تایپینگ مولکولی و بررسی حضور ژن‌های افلاکس در ایزوله‌های ادراری *کلبسیلا پنومونیه*: مطالعه مقطعی

معصومه امیری[۱]، مریم قانع*[۲]، لاله بابایی خو[۳]

تاریخ دریافت ۱۳۹۷/۰۸/۱۶ تاریخ پذیرش ۱۳۹۷/۱۱/۰۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: پمپ‌های افلاکس نقش مهمی در ایجاد مقاومت دارویی در *کلبسیلا پنومونیه* ایفا می‌کنند. هدف از این مطالعه، بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، حضور ژن‌های افلاکس و همچنین تایپینگ مولکولی جدایه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه توصیفی مقطعی درمجموع، ۱۰۰ جدایه بالینی *کلبسیلا پنومونیه* از بیمارستان میلاد تهران جمع‌آوری شد. شناسایی باکتری‌ها بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و آزمایش حساسیت ضد میکروبی مطابق با توصیه‌های موسسه استاندارد روش‌های آزمایشگاهی (CLSI) انجام شد. حضور ژن‌های *tolC*، *AcrAB*، *mdtK* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و تایپینگ مولکولی با استفاده از روش PCR عناصر تکراری بین ژنی (ERIC-PCR) انجام شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان داد که ۴۸ درصد ایزوله‌ها مقاومت چند دارویی (MDR) داشتند. بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین (۶۵ درصد) و سفپیم (۵۷ درصد) و کم‌ترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به آزترئونام (صفر درصد) و فسفومایسین (۱ درصد) مشاهده شد. ژن *AcrAB* با فراوانی ۹۶ درصدی، فراوان‌ترین ژن افلاکس در ایزوله‌ها بود و پس‌ازآن ژن‌های *mdtK* با ۸۲ درصد و *tolC* با ۷۹ درصد قرار داشتند. ERIC-PCR، ۱۶ ژنوتیپ متفاوت را در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* نشان داد. ارتباط معنی‌داری بین الگوی اریک و ژن‌های پمپ افلاکس در برخی کلون‌ها مشاهده شد ($p<0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: یافته‌های ما شیوع بالای مقاومت چند دارویی و ژن‌های افلاکس را در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* نشان داد. سرکوب سیستم‌های افلاکس ممکن است در درمان و کنترل عفونت‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به چند دارو مفید باشد.

کلیدواژه‌ها: *کلبسیلا پنومونیه*، مقاومت دارویی، تایپینگ مولکولی

مجله پزشکی ارومیه، دوره سی‌ام، شماره اول، ص ۲۰-۸، فروردین ۱۳۹۸

آدرس مکاتبه: اسلامشهر، میدان نماز، بلوار صیاد شیرازی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر، تلفن: ۵۶۳۶۸۹۸۴

Email: ghane@iiau.ac.ir, maryamghaneh@yahoo.com

مقدمه

باکتری‌های مقاوم به درمان آنتی‌بیوتیکی تهدیدی حیاتی برای سلامت انسان هستند و گسترش قابل‌توجهی در بسیاری از کشورها پیدا کرده‌اند. آگاهی از میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی علاوه بر نقش آن در کاهش مرگ‌ومیر، ازنظر اقتصادی نیز بسیار حائز اهمیت می‌باشد. هزینه‌های پزشکی مرتبط با درمان عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در یک بیمارستان فقط در طول یک سال حدود ۱۳/۳۵ میلیون دلار برآورد شده است. بنابراین آگاهی از میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جامعه علاوه بر کاهش میزان مرگ‌ومیر، باعث افزایش دانش در مورد پیامدهای مقاومت، جلوگیری از ظهور گونه‌های مقاوم و همچنین کاستن هزینه‌های درمانی می‌گردد (۱).

بیش از ۷۰ سال از ظهور اولین آنتی‌بیوتیک علیه عفونت‌های میکروبی می‌گذرد و در این مدت باکتری‌ها به‌عنوان موجودات زنده و هوشمند، از مکانیسم‌های جدیدی برای بقای خود استفاده کرده‌اند. یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت باکتری‌ها، بیان سیستم‌های پمپ افلاکس است (۲). افلاکس فرآیندی است که طی آن باکتری، ترکیباتی مانند داروها و مواد شیمیایی سمی را به خارج سلول دفع و از ایجاد غلظت کشنده برای باکتری جلوگیری می‌نماید. سیستم‌های پمپ افلاکس در پروکاریوت‌ها دارای ۵ خانواده هستند

[۱] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر، اسلامشهر، ایران

[۲] استادیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر، اسلامشهر، ایران (نویسنده مسئول)

[۳] استادیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر، اسلامشهر، ایران

که به دلیل تنوع سوبسترایی در ایجاد مقاومت چند دارویی از اهمیت بالایی برخوردارند. پمپ‌های افلاکس نه‌تنها باعث افزایش حداقل غلظت مهاری (MIC) آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند، بلکه با کاهش غلظت دارو در داخل سلول، منجر به ایجاد سویه‌های جهش‌یافته مقاوم در باکتری‌ها می‌گردند (۳).

پمپ‌های افلاکس یکی از مهم‌ترین علل ایجاد سویه‌های با مقاومت چندگانه (MDR) در میکروارگانیسم‌ها ازجمله *کلبسیلا پنومونیه* هستند (۴). *سویه‌های کلبسیلا* پنومونیه مقاوم به چند دارو، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف بسیاری که قبلاً در درمان این ارگانیسم‌ها مفید بوده، مقاوم هستند. ازاین‌رو درمان آن‌ها چالش بزرگی برای پزشکان در سراسر جهان است.

سیستم‌های پمپ افلاکس در *کلبسیلا پنومونیه* شامل AcrAB و سیستم‌های MdtK هستند. پمپ‌های AcrAB-TolC از یک کانال واقع در غشای خارجی(TolC) ، یک ناقل در غشای داخلی و بخش پری‌پلاسمی (AcrA) تشکیل شده است (۵). این پمپ مسئول مقاومت به کینولون‌ها، تتراسایکلین و کلرامفنیکل در بسیاری از سویه‌های MDR است. سیستم Mdtk نیز برخی از این آنتی‌بیوتیک‌ها را به خارج ترشح می‌کند (۶).

