مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۶، شمـاره‌ی ۱۱۵، خـرداد و تیر ۱۳۹۷، صفحات ۱۲ تا ۲۲

نقش پمپ تراوشی AcrAB در مقاومت به فلوروکینولون‌ها در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جمع آوری شده از مراکز پزشکی کرمانشاه

دکتر علی‌شا اکیا[۱]، اعظم الهی[۲]، رؤیا چگنه‌لرستانی[۲]، دکتر کیقباد قدیری[۳]

نویسنده‌ی مسئول: گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه azamelahi1365@gmail.com

دریافت: ۹۵/۱۰/۲۵ پذیرش: ۹۶/۱/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: *یکی از مکانیسم‌های دخیل در مقاومت کلبسیلا پنومونیه به فلوروکینولون‌ها، پمپ‌های تراوشی AcrAB است. در این مطالعه فراوانی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه دارای ژن‌های کد کننده AcrAB و نقش پمپ‌های تراوشی در مقاومت به فلوروکینولون بررسی گردید.*

روش بررسی: *۱۶۵ نمونه مختلف بیماران از مراکز پزشکی کرمانشاه جمع‌آوری و از میان آن‌ها ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه توسط کیت API-20E تایید شد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین با استفاده از آزمایش‌های Disk diffusion و MIC (Minimum Inhibitory Concentration) تعیین شد. ژن‌های acrA و acrB با روش PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. بررسی اثر ماده مهارکننده پمپ‌های تراوشی باکتریایی، Carbonyl cyanide m- chlorophynyl hydrazone (CCCP)، با غلظت نهایی ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی MIC ایزوله‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها به‌روش آگار دایلوشن انجام شد.*

یافته‌ها: *از ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، (۲۸ درصد) ۲۸ ایزوله به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین مقاوم بودند. هر دو ژن acrA و acrB در تمام ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها وجود داشت. اثر CCCP بر روی ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین منجر به کاهش میزان MIC در ۱۱ ایزوله (۳۹/۲ درصد) شد که از میان آن‌ها میزان MIC در ۵ ایزوله از مقاوم به حساس تغییر یافت.*

نتیجه‌گیری: *گرچه میزان مقاومت بالای دارویی ایزوله‌ها تنها به دلیل پمپ‌های تراوشی نمی‌باشد، اما نتایج مهار پمپ تراوشی نشان دهنده نقش آن‌ها در مقاومت ۳۹ درصد ایزوله‌ها بود. همچنین وجود ژن‌های AcrAB در همه ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به فلوروکینولون‌ها اهمیت این پمپ‌ها را نشان می‌دهد.*

واژگان کلیدی: ***AcrAB، پمپ تراوشی، فلوروکینولون، کلبسیلا پنومونیه***

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه یکی از عوامل عفونت مجـاری ادراری، پنومونی، عفونت زخم و سپتی‌سمی می‌باشد و کلـونیزه شـدن این باکتری در بیماران بستری بیش‌تر از بیماران سرپایی اسـت (۱). با کشف آنتی‌بیوتیک‌ها و رواج استفاده از آن‌ها در درمـان

۱- دکترای تخصصی باکتری شناسی، دانشیار مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه

۲- کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه

۳- فوق تخصص بیماری‌های عفونی کودکان، دانشیار مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه

بیماری‌های عفونی باکتریایی، مقاومت باکتریایی در برابر این داروها به وجود آمد (۲). اکنون این باکتری به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های متداول مقاوم شده و داروهای اندکی در درمان عفونت‌های ناشی از آن موثرند. آنتی‌بیوتیک‌های گروه فلوروکینولون مشتقات سنتزی نالیدیکسیک اسید هستند و در درمان عفونت‌های مختلف با منشاء باکتری‌های گرم منفی استفاده می‌شوند (۳). روش اثر فلوروکینولون‌ها مهار سنتز DNA باکتریایی با اتصال به آنزیم توپوایزومراز II (DNA ژیراز) و توپوایزومراز IV است (٤). اما به‌علت استفاده‌ی بی‌رویه از این داروها اکنون مقاومت به کینولون‌ها نیز افزایش یافته است (۵). مکانیسم‌های عمده‌ای در مقاومت باکتری‌ها به فلوروکینولون‌ها نقش دارند، از جمله آن‌ها تغییر هدف آنتی‌بیوتیک، کاهش تجمع آنتی‌بیوتیک‌ها درون سلول هدف به‌وسیله فعالیت پمپ‌های تراوشی یا کاهش بیان پورین‌های غشایی می‌باشد (٦). بیان بالای پمپ تراوشی AcrAB یکی از مکانیسم‌های اصلی مقاومت به فلوروکینولون‌ها می‌باشد. این سیستم پروتئینی به‌وسیله‌ی ژن‌های کروموزومی یا پلاسمیدی کد می‌شود و افزایش بیان آن سبب ممانعت از تجمع داخل سلولی داروها می‌گردد (۸و۷). پمپ‌های تراوشی می‌توانند سبب دفع طیف گسترده‌ای از مواد از جمله داروها، مواد شیمیایی، رنگ‌ها و دترجنت‌ها شوند (۹). پنج خانواده‌ی اصلی از پمپ‌های تراوشی در پروکاریوت‌ها یافت شده و یکی از نمونه‌های مهم شناخته شده آن‌ها پمپ RND است (۱۰). پمپ RND از پمپ‌های تراوشی است که موجب مقاومت به چندین دارو می‌شود (۱۱و ۹). پمپ AcrAB-TolC در دسته RND قرار دارد و به‌عنوان پمپ غالب تراوشی شناخته شده‌است (۱۰). AcrA یک پروتئین مستقر در فضای پری‌پلاسمیک، AcrB یک پروتئین ناقل در غشای داخلی و TolC یک کانال پروتئینی در غشای خارجی باکتری است که به پروتئین غشای خارجی هم معروف است (۱۳و۱۲). AcrAB در ایجاد مقاومت به فلوروکینولون‌ها، تتراسایکلین‌ها، کلرامفنیکل، تری‌متوپریم و بتالاکتام‌ها نیز تاثیر دارد (١٤). بیان AcrAB در سطح سلول به‌وسیله‌ی MarA, SoxS, rob, acrR تنظیم می‌شود (١٤). به کارگیری مهار کننده‌های پمپ تراوشی امکان استفاده مجدد از بسیاری آنتی‌بیوتیک‌ها که تحت تاثیر پمپ‌های تراوشی قرار می‌گیرند را خواهد داد (۱۵). اخیرا نظریه‌ی امکان استفاده از مهارکننده‌های پمپ‌های تراوشی با آنتی‌بیوتیک‌ها به‌منظور بهبود و تقویت اثر آن‌ها بررسی شده‌است (١٦).

مهارکننده Carbonyl Cyanide m- Chlorophynyl Hydrazone=CCCP ترکیبی است که به دلیل داشتن سیانور در ساختمان خود می‌تواند سیتوکروم اکسیداز زنجیره انتقال الکترون را مهار کند. با این عمل گرادیان الکتروشیمیایی یون‌های پروتون در غشای سیتوپلاسمی مختل می‌شود. در نتیجه این ترکیب می‌تواند سیستم پمپ‌هایی که از انرژی پروتونی برای پمپ مواد استفاده می‌کنند را مهار نماید (۱۷). این ترکیب در چند مطالعه به‌عنوان مهارکننده پمپ‌های تراوشی در باکتری‌ها به‌کار رفته‌است (۱۹و ۱۸). پمپ‌های تراوشی به لحاظ داشتن سوبستراهای متنوع، اثر سینرژیسمی با سایر مکانیسم‌های مقاومت و نیز فراونی آن‌ها در باکتری‌های پاتوژن اهمیت زیادی در ایجاد مقاومت‌های دارویی دارند. در این تحقیق فراوانی ایزوله‌های دارای ژن‌های کد کننده acrA، acrB و تاثیر مهارکننده CCCP بر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون بررسی گردید.

