Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*

2017; 20(126): 22-32

Phenotypic and Genotypic Efflux Pumps in Resistance to Fluoroquinolones in E.coli Isolated from Inpatients in Kermanshah Hospitals in 2013

Maryam Doosti Mohajer[1], Hamid Pajavand[2], Ramin Abiri[3], Amirhooshang Alvandi[3*]

1. MSc Student in Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran
2. Researcher, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
3. Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

Received: 19 Aug 2017, Accepted: 12 Nov 2017

Abstract

Background: Antibiotic resistance rates in E. coli are rapidly rising, especially with regard to fluoroquinolones. One of the mechanisms that lead to antibiotic resistance is efflux pumps. The aim of this study was phonotypic and genotypic analysis of efflux pump role in fluoroquinolones resistance of E. coli strains isolated from hospitalized patients in Kermanshah 2013.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, 100 isolates of E. coli were collected from hospitalized patients from Kermanshah. All isolates were identified by standard biochemical tests. The antimicrobial susceptibility patterns were determined by disk diffusion method according to CLSI guidelines. The presence of Efflux pump genes was determined by a PCR method.

Results: The rates of resistance to Ceftazidime, Nalidixic Acid, Ciprofloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, Gentamicin, and Tetracycline were 73%, 67%, 55%, 54%, 45%, 38%, and 24%, respectively. According to the results of PCR test, of 100 E. coli isolates, 99% of isolates were positive for acrA, 98% for acrB, 95% for acrE, 98% for acrF, 94% for mdfA, 96% for norE, and 96% for tolC.

Conclusion: In Strains with positive gene acrA, acrB, acrA, acrB, tolC, mdfA, norE, the presence of efflux pump inhibitor reduced the amount of resistance to antibiotics. So, efflux pumps are important in antibiotic resistance.

Keywords: Efflux Pump, Escherichia coli, MDR, PCR.

*Corresponding Author:
Address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
Email: ah_alvandi@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۲۰، شماره۹ (شماره پیاپی ۱۲۶)،آذر ۱۳۹۶، ۳۲-۲۲

فنوتیپ و ژنوتیپ پمپ‌های افلاکس در ایجاد مقاومت به فلوروکینولون‌ها در ایزوله‌های اشرشیاکلی جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های کرمانشاه در سال ۱۳۹۲

مریم دوستی مهاجر[۱]،حمید پژاوند[۲]، رامین عبیری[۳]، امیرهوشنگ الوندی[۳]*

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
۲. پژوهش‌گر، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۳. دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۸، تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در اشرشیاکلی به ویژه نسبت به فلوروکینولون‌ها به سرعت در حال افزایش است. یکی از مکانیسم‌هایی که در مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها نقش دارد، سیستم‌های افلاکس است. هدف از انجام این مطالعه، تعیین فنوتیپی و ژنوتیپی نقش پمپ‌های افلاکس در ایجاد مقاومت به فلوروکینولون ها در ایزوله‌های اشرشیاکلی جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های کرمانشاه در سال ۱۳۹۲ بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، ۱۰۰ ایزوله اشرشیاکلی از بیماران بستری در بیمارستان‌های کرمانشاه جمع آوری شدند و توسط تست‌های بیوشیمیایی استاندارد تعیین هویت گردیدند. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مطابق با دستورالعمل CLSI تعیین گردید. حضور پمپ‌های افلاکس به وسیله روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بررسی گردید.

یافته‌ها: مقاومت ایزوله‌ها نسبت به سفتازیدیم، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین، افلوکساسین، جنتامایسین و تتراسیکلین به ترتیب برابر با ۷۳، ۶۷، ۵۵، ۵۴، ۴۵، ۳۸ و ۲۴ درصد بود. براساس نتایج به دست آمده از آزمایش PCR، از بین ۱۰۰ ایزوله اشرشیا کلی، ۹۹ ایزوله (۹۹ درصد) واجد ژن acrA بودند. هم‌چنین، برای ژن acrB ۹۸ درصد، برای ژن acrE ۹۵ درصد، برای ژن acrF ۹۸ درصد، برای ژن tolC ۹۶ درصد، برای ژن mdfA ۹۴ درصد و برای ژن norE ۹۶ درصد مثبت گردید.

نتیجه گیری: در سویه‌هایی که دارای ژن acrA، acrB، acrE، acrF، tolC، mdfA، norE مثبت بودند، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک در حضور مهارکننده پمپ افلاکس کاهش پیدا کرد. بنابراین پمپ افلاکس در مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارای اهمیت می‌باشد.

واژگان کلیدی: اشرشیاکلی، افلاکس پمپ، مقاومت چندداروییی، PCR.

***نویسنده مسئول:** ایران، کرمانشاه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی
Email: ah_alvandi@yahoo.com

مقدمه

عفونت‌های ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت های باکتریایی است که پس از عفونت دستگاه تنفسی از اهمیت خاصی برخوردار هستند(۱).

