Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.40; No.1; 2016

The study of antibiotic resistance among *Klebsiella pneumoniae* and expression level of *oqxA* and *acrA* genes by using real-time PCR

Arezoo Saadatian Farivar[1], Jamileh Nowroozi* [1], Gita Eslami[2], Azar Sabokbar [1], Ali Hashemi[2]

1. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj
2. Department of Microbiology, Shahid Beheshti University, Tehran

(Received: 2015/12/20 Accept: 2016/05/31)

Abstract

Background: *The increasing emergence of antimicrobial resistance among gram negative bacteria especially Enterobacteriaceae has become a global problem. Klebsiella pneumoniae is an opportunistic pathogen, which recently due to causing broad spectrum of disease and antibiotic resistance has been lionized. Efflux pumps are one of the antibiotic resistance mechanisms, which were introduced in this bacteria. Therefore, the aims of this study were detection of oqxA, oqxB, acrA and acrB genes, evaluation of expression level of oqxA and acrA genes and determination of antibiotic resistance patterns among Klebsiella pneumoniae isolated at Tehran hospitals.*

Materials and Methods: *In this descriptive study 83 Klebsiella pneumoniae were collected from patients attending to three hospitals in Tehran. Antibiotic susceptibility test was performed by disk diffusion method. The presence of oqxA, oqxB, acrA and acrB resistance genes was detected by PCR. The CCCP was used as efflux pump inhibitor and the oqxA, acrA genes expression level was analyzed by using real-time PCR.*

Results: *The most of strains showed to have OqxAB (96%) and AcrAB (97%) pumps. The use of efflux pump inhibitor showed different results for ciprofloxacin MIC. Real-time PCR assay showed higher expression level of OqxAB (2.3 folds) and AcrAB (4 folds) pumps in resistant strains.*

Conclusion: *The existence of antibiotic resistance genes, increasing of Klebsiella pneumoniae strains, which become resistant to common antibiotics and nosocomial infections, highlights the need for particular detection, prevention and control of spread of resistant bacteria.*

Keywords: *Klebsiella pneumoniae, Efflux pumps, Antimicrobial resistance, Real-time PCR.*

* *Corresponding Author: Jamileh Nowroozi*
Email: nowrooziJ@yahoo.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-02-15]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۰، شماره ۱، ۱۳۹۵، صفحات ۴۲ تا ۴۸

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های کلبسیلاپنومونیه و میزان بیان ژن‌های *oqxA* و *acrA* بااستفاده از Real-Time PCR

آرزو سعادتیان فریور[۱]، جمیله نوروزی[۱*]، گیتا اسلامی[۲]، آذر سبکبار[۱]، علی هاشمی[۲]

۱- گروه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۲- گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه شهید بهشتی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۹/۲۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۳/۲۵

چکیده

سابقه و هدف: افزایش مقاومت ضد میکروبی در باکتری‌های گرم منفی به خصوص خانواده انتروباکتریاسه به مشکل جهانی تبدیل شده است. کلبسیلاپنومونیه پاتوژن فرصت‌طلب گرم منفی است که به دلیل ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها و مقاومت آنتی‌بیوتیکی امروزه مورد توجه قرار گرفته است. پمپ‌های ترشحی به‌عنوان یکی از مکانیزم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در این باکتری مطرح است. بنابراین هدف از این مطالعه تشخیص ژن‌های *acrB*, *acrA*, *oqxA*, *oqxB* تعیین میزان بیان ژن‌های *acrA*, *oqxA* و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان ایزوله‌های بالینی کلبسیلاپنومونیه جداشده از بیمارستان‌های تهران بوده است.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی، تعداد ۸۳ کلبسیلاپنومونیه از بیماران مراجعه‌کننده به سه بیمارستان در تهران جمع‌آوری شدند. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار از دیسک انجام شد. وجود ژن‌های مقاومت *oqxA, oqxB, acrA* و *acrB* با استفاده از تکنیک *PCR* بررسی شد. از *CCCP* به‌عنوان مهارکننده استفاده شد و سپس میزان بیان ژن‌های *oqxA* و *acrA* از طریق *Real-time PCR* بررسی شد.

یافته‌ها: اکثر نمونه‌ها دارای پمپ‌های (*OqxAB* ۹۶ درصد) و AcrAB ۹۷درصد) بودند. استفاده از مهارکننده پمپ دفعی، نتایج متفاوتی را در *MIC* سیپروفلوکساسین نشان داد. *Real-time PCR*، افزایش بیان ۲/۳ برابری پمپ دفعی *OqxAB* و چهار برابری پمپ دفعی AcrAB در سویه‌های مقاوم را آشکار کرد.

