Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:37 +0430 on Sunday June 20th 2021

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی – مولکولی

دوره پنجم، شماره هجدهم – بهار ۱۳۹۴

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی شیوع ژن qnr در ایزوله های اسینتو باکتر بالینی

میترا صالحی[۱]، مهناز طبیب زاده[۲]، محمدرضا فلاحیان[۳]

۱. استادیارِ میکروبیولوژی،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

۲. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

۳. مربی میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

چکیده

سابقه و هدف شیوع ژن qnr در میان ایزوله های اسینتوباکتر بالینی در سطح شهر تهران در جهت بروز مقاومت به فلوروکینولونها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها:حضور ژن *qnrA*با روش *PCR* و حساسیت آنتی بیوتیکی ۵۰ ایزوله بالینیاسینتوباکترنسبت به آنتی بیوتیک های خانواده فلوروکینولون، پیپراسیلین-تازوباکتام و کلیستین با روش آنتی بیوگرام بررسی شد.

یافته ها:۷۴٪ از ایزوله های *qnr*مثبت دارای ژن *qnrA* و۲۲٪ از آنها دارای ژن *qnrB* بودند. همچنین تمام سویه ها مقاوم به فلوروکینولون بودند.

نتیجه گیری:نتایج بیانگر فراوانی بالای ژن *qnr* در این ایزوله ها و نیز نشانگر شیوع بالاتر ژنوتیپ *qnrA*نسبت به ژنوتیپ *qnrB* می باشد.

کلمات کلیدی : اسینتوباکتر، ژن *qnr*، ژنوتیپ *qnrA*، ژنوتیپ *qnrB*

مقدمه

امروزه یکی از مشکلات عمده ی سیستم های بهداشتی، عفونت های بیمارستانی است که بیش از همه در بخش های مراقبت ویژه اهمیت دارد. بیماران بستری شده در بخش های مراقبت ویژه به دلیل پیچیدگی مراقبت، شرایط خاص بیماران و استفاده از تجهیزات مختلف پزشکی در طول درمان، در معرض عفونت با ارگانیسم ها هستند. مقاومت آنتی بیوتیکی یکی از مشکلات اساسی در درمان و کنترل عفونت ها به ویژه در این دسته از بیماران محسوب می شود (۹).

روش کار

جامعه مورد بررسی و نمونه ها

در این مطالعه۵۰ایزوله اسینتوباکتر از نمونه های بالینی مختلف شامل تراشه،خلط، ادرار،خون، زخم، مایع آسیت، مایع پلور، کاتتر، مایع نخاعی،از بخش های مختلف بیمارستان های تهران جدا شده و مورد بررسی قرار گرفتند.

روش آزمایشگاهی

نمونه های بالینی در مدت مطالعه پس از انتقال به آزمایشگاه بر روی محیط های BHI و مک کانکی آگار (Merck) کشت داده شد و پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از مشاهده رشد بلافاصله تست های افتراقی بر روی آنها انجام گرفت، به این صورت که پس از رنگ آمیزی و مشاهده کوکو باسیل های گرم منفی از نظر تست اکسیداز بررسی شدند. نمونه های اکسیداز منفی با استفاده از تست های بیوشیمیایی، مانند تست حرکت،تست سیترات و کشت بر روی محیط گلوکز OF(Oxidation-Fermentation) و رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به منظور شناسایی قطعی ایزوله ها مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی نمونه ها

آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
پست الکترونیکی : mahnaz33082@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله : ۹۲/۷/۲۰
تاریخ پذیرش : ۹۲/۱۲/۴

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:37 +0430 on Sunday June 20th 2021

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش آگار دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام گردید.جهت انجام آزمایش سوسپانسیونی از کلنی های باکتری معادل لوله ۰/۵ مک فارلند تهیه شده و پس از آغشته کردن سوآپ استریل با سوسپانسیون، بر روی محیط مولر هینتون آگار پخش گردید. بعد از قرار دادن دیسک های آنتی بیوتیک روی پلیت قطر هاله عدم رشد پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد اندازه گیری شده و نتایج طبق دستور العمل مربوطه (طبق راهنمای CLSI) تحت عناوین حساس،نیمه حساس و مقاوم ثبت و تحلیل گردید.

آنتی بیوتیک های مورد بررسی در این مطالعه شامل دیسک آنتی بیوتیک های خانواده فلوروکینولون(سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، نورفلوکساسین) پیپیراسیلین-تازوباکتام و کلیستین بودند.

