Qom University of Medical Sciences Journal

2023. Volume 17

Research Paper

Frequency of Plasmid-mediated Quinolone Resistance in Citrobacter Isolated From Urinary Tract Infection

Alisha Akiya[1], Azam Elahi[1], Somayeh Jafari[2], Roya Chegane Lorestani[1], Mosayeb Rostamian[1], *Etrat Javadirad[3*]

1. Infectious Diseases Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
2. Development and Clinical Research Unit, Imam Reza Hospital, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
3. Department of Pathology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Akiya A, Elahi A, Jafari S, Chegane Lorestani R, Rostamian M, Javadirad E. Frequency of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Citrobacter Isolated From Urinary Tract Infection. Qom Univ Med Sci J. 2023; 17:E2784.2. https://doi.org/10.32598/qums.17.2784.2

doi https://doi.org/10.32598/qums.17.2784.2

Received: 07 Dec 2022

Accepted: 09 May 2023

Available Online: ???

Keywords:
Citrobacter, Fluoroquinolones, Plasmids

ABSTRACT

Background and Objectives Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) plays an essential role in developing resistance to quinolones. This study aimed to investigate the presence and effect of PMQR genes in clinical isolates of Citrobacter from urinary tract infections.

Methods Fifty-one citrobacter isolates were found in urinary samples of patients referred to Imam Reza Hospital in Kermanshah City, Iran, in 2019. The susceptibility to antibiotics was determined by disk diffusion and broth microdilution methods. The *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac (6 ')-Ib*, and *qepA* genes of isolates were detected by the polymerase chain reaction (PCR) method. Then, the PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) method was used to differentiate the *aac (6')-Ib* gene from its *aac (6')-Ib-cr* variant. The obtained data were analyzed using the chi-square and Mann-Whitney statistical methods.

Results The highest resistance of isolates was seen against cefazolin (74.5%), ciprofloxacin (41.2%), and cotrimoxazole (35.3%). More than 80% of isolates were susceptible to carbapenems, gentamicin, and piperacillin/tazobactam. The frequency of qnr genes in isolates was 41.5%. The *qnrB* gene was the most frequent (43.2%), followed by *qnrS* (5.9%) and *qnrA* (1.9%). The *aac (6') -Ib* gene was found in 27.5% of the isolates; all were *aac (6')-Ib-cr*. The *qepA* gene was not found in any isolate.

Conclusion The results of this study indicate the importance of Citrobacter freundii as an agent of urinary tract infection and its high resistance to ciprofloxacin. PMQR genes are highly prevalent in Citrobacter isolates, and there is a significant correlation between the *qnrB* and *qnrS* genes with the increased minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin. Therefore, antibiotic susceptibility should be performed before treating Citrobacter urinary tract infections.

**** Corresponding Author:***

Etrat Javadirad

Address: Department of Pathology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

Tel: +98 (918) 8369902

E-Mail: pathologist84@yahoo.com

Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license(https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).
Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Extended Abstract

Introduction

Citrobacter genus has been recognized as an opportunistic pathogen causing hospital-acquired infections. The significance of these bacteria in causing hospital infections with high antibiotic resistance is notable. Fluoroquinolones are antibiotics with broad-spectrum antimicrobial activity. However, their extensive use has led to high resistance levels, especially in gram-negative bacteria. Resistance to fluoroquinolones in citrobacter species mainly occurs due to mutations in chromosomal genes encoding DNA gyrase and topoisomerase IV or through efflux pumps. However, recent studies have shown that resistance to quinolones may also arise through plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes. Horizontal transfer of plasmids carrying PMQR genes and accumulation of mutations in chromosomal genes significantly increase resistance to quinolones. PMQR genes have been reported to have varying prevalence worldwide. citrobacter has not been extensively studied as an opportunistic pathogen in many regions, including Iran, and therefore, limited information is available about it. Given the importance of the prevalence of PMQR genes and their association with resistance to fluoroquinolones, this study aimed to investigate the frequency of these genes in citrobacter isolates and their correlation with increased resistance levels.

Methods

In this descriptive study, 51 citrobacter isolates were collected from 280 urine samples of hospitalized patients at Imam Reza (AS) Hospital, Kermanshah City, Iran, in 2019. Mid-stream clean catch samples were collected in sterile containers and cultured on EMB and blood agar (Merck, Germany) media. The plates were then incubated for 24 hours at 37°C. The number of colonies was counted, and if the colony count was $>10^5$ CFU/mL, it was considered a positive urinary tract infection. The standard API 20 kit (BioMerieux, France) was used to identify the genus and species of the bacteria. The susceptibility or resistance of isolates was determined using the disk diffusion (Kirby-Bauer) method on Mueller-Hinton agar and according to the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) standard. MAST antibiotic disks (England, Merseyside) including ceftriaxone (30 µg), cefotaxime (30 µg), cefpodoxime (30 µg), cefotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg), cefazolin (30 µg), cotrimoxazole (25 µg), ertapenem (10 µg), meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), tobramycin (10 µg), gentamicin (20 µg), piperacillin-tazobactam (110 µg), aztreonam (30 µg), and ciprofloxacin (5 µg) were used. Finally, the results were evaluated according to the standard CLSI tables. The minimum inhibitory concentration (MIC) of isolates against ciprofloxacin was determined using the microdilution broth method. The quality control strain for the antibiotic susceptibility test was Escherichia coli ATCC 25922. The MIC of each bacterial strain was considered the lowest antibiotic concentration in a well in which no bacterial growth occurred. Based on the CLSI tables, isolates with MIC≥4, 2≤MIC<4, and MIC≤1 were considered resistant, intermediate, and susceptible to ciprofloxacin, respectively.

The *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* genes were detected using specific primers (CinnaClone, Iran) and polymerase chain reaction (PCR) method. The boiling method was used for DNA extraction. The PCR reaction was performed using a thermal cycler (BioRad, USA). An enzymatic digestion was performed to differentiate the *aac(6')-Ib* gene from its variant *cr-aac(6')-Ib*, associated with quinolone resistance. The PCR product for the aac(6')-Ib gene was digested using the BtsCI enzyme (Fermentas, England). If cut, it would produce fragments of 272-bp and 210-bp, indicating the presence of *aac(6')-Ib*, but if not cut, it would mark the presence of the variant *cr-aac(6')-Ib*.

