

بررسی وجود ژن های *oqxA* و *oqxB* (پمپ *oqxAB*) در کلبسیلا پنومونیه جدا شده از عفونت های مجاری ادراری و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها در شهر قم

ساغر شهبازی، محسن زرگر*، محمد سلیمانی درجاق

گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران

چکیده

سابقه و هدف: پمپ های افلاکس یکی از مکانیسم های مقاومت به آنتی بیوتیک ها محسوب می شوند. هدف از این مطالعه بررسی وجود ژن های *oqxA* و *oqxB* در کلبسیلا پنومونیه و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها می باشد.

مواد و روش ها: نمونه برداری از ۵۰۰ مراجعه کننده به آزمایشگاه های استان قم، جمع آوری شد. تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی طبق (CLSI 2014) انجام شد. وجود ژن های *oqxA*، *oqxB* با روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: تعداد ۱۰۰ باکتری کلبسیلا پنومونیه جدا گردید. تمام جدایه های کلبسیلا پنومونیه به سیپروفلوکساسین و آمیکاسین، حساس بودند. نتایج حاصل از PCR نشان داد که، ۴۶٪ از نمونه ها دارای ژن *oqxA* و ۵۲٪ دارای ژن *oqxB* بودند.

بحث: نتایج حاکی از آن است که باکتری کلبسیلا پنومونیه در سویه های جدا شده در بیمارستان های شهر قم از آمار قابل توجه ای بر خوردار می باشد. هم چنین، پمپ های افلاکس *oqxAB* از کمیت به نسبت بالایی برخوردار می باشد.

نتیجه گیری: مقابله با مقاومت آنتی بیوتیکی از جمله پمپ های افلاکس *oqxAB*، دارای اهمیت می باشد. این یافته ها بیانگر به- کارگیری عوامل آنتی بیوتیکی جدید برای درمان عفونت های حاصل از این باکتری و ارگانسیم های مقاوم می باشد.

واژه های کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، عفونت ادراری، مقاومت آنتی بیوتیکی، پمپ افلاکس.

مقدمه

این باکتری باعث انواع مختلفی از عفونت ها به ویژه در نوزادان موجب پنومونی، سپتی سمی، اسهال، عفونت های ادراری و باکتریمی می گردد (۱۲، ۱۴، ۱۷، ۲۸). مطالعه های مختلف نشان می دهند که بسیاری از جدایه های کلبسیلا پنومونیه نسبت به اکثر آنتی بیوتیک ها مقاوم شده اند و این جدایه های مقاوم به چند دارو به سرعت در بین بیماران بستری در بیمارستان در حال گسترش می باشند که می تواند درمان عفونت های ناشی از این باکتری را با مشکل مواجه کند. توانایی این باکتری برای دست یابی به مکانیسم های متفاوتی از مقاومت آنتی بیوتیکی و نیز مقاوم شدن بعضی از سویه ها به اغلب آنتی بیوتیک های رایج و هم چنین فقدان داروهای ضد میکروبی جدید و مؤثر از مهم-ترین علل ایجاد کننده خطر توسط این باکتری می باشند (۱، ۸).

کلبسیلا پنومونیه^۱ شایع ترین گونه در بین سایر گونه های جنس کلبسیلا است که باسپیل گرم منفی میله ای شکل، غیر متحرک دارای کپسول پلی ساکاریدی و تخمیر کننده لاکتوز و گلوکز است.

این باکتری یکی از موارد مهم عفونت های اکتسابی از جامعه و بیمارستان و جزو شایع ترین پاتوژن های بیمارستانی می باشد که میزان مرگ و میر ناشی از آن بالا می باشد (۹، ۲۳).

نویسنده مسئول:

گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
پست الکترونیکی: zmohsen2002@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۱

¹ klebsiella pneumoniae

نهایت ۱۰۰ باکتری کلبسیلا پنومونیه شناسایی و جداسازی شد.

کشت، جداسازی و شناسایی کلبسیلا

پنومونیه

پس از آموزش بیماران نسبت به نحوه نمونه‌گیری استاندارد که شامل ضدعفونی کردن بخش خروجی مجرای ادراری و شستشو و اخذ نمونه ادرار می‌باشد، نمونه‌های ادراری از بیماران جمع آوری شده و به روی محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار و بلاد آگار انجام شد. ملاحظه‌های دستورالعمل CLSI در نمونه‌برداری و کشت مورد استفاده قرار گرفت. گرماگذاری پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. بعد از گرماگذاری، کلنی‌های مشکوک به کلبسیلا پنومونیه را انتخاب شدند و جهت بررسی‌های بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند. در ابتدا از تمام نمونه‌های لام میکروسکوپی تهیه شد و با روش رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفت. بعد از رنگ آمیزی گرم روی کلنی‌های رشد یافته، تست‌های افتراقی شامل تست اکسیداز، کشت در محیط‌های VP، MR، SIM، TSI، سیمون سترات، لایزین دکربوکسیلاز و اوره جهت شناسایی کلبسیلا پنومونیه انجام گردید. در نهایت به منظور تهیه کشت‌های ذخیره، از محیط کشت BHI براث دارای ۳۰ درصد گلیسرول استفاده شد و برای آزمایش‌های بعدی در فریزر ۲۰- درجه ذخیره گردید.

