

Effect of AcrAB Efflux Pump on Ciprofloxacin Resistance Rate in *Escherichia coli* Isolates

Alisha Akya¹, Roya Chegeneh Lorestani^{1*}, Azam Elahi¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

*Corresponding Author:
Roya Chegene Lorestani,
Department of Microbiology,
Faculty of Medicine,
Kermanshah University of
Medical Sciences,
Kermanshah, Iran.

Email:
lorestani25@gmail.com

Received: 6 Oct, 2016.

Accepted: 4 Dec, 2016.

Abstract

Background and Objectives: One of the important mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli*, is AcrAB efflux pumps activity. In this study, the frequency of *acrA* and *acrB* genes and the effect of efflux pumps on the ciprofloxacin resistance in isolates of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli*, were investigated.

Methods: This experimental study was performed on 66 ESBL producing *E.coli* strains isolated from urine sample of outpatients referred to two medical centers in Kermanshah city. Antibiotic susceptibility of the isolates to 10 common antibiotics, was assessed using standard disk diffusion method (according to the CLSI guideline). The *acrA* and *acrB* genes were detected by PCR in ciprofloxacin resistant isolates. The inhibitory effect of bacterial efflux pump (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP), with final concentration of 25µg/ml on MIC of the ciprofloxacin resistant isolates, was assessed using agar dilution method. The data were analyzed using Chi-square test.

Results: Out of 66 isolates, 45 isolates (68.1%), were resistant to ciprofloxacin. Both *acrA* and *acrB* genes, were found in the ciprofloxacin resistant *E. coli* isolates. The effect of CCCP on the resistance of isolates to ciprofloxacin led to the decrease in MIC only in 7 isolates (15.5%).

Conclusion: The results of this study showed that despite the high resistance to ciprofloxacin and the presence of both *acrA* and *acrB* genes in most of the *E.coli* isolats, the efflux pump activity exists in a small percentage of isolates. Therefore, efflux pumps play a small role in ciprofloxacin resistance in *E. coli*.

Keywords: *Escherichia coli*; Microbial drug resistance; Ciprofloxacin.

تأثیر پمپ برون ریز AcrAB بر میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه‌های اشرشیاکلی

علی‌شا اکیا^۱، رؤیا چگنه لریستانی^{۱*}، اعظم الهی^۱

چکیده

زمینه و هدف: یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به کینولون‌ها در اشرشیاکلی، فعالیت پمپ ترشحی AcrAB است. در این مطالعه فراوانی ژن‌های *acrB*، *acrA* و اثر پمپ برون ریز بر روی مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه‌های اشرشیاکلی مولد بتا لاکتامازهای طیف گسترده (ESBL) بررسی گردید.

روش بررسی: این مطالعه تجربی بر روی ۶۶ نمونه اشرشیاکلی مولد ESBL جداشده از نمونه ادرار بیماران سرپایی مراجعه‌کننده به ۲ مرکز پزشکی در شهر کرمانشاه انجام شد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها به ۱۰ آنتی‌بیوتیک رایج با روش استاندارد دیسک دیفیوژن (طبق راهنمای CLSI) انجام گرفت. ژن‌های *acrB* و *acrA* با روش PCR در جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین مشخص شدند. اثر مهارکننده پمپ‌های برون ریز با کتریایی (Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone, CCCP)، با غلظت نهایی ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی حداقل غلظت مهارکننده (MIC) جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با روش آگار دیلوشن ارزیابی گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون کای دو تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: از ۶۶ جدایه، ۴۵ جدایه (۶۸/۱٪) به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. در تمام جدایه‌های اشرشیاکلی، هر دو ژن *acrB* و *acrA* مقاوم به سیپروفلوکساسین یافت شد. اثر CCCP روی مقاومت جدایه‌ها به سیپروفلوکساسین منجر به کاهش حداقل غلظت مهارکننده، تنها در ۷ جدایه (۱۵/۵٪) گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد با وجود بالا بودن میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین و حضور هر دو ژن *acrB* و *acrA* در اکثر جدایه‌های اشرشیاکلی، فعالیت پمپ برون ریز در درصد کمی از جدایه‌ها وجود دارد؛ بنابراین، پمپ‌های برون ریز در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین در اشرشیاکلی نقش کوچکی ایفا می‌کنند.

کلید واژه‌ها: اشرشیاکلی؛ مقاومت دارویی میکروبی؛ سیپروفلوکساسین.

