



## بررسی فراوانی ژن‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین *qnrA* و *qnrB* در جدایه‌های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری در بیمارستان استهبان فارس

حجت علیشاهی<sup>۱</sup>، گیلدا اسلامی<sup>۲</sup>، هنگامه زندی<sup>۳\*</sup>، محمود وکیلی<sup>۴</sup>

### چکیده

مقدمه: عفونت ادراری یک مشکل جدی بهداشتی است که سالانه میلیون‌ها نفر به آن مبتلا می‌گردند. اشریشیاکلی عامل ۹۰-۷۵٪ از عفونت‌های ادراری می‌باشد. استفاده وسیع از سیپروفلوکساسین باعث افزایش مقاومت به این باکتری شده است. هدف از این پژوهش تعیین فراوانی ژن‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین *qnrA* و *qnrB* در اشریشیاکلی جدا شده از نمونه عفونت ادراری بیمارستان امام خمینی (ره) استهبان بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، تعداد ۲۲۴ جدایه اشریشیاکلی از نمونه‌های ادراری بیماران مبتلا به عفونت ادراری در بیمارستان امام خمینی (ره) استهبان جمع‌آوری شد. حساسیت جدایه‌ها نسبت به کینولون‌ها با روش دیسک دیفیوژن و مطابق با استانداردهای ۲۰۱۳ CLSI انجام و MIC سیپروفلوکساسین به روش E-test تعیین گردید. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی حضور ژن‌های *qnrA* و *qnrB* در جدایه‌های حساس و مقاوم به سیپروفلوکساسین به روش multiplex PCR بررسی گردید. داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: از ۲۲۴ جدایه مورد بررسی با تعیین MIC، ۸۸ جدایه (۳۹/۳٪) نسبت به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. همچنین جدایه‌های به ترتیب نسبت به نالیدیکسیک اسید (۴۸/۷٪)، افلوکساسین (۲۹٪)، نورفلوکساسین (۲۷/۷٪) و لووفلوکساسین (۲۳/۷٪) بیشترین مقاومت را نشان دادند. ژن *qnrA* در نمونه‌ها مشاهده نشده و ۷۳ نمونه (۳۲/۶٪) دارای ژن *qnrB* بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان‌دهنده وجود ژن مقاوم به فلوروکینولون‌ها *qnrB* در جدایه‌های اشریشیاکلی مورد مطالعه می‌باشد. با توجه به ارتباط معنی‌دار بین ژن *qnrB* و مقاومت به سیپروفلوکساسین ( $p < 0/05$ ) و به دلیل افزایش مقاومت اشریشیاکلی نسبت به بتالاکتام‌ها، توصیه می‌گردد قبل از شروع درمان آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی انجام شود.

واژه‌های کلیدی: سیپروفلوکساسین، کینولون‌ها، ژن *qnr*، اشریشیاکلی، عفونت مجاری ادراری، مقاومت به پادزیست‌ها

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، میکروبی شناسی، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

۲- استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

۳- استادیار، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

۴- استادیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد میکروبی شناسی پزشکی پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می‌باشد.

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۳۵۳۸۲۲۹۲۰۰، پست الکترونیکی: hengameh\_zandi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۱۵

## مقدمه

عفونت مجاری ادراری یک مشکل جدی بهداشتی می‌باشد که سالانه میلیون‌ها نفر به آن مبتلا می‌گردند. این عفونت شایع‌ترین بیماری باکتریایی کسب شده از اجتماع می‌باشد که اغلب زنان بیشتر از مردان به آن مبتلا می‌گردند (۱). افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های ایجادکننده عفونت ادراری باعث افزایش نگرانی در کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه گردیده است. اشیریشیاکلی عضو خانواده انتروباکتریاسه بوده و یک باکتری گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و بدون اسپور می‌باشد که در روده و مدفوع انسان، حیوانات خون‌گرم و خزندگان یافت می‌شود (۲،۳). اشیریشیاکلی عامل ۹۰-۷۵٪ عفونت‌های مجاری ادراری می‌باشد (۴).

کینولون‌ها و فلوروکینولون‌ها آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف صناعی مهمی هستند که به طور معمول برای درمان عفونت‌های ناشی از اشیریشیاکلی و دیگر باکتری‌ها استفاده می‌گردد (۵).

کینولون‌ها شامل ۴ نسل می‌باشند: نسل اول مانند نالیدیسیک‌اسید، نسل دوم مانند سیپروفلوکساسین، نسل سوم مانند لووفلوکساسین و نسل چهارم مانند گمی‌فلوکساسین (۵). فلوروکینولون‌ها با مهار آنزیم DNA گیراز و توپوایزومراز IV از ساخت DNA جلوگیری می‌کنند (۶).