افزایش ظهور مقاومت چند دارویی در بین ایزوله‌های بیمارستانی کلبسیلا پنومونیه، گزینه‌های درمانی برای درمان عفونت‌های ایجاد شده به‌وسیله این باکتری را محدود کرده است (۵،۱۰). اغلب جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چندین دارو می‌باشند. در این میان پمپ‌های تراوشی برون ریز، با پمپ کردن آنتی‌بیوتیک‌ها به بیرون از سلول، باعث کاهش غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها در فضای پری پلاسمی باکتری‌های گرم منفی می‌شود و هم‌چنین با ممانعت از تجمع داخل سلولی آن‌ها، از حد آستانه مورد نیاز برای فعالیت و تأثیر گذاری داروها جلوگیری می‌کند. به این ترتیب پمپ‌های برون ریز نقش مهمی در ایجاد مقاومت دارویی در کلبسیلا پنومونیه ایفا می‌کنند. از مهم‌ترین پمپ‌های افلاکس که در ایجاد مقاومت در کلبسیلا پنومونیه نقش دارند، پمپ oqxAB می‌باشد (۱۳).

به‌طور کلی مقاومت دارویی کلبسیلا پنومونیه روز به روز افزوده می‌شود و بنابراین انجام تست‌های مقاومت دارویی، قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک، ضروری به نظر می‌رسد (۳). یکی از اهداف این مطالعه تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های بالینی بیماران است. هم‌چنین از آنجا که افزایش بیان سیستم‌های افلاکس نقش مهمی در مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارد، هدف از این مطالعه بررسی حضور ژن‌های پمپ افلاکس oqxAB در ایجاد مقاومت کلبسیلا پنومونیه و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه نمونه‌برداری از ۵۰۰ بیمار سرپایی مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های استان قم در سال ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ صورت گرفت و نمونه‌های ادراری جمع آوری شد. نمونه‌های گرفته شده در ظروف استریل به آزمایشگاه منتقل گردید. در

بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی کلبسیلا پنومونیه‌های جدا شده

بیوتیک آبه کار رفته در این مطالعه شامل: ایمپینم (۱۰ μg)، مروینم (۱۰ μg)، آزترونام (۳۰ μg)، سفوتاکسیم (۳۰ μg)، سفتازیدیم (۳۰ μg)، تتراسیکلین (۳۰ μg)، آمپی‌سیلین (۱۰ μg)، سیپروفلوکساسین (۵ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، آمیکاسین (۱۰ μg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ μg)، آموکسی-سیلین (۱۰ μg)، سفالکسین (۳۰ μg) بودند. با توجه به جدول استاندارد CLSI 2014 نتایج تست آنتی‌بیوگرام گزارش گردید (۲۴).

استخراج DNA

کلبسیلا پنومونیه‌های جدا شده را به‌منظور نیاز به باکتری‌های تازه کشت برای انجام تست‌های آنتی‌بیوگرام از محیط کشت‌های ائوزین متیلن بلو به محیط BHI آگار انتقال و کشت داده شد. سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل نیم مک فارلند تهیه شد. برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی (آنتی‌بیوگرام) جدایه‌ها از روش انتشار دیسک کربی بایر، طبق دستورالعمل (CLSI2014) استفاده شد. دیسک‌های آنتی-

انجام الکتروفورز برای ژن های oqxA و oqxB

پس از اتمام واکنش PCR جهت بررسی های کیفی، محصول واکنش PCR را بر روی ژل آگاروز ۱ درصد، الکتروفورز شد و سپس ژل با اتیدیوم بروماید رنگ گردید و پس از پایان الکتروفورز، ژل در دستگاه ژل داگ قرار داده شد.

یافته ها

در این تحقیق نمونه برداری از ۵۰۰ بیمار سرپایی مراجعه کننده به آزمایشگاه های قم از تاریخ آبان ماه ۱۳۹۴ تا فروردین ۱۳۹۵ صورت گرفت که در نهایت ۱۰۰ نمونه باکتری مربوط به کلبسیلا پنومونیه بودند.