در *کلبسیلا پنومونیه*، افزایش بیان پمپ AcrAB با افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی همراه است. همچنین نشان داده شده است که AcrAB در بیماری‌زایی باکتری هم دخالت دارد (۷، ۸). پمپ افلاکس AcrAB از پمپ‌های اصلی ایجادکننده‌ی مقاومت ذاتی سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* علیه فلوروکینولون‌ها، به‌ویژه سیپروفلوکساسین است. در نتیجه فلوروکینولون‌ها که به نظر می‌آمد انتخابی مناسب در درمان عفونت‌های ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* باشند، در مطالعات بسیاری افزایش مقاومت باکتری نسبت به آن‌ها گزارش شده است (۹). این پمپ علاوه بر مقاومت به کینولون‌ها، سبب مقاومت به کلرامفنیکل، تتراسایکلین، تری متوپریم، بتالاکتام‌ها و ماکرولیدها هم می‌شود (۱۰).

روش ERIC-PCR یکی از روش‌های مفید در تایپینگ انواع گونه‌های باکتریایی به شمار می‌رود. این روش مبتنی بر بررسی توالی‌های تکرارشونده ERICبا طول ۱۲۷-۱۲۴ جفت باز است. توالی‌های ERIC واجد ناحیه معکوس تکرارشونده و حفاظت شده هستند که به شکل بین ژنی در ژنوم باکتری‌ها موجود می‌باشند. این توالی‌ها و تفاوت در تکرار آن‌ها به‌عنوان یک ابزار بیولوژیک مولکولی برای بررسی ژنتیکی خانواده انتروباکتریاسه ازجمله *کلبسیلا پنومونیه* کاربرد دارند (۱۱). روش‌های مولکولی مبتنی بر DNA برای شناسایی و طبقه‌بندی میکروب‌ها، وابستگی کم‌تری به عوامل متغیر و مؤثر در رشد باکتری داشته و در مدت‌زمان کوتاهی با انعکاس روابط فیلوژنی بین ایزوله‌های مختلف، می‌تواند آن‌ها را در گروه‌های خاص قرار دهد (۱۱). دست‌یابی به اطلاعات پایه‌ای و بنیادی در خصوص شناخت ایزوله‌های جداشده می‌تواند به درک درستی از منشأ عفونت و در پی آن، راهکارهای کنترل عفونت در مراکز درمانی و درنهایت کاهش مرگ‌ومیر منجر شود.

علیرغم شیوع بالای عفونت‌های ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* در ایران، اطلاع نسبتاً کمی درزمینه‌ی فراوانی ژن‌های پمپ افلاکس در ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* وجود دارد. با توجه به اهمیت پمپ‌های افلاکس به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین مکانیسم‌های مقاومت چند دارویی، در این مطالعه، میزان شیوع ژن‌های رمز کننده این پمپ‌ها در ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* موردبررسی قرار گرفت. به‌علاوه ارتباط ژنتیکی بین ایزوله‌های جداشده با استفاده از روش ERIC-PCR بررسی شد.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه و جداسازی باکتری‌ها:

این مطالعه مقطعی- توصیفی در طی یک دوره ۱۰ ماهه از دی ۱۳۹۶ تا آبان ۱۳۹۷ بر روی ۱۰۰ ایزوله ادراری *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از بیماران بستری در بیمارستان میلاد انجام شد. نمونه ادرار از قسمت میانی ادرار در ظروف استریل جمع‌آوری شد. بیماران بستری در بیمارستان با علائم عفونت ادراری قبل از مصرف آنتی‌بیوتیک وارد تحقیق شدند. برای جداسازی باکتری *کلبسیلا پنومونیه*، نمونه‌های ادرار بر روی محیط کشت بلاد آگار و مک‌کانکی آگار به روش کشت خطی کشت داده شدند و از کلنی‌های مخاطی و صورتی‌رنگ در محیط مک‌کانکی به‌عنوان کلنی مشکوک به کلبسیلا برای تست‌های بیوشیمیایی، کشت خالص تهیه شد. برای شناسایی سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* از روش رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی نظیر ایندول، متیل رد، وژس- پروسکوئر، سیترات، اوره و حرکت استفاده گردید. پس از تأیید نهایی باکتری‌های جداشده، کلنی‌های باکتری در محیط نگه‌دارنده شامل محیط لوریا برتانی براث (LB) (مرک، آلمان) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۲). مطالعه حاضر با رعایت کامل مفاد کمیته اخلاق در پژوهش انجام گردید و مجوز اخلاق در پژوهش از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد واحد علوم پزشکی تهران با کد IR.IAU.TMU.REC.1396.278 اخذ شد.

بررسی حضور ژن‌های افلاکس:

برای تهیه DNA ژنومی، یک کلنی منفرد از هر یک از سویه‌های جدا شده در ۵ میلی لیتر محیط کشت LB در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به صورت شبانه کشت داده شد (۱۲)، سپس استخراج DNAبا استفاده از کیت استخراج DNA (فرمنتاز، لیتوانی) و بر

اساس دستور کار شرکت سازندهٔ کیت صورت گرفت. برای بررسی وجود ژن رمز کننده‌ی سیستم پمپ افلاکس MdtK از واکنش PCR و برای ردیابی ژن‌های AcrAB و TolC از واکنش مالتی پلکس PCR استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده است. واکنش با استفاده از بافر ۱X (PCR buffer 1X)، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۱ میلی مولار$MgCl_2$ ، ۰/۲ میکرو مولار از هر یک از پرایمرها، ۵ میکرولیتر DNA ژنومی (۵۰ نانو گرم)، ۱/۲۵ واحد Taqپلیمراز و آب مقطر دوبار تقطیر تا حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. واکنش با یک سیکل ۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌منظور واسرشت سازی اولیه آغاز شد و با ۳۵ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای واسرشت سازی، ۳۰ ثانیه برای مرحله اتصال پرایمرها (۴۳ درجه سانتی‌گراد برای واکنش PCR و ۵۳ درجه برای مالتی پلکس PCR) و ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای طویل شدن رشته‌ها ادامه پیدا کرد. درنهایت این واکنش با یک سیکل ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای طویل سازی نهایی به اتمام رسید (۴).