اگرچه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

رؤیا چگنه لریستانی؛ گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
lorestani25@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۱۴

تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۱۳

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Akya A, Chegeneh Lorestani R, Elahi A. Effect of AcrAB efflux pump on ciprofloxacin resistance rate in *Escherichia coli* isolates. Qom Univ Med Sci J 2018;11(12):1-9. [Full Text in Persian]

مقدمه

/شرشیاکلی، شایع‌ترین باکتری عامل عفونت مجرای ادراری (Urinary Tract Infection, UTI) است. در سال‌های اخیر به علت مقاومت این باکتری به داروهای گروه بتالاکتام به واسطه تولید بتالاکتامازهای طیف گسترده (ESBL)، آنتی‌بیوتیک‌های گروه فلوروکینولون به عنوان داروهای جایگزین در درمان عفونت دستگاه ادراری به کار رفته‌اند (۱). روش اثر فلوروکینولون‌ها، مهار سنتز DNA (Deoxyribonucleic acid) باکتریایی با اتصال به آنزیم توپوایزومراز II (DNA ژیراز) و توپوایزومراز IV می‌باشد (۲). اما در سال‌های اخیر مقاومت به فلوروکینولون‌ها در جدایه‌های /شرشیاکلی مولد ESBL روبه افزایش است (۳). مقاومت باکتری‌ها به فلوروکینولون‌ها با چند مکانیسم عمده از جمله موتاسیون در آنزیم‌های توپوایزومراز و فعالیت پمپ‌های برون ریز پدید می‌آید (۲).

با افزایش بیان پمپ‌های برون ریز، عوامل ضدمیکروبی قبل از اینکه به محل هدف خود در درون سلول برسند، از سلول دفع می‌شوند؛ بنابراین ممانعت از تجمع داخل سلولی آنتی‌بیوتیک و در نتیجه بی‌اثر کردن آن اتفاق می‌افتد (۴،۵). اخیراً ایده استفاده از مهارکننده‌های پمپ برون ریز همراه با آنتی‌بیوتیک‌ها برای تقویت تأثیر آن‌ها مطرح شده است (۶). پنج خانواده اصلی از پمپ‌های برون ریز در پروکاریوت‌ها یافت شده که پمپ AcrAB-TolC در طبقه RND (Resistance-Nodulation Division) قرار دارد. سیستم AcrAB به عنوان یک پمپ غالب برون ریز در باکتری‌های گرم منفی و مهم‌ترین پمپ RND شناخته شده است (۷). پروتئین‌های RND در غشای داخلی (AcrB) همراه با ۲ پروتئین دیگر: یکی کانال‌های غشای خارجی (TolC) و دیگری پروتئین پری‌پلاسمیک (AcrA)، یک سیستم پمپ برون ریز سه بخشی را تشکیل می‌دهند. این سیستم چند پروتئینی سبب انتقال انواع مواد ضدباکتریایی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها، رنگ‌ها و پاک‌کننده‌ها به خارج سلول باکتری می‌شوند (۸). سیستم ایفلکس AcrAB می‌تواند مقاومت به فلوروکینولون‌ها، بتالاکتام، تتراسایکلین، کلرامفنیکل و تری‌متوپریم را ایجاد کند (۳). بنابراین، افزایش بیان AcrAB نقش قابل توجهی در مقاومت چنددارویی (Multidrug Resistance, MDR) باکتری‌ها دارد (۹).

مقاومت به فلوروکینولون با واسطه پمپ برون ریز در تعداد زیادی از باکتری‌های گرم منفی و مثبت گزارش شده است (۱۰،۱۱). فعالیت پمپ‌های برون ریز در خارج کردن فلوروکینولون‌ها از سیتوپلاسم باکتری در شرایط آزمایشگاهی به وسیله مهارکننده‌هایی مثل کربونیل سیانید m-کلروفنیل هیدرازون (CCCP) مهار می‌شود (۱۲). مهارکننده 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 و در نتیجه پمپ‌هایی را که از انرژی پروتونی استفاده کرده‌اند، مهار می‌کند (۱۳). هدف از این مطالعه بررسی حضور سیستم پمپ برون ریز AcrAB و تعیین اثر آن‌ها در میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه‌های /شرشیاکلی مولد ESBL بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، تعداد ۲۴۰ جدایه /شرشیاکلی از نمونه‌های ادراری بیماران سرپایی مراجعه‌کننده به ۲ مرکز پزشکی (آزمایشگاه مرکزی و کلینیک ویژه دانشگاه) در شهر کرمانشاه طی سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۲ جمع‌آوری شد. نمونه میانی ادرار (Mid Stream Clean Catch) در ظرف‌های استریل جمع‌آوری و بر روی محیط‌های اختصاصی EMB و بلاد آگار (Merck, Germany) با استفاده از لوپ استاندارد کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند، سپس تعداد کلنی‌ها، شمارش و وجود تعداد ۱۰^۵ یا بیشتر کلنی باکتری در هر میلی‌لیتر حجم ادرار افراد مشکوک به عفونت ادراری، عفونت در نظر گرفته شد (۱۴). مواردی که علائم بالینی نداشتند، از مطالعه حذف شدند. از طرفی، اطلاعات بیماران از طریق تکمیل پرسشنامه و مصاحبه با بیمار یا خانواده وی (از نظر جنس، سن، سابقه عفونت ادراری، سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک، بیماری زمینه و سابقه بستری در بیمارستان) بررسی گردید. پس از جمع‌آوری نمونه‌های ادراری، سویه‌های /شرشیاکلی براساس روش استاندارد و با استفاده از واکنش گرم، ریخت‌شناسی، خصوصیات کشت و تست‌های تکمیلی بیوشیمیایی متداول (اکسیداز، سیمون-سیترات، اوره‌آز، فنیل آلانین دامیناز،