نتایج تست های بیوشیمیایی و کشت

به منظور تعیین هویت باکتری های کلبسیلا پنومونیه بر اساس روش های استاندارد بیوشیمیایی افتراقی میکروشناسی از جمله آزمون های اکسیداز، کشت بر روی محیط TSI، آزمون های متیل رد یا MR و ووگس پروسکوئر یا VP، آزمون TSI، سیترات، اوره، لیزین دکربوکسیلاز صورت گرفت که در (جدول ۳) و (شکل ۱) نشان داده شده است.

جدول ۳- نتایج تست های افتراقی کلبسیلا پنومونیه

تست	کلبسیلا پنومونیه
MR	منفی
VP	مثبت
اوره	مثبت
اکسیداز	منفی
SIM	منفی
لیزین دکربوکسیلاز	مثبت
سیترات	مثبت

استخراج DNA با استفاده از کیت DNP صورت گرفت. سپس به منظور بررسی کیفی DNA ژنومیک استخراج شده، نمونه حاصل بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز گردید و در نهایت ژل به منظور بررسی اسید نوکلئیک در دستگاه ژل داگ قرار داده شد و با طول موج ۲۶۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به منظور بررسی کمی DNA ژنومیک، از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. برای این منظور ابتدا DNA استخراج شده را به میزان ۱۰۰ برابر رقیق کرده و جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد.

واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)

واکنش PCR برای تکثیر ژن های oqxA و برای تکثیر ژن oqxB، با استفاده از دو جفت پرایمر^۳ انجام شد که قطعه ای با طول ۱۱۰۲ جفت باز برای ژن oqxA و قطعه ای با طول ۲۰۱ جفت باز برای ژن oqxB به دست آمد. توالی پرایمرهای پیشرو و معکوس به قرار زیر بوده است (جدول ۱).

جدول ۱- مشخصه های پرایمرهای به کار رفته در واکنش PCR

Primer name	Primer sequence	TM	Size band
oqxA-F	5'- ACATTCACCTGACCGCGC -3'	56°C	1102bp
oqxA-R	5'- GGCATACCCGGCATAAACAC -3'	56°C	
oqxB-F	5'- ATCGTTCGAGTTGCCCCG -3'	55°C	201bp
oqxB-R	5'- CAGCATCCCGGAGAACACC -3'	55°C	

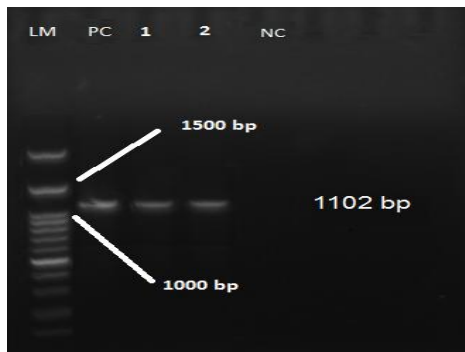
واکنش PCR به همراه کنترل مثبت و کنترل منفی انجام گرفت. برای کنترل مثبت از نمونه DNA استخراج شده سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه (ATCC700603) استفاده شد. برای کنترل منفی واکنش از آب مقطر بدون DNA استفاده شد. واکنش PCR طبق شرایط دمایی (جدول ۲) انجام گرفت.

جدول ۲- برنامه PCR

مرحله	سیکل	زمان	دما
Initial denaturation	۱	۳ دقیقه	۹۵
Denaturation	۳۵	۳۰ ثانیه	۹۵
Annealing	۳۰	۳۰ ثانیه	۵۶
Extention	۳۵	۴۵ ثانیه	۷۲
Final extention	۱	۵ دقیقه	۷۲

³ - CLC Sequence Viewer version 8 Gene Runne

طول ۱۱۰۲ جفت باز در الکتروفورز مشاهده شد (شکل ۲). از بین ۱۰۰ جدایه، ۴۶ جدایه دارای ژن *oqxA* (۴۶٪) بودند که نتایج مربوط به آن در (نمودار شماره ۳) قابل مشاهده است.



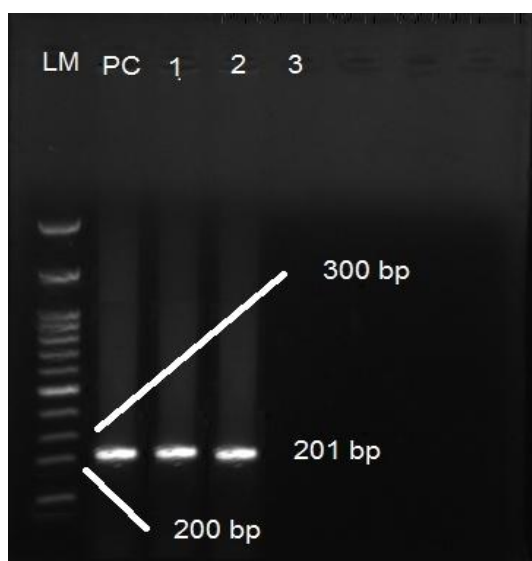
شکل ۲- الکتروفورز ژن *oqxA*: LM: سایزمارکر 100 plus bp -