اشرشیاکلی شایع‌ترین باسیل گرم منفی جدا شده از موارد بالینی بوده و هم‌چنین علت بیش از ۸۰ درصد از موارد عفونت‌های دستگاه ادراری اکتسابی در جامعه به علاوه عفونت‌های کسب شده از بیمارستان است(۲). کشف آنتی بیوتیک ها و تولید و گسترش آنتی بیوتیک‌های جدید و رواج استفاده از آن‌ها در درمان بیماری‌های عفونی باکتریایی باعث به وجود آمدن مقاومت‌های باکتریایی نسبت به مواد ضد باکتریایی شده است.

بروز و شیوع مقاومت به آنتی بیوتیک ها، به ویژه در باکتری‌های گرم منفی یکی از سدهای بزرگ بر سر راه درمان این گونه بیماری‌ها محسوب می شود. میکروارگانیسم کانال‌های پروتئینی متعددی در غشاء دارد که در انتقال تعداد زیادی از مواد غذایی و ترکیبات سمی نقش دارند.

در میان این انتقال دهنده‌ها، پمپ های efflux نقش اساسی در خروج آنتی بیوتیک ها از داخل سلول داشته و این مواد را از درون سلول به محیط خارج پمپ می‌کنند. بنابراین باعث کاهش غلظت آنتی بیوتیکها در فضای پری‌پلاسمی با کتری‌های گرم منفی می‌گردند. افزایش بیان یک یا چند پمپ efflux باعث ممانعت از تجمع داخل سلولی، در حد آستانه ی موردنیاز برای فعالیت داروها می گردد(۳).

در باکتری ها از نظر فیلوژنی پنج خانواده از پمپ‌های افلاکس وجود دارد شامل: Major Facilitatore superfamily (MFS)، Multidrug and toxic efflux (MATE) ، Resistant Nodulation Division (RND)، Small Mulidrug Resistant (SMR) و ATP binding cassette (ABC) که بر اساس روش کسب انرژی برای انتقال سوبسترا به دو دسته تقسیم می شوند(۴). پمپ های دسته یک که فقط پمپ های ABC یا کاست های اتصالی به ATP را شامل می شوندو جهت جابه‌جایی سوبسترا از ATP به عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند و پمپ های دسته دوم که برای انتقال سوبسترا از انرژی گرادیانت پروتون غشاء استفاده می کنند(۵). خصوصیت مشترک همه سیستم های افلاکس، توانایی دفع انواع مواد ضدباکتریایی نظیر آنتی بیوتیک‌ها، بیوسایدها، رنگها، پاک کننده‌ها، اسیدهای چرب و حلال‌های آلی می‌باشد و باعث مقاومت به آنتی بیوتیک ها و مواد سمی دیگر می شود(۶).

برای اولین بار پمپ های افلاکس در سال ۱۹۷۸ توسط لوی در اشرشیا کلی شناسایی شد(۷). ژنوم باکتری اشرشیا کلی ۳۷ سیستم افلاکس شامل ۱۹MFS، SMR ۳، ۷RND، ۷ABC و ۱MATE راکد می کند . از این تعداد، ۲۱ مورد از آن‌ها شامل ۱۱MFS، ۲SMR، RND ۶، ۱ABC، ۱MATE قادر به انتقال ترکیبات سمی یا مولکول‌های آنتی بیوتیکی از سلول هستند. پروتئین های خانواده SMR کوچک‌ترین انتقال دهنده های چند دارویی هستند. خانواده RND از نظر ساختار از بقیه خانواده ها متمایز است. ناقل های این خانواده بزرگتر از بقیه ناقل ها هستند و فقط در باکتری های گرم منفی یافت می شوند(۸).

سیستم افلاکس خانواده RND، شامل سه جزء اساسی است: یک پروتئین ناقل در غشاء داخل (مانند AcrB)، یک پروتئین مستقر در فضای پری پلاسمیک (مانند AcrA) و یک کانال پروتئینی در غشاء خارجی (مانندTolC) که به پروتئین غشاء خارجی هم معروف است(۹). این ترکیب ۳ گانه اجازه خروج مستقیم داروها از سیتوسول به محیط بیرون را می‌دهد(۶). این خانواده با به‌کارگیری نیروی محرکه‌ی پروتونی غشاء در ازای ورود یون‌های پروتون به درون سلول ترکیبات دارویی را از سلول خارج می کند. افلاکس پمپ MdfA عضوی از پمپ‌های

خانواده MFS است و تشکیل شده از۲۱ پل متصل به هم است که منجر به ایجاد کانال در عرض غشاء داخلی باکتری اشرشیاکلی می شود و باعث مقاومت به آنتی بیوتیک هایی نظیر آمینوگلیکوزیدها، فلوروکینولون‌ها، ماکرولیدها، تتراسایکلین و کلرامفنیکل می گردد(۱۰).

از آن‌جا که فلوروکینولون ها و کینولون ها داروی انتخابی برای درمان برخی از عفونت های باکتریایی در انسان و به خصوص عفونت دستگاه ادراری می باشند و بیان و عملکرد سیستم های افلاکس نقش مهمی در مقاومت این آنتی بیوتیک ها دارد، انجام پژوهش های بیشتر در این زمینه بسیار با اهمیت است.