روش بررسی

نمونه‌گیری و جداسازی ایزوله‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، از بهمن ۱۳۹۳ لغایت اسفند ۱۳۹٤ تعداد ١٦٥ نمونه *کلبسیلا پنومونیه* از نمونه‌های بالینی از سه بیمارستان و یک آزمایشگاه تشخیص طبی در کرمانشاه جمع‌آوری شد. این باکتری‌ها ابتدا با روش کشت غربالگری اولیه شدند و سپس با

استفاده از کیت API20E (Biomerieux, France) مورد شناسایی نهایی قرار گرفتند.

- **پروفایل آنتی‌بیوتیکی:** حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن برروی محیط مولر هینتون آگار برای آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم) و لووفلوکساسین (۵ میکروگرم) (شرکت مست، انگلستان) با توجه به دستورالعمل‌های Clinical and Laboratory (CLSI) Standards Institute انجام شد (۲۰). لازم به ذکر است که سویه‌ی استاندارد *اشریشیا کلی* ATCC 25922 جهت کنترل کیفی روش آنتی‌بیوگرام مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین حداقل غظت مهارکننده (MIC) آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین از روش میکرودایلوشن براث استفاده گردید. در این روش ابتدا از کشت ۲٤ ساعته ایزوله‌ها روی محیط نوترینت آگار، رقتی معادل کدورت نیم مک فارلند تهیه و طبق دستور کار CLSI رقیق شد (۲۰). به‌طوری که غلظت نهایی باکتری‌ها در هر چاهک میکروپلیت 10^5 باکتری بود. غلظت‌های ۰/۰۱۵ گرم بر میلی‌لیتر میکرون تا ۱۰۲٤ گرم بر میلی‌لیتر میکرون برای هر دو آنتی‌بیوتیک به‌کار رفت. هر چاهک میکروپلیت حاوی حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر شامل محیط کشت، آنتی‌بیوتیک و سوسپانسیون باکتری بود. محیط مولر هینتون براث به‌همراه باکتری و بدون آنتی‌بیوتیک به‌عنوان کنترل مثبت و همچنین محیط مولر هینتون براث به‌تنهایی بدون باکتری به عنوان کنترل منفی به‌کار رفت. پانل‌ها ٢٤ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند و کم‌ترین غلظت آنتی‌بیوتیک در چاهکی که هیچ کدورتی از رشد باکتری در آن مشاهده نشد، معادل MIC بر آورد گردید (۲۱). از سویه *E. coli* ATCC 25922 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. میزان Breakpoints MIC پیشنهادی توسط CLSI برای سیپروفلوکساسین برای ایزوله‌های حساس کوچکتر مساوی ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای ایزوله‌های مقاوم بزرگتر مساوی ٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در مورد لووفلوکساسین برای ایزوله‌های حساس کوچکتر مساوی ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای ایزوله‌های مقاوم بزرگتر مساوی ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

- **روش PCR(Polymerase Chain Reaction):** DNA ایزوله‌ها برای انجام PCR با روش جوشانیدن (boiling) استخراج شد. به این منظور نمونه‌ها را از فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد خارج شد و در پلیت‌های نوترینت آگار کشت و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. در مورد هر ایزوله تعدادی از کلنی‌های رشد یافته در شرایط کاملا استریل به لوله اپندرف ۱/۵ میلی‌لیتر استریل حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل انتقال داده شد، سوسپانسیون حاصل به خوبی ورتکس شد و سپس این سوسپانسیون میکروبی به‌مدت ۵ دقیقه در بن ماری در حال جوش قرار داده شد. بعد از گذشت این زمان به‌مدت ۱۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. فاز رویی که حاوی DNA بود به لوله اپندرف ۱/۵ میلی‌لیتر دیگری انتقال و مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR برای ژن‌های acrA و acrB (جدول ۱) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (سینا کلون، تهران) و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BioRad, USA) انجام و برای هر ژن یک کنترل مثبت که قبلا توسط توالی یابی تایید شده بود، در نظر گرفته شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای به‌کار رفته و اندازه محصولات PCR

ژن	توالی پرایمر ('5-'3)	اندازه محصول (bp)	منبع
AcrA	5´-ATGAACAAAAACAGAGG-3´ 5´-TTTCAACGGCAGTTTTCG-3´	٤٩٥	(١٥)
AcrB	5´-GGTCGATTCCGTTCTCCGTTA-3´ 5´-CTACCTGGAAGTAAACGTCATTGGT-3´	١٠٧	(١٦)