امروزه مقاومت اشیریشیاکلی به سیپروفلوکساسین در حال افزایش می‌باشد. در مطالعات انجام شده در مناطق مختلف کشور ایران میزان مقاومت اشیریشیاکلی به سیپروفلوکساسین بین ۸۵٪-۱۰/۲٪ گزارش شده است (۷-۱۰). در مطالعات انجام شده در سایر کشورها نیز میزان مقاومت این باکتری به سیپروفلوکساسین بین ۵۹/۴٪ - ۱۴/۸٪ گزارش شده است (۱۱-۱۳). مهمترین ساز و کار مقاومت گونه‌های خانواده انتروباکتریاسه نسبت به فلوروکینولون‌ها، جهش‌هایی است که در کروموزوم باکتری صورت می‌گیرد، مانند جهش در مناطق نزدیک به جایگاه فعال آنزیم‌های DNA گیراز و توپوایزومراز IV به نام مناطق تعیین‌کننده مقاومت کینولونی (QRDRs) (quinolone resistance-determining regions) و

همچنین جهش جهت افزایش پمپ‌های افلاکس (efflux pump) که باعث کاهش اثرات دارو بر جایگاه هدف می‌گردند (۱۴). به تازگی مشخص شده که به واسطه پلاسمیدها نیز نسبت به کینولون‌ها مقاومت ایجاد می‌شود که این نوع مقاومت در حال افزایش است (۱۵). تاکنون سه مکانیسم برای مقاومت کینولون به واسطه پلاسمید (plasmid-mediated quinolone resistance) گزارش شده است که اولین مکانیسم، محافظت از توپوایزومراز به واسطه پروتئین Qnr است که توسط ژن‌های qnrA، qnrB، qnrC، qnrD، qnrS و qnrVS بیان می‌گردند، دومین مکانیسم تغییرات آنزیمی سیپروفلوکساسین می‌باشد که توسط آنزیم آمینوگلیکوزیداستیل ترانسفراز aac(6)-Ib-cr انجام می‌شود و سومین مکانیسم، پمپ افلاکس کینولون‌ها به واسطه پلاسمید توسط پروتئین‌های QepA و OqxAB می‌باشد (۱۶-۱۸).

در دو مطالعه انجام شده در ایران، میزان ژن qnrA به ترتیب ۱۴/۳٪ و ۳۱/۸٪ و میزان ژن qnrB ۵۶/۶٪ گزارش شده است (۱۹،۲۰). عوامل مقاومت کینولون‌ها به واسطه پلاسمید باعث ایجاد مقاومت سطح پایین به فلوروکینولون‌ها می‌گردند. لذا شناسایی این عوامل جهت کنترل مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین مطالعات اپیدمیولوژیک ضروری است. با توجه به اینکه این عوامل توسط روش‌های فنوتیپی قابل شناسایی نمی‌باشند، بنابراین برای شناسایی از روش‌های مولکولی از جمله PCR استفاده می‌گردد (۲۱). هدف از انجام این تحقیق، بررسی فراوانی ژن‌های qnrA و qnrB در جدایه‌های اشیریشیاکلی جدا شده از عفونت‌های ادراری بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) شهرستان استهبان استان فارس بود.

## روش بررسی

جمع‌آوری نمونه و تعیین هویت: در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، در طول یک سال از اول فروردین لغایت ۲۹ اسفند ۱۳۹۲، باکتری‌های جدا شده از نمونه ادرار بیماران بستری و سرپایی مبتلا به عفونت ادراری در آزمایشگاه

ژن‌های *qnrA* و *qnrB* در جدایه‌های اشریشیاکلی مقاوم و حساس به سیپروفلوکساسین، ابتدا حداقل غلظت مهارکنندگی سیپروفلوکساسین (MIC) به روش E-test (Epsilometer test) مطابق با استانداردهای CLSI2013 (۲۳) تعیین شد. در این روش تلقیح سوسپانسیون باکتریایی بر روی محیط کشت همانند روش انتشار دیسک انجام شد و پس از قراردادن نوار E-test سیپروفلوکساسین (شرکت Liofilchem ایتالیا) بر روی محیط، پلیت به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد و سپس محل تلاقی اکلپیس عدم رشد با نوار E-test به عنوان MIC در نظر گرفته شد. مطابق با استانداردهای CLSI ۲۰۱۳ مقدار  $MIC \geq 4 \mu\text{g/ml}$  به عنوان جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین در نظر گرفته شد. جهت کنترل کیفی روش انتشار دیسک و E-test از سویه استاندارد ATCC25923 E. coli استفاده گردید.

استخراج DNA: جهت استخراج DNA کروموزومی از باکتری‌ها، از روش جوشاندن استفاده شد (۲۴). در این روش یک کلنی از باکتری در ۳ میلی‌لیتر محیط TSB استریل در لوله دربیچ‌دار کشت داده و به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. از سوسپانسیون باکتری به مقدار یک میلی‌لیتر در میکروتیوب سترون ۱/۵ میلی‌لیتری استریل ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در دور  $1000 \times g$  در دمای محیط سانتریفیوژ شد. پس از خالی کردن مایع رویی رسوب باکتری سه بار توسط PBS شسته شد. در نهایت رسوب باکتری شسته شده برای لیز سلولی مورد استفاده قرار گرفت. سپس رسوب با ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به حالت سوسپانسیون درآورده شد و میکروتیوب حاوی سوسپانسیون باکتری به مدت ۴ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس سوسپانسیون در دور  $10000 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ (Hettich ساخت آلمان) و مایع رویی حاوی DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت بررسی کیفی و کمی به ترتیب از آگار ژل الکتروفورز (۰/۷٪) و نانودراپ استفاده گردید.