هدف از انجام این مطالعه تعیین فنوتیپی و ژنوتیپی نقش پمپ های افلاکس در ایجاد مقاومت به فلوروکینولون ها در ایزوله‌های اشرشیا کلی جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان های کرمانشاه در سال ۱۳۹۲ بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، ۱۰۰ نمونه ی بالینی خون، مدفوع و ادرار در طول دوره سه ماهه فروردین تا خرداد ۱۳۹۲ از بیماران بستری در دو بیمارستان امام رضا و طالقانی کرمانشاه وارد مطالعه شد. پس از جمع آوری نمونه ها، ابتدا نمونه‌ها بر روی محیط‌های مک کانکی و EMB کشت داده شدند. سپس با استفاده از کیت تشخیصی API20E ایزوله های مشکوک به اشرشیا کلی مورد تأیید نهایی قرار گرفتند.

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

به منظور ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های اشرشیا کلی، از روش دیسک دیفیوژن(کربی –بائر) بر اساس معیارهای CLSI استفاده شد. سپس این سوسپانسیون در محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck, Germany) دارای مهار کننده پمپ افلاکس(CCCP) (Merck, Germany) و بدون CCCP با غلظت ثابت ۱۰۰ میکرومول کشت داده شد. از دیسک های آنتی بیوتیکی سیپروفلوکساسین (BBL-5µg)، اوفلوکساسین (MAST Disk-5µg)، نوروفلوکساسین (MAST Disk-10µg)، نالیدیکسیک اسید (BBL-30µg)، به منظور بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها استفاده گردید. نتایج بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم دسته بندی گردید(۱۱). در این مطالعه از سویه استاندارد ATCC ۲۵۹۲۲ اشرشیاکلی به عنوان کنترل کیفی استفاده گردید.

استخراج DNA و انجام PCR

در ادامه از روش جوشاندن برای استخراج DNA و پس از استخراج DNA، کمیت و کیفیت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ با جذب اشعه‌ی ماوراء بنفش به طور دقیق مشخص گردید. جهت بررسی ژن پمپ های افلاکس از PCR استفاده شد(۱۲). آزمون PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرو لیتر شامل بافر 1X PCR، ۲۰۰ میکرومولار dNTPmix، ۱/۵ میلی مولار MgCl2، ۰/۵ میکرومولار از هر یک از پرایمرهای، یک واحد Taq DNA pol و مقدار یک میکرولیتر از DNA الگو انجام شد.

جدول ۱ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده را نشان می دهد. این ژن ها به این دلیل انتخاب شدند که جزئی از سیستم های افلاکس هستند که در افلاکس فلوروکینولون‌ها دخالت دارند.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده، توالی پرایمرها، درجه حرارت اتصال

Primer		Sequences (5́–3́)	Amplicon length (21)	References	Annealing
norE	F R	CTGGCGGCAGCGGTAA TGCCATACAGACACCCACCATA	108	(16)	64
tolC	F R	AAGCCGAAAAACGCAACCT CAGAGTCGGTAAGTGACCATC	100	(16)	62
acrA	F R	CTTAGCCCTAACAGGATGTG TTGAAATTACGCTTCAGGAT	189	(17)	56
acrB	F R	CGTACACAGAAAGTGCTCAA CGCTTCAACTTTGTTTTCTT	183	(17)	56
acrE	F R	GCCCTCCTTTATTCTGATCT GGCTATACGATAAGCATTGG	166	(17)	56
acrF	F R	TAGCAATTTCCTTTGTGGTT CCTTTACCCTCTTTCTCCAT	247	(17)	56
mdfA	F R	GAGATTAAACAGTCCGTTGC TTTATGCTTTCGGTATTGGT	182	(17)	57

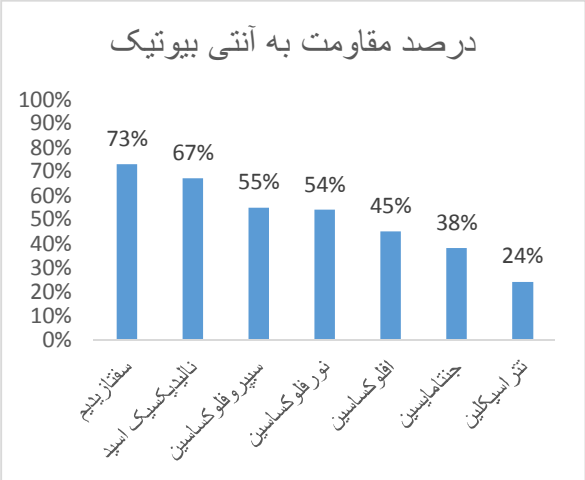
برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. پس از انجام واکنش، محصول PCR، بر روی ژل آگارز ۱ درصد لود و الکتروفورز انجام شد و به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد.

تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون کای دو استفاده شد. p مساوی یا کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از ۱۰۰ ایزوله اشرشیا کلی جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان های کرمانشاه، ۶۶ ایزوله از بیماران زن و ۳۴ ایزوله از مردها جدا گردید. بررسی الگوی حساسیت ایزوله‌ها نسبت به آنتی بیوتیک ها نشان داده که مقاومت نسبت به سفتازیدیم (۷۳ درصد)، نالیدیکسیک اسید (۶۷ درصد)، سیپروفلوکساسین (۵۵ درصد)، نورفلوکساسین (۵۴ درصد)، افلوکساسین (۴۵ درصد)، جنتامایسین (۳۸ درصد)، تتراسیکلین (۲۴ درصد) بود. نتایج نشان دهنده بیشترین و کمترین مقاومت ایزوله های اشرشیاکلی به ترتیب نسبت به سفتازیدیم و تتراسیکلین بود(نمودار ۱)(جدول ۲).