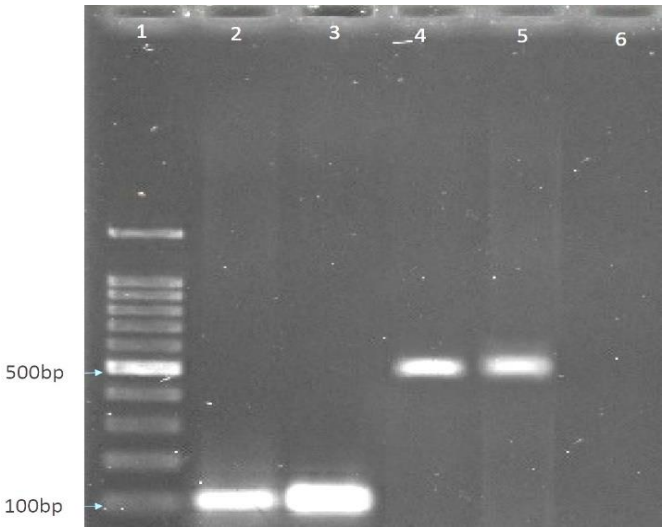
محصول PCR بر روی آگارز ۱ درصد الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و در نهایت با دستگاه ژل داک (Gel-Documentation, BioRad) با استفاده از اشعه‌ی UV مورد بررسی قرارگرفت.

- بررسی اثر مهارکننده CCCP بر مقاومت ایزوله‌ها

تاثیر مهارکننده سیستم‌های پمپ برون‌ریز CCCP (Sigma, USA) بر روی MIC سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین برای ایزوله‌ها به روش آگار دایلوشن بررسی شد. ماده CCCP با غلظت نهایی ۵ گرم بر میکرو میلی‌لیتر به‌کار رفت و عملکرد پمپ‌های تراوشی به‌وسیله‌ی مقایسه MIC آنتی‌بیوتیک‌ها قبل و بعد از اثر CCCP روی ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین برآورد گردید. در این روش ۱۲ غلظت (غلظت‌های ۰/۰۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تا ١٠٢٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین تهیه و هر یک از غلظت‌ها به مولر هینتون آگار موجود در پلیت‌ها در دمای ٤٥ درجه‌ی سانتی‌گراد اضافه و مخلوط گردید (روش آگار دایلوشن). از کشت تازه ١٦–١٨ ساعته ایزوله‌ها سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند تهیه شد و تعداد CFU 10^4 باکتری روی سطح پلیت مولر هینتون آگار حاوی غلظت‌های مختلف از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌صورت نقطه‌ای کشت داده شد و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ١٦ تا ١٨ ساعت انکوبه گردید. سپس این آزمایش یک‌بار دیگر برای ایزوله‌ها اما با حضور غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مهارکننده CCCP در محیط مولر هینتون آگار انجام شد. نتایج حاصل MIC برای ایزوله‌ها در حضور و غیاب مهارکننده CCCP مقایسه گردید.

یافته‌ها

از صد نمونه *K. pneumoniae* ۷۰ ایزوله از ۳ بیمارستان و ۳۰ ایزوله از نمونه‌های آزمایشگاه‌های سرپایی جداسازی شدند. ایزوله‌ها از نمونه‌های ادرار (۵۸ نمونه)، سوختگی (١٦ نمونه)، تراشه (١٤ نمونه)، خون (۵ نمونه)، زخم (۲ نمونه)، مایع آسیت (۳ نمونه)، تخت پانسمان سوختگی (۱ نمونه) و تخت برانکارد (۱ نمونه) به دست آمد. همچنین از مجموع بیماران ۵۹ نفر زن، ۳۹ نفر مرد و ۲ نمونه مربوط به تخت بیماران یکی از بیمارستان‌ها بودند. میانگین سنی بیماران ۲۶/۲± ۵/ ۳۹ سال بود. نتایج تست‌های آنتی‌بیوتیکی نشان داد که از ۱۰۰ ایزوله تعداد ۲۸ (۲۸درصد) ایزوله به هر دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین مقاوم بودند و ۵ (۵ درصد) ایزوله نیمه حساس بودند، به‌طوری که ٤ ایزوله فقط به سیپروفلوکساسین و یک ایزوله به هر دو آنتی‌بیوتیک نیمه‌حساس بود. همچنین نتایج MIC نشان داد بالاترین رنج مقاومت به سیپروفلوکساسین ١٠٢٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر (یک ایزوله) و لووفلوکساسین ٢٥٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر (دو ایزوله) بود. نتایج PCR وجود هر دو ژن acrA و acr را در تمام ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد (تصویر ۱).