Results

Out of 280 urine samples, 51 isolates (18.2%) were citrobacter, belonging to 31 female patients (60.8%) and 20 male patients (39.2%). The mean age of patients was 26±6.40 years, with a maximum age of 87 years and a minimum age of less than one year. Of 51 citrobacter isolates, 39(76.5%) were *Citrobacter Freundii,* 7(13.7%) were *C. koseri*, and 5(8.9%) were *C. braakii*. The resistance rate to sulfazol, ciprofloxacin, and cotrimoxazole was 74.5%, 41.2%, and 35.3%, respectively. >80% of isolates were sensitive to carbapenems, piperacillin/tazobactam, and gentamicin. Respectively, 21 isolates (41.2%), 1 isolate (9.1%), and 29 isolates (56.9%) were resistant, intermediate, and susceptible to ciprofloxacin. The MIC of isolates against ciprofloxacin was also determined. In most isolates, the resistance level to ciprofloxacin was high MIC (≥64 µg/mL).

The size of the PCR products for *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*, and *qep*A genes were 516, 469, 417, 482, and 720 base pairs, respectively. Among the 51 citrobacter isolates, 22 isolates (2.43%) had *qnr* genes, including *qnrB* in 22 (5.41%), *qnrS* in 3 (9.5%), and *qnrA* in one isolate (9.1%). Fourteen isolates (27.5%) carried the *aac(6')-Ib* gene; all were the variant cr. The *qepA* gene was not de-

tected in any of the isolates. Regarding the relationship between the *aac(6')-Ib-cr* gene and ciprofloxacin resistance, 64.3% of isolates with this gene were resistant to ciprofloxacin. In comparison, 32.4% of isolates without this gene were resistant, which was statistically significant (P=0.039). Additionally, statistically significant positive correlations were observed between the presence of *qnrB* and *qnrS* genes and ciprofloxacin resistance. Among the 25 isolates with PMQR, 12(48%) isolates had a high MIC (≥64 µg/mL) for ciprofloxacin, while only 3(11.5%) of the 26 isolates without PMQR genes had an MIC of 64 µg/mL or higher for ciprofloxacin. Statistical analysis showed a significant relationship between increased MIC of ciprofloxacin and the presence of PMQR genes (P=0.02). Additionally, statistically, the mean MIC of ciprofloxacin in isolates with qnr genes was higher than the mean MIC in isolates without qnr genes (P=0.001). The mean MIC of ciprofloxacin in isolates with the *aac(6')-Ib-cr* gene was also higher than the mean MIC of isolates without this gene (P=0.001).

Conclusion

The results of this study indicate the importance of *C. freundii* as a pathogen of urinary tract infection and its high resistance to ciprofloxacin. PMQR genes are highly prevalent in citrobacter isolates, and there is a significant correlation between the *qnrB* and *qnrS* genes with the increased MIC of ciprofloxacin. Therefore, antibiotic susceptibility should be performed before treatment of citrobacter-causing urinary tract infection.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

The present study was conducted after obtaining ethical approval from the Ethics Committee of Kermanshah University of Medical Sciences (Code: IR. KUMS. REC.1395.241).

Funding

This study financially supported by Kermanshah University of Medical Sciences.

Authors contributions

All authors equally contributed to preparing this article.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Imam Reza (AS) Hospital, Kermanshah City and all participants for their cooperation.

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

مقاله پژوهشی

فراوانی ژن‌های مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید در سیتروباکترهای جداشده از نمونه‌های ادرار

علی‌شا اکیا[۱]، اعظم الهی[۱]، سمیه جعفری[۲]، رؤیا چگنه لرستانی[۱]، مصیب رستمیان[۱]، *عترت جوادی راد[۳]

۱. مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی ،پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم‌پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۲. واحد توسعه و تحقیقات بالینی بیمارستان امام رضا، دانشگاه علوم‌پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.
۳. گروه آسیب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Akiya A, Elahi A, Jafari S, Chegane Lorestani R, Rostamian M, Javadirad E. Frequency of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Citrobacter Isolated From Urinary Tract Infection. Qom Univ Med Sci J. 2023; 17:E2784.2. https://doi.org/10.32598/qums.17.2784.2

doi https://doi.org/10.32598/qums.17.2784.2

تاریخ دریافت: ۱۶ آذر ۱۴۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۹ اردیبهشت ۱۴۰۲
تاریخ انتشار: ؟؟؟

چکیده

زمینه و هدف مقاومت کینولون با واسطه پلاسمید (PMQR) نقش مهمی در ایجاد مقاومت به کینولون‌ها دارد. هدف این مطالعه بررسی حضور و تأثیر ژن‌های PMQR در جدایه‌های بالینی سیتروباکتر از عفونت ادراری بود.

روش بررسی ۵۱ سیتروباکتر از نمونه‌های ادراری بیماران در بیمارستان امام رضا در شهر کرمانشاه در سال ۱۳۹۹ جدا شدند. حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش‌های دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن براث تعیین شد. ژن‌های aac (6′)-Ib، qnrS، qnrB، qnrA و qepA جدایه‌ها با PCR مشخص شد. روش PCR-RFLP جهت تمایز ژن aac (6′)-Ib از واریانت آن، aac (6′)-Ib-cr به کار رفت. داده‌ها با روش‌های آماری کای دو و من‌ویتنی تحلیل شدند.

یافته‌ها بیشترین مقاومت جدایه‌ها برای سفازولین (۷۴/۵ درصد)، سیپروفلوکساسین (۴۱/۲ درصد) و کوتریموکسازول (۳۵/۳ درصد) بود. بیش از ۸۰ درصد جدایه‌ها نسبت به کارباپنم‌ها، جنتامایسین و پیپراسیلین / تازوباکتام حساس بودند. فراوانی ژن‌های qnr در جدایه‌ها ۴۳/۲ درصد بود. ژن qnrB فراوان‌ترین (۴۱/۵ درصد) بود و به دنبال آن qnrS (۵/۹ درصد) و qnrA (۱/۹درصد) قرار داشتند. ژن aac(6′)-Ib در ۲۷/۵ درصد از جدایه‌ها یافت شد که تمام آن‌ها واریانت aac(6′)-Ib-cr بودند. ژن qepA در هیچ‌کدام از جدایه‌ها یافت نشد.