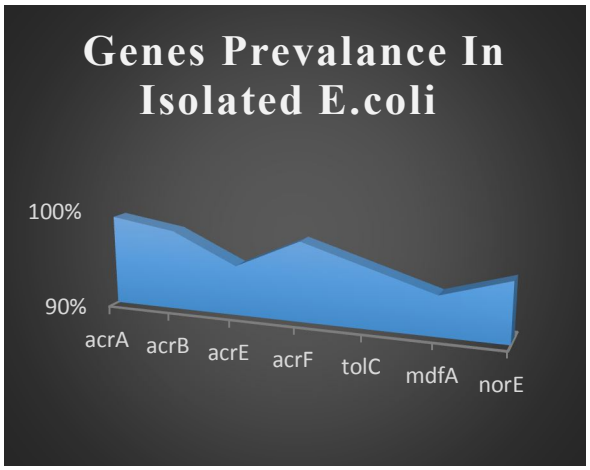
نمودار ۱. میزان مقاومت آنتی بیوتیکی بر حسب درصد در ایزوله های اشرشیا کلی

جدول ۲. ارزیابی تست آنتی بیوتیکی ایزوله های اشرشیا کلی در حضور و بدون حضور مهارکننده پمپ افلاکس CCCP

آنتی بیوتیک	CCCP / بدون CCCP	حساس	نیمه حساس	مقاوم
آمپی سیلین	-	۵	۶	۸۹
	CCCP	۵	۵	۹۰
سفتازیدیم	-	۱۹	۸	۷۳
	CCCP	۲۸	۸	۶۵
ایمی پنم	-	۹۷	۲	۱
	CCCP	۱۰۰	۰	۰
جنتامایسین	-	۵۵	۷	۳۸
	CCCP	۶۱	۲	۳۷
تتراسیکلین	-	۵۶	۲۰	۲۴
	CCCP	۶۱	۱۶	۲۳
سیپروفلوکساسین	-	۴۲	۳	۵۵
	CCCP	۴۵	۱	۵۴
افلوکساسین	-	۴۶	۹	۴۵
	CCCP	۴۴	۱۰	۴۶
نوروفلوکساسین	-	۴۲	۴	۵۴
	CCCP	۴۳	۵	۵۲
نالیدیکسیک	-	۲۵	۸	۶۷
	CCCP	۲۵	۹	۶۶

فراوانی ژن های mdfA، tolC، acrF، acrE، acrB، aceA و norE در ایزوله های اشرشیا کلی

از بین ۱۰۰ ایزوله اشرشیا کلی، ۹۹ درصد دارای ژن acrA ، ۹۸ درصد دارای ژن acrB، ۹۵ درصد دارای ژن acrE، ۹۸ درصد دارای ژن acrF، ۹۶ درصد دارای ژن tolC، ۹۴ درصد دارای ژن mdfA و ۹۶ درصد دارای ژن norE بودند(نمودار۲).



نمودار ۲. درصد فراوانی ژن ها در ایزوله های اشرشیا کلی

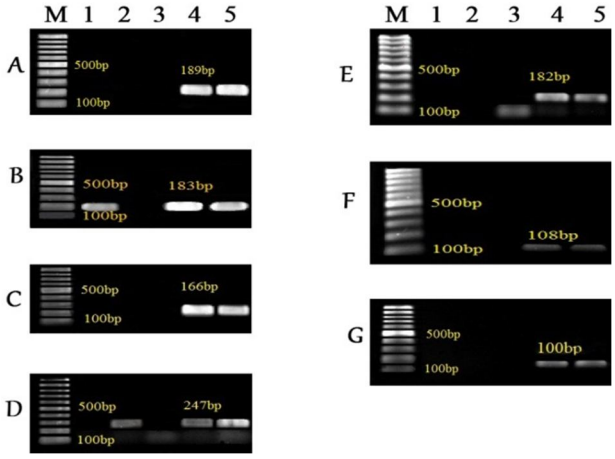
نتایج حاصل از اختلاف بین تعداد سویه‌های مقاوم در حضور و عدم حضور CCCP

در سویه‌هایی که ژن acrE، acrF، tolC، norE، acrA و acrB مثبت بودند، کمترین میزان مقاومت به وسیله افلاکس پمپ‌ها در حضور مهارکننده پمپ تراوشی (CCCP) نسبت به محیط بدون مهارکننده تراوشی به میزان ۴ درصد در سفتازیدیم دیده شد.

این میزان در سویه هایی که ژن mdfA مثبت بودند، کاهش مقاومت به وسیله افلاکس پمپ‌ها در حضور CCCP نسبت به محیط بدون CCCP به میزان ۳ درصد در سفتازیدیم دیده شد(جدول۳)(شکل ۱).