تکثیر ژن‌ها به روش multiplex PCR: تکثیر ژن‌های

میکروب‌شناسی بیمارستان امام خمینی (ره) استهبان، به همراه اطلاعات دموگرافیک بیماران جمع‌آوری شدند. بعد از کشت نمونه‌ها در محیط کشت ائوزین-متیلن-آبی (EMB) و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، پرگنه‌های لاکتوز مثبت، با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و آزمایش‌های بیوشیمیایی مانند تخمیر قندهای گلوکز و لاکتوز و تولید گاز در محیط TSI، تولید اندول از تریپتوفان، حرکت و تولید  $H_2S$  در محیط SIM، استفاده از سیترات در محیط سیمون سیترات، هیدرولیز اوره در محیط اوره و تولید اسیدهای مخلوط از تخمیر گلوکز در محیط MR، مورد بررسی قرار گرفته و تعیین هویت شدند. بعد از تشخیص سویه‌ها به عنوان اشریشیاکلی این جدایه‌ها برای بررسی‌های بعدی جمع‌آوری گردید (۲۲). کلیه محیط‌های کشت ساخت شرکت Conda کشور کانادا بود.

سنجش حساسیت به کینولون‌ها: حساسیت جدایه‌ها نسبت به کینولون‌ها به روش انتشار دیسک (کربی-باوئر (Kirby-Bauer)) مطابق با استانداردهای CLSI2013 (Clinical and Laboratory Standards Institute) (۲۳) انجام شد. به طور اختصار در این روش از کشت باکتریایی ۲۴ ساعته، در لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی استریل، سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل کدورت لوله نیم‌مک فارلند ( $10^8 \times 1/5$  باکتری در میلی‌لیتر) تهیه شده و بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (شرکت Conda کانادا) تلقیح و پس از قرار دادن دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بر روی محیط، به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. با استفاده از خط‌کش، هاله عدم رشد اطراف دیسک برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد و با مقایسه با جدول، به صورت حساس، نیمه‌حساس و مقاوم گزارش شد.

دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده شامل افلوکساسین  $5 \mu\text{g}$  (۵)، نورفلوکساسین  $10 \mu\text{g}$  (۱۰)، لووفلوکساسین  $5 \mu\text{g}$  (۵)، نالیدیکسیک اسید  $30 \mu\text{g}$  (۳۰) بود. کلیه دیسک‌های آنتی‌بیوتیک ساخت شرکت Liofilchem ایتالیا بود.

تعیین MIC سیپروفلوکساسین: به منظور بررسی فراوانی

تکثیر شامل واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ چرخه شامل واسرشتگی در ۹۴، اتصال در ۵۳ و گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه برای هر نمونه اعمال شد. به دنبال آن یک مرحله گسترش نهائی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

qnrA و qnrB با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) و به روش multiplex PCR انجام شد. به این صورت که غلظت نهایی برای هر یک از مواد شامل ۴ پیکومول برای هر یک از پرایمرهای qnrA- F، qnrA- R، qnrB- F و qnrB- R، ۰/۲ میلی‌مولار برای dNTP، ۱/۵ میلی‌مولار برای MgCl<sub>2</sub>، ۵۰ mM Tris-HCl و ۱۰ mM KCl و ۱۰۰ نانومول برای ژنوم به عنوان الگوی تکثیر در نظر گرفته شد. برنامه

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

| نام پرایمرها | توالی پرایمر         | ۵ | ۳ | اندازه محصول (bp) | منبع |
|--------------|----------------------|---|---|-------------------|------|
| qnrA- F      | ATTTCTCACGCCAGGATTTG |   |   | ۵۱۶               | (۲۵) |
| qnrA- R      | GATCGGCAAAGGTTAGGTCA |   |   |                   |      |
| qnrB- F      | GATCGTGAAAGCCAGAAAGG |   |   | ۴۶۹               | (۲۵) |
| qnrB- R      | ACGATGCCTGGTAGTTGTCC |   |   |                   |      |

بیوشیمیایی، از میان باسیل‌های گرم منفی مورد بررسی، تعداد ۲۲۴ جدایه به عنوان اشریشیاکلی تعیین هویت شدند. تعداد ۱۷۴ (۷۷/۷٪) نمونه از زنان و ۵۰ نمونه (۲۲/۳٪) از مردان جدا شد. بیشترین و کمترین میزان مقاومت جدایه‌ها به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید (۴۸/۷٪) و لووفلوکسازین (۲۳/۷٪) نشان داده شد (جدول شماره ۲).

در نهایت محصول multiplex PCR با استفاده از آگارز ژل (۲٪) الکتروفورز و در کنار ladder DNA 50 bp مورد بررسی قرار گرفت. به همراه نمونه‌ها از کنترل مثبت و منفی استفاده شد که کنترل مثبت حاوی ژنوم استخراج شده از باکتری اشریشیا کلی دارای ژن qnrB بود، همچنین جهت کنترل منفی به جای DNA از آب مقطر استفاده شد.