نتیجه‌گیری نتایج این مطالعه بیانگر اهمیت سیتروباکتر فروندی به‌عنوان عامل عفونت ادراری و میزان مقاومت بالای آن به سیپروفلوکساسین بود. ژن‌های PMQR فراوانی بالایی در جدایه‌های سیتروباکتر داشتند و بین ژن‌های qnrB و qnrS با افزایش میزان حداقل غلظت مهارکننده سیپروفلوکساسین ارتباط معناداری وجود داشت. بنابراین سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی پیش از درمان سیتروباکتر عامل عفونت ادراری، باید صورت گیرد.

کلیدواژه‌ها:
سیتروباکتر،
فلوروکینولون‌ها،
پلاسمیدها

* **نویسنده مسئول:**
عترت جوادی راد
نشانی: کرمانشاه، دانشگاه علوم‌پزشکی کرمانشاه، دانشکده پزشکی، گروه آسیب‌شناسی.
تلفن: ۸۳۶۹۹۰۲ (۹۱۸) ۹۸+
رایانامه: pathologist84@yahoo.com

Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license(https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).
Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

مقدمه

سیتروباکتر به‌عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب و عامل عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده است. گونه‌های مهم آن شامل سیتروباکتر فروندی[1]، سیتروباکتر کوسری[2]، سیتروباکتر امالانتیگوس[3]، سیتروباکتر براکی[4] و سیتروباکتر یانگی[5] هستند [۱]. این گونه‌ها در محیط ازجمله خاک، فاضلاب‌ها و یا به‌صورت فلور نرمال در روده انسان و حیوانات وجود دارند. اما اهمیت این گونه‌ها در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی با مقاومت بالا به آنتی‌بیوتیک‌هاست [۲]. فلوروکینولون‌ها آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که فعالیت ضدمیکروبی گسترده‌ای دارند. اما استفاده وسیع، سطح مقاومت به آن‌ها را به‌ویژه در باکتری‌های گرم منفی بالا برده است [۳].

مقاومت به فلوروکینولون‌ها در انتروباکتریاسه عمدتاً درنتیجه موتاسیون در ژن‌های کروموزومی کدکننده DNA ژیراز و توپوایزومراز IV یا به‌وسیله پمپ‌های برون ریز رخ می‌دهد [۴]. اما تحقیقات اخیر نشان داده که مقاومت به کینولون‌ها ممکن است به واسطه ژن‌های وابسته به پلاسمید[6] نیز ایجاد شود. اولین ژن پلاسمیدی مقاومت به کینولون‌ها در سال ۱۹۹۸ در یک جدایه کلبسیلا پنومونیه در ایالات متحده گزارش شد. به‌تدریج تاکنون ۳ گروه ژنی PMQR شامل aac(6′)-Ib-cr، qnr و qepA شناسایی شده‌اند [۵]. ژن‌های qnr پروتئین‌هایی از خانواده پنتاپپتیدهای تکراری را کد می‌کنند که از اتصال کینولون‌ها به DNA ژیراز و توپوایزومراز IV جلوگیری می‌کنند [۵]. حداقل ۳ خانواده از ژن‌های qnr شامل qnrA، qnrB و qnrS در گونه‌های انتروباکتریاسه در جهان گزارش شده است [۶]. دومین گروه ژنی PMQR یک واریانت از ژن آمینوگلیکوزید استیل ترانسفراز (aac(6′)-Ib-cr) است که با اضافه کردن یک گروه استیل به تعدادی از فلورکینولون‌ها، ازجمله سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین فعالیت آن‌ها را کاهش می‌دهد [۵]. سومین گروه پمپ ویژه برون‌ریز فلوروکینولون‌ها، qepA است که اخیراً گزارش شده و سبب افزایش حداقل غلظت مهارکننده[7] (حداقل غلظت مهارکننده) فلوروکینولون‌های آب‌دوست می‌شود [۵]. انتقال افقی پلاسمیدهایی که ژن‌های PMQR را حمل می‌کنند و تجمع موتاسیون‌ها در ژن‌های کروموزومی نقش مهمی در افزایش مقاومت به کینولون‌ها دارند [۶]. ژن‌های PMQR در جهان با شیوع متفاوت گزارش شده‌اند [۷]. به‌طوری‌که در مطالعه‌ای در کره شیوع ژن‌های qnr در جدایه‌های سیتروباکتر ۳۸/۴ بود [۸]. مطالعه دیگری در چین شیوع ژن‌های qnr و aac(6)-Ib-cr در جدایه‌های بالینی سیتروباکتر را به ترتیب ۷۲/۸ درصد و ۱۱/۶ درصد گزارش کرد [۹] که بیانگر انتشار وسیع این ژن‌هاست.

1. Citrobacter freundii
2. C.koseri
3. C.amalantigus
4. C.braakii
5. C.youngae
6. Plasmid-Mediated Resistance (PMQR)
7. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

هرچند وجود سیتروباکتر از ۲۳/۶ درصد نمونه‌های عفونت ادراری گزارش شده است [۱۰]، سیتروباکتر در بسیاری مناطق، ازجمله ایران، کمتر به‌عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب مورد بررسی قرار گرفته و درنتیجه اطلاعات کمی درمورد آن موجود است. باتوجه‌به اهمیت شیوع ژن‌های PMQR و ارتباط آن‌ها با مقاومت به فلوروکینولون‌ها، این مطالعه با هدف بررسی فراوانی این ژن‌ها در جدایه‌های سیتروباکتر و ارتباط آن‌ها با افزایش میزان مقاومت صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه توصیفی ۵۱ جدایه سیتروباکتر از ۲۸۰ نمونه ادرار از بیماران بستری در بیمارستان امام رضا (ع) در سال ۱۳۹۹ جمع‌آوری شد. نمونه قسمت میانی جریان ادرار[8] در ظرف‌های استریل جمع‌آوری شد و بر روی محیط‌های اختصاصی EMB و آگار خوندار[9] (Merck، Germany) با استفاده از لوپ کالیبره (۰/۰۱ میلی‌لیتر) کشت داده شد و پلیت‌ها ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس تعداد کلنی‌ها شمارش شد و درصورتی‌که تعداد کلنی‌ها بیش از ۱۰۵ در هر میلی لیتر می‌بود عفونت ادراری مثبت تلقی می‌شد [۱۱]. سپس جهت تشخیص جنس و گونه باکتری از کیت استاندارد API ۲۰ (Biomerieux، France) استفاده شد. سویه‌ها جهت آزمایشات بعدی در محیط TSB حاوی ۳۰ درصد گلیسرول، در منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