جدول ۳. نتایج میزان کاهش مقاومت آنتی بیوتیکی در محیط دارای CCCP نسبت به محیط بدون CCCP در حضور یا عدم حضور ژن‌های افلاکس

		CAZ	TET	CIP	NOR	NAL	AMP	IMP	GEN	OF
acrA	+	4	1	1	1	1	-	-	-	-
	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-
acrB	+	4	1	1	2	1	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
acrE	+	4	2	2	1	-	-	-	-	-
	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-
acrF	+	4	1	1	2	1	-	-	1	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mdfA	+	3	2	1	2	1	-	-	1	-
	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
norE	+	4	1	-	2	1	-	-	-	-
	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-
tolC	+	4	1	2	3	1	-	-	2	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



شکل ۱. الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR ژن‌های به ترتیب acrA با ۱۸۹ جفت باز، acrB با ۱۸۳ جفت باز،acre با ۱٦٦ جفت باز،acrF با ۲٤۷ جفت باز، TolC با ۱۸۲ جفت باز، mdfA با ۱۰۸ جفت باز و norE در گونه های اشرشیاکلی. A, C, E, F, G چاهک M: مارکر وزن مولکولی با سایز ۱۰۰ جفت باز، چاهک ۱ کنترل منفی، چاهک های۲ و ۳ نمونه منفی، چاهک ٤ کنترل مثبت و چاهک ٥ نمونه مثبت. B: چاهک M: مارکر وزن مولکولی با سایز ۱۰۰ جفت باز، چاهک ۱ کنترل مثبت، چاهک ۲ کنترل منفی و چاهک های۳ و ٤ نمونه مثبت. D: چاهک M: مارکر وزن مولکولی با سایز ۱۰۰ جفت باز، چاهک ۱ کنترل منفی، چاهک ۲ کنترل مثبت، چاهک ۳ نمونه منفی و چاهک های ٤ و ٥ نمونه مثبت.

بحث

باکتری اشرشیاکلی به جهت نقشی که در ایجاد عفونت های بیمارستانی دارد، از لحاظ پزشکی بسیار با اهمیت است. سپسیس، مننژیت، گاستروانتریت و عفونت های حاد مجاری ادراری از جمله بیماری هایی هستند که توسط این باکتری ایجاد می‌شوند. عفونت های مجاری ادراری ناشی از اشرشیاکلی آمار بالایی را در سراسر دنیا به خود اختصاص داده است. هم‌چنین یکی از شایع ترین عفونت های باکتریال در کودکان است و از علل عمده‌ی مراجعه بیماران به بیمارستان‌ها می‌باشد(۱۳). نکته ای که باید بیشتر مورد توجه واقع شود، میزان مقاومت بالایی است که باکتری اشرشیا کلی در برابر گروه‌های مختلف آنتی بیوتیکی از خود نشان می‌دهند و به نظر می رسد که میزان این مقاومت ها روز به روز در حال افزایش است. وجود مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در پاتوژن‌های بیمارستانی یکی از نگرانی‌های بزرگ و اساسی علم پزشکی است. مقاومت به آنتی بیوتیک های جدید و گسترش باکتری‌های مقاوم نه تنها بین بیماران بستری در بیمارستان بلکه در بین افراد جامعه از پیامدهای این معضل است(۱۴).

در میان آنتی‌بیوتیک‌ها فلوروکینولون ها به طور گسترده‌ای در درمان بالینی عفونت‌های مختلف ناشی از

اشرشیا کلی استفاده می شوند. شایع‌ترین مکانیسم مقاومت به فلوروکینولون ها جهش در ژن های کروموزومی کد کننده DNA ژیراز و توپوایزومراز IV است(۱۵). سایر مکانیسم‌های غیر اختصاصی، نظیر کاهش تجمع داخل سلولی دارو که در اثر بیان بیش از حد پمپ های Efflux صورت می گیرد و یا کاهش نفوذپذیری دارو به داخل سلول که در اثر پورین‌ها ایجاد می شود نیز رایج است(۹). پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای که طی دهه گذشته در دانش سیستم‌های افلاکس چند دارویی حاصل شده، نشان می دهد این سیستم در باکتری‌ها گسترده شده و دو نقش فیزیولوژیکی دارند: نخست به عنوان ماشین ترشح فرآورده‌های سلولی هستند و دوم به عنوان مکانیسم‌های دفاعی علیه مواد مضری که در محیط وجود دارند استفاده می‌گردند(۳). متاسفانه در کشور ما بروز مقاومت باکتریایی و عوامل دخیل در افزایش این قبیل مقاومت ها آن‌چنان که باید مورد بررسی قرار نگرفته است و بنابراین امروزه شاهد هستیم که عفونت های بیمارستانی به ویژه عفونت های مربوط به اشرشیا کلی آمار قابل توجهی را به خود اختصاص داده اند. در این پژوهش فراوانی ژن های کد کننده پمپ های افلاکس acrA، acrB، acrE، acrF، norE، mdfA و tolC و نقش این پمپ افلاکس در ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک های زیر مورد بررسی قرار گرفت. فلوروکینولون‌ها آنتی بیوتیک های ارجح در شروع درمان تجربی عفونت ادراری می باشند. به همین خاطر بحث مقاومت به آن همیشه مورد توجه قرار گرفته است. در سال‌های اخیر، میزان مقاومت به فلوروکینولون‌ها افزوده شده است. از بین فلوروکینولون ها سیپروفلوکساسین خوراکی یا وریدی به خاطر جذب سریع و ترشح مناسب به داخل ادرار بیشترین کاربرد را جهت درمان عفونت ادراری دارد. بنابراین مشاهده مقاومت به سیپروفلوکساسین نگرانی‌هایی را به همراه خواهد داشت(۱۶). مقاومت به سیپروفلوکساسین درگزارش‌هایی از تهران و کرمانشاه به ترتیب ۵۸/۳۳ و ۷۲۶ درصد بوده است (۱۷، ۱۸). در مطالعه حاضر، مقاومت به سیپروفلوکساسین ۵۵ درصد بوده است که با مطالعه ای در تبریز با مقاومت ۵۴ درصد نسبت به سیپروفلوکساسین مطابقت دارد(۱۹). نوروفلوکساسین یکی دیگر از آنتی بیوتیک هایی است که با خصوصیات مشابه به سیپروفلوکساسین در دسته فلوروکینون ها قرار گرفته است. مقاومت به این آنتی بیوتیک در پژوهش‌هایی که در سال های گذشته در تبریز و کرمانشاه انجام شده است، به ترتیب ۴۶ و ۳۱/۳ درصد گزارش گردید(۱۸، ۱۹). در این مطالعه میزان مقاومت به نوروفلوکساسین ۴۵ درصد گزارش شد.