لیزین دکربوکسیلاز، MRVP، TSI، SIM) شناسایی و جداسازی شدند (۱۵).

برای تشخیص جدایه‌های مولد ESBL از میان کل جدایه‌ها، از تست فنوتیپی تأییدی (Phenotypic Confirmatory Tests) استفاده گردید. در این روش از دیسک‌های ترکیبی شامل: سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم) + اسید کلاولانیک (۱۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) + اسید کلاولانیک (۱۰ میکروگرم) (MAST (England, Merseyside) استفاده شد. در صورتی که قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف دیسک ترکیبی، حداقل ۵ میلی‌متر یا بیشتر از قطر هاله عدم رشد دیسک منفرد همان آنتی‌بیوتیک بود، به‌عنوان جدایه مولد ESBL در نظر گرفته می‌شد (۱۶). از سویه استاندارد *E. coli* ATCC 35218، به‌منظور کنترل کیفی جدایه‌های مولد ESBL استفاده شد. بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به‌وسیله روش دیسک دیفیوژن طبق دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شرکت (MAST (England, Merseyside) شامل: ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، آزترونام (۳۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، تویرامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیروفلوکساسین (۵ میکروگرم) و کوتریموکسازول (۲۵ میکروگرم) انجام گرفت؛ درضمن از سویه استاندارد *E. coli* ATCC 25922 جهت کنترل کیفی استفاده گردید.

براساس دستورالعمل CLSI، جدایه‌های /شرشیا کلی با قطر هاله عدم رشد ≤ 15 میلی‌متر برای سیروفلوکساسین به‌عنوان جدایه‌های مقاوم گزارش شدند. تمام جدایه‌های مقاوم به سیروفلوکساسین برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده سیروفلوکساسین به‌وسیله روش آگار دایلوژن، طبق دستورالعمل CLSI ارزیابی شدند (۱۶). DNA جدایه‌ها به روش جوشانیدن (Boiling) استخراج گردید (۱۷) و ژن‌های *acrA* و *acrB* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (سیناکلون، تهران) تکثیر شدند. جدول شماره ۱ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده را نشان می‌دهد (۱۸، ۱۹). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس شرکت سیناکلون، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر DNA باکتری و بقیه آب مقطر استریل) در طی ۳۰ سیکل شامل: مرحله اولیه باز شدن دو رشته DNA (به‌مدت ۵ دقیقه، دمای ۹۴ درجه سانتیگراد)، مرحله باز شدن دو رشته DNA (۱ دقیقه، دمای ۹۴ درجه سانتیگراد)، مرحله اتصال پرایمرها (۱ دقیقه، دمای ۵۷ درجه سانتیگراد) برای ژن‌های *acrA* و *acrB*، مرحله طولیل شدن رشته هدف (به‌مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد) و مرحله طولیل شدن نهایی (به‌مدت ۵ دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد) انجام شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BioRad, USA)، انجام و برای هر ژن یک کنترل مثبت در نظر گرفته شد. محصول PCR بر روی آگارز ۱٪، الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و در نهایت، با دستگاه ژل‌داک (Gel-Documentation, BioRad) با استفاده از اشعه UV مورد بررسی قرار گرفت.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده و اندازه محصولات PCR

ژن	توالی پرایمر (۵' به ۳')	اندازه محصول (bp)	منبع
<i>acrA</i>	5'-ATGAACAAAAACAGAGG-3' 5'-TTTCAACGGCAGTTTTTCG-3'	۴۹۵	(۱۸)
<i>acrB</i>	5'-GGTCGATTCCGTTCTCCGTTA-3' 5'-CTACCTGGAAGTAAACGTCATTGGT-3'	۱۰۷	(۱۹)

در ابتدا جهت تعیین حداقل غلظت مهارکننده سیروفلوکساسین در میان جدایه‌های مقاوم به سیروفلوکساسین، غلظت‌های مختلفی از ۰/۱۵-۱۰۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱۷ رقت مختلف) از آنتی‌بیوتیک سیروفلوکساسین، طبق دستورالعمل CLSI در محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه گردید.