تعیین حساسیت یا مقاومت جدایه‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (کربی بائر) روی محیط مولر هینتون آگار و براساس استاندارد CLSI[10] استفاده شد [۱۲]. از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شرکت MAST (Merseyside، England) شامل سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفپودوکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفازولین (۳۰ میکروگرم)، کوتری موکسازول (۲۵ میکروگرم)، ارتاپنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۲۰ میکروگرم)، تازوباکتام ـ پیپراسیلین (۱۱۰ میکروگرم)، آزترونام (۳۰ میکروگرم) و سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم) استفاده شد. در پایان نتایج براساس جداول استاندارد CLSI مورد بررسی قرار گرفت. سپس جهت تعیین غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد جدایه‌ها نسبت به سیپروفلوکساسین از روش میکرودایلوشن براث

8. Mid stream clean catch
9. Blood agar
10. Clinical and Laboratory Standard Institute

استفاده شد. ابتدا از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها روی محیط مولر هینتون آگار، رقتی معادل کدورت نیم مک فارلند تهیه و طبق دستور کار CLSI رقیق شد. به‌طوری‌که غلظت نهایی باکتری‌ها در هر چاهک میکروپلیت ۱۰۵ باکتری بود. غلظت‌های متفاوتی از ۰/۰۶ تا ۵۱۲ میکروگرم در هر میلی‌لیتر برای سیپروفلوکساسین تهیه شد. هر چاهک میکروپلیت حاوی حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر شامل محیط کشت، آنتی‌بیوتیک و سوسپانسیون باکتری بود. محیط مولر هینتون براث (Merck، Germany) به همراه باکتری و بدون سیپروفلوکساسین به‌عنوان کنترل مثبت و همچنین محیط مولر هینتون براث به‌تنهایی و بدون باکتری به‌عنوان کنترل منفی به کار رفت. پانل‌ها ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. جهت کنترل کیفی آنتی‌بیوگرام از سویه‌های استاندارد اشرشیاکلی ATCC 25922 استفاده شد. حداقل غلظت مهارکننده هر سویه باکتری کمترین غلظت آنتی‌بیوتیک در چاهکی که باکتری در آن رشد نکرده بود در نظر گرفته شد. بر اساس جداول CLSI، جدایه‌های دارای 4≥MIC، MIC=2، و MIC≤1 برای سیپروفلوکساسین به ترتیب مقاوم، نیمه‌حساس و حساس بودند.

شناسایی ژن‌ها

تشخیص ژن‌های qnrA، qnrB، qnrS، aac(6′)-Ib-cr و qepA با پرایمرهای اختصاصی (سیناکلون، ایران) و به روش PCR انجام شد [۱۳-۱۵] (جدول شماره ۱). جهت استخراج DNA از روش جوشانیدن استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس شرکت سیناکلون، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر و ۲ میکرولیتر DNA باکتری و بقیه آب مقطر استریل) در طی ۳۰ سیکل انجام شد، شامل مرحله اولیه باز شدن ۲ رشته DNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله باز شدن ۲ رشته DNA، ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال پرایمرها ۱ دقیقه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ژن‌های qnrA و qepA، ۵۳ درجه سانتی‌گراد برای qnrB و qnrS و ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای aac(6′)-Ib-cr. مرحله طویل شدن رشته هدف به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و مرحله طویل شدن نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BioRad، USA) انجام و و از جدایه‌های اشرشیاکلی حاوی ژن‌های qnrS، qnrB،qnrA و aac(6′)-Ib به‌عنوان کنترل مثبت و از اشرشیاکلی ATCC25922 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. محصول PCR بر روی آگارز ۱ درصد الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و درنهایت با دستگاه ژل داک (Gel-Documentation BioRad ،USA) بااستفاده از اشعه UV مورد بررسی قرار گرفت. سپس تعدادی از محصولات PCR تعیین توالی (Applied BiosystemABI3130، USA) شدند و نتیجه آن با استفاده از نرم‌افزار BLAST آنالیز شد.

هضم آنزیمی

برای تمایز ژن aac (6′)-Ib از واریانت aac (6′)-Ib-cr آن که در ارتباط با مقاومت به کینولون‌هاست، هضم آنزیمی انجام شد. محصول PCR برای ژن aac (6′)-Ib با آنزیم BtsCI هضم شد (Fermentase, England). در صورت برش آن به قطعات 272-bp و 210-bp، نشان‌دهنده aac (6′)-Ib، اما عدم برش نشان‌دهنده واریانت aac (6′)-Ib-cr بود.

تحلیل آماری

داده‌های حاصل از نتایج آزمایش‌های مختلف همراه مشخصات نمونه‌های موردبررسی در یک فایل اکسل وارد شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ تجزیه‌وتحلیل شد. از تست‌های آماری کای دو و من‌ویتنی برای تحلیل یافته‌ها استفاده شد و مقادیر P کمتر یا مساوی ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

از ۲۸۰ نمونه ادراری، ۵۱ جدایه (۱۸/۲ درصد) سیتروباکتر بودند که متعلق به ۳۱ زن (۶۰/۸ درصد) و ۲۰ (۳۹/۲ درصد) مرد بودند. میانگین سنی بیماران ۲۶±۴۰/۶ سال بود. حداکثر سن ۸۷ سال و حداقل سن زیر یک سال بود. ازنظر توزیع سنی بیماران موردمطالعه، گروه سنی زیر ۲۰ سال، ۱۶ نفر (۳۱/۴ درصد)؛ ۲۱ تا ۴۰ سال، ۱۳ نفر (۲۵/۵ درصد) و گروه سنی بالای ۴۰ سال ۲۲ نفر (۴۳/۱ درصد) بودند. از میان ۵۱ جدایه سیتروباکتر، ۳۹ جدایه (۷۶/۵ درصد) سیتروباکتر فروندی، ۷ جدایه (۱۳/۷ درصد) سیتروباکتر کوسری و ۵ جدایه (۹/۸ درصد) سیتروباکتر براکی بودند. میزان مقاومت نسبت به سفازولین (۷۴/۵ درصد)، سیپروفلوکساسین (۴۱/۲ درصد) و کوتری‌موکسازول (۳۵/۳ درصد) بود. بیش از ۸۰ درصد جدایه‌ها نسبت به کارباپنم‌ها، پیپراسیلین / تازوباکتام و جنتامایسین حساسیت نشان دادند (تصویر شماره ۱). به ترتیب ۲۱ جدایه (۴۱/۲ درصد)، ۱ جدایه (۱/۹ درصد) و ۲۹ جدایه (۵۶/۹ درصد) به ترتیب نسبت به سیپروفلوکساسین مقاوم، نیمه‌حساس و حساس بودند. همچنین میزان حداقل غلظت مهارکننده جدایه‌ها برای سیپروفلوکساسین تعیین شد (تصویر شماره ۲). در بیشتر جدایه‌ها میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین بالا (64≤MIC میکروگرم در هر میلی‌لیتر) بود.