تصویر ۱: الکتروفورز محصولات PCR برای ژن‌های AcrA و AcrB

ردیف ۱- مارکر (DNA ladder, 100bp)، ردیف۲- کنترل مثبت برای ژن AcrB، ردیف۳- AcrB، ردیف٤-کنترل مثبت برای ژن AcrA، ردیف۵- AcrA، ردیف ٦-کنترل منفی.

مقایسه‌ی MIC ایزوله‌ها نشان داد که مهارکننده بر روی دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین تاثیر مشابه‌ای در کاهش MIC ایزوله‌ها دارد (جدول ۲). اثر CCCP روی مقدار MIC سیپروفلوکساسین در ۸ ایزوله باعث کاهش MIC شد که در ٤ ایزوله سبب یک رقت کاهش و در٤ ایزوله دیگر سبب بیش از یک رقت کاهش شد.

به‌طوری که میزان MIC در ۲ ایزوله از حالت مقاوم به حالت حساس تغییر یافت. اما برای لووفلوکساسین، ۹ ایزوله کاهش MIC نشان دادند که در ٦ ایزوله یک رقت کاهش وجود داشت و در ۳ ایزوله بیش از یک رقت کاهش مشاهده شد که میزان MIC از حالت مقاوم به حالت حساس تغییر کرد. به‌طور کلی از ۲۸ ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین، ۱۱ ایزوله (۳۹/۲ درصد) در اثر مهارکننده CCCP کاهش MIC را به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان دادند و ۵ ایزوله (۱۷/۸ درصد) در اثر مهارکننده CCCP تغییر مقاومت از حالت مقاوم به حالت حساس را داشتند (جدول ۳).

جدول ۲: نتایج MIC (µg/ml) ایزوله‌ها

آنتی‌بیوتیک	MIC(g/mlµ)				
	Resistance breakpoint	رنج	MIC 50	MIC 90	مقاومت(٪)
سیپروفلوکساسین	≥٤	۱۰۲٤-۰/۰۱۵	٦٤	۰/۵	۲۸
لووفلوکساسین	≥۸	۲۵٦-۰/۰۱۵	٦٤	۰/۱۲۵	۲۸

جدول ۳: اثر ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون CCCP بر روی MIC

آنتی‌بیوتیک‌ها	ایزوله‌ها	نتایج MIC قبل اعمال اثر CCCP	MIC(µg/ml)		نتایج MIC بعد اعمال اثر CCCP
			CCCP + آنتی بیوتیک‌ها	آنتی‌بیوتیک‌ها	
	K40	R	۳۲	۱۲۸	R
	K63	R	۱	٦٤	S
	R2	R	٦٤	۱۲۸	R
سیپروفلوکساسین	R6	R	۱	٦٤	S
	M15	R	٤	۱٦	R
	T3	R	٥۱۲	۱۰۲٤	R
	T8	R	۱۲۸	۲٥٦	R
	T19	R	۲٥٦	٥۱۲	R
	K4	R	٦٤	۱۲۸	R
	K5	R	٦٤	۱۲۸	R
	K6	R	٦٤	۱۲۸	R
	K40	R	۳۲	٦٤	R
لووفلوکساسین	K63	R	۱	٦٤	S
	R6	R	۱	۱۲۸	S
	M15	R	۲	۳۲	S
	T8	R	۱۲۸	۲٥٦	R
	T19	R	۱۲۸	۲٥٦	R