نتیجه‌گیری: وجود ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، افزایش سویه‌های کلبسیلاپنومونیه مقاوم به آنتی بیوتیک‌های متداول و افزایش عفونت‌های بیمارستانی، لزوم تشخیص دقیق باکتری‌های مقاوم و جلوگیری از ایجاد مقاومت‌های جدید و کنترل گسترش مقاومت‌ها را ضروری می کند.

واژگان کلیدی: کلبسیلاپنومونیه- پمپ‌های ترشحی - مقاومت ضدمیکروبی - *Real-Time PCR*

مقدمه:

کلبسیلاپنومونیه باسیل گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، غیرمتحرک و از خانواده انتروباکتریاسه است. این باکتری به‌عنوان پاتوژن فرصت‌طلب و عامل عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی است. از جمله عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌توان به پنومونی، عفونت‌های ادراری، سپتی‌سمی، عفونت زخم، عفونت‌های‌تنفسی، آبسه‌های‌کبدی و مننژیت اشاره کرد. این عفونت‌ها اغلب توسط کلبسیلاپنومونیه مقاوم به چند دارو ایجاد می‌شوند که باعث نگرانی مراکز درمانی شده است(۱). احتمال می‌رود باکتری‌ها مقاومت چند دارویی را از طریق انتقال افقی ژن‌های مقاومت به واسطه عناصر متحرک ژنتیکی مثل انتگرون‌ها به‌دست آورده‌اند(۲). از جمله ژن‌های مقاومت می‌توان به ژن مقاومت به کینولون‌ها(۳)، ژن‌های

نویسنده مسئول: جمیله نوروزی
پست الکترونیک: *nowrooziJ@yahoo.com*

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-02-15]

16SrRNA متیل ترانسفراز، بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف(ESBLs) اشاره کرد(۴). از طرف دیگر، پمپ‌های دفع آنتی‌بیوتیک، مکانیسم شناخته شده‌ای از مقاومت باکتری‌هاست که نخستین بار به‌عنوان عامل مقاومت به تتراسایکلین در *E.coli* توصیف شد(۷). از آن به بعد، پمپ‌های دفعی بسیاری در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی گزارش شده است(۸). این سیستم‌ها، مواد محلول را به خارج از سلول دفع می‌کنند. پمپ‌های دفعی باکتریایی براساس تعداد ترکیب‌های تشکیل دهنده، تعداد مناطق transmembrane- Spanning، منبع انرژی استفاده شده پمپ و نوع مولکول‌هایی که دفع می‌کنند به شش خانواده تقسیم می‌شوند:

ABC [1]، MFS[2]، MATE [3]، SMR [4]، RND [5]، DMT [6] (۹).

از میان پمپ‌های دفعی، خانواده RND، در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های گرم منفی به خصوص سودوموناس آئروجینوزا و گونه‌های متعلق به خانواده انتروباکتریاسه اهمیت دارند که این پمپ‌ها از طریق دفع مواد غیرضروری از میان غشای سیتوپلاسمی عمل می‌کنند (۸). در مقابل، در باکتری‌های گرم مثبت، پمپ‌های دفعی MFS و ABC بیشتر یافت می‌شوند(۹).

از میان پمپ‌های دفعی متعلق به خانواده RND می‌توان به پمپ دفعی *OqxAB* و AcrAB اشاره کرد که وجود آن در کلبسیلاپنومونیه هم گزارش شده است(۱۰). پمپ دفعی *OqxAB* از دو ژن *oqxA* و *oqxB* تشکیل شده که هم روی کروموزوم و هم روی پلاسمید قرار دارند(۱۱و ۱۲). این پمپ‌ها عامل ایجاد مقاومت در برابر فلوروکینولون‌ها و بیوسایدهایی از قبیل تریکلوسان، کلروهگزیدین و اتیدیوم بروماید هستند(۱۲). همچنین افزایش تحمل در برابر SDS (سدیم دودسیل سولفات) که در بسیاری از موادشیمیایی خانگی مثل شامپو و خمیردندان وجود دارد، در سویه‌های حاوی پمپ *OqxAB* گزارش شده است(۱۳). به تازگی دو ژن در ارتباط با اپرون *oqxA*B روی کروموزوم کلبسیلاپنومونیه MGH75878(۱۴) شناخته شده است که شامل *rarA* (کدکننده فعال کننده رونویسی) و *oqxR* (کدکننده مهارکننده رونویسی) هستند. نتایج حاکی از آن است که افزایش بیان *rarA* در کنار کاهش بیان *oqxR* باعث بیان اپرون *oqxA*B می‌شود(۱۵).