اندازه محصول PCR ژن‌های qnrA، qnrB، qnrS، aac(6′)-Ib و qepA به ترتیب ۵۱۶، ۴۶۹، ۴۱۷، ۴۸۲ و ۷۲۰ جفت باز بود (تصویر شماره ۳). از میان ۵۱ جدایه‌های سیتروباکتر، ۲۲ جدایه (۴۳/۲ درصد) ژن‌های qnr داشتند که شامل qnrB در ۲۲ (۴۱/۵ درصد)، qnrS در ۳ (۵/۹ درصد) و qnrA در ۱ جدایه (۱/۹ درصد) بودند. ۱۴ جدایه (۲۷/۵ درصد) دارای ژن aac (6′)-Ib و همگی واریانت cr بودند. ژن qepA در هیچ‌کدام از جدایه‌ها

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورداستفاده و اندازه محصولات PCR

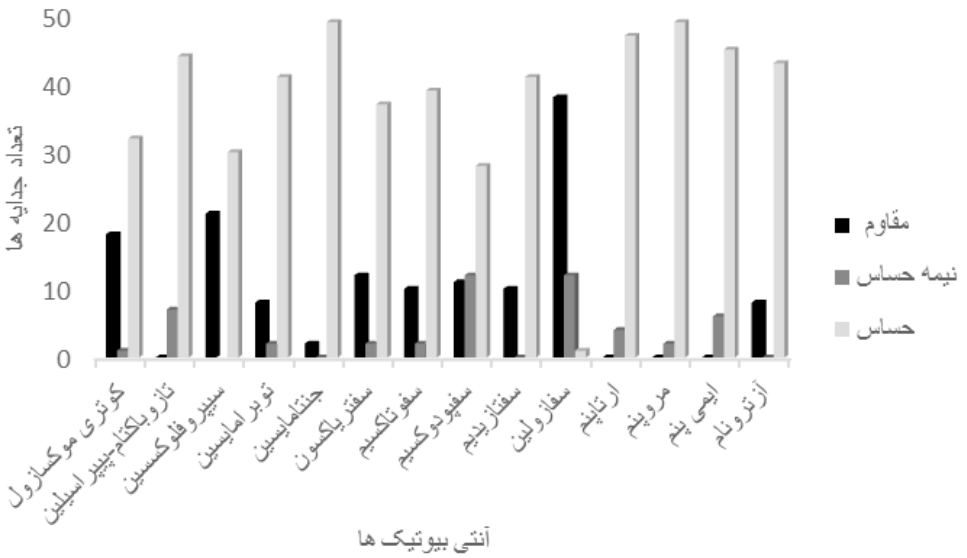
نام ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)
qepA	5´-GGACATCTACGGCTTCTTCG-3´ 5´-AGCTGCAGGTACTGCGTCAT-3´	۷۲۰
qnrA	5´-TCAGCAAGAGGATTTCTCA-3´ 5´-GGCAGCACTATTACTCCCA-3´	۵۱۶
qnrB	5´-GATCGTGAAAGCCAGAAAGG-3´ 5´-ACGATGCCTGGTAGTTGTCC-3´	۴۶۹
qnrS	5´-ACGACATTCGTCAACTGCAA-3´ 5´-TAAATTGGCACCCTGTAGGC-3´	۴۱۷
aac(6´)-Ib	5´-TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA-3´ 5´-CTCGAATGCCTGGCGTGTTT-3´	۴۸۲

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

یافت نشد. ازنظر ارتباط بین ژن aac(6´)-Ib-cr و مقاومت به سیپروفلوکساسین، در جدایه‌های دارای این ژن، ۶۴/۳ درصد به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. درحالی‌که در جدایه‌های فاقد این ژن، ۳۲/۴ درصد مقاوم بودند که ازلحاظ آماری معنی‌دار بود (P=۰/۰۳۹). همچنین ازلحاظ آماری بین حضور ژن qnrB و qnrS با مقاومت به سیپروفلوکساسین ارتباط مثبت و معناداری وجود داشت (جدول شماره ۲).

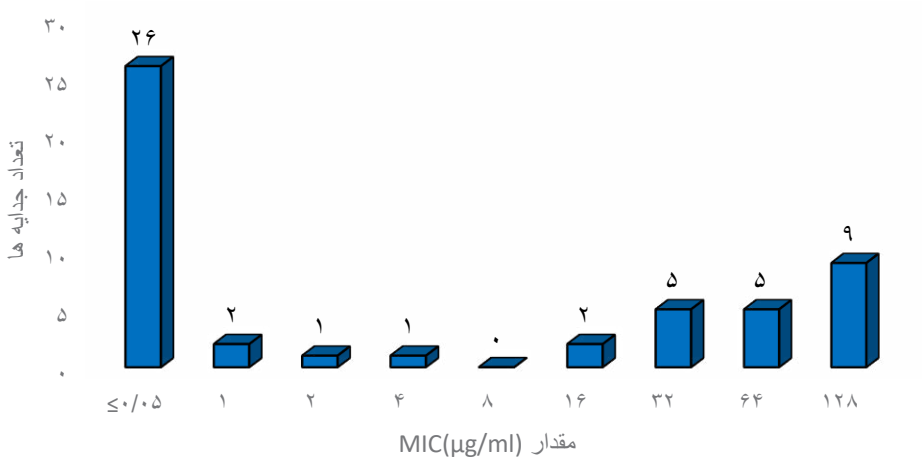
از میان ۲۵ جدایه دارای PMQR، ۱۲ (۴۸ درصد) جدایه دارای حداقل غلظت مهارکننده بالا (64≤MIC میکروگرم در هر میلی‌لیتر) برای سیپروفلوکساسین بودند. درحالی‌که از ۲۶ جدایه فاقد ژن‌های PMQR، فقط ۳ جدایه (۱۱/۵ درصد) برای سیپروفلوکساسین دارای 64≤MIC بودند. آنالیز آماری داده‌های مذکور یک رابطه معنی‌دار بین افزایش حداقل غلظت مهارکننده سیپروفلوکساسین و ژن‌های PMQR را نشان داد (P=۰/۰۲). همچنین ازلحاظ آماری، میانگین حداقل غلظت مهارکننده سیپروفلوکساسین در جدایه‌های دارای ژن‌های qnr، بالاتر از میانگین حداقل غلظت مهارکننده جدایه‌های فاقد ژن‌های qnr بود (P=۰/۰۰۱). میانگین حداقل غلظت مهارکننده سیپروفلوکساسین در جدایه‌های دارای ژن aac(6´)-Ib-cr بالاتر از میانگین حداقل غلظت مهارکننده جدایه‌های فاقد ژن aac(6´)-Ib-cr بود (P=۰/۰۰۱).