نالیدیکسیک اسید از مشتقات کینولون ها است که از طریق مهار ساخت DNA باکتری اثر خود را اعمال می‌کند. مقاومت به این دارو در طول درمان به سرعت بروز می‌کند. درمطالعه‌ای که در سال های گذشته در کرمانشاه انجام شده بود، مقاومت به نالیدیکسیک اسید ۳۸/۵ درصد گزارش شد(۱۸). در این مطالعه میزان مقاومت ۶۷ درصد گزارش شده است. مشابه مطالعه ای که در سال ۲۰۰۹ در تبریز با مقاومت ۶۶ درصد در بیماران بستری گزارش گردیده است(۱۹)، این موضوع نشان دهنده افزایش میزان مقاومت اشرشیا کلی به نالیدیکسیک اسید است که در سال های متوالی جهت درمان این باکتری استفاده شده است. اوفلوکساسین یک ترکیب باکتریسید است. در این مطالعه مقاومت به اوفلوکساسین ۴۵ درصد گزارش شد. میزان مقاومت به اوفلوکساسین در تبریز، کرمانشاه، کرج به ترتیب ۴۰ ، ۲۶و ۳۰ درصد بوده است. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، مقاومت به اوفلوکساسین نسبت به سال های گذشته افزایش یافته است. چنین مقاومت های دارویی، مشکلات پیچیده ای را برای درمان های تجربی عفونت های ایجاد شده توسط اشرشیا کلی ایجاد می‌کنند(۲۱-۱۹). در مطالعات انجام شده در شهرهای مختلف ایـران، گستره مقاومت نسبت به جنتامایسین بین ۲۰ تـا ۴۳ درصد گزارش شده است(۲۴-۲۲). از آن‌جایی که میزان مقاومت اشرشیا کلی به جنتا مایسین در مطالعه صورت گرفته در کرمانشاه ۳۸ درصد گزارش شده

است، زنگ خطری برای گسترش مقاومت ارگانیسم به این آنتی بیوتیک است. تتراسیکلین ازجمله آنتی بیوتیک‌های باکتریسید است که برای مقابله با باکتری‌های گرم مثبت و منفی استفاده می‌شود. در این مطالعه، میزان مقاومت به تتراسیکلین ۲۴ درصد بوده است که در مقایسه با نتایج مطالعات انجام شده در اصفهان، زنجان، بابل به ترتیب با میزان مقاومت ۴۴/۸ ، ۴۶/۵ و ۸۳/۹ درصد کمتر است(۲۳, ۲۵, ۲۶). در مطالعات انجام گرفته در کشورهای دیگر بر اساس منطقه جغرافیایی، نتایج متفاوتی گزارش شده است به این شکل که در پژوهشی در آمریکا در سال ۲۰۱۶ میزان مقاومت به فلورکینولون ها در سویه H30 اشرشیا کلی به شکل معنی‌داری به خصوص در مورد سیپروفلوکساسین (۱۶/۸درصد) و نوروفلوکساسین بالا بوده است(۲۷). مقاومت به فلوروکینولون‌ها در پژوهشی در لهستان حدود ۲۷ درصد گزارش شده است که ۲۵ درصد از سویه‌های اشرشیا کلی جدا شده از نمونه‌های مختلف در طی یک سال به سیپروفلوکساسین مقاومت نشان دادند(۲۸).در حالی که میزان مقاومت به فلوروکینولون‌ها در چین از ۴۳ درصد در سال ۲۰۱۳ به ۴۸ درصد در سال ۲۰۱۵ افزایش یافته است(۲۹).