### نتایج

در این مطالعه با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و آزمایشات

جدول ۲: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های مورد بررسی نسبت به کینولون‌ها (n=۲۲۴)

| آنتی‌بیوتیک     | حساس         | نیمه حساس    | مقاوم        |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|
|                 | تعداد (درصد) | تعداد (درصد) | تعداد (درصد) |
| لووفلوکسازین    | ۱۵۸ (۷۰/۵)   | ۱۳ (۵/۸)     | ۵۳ (۲۳/۷)    |
| افلوکسازین      | ۱۵۳ (۶۸/۳)   | ۶ (۲/۷)      | ۶۵ (۲۹)      |
| نورفلوکسازین    | ۱۵۱ (۶۷/۴)   | ۱۱ (۴/۹)     | ۶۲ (۲۷/۷)    |
| نالیدیکسیک اسید | ۱۰۰ (۴۴/۶)   | ۱۵ (۶/۷)     | ۱۰۹ (۴۸/۷)   |

ترتیب در جداول شماره ۳ و ۴ نشان داده شده است. در این مطالعه ۳۹/۲٪ جدایه‌ها دارای MIC  $\geq$  ۴  $\mu$ g/ml بوده و ۲۰/۵٪ جدایه‌ها MIC > ۳۲/۰۰ داشتند.

حداقل غلظت مهار کننده رشد باکتری (MIC) سیپروفلوکسازین در جدایه‌های مورد بررسی بروش E-test و همچنین فراوانی MIC در غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک به

جدول ۳: فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها نسبت به سیپروفلوکساسین بروش E-test

| مجموع    | مقاوم<br>تعداد(درصد) | نیمه حساس<br>تعداد(درصد) | حساس<br>تعداد (درصد) | آنتی بیوتیک مورد بررسی |
|----------|----------------------|--------------------------|----------------------|------------------------|
| ۲۲۴(۱۰۰) | ۸۸ (۳۹/۲)            | ۱۰(۴/۵)                  | ۱۲۶ (۵۶/۳)           | سیپروفلوکساسین         |

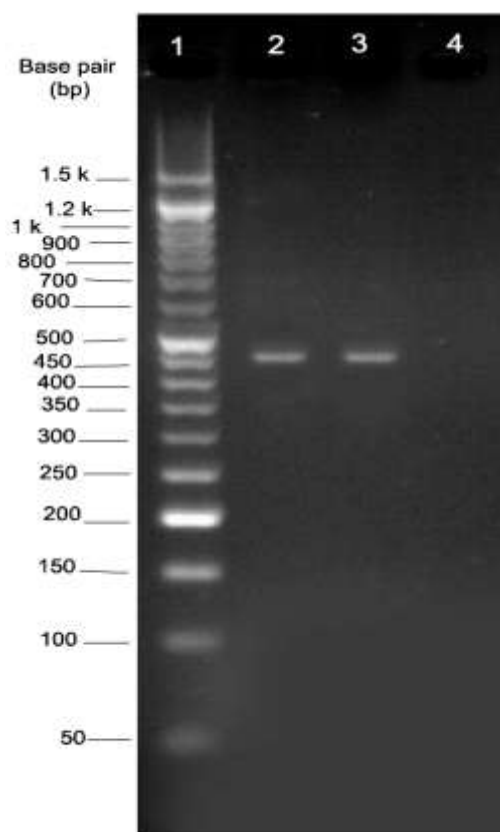
جدول ۴: فراوانی و درصد MIC در غلظت های مختلف سیپروفلوکساسین

| مجموع | MIC  |     |     |     |      |     |      | تعداد | درصد |
|-------|------|-----|-----|-----|------|-----|------|-------|------|
|       | >۳۲  | ۳۲  | ۱۶  | ۸   | ۴    | ۲   | >۲   |       |      |
| ۲۲۴   | ۴۶   | ۱   | ۶   | ۸   | ۲۷   | ۱۰  | ۱۲۶  |       |      |
| ۱۰۰   | ۲۰/۵ | ۰/۴ | ۲/۶ | ۳/۶ | ۱۲/۱ | ۴/۵ | ۵۶/۳ |       |      |

\* براساس پروتکل CLSI 2013 MIC  $\geq$  4  $\mu$ g/ml, مقاوم و MIC=2  $\mu$ g/ml نیمه حساس در نظر گرفته می شود(۲۲).

مشاهده گردید. در تصویر ۱، نتایج حاصل از تکثیر ژن qnrB نشان داده شده است.

براساس نتایج حاصل از multiplex PCR، ژن qnrA در بین جدایه ها وجود نداشت و ژن qnrB در ۷۳(۳۲/۶٪) جدایه



تصویر ۱: آگارز ژل الکتروفورز جهت بررسی نتایج حاصل از تکثیر ژن

qnrB: ستون ۱: 50bp DNA ladder، ستون ۲: نمونه دارای ژن qnrB (۴۶۹bp)، ستون ۳: کنترل مثبت برای ژن qnrB، ستون ۴: کنترل منفی

جدول ۵ نشان می‌دهد که بین وجود ژن *qnrB* و مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین رابطه معنی‌داری وجود دارد ( $p < 0.05$ ).