جدول (۱): پرایمرهای مورد استفاده

ژن		توالی پرایمر	طول قطعه ایجاد شده (جفت باز)	منبع
AcrAB	forward reverse	ATCAGCGGCCGGATTGGTAAA GGGTTCGGGAAAATAGCGCG	۳۱۲	(4)
TolC	forward reverse	ATCAGCAACCCCGATCTGCGT CCGGTGACTTGACGCAGTCCT	۵۲۷	(4)
MdtK	forward reverse	GCGCTTAACTTCAGCTCA GATGATAAATCCACACCAGAA	۴۵۳	(4)

بررسی حساسیت ضد میکروبی:

سنجش حساسیت سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* به آنتی بیوتیک، با روش انتشار از دیسک (۱۳) و مطابق با توصیه‌های موسسه استاندارد روش‌های آزمایشگاهی CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)انجام شد (۱۴). آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده از کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی و بر اساس فراوانی استفاده از آن‌ها در بیمارستان‌ها انتخاب شدند؛ این آنتی‌بیوتیک‌ها شامل آمیکاسین(30 µg) ، ایمیپنم(10 µg) ، سفپیم(30 µg) ، سیپروفلوکساسین(5 µg) ، آزترئونام(30 µg) ، فسفومایسین(50 µg) ، سفتریاکسون(30 µg) ، نورفلوکساسین (10 µg) (شرکتMAST ، انگلستان) بودند. آزمون آنتی بیوگرام با استفاده از سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی و مقایسه کدورت آن با نیم مک فارلند انجام شد. سوسپانسیون تهیه شده با استفاده از سواب استریل بر روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) به صورت متراکم کشت داده شد و پس از قرار دادن دیسک‌ها بر روی سطح محیط کشت، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت، قطر هاله‌ی عدم رشد با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد و نتایج با استفاده از جداول استاندارد CLSI تفسیر گردید. سویه‌هایی که نسبت به سه خانواده آنتی‌بیوتیک و در هر خانواده حداقل نسبت به یکی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند، به‌عنوان سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR)در نظر گرفته شدند (۱۵).

تایپینگ مولکولی با استفاده از روشERIC :

تایپینگ مولکولی ایزوله‌ها با روش ERIC-PCR و با استفاده از پرایمر ERIC2 با توالی ۵- ′AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3′انجام شد (۴). برای این منظور ۲ میکرولیتر از نمونه DNA (۵۰ نانوگرم) به ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس با غلظت نهایی 1X(Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED)(Ampliqon، دانمارک)، ۱ میکرولیتر پرایمر (10 pmol) و ۹/۵ میکرولیتر آب اضافه شد. PCRبا یک سیکل ۱۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌منظور واسرشت سازی اولیه آغاز شد و با ۳۵ سیکل شامل ۱ دقیقه ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای واسرشت شدن رشته‌ها، ۱ دقیقه ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای اتصال پرایمر و ۸ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای طویل سازی رشته‌ها ادامه پیدا کرد (۴). برای مشاهده‌ی باندها، از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. پس از مشاهده باندهای حاصل از تکثیر PCR و اسکن تصاویر آن‌ها، امتیاز دهی بر اساس حضور و یا عدم حضور باندهای DNA انجام شد. به این ترتیب که در هر جمعیت در صورت حضور باند، امتیاز یک و در صورت عدم حضور باند امتیاز صفر داده شد و درنهایت داده‌ها توسط نرم‌افزار NTsys (NTSYSpc version2.10e) آنالیز شده و برای ترسیم دندروگرام از روش UPGMA استفاده شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری:

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد. ارتباط معنی‌دار بین ژن‌های رمز کننده پمپ افلاکس و مقاومت آنتی‌بیوتیکی و نیز نوع الگوی ERIC-PCR با استفاده از

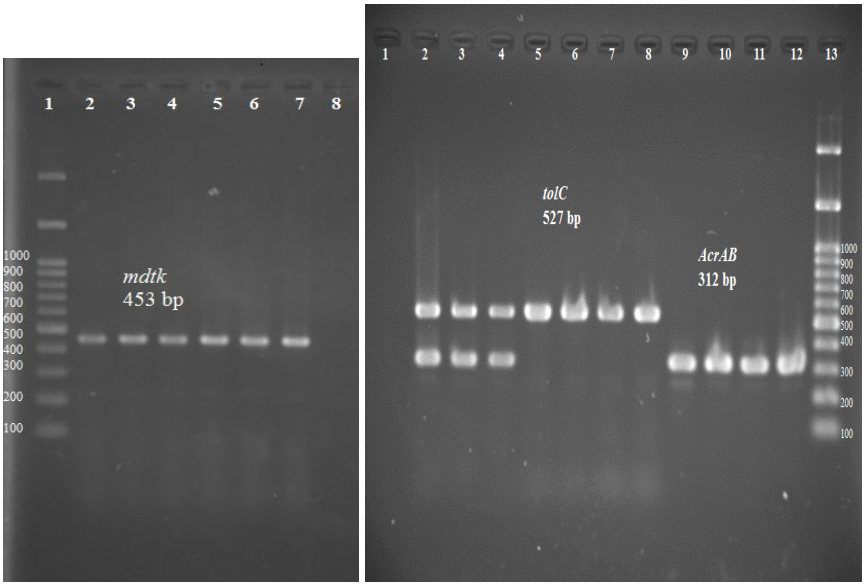
آزمون کای اسکوئر و آزمون دقیق فیشر انجام شد. در تمام آنالیزها $p \leq 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از دی ماه سال ۱۳۹۶ تا آبان سال ۱۳۹۷، ۱۰۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* از بیماران بستری در بیمارستان میلاد تهران جدا شد. تمام ایزوله‌های جدا شده مربوط به نمونه‌های ادرار بودند که در این میان ۵۰ (۵۰ درصد) ایزوله از مردان و ۵۰ (۵۰ درصد) ایزوله از زنان جدا شده بود و میانگین سن بیماران ۲۲±۴۶/۹ بود.

نتایج حضور ژن‌های پمپ افلاکس در سویه‌های جدا شده:

در این مطالعه، ۳ ژن مرتبط با پمپ‌های افلاکس شامل ژن‌های *tolC*، *AcrAB* و *mdtK* با استفاده از روش PCR ردیابی شدند. نتایج حاصل از PCR در شکل ۱ نشان داده شده است. در میان ایزوله‌های جدا شده ژن *AcrAB* فراوان‌ترین ژن افلاکس (۹۶ درصد) و پس‌ازآن ژن‌های *mdtK* و *tolC* (به ترتیب ۸۲ درصد و ۷۹ درصد) بودند. در میان ایزوله‌ها تنها ۲ درصد آن‌ها هیچ یک از سه ژن مورد مطالعه را نداشتند. ۶ درصد آن‌ها دارای دو ژن و ۱۵ درصد آن‌ها دارای یک ژن بودند. ۷۷ درصد باقی مانده هر سه ژن *tolC*، *AcrAB* و *mdtK* را دارا بودند.