پمپ ترشحی AcrAB از پمپ‌های اصلی ایجادکننده مقاومت ذاتی سویه‌های کلبسیلاپنومونیه علیه فلوروکینولون‌ها به‌ویژه سیپروفلوکساسین است. این پمپ علاوه بر مقاومت به کینولون‌ها سبب مقاومت به کلرامفنیکل، تتراسایکلین، تری متوپریم، بتالاکتام‌ها و ماکرولیدها هم می‌شود(۱۶). در نتیجه فلوروکینولون‌ها که به نظر می‌آمد انتخابی مناسب در درمان عفونت‌های ناشی از کلبسیلاپنومونیه باشد، در مطالعه‌های بسیاری ، افزایش مقاومت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های فوق گزارش شده است(۱۳). این مسئله‌مشکلات جدی در درمان انسان‌ها به وجود آورده و انتخاب‌های درمانی را محدود کرده است. در کلبسیلاپنومونیه افزایش بیان پمپ AcrAB و به تازگی *OqxAB* در ارتباط با افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی گزارش شده است، ولی سایر مکانیسم‌های تنظیم آن شناسایی نشده است. به علاوه نشان داده شده که AcrAB در بیماری‌زایی باکتری هم دخالت دارد، ولی نقش *OqxAB* هنوز مشخص نیست. در مطالعه‌ای گزارش شده که افزایش بیان *oqxA*B که در نتیجه جهش در ژن *oqxR* است، به مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های بالینی کلبسیلاپنومونیه منجر می‌شود که البته تیجسیکلین مستثنا است. همچنین گزارش شده که حضور پمپ AcrAB به همراه افزایش بیان پمپ *OqxAB* در ایجاد پتانسیل بالای بیماری‌زایی دخیل است(۱۷).

یکی از روش‌های تشخیص فعالیت پمپ‌های مختلف در باکتری‌ها استفاده از مهارکننده‌ها است. به این صورت که در حضور مهارکننده، فعالیت پمپ متوقف می‌شود و در نتیجه باعث کاهش MIC آنتی‌بیوتیک مدنظر در باکتری مورد مطالعه می‌شود. بنابراین مهارکننده می‌تواند به ما نشان دهد که چه آنتی‌بیوتیک‌هایی در درمان عفونت‌های حاصل از باکتری مورد مطالعه، به احتمال بی‌اثر است(۱۶، ۱۹، ۱۸). (Carbonyl Cyanide m-chlorophenyl hydrazone CCCP) جزو مهارکننده‌های سنتتیک است که مهار را از طریق مسدودکردن گرادیان پروتون از غشا انجام می‌دهد(۱۹).

میزان بیان پمپ‌های دفعی می‌تواند در افزایش یا کاهش مقاومت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک خاص دخالت داشته باشد که بررسی این میزان از طریق روش Real-time PCR امکان‌پذیراست (۱۲). بنابراین هدف از این مطالعه نقش ژن‌های *oqxA*، *oqxB*، *acrA*، *acrB* در میان ایزوله‌های بالینی کلبسیلاپنومونیه جداشده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های مفید، طالقانی و امام خمینی بوده است. همچنین بررسی میزان بیان ژن‌های *oqxA* و *acrA* از طریق Real-time PCR، مطالعه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعیین ارتباط آن با میزان بیان پمپ‌ها انجام شده است.

مواد و روش‌ها:

جمع‌آوری باکتری‌ها و انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی

در این مطالعه توصیفی از شهریور ۹۳ تا مرداد ۹۴، نمونه‌های مشکوک به وجود کلبسیلاپنومونیه از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های مفید، طالقانی و امام‌خمینی جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، روی محیط‌های EMB و مک کانکی آگار کشت داده شدند و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. بعد از تهیه لام و مشاهده باسیل‌های گرم منفی، تست‌های بیوشیمیایی معمول نظیر کشت در محیط لیزین دکربوکسیلاز، SIM, TSI, MRVP، اوره و سیترات و تست اکسیداز برای تأیید کلبسیلاپنومونیه انجام شد. سپس باکتری‌ها در محیط TSB (Triptic Soy broth) و گلیسرول در ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام مراحل بعدی مطالعه ذخیره شدند.