جدول ۵: تعیین حضور ژن *qnrB* و مقاومت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در جدایه‌های اشریشیاکلی مورد بررسی

| آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین | حساس ژن <i>qnrB</i> | نیمه حساس تعداد (درصد) | مقاوم تعداد (درصد) | مجموع تعداد (درصد) | p-value |
|----------------------------|---------------------|------------------------|--------------------|--------------------|---------|
| مثبت                       | ۳۰ (۲۳/۸)           | ۵ (۵۰)                 | ۳۸ (۴۳/۲)          | ۷۳ (۳۲/۶)          | ۰/۰۰۶   |
| منفی                       | ۹۶ (۷۶/۲)           | ۵ (۵۰)                 | ۱۰۱ (۵۶/۸)         | ۱۵۱ (۶۷/۴)         |         |
| مجموع                      | ۱۲۶ (۱۰۰)           | ۱۰ (۱۰۰)               | ۱۳۶ (۱۰۰)          | ۲۶۲ (۱۰۰)          |         |

همچنین جهت تایید محصول PCR، تعدادی از نمونه‌ها تعیین توالی گردیده و نتایج تعیین توالی BLAST گردید.

### بحث و نتیجه‌گیری

کینولون‌ها و فلوروکینولون‌ها آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف صنعتی مهمی هستند که به طور معمول برای درمان عفونت‌های ناشی از اشریشیاکلی و دیگر باکتری‌ها استفاده می‌گردند. امروزه مقاومت اشریشیاکلی به سیپروفلوکساسین در سرتاسر جهان در حال افزایش می‌باشد. به تازگی مقاومت به واسطه ژن *qnr* که یکی از عوامل مقاومت کینولون‌ها به واسطه پلاسمید (PMQR) می‌باشد مورد توجه قرار گرفته است. ژن *qnr* کدکننده یک پروتئین از واحدهای تکرارشونده پنتاپپتیدی است که با جلوگیری از اتصال کینولون‌ها به آنزیم DNA گيراز و توپوایزومراز IV از DNA محافظت می‌کند (۱۸). ژن *qnrA* کدکننده پروتئینی با ۲۱۸ اسید آمینه بوده و ژن *qnrB* پروتئین شامل ۲۱۴ اسید آمینه را کد می‌کند که از نظر واحدهای اسید آمینه ۴۱٪ به *qnrA* شباهت دارد (۲۶). در این مطالعه با تعیین مقدار MIC سیپروفلوکساسین به روش E-test، از ۲۲۴ نمونه اشریشیاکلی جدا شده از نمونه عفونت ادراری در بیمارستان امام خمینی (ره) استهبان، ۸۸ جدایه (۳۹/۳٪) نسبت به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. در این تحقیق ژن *qnrA* در نمونه‌های مورد بررسی وجود نداشت. فراوانی ژن *qnrB* در جدایه‌های مورد بررسی، ۷۳ جدایه (۳۲/۶٪) بود. در بین ۷۳ جدایه اشریشیاکلی دارای

ژن *qnrB*، ۳۸ جدایه (۵۲٪) نسبت به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. در این مطالعه همچنین مشخص گردید که بین وجود ژن *qnrB* و مقاومت به سیپروفلوکساسین ارتباط معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0.05$ ). همچنین مشخص شد که ۴۳/۲٪ جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای ژن *qnrB* می‌باشند. در تحقیقی که Zhao و همکاران در سال ۲۰۱۵ در چین بر روی ۲۲۰ جدایه اشریشیاکلی انجام دادند، ۹ جدایه (۱/۵٪) دارای ژن *qnrB* بوده ولی ژن *qnrA* در هیچ‌کدام از جدایه‌ها گزارش نکردند (۲۷). Yang و همکاران در سال ۲۰۱۴ در کره جنوبی با مطالعه بر روی ۱۰۲ جدایه اشریشیاکلی مقاوم و نیمه حساس به سیپروفلوکساسین ژن‌های *qnrA* و *qnrB* در هیچ‌کدام از نمونه مشاهده نمودند (۲۸). در تحقیقی که سلیمانی اصل و همکاران در سال ۲۰۱۳ و در شهر خرم آباد بر روی ۱۴۰ جدایه اشریشیاکلی (۱۱۶ جدایه مقاوم به نالیدیکسیک اسید و ۴۳ جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین) انجام دادند، ۱۴ جدایه (۱۲/۱٪) مقاوم به نالیدیکسیک اسید و ۹ جدایه (۱۴/۳٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین، دارای ژن *qnrA* بودند (۱۹). در تحقیقی که منصوری جمشیدی و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی ۱۵۰ جدایه اشریشیاکلی جدا شده از بیمارستان‌های تهران و ایلام انجام دادند، فراوانی ژن‌های *qnrA* و *qnrB* در بین جدایه‌های مقاوم به کینولون‌ها را به ترتیب ۲۲ (۳۱/۸٪) و ۳۹ (۵۶/۵٪) گزارش کردند که ۲۰ (۲۸/۹٪) نمونه دارای دو ژن *qnrA* و *qnrB*

qnrB بودند همخوانی داشته ولی در مطالعات Zhao و همکاران (۲۷)، Yang و همکاران (۲۸) و همچنین Robicsek و همکاران (۲۵) میزان حضور این ژن بسیار کم گزارش گردیده است. حتی در مطالعه Pasom و همکاران (۲۱) ژن qnrB حضور نداشت. مغایرت در نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر با برخی مطالعه‌های مشابه به علت تفاوت در تجویز آنتی بیوتیک‌ها در مناطق مختلف می‌باشد که باعث توزیع متفاوت ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی گردیده است (۳۰).