عملکرد پمپ‌های برون ریز به‌وسیله مقایسه حداقل غلظت مهارکننده سیروفلوکساسین در میان جدایه‌های مقاوم به سیروفلوکساسین، قبل و بعد از استفاده CCCP (Sigma, USA) به‌عنوان مهارکننده پمپ‌های برون ریز با روش آگار دایلوژن بررسی شدند.

۵۰ سال به بالا (>۵۰)، که بیشترین مورد جدا شده در این گروه سنی بود، قرار داشتند.

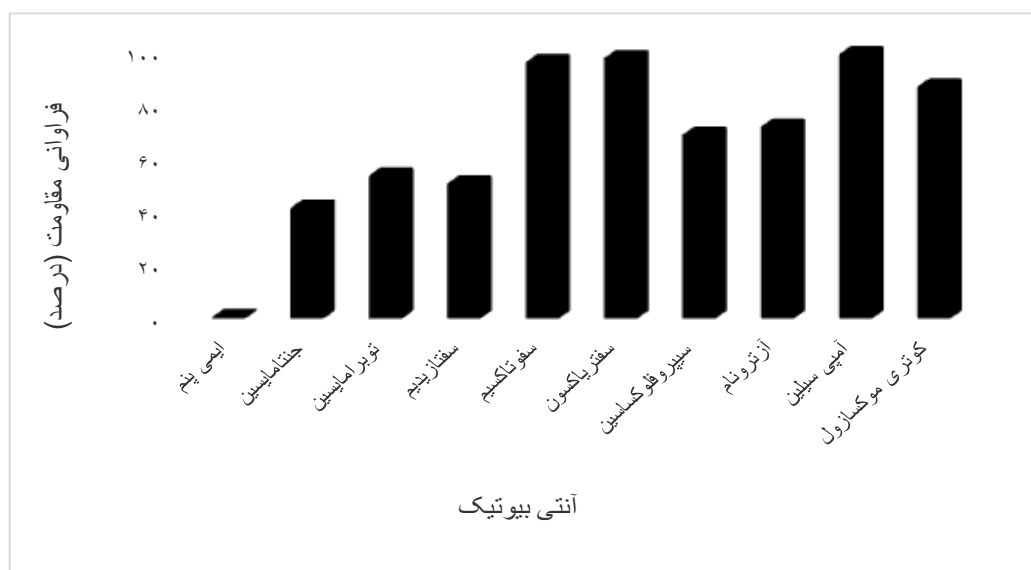
نتایج حاصل از مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها نشان داد بیشترین میزان مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین، سفتریاکسون، سفوتاکسیم و کمترین میزان مقاومت نسبت به ایمی‌پنم است (نمودار شماره ۱). تعداد ۴۵ جدایه (۶۸/۱٪) به سیروفلوکساسین مقاوم بودند و مقاومت بالایی نیز به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله ۹۷٪ به آمپی‌سیلین و سفتریاکسون، ۹۵٪ به سفوتاکسیم، ۸۲٪ به کوتریموکسازول، ۷۵٪ به آزترونام، ۶۲٪ به سفنازیدیم و توبرامایسین و ۴۶٪ به جنتامایسین از خود نشان دادند. بالاترین میزان مقاومت به سیروفلوکساسین در رده سنی بالاتر از ۵۰ سال مشاهده گردید. در مطالعه حاضر از ۶۶ جدایه مورد بررسی، ۶۵ جدایه (۹۸/۵٪) حداقل به سه گروه آنتی‌بیوتیکی مقاوم بودند؛ بنابراین به عنوان مقاومت چنددارویی در نظر گرفته شدند. نتایج حداقل غلظت مهارکننده سیروفلوکساسین نشان داد از ۶۶ جدایه، تعداد ۴۵ (۶۸/۱٪) جدایه مقاوم، ۱ جدایه (۱/۵٪) نیمه حساس و ۲۰ جدایه (۳۰/۳٪) حساس به سیروفلوکساسین بوده‌اند (نمودار شماره ۲). بالاترین میزان حداقل غلظت مهارکننده در جدایه‌های مقاوم، ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین در این ۶۶ جدایه مولد ESBL، مقدار MIC50 و MIC90 به ترتیب ۶۴ و ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