استخراج DNA

جهت استخراج DNA از ایزوله های بالینی ازکیت تجاری شرکت MBST مخصوص باکتری های گرم منفی طبق دستورالعمل آن استفاده گردید. به منظور بررسی حضور ژن های *qnrB*،*qnrA* روی پلاسمیدسویه های ایزوله شده، از کیت

استخراج پلاسمید شرکت Metabion استفاده شد. در نهایت ۱ ماکرولیتر از سوپرناتانت به عنوان نمونه DNA برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

تکثیر ژن های qnr به روش PCR

مواد Mixمورد استفاده در PCR شامل dNTPs، بافر ۱۰X PCR،آنزیم Taq DNA polymerase،نمونه DNA ایزوله های اسینتوباکتر به همراه پرایمر های مربوط به ژنهای *qnrA*، *qnrB* در جدول شماره ۱ آورده شده اند. برنامه دستگاه ترموسایکلر برای شناسایی ژن *qnrA* و *qnrB*در جدول شماره ۲ آمده است .

جدول۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تعیین حضور ژن های *qnrA/B*

		۵-۳ Sequences
Right Primer	*qnr A*	ATTTCTCACGCCAGGATTTG
Left Primer		GATCGGCAAAGGTTAGGTCA
Right Primer	*qnr B*	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG
Left Primer		ACGATGCCTGGTAGTTGTCC

جدول ۲ -برنامه دما، زمان و چرخه ترموسایکلر با استفاده از جفت پرایمر های *qnrA/qnrB*

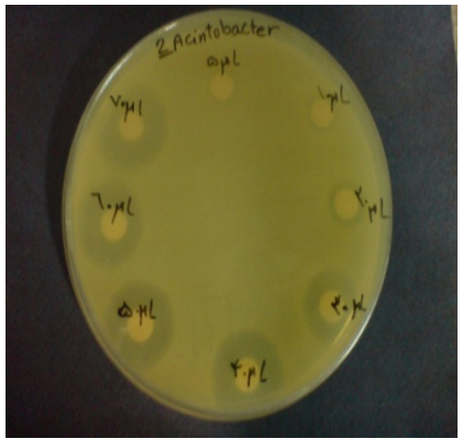
مرحله	نگهداری پایانی	ساخت پایانی	تعداد سیکل	ساخت	اتصال	واسرشت	واسرشت اولیه
دما (°C)	۴	۷۲	۳۰	۷۲	۵۸	۹۵	۹۵
زمان	-	min۱۰		min۱	s۳۰	min۱	min۱

یافته ها

در این تحقیق ۵۰ ایزوله اسینتو باکتر جمع آوری و نخست به وسیله روش های بیوشیمیایی تایید شدند. تست حساسیت آنتی بیوتیک به روش دیسک دیفیوژن برایدیسکهای سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، نورفلوکساسین، پیپیراسیلین-تازوباکتام و کلیستین مورد بررسی قرار گرفت.

به دلیل مکانیسم مقاومتی ژن *qnr*به آنتی بیوتیک های خانواده فلوروکینولون آنتی بیوتیک پودری سیپروفلوکساسین در غلظتهایgμ ۵،gμ۱۰،gμ۲۰،gμ۳۰،gμ۴۰،gμ۵۰،gμ۶۰،gμ۷۰ هم تهیه شد و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش در جدول ۳ نشان داده شده است. در شکل ۱ نمونه ای از پلیت حاوی دیسک سیپروفلوکساسین در غلظت های مختلف نیز نشان داده شده است.

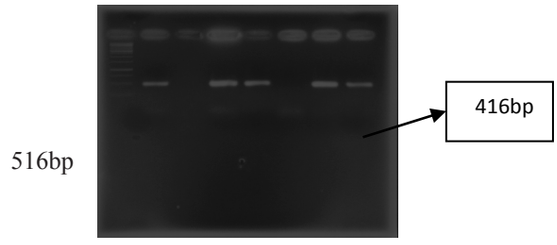
جدول -۳ مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های جدا شده از عفونت های بیمارستانی



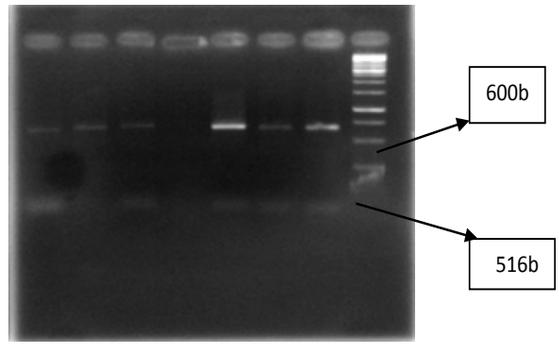
شکل ۱. نمونه ای از پلیت حاوی نمونه

درصد حضور ژن *qnr*در سویه های بالینی مقاوم به سیپروفلوکساسین برای ژن ۷۴٪*qnrA*(=۳۷n) و برای ژن ۲۲٪*qnrB*(=۱۱n) می باشد (شکل ۳و ۲) .