شکل (۱): نتایج حاصل از الکتروفورز محصول مالتی پلکس PCR ژن‌های *tolC* و *AcrAB* (سمت راست) و محصول PCR ژن *mdtK* (سمت چپ) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی. شکل سمت راست: ستون ۱ کنترل منفی، ستون ۲ کنترل مثبت (سویه *کلبسیلا پنومونیه* تهیه شده از کلکسیون میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) ستون ۳ و ۴ سویه‌های دارای ژن‌های *tolC* و *AcrAB*، ستون ۸-۵ سویه‌هایی که ازنظر ژن *tolC* مثبت بودند، ستون‌های ۱۲-۹ سویه‌هایی که ازنظر وجود ژن *AcrAB* مثبت بودند و ستون ۱۳ مارکر (100 bp size marker). شکل سمت چپ: ستون ۱ مارکر، ستون ۲ کنترل مثبت، ستون ۷-۳ سویه‌های دارای ژن *mdtK* و ستون ۸ کنترل منفی.

بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده:

نتایج بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مورد مطالعه در جدول ۲ آورده شده است. همان طور که در نمودار مشاهده می‌شود، بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین (۶۵ درصد) و سفپیم (۵۷ درصد) و کم‌ترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به آزترئونام (صفر درصد) و فسفومایسین (۱ درصد) مشاهده شد. در مطالعه حاضر ۴۸ درصد ایزوله‌ها به‌عنوان سویه‌های MDR مشخص شدند. این سویه‌ها ۱۵ الگوی مقاومت را نشان دادند. جدول ۳ الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های MDR و فراوانی ژن‌های افلاکس را در این سویه‌ها نشان می‌دهد. در بین سویه‌های MDR، ۳۹ ایزوله (۸۱/۵ درصد)، هر ۳ ژن مورد مطالعه را داشتند (جدول ۳).

جدول (۲): الگوی حساسیت ضد میکروبی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*

آنتی بیوتیک	حساس	نیمه حساس	مقاوم
	تعداد (٪)	تعداد (٪)	تعداد (٪)
آمیکاسین	۲۹	۶	۶۵
	(٪۲۹)	(٪۶)	(٪۶۵)
ایمیپنم	۸۳	۶	۱۱
	(٪۸۳)	(٪۶)	(٪۱۱)
سفپیم	۳۶	۷	۵۷
	(٪۳۶)	(٪۷)	(٪۵۷)
سیپروفلوکساسین	۳۶	۱۷	۴۷
	(٪۳۶)	(٪۱۷)	(٪۴۷)
نورفلوکساسین	۷۱	۳	۲۶
	(٪۷۱)	(٪۳)	(٪۲۶)
آزترئونام	۹۷	۳	۰
	(٪۹۷)	(٪۳)	
فسفومایسین	۹۵	۴	۱
	(٪۹۵)	(٪۴)	(٪۱)
سفتریاکسون	۶۷	۲	۳۱
	(٪۶۷)	(٪۲)	(٪۳۱)

جدول (۳): الگوی حساسیت ضد میکروبی ایزوله‌های MDR *کلبسیلا پنومونیه* و فراوانی ژن‌های کد کننده پمپ‌های افلاکس

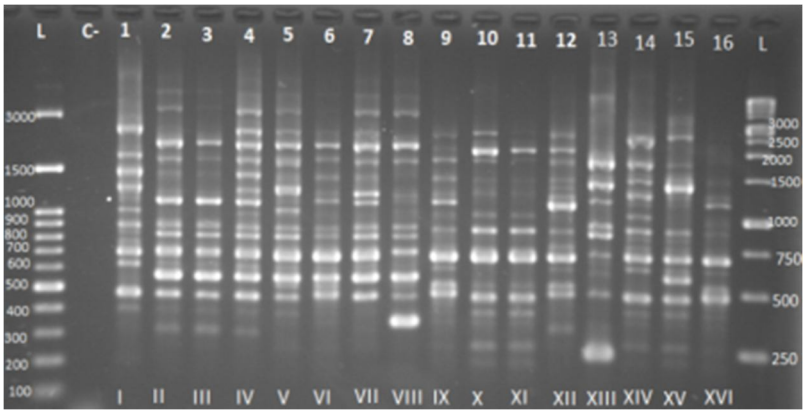
ایزوله‌ها	الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی	ژن‌های رمز کننده پمپ‌های افلاکس		
		tolC	AcrAB	mdtK
Kp 4	AK-CPM-CIP-CRO	+	+	+
Kp 5		+	+	+
Kp 25		+	+	+
Kp 89		-	+	-
KP 7	AK-CPM-NOR-CRO	+	+	+
Kp 44		+	+	+
Kp 49		+	+	+
Kp 51		+	+	+
Kp 52		+	+	+
Kp 56		+	+	+
Kp 11	AK-IMI-CPM-CIP-NOR-CRO	+	+	+
KP 15		+	+	+
Kp 41		+	+	+
Kp 42		+	+	+
Kp 13	AK-IMI- CPM-CIP	+	+	+
Kp 33		+	+	+
Kp 46		+	+	+
Kp 17	AK-CIP-CRO	+	+	+

ایزوله‌ها	الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی	ژن‌های رمز کننده پمپ‌های افلاکس		
		tolC	AcrAB	mdtK
Kp 34		+	+	+
Kp 20	AK-CPM-CIP-NOR	+	+	+
Kp 78		-	+	-
Kp 93		+	+	+
Kp 95		+	+	+
Kp 23	AK-IMI-CIP-NOR	+	+	+
Kp 24	AK-IMI-CPM	+	+	+
Kp 48	AK-CPM-CIP-FOS	+	+	+
Kp 50	AK-CPM-NOR	+	+	+
Kp 62		-	+	-
Kp 65		-	+	+
Kp 57	AK-CIP-NOR-CRO	+	+	+
Kp 94		+	+	+
Kp 65	AK-CPM-NOR	-	+	+
Kp 68	AK-IMI-CIP	-	+	-
Kp 81	AK-NOR-CRO	+	+	+
Kp 82		-	+	-
Kp 83		+	+	+
Kp 12	AK-CPM-CIP	+	+	+
Kp 9		+	+	+
Kp 29		+	+	+
Kp 30		+	+	+
Kp 31		+	+	+
Kp 54		-	-	+
Kp 55		+	+	+
Kp 76		-	+	-
Kp 79		+	+	+
Kp 87		+	+	+
Kp 88		+	+	+
Kp 97		+	+	+