از کشت تازه ۱۸-۱۶ ساعته جدایه‌ها، سوسپانسیون معادل ۰/۵ مک‌فارلند تهیه و تعداد CFU^۴ ۱۰ از سوسپانسیون باکتری روی سطح پلیت مولر هیتون آگار حاوی غلظت‌های مختلف از آنتی‌بیوتیک به صورت نقطه‌ای کشت داده شد و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸-۱۶ ساعت انکوبه شدند. سپس این آزمایش یک‌بار دیگر برای جدایه‌ها با افزودن مهارکننده CCCP (با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به محیط مولر هیتون آگار حاوی سیروفلوکساسین انجام شد. نتایج حداقل غلظت مهارکننده جدایه‌ها در حضور و غیاب مهارکننده CCCP مقایسه گردید. از پلیت محتوی CCCP بدون آنتی‌بیوتیک به عنوان کنترل استفاده شد.

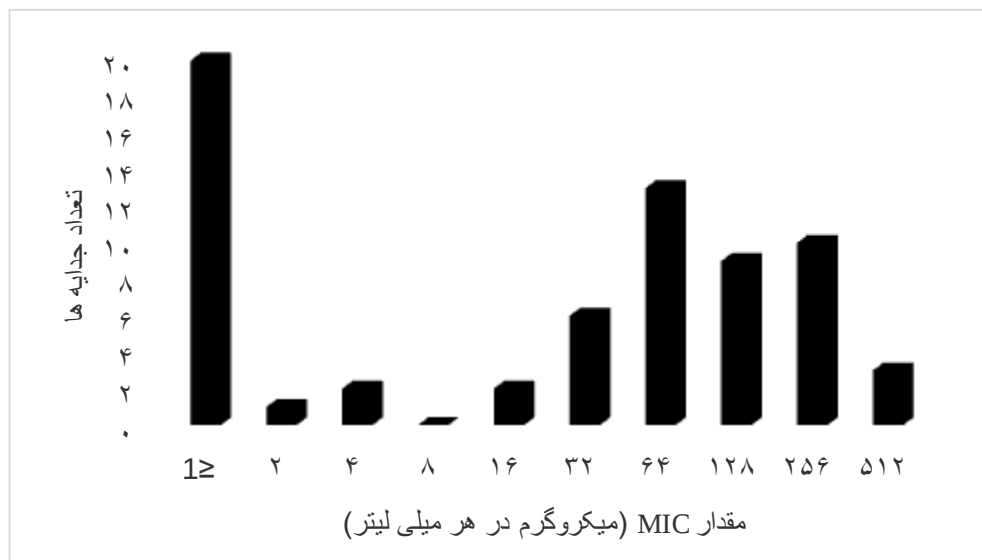
داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و آزمون کای‌دو آنالیز شدند. سطح معنی‌داری، کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از میان کل جدایه‌های *شرشیاکلی*، تعداد ۶۶ جدایه (۲۷/۵٪) مولد ESBL {شامل: ۵۷ نفر زن (۸۶/۴٪) و ۹ نفر مرد (۱۳/۶٪)} بودند. میانگین سنی بیماران، ۴۳/۵±۲۲/۱ سال و ماکزیم سن، ۹۷ سال و می‌نیم سن، ۱ سال بود. از نظر توزیع سنی بیماران مورد بررسی، ۵ نفر (۷/۷٪) در گروه سنی ۱-۱۰ سال، ۷ نفر (۱۰/۶۰٪) ۱۱-۲۰ سال، ۶ نفر (۹/۰۹٪) ۲۱-۳۰ سال، ۸ نفر (۱۲/۱۲٪) ۳۱-۴۰ سال، ۱۴ نفر (۲۱/۲۱٪) ۴۱-۵۰ سال و ۲۶ نفر (۳۹/۳۹٪) در گروه سنی