لازم به ذکر است که در مطالعه حاضر در بین ۱۲۶ جدایه حساس به سیپروفلوکساسین، ۳۰ جدایه (۲۳/۸٪) دارای ژن qnrB بودند. اخیراً پیشنهاد شده است که عوامل مقاومت کینولون‌ها به واسطه پلاسمید (PMQR) می‌توانند باعث ایجاد مقاومت سطح پایین نسبت به فلوروکینولون‌ها گردند و با وجود اینکه جدایه‌های حمل کننده ژن‌های PMQR ممکن است نسبت به فلوروکینولون‌ها حساس باشند، اما افزایش مقاومت این جدایه‌ها بعد از مواجهه با عوامل فلوروکینولونی نشان داده شده است (۲۱). بنابراین علیرغم اکثر مطالعات قبلی در تحقیقات آینده باید وجود این ژن‌ها در جدایه‌های حساس و نیمه حساس نیز مورد توجه قرار گیرد. البته بر اساس مطالعات ذکر شده در بالا، فراوانی این ژن‌های مقاو در کشورهای مختلف بسیار متفاوت است و به نظر می‌رسد که بسیاری از سویه‌های اشریشیاکلی به روش‌های دیگری نسبت به کینولون‌ها مقاومت را کسب می‌کنند. در این مطالعه بیشترین میزان مقاومت جدایه‌های مورد بررسی به روش دیسک دیفیوژن به ترتیب نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید (۴۸/۷٪)، افلوکساسین (۲۹٪)، نورفلوکساسین (۲۷/۷٪) و لووفلوکساسین (۲۳/۷٪) مشاهده شد که نشان‌دهنده بالا بودن مقاومت سویه‌ها به کینولون‌های نسل اول مانند نالیدیکسیک اسید نسبت به سایر فلوروکینولون‌ها می‌باشد.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر که بیانگر وجود سویه‌های مقاوم به کینولون‌ها و حضور ژن مقاومت به واسطه پلاسمید qnrB در سویه‌های اشریشیاکلی می‌باشد، جهت جلوگیری از

بودند (۲۰). در تحقیقی که توسط Pasom و همکاران در تایلند بین سال‌های ۲۰۱۱-۲۰۱۳ انجام شد، در ۱۲۱ جدایه اشریشیاکلی تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، وجود ژن‌های مقاومت به کینولون‌ها به واسطه پلاسمید مورد بررسی قرار گرفت که ۱ جدایه (۰/۸٪) حامل ژن qnrA بود و ژن qnrB در بین جدایه‌ها وجود نداشت. همچنین آن‌ها در این تحقیق متوجه شدند که ۶۰-۳۵٪ از نمونه‌های دارای ژن‌های ایجادکننده PMQR نسبت به فلوروکینولون‌ها مقاوم نبود (۲۱). Robicsek و همکاران در ایالت متحده در سال ۲۰۰۶، با بررسی بر روی سویه‌های خانواده انتروباکتریاسه، فراوانی ژن‌های qnrA و qnrB در ۱۰۶ جدایه کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*) را به ترتیب ۱۴٪ و ۶٪، در ۱۶۰ جدایه انتروباکتر (*Enterobacter spp*) به ترتیب ۱۱٪ و ۲۰٪ و در ۴۷ جدایه اشریشیاکلی را به ترتیب ۱٪ و ۱٪ گزارش نمودند (۲۵).

Corkill و همکاران در سال ۲۰۰۵ در انگلستان با بررسی ۴۷ جدایه انتروباکتریاسه مقاوم به سیپروفلوکساسین و سفوتاکسیم جدا شده از موارد باکتریایی، شیوع ژن qnrA را ۳۲٪ گزارش کردند (۲۹).

در مطالعات ذکر شده، فراوانی ژن‌های qnrA و qnrB اغلب فقط در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین مورد بررسی قرار گرفته است ولی در مطالعه حاضر هم سویه‌های مقاوم و هم سویه‌های حساس سیپروفلوکساسین از نظر وجود ژن‌های qnrA و qnrB مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مربوط به حضور ژن qnrA در مطالعات مختلف با یکدیگر تناقض دارد، چنانچه در پژوهش‌های سلیمانی اصل و همکاران (۱۹) و منصوری جمشیدی و همکاران (۲۰) این ژن یافت شده است ولی در مطالعه حاضر و مطالعات Zhao و همکاران (۲۰)، Yang و همکاران (۲۸) و همچنین Robicsek و همکاران (۲۵) یافت نشد. همانطور که قبلاً ذکر گردید در مطالعه حاضر ۴۳/۲٪ جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای ژن qnrB بودند که با نتایج مطالعه منصوری جمشیدی و همکاران (۲۰) که بیش از نیمی از سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای ژن

حاصل از مطالعات مرتبط با مقاومت آنتی‌بیوتیکی مورد توجه مسئولین کمیته عفونت‌های بیمارستانی قرار گیرد تا راهکارهایی جهت جلوگیری از شیوع سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، گسترش عفونت‌های بیمارستانی و کنترل این عفونت‌ها اندیشیده شود.