تست حساسیت ضد میکروبی با روش کربی‌بوئرانتشار از دیسک روی محیط مولرهینتون آگار، نسبت به ۱۶دیسک آنتی‌بیوتیکی (Mast Group. UK) افلوکساسین OFx ,5µgr، سیپروفلوکساسین CIP, 5µgr، نورفلوکساسین NOR,10µg جنتامایسین GM, 10µgr ، آمیکاسین AK, 30µgr، استرپتومایسین HLS, 10µgr، توبرامایسین TOB, 10µgr، کانامایسین K, 30µgr، تیکارسیلین TIC, 75µgr، سفوتاکسیم CTX, 30µgr، سفتازیدیم CAZ, 30µrg، آزترونام ATM, 30µgr ایمیپنم IMI, 10µgr، تری متوپریم TR, 5µgr، کلرامفنیکل C, 30µgr و کلیستین CO, 10µgr انجام و از E. coli ATCC ۲۵۹۲۲ به‌عنوان کنترل کیفی استفاده شد و نتایج طبق رهنمودهای CLSI clinical and laboratory standards Insitute(۲۰۱۳) بررسی شدند.

استخراج DNA:

باکتری‌ها در محیط (Luria-Bertani broth LB) کشت داده شده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. سپس DNA با استفاده از کیت Genet bio (کره جنوبی) طبق دستورالعمل کیت استخراج شد و DNA در ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مراحل بعدی مطالعه ذخیره شد.

شناسایی ژن‌های *acrB, acrA, oqxB, oqxA*:

حضور ژن‌های *acrB, acrA, oqxB, oqxA* با استفاده از تکنیک PCR و پرایمرهای اختصاصی بررسی شد. توالی پرایمرها با اطلاعات توالی نوکلئوتیدی موجود در (blast Gene Bank) مقایسه و تأیید شد (جدول شماره ۱). واکنش تکثیر در حجم (eppendrof Master Cycler 25µL) شامل 12/5µL از مخلوط اصلی (master mix2x شرکت سیناکلون، کرج- ایران CAT. NO: PR8252C): 0/4 m M , 3mM mgCl2 از هرکدام از داکسی نوکلئوتیدتری فسفات و ۰/۰۸ واحد Taq DNA پلیمراز، ۷/۵ میکرولیتر آب یونیزه، یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای Reverse,Forward و ۳ میکرولیتر از DNA الگو و در شرایط: دناتوره شدن اولیه ۹۴ درجه‌سانتی‌گراد برای ۵′ و به دنبال آن ۳۶ چرخه شامل دناتوره شدن ۹۴ درجه‌سانتی‌گراد برای "۴۵، annealing (وابسته به پرایمر استفاده شده)، طویل شدن ۷۲ درجه‌سانتی‌گراد برای "۴۵ و طویل شدن نهایی ۷۲ درجه‌سانتی‌گراد برای ۵′ انجام شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۱ % (w/v) و بافر TBE (EDTA، اسیدبوریک و Tric HCl) در ولتاژ ۹۵ برای "۴۵ الکتروفورز

1. ATP-binding cassette (ABC) Super family
2. The major facilitator super family (MFS)
3. The multidrug and toxic compound extrusion (MATE)
4. The Small multidrug resistance (SMR) family
5. The resistance-nodulation-division(RND) superfamily
6. The drug metabolite transpoter (DMT) superfamily

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-02-15]

شدند و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و با دستگاه gel doc بررسی شدند. اندازه قطعات تکثیر شده با کمک ladder100bp (شرکت سیناکلون)مقایسه و مشخص شد. سپس نمونه‌ها برای تأیید توالی به شرکت Bioneer (کره جنوبی) فرستاده شدند و نتایج با استفاده از نرم‌افزار FinchT.V و Blast در NCBI، بررسی و تأیید شدند. در این بررسی کلبسیلاپنومونیه ۷۰۰۶۰۳ ATCC و نمونه‌های اهدایی از بیمارستان به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شدند.

پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

oqxA-F	GGCAAGAGCCAAAACGCAGG
oqxA-R	GGGGCGTCATTTGGTG
oqxB-F	CGAAGAAAGACCTCCCACCC
oqxB-R	CGCCGCCAATGAGATACA
AcrA-F	ATTAACCCTGACGCCCTGCT
AcrA-R	TGCGCTTTTACCTGCACACC
AcrB-F	CGTCTCCATCAGCGACATTAAC
AcrB-R	GAACCGTATTCCCAACGCGA

روش CCCP :

حداقل غلظت بازدارندگی یا Minimum inhibitory concentration (MIC) سیپروفلوکساسین با استفاده از روش میکرودیلوشن براث در حضور و عدم حضور غلظت ثابتی از ترکیب CCCP به‌عنوان مهارکننده پمپ ترشحی بررسی شد. نقش آن در سویه‌های دارای *OqxAB* و AcrAB در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین بدین طریق به دست آمد. غلظت نهایی CCCP در چاهک‌ها ۲۵μg/mL بود. مقایسه MIC سیپروفلوکساسین در حضور CCCP و در غیاب آن برای آشکارشدن نقش پمپ دفعی در سویه‌های مقاوم و نیمه حساس به سیپروفلوکساسین انجام شد. کاهش ۱۶-۲ برابری MIC بعد از اضافه شدن CCCP، نشان‌دهنده نقش پمپ‌ها در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین بود (۲۰). از سودوموناس آئروجینوزا ATCC27853 و سودوموناس آئروجینوزا PAO1 به‌عنوان کنترل مثبت و چاهک‌های فاقد سیپروفلوکساسین به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. رشد باکتری‌ها در پلیت حاوی ۲۵μg/mL CCCP و فاقد آنتی‌بیوتیک، موید این مطلب بود که این غلظت از CCCP، ممانعتی برای رشد باکتری ندارد.

انجام روش Real-time PCR:

RNA از سویه‌های کلبسیلاپنومونیه ایزوله شده، توسط کیت استخراج RNA RNX-plus solution (شرکت سیناکلون، کرج ایران) استخراج شد. در مرحله بعدی با استفاده از آنزیم DNase (شرکت فرمنتاز)، DNA های احتمالی که به همراه RNA استخراج شده بودند، حذف شدند. پس از آن به کمک کیت سنتز cDNA (TaKaRa cat. PRO37Q)، از RNAهای استخراج شده، cDNA ساخته شد. بعد از آن برای تأیید اختصاصیت پرایمرهای Real- time PCR، کیفیت cDNA سنتز شده و برای به دست آوردن دمای مناسب annealing،RT-PCR انجام شد. در جدول ۲ پرایمرهای استفاده شده برای ژن‌های *oqxA*, *acrA* نشان داده شده است. سپس Real time PCR در حجم۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت شرکت Genet bio CAT. NO: Q9210 کره جنوبی به‌صورت زیر انجام شد: ۱۰میکرولیتر از Prime Qmaster mix (2x) with syber green، پنج میکرولیتر از Depc water، یک میکرو لیتر از پرایمر Forward، یک‌میکرولیتر از پرایمر Reverse، یک میکرولیتر از Rox dye و ۲ میکرولیتر از CDNA. تکثیر قطعه‌های موردنظر در دستگاه Corbet با برنامه دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه (۱ چرخه) و تکثیر شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۵۰ ثانیه و ۴۰ چرخه انجام شد.

برای ژن *oqxA* (۲۱) از ژن خانه‌دار *PROB* (۲۲) و برای ژن *acrA* از ژن خانه‌دار *rrSE* برای مقایسه با میزان بیان ژن هدف برای هر ایزوله استفاده شد. سپس برای محاسبه میزان بیان ژنی و رسم نمودارهای مربوطه از نرم‌افزار Rest استفاده شد، بدین صورت که CT (critical threshold cycle) با نرم‌افزار مشخص و مقدار بیان ژن هدف محاسبه شد. آنالیز میزان بیان با اندازه‌گیری نسبی بیان mRNA در

جدول ۲. پرایمرهای استفاده شده در Real Time PCR

oqxA-F	PCRGGCAAGAGCCCAAAAACGCAGG
oqxA-R	GGGGCGTCATTTGGTG
RPOB-F	AACGTCGTATCTCCGCACTC
RPOB-R	CGATACGGCGTCTCAAGGAA
acrA-F	ATTAACCCTGACGCCCTGCT
acrA-R	TGCGCTTTTACCTGCACACC
rrsE-F	TTGACGTTACCCGCAGAAGAA
rrsE-R	GCTTGCACCTCCGTATTACC

مقایسه با سویه استاندارد کلبسیلاپنومونیه (ATCC700603) انجام شد.