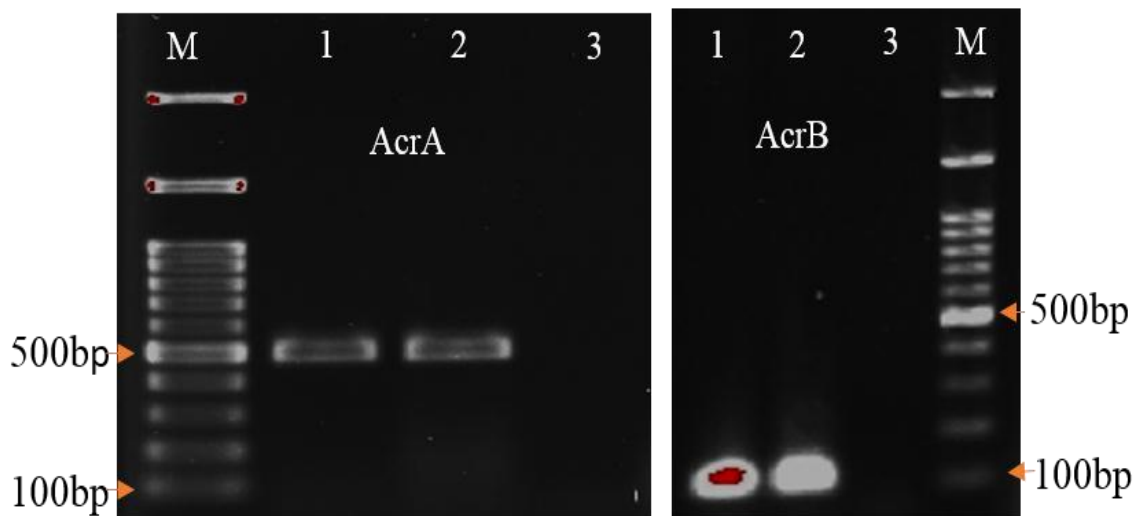
نمودار شماره ۱: مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۶۶ جدایه *شرشیاکلی* مولد بتالاکتام‌های طیف گسترده به روش انتشار دیسک.



نمودار شماره ۲: توزیع جدایه‌های *شرشیاکلی* مولد ESBL بر حسب مقدار MIC (میکروگرم بر میلی لیتر) برای سیپروفلوکساسین.

جدایه‌های *شرشیاکلی* مقاوم به سیپروفلوکساسین نشان داد (شکل).

نتایج PCR وجود هر دو ژن *acrA* و *acrB* را در تمام



شکل: الکتروفورز محصول PCR برای ژن‌های *acrAB*.

ردیف M: مارکر (DNA Ladder, 100bp); ردیف ۱: کنترل مثبت؛ ردیف ۲: *AcrA*، *AcrB* و ردیف ۳: کنترل منفی.

۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر CCCP را داشته‌اند. در میان این جدایه‌ها، ۵ جدایه کاهش ۲ برابری، ۱ جدایه کاهش ۴ برابری و ۱ جدایه کاهش ۱۶ برابری در مقدار حداقل غلظت مهارکننده نشان دادند. میزان کاهش حداقل غلظت مهارکننده در هیچ کدام از ۷ جدایه به حد تغییر حالت از مقاوم به حساس نبود (جدول شماره ۲). در تعداد ۳۸ جدایه از ۴۵ جدایه مقاوم، تغییری در مقدار حداقل غلظت مهارکننده، قبل و بعد از استفاده از CCCP مشاهده

مقدار حداقل غلظت مهارکننده در میان جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین در حضور ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از CCCP، به عنوان مهارکننده پمپ ترشحی در جهت ارزیابی فعالیت پمپ *AcrAB* در مقاومت به سیپروفلوکساسین تعیین شد. مقایسه مقدار حداقل غلظت مهارکننده با و بدون حضور CCCP نشان داد ۷ جدایه (۱۵/۵٪) از ۴۵ جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین، کاهش ۲-۱۶ برابری در میزان حداقل غلظت مهارکننده بعد از استفاده از

جدول شماره ۲: اثر مهارکننده CCCP بر روی حداقل غلظت مهارکننده جدایه‌های مقاوم به سیروفلوکساسین

کد جدایه‌ها	MIC (میکروگرم بر میلی لیتر)	
	بدون CCCP	با CCCP
۱۲۲	۲۵۶	۶۴
۱۳۷	۳۲	۱۶
۱۴۰	۲۵۶	۱۶
۴	۶۴	۳۲
۲۴۲	۶۴	۳۲
۱۹۷	۳۲	۱۶
۱۸۰	۳۲	۱۶

نشاد بین حضور ژن‌های *AcrA*، *AcrB* و میزان مقاومت به سیروفلوکساسین در اثر پمپ‌های برون ریز، ارتباط معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$).

بحث

مطالعات نشان می‌دهند باکتری‌های مولد ESBL با داشتن ژن‌های مختلف، همزمان به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله فلوروکینولون‌ها مقاوم هستند (۲۱، ۲۰). سیستم پمپ برون ریز، یکی از مکانیسم‌های مقاومت به کینولون‌ها در اعضای خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد (۳). طبق مطالعات قبلی، این سیستم بعد از اینکه باکتری در معرض آنتی‌بیوتیک قرار گرفت بیشترین فعالیت را دارد (۳). نتایج مطالعه حاضر، نشان‌دهنده میزان بالای مقاومت (۹۸٪) به سیروفلوکساسین در جدایه‌های *اشرشیاکلی* مولد ESBL بود، همچنین ۹۸٪ از جدایه‌های مولد ESBL، حداقل به ۳ گروه آنتی‌بیوتیکی مقاوم بودند که یکی از دلایل این پدیده می‌تواند تجویز غیرمنطقی آنتی‌بیوتیک‌ها در منطقه مورد بررسی باشد.