R= resistance, S= sensitive

بحث

تراوش فرآیندی است که طی آن باکتری، ترکیباتی نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد شیمیایی و غیره را به خارج سلول دفع و از ایجاد غلظت کشنده این مواد جلوگیری می‌کند. خروج آنتی‌بیوتیک‌ها از سلول باکتری سبب کاهش چشم‌گیر اثر درمانی آن‌ها می‌گردد (۲۲و ۱۵). استفاده از عوامل کاهش دهنده‌ی مقاومت دارویی مانند عوامل مهارکننده‌ی پمپ‌های تراوشی می‌توانند کارآمدی آنتی‌بیوتیک‌ها را افزایش دهند (۲۳). گسترش سویه‌های مقاوم *کلبسیلا پنومونیه* به فلوروکینولون‌ها در همه‌ی نقاط جهان پدیدار شده‌است. اما میزان فراوانی آن‌ها در مناطق مختلف جهان متفاوت است. در مطالعه‌ای در ترکیه مقاومت به سیپروفلوکساسین (۲۹/۱ درصد) با میزان بالای MIC گزارش شده که با نتایج ما مشابه است (۲٤). ولی در چند مطالعه‌ی دیگر رنج MIC پایین‌تر و از ۱٦ تا ۲٥٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است (۲۵و۱۹و۱۸). مقایسه‌ی این نتایج با مطالعه‌ی ما نشان دهنده‌ی میزان بالای مقاومت به فلوروکینولون‌ها در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* در کرمانشاه می‌باشد. یکی از دلایل این پدیده می‌تواند در اثر تجویز غیر منطقی آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. مطالعات اندکی در مورد نقش پمپ‌های تراوشی در ایجاد مقاومت *کلبسیلا پنومونیه* به فلوروکینولون‌ها انجام شده‌است (۱۹). نتایج پژوهش‌ها بیانگر آن است که سیستم‌های پمپ تراوشی در ایجاد مقاومت ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به فلوروکینولون‌ها دخالت دارند (۲۷-۲۵). وجود ژن‌های

AcrA و AcrB درصد در صد ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین در مطالعه‌ی حاضر با نتایج مطالعه دیگری در ایران مشابه است (۱۹و۱۱). فراوانی بالای ژن‌های پمپ تراوشی AcrAB در مطالعه‌ی حاضر نشان دهنده‌ی اهمیت آن‌ها در ایجاد مقاومت ایزوله‌ها نسبت به فلوروکینولون‌ها می‌باشد، هر چند به‌نظر می‌رسد این ژن‌ها در همه ایزوله‌ها فعالیت یکسان ندارند. به‌طوری که مطالعه‌ی حاضر نشان داد، پمپ‌های تراوشی نقش آشکاری در کاهش حساسیت ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* (۳۹ درصد) به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین دارد. پمپ‌های تراوشی نه‌تنها باعث افزایش MIC آنتی‌بیوتیک‌ها می‌گردند، بلکه با کاهش غلظت دارو در داخل سلول منجر به ایجاد سویه‌های موتانت مقاوم به آنتی‌بیوتیک در باکتری‌ها می‌شوند (۹).