آنالیز آماری داده‌ها:

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار آماری spss v.22 تحلیل شد. برای تحلیل داده‌ها از آمار توصیفی (فراوانی، درصد، میانگین) استفاده شد و در بخش استنباطی ارتباط بین متغیرهای بررسی شده از طریق آزمون‌های ضریب بررسی اسپیرمن و Chi-square برای تعیین ارتباط معناداری در سطح احتمال ۵ درصد>P بررسی شده است.

یافته‌ها:

جداسازی باکتری‌ها و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی :

۸۳ مورد کلبسیلاپنومونیه از بیماران ایزوله شدند. ۲۹ (۳۵درصد) باکتری از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان طالقانی، ۲۱ (۲۵/۳درصد) باکتری از بیمارستان مفید، (۳۹/۸درصد) باکتری از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی جمع‌آوری شد.از کل ۸۳ ایزوله ۵۱ (۶۱/۴ %) مورد از نمونه‌های ادراری،۱۶ (۱۹/۳%) مورد از نمونه خون، ۵ (۶%) مورد از زخم، ۴ (۴/۸%) مورد از خلط، ۳ (۳/۶%) مورد از درون شکم و ۴ (۴/۸%) مورد از سایر منابع جداسازی شدند. از میان بیماران مراجعه کننده ۲۹ (۳۵ %) مرد، ۲۵ (۳۰/۱%) زن، ۲۶ (۳۱/۳%) کودک و ۳ (۳/۶%) مورد نامشخص بود. ۵۸ (۶۹/۹%) مورد از بیماران بستری در بیمارستان بودند و ۱۹(۲۲/۹%) مورد مراجعه کننده به اورژانس و ۶ (۷/۲%) مورد هم نامعلوم

جدول ۱. نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی کلبسیلاپنومونیه ایزوله شده از بیماران

آنتی‌بیوتیک	(%) حساس	(%) نیمه حساس	(%) مقاوم
افلوکساسین	۲۳ (۲۷/۸%)	۶(۷/۲%)	۵۴(۶۵%)
سیپروفلوکساسین	۲۰(۲۴/۱%)	۶(۷/۲%)	۵۷(۶۸/۷%)
نورفلوکساسین	۲۲(۲۶/۵%)	۶(۷/۲%)	۵۵(۶۶/۳%)
جنتامایسین	۲۰(۲۴/۱%)	۸(۹/۶%)	۵۵(۶۶/۳%)
آمیکاسین	۳۵(۴۲/۲%)	۵(۶%)	۴۳(۵۱/۸%)
توبرامایسین	۲۸(۳۳/۷%)	۸(۹/۶%)	۴۷(۵۶/۷%)
کانامایسین	۸(۹/۶%)	۹(۱۰/۹%)	۶۶(۷۹/۵%)
تیکارسیلین	۱۱(۱۳/۲%)	۴(۴/۸%)	۶۸(۸۲%)
استرپتومایسین	۶۳(۷۵/۹%)	۶(۷/۲%)	۱۴(۱۶/۹%)
سفوتاکسیم	۷(۸/۵%)	۵(۶%)	۷۱(۸۵/۵%)
سفتازیدیم	۱۱(۱۳/۳%)	۷(۸/۴%)	۶۵(۷۸/۳%)
آزترونام	۱۱(۱۳/۳%)	۶(۷/۲%)	۶۶(۷۹/۵%)
ایمیپنم	۳۸(۴۵/۸%)	۷(۸/۴%)	۳۸(۴۵/۸%)
تری‌متوپریم	۱۷(۲۰/۵%)	۴(۴/۸%)	۶۲(۷۴/۷%)
کلرامفنیکل	۴۶(۵۵/۴%)	۱۹(۲۲/۹%)	۱۸(۲۱/۷%)
کلیستین	۶۹(۸۳/۱%)	–	۱۴(۱۶/۹%)

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-02-15]

بود.. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدول شماره ۱ آمده است. از میان نمونه‌ها ۳۰ سویه که مقاومت به فلوروکینولون‌های یعنی افلوکساسین، نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین را نشان دادند، به سایر عوامل ضدمیکروبی استفاده شده در این مطالعه (جز کلیستین) هم مقاوم بودند.

از ۸۳ نمونه، ۶۶ نمونه به سه کلاس از آنتی‌بیوتیک‌ها یا بیشتر مقاوم بودند که در نتیجه این ۶۶ نمونه (۷۹/۵درصد) جزو (