NC: کنترل منفی

PC: کنترل مثبت، شماره ۱ و ۲ جدایه واجد ژن *oqxA*

نتایج حاصل از بررسی ژن *oqxB* با روش PCR

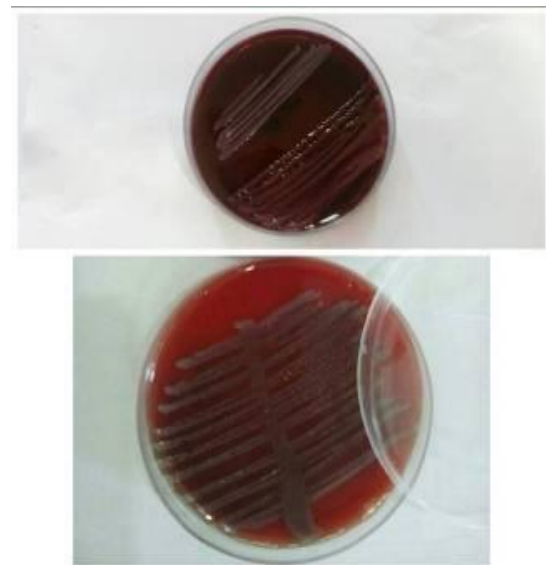
جهت بررسی حضور ژن *oqxB* در جدایه‌های مورد بررسی، DNAهای تخلیص شده از جدایه‌ها به همراه پرایمرهای *oqxB* درواکنش وارد گردید و نتایج مثبت به صورت باند واضحی به طول ۲۰۱ جفت باز در الکتروفورز مشاهده شد (شکل ۳). از بین ۱۰۰ جدایه، ۵۲ جدایه دارای ژن *oqxB* (۵۲٪) بودند. که نتایج مربوط به آن در (نمودار شماره ۳) قابل مشاهده است.



شکل ۳- الکتروفورز ژن *oqxB*: LM: سایزمارکر 100 plus bp - شماره ۳

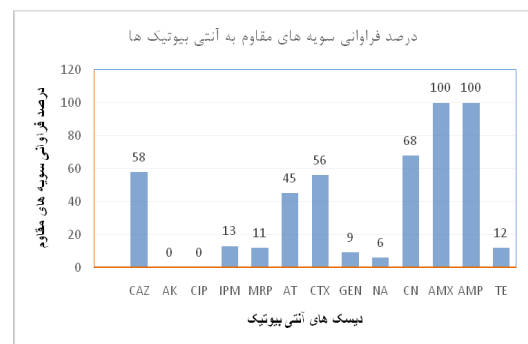
کنترل منفی

PC: کنترل مثبت، شماره ۱ و ۲ جدایه واجد ژن *oqxB*



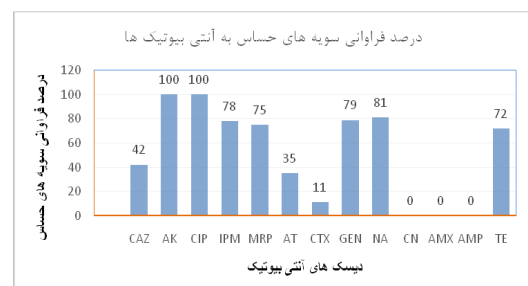
شکل ۱- رشد کلبسیلا پنومونیه در سطح محیط EMB و بلاد آگار

نتایج تست‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها



نمودار ۱- درصد فراوانی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها

Ceftazidime (CAZ), Amikacin (Ak), Ciprofloxacin (CIP), Imipenem (IPM), Meropenem (MRP), Aztreonam (AT), Cefotaxime (CTX), Gentamicin (GEN), Nalidixic acid (NA), Cefalexin (CN), Amoxicilin (AMX), Ampicillin (AMP), Tetracycline (TE).



نمودار ۲) درصد فراوانی سویه‌های حساس به آنتی‌بیوتیک‌ها

نتایج حاصل از بررسی ژن *oqxA* با روش PCR

جهت بررسی حضور ژن *oqxA* در جدایه‌های مورد بررسی، DNAهای تخلیص شده از جدایه‌ها به همراه پرایمرهای *oqxA* درواکنش وارد گردید و نتایج مثبت به صورت باند واضحی به

و همکاران با مطالعه حاضر مطابقت دارد (۴). در تحقیقی که شاهچراغی و همکاران در سال ۲۰۰۷ در شهر تهران انجام دادند، ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به آنتی بیوتیک های سفنازیدیم (۳۱٪) و سفوتاکسی (۳۲٪) و جنتامایسین (۳۶٪) و آمیکاسین (۲۶٪) مقاوم بودند (۱۹).