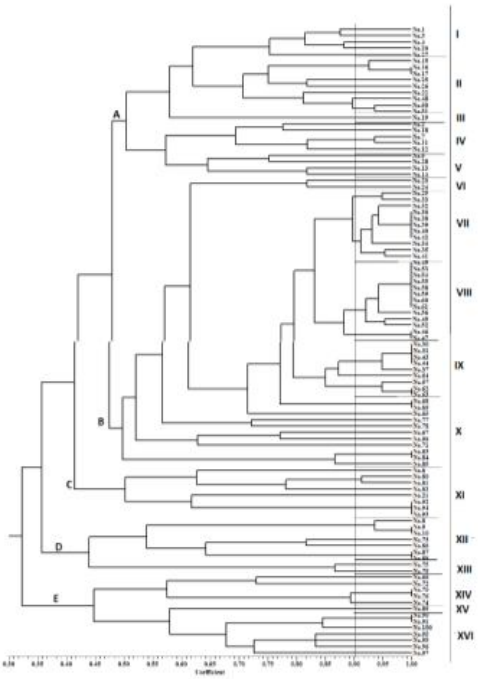
AK: آمیکاسین 30 µg، IMI: ایمیپنم 10 µg، CPM: سفپیم 30 µg، CIP: سیپروفلوکساسین 5 µg، ATM: آزترئونام 30 µg،FOS: فسفومایسین 50 µg، CRO: سفتریاکسون 30 µg، NOR: نورفلوکساسین 10 µg.

ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*:

ERIC-PCR، ۱۶ الگوی متفاوت DNA را در ایزوله‌های مورد مطالعه نشان داد (شکل ۲). نتایج حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* با استفاده از نرم‌افزار NTsys به صورت یک دندروگرام در شکل ۳ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود همه ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* در ۵ گروه اصلی A-E تقسیم می‌شوند. اکثریت ایزوله‌ها (۴۶ ایزوله) در گروه B قرار دارند. در این گروه ۵ کلون (۱۰-۶) مجزا وجود دارند. گروه B نیز دارای ۲۴ ایزوله بوده با ۵ کلون (۵-۱) قابل مشاهده است. گروه C دارای ۱ نوع کلون و ۸ ایزوله، گروه D دارای ۲ نوع کلون و ۹ ایزوله و درنهایت گروه E دارای ۳ نوع کلون و ۱۳ ایزوله بودند. در واقع کلون‌های ۳ و ۱۵ با یک ایزوله و کلون‌های ۶ و ۱۳ با دو ایزوله کم‌ترین فراوانی را بین نمونه‌های مورد آزمایش داشتند. کلون‌های ۷ و ۱۰ با ۱۱ ایزوله و کلون ۸ با ۱۳ ایزوله پرتکرارترین کلون‌ها بودند. ارتباط بین ژنوتایپینگ و وجود ژن‌های کد کننده پمپ افلاکس در جدول ۴ مشخص شده است. در این جدول مشاهده می‌شود که اکثر ایزوله‌هایی که در یک کلونال تایپ قرار گرفته‌اند، ازنظر دارا بودن سه ژن *AcrAB tolC* و *mdtK* نیز مشابه هستند. ارتباط معنی‌داری بین حضور ژن‌های رمز کننده پمپ‌های افلاکس و نوع الگوی اریک در برخی کلون‌ها مشاهده شد ($p<0.05$).



شکل (۲): ژل الکتروفورز حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌های MDR *کلبسیلا پنومونیه*



شکل (۳): دندروگرام حاصل از ژنوتایپینگ ایزوله‌ها به روش ERIC-PCR

جدول (۴): ارتباط بین تایپینگ مولکولی و ژن‌های کد کننده پمپ افلاکس

ERIC-PCR type	تعداد ایزوله‌ها	*TolC*	*AcrAB*	*mdtK*
I	۵	۵	۵	۵
II	۹	۹	۹	۹
III	۱	۱	۱	۱
IV	۵	۵	۵	۵
V	۴	۴	۴	۴
VI	۲	۲	۲	۲
VII	۱۱	۱۱	۱۱	۱۰
VIII	۱۳	۱۱	۱۱	۱۱
IX	۹	۶	۹	۶
X	۱۱	۵	۱۰	۷
XI	۸	۵	۷	۵
XII	۷	۶	۷	۷
XIII	۲	۱	۲	۱
XIV	۵	۱	۵	۲
XV	۱	۰	۱	۰
XVI	۷	۷	۷	۷
Total	۱۰۰	۷۹	۹۶	۸۲

بحث و نتیجه‌گیری

کلبسیلا پنومونیه عامل ایجادکننده‌ی بیماری‌های عفونی بسیاری همچون عفونت خون، زخم، پنومونی و مننژیت است. استفاده‌ی گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به مقاومت بالای سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* شده است (۱۶). در دنیا سالیانه ۱۵۰ میلیون نفر به عفونت ادراری مبتلا می‌شوند که *کلبسیلا پنومونیه* عامل ۱۲ درصد از آن‌ها است (۱۷). سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان ایزوله‌های کسب شده از جامعه و بیمارستان‌ها رو به افزایش است و این امر یک مشکل بزرگ و جهانی است (۱۸). مطالعه حاضر، فراوانی بسیار بالایی از ژن‌های افلاکس را در ایزوله‌های مورد مطالعه نشان داد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ۴۸ درصد ایزوله‌ها MDRهستند. این یافته‌ها با نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده توسط پارسایی مهر و همکاران در ایران مطابقت دارد (۱۹). میزان شیوع سویه‌های MDR *کلبسیلا پنومونیه* در کشورهایی نظیر مصر و نپال بالاتر (به ترتیب ۷۱/۱ درصد و ۶۶/۷ درصد) و در ترکیه پایین‌تر (۲۹ درصد) از نتایج به دست آمده در این تحقیق است (۴، ۲۰، ۲۱). فراوانی بالای سویه‌های MDR *کلبسیلا پنومونیه* در آزمایش حاضر می‌تواند به دلیل فقدان یک قانون نظارتی در ایران برای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و در نتیجه استفاده بیش از حد آن‌ها باشد. استفاده بی رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به انتخاب سویه‌های مقاوم به دارو می‌شود. ازآنجایی‌که ژن‌های مقاومت اغلب بر روی پلاسمیدها و یا سایر عناصر ژنتیکی متحرک قرار دارند که آن‌ها نیز چندین ژن مقاومت را به‌طور همزمان حمل می‌کنند؛ انتقال آن‌ها بین سویه‌های بالینی می‌تواند منجر به گسترش هر چه بیشتر سویه‌های MDR گردد.