بر اساس نتایج PCR، از بین ۱۰۰ ایزوله اشرشیاکلی، ۹۹ درصد دارای ژن acrA ، ۹۸ درصد دارای ژن acrB، ۹۵ درصد دارای ژن acrE، ۹۸ درصد دارای ژن acrF، ۹۶ درصد دارای ژن tolC، ۹۴ درصد دارای ژن mdfA و ۹۶ درصد دارای ژن norE بودند. نتایج PCR نشان می دهد که درصد بالایی از سویه‌ها سیستم مقاومت چنددارویی را بر روی کروموزوم خود دارند.

این ژن ها، پمپ‌های افلاکس را کد کرده و باعث دفع آنتی بیوتیک های فلوروکینولون و بعضی آنتی‌بیوتیک-های دیگر به خارج سلول می شوند و از ایجاد غلظت مناسب مواد سمی که برای باکتری کشنده است، جلوگیری می‌نمایند(۳۰)، درنتیجه باعث ایجاد مقاومت به این آنتی بیوتیک ها می‌شوند. بنابراین بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، پمپ های افلاکس به میزان بالا در ایزوله های اشرشیاکلی حضور داشته و باعث ایجاد سطوح بالایی از مقاومت در برابر انواع آنتی بیوتیک‌ها به خصوص فلوروکینولون‌ها می‌شوند.

نتیجه‌گیری

طیف وسیع مقاومت منجر به بی‌اثرشدن بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های رایج می شود؛ توسعه مهارکننده های پمپ‌های افلاکس به ما امکان استفاده مجدد از آنتی بیوتیک‌های متنوعی که تحت تأثیر پمپ های افلاکس قرار می گیرند را خواهد داد. در این مطالعه از CCCP که جزء ترکیبات مهارکننده پمپ‌های افلاکس می باشد، جهت بررسی نقش این پمپ‌ها در ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده گردید. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد، میزان مقاومت به آنتی بیوتیک در حضور CCCP در سویه‌هایی که ژن acrA، acrB، acrE، acrF، tolC، mdfA و norE مثبت بودند کاهش پیدا کرده و بیش‌ترین میزان حساسیت در سفتازیدیم دیده شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پمپ افلاکس در مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارای اهمیت می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسنگان این مقاله از پرسنل بیمارستان‌های امام رضا و طالقانی کرمانشاه که در جمع‌آوری نمونه ها و مراحل اولیه این مطالعه یاری نمودند و هم‌چنین از پرسنل آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. Barati L, Ghezelsofla F, Azarhoush R, Heidari F, Noora M. Antibiotic sensitivity of isolated E. coli from pregnant women urine. J Gorgan Univ Med Sci. 2011;13(3).

2. Heidari-soureshjani E, Heidari M, Doosti A. Epidemiology of urinary tract infection and antibiotic resistance pattern of E. coli in patients referred to Imam Ali hospital in Farokhshahr, Chaharmahal va Bakhtiari, Iran. J Shahrekord Univ Med Sci. 2013;15(2):9-15.
3. Najar pyraie S, Esmaili, D. Antibiotics efflux Pumps. J Army Univ Med Sci Iranian Republic. 2004;2(1):301-6.
4. Webber M, Piddock L. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. J Antimicrob Chem. 2003;51(1):9-11.
5. Bohn C, Bouloc P. The Escherichia coli cmlA gene encodes the multidrug efflux pump Cmr/MdfA and is responsible for isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside exclusion and spectinomycin sensitivity. J bacter. 1998;180(22):6072-5.
6. Zhang Y, Xiao M, Horiyama T, Zhang Y, Li X, Nishino K, et al. The multidrug efflux pump MdtEF protects against nitrosative damage during the anaerobic respiration in Escherichia coli. J Biol Chem. 2011;286(30):26576-84.
7. Sephehri seresht S, Zahraei Salehi T, Sattari M, Tajbakhsh H, Aslani MM. Evaluation of genetic origin of shiga toxin in enterohemorrhagic Escherichia. J Kurdistan Univ Medi Sci. 2008;13:45-52.
8. Plésiat P. Role of the efflux pumps in antimicrobial resistance in E. coli. In: Teaching hospital Jean Minjoz B, France, editor. 2013.
9. Yang S, Clayton SR, Zechiedrich EL. Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in Escherichia coli. J Antimicrob Chemo. 2003;51(3):545-56.
10. Pourahmad R, Jazayeri N. Examine the possible presence of mutations in genes AcrR in mutants resistant to ciprofloxacin and tetracycline in Escherichia coli. Special Twelfth Iranian Genetics Congress Shahrekord University2013.
11. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing;Twenty-First Informational Supplement, CILS/NCCLS M100 S21. clinical and laboratory standards institute,waynepa. 2011;31(1)..
12. 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 Vac Immuno. 2008;15(2):293-6.
13. Mohammadyari F, IranPour A, Mousavi F, Khozeimeh L. Comparison of single dose and three-day course of cefixime in the treatment of women with uncomplicated acute cystitis referred to health care center in Tehran. J Islamic Azad Univ-Tehran Med Branch. 2013;23(1):46-51.
14. Nakha'ee Moghaddam M, Moshrefi, Sh. Determining the Antibiotic Resistance Pattern of Urinary Isolates of Escherichia coli and Prevalence of Extended Spectrum ß-lactamases (ESBLs) among them Quarterly. J Sabzevar Univ Med Sci. 2009;4(54):228-3.
15. Sato T, Yokota S, Uchida I, Okubo T, Usui M, Kusumoto M, et al. Fluoroquinolone resistance mechanisms in an Escherichia coli isolate, HUE1, without quinolone resistance-determining region mutations. Front Microbiol. 2013;4:125.
16. Sadeghi M, Bayani M, Montazeri M, Montazeri M, Fallahi negad S. Risk factors for ciprofloxacin resistance in community-acquired urinary tract infections caused by Escherichia. J Infectious Diseases and Tropical Infectious Disease Specialists Association. 2009;45.
17. Abdollahi Kheirabadi S, Najafipour S, Kafilzadeh F, Abdollahi A, Jafari S, Moravej A. Evaluation of Drug Resistance Pattern of Escherichia coli Strains Isolated from Fasa Vali-e-Asr Hospital Patients. J Fasa Univ Med Sci. 2013;2(4):273-8.
18. Madani SH, Khazaee S, Kanani M, Shahi M. Antibiotic resistance pattern of E. coli isolated from urine culture in Imam Reza Hospital Kermanshah-2006. J Kermanshah Univ Med Sci. 2008;12(3).
19. Mahdavi A, Nahaei, M.R., Akhi, M.T., Nahaei, M., Akbari Dibavar, M. Antibiotic Resistance Pattern against Fluoroquinolones among Escherichia coli Isolated from ICU and Out- patient Clinic Admitted Patients with