اختلاف قابل‌توجهی بین میزان حداقل غلظت مهارکننده جدایه‌های دارای یک ژن مقاومت PMQR با جدایه‌هایی که بیش از یک ژن داشتند وجود نداشت (جدول شماره ۳). اگرچه بیشتر جدایه‌های دارای ژن‌های PMQR نسبت به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و میزان حداقل غلظت مهارکننده آن‌ها نسبت به این آنتی‌بیوتیک بالا بود. اما این ژن‌ها در جدایه‌های حساس به سیپروفلوکساسین نیز وجود داشتند.



تصویر ۱. حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های سیتروباکتر

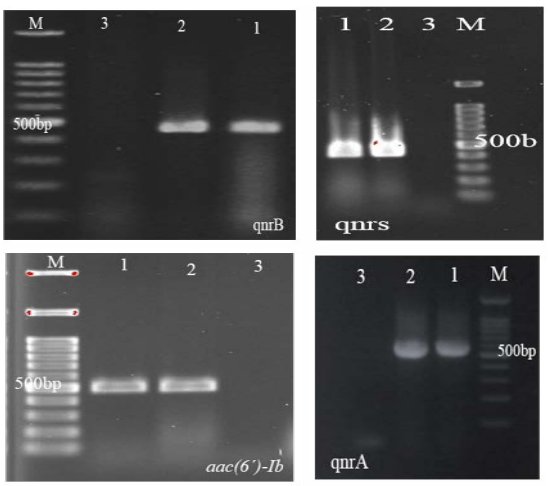
مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم



تصویر ۲. توزیع جدایه‌ها سیتروباکتر بر حسب مقدار حداقل غلظت مهارکننده (میکروگرم در میلی‌لیتر) سیپروفلوکساسین
MIC≥۴: مقاوم
MIC=۲: نیمه‌حساس
MIC≤۱: حساس

بحث

گونه‌های سیتروباکتر از عوامل فرصت‌طلب عفونت‌های سیستم ادراری و تنفسی بیمارستانی هستند [۱۶]. کلونیزاسیون و عفونت مجاری ادراری به‌وسیله سیتروباکتر معمول‌ترین نوع عفونت با این پاتوژن فرصت‌طلب است [۱۷]. در مطالعه‌ای شیوع عفونت ادراری توسط گونه‌های سیتروباکتر در ۵ تا ۱۲ درصد گزارش شده است [۱۸]. طبق گزارشات قبلی سیتروباکتر بعد از اشرشیاکلی و کلبسیلا سومین پاتوژن مهم عامل ادراری است [۱۹، ۲۰]. یکی از مشکلات درمان عفونت با این باکتری مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی است. به‌طوری‌که در مطالعه ما درصد بالایی از جدایه‌های سیتروباکتر که اکثریت آن‌ها گونه فروندی بودند، نسبت به کوتریموکسازول، بتالاکتام‌ها و سیپروفلوکساسین مقاومت نشان دادند که با نتایج مطالعات دیگر سازگاری دارد [۲۱، ۲۲]. افزایش مقاومت به فلوروکینولون‌ها با گسترش ژن‌های PMQR با قابلیت انتقال افقی آن‌ها در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه مرتبط است [۲۳]. هرچند شیوع ژن‌های qnr، به‌خصوص qnrB در جدایه‌های انتروباکتریاسه در کشورهای آسیایی بررسی شده است [۹]، اما تعداد کمی از مطالعات فراوانی این ژن را در سیتروباکتر بررسی کرده‌اند. این موضوع می‌تواند ناشی از کم‌اهمیت دانستن و درنتیجه جداسازی اندک گونه‌های سیتروباکتر باشد. در مطالعه ما qnrB شایع‌ترین ژن در بین جدایه‌ها بود که با نتایج مطالعات دیگر سازگاری دارد. ازجمله در ۲ مطالعه در چین روی ۱۲۲ جدایه بالینی سیتروباکتر و ۲۶۵ جدایه انتروباکتریاسه شیوع ژن



تصویر ۳. الکتروفورز نتایج PCR برای ژن‌های *qnrS* ، *qnrB* ، *qnrA* و *aac(۶´)-Ib-cr*. ردیف M: مارکر (DNA ladder, ۱۰۰bp)، ردیف۱: کنترل مثبت، ردیف ۲: *qnrS* ، *qnrB*، *qnrA* و *aac(۶´)-Ib-cr* ردیف۳: کنترل منفی

جدول ۲. ارتباط بین ژن‌های qnr جدایه‌ها با مقاومت آن‌ها به سیپروفلوکساسین

وجود ژن‌های PMQR	میزان حساسیت ایزوله‌ها به سیپروفلوکساسین				P
	دارای ژن PMQR		بدون ژن PMQR		
	غیرحساس	حساس	غیرحساس	حساس	
qnrA	۱(۱/۹)	۰(۰)	۲۰(۳۹/۳)	۳۰(۵۸/۸)	۰/۲۲۷
qnrB	۱۷(۳۳/۳)	۵(۹/۸)	۴(۷/۸)	۲۵(۴۹/۱)	۰/۰۰۱
qnrS	۳(۵/۹)	۰(۰)	۱۸(۳۵/۳)	۳۰(۵۸/۸)	۰/۰۳۳