در این مطالعه مقاومت ۱۰۰ ایزوله‌ی *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به هشت آنتی‌بیوتیک از کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی با استفاده از تست دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت. میزان مقاومت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها نسبت به سال‌های پیش افزایش قابل‌توجهی پیدا کرده است. به‌عنوان مثال ۶۵ درصد ایزوله‌ها به آمیکاسین مقاوم بودند درحالی‌که در مطالعات انجام شده در سال ۱۳۹۱، صفر درصد (۲۲)، در سال ۱۳۹۲، ۲۵ درصد (۲۳)، در سال ۱۳۹۳، ۲۶ درصد (۲۴) و در سال ۱۳۹۴، ۳۵ درصد ایزوله‌ها نسبت به آمیکاسین مقاوم بودند (۲۵). مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفپیم از ۸ درصد در سال ۱۳۹۳ (۲۴) به ۵۷ درصد در مطالعه حاضر رسیده است. مقاومت به ایمی پنم در ۱۱ درصد ایزوله‌های مطالعه حاضر مشاهده شد درحالی‌که در مطالعات قبلی این میزان ۲ درصد بوده است (۲۲، ۲۴). میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین نیز از ۳۰ درصد در سال ۱۳۹۲ (۲۳) و ۳۳ درصد در سال ۱۳۹۴ (۲۵)، به ۴۷ درصد در مطالعه حاضر رسیده است. این روند افزایشی میزان مقاومت ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در سال‌های اخیر، بسیار نگران کننده است. این موضوع نشان‌دهنده‌ی مصرف بی رویه و بدون نظارت آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز کسب مکانیسم‌های متعدد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشد. این مکانیسم‌ها شامل تولید پمپ‌های افلاکس،

کاهش پورین‌ها، تولید کارباپنماز و تولید متالوبتالاکتاماز می‌باشد (۲۶).

در مطالعات انجام شده طی سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۶ کم‌ترین مقاومت ایزوله‌های *کلبسیلا* نسبت به ایمیپنم بوده است (۲۶-۲۸). این نتیجه در کشورهای مختلف ازجمله ایران (۲۲)، پاکستان (۳۰)، ژاپن (۳۱) و اردن (۳۲) مشابه بود و همگی ایمیپنم را به‌عنوان مؤثرترین آنتی‌بیوتیک برای درمان عفونت‌های *کلبسیلا پنومونیه* و آخرین خط درمانی جهت عفونت‌های ناشی از این بیماری معرفی کرده بودند. درحالی‌که نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده افزایش مقاومت سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* به ایمیپنم (۱۱ درصد) بود. سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان سویه‌های ایجادکننده‌ی عفونت‌های دستگاه ادراری، از کشوری به کشور دیگر متغیر است و از دلایل ایجاد این تفاوت‌ها می‌توان به شرایط جغرافیایی، شیوه زندگی و نحوه تجویز آنتی‌بیوتیک اشاره کرد (۲۴).

پمپ‌های افلاکس آنتی‌بیوتیکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی هستند که در ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* نیز استفاده می‌شوند (۳۳، ۳۴). در مطالعه حاضر شیوع بسیار بالایی از ژن‌های افلاکس در ایزوله‌های مورد مطالعه مشاهده شد. مطالعات متعددی نشان داده که سیستم‌های پمپ افلاکس در ایجاد مقاومت ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به فلوروکینولون‌ها دخالت دارند (۳۵-۳۷). در مطالعات دیگری نشان داده شد که ۱۰۰ درصد ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین دارای پمپ‌های AcrAB هستند (۸،۱۰). در این مطالعه ۹۵/۷ درصد سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای ژن AcrAB بودند؛ با این وجود ارتباط معنی‌داری بین حضور این ژن و مقاومت به سیپروفلوکساسین مشاهده نشد ($P>0.05$). در مطالعه حاضر، ۷۷/۵ درصد ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، هر سه ژن پمپ مورد مطالعه را دارا بودند و تنها ۵/۱ درصد آن‌ها هیچ یک از سه ژن *tolC*، *AcrAB* و *mdtK* را نداشتند. این مسئله مشکلات جدی در درمان عفونت‌های ناشی از *کلبسیلا* ایجاد کرده و می‌تواند انتخاب‌های درمانی را محدود کند.

تایپینگ مولکولی ابزار قدرتمندی در مطالعه‌ی عفونت‌های بیمارستانی است (۳۸). در این مطالعه ژنوتایپینگ ایزوله‌ها با استفاده از روشERIC-PCR ، ۱۶ الگوی متفاوت (در سطح شباهت ۹۰ درصد) را در ۱۰۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* مورد مطالعه نشان داد. این تفاوت‌ها می‌تواند به دلیل تنوع ژنتیکی ایزوله‌های مورد آزمایش باشد. نتایج حاصل از آزمایش حاضر همسو با نتایج Lai و همکاران است که بیان کردند *کلبسیلا پنومونیه* پاتوژنیک، بر اساس تفاوت در توالی نوکلئوتیدی‌شان، به شدت هتروژن هستند و آنالیز الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژنوتایپینگ به روشERIC-PCR ، می‌تواند در پیش‌بینی الگوی مقاومت ایزوله‌ها مورد استفاده قرار گیرد (۳۹). مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک یکی از دلایل ایجاد الگوهای هتروژن در باکتری‌ها می‌باشد. دسته‌بندی سویه‌ها در چندین گروه متفاوت با استفاده از روش ERIC-PCR می‌تواند یک زنگ خطر برای جامعه‌ی مورد مطالعه باشد. حضور کلون‌های متفاوت *کلبسیلا پنومونیه* در مطالعه حاضر می‌توانند به معنای منشأ متفاوت سویه‌ها و یا الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی متفاوت باشند. لذا در ارائه و تجویز آنتی‌بیوتیک باید به نتایج روش ERIC توجه کرد تا اولاً نتایج درمانی بهتری به دست آید و دوماً با عدم تجویز نامناسب دارو، از بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتر جلوگیری شود.