Urinary Tract Infection (Text in Persian). J Tabriz Univ of Med Sci. 2009;3(83):91-6.
20. Mohajeri P, Izadi B, Rezai M, Falahi B, Khademi H, Ebrahimi R. Assessment of the frequency of extended spectrum beta lactamases producing Escherichia coli isolated from Urinary tract infections and its antibiotic resistance pattern in kermanshah. J Ardabil Univ Med Sci. 2011;11(1):86-94.
21. Myrmostfa M, Haddadi A, AmirMozaffari sabet N. Determination of plasmid and antibiotic resistance in clinical strains of Escherichia coli isolated from patients in different parts of the city of Karaj. New Cell& Mol Biotech J. 2013;12:93-7.
22. Fesharakinia A, Malekaneh M, Hooshyar H, Aval M, Gandomy-Sany F. The survey of bacterial etiology and their resistance to antibiotics of urinary tract infections in children of Birjand city. J Birjand Univ Med Sci. 2012;19(2):208-15.
23. Hamid FR, Tajik A, Noorifard M, Keshavarz A, Taghipour N, HOSSIENI SJ. Antibiotic resistance pattern of E. coli isolated from urine culture in 660 Army clinical laboratory center in Tehran 2008. 2012.
24. Tashakory M, Farokhnia M, Zia Sheikholeslami N, Mirzai T, Yousefi H, Mokhtari F, et al. Frequency distribution of spawners Beta lactamase in Escherichia coli isolates from patients with urinary tract infections in hospitals Ali Ibn Abi Talib (as) University of Medical Sciences Rafsanjan. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2011;10(1):62-8.
25. Mohammadi M, Mohammadi M. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from urinary tract infections. Med Sci J Islamic Azad Univ. 2006;2:95-9.
26. Haghi F, Zeighami H, Keramati N, Hemmati F, Hajiahmadi F. Frequency of TEM Extended Spectrum Beta Lactamase Producing Escherichia coli in Clinical Specimens by Phenotypic and Molecular Methods in Zanjan. ZUMS Journal. 2013;21(85):55-63.
27. Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA, Sokurenko EV, Tchesnokova V. Intensity and mechanisms of fluoroquinolone resistance within the H30 and H30Rx subclones of Escherichia coli sequence type 131 compared with other fluoroquinolone-resistant E. coli. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2015 Aug 1;59(8):4471-80.
28. Kim D, Ahn JY, Lee CH, Jang SJ, Lee H, Yong D, Jeong SH, Lee K. Increasing Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporins, Fluoroquinolone, and Carbapenem in Gram-Negative Bacilli and the Emergence of Carbapenem Non-Susceptibility in Klebsiella pneumoniae: Analysis of Korean Antimicrobial Resistance Monitoring System. Annals of laboratory medicine. 2017 May 1;37(3):231-9.
29. Korona-Glowniak I, Skrzypek K, Siwiec R, Wrobel A, Malm A. Fluoroquinolone-resistance mechanisms and phylogenetic background of clinical Escherichia coli strains isolated in south-east Poland. The new microbiologica. 2016 Jul 1;39(3):210-5.
30. Shirazi MH, Sirous, M., Eshraghi, S.S., Fallah-Mehrabadi, J., Ebrahimi-Daryani, N., Pourmand, M. R., Soltan-dallal, M.M., Hajikhani, S. Evaluation of HP0605 and HP0971 genes of efflux pumps in Helicobacter pylori resistance to Metronidazole Iranian South Medical Journal. 2009;2:111-8.