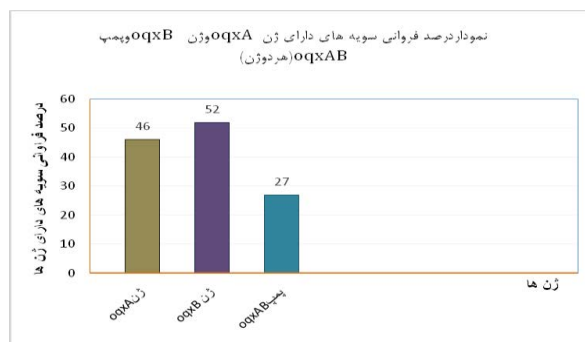
همچنین در مطالعه‌ای که شاهچراغی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در شهر تهران انجام دادند، ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه (۳/۶٪) به مروپنم، (۱/۱٪) مقاوم به ایمپینم بودند (۲۰).

مقایسه میزان مقاومت در مطالعه هاشمی و همکاران و شاهچراغی و همکاران، با مطالعه حاضر نشان می‌دهد که به مرور زمان به علت مقاوم شدن باکتری‌ها، میزان مقاومت در سال ۱۳۹۵ افزایش یافته است.

رستگار و همکاران در شهر تهران در سال ۲۰۱۳ از ۳۵ ایزوله کلبسیلا پنومونیه ۵۴/۲٪ ایزوله مقاوم به ایمپینم بودند (۱۵). میزان مقاومت در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده در تحقیق رستگار و همکاران از مطالعه حاضر بیش تر بود که علت آن به احتمال به نوع نمونه مربوط می‌شود، چرا که نمونه‌های جدا شده از بیماران سوختگی مقاومت بیش تری از خود نشان داده‌اند. این افراد ایمنی ضعیف شده‌ای دارند و مدت زیادی در بیمارستان بستری و تحت درمان قرار می‌گیرند. باید توجه داشته که حساسیت سویه‌ها نسبت به ایمپینم و مروپنم نباید پزشکان را در مصرف و تجویز بی‌رویه این دارو ترغیب نماید، چه بسا این گونه اقدام‌ها ممکن است باعث پیدایش و شیوع سوش‌های مقاوم به ایمپینم و مروپنم هم‌چنان که در سال‌های اخیر نیز گزارش‌هایی مبنی بر پیدایش سوش‌های مقاوم سودوموناس و باکتری‌های دیگر در برابر ایمپینم و مروپنم گزارش شده است.

سلطان دلال و همکاران در ۱۳۹۱، به روی تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های کلبسیلا جدا شده مطالعه‌های انجام دادند.

در مطالعه آن‌ها درصد مقاومت تمام گونه‌های کلبسیلا نسبت به، آموکسی‌سیلین (۹۷٪)، نالیدیکسیک اسید (۲٪)، تتراسایکلین (۲۸٪)، ایمپینم و سفنازیدیم (۲٪) و آمیکاسین بدون مقاومت تعیین گردید. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد آمیکاسین با کم‌ترین درصد مقاومت در مقابل تمام گونه‌های کلبسیلا، مؤثرترین آنتی‌بیوتیک بوده است که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (۲).



نمودار ۳- درصد فراوانی سویه‌های دارای ژن oqxA و oqxB و پمپ oqxAB (هر دو ژن)

بحث

امروزه در تمام دنیا مقاومت میکروبی در بین باکتری‌ها به‌ویژه باسیل‌های گرم منفی یک مشکل رو به افزایش است، به‌خصوص در بخش‌های خاص از جمله بخش مراقبت‌های ویژه، به همین دلیل شناسایی الگوی مقاومت میکروبی در هر بیمارستانی برای موفقیت پزشکان در درمان صحیح بیماران الزامی می‌باشد. از جمله باکتری‌های شایع عفونت‌های ادراری کلبسیلا پنومونیه می‌باشد. پمپ‌های افلاکس پمپ‌های خارج کننده آنتی‌بیوتیک هستند. این پمپ‌ها از طریق انتقال آنتی-بیوتیک از داخل باکتری به محیط خارج از باکتری منجر به مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک می‌شوند (۲۵، ۲۲). از مهم‌ترین پمپ‌های افلاکس که در ایجاد مقاومت در کلبسیلا پنومونیه نقش دارد، پمپ oqxAB می‌باشد (۲۱، ۶).

پمپ‌های ترشحی oqxAB ابتدا در درون پلاسמיד Pola52 با وزن مولکولی ۵۲ کیلو دالتون در اشریشیاکلی جدا شده از خوک شناسایی شد که از دو ژن oqxA و oqxB تشکیل شده است. در ابتدا تصور می‌شد ژن‌های این افلاکس پمپ، تنها با جهش کروموزومی میانجی‌گری می‌شود تا زمانی که مقاومت به واسطه پلاسמיד در سال ۱۹۹۸ شرح داده شد (۱۸، ۱۶).

