPSS software.

Findings: Disk diffusion results showed that the highest and lowest resistance rates were for nalidixic acid (40.0%) and levofloxacin (27.1%), respectively. According to the minimum inhibitory concentration, 45.7% and 38.6% of the isolates were identified as resistant for nalidixic acid and ciprofloxacin, respectively. aac(6')-Ib-cr gene was detected in 21 isolates (30%); but qepA gene was not detected in any of isolates (0%).

Conclusion: The results of this study indicate that resistance to common fluoroquinolones is gained. High frequency of aac(6')-Ib-cr gene is an alarm for the region. Therefore, antimicrobial resistance monitoring of this bacterium should be reviewed seriously before initiating treatment and studies about the chromosomal and plasmid-mediated quinolone resistance determinants should be done regularly.

Keywords: Klebsiella pneumoniae, Fluoroquinolones, Antibiotic resistance, Genes

Citation: Izadi G, Zandi H, Dehghan-Banadkouki A, Emadi SS, Vakili M, Astani A. **Frequency of qepA and aac(6')-Ib-cr Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Klebsiella Pneumoniae isolated from Patients with Urinary Tract Infection in Yazd City, Iran.** J Isfahan Med Sch 2018; 35(454): 1579-86.

1- Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
2- Assistant Professor, Research Center for Food Hygiene and Safety, School of Public Health AND Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
3- Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Associate Professor, Department of Community Medicine, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
5- Assistant Professor, Zoonotic Diseases Research Center, School of Public Health AND Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
Corresponding Author: Akram Astani, Email: astani_ir@yahoo.com