#### سیاسگزاری

بدین وسیله مراتب قدردانی و تشکر از آقایان دکتر سید شهریار شیخ الاسلامی، هادی کامگار و امین دهقان را اعلام می‌دارد. لازم به ذکر است این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد میکروبی‌شناسی پزشکی پردیس بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می‌باشد.

افزایش سویه‌های اش‌ریشیاکلی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های کینولون، لازم است سنجش حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها قبل از تجویز تعیین گردد تا با مصرف آنتی‌بیوتیک مناسب و جلوگیری از مصرف خودسرانه و غیرمنطقی آنتی‌بیوتیک‌ها از افزایش مقاومت جلوگیری به عمل آید. به دلیل اهمیت فلوروکینولون‌ها در درمان بیماری‌های ناشی از اش‌ریشیاکلی، لازم است میزان شیوع این نوع مقاومت هر ساله در کشور مورد بررسی قرار گیرد.

پیشنهاد می‌گردد که برای بررسی دقیق‌تر میزان شیوع انواع مقاومت به فلوروکینولون‌ها، علاوه بر ارزیابی مکانیسم‌های مقاومت وابسته به کروموزوم، مکانیسم‌های دیگر مانند مقاومت به واسطه پلاسمیدها نیز مورد توجه قرار گیرد. همچنین نتایج

#### References:

- 1- Dromigny JA, Nabeth P, Juergens-Behr A, Perrier-Gros-Claude JD. *Risk factors for antibiotic-resistant Escherichia coli isolated from community-acquired urinary tract infections in Dakar, Senegal.* J Antimicrobial Chemotherapy 2005; 56(1): 236-39.
- 2- Berg RD. *The indigenous gastrointestinal microflora.* Trends in Microbiol 1996; 4(11): 430-35.
- 3- Gordon DM, Cowling A. *The distribution and genetic structure of Escherichia coli in Australian vertebrates: host and geographic effects.* Microbiol 2003; 149(12):3575-586.
- 4- Gupta K. *Addressing antibiotic resistance.* American J Med 2002; 113 (1): 29-34.
- 5- Cooper CS, Klock PL, Chu DT, Hardy DJ, Swanson RN, Plattner JJ. *Preparation and in vitro and in vivo evaluation of quinolones with selective activity against gram-positive organisms.* J Med Chemistry 1992; 35(8): 1392-98.
- 6- Fu Y, Zhang W, Wang H, Zhao S, Chen Y, Meng F, et al. *Specific patterns of gyrA mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli.* BMC Infectious Diseases 2013; 13(1): 8.
- 7- Mahdavi A, Nahaei MR, AKHI AMT, Nahaei M, Dibavar MA. *Antibiotic resistance pattern against fluoroquinolones among Escherichia coli isolated from ICU and out-patient clinic admitted patients with urinary tract infection.* Med J Tabriz Uni Med Sci 2009; 31(3): 91-6. [Persian]
- 8- 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 by E-test versus disk diffusion test.* Tehran Uni Med J 2007; 65(4): 1-10. [Persian]

- 9- Milani M, Nahaei MR, Lotfipour F, Saber Y. *Antibiotic sensitivity of prevalent bacteria isolated from urinary tract infection during 1998-2005*. Pharmaceutical Sci 2008; 4: 47-53. [Persian]
- 10- Mokhtarian H, Ghahramani M, Nourzad H. *A study of antibiotic resistance of Escherichia coli isolated from urinary tract infection*. QHMS 2006; 12(3): 5-10. [Persian]
- 11- Kahlmeter G. *An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project*. J Antimicrobial Chemotherapy 2003; 51(1): 69-76.
- 12- Shao HF, Wang WP, Zhang XW, Li ZD. *Distribution and resistance trends of pathogens from urinary tract infections and impact on management*. Zhonghua Nan Ke Xue 2003; 9(9): 690-92.
- 13- Colodner R, Kometiani I, Chazan B, Raz R. *Risk factors for community-acquired urinary tract infection due to quinolone-resistant E. coli*. Infection 2008; 36(1): 41-5.
- 14- Hooper DC. *Mechanisms of fluoroquinolone resistance*. Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy 1999; 2(1): 38-55.
- 15- Stephenson S, Brown PD, Holness A, Wilks M. *The emergence of qnr-mediated quinolone resistance among Enterobacteriaceae in Jamaica*. West Indian Med J 2010; 59(3): 241-44.
- 16- 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*. Japanese J Infectious Diseases 2011; 64(1): 55-7.
- 17- Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. *Plasmid-mediated quinolone resistance*. Microbiology spectrum 2014; 2(5).
- 18- Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, et al. *qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2006; 50(4): 1178-82.
- 19- Zibaei M, Firoozeh F. *Detection of qnrA gene among quinolone-resistant Escherichia coli isolated from urinary tract infections in Khorram Abad during 2011-2012*. J Kashan Uni Med Sci 2013; 17(5): 488-94. [Persian]
- 20- Mansouri Jamshidi N, Pakzad I, Tabaraei B, Hadadi A. *Evaluating the frequency of ciprofloxacin resistance qnr genes in Escherichia coli strains isolated from clinical samples of Imam Khomani and Milad Hospitals in Ilam and Tehran, Iran*. Sci J Ilam Uni Med Sci 2013; 21(6): 16-22. (In Persian)
- 21- 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*. Japanese J Infectious Diseases 2013; 66(5): 428-32.