در مطالعه‌ای در ایران در سال ۲۰۱۱ حدود ٤٧/٥ درصد از ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین کاهش حداقل غلظت مهارکننده بعد از استفاده از مهارکننده CCCP را داشتند (۱۹). همچنین در یک مطالعه دیگر در ایران ٤٠ درصد ایزوله‌ها مقاوم به سیپروفلوکساسین کاهش ۲ تا ١٦ برابری در حضور CCCP داشتند (۱۱). در مطالعه‌ای در ترکیه (۲۰۰٤) حضور پمپ‌های تراوشی فعال در ۳۹ درصد از ایزوله‌های مقاوم *کلبسیلا پنومونیه* تشخیص داده شد که در مقاومت به فلوروکینولون‌ها نقش داشتند (۲۷). همچنین در مطالعه‌ی دیگری در ترکیه (۲۰۱۳)، حدود ٤٤ درصد ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* در حضور مهارکننده PAβN (Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide) حداقل غلظت مهارکننده کاهش یافت (٢٤). در مطالعه‌ای در چین (۲۰۱۲) ٥٠ درصد از ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* در حضور CCCP کاهش حداقل غلظت مهارکننده را نشان دادند (۱۸). نتایج این مطالعات به یافته‌های مطالعه‌ی ما در کاهش مقاومت درصد بالایی از ایزوله‌ها به‌وسیله‌ی مهارکننده‌های پمپ‌های تراوشی نزدیک بود. اما در یک مطالعه در مصر (۲۰۱٤) ٦٩ درصد ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* در حضور مهارکننده CCCP حداقل غلظت مهارکننده کاهش یافت که کمی بالاتر از نتایج ما بود (۲۸). البته باید در نظر داشت که پمپ‌های تراوشی تنها یکی از سیستم‌های مقاومت به فلوروکینولون‌ها هستند و مکانیسم‌های دیگری از جمله موتاسیون در ژن‌های توپوایزومراز و تغییر در پورین‌های غشای باکتری نیز دخیل می‌باشند (۲۹).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که پمپ‌های تراوشی در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون نقش موثری دارند. گرچه پمپ‌های تراوشی یکی از مکانیسم های مقاومت دارویی است، اما نتایج ارزیابی فنوتیپی پمپ تراوشی در مطالعه حاضر نشان دهنده‌ی کاهش MIC در ۳۹ درصد ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به فلوروکینولون بود. همچنین حضور ژن‌های AcrAB در همه‌ی ایزوله‌های مقاوم، به‌نظر می‌رسد نقش این پمپ‌ها در سویه‌های بالینی مقاوم با اهمیت باشد. امکان استفاده از مهارکننده پمپ‌های تراوشی همراه آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند راهکار مناسبی برای تقویت اثر آنتی‌بیوتیک‌های موجود باشد.

تقدیر و تشکر

مقاله‌ی حاضر حاصل اجرای طرح تحقیقاتی مصوب در معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می‌باشد. بدین وسیله از پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی میکروب‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی کرمانشاه تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1- Feiz Sardhar MH, Akya A. The Frequency of Extended Spectrum β-Lactamase Genes of SHV-2a, SHV-5 and SHV-12 in Clinical Isolates of *Klebsiella Pneumoniae* Isolated from Kermanshah Medical Centers in 2014. *Arak Uni Med Sci*. 2016; 19: 59-67.

2- Akya A, Khodadoost M, Rashiditabar E. Prevalence of blaTEM Gene in *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections of Outpatients in Kermanshah. *Zanjan Uni Med Sci*. 2013; 21: 84-94.

3- Sarkozy G. Quinolone:a class of antimicrobial agents. *Vet Med*. 2001; 46: 257-74.

4- Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 337-41.

5- Wada K, Kariyama R, Mitsuhata R, et al. Experimental and clinical studies on fluoroquinolone-insusceptible *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections from 1994 to 2007. *Acta medica Okayama*. 2009; 63: 263-72.

6- Yamane K, Wachino J, Suzuki S, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51: 3354-60.

7- Koronakis V. TolC--the bacterial exit duct for proteins and drugs. *FEBS letters*. 2003; 555: 66-71.

8- Levy SB. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol*. 2002; 92: 65S-71S.

9- Goudarzi H, Doraghi M, Dabiri H, Ghalavand Z. Functional analysis of multidrug efflux pumps genes of *Acinetobacter baumannii* strains. *Research in Medicine*. 2013; 37: 107-12.

10- Peleg AY, Adams J, Paterson DL. Tigecycline Efflux as a Mechanism for Nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51: 2065-9.

11- Saadatian Farivar A, 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. *Shahid Beheshti Uni Med Sci*. 2016; 40: 42-8.

12- Eswaran J, Koronakis E, Higgins MK, Hughes C, Koronakis V. Thr ee's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr Opin Struct Biol*. 2004; 14: 741-7.

13- Koronakis V, Eswaran J, Hughes C. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem*. 2004; 73: 467-89.

14- Oethinger M, Kern WV, Jellen-Ritter AS, McMurry LM, Levy SB. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 10-3.

15- Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64: 672-93.

16- Saenz Y, Ruiz J, Zarazaga M, Teixido M, Torres C, Vila J. Effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg-beta-naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53: 544-5.