در تحقیقی که هاشمی و همکاران در سال ۱۳۹۳ به روی کلبسیلا پنومونیه انجام دادند، مقاومت جدایه‌ها به آزترونام (۵۶٪)، سفوتاکسیم (۵۷٪)، آمپی‌سیلین (۷۳٪)، سفنازیدیم (۵۴٪)، حساسیت جدایه‌ها به مروپنوم (۷۰٪)، جنتامایسین (۶۰٪)، آمیکاسین (۷۰٪)، ایمپینم (۷۰٪) گزارش شد که در ایسن مطالعه مقاومت جدایه‌ها به آزترونام (۴۵٪)، سفوتاکسیم (۵۶٪)، آمپی‌سیلین (۱۰۰٪)، سفنازیدیم (۵۸٪) و حساسیت جدایه‌ها به مروپنوم (۷۵٪)، جنتامایسین (۸۱٪)، آمیکاسین (۱۰۰٪)، ایمپینم (۷۴٪) نشان داده شد. در واقع نتایج هاشمی

حضور پمپ oqxAB در کشور کره جنوبی (۰/۴٪)، در کشور سوئد (۱/۸٪) و در چین (۷۶٪) گزارش گردید (۱۷،۲۷). در مطالعه حاضر، ۷۱٪ از نمونه‌ها یا دارای ژن oqxA و یا ژن oqxB و یا هر دو ژن oqxA و oqxB (پمپ oqxAB) بودند که با فاصله بسیار کم فقط از کشور چین کم‌تر بود که در واقع ۲۷٪ از نمونه‌ها دارای هر دو ژن oqxA و oqxB، ۴۶٪ دارای ژن oqxA و ۵۲٪ دارای ژن oqxB بودند.

به‌طور کلی در مطالعه حاضر از ۱۰۰ سویه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از عفونت‌های ادراری، بیش‌ترین میزان حساسیت (۱۰۰٪) مربوط به سیپروفلوکساسین و آمیکاسین بود و بیش‌ترین میزان مقاومت (۱۰۰٪) مربوط به آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین، بود. در این نتایج چندین مقاومت به طور ۱۰۰ درصدی دیده شد که نشان دهنده این می‌باشد که جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مورد استفاده در این تحقیق، مقاوم به چندین دارو یا MDR می‌باشند. هم‌چنین، پس از انجام آنتی-بیوگرام، به این نتیجه رسیده شد که هیچ یک از سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین و سیپروفلوکساسین مقاوم نبودند، لذا در مطالعه حاضر، سیپروفلوکساسین و آمیکاسین بهترین اثر را داشتند.

برای تأیید PCR از سویه کنترل مثبت دارای ژن‌های oqxAB استفاده شده است. هم‌چنین از کنترل منفی که فاقد ژن فوق می‌باشد، استفاده گردید. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از بین ۱۰۰ جدایه کلبسیلا پنومونیه، ۴۶٪ دارای ژن oqxA، ۵۲٪ دارای ژن oqxB و ۲۷٪ از نمونه‌ها دارای هر دو ژن oqxA و oqxB، بودند.

در نتیجه به‌طور کلی احتمال می‌رود، پمپ افلاکس oqxAB در مقاومت برخی از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه به‌کار رفته در این تحقیق، از جمله برخی از سفالوسپورین‌ها (سفالکسین و سفوتاکسیم)، بتالاکتام‌ها (مروپنم، ایمپنم)، آمینوگلوکوزیدها (جنتامایسین) ممکن است که نقش داشته و در برخی دیگر از سویه‌ها، نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها احتمال می‌رود راه‌های دیگری منجر به مقاومت در آن‌ها شده است.

مطالعه حاضر، نگرشی مختصر به مقاومت دارویی بود در حالی که راه‌های مقابله با مقاومت آنتی‌بیوتیکی از جمله پمپ‌های افلاکس oqxAB و سایر پمپ‌های افلاکس همواره پرسش‌هایی را در بر داشته است که در تحقیق‌های بعدی، می‌توان به دنبال پاسخ آن‌ها گشت و یک راه قطعی برای درمان آن ارائه کرد.

مولانا و همکاران در مطالعه‌ای در شهر بابل میزان مقاومت سویه‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های بالینی نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم را (۹۰٪) و در مطالعه حاضر (۵۶٪) به‌دست آمد. میزان مقاومت بیماران مورد بررسی در این تحقیق نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم نسبت به بیماران مورد بررسی توسط مولانا و همکاران پایین‌تر است (۱۱).

مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف براساس الگوهای درمانی که در مناطق مختلف صورت می‌گیرد متفاوت است. با مقایسه نتایج آنتی‌بیوگرام و بررسی درصد مقاومت به آنتی-بیوتیک‌ها در مناطق مختلف در می‌یابیم که در مورد برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها نتایج متغیری را مشاهده می‌گردد. باید توجه داشت که تفاوت منطقه‌ای در نقاط مختلف دنیا یا حتی یک کشور، پاسخ‌های درمانی متفاوتی را نسبت به داروهای ضد میکروبی ایجاد می‌کند. منشأ این تفاوت‌ها در نقاط مختلف را می‌توان تفاوت‌های ژنتیکی افراد، تفاوت ژنتیکی سویه‌ها و تفاوت در زمینه‌های دیگری دانست که با توجه به این امر الگوهای درمانی مورد استفاده در نقاط مختلف، متفاوت و براساس ویژگی‌های خاص هر منطقه تعریف می‌شود (۷).

در تحقیقی که هاشمی و همکاران در ۱۳۹۳ بر روی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه انجام دادند، نتایج حاصل از PCR ژن‌های oqxA و oqxB، شیوع هر دو ژن در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه را (۵۰٪) نشان داد (۱۹). در مطالعه حاضر، (۴۶٪) دارای ژن oqxA، ۵۲ درصد دارای ژن oqxB بودند. نتایج حاضر با مطالعه‌های هاشمی و همکاران هم‌خوانی دارد.

در تحقیقی که جینی یوان و همکاران در سال ۲۰۱۲ در کشور چین با هدف بررسی ژن پمپ افلاکس oqxAB در نمونه‌های بالینی جدا شده از کلبسیلا پنومونیه توسط روش PCR انجام شد، تمام طول ژن oqxAB تعیین توالی شد. از ۱۵۴ نمونه کلبسیلا پنومونیه، (۶۶/۹٪) غیرحساس به سیپروفلوکساسین و (۵۰/۷٪) غیرحساس به لووفلوکساسین بودند. در مطالعه حاضر تمام سویه‌ها به سیپروفلوکساسین حساس بودند. در مطالعه یوان، ژن‌های oqxA و oqxB در تمامی نمونه‌ها حضور داشتند. در نتیجه شناسایی ژنوم کلبسیلا پنومونیه به عنوان یک مخزن برای oqxAB بود (۲۶). هم‌چنین در مطالعه حاضر (۷۱٪) از نمونه‌های کلبسیلا پنومونیه دارای ژن‌های oqxA و یا oqxB و یا هر دو ژن بودند، در واقع ۲۷٪ از نمونه‌ها دارای هر دو ژن oqxA و oqxB، ۴۶٪ دارای ژن oqxA و ۵۲٪ دارای ژن oqxB بودند.

نتیجه گیری

به طور کلی بیان بیش از حد پمپ های افلاکس، موتاسیون جایگاه هدف منجر به افزایش شدید باکتری های مقاوم شده است که درمان را با مشکل مواجه کرده است. نیاز است در آینده برای طراحی آنتی بیوتیک های جدید و هم چنین به منظور به حداکثر رساندن اثر آنتی بیوتیک ها، اثر و حضور ژن های دیگر پمپ های افلاکس، حضور آنزیم های بتالاکتاماز، حضور مهارکننده های پمپ های افلاکس نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

سپاسگزاری

در پایان از مدیران و مسئولین و اساتید محترم دانشگاه آزاد اسلامی - واحد قم، به خصوص مدیریت گروه میکروبیولوژی و شرکت سامان ژن آراد کمال امتنان را دارم. این تحقیق برگرفته از پایان نامه دانشجویی می باشد.