مطالعه حاضر با چند محدودیت مواجه بود. اول این که در این مطالعه صرفاً حضور ژن‌های افلاکس مورد بررسی قرار گرفته بود. حال آنکه برای مطالعه دقیق‌تر ارتباط پمپ‌های افلاکس با مقاومت آنتی‌بیوتیکی لازم است بیان ژن‌های سیستم افلاکس نیز بررسی گردد. دوم اینکه مطالعه حاضر به یک بیمارستان محدود بود. با مطالعه گسترده‌تر بر روی تعداد بیشتری بیمارستان می‌توان به اطلاعات دقیق‌تری از میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی و میزان فراوانی ژن‌های افلاکس در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* پی برد.

تمام نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر نگران کننده و نشان از افزایش رو به رشد مقاومت‌های چند دارویی در بین ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* دارد. انتقال این ایزوله‌های بیمارستانی به افراد جامعه ممکن است سبب گسترش مقاومت دارویی و بیماری‌زایی در جامعه به‌ویژه در افراد دارای ضعف سیستم ایمنی شود. نتایج حاصل نشان می‌دهد که آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده، در درمان عفونت‌های *کلبسیلا پنومونیه* چندان مؤثر نیستند و استفاده از آن‌ها در درمان، علاوه بر بالا رفتن هزینه‌های درمانی، سبب بروز هر چه بیشتر مقاومت دارویی خواهد شد. در نتیجه ضرورتاً پیشنهاد می‌شود که درمان مورد استفاده توسط پزشکان حتماً بر اساس نتایج آنتی بیوگرام انجام شده توسط آزمایشگاه میکروب شناسی بالینی باشد. همچنین مشاهده شد که در ۹۸ درصد ایزوله‌ها حداقل یک ژن کد کننده‌ی پمپ افلاکس وجود دارد. بنابراین درمان عفونت‌های ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* می‌تواند به سمت مقابله با بیان این پمپ‌ها در باکتری و یا مهار آن‌ها برود. نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های اندمیک *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده در شهر تهران دارای الگوهای ژنتیکی متنوعی هستند و روش ERIC-PCR برای تمایز آن‌ها از کارایی مناسبی برخوردار بوده و جهت مطالعات اپیدمیولوژیک، کاربردی است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد است. نگارندگان از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد واحد اسلامشهر برای فراهم آوردن شرایط لازم برای انجام تحقیق کمال تشکر را دارند.

هیچ‌گونه تضاد منافع وجود ندارد.

References:

1- Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev 2017; 41(3):252-75.

2- Tanwar J, Das S, Fatima Z, Hameed S. Multidrug resistance: an emerging crisis. Interdiscip Perspect Infect Dis 2014;2014:541340.

3- Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. Nat Rev Microbiol 2006;4(8):629-36.

4- Wasfi R, Elkhatib WF, Ashour HM. Molecular typing and virulence analysis of multidrug resistant Klebsiella pneumoniae clinical isolates recovered from Egyptian hospitals. Sci Rep 2016;6:38929.

5- Du D, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, et al. Structure of the AcrAB–TolC multidrug efflux pump. Nature 2014;509(7501):512-5.

6- Okusu H, Ma D, Nikaido H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. J bacteriol 1996;178(1):306-8.

7- Bialek-Davenet S, Lavigne J-P, Guyot K, Mayer N, Tournebize R, Brisse S, et al. Efflux pumps AcrAB and OqxAB and porins OmpK35 and Ompk36: relationship, regulation and impact on multidrug resistance and virulence in *Klebsiella pneumonia*e. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54:4373-8.

8- Farivar AS, Nowroozi J, Eslami G, Sabokbar A, Hashemi A. The study of antibiotic resistance among *Klebsiella pneumoniae* and expression level of oqxA and acrA genes by using real-time PCR. Res Med 2016; 40(1):42-8.

9- Swick MC, Morgan-Linnell SK, Carlson KM, Zechiedrich L. Expression of multidrug efflux pump genes acrAB-tolC, mdfA, and norE in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. Antimicrob agents chemother 2011;55(2):921-4.

10- Pakzad I, Zayyen Karin M, Taherikalani M, Boustanshenas M, Lari AR. Contribution of AcrAB efflux pump to ciprofloxacin resistance in Klebsiella pneumoniae isolated from burn patients. GMS Hyg Infect Control 2013;8(2).

11- Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen G-X. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(6): 2014-8.

12- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual: Cold spring harbor laboratory Cold Spring Harbor, NY; 1982.

13- Bauer A, Kirby W, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Path 1966;45(4_ts):493-6.

14- Wayne P. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI Document M100, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017.

15- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C, et al. Multidrug‐resistant, extensively drug‐resistant and pandrug‐resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012;18(3):268-81.

16- Cao X, Xu X, Zhang Z, Shen H, Chen J, Zhang K. Molecular characterization of clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2014;13(1):16.

17- Foysal MdJ, Majlish AK, Islam K, Alam MdJ, Ali MH, Momtaz F. Targeting of Virulence Factors and Plasmid Profiling of *Klebsiella pneumoniae* Causing

Urinary Tract Infection in Sylhet City of Bangladesh. Braz arch biol technol 2018; 61.

18- Abbasi P, Kargar M, Doosti A, Mardaneh J, Ghorbani-Dalini S, Dehyadegari MA. Characterization of Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) using multiplex Real-Time PCR assays for stx1, stx2, eaeA. Iran J of Microbiol 2014;6(3):169-74.

19- Parsaie Mehr V, Shokoohizadeh L, Mirzaee M, Savari M. Molecular Typing of *Klebsiella pneumoniae* Isolates by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)–PCR. Infect Epidemiol Microbiol 2017; 3(4):112-6.

20- Paneru T. Surveillance of *Klebsiella pneumoniae* and antibiotic resistance a retrospective and comparative study through a period in Nepal. Danish J Med Biol Sci 2015:29-36.

21- Avcioglu NH, Bilkay IS. Antibiotic resistance, multidrug resistance and enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction profiles of clinically important *Klebsiella* species. Asian Biomed 2016;10(1):41-7.