PMQR: ژن‌های مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم

qnrB در جدایه‌های سیتروباکتر به ترتیب ۵۹/۸ و ۴۰ درصد گزارش شده است [۹، ۲۴]. همچنین در مطالعه‌ای در کره شیوع ژن qnrB در سیتروباکتر را ۶۷/۹ درصد گزارش کرده‌اند [۸]. در مطالعه‌ای در آمریکا بر روی ۵۹۰ جدایه انتروباکتریاسه، ۲۵ درصد از جدایه‌ها دارای ژن qnrB بودند [۲۵]. در تمامی مطالعات مذکور ژن qnrB بالاترین شیوع را داشته است که با نتایج مطالعه ما مشابه است. به نظر می‌رسد که ژن qnrB در نقاط مختلف جهان گسترش بالایی دارد. میزان ژن qnrS در مطالعه ما پایین بود که با نتایج دیگر مطالعات در چین و فرانسه که فراوانی این ژن را به ترتیب ۱/۹ و ۲/۵ درصد گزارش کردند تطابق دارد [۲۶، ۹]. در گزارشاتی از چین میزان شیوع qnrA در جدایه‌های سیتروباکتر ۸/۲ درصد و ۲۰ درصد، همچنین در مطالعه‌ای در مراکش روی جدایه‌های انتروباکتریاسه ۱۰/۲ درصد گزارش شده است [۹، ۲۴، ۲۶]. فراوانی ژن aac(6´)-Ib-cr در مطالعه‌ای در چین در جدایه‌های سیتروباکتر ۲۶/۷ درصد گزارش شده است [۲۴]. در مطالعه ما ژن qepA در هیچ‌کدام از جدایه‌ها یافت نشد که تا حدی مورد انتظار بود. چون در پژوهش‌های دیگر هم فراوانی این ژن صفر گزارش شده است [۲۷، ۲۸].

در مطالعه ما بررسی آماری، ارتباط ژن‌های PMQR با مقاومت جدایه‌ها به سیپروفلوکساسین را نشان داد و در جدایه‌های با حداقل غلظت مهارکننده بالاتر (MIC≥۶۴) شیوع بیش‌تری داشتند. هر چند بین حضور این ژن‌ها با افزایش حداقل غلظت مهارکننده ارتباط معناداری وجود داشت، اما این ژن‌ها توزیع گسترده‌ای در میان جدایه‌های سیتروباکتر داشت. حتی در جدایه‌های حساس به سیپروفلوکساسین نیز مشاهده شدند [۹، ۲۹]. در گزارش دیگری جدایه‌هایی که دارای ژن‌های PMQR بودند بعد از اینکه در برابر فلوروکینولون‌ها قرار گرفتند، افزایش مقاومت در آن‌ها مشاهده شد. بنابراین درمان عفونت‌های ایجادشده توسط جدایه‌های دارای ژن‌های PMQR با فلوروکینولون‌ها ممکن است سبب افزایش مقاومت و شکست درمان شود [۳۰].

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه بیانگر اهمیت سیتروباکتر فروندی در ایجاد عفونت ادراری در بیماران بستری و میزان مقاومت بالای آن نسبت به سیپروفلوکساسین است. ژن‌های PMQR فراوانی بالایی در جدایه‌ها دارند و همچنین ژن‌های qnrS و qnrB تأثیر معناداری در افزایش میزان حداقل غلظت مهارکننده سیپروفلوکساسین

جدول ۳. توزیع جدایه‌های دارای ژن PMQR برحسب مقدار حداقل غلظت مهارکننده (میکروگرم در میلی‌لیتر) سیپروفلوکساسین

ژن‌های PMQR	تعداد جدایه	حداقل غلظت مهارکننده (میکروگرم در میلی‌لیتر)				
		۰/۵≥	۱ تا ۲	۴ تا ۸	۱۶ تا ۳۲	۶۴ تا ۱۲۸
qnrB+ Aac(6´)-Ib-cr	۹	۲	۱		۲	۴
Aac(6´)-Ib-cr + qnrB+qnrS	۲					۲
qnrS+qnrB	۱					۱
qnrA+qnrB	۱				۱	
Aac(6´)-Ib-cr	۳					۳
qnrB	۹	۲		۱	۴	۲

PMQR: ژن‌های مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم

نشان دادند. بنابراین برای استفاده مناسب از فلوروکینولون‌ها در درمان عفونت ادراری سیتروباکتر باید سنجش حساسیت باکتری صورت گیرد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مقاله با کد اخلاق (KUMS.REC.1395.241) به تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم‌پزشکی کرمانشاه رسیده است.

حامی مالی

معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم‌پزشکی کرمانشاه حامی این پژوهش بوده است.

مشارکت‌نویسندگان

تمام نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از واحد توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان امام رضا (ع)، دانشگاه علوم‌پزشکی کرمانشاه و تمام افراد شرکت کننده، تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

[1] Jones ME, Avison MB, Damdinsuren E, MacGowan AP, Bennett PM. Heterogeneity at the beta-lactamase structural gene ampC amongst Citrobacter spp. assessed by polymerase chain reaction analysis: Potential for typing at a molecular level. J Med Microbiol. 1994; 41(3):209-14. [DOI:10.1099/00222615-41-3-209] [PMID]

[2] Akya A, Jafari S, Ahmadi K, Elahi A. [The frequency of carbapenemase genes in citrobacter Frundii and citrobacter Koseri isolated from clinical specimens in Imam Reza Hospital, Kermanshah, Iran (Persian)]. J Kerman Univ Med Sci. 2015; 22(5):629-38. [Link]

[3] Richter SN, Frasson I, Bergo C, Manganelli R, Cavallaro A, Palù G. Characterisation of qnr plasmid-mediated quinolone resistance in Enterobacteriaceae from Italy: Association of the qnrB19 allele with the integron element ISCR1 in Escherichia coli. Int J Antimicrob Agents. 2010; 35(6):578-83. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2010.02.015] [PMID]

[4] Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: Target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J Antimicrob Chemother. 2003; 51(5):1109-17. [DOI:10.1093/jac/dkg222] [PMID]

[5] Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J Infect Chemother. 2011; 17(2):149-82. [DOI:10.1007/s10156-010-0120-2] [PMID]