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:37 +0430 on Sunday June 20th 2021



شکل ۲:PCR با استفاده از پرایمرهای جدول۳-۴ تکثیر ژن *qnrA* انجام گرفت و محصول۵۱۶ bp به دست آمد.



شکل۳:PCRبا استفاده از پرایمرهای جدول۳-۴ تکثیر ژن *qnrB* انجام گرفت و محصول۴۱۶bp به دست آمد.

بحث

فلوروکینولون ها از آنتی بیوتیک های رایج در درمان عفونت های بیمارستانی می باشند و باید مکانیسم یا مکانیسم هایی که مربوط به مقاومت باکتری ها به خانواده ی فلوروکینولون ها است، شناخته شود زیرا این باکتری ها قادرند در حضور غلظت های بالایی از آنتی بیوتیک های فلوروکینولون از جمله سیپروفلوکساسین رشد کنند. مکانیسم های متعددی وجود دارد که باعث مقاومت این باکتری ها به فلوروکینولون ها می شود. یکی از این مکانیسم های مقاومت به آنتی بیوتیک های خانواده فلوروکینولون حضور ژن *qnr*می باشد.

در تحقیق حاضر مقاومت سویه های اسینتوباکتر جدا شده از عفونت های بیمارستانی در برابر آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بررسی شدند. از نتایج به دست آمده ۱۰۰٪ نمونه ها کاملاً به سیپروفلوکساسین مقاومت نشان دادند.

در مطالعه ی حسینی جزنی و همکارانش در پاییز ۱۳۸۸در جهرم به میزان مقاومت اسنیتوباکترهای جداشده از زخم های سوختگی نسبت به سیپروفلوکساسین و برخی از آنتی بیوتیک های مطرح در درمان اسینتوباکتر پرداخته شده است. نتایج تحقیقات وی نشان که کلیه ایزوله های تحت بررسی نسبت به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین مقاوم بودند) ۲).مقایسه ی تحقیق حاضر با نتایج حسینی جزنی کاملاً مطابقت دارد.

در مطالعه ی Yu-Chi Lin و همکارانش که درسال ۲۰۱۰ در کشور تایوان انجام شد، به این نتیجه رسیدند که ۸۵٪ اسینتوباکتر هامقاوم به فلوروکینولون هستند و همه ی آنها حاوی موتاسیون ۸۳ *Ser LeuGyrA*بودند و موتاسیون های ناحیه ی*GyrA*دراسینتوباکترها با مقاومت به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین نقش دارد) ۱۵).

دربسیاری از گزارشات موتاسیون *LeuGyrA* ۸۳ *Ser* را یکی از عوامل مقاومت نسبت به فلوروکینولون ها ذکر می کنند. این موتاسیون در مقاومت باکتری ها به فلوروکینولون ها نقش دارد و قابل توجه است که ژن *qnr* نیز که یکی دیگر از عوامل مقاومت به این آنتی بیوتیک است و از فعالیت DNAژیراز وتوپوایزومرازIV در شرایط invitro جلوگیری می کند . البته قابل ذکر است که مقاومت جدید بررسی پلاسمیدهای حاوی ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک ها را می پردازد که ژن *qnr* به عنوان یکی از ژن های پلاسمیدی است.

در مطالعه حاضر ژن *qnrA*بررسی شد و می توان گفت که مابقی‌اسینتوباکترها ممکن است حاوی موتاسیون *GyrA- Ser۸۳Leu* باشند که از این طریق به سیپروفلوکساسین مقاوم شده اند.

از طرف دیگر در مطالعه ی پریسا اسداللهی و همکارانش که درسال ۱۳۸۹در شهر ایلام انجام شد به مقاومت چند دارویی اسینتوباکترها اشاره شده است در این مقاله نیز حضور ژن مقاومت *GyrA* که عامل مقاومت به فلوروکینولون ها است بررسی شده است (۶).

در بررسی صورت گرفته توسط Touati در سال ۲۰۰۷ انجام گرفت ۲ ایزوله انتروباکترکوآکله و ایزوله اسینتوباکتر بومانی مقاومت چند دارویی به بتالاکتام ها و فلوروکینولون ها نشان دادند. ایزوله انتروباکتر حامل ژن *qnrB* بود و اسینتوباکتر بومانی حامل ژن *qnrA* بودند (۱۱) .

در مطالعه حاضر بر روی ایزوله های اسینتوباکتر۷۴٪(۳۷n=) از ایزوله ها حاوی ژن *qnrA*و۲۲٪) ۱۱ n=) از ایزوله ها حاوی ژن *qnrB*بودند.

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۹ توسط Yang و همکارانش انجام گرفت میزان شیوع ژن *qnrB*در میان ۱۱۵ ایزوله اسینتوباکتر بومانی بررسی شد. از این میان ۲ ایزوله (۱/۷۴٪) برای این ژن مثبت بودند. یکی از ایزوله ها به هر ۴ آنتی بیوتیک از گروه کینولونها مقاوم بود. ایزوله دیگر دارای مقاومت متوسط به لوفلوکساسین و موکسی فلوکساسین بود و به آنتی بوتیک های سیپروفلوکساسین و لومفلوکساسین مقاوم بودند. لازم به ذکر است که سویه های *qnr* مثبت به دلیل تولید همزمان ESBL ها MDRبودند)۱۴).

درتحقیق زهرا هاشمی زاده و همکارانش در سال ۱۳۸۹در شهر شیراز انجام شد و از میان ۱۴۷ سویه‌اسینتوباکتر بیشترین مقاومت را نسبت به

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:37 +0430 on Sunday June 20th 2021

آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین (۸۷٪)، گزارش کردند(۵).

کلیستین (پلی میکسین E) و پلی میکسین B آنتی بیوتیک های پلی پپتیدی باکتریوسیدال می باشند، که باتخریب غشای سلولی باکتری های گرم منفی آنها را می کشند. این داروها در درمان باسیل های گرم منفی مقاوم به چند دارو به خصوص سودوموناس آئروجینوزا در بیماران سیستیک فیبروزیس یا برونشکتازی نقش مهمی دارند. در استفاده از این داروها باید محتاطانه رفتار کرد زیرا درمان وریدی این داروها موجب نوروتوکسیسیته و نفروتوکسیسیته می شود(۸).

در مطالعه ای که توسط Ayan و همکارانش در سال ۲۰۰۳ انجام گرفته است، مشخص گردید که از۵۲ اسینتوباکترمورد مطالعه همه ایزوله ها به پیپیراسیلین –تازوباکتام مقاوم بودند و ۸٪ آنها به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند).۷ (

در مطالعه ای که توسط Wang و همکارانش در سال ۲۰۰۳ بر روی اپیدمی های ناشی از اسینتوباکترمقاوم به دارو در بخش ICU انجام گرفت مشخص گردید که تمام سویه ها به سیپروفلوکساسین و پیپیراسیلین- تازوباکتام مقاوم و به پلی میکسینB حساس بودند (۱۲).

در مطالعه ی دکتر نور خدا صادقی فرد و همکارانش در ایلام انجام شد و در سال ۱۳۸۵ به چاپ رسید. اعلام کردند که تمام ۶۶ ایزوله های بالینی اسینتوباکتر به کلیستین حساس می باشند(۳).

نتایج تحقیق حاضر با مطالعات دیگران مطابقت داشته ایزوله های اسینتوباکتربررسی شده در این مطالعه همگی به آنتی بیوتیک های پیپیراسیلین-تازوباکتام و کلیستین به ترتیب مقاوم و حساس بودند. درصد مقاومت اسینتوباکترنسبت به سیپروفلوکساسین افزایش یافته و این نشان دهنده ی افزایش شیوع پلاسمید حاوی ژن *qnr* بین سویه های این باکتری می باشد. افزایش شیوع ژن *qnr*میان این باکتری ها باعث بالا رفتن مقاومت به آنتی بیوتیک ها شده و این یافته ها بیانگر ضرورت بازنگری در درمان آنتی بیوتیکی و به کارگیری عوامل آنتی بیوتیکی جدید در درمان عفونت های حاصل از این باکتری را روشن می سازد..

نتیجه گیری

با توجه به این رموضوع که مقاومت به آنتی بیوتیک های فلورکینولونی با حضور ژن*qnr*مرتبط است و فراوانی بالای ژن *qnr* در ایزوله های اسینتوباکتر و شیوع بالاتر ژنوتیپ *qnrA*نسبت به ژنوتیپ *qnrB*، در نمونه های مورد مطالعه دیده شد باید در میزان مصرف آنتی بیوتیک های فلوروکینولون در درمان عفونت های مرتبط با این باکتری احتیاط کرد.

سپاسگزاری

از معاونت تحقیقات و فنآوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند برای تأمین منابع مالی این پروژه تشکر و قدردانی میشود.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:37 +0430 on Sunday June 20th 2021

منابع

۱.پوشانه س، فرج نیا ص، سلیمانی درجاق م، رهبرنیا ل, انصارین خ، سهرابی ن، پیمانی ا. شیوع ژن های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) کلاس A در اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضا شهر تهران. مجله علوم دارویی. پاییز ۱۳۹۰; دوره ۱۷, شماره ۴: ۲۳۲-۲۲۵.

۲.حسینی جزنی ن، بابازاده ه،خلخالی ح. مقاومت اسنیتوباکترهای میزان جداشده از زخمهای سوختگی سیپروفلوکساسین بهوبرخی آنتی بیوتیکهای مطرح دردرمان. مجله دانشگاه علوم پزشکی جهرم. پاییز ۱۳۸۸;۷(۲):۴۸-۵۸.

۳.خدا صادقی فرد ن، رنجبر ر ، قاسمی ا ، پاکزاد ا ، زعیمی یزدی ج ، زاهری ا ، همتیان ع، غفوریان س. بررسی میزان مقاومت دارویی سویه های اسینتوباکتر بومانی و سایر گونه هـای اسینتوباکتـرجدا شده از سه بیمارستان در شهر تهران. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دوره چهاردهم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۸;۶(۵):۳۴-۲۷.

۴.نوروزی جمیله.باکتری های بیماریزا ،موسسه ی فرهنگی انتشاراتی نور دانش،۱۳۸۰،فصل ۱۰-۹.

۵.هاشمی زاده ز، بارزگانی ع، امامی ا، جواد رحیمی م. مقاومت آنتی بیوتیکی اسینتوباکتر و فراوانی سویه های تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف در بیماران بخش های مراقبت ویژه بیمارستان نمازی شیراز (۱۳۸۷-۱۳۸۶). مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، سال چهاردهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۹;۷(۲):۲۲-۱۵.

6.Asadollahi P,Akbari M,Soroush S,Taherikalani M,AsadollahiKh,Sayehmiri K, Maleki A, Maleki M, Karimi P, Emaneini M. Antimicrobial resistance patterns and their encoding genes among *Acinetobacterbaumannii* strains isolated from burned patients.ESEVIER, Volume38, Issue8, December 2012; 1198-1203.

7.Ayan M, Durmaz R, Aktas E, et al. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired *Acinetobacterbaumannii* infection in a teaching hospital. J Hospital Infection 2003,54:39-45.

8.Gopa B. Green,MDlan S. Harris, MD Grace A. Lin, MD Kyle C. Moylan, MD. The Washington Manual of Medical Therapeutics.31the edition. Department of Medicine Washington University School of Medicine St. Louis, Missouri.2006; 284-285.

9.NaasT,BogaertsP,Bauraing C, et al. Emergence of PER and VEB extended spectrum beta-lactamases in *Acintobacterbaumannii* in Belgium: J Antimicrobe Chemotherapy, Jul2006; 58(1):178-82.

10.Palumbi SR. Humans as the world ´s greatest evolutionary force. Science,2001; 293: 1786-1790.

11. TouatiA, BrasmeL, BenallaouaS, GharoutA, Janick Mad First report of *qnrB*-producing Enterobacter cloacae and *qnrA*-producing *Acinetobacterbaumannii* recovered from Algerian hospitals. American Journal of microbiology, November 2007; 64-75.

Wang SH, Sheng WH, Chang YY, et al. Healthcare- as sociated outbreak due to pan-drug resistant *Acintobacterbaumanii*.12 in a surgical intensive care unit. J Hospital Infection 2003; 53:97-102

Xuan Cai, Congrong Li, Jun Huang and Yan Li Yu-Chi Lin,Ko-Chiang Hsia, Xuan Cai,Congrong Li, Jun Huang and Yan Li..13 Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in Central China .African Journal of Microbiology Research Vol .(4, May 2011;5(7

14.Yang Ren-guo,Yu Ru-jia,Gao Yan-yu, Lü Xiao-ju.Detection of *qnr* gene and drug resistance in clinical isolates of *Acinetobacterbaumannii*.Chinese Journal of Antibiotics**2009**;**12**.

15. Yu-Chi Lin,Ko-Chiang Hsia,Yee-Chun Chen,Wang-Huei Sheng,Shan-Chwen Chang,Mei-Hui Liao,and Shu-Ying Li.Genetic Basis of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Clinical Isolates in Taiwan. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, May 2010; 2078–2084

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:37 +0430 on Sunday June 20th 2021