22- Soltan Dalal MM, Miremadi SA, Sharify Yazdi MK, Rastegar Lari A, Rajabi Z, Avadis Yans S. Antimicrobial resistance trends of *Klebsiella* spp. isolated from patients in Imam Khomeini hospital. J Payavard Salamat 2012;6(4):275-81. (Persian)

23- Mohammadi S, Mohammadi B, Zandi S, Ramazanzadeh R, Rouhi S. Antibiotic sensitivity in strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples Besat hospitals of Sanandaj (2013-2014). Zanko J Med Sci 2016; 17(52): 1-9. (Persian)

24- Tavakol M, Momtaz H. Determination of antibiotic resistance profile in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from urinary tract infections of patients hospitalized in Peyambaran hospital (Tehran-Iran). Feyz J 2017;21(1):74-82. (Persian)

25- Pourali Sheshblouki G, Mardaneh J, Hosseinzadeh Z. Klebsiella pneumoniae infections in hospitalized patients: Characterization of Antibiotic Cross-resistance and Detection of Cefepime Susceptible-dose Dependent (SDD) Strains. J Fasa Univ Med Sci 2016;6: 52-9. (Persian).

26- Shakil S, Azhar E, Tabrez S, Kamal M, Jabir N, Abuzenadah A, et al. New Delhi Metallo-β-Lactamase (NDM-1): An Updates. J Chemother 2011;23(5):263-5.

27- Gulsun S, Oguzoglu N, Inan A, Ceran N. The virulence factors and antibiotic sensitivities of *Escherichia coli* isolated from recurrent urinary tract infections. Saudi Med J 2005; 26(11):1755-8.

28- Mathai E, Grape M, Kronvall G. Integrons and multidrug resistance among Escherichia coli causing community‐acquired urinary tract infection in southern India. Apmis 2004;112(3):159-64.

29- Tariq N, Jaffery T, Ayub R, Alam AY, Javid MH, Shafique S. Frequency and antimicrobial susceptibility of aerobic bacterial vaginal isolates. JCPSP 2006;16(3):196-9.

30- Amin A, Ghumro PB, Hussain S, Hameed A. Prevalence of antibiotic resistance among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from a tertiary care hospital in Pakistan. Malaysian J Microbiol 2009;5:81-6.

31- Ishii Y, Alba J, Kimura S, Shiroto K, Yamaguchi K. Evaluation of antimicrobial activity of β-lactam antibiotics using E-test against clinical isolates from 60 medical centres in Japan. Int J Antimicrob Agents 2005;25(4):296-301.

32- Al Shara MA. Emerging antimicrobial resistance of *klebsiella pneumoniae* strains isolated from pediatric patients in jordan. New Iraqi J Med 2011;7(2):29-32.

33- Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. N Engl J Med 2010;362(19):1804-13.

34- Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picao RC, Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. Expert Rev Anti-infect Ther 2010;8(1):71-93.

35- Hasdemir UO, Chevalier J, Nordmann P, Pagès J-M. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism

in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. J Clin microbiol 2004;42(6):2701-6.

36- Martínez-Martínez L, Pascual A, del Carmen Conejo M, García I, Joyanes P, Doménech-Sánchez A, et al. Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and relationship to extended-spectrum β-lactamase production. Antimicrob Agents Chemother 2002;46(12):3926-32.

37- Mazzariol A, Tokue Y, Kanegawa TM, Cornaglia G, Nikaido H. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. Antimicrob Agents Chemother 2000;44(12):3441-3.

38- Boccia S, Posteraro B, La Sorda M, Vento G, Matassa PG, Tempera A, et al. Genotypic analysis by 27A DNA fingerprinting of Candida albicans strains isolated during an outbreak in a neonatal intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol 2002;23(5):281-4.

39- Lai YC, Yang SL, Peng HL, Chang HY. Identification of genes present specifically in a virulent strain of *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immunity 2000;68(12):7149-51.

Original Article

MOLECULAR TYPING AND INVESTIGATING THE PRESENCE OF EFFLUX GENES IN URINARY ISOLATES OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE

Masoumeh Amiri[1], Maryam Ghane[2], Laleh Babaee khou[3]*

Received: 07 Nov, 2018; Accepted: 26 Mar, 2019

Abstract

Background & Aims: The efflux pumps play an important role in the development of drug resistance in Klebsiella pneumoniae. The aim of this study was to investigate the antibiotic resistance, and the presence of efflux genes, as well as molecular typing in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae.

Materials & Methods: In this cross sectional descriptive study, a total of 100 K. pneumoniae isolates were collected from Milad hospital, Tehran, Iran. Bacterial identification was carried out by biochemical tests and antimicrobial susceptibility testing performed according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. The presence of TolC, AcrAB, MdtK genes were investigated using polymerase chain reaction (PCR) and molecular typing was performed according to the enterobacterial repetitive intergenic consensus -polymerase chain reaction (ERIC-PCR).

Results: The results showed that 48% of isolates were multidrug resistant (MDR). The highest rate of resistance was observed against amikacin (65%) and the lowest resistance was found in aztreonam and fosfomycin (1%). The occurrence of AcrAB gene (96%) was the highest, followed by mdtK (82%) and tolC (79%). ERIC-PCR revealed 16 different genotypes among K. pneumoniae isolates. There was a significant association between ERIC-PCR pattern and efflux pump genes in some clonal types ($p<0.05$).

Conclusion: Our findings indicated the high prevalence of multidrug resistance and efflux genes in Klebsiella pneumoniae isolates. The strategy for suppressing these efflux systems may be useful in the treatment and control of the multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae.

Keywords: Klebsiella pneumoniae, Drug Resistance, Molecular Typing

Address: Faculty of Science, Department of Biology, Islamic Azad University, Islamshahr branch, Islamshahr, Iran
Tel: +982156368984
Email: ghane@iiau.ac.ir, maryamghaneh@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2019: 30(1): 20 ISSN: 1027-3727

[1] *MSc in microbiology, Faculty of Science, Department of Biology, Islamic Azad University, Islamshahr branch, Islamshahr, Iran*
[2] *Assistant Professor of Microbiology, Faculty of Science, Department of Biology, Islamic Azad university, Islamshahr branch, Islamshahr, Iran (Corresponding Author)*
[3] *Assistant Professor of Microbiology, Faculty of Science, Department of Biology, Islamic Azad university, Islamshahr branch, Islamshahr, Iran*