منابع

۱. جلال پورش. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت های بیماری. مجله دانشکده پزشکی اصفهان. ۱۳۹۰؛ ۱۴۲(۲):۲۹.
۲. سلطان دلالم، میرعمادی، شریفی یزدی، م، رستگار لاری، ع، رجیبی، ز، آودیس یانس، س. تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی گونه های کلبسیلا جدا شده از نمونه های بیماران بستری در بیمارستان امام خمینی. مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۱۳۹۱؛ ۶(۴):۲۷۵-۲۸۱.
۳. فروهی ف. بررسی تأثیر آنتی بیوتیک های رایج در سنجش مقاومت و حساسیت میکروبی سویه های سودوموناس آئروژینوزا و کلبسیلا پنومونیه. مجله علمی پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۳۹۱؛ ۱۳: ۵۸-۵۳.
۴. هاشمی، ع، فلاح، ف، طاهرپور، ا، گودرزی، ح، عرفانی منش، س، تاک، ا. بررسی الگوی ژنتیکی و نقش پمپ *oqxA* در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۱۳۹۳؛ ۲۴(۱۱۹): ۴۸-۶۱.
5. García-Sureda L, Juan C, Doménech-Sánchez A, Albertí S. Role of *klebsiella Pneumoniae* LamB Porin in Antimicrobial Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011; 55(4): 1803-5.
6. Guerin F, Lallement C, Isnard C, Dhalluin A, Cattoir V, Giard JC. Landscape of Resistance-Nodulation-cell Division (RND)-type Efflux Pumps in *Enterobacter Cloacae* Complex. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016; 60(4): 2373-2382.
7. Jabeen, K, A. Znfar and R. Hasan. Frequency and Sensitivity Pattern of Extended Spectrum Beta lactamase Producing Isolates in a Tertiary Care Hospital laboratory of Pakistan. *Journal-Pakistan Medical Association*, 2005; 55(10): 436-9.
8. Kaye KS, Kaye D. Multidrug-resistant pathogens: Mechanisms of Resistance and Epidemiology. *Current Infectious Disease Reports*, 2005; 2(5): 391-8.
9. Liu BT, Wang XM, Liao XP, Sun J, Zhu HQ, Chen XY, et al. Plasmid-mediated Quinolone Resistance Determinants *OqxAB* and *aac(6)-Ib-cr* and Extended-spectrum Beta-lactamase Gene *BlaCTX-M-24* Co-located on the Same Plasmid in one *Escherichia coli* Strain from China. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011; 66(7): 1638-9.
10. Maham S, Fallah F, Eslami G, et al. The Antimycobacterium Activity of Menthe Piperita and Menthe Spicata Ethanolic Extract Against *Mycobacterium Bovis* in Comparison With Isoniazid. *Iran J Clin Infect Dis*, 2011; 6(2): 78-81.
11. Molana Z, Ferdosi SHahandashti E, Gharavi S, Shafii M, Norkhomami S, Ahangarkani F, Rajabnia R. Molecular Investigation of Class i Integron in *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Unit Shahid Beheshti Hospital of Babol Intensive Care, 2011; 13(6): 7-13
12. Navidinia M, Karimi A, Rahbar M, Fallah F, et al. Study Prevalence of Verotoxigenic *E. coli* Isolated from Urinary Tract Infections (UTIs) in an Iranian Children Hospital. *Open Microbiol Journal*, 2012; 6: 1-4.
13. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*, 2011; 17(10): 1791-8.
14. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* *AcrAB* Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and *v*Virulence. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010; 54(1): 177-83.
15. Rastegar Lari A, Azimi L, Rahbar M, Fallah F, Alaghebandan R. Phenotypic Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Among Burns Patients: First Report from Iran. *Burns*, 2013; 39(1): 174-176.
16. Rodriguez-Martinez JM, Diaz de Alba P, Briales A, Machuca J, Lossa M, Fernandez-Cuenca F, et al. Contribution of *OqxAB* Efflux Pumps to Quinolone Resistance in Extended-spectrum-beta-lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013; 68(1): 68-73.
17. Roy S, Viswanathan R, Singh AK, Das P, Basu S. Sepsis in Neonates Due to Imipenem-resistant *klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 in India. *J Antimicrob Chemother*, 2011; 66(6): 1411-3.
18. 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. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012; 67(4): 886-97.
19. Shahcheraghi F, Moezi H, Feizabadi MM. Distribution of TEM and SHV Beta-lactamase Genes Among *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Patients in Tehran. *Med Sci Monit*, 2007; 13(11): 247-250.
20. Shahcheraghi F, Nobari S, Rahmati Ghezalgeh F, Nasiri S, Owlia P, Nikbin VS, et al. First Report of New Delhi Metallo-beta-lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Iran. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, NY)*, 2013; 19(1): 30.
21. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Mechanisms, Physiology and Pharmacological Exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015; 465(1): 165.

22. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013; 30(12): 2725-9.
23. Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, Siu LK. *Klebsiella pneumoniae* Outer Membrane Porins OmpK35 and OmpK36 Play Roles in Both Antimicrobial Resistance and Virulence. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011; 55(4): 1485-93.
24. Wayen PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. CLSI document, CLSI 2014; M 100-S20.
25. Wong MH, Chan EW, Chen S. Evolution and Dissemination of OqxAB-like Efflux Pumps, an Emerging Quinolone Resistance Determinant Among Members of Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015; 59(6): 3290-7.
26. Yuan J, Xu X, Guo Q, Zhao X, Ye X, Guo Y, et al. Prevalence of the OqxAB Gene Complex in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Clinical Isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherap*, 2012; 67(7): 1655-9.
27. Zhao J, Chen Z, Chen S, Deng Y, Liu Y, Tian W, et al. Prevalence and Dissemination of OqxAB in *Escherichia coli* Isolates from Animals, Farmworkers, and the Environment *Antimicrob Agents Chemother*, 2010; 54(10): 4219-4224.
28. Zhou X, Gaol J, Huang Y, Fu S, Chen H. Antibiotic Resistance Pattern of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter Sakazakii* Isolates from Powdered Infant Formula. *African J Microbiol Res*, 2011; 5(19): 3073-3077.