[6] Firoozeh F, Zibaei M, Soleimani-Asl Y. Detection of plasmid-mediated qnr genes among the quinolone-resistant Escherichia coli isolates in Iran. J Infect Dev Ctries. 2014; 8(7):818-22. [DOI:10.3855/jidc.3746] [PMID]

[7] Martínez-Martínez L, Eliecer Cano M, Manuel Rodríguez-Martínez J, Calvo J, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008; 6(5):685-711. [DOI:10.1586/14787210.6.5.685] [PMID]

[8] Park YJ, Yu JK, Lee S, Oh EJ, Woo GJ. Prevalence and diversity of qnr alleles in AmpC-producing Enterobacter cloacae, enterobacter aerogenes, citrobacter freundii and serratia marcescens: A multicentre study from Korea. J Antimicrob Chemother. 2007; 60(4):868-71. [DOI:10.1093/jac/dkm266] [PMID]

[9] Zhang R, Ichijo T, Huang YL, Cai JC, Zhou HW, Yamaguchi N, et al. High prevalence of qnr and aac(6')-Ib-cr genes in both water-borne environmental bacteria and clinical isolates of Citrobacter freundii in China. Microbes Environ. 2012; 27(2):158-63. [DOI:10.1264/jsme2.ME11308] [PMID] [PMCID]

[10] Leski TA, Taitt CR, Bangura U, Stockelman MG, Ansumana R, Cooper WH 3rd, et al. High prevalence of multidrug resistant Enterobacteriaceae isolated from outpatient urine samples but not the hospital environment in Bo, Sierra Leone. BMC Infect Dis. 2016; 16:167. [DOI:10.1186/s12879-016-1495-1] [PMID]

[11] Fauci S, Braunwald E, Kasper DL, Hauser S, Longo D, Jameson J, et al. Harrison's principles of internal medicine. USA: McGraw-Hill; 2008. [Link]

[12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017. [Link]

[13] Kang HY, Tamang MD, Seol SY, Kim ES. Dissemination of plasmid-mediated qnr, aac(6')-Ib-cr, and qepA Genes among 16S rRNA Methylase producing enterobacteriaceae in Korea. J Bacteriol Virol. 2009; 39(3):173-82. [DOI:10.4167/jbv.2009.39.3.173]

[14] Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(8):2872-4. [DOI:10.1128/AAC.01647-05] [PMID] [PMCID]

[15] Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(11):3953-5. [DOI:10.1128/AAC.00915-06] [PMID]

[16] Metri BC, Jyothi P. Antibiotic sensivity pattern of citrobacter spp. isolated from patients with urinary tract infections in tertiary care hospital in south india. Int J Pharm Pharm Sci. 2015; 7(1):252-4. [Link]

[17] Stewart ZE, Shaker M, Baxter JD. Urinary tract infection caused by citrobacter koseri in a patient with Spina Bifida, an ileal conduit and renal caluli progressing to peri-nephric abscess and empyema. Urol Case Rep. 2017; 11:22-4. [DOI:10.1016/j.eucr.2016.11.013] [PMID]

[18] Gill MA, Schutze GE. Citrobacter urinary tract infections in children. Pediatr Infect Dis J. 1999; 18(10):889-92. [DOI:10.1097/00006454-199910000-00010] [PMID]

[19] Metri BC, Jyothi P, Peerapur BV. Antibiotic resistance in citrobacter spp. isolated from urinary tract infection. Urol Ann. 2013; 5(4):312-3. [DOI:10.4103/0974-7796.120295] [PMID]

[20] Ranjan KP, Ranjan N. Citrobacter: An emerging health care associated urinary pathogen. Urol Ann. 2013; 5(4):313-4. [PMID] [PMCID]

[21] Metri BC, Jyothi P, Peerapur BV. Anti-microbial resistance profile of Citrobacter species in a tertiary care hospital of Southern India. Indian J Med Sci. 2011; 65(10):429-35. [DOI:10.4103/0019-5359.109259] [PMID]

[22] Kim PW, Harris AD, Roghmann MC, Morris JG Jr, Strinivasan A, Perencevich EN. Epidemiological risk factors for isolation of ceftriaxone-resistant versus -susceptible citrobacter freundii in hospitalized patients. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(9):2882-7. [DOI:10.1128/AAC.47.9.2882-2887.2003] [PMID]

[23] Soleimani-Asl Y, Zibaei M, Firoozeh F. [Detection of qnrA gene among quinolone-resistant Escherichia coli isolated from urinary tract infections in Khorram Abad during 2011-2012 (Persian)]. Feyz. 2013; 17(5):488-94. [Link]

[24] Yang H, Chen H, Yang Q, Chen M, Wang H. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes qnr and aac(6')-Ib-cr in clinical isolates of Enterobacteriaceae from nine teaching hospitals in China. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(12):4268-73. [DOI:10.1128/AAC.00830-08] [PMID]

[25] Halová D, Papousek I, Jamborova I, Masarikova M, Cizek A, Janecko N, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance genes in Enterobacteriaceae from American crows: High prevalence of bacteria with variable qnrB genes. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58(2):1257-8. [DOI:10.1128/AAC.01849-13] [PMID]

[26] Bouchakour M, Zerouali K, Gros Claude JD, Amarouch H, El Mdaghri N, Courvalin P, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae in Morocco. J Infect Dev Ctries. 2010; 4(12):779-803. [DOI:10.3855/jidc.796] [PMID]

[27] Shao Y, Xiong Z, Li X, Hu L, Shen J, Li T, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Citrobacter freundii isolates from Anhui province, PR China. J Med Microbiol. 2011; 60(Pt 12):1801-5. [DOI:10.1099/jmm.0.034082-0] [PMID]

[28] Cruz GR, Radice M, Sennati S, Pallecchi L, Rossolini GM, Gutkind G, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among oxyiminocephalosporin-resistant Enterobacteriaceae in Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108(7):924-7. [DOI:10.1590/0074-0276130084] [PMID]

[29] Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. Lancet Infect Dis. 2006; 6(10):629-40. [DOI:10.1016/S1473-3099(06)70599-0] [PMID]

[30] Karah N, Poirel L, Bengtsson S, Sundqvist M, Kahlmeter G, Nordmann P, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6')-ib-cr in escherichia coli and Klebsiella spp. from Norway and Sweden. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010; 66(4):425-31. [DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2009.12.004] [PMID]