سیستم ایفلکس پمپ AcrAB، یکی از مکانیسم‌های اصلی مقاومت به کینولون‌ها است. تحقیقات فنوتیپی و ژنوتیپی نشان می‌دهد پمپ‌های برون ریز نقش مهمی در مقاومت باکتری‌ها به فلوروکینولون‌ها دارند (۲۴-۲۲). یکی از روش‌های فنوتیپی جهت ارزیابی نقش پمپ‌های برون ریز در ایجاد مقاومت به سیروفلوکساسین، استفاده از $\text{Pa}\beta\text{N}$ (فیل آلانین آرژنین بتا نفتیل آمید) و CCCP به عنوان مهارکننده‌های پمپ‌های برون ریز به وسیله تغییرات در سطح حداقل غلظت مهارکننده است (۲۴، ۱۲، ۳).

در مطالعه حاضر همانند پژوهش پاکزاد، اثر غلظت ثابت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از CCCP روی حداقل غلظت مهارکننده سیروفلوکساسین ارزیابی شد (۱۸). در مطالعه حاضر باوجود حضور هر دو ژن *acrA* و *acrB* در تمام جدایه‌های *اشرشیاکلی* مقاوم به سیروفلوکساسین که با نتایج مطالعه پاکزاد و همکاران که در آن حضور ژن *acrA* در تمام جدایه‌های مقاوم به سیروفلوکساسین گزارش شده بود، همخوانی داشت (۱۸)، اما فقط درصد کمی (۱۵/۵٪) از آن‌ها با مهارکننده CCCP، کاهش در میزان حداقل غلظت مهارکننده سیروفلوکساسین را نشان دادند که احتمالاً این ژن‌ها در همه جدایه‌ها یکسان بیان نشده و یا تعداد آن‌ها متفاوت بوده است و در نتیجه، فعالیت آن‌ها در برخی جدایه‌ها در ایجاد مقاومت به فلوروکینولون‌ها بارز نیست.

در مطالعه‌ای که پاکزاد و همکاران انجام دادند ۴۷/۵٪ از جدایه‌های *کلبدیلا پنومونیه*، کاهش در میزان حداقل غلظت مهارکننده با حضور مهارکننده CCCP داشتند (۱۸). در مطالعه Hasdemir در ترکیه، ۳۹٪ جدایه‌های *کلبدیلا پنومونیه*، پمپ‌های برون ریز فعال داشتند (۲۴). همچنین در مطالعه دیگری از همین کشور توسط Yedekci در ۳۹/۶٪ جدایه‌های *اشرشیاکلی*، مقدار حداقل غلظت مهارکننده با حضور مهارکننده $\text{P}\beta\text{NA}$ کاهش یافت (۳). در مطالعه‌ای در چین توسط Zhong و همکاران، ۵۰٪ از جدایه‌های *کلبدیلا پنومونیه* در حضور مهارکننده CCCP کاهش در مقدار حداقل غلظت مهارکننده را نشان دادند (۲۵). نتایج این مطالعات در مقایسه با یافته‌های مطالعه حاضر، کاهش بیشتری در مقاومت جدایه‌ها نسبت به سیروفلوکساسین به وسیله مهارکننده‌های پمپ‌های برون ریز نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد در مطالعه حاضر پمپ‌های برون ریز در جدایه‌های *اشرشیاکلی*

جدایه‌های /شرشیاکلی، نتایج مهار پمپ برون‌ریز، نشان‌دهنده فعالیت آن‌ها در درصد کمی (۱۵/۵٪) از جدایه‌ها بوده است؛ بنابراین در ایجاد این میزان مقاومت بالا در اکثر جدایه‌ها، مکانیسم‌های دیگر مقاومت به کینولون‌ها نقش دارند. بر این اساس استفاده از مهارکننده پمپ‌های برون‌ریز همراه آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند تا حدی تقویت‌کننده اثر آنتی‌بیوتیک‌ها باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کارکنان آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی کرمانشاه تقدیر و تشکر می‌گردد.