17- Tarashi S, Goudarzi H, Hashemi A, et al. Evaluation of carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazone effect and efflux pump expression level of mexCD-oprJ among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients in Shahid Motahari hospital in Tehran during 2014-2015. *Zanjan Uni Med Sci J*. 2016; 108: 43-55.

18- Zhong HQ, Zhang S, Pan H, Cai T. Influence of induced ciprofloxacin resistance on efflux pump activity of *Klebsiella pneumoniae. J Zhejiang Univ Sci B*. 2013; 14: 837-43.

19- 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: 1-6.

20- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI, Wayne, PA. M100-S21, 31, no. 1. 2011.

21- Nascente PS, Meineraz ARM, Faria RO, Suchuch LF, Meireles MCA, Mello JRB. CLSI broth microdilution method for testing susceptibility of Malasseziapachydermatis to thiabendazole. *Braz J Microbiol*. 2009; 40: 222-6.

22- Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?. *Clin Infect Dis*. 2002; 34: 634-40.

23- Stavri M, Piddock LJ, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59: 1247-60.

24- Yedekci S, Erac B, Limoncu MH. Detection of the efflux pump-mediated quinolone resistance in ESBL positive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates by phe-Arg-beta naphthylamide. *Turk J Pharm Sci*. 2012; 9: 67-74.

25- 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: 3441-3.

26- Martinez-Martinez L, Pascual A, Conejo Mdel C, et al. Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum beta-lactamase production. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46: 3926-32.

27- Hasdemir UO, Nordmann P, Pages JM. Detection and prevalence of active drug efflux

mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *J Clin Microbiol*. 2004: 2701-6.

28- Kishk R, Mandour M, Hessam W, Nemr N. Efflux pump genes and chlorhexidine resistance: Clue for *Klebsiella pneumoniae* infections in intensive care units, Egypt. *Afr J Microbiol Res*. 2014; 8: 2162-7.

29- Andersen JL, He GX, Kakarla P, et al. Multidrug efflux pumps from Enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. *Int J Environ Res Public Health*. 2015; 12: 1487-1547.

The Role of AcrAB Leakage Pump in Resistance to Fluoroquinolones in *Klebsiella Pneumoniae* Isolates Collected from Medical Centers of Kermanshah

Akya A[1], Elahi A[2], Chegeneh Lorestani R[2], Ghadiri K[1]

[1]Nosocomial Infection Research Centre, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

[2]Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

***Corresponding Author**:* Elahi A, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

E-mail: azamelahi1365@gmail.com

Received: 14 Jan 2017 **Accepted:** 16 Apr 2017

Background and Objective: One of the mechanisms involved in the resistance of Klebsiella pneumoniae to fluoroquinolones is AcrAB leakage pumps. In this study, the prevalence of Klebsiella pneumoniae isolates with AcrAB encoding genes and the role of permeation pumps in fluoroquinolone resistance were investigated.

Materials and Methods: 165 samples from patients of Kermanshah Medical Centers were collected and 100 isolates of Klebsiella pneumoniae approved by API-20E kit. Antibiotic susceptibility of isolates to ciprofloxacin and levofloxacin was determined using disk diffusion and MIC (Minimum Inhibitory Concentration) experiments. AcrA and AcrB genes were determined by PCR method. The effect of bacterial permeation inhibitor (CCCP) Carbonyl cyanide m-chlorophynyl hydrazone with final concentration of 5µg / ml on MIC of fluoroquinolones resistant isolates was done using agar dilution method.

Results: Of the100 Klebsiella pneumoniae isolates, 28 (28%), were resistant to ciprofloxacin and levofloxacin. Both acrA and acrB genes were resistant to antibiotics in all Klebsiella pneumoniae isolates. The effect of CCCP on isolates resistant to ciprofloxacin and levofloxacin resulted in a decrease in MIC in 11 isolates (39.2%), among which the MIC was changed in five isolated from resistant to susceptible state.

Conclusion: Although the high drug resistance of isolates is not due to permeation pumps, the results of inhibition of pump indicate their role in the resistance of 39% of isolates. Also, the presence of AcrAB genes in all fluoroquinolones resistant Klebsiella pneumoniae isolates shows the importance of these pumps.

Keywords: ***AcrAB, leakage pump, Fluoroquinolone, Klebsiella pneumonia***