- 22- Bailey W R, Finegold SM, Martin WJ, Scott EG. *Bailey and Scott's Diagnostic microbiology: a textbook for the isolation and identification of pathogenic microorganisms*. 5th Edition, the Uni Michigan 2008; 145-80.
- 23- Clinical and laboratory standard institute. *Performance standard for antimicrobial susceptibility testing: Document M100-S23*. Wayne,PA,USA: CLSI; 2013.
- 24- Queipo-Ortuño MI, Colmenero JDD, Macias M, Bravo MJ, Morata P. *Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in Real-Time PCR for serum samples from Patients with Brucellosis*. Clin. Vaccine Immunol 2008; 15 (2): 293-96.
- 25- Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. *qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2006; 50(8): 2872-74.
- 26- Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Sato K, Ibe S, et al. *Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in Shigella flexneri 2b*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2005; 49(2): 801-03.
- 27- Zhao L, Zhang J, Zheng B, Wei Z, Shen P, Li S, et al. *Molecular epidemiology and genetic diversity of fluoroquinolone-resistant Escherichia coli isolates from patients with community-onset infections in 30 Chinese county hospitals*. J clinic microbiol 2015; 53(3): 766-70.
- 28- 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*. The Canadian J infectious diseases & med microbio J canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie med/ AMMI Canada 2014; 25(3): 163-69.
- 29- Corkill JE, Anson JJ, Hart CA. *High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from blood cultures in Liverpool, UK*. J antimicrobial chemotherapy 2005; 56(6): 1115-17.
- 30- Davies J, Davies D. *Origins and evolution of antibiotic resistance*. Microbio molecular biology rev: MMBR 2010; 74(3): 417-33.

## ***Frequency of QnrA and QnrB Ciprofloxacin-resistant Genes in Escherchia Coli Strains Isolated from Urinary Tract Infections in Estahban-Hospitals in Fars Province***

***Alishahi H(MSc)<sup>1</sup>, Eslami G(PhD)<sup>2</sup>, Zandi H(PhD)<sup>\*3</sup>, Vakili M(MD)<sup>4</sup>***

<sup>1</sup> International campus, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

<sup>2</sup> Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

<sup>3</sup> Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

<sup>4</sup> Department of Public Medicine, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

**Received:** 22 Apr 2015

**Accepted:** 6 Aug 2015

### ***Abstract***

**Introduction:** Urinary tract infections(UTIs) are regarded as a serious health problem that affects millions of people per year. In fact, *Escherchia coli* causes about 75%-90% of UTIs. The wide usage of ciprofloxacin has led to an increase in the resistance to this bacterium. Therefore, this study aimed to evaluated frequency of *qnrA* and *qnrB* genes in *E. coli* strains isolated from UTIs at Imam Khomeini hospital in Estahban-Fars province.

**Methods:** In this descriptive-analytic study, a total of 224 *E. coli* strains isolated from the urine samples of the patients suffering from urinary tract infection were collected at Estahban Imam Khomeini Hospital. The susceptibility testing for quinolons were performed by the disk diffusion method according to CLSI 2013 protocols. Moreover, the minimum inhibition concentration(MIC) of ciprofloxacin was determined by the E-test method. Multiplex PCR was carried out in order to evaluate the presence of *qnrA* and *qnrB* genes in the Cipro floxacin-resistant isolates applying the specific primers. Moreover, the study data were statistically analyzed by SPSS software (V.16).

**Results:** 224 isolates were obtained via applying MIC, out of which 88 (39.2%) isolates were resistant to ciprofloxacin. The resistance rates to quinolons were as follows: nalidixic acid(48.7%), ofloxacin(29%), norfloxacin (27.7%), levofloxacin (23.7%). Seventy three (32.6%) isolates carried *qnrB* gene, whereas *qnrA* gene was not observed in any samples.

**Conclusion:** As the study results indicated, resistant genes to *qnrB* were seen in the *E. coli* isolates of urine samples. As a matter of fact, a significant correlation was detected between *qnrB* gene and resistance to ciprofloxacin ( $p < 0/05$ ). Moreover, antimicrobial susceptibility tests are recommended to be performed before beginning the treatment due to the increased resistance of *E. coli* to beta-lactams.

**Keywords:** Antibiotic resistance; Ciprofloxacin; *E. coli*; *Qnr* genes; Quinolones; Unitary tract infection

#### ***This paper should be cited as:***

Alishahi H, Eslami G, Zandi H, Vakili M. *Frequency of qnra and qnrB ciprofloxacin-resistant genes in escherchia coli strains isolated from urinary tract infections in estahban-hospitals in fars province*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 23(8): 736-46.

**\*Corresponding author: Tel: 03538229200, Email: hengameh\_zandi@yahoo.com**