نقش کمکی در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین داشته و احتمالاً دیگر مکانیسم‌های مقاومت به فلوروکینولون‌ها از جمله تجمع موتاسیون در آنزیم‌های هدف فلوروکینولون‌ها مثل DNA ژیراز و توپوایزومراز IV، کاهش تجمع داخل سلولی دارد (به علت کاهش بیان پورین‌های غشای خارجی) و در سال‌های اخیر ژن‌های مقاومت به کینولون‌ها وابسته به پلاسمید (PMQR)، در مقاومت به این گروه آنتی‌بیوتیکی نقش داشته‌اند (۲۷،۲۶،۲).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد باوجود بالا بودن میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین و حضور هر دو ژن *acrA* و *acrB* در اکثر

References:

- Gallini A, Degris E, Desplas M, Bourrel R, Archambaud M, Montastruc JL, et al. Influence of fluoroquinolone consumption in inpatients and outpatients on ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in a university hospital. J Antimicrob Chemother 2010;65(12):2650-7.
- Hooper DC. Emerging Mechanism of fluoroquinolone Resistance. Emerg Infect Dis 2001;7(2):337-41.
- Yedekci S, Erac B, Limoncu MH. Detection of the efflux pump-mediated quinolone resistance in ESBL positive *Escherichia coli* and *Klrsiella pneumonia* isolates by phe-Arg-beta naphthylamide. Turk J Pharm Sci 2012;9(1):67-74.
- Koronakis V. TolC-the bacterial exit duct for proteins and drugs. FEBS Lett 2003;555(1):66-71.
- Levy SB. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. J Appl Microbiol 2002;92 Suppl:65S-71S.
- Stavri M, Piddock LJ, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. J Antimicrob Chemother 2007;59(6):1247-60.
- Peleg AY, Adams J, Paterson DL. Tigecycline Efflux as a Mechanism for Nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2007;51(6):2065-9.
- Blair JMA, Piddock LJV. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. Curr Opin Microbiol 2009;12(5):512-9.
- Nikaido H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. Clin Infect Dis 1998;27 Suppl 1:S32-41.
- Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother 2005;56(1):20-51.
- Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(9): 2233-41.
- Aathithan S, French GL. Prevalence and role of efflux pump activity in ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011;30(6):745-52.

13. Dostvandi S, Abiri R, Mohajeri P, Alvandi A. Genotypic and phenotypic characteristics of efflux pumps in *Acinetobacter spp.* isolated from inpatients. J Mazandaran Univ Med Sci 2015;25(126):1-10. [Full Text in Persian]
14. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al. Harrison's principles of internal medicine. 17th ed. New York: McGraw-Hill; 2008.
15. Washington C, Stephen A, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P. Koneman's Color Atlas and Textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. New York: Lippincott, Williams&Wilkins; 2006. p. 775-79.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 2013.
17. Ogbolu DO, Terry Alli OA, Olanipekun LB, Ojo OI, Makinde OO. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing commensal *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from hospital out-patients in Southern Nigeria. Int J Med Med Sci 2013;5(3):97-105.
18. Pakzad I, Zayyen Karin M, Taherikalani M, Boustanshenas M, Lari AR. Contribution of AcrAB efflux pump to ciprofloxacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from burn patients. GMS Hyg Infect Control 2013;8(2):Doc15.
19. Swick MC, Morgan-Linnell SK, Carlson KM, Zechiedrich L. Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. Antimicrob Agents Chemother 2011;55(2):921-4.
20. Eftekhari F, Rastegar M, Gholipour M, Mansoursamaei N. Detection of extended spectrum b-lactamases in urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae* in relation to blaSHV, blaTEM and blaCTX-M gene carriage. Iran J Public Health 2012;41(3):127-32.
21. Raei F, Eftekhari F, Feizabadi MM. Prevalence of quinolone resistance among extended-spectrum β -Lactamase producing uropathogenic *Klebsiella pneumoniae*. Jundishapur J Microbiol 2014;7(6):e10887.
22. Mazzariol A, Zuliani J, Cornaglia G, Rossolini GM, Fontana R. AcrAB Efflux System: Expression and contribution to fluoroquinolone resistance in *Klebsiella spp.* Antimicrob Agents Chemother 2002;46(12):3984-6.
23. Mazzariol A, Tokue Y, Kanegawa TM, Cornaglia G, Nikaido H. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. Antimicrob Agents Chemother 2000;44(12):3441-3.
24. Hasdemir UO, Chevalier J, 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;42(6):2701-6.
25. 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(9):837-43.
26. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: Target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J Antimicrob Chemother 2003;51(5):1109-17.
27. Goudarzi M, Fazeli M, Azad M, Seyedjavadi SS. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from patients with nosocomial urinary tract infection in Tehran, Iran. Iran J Public Health 2017;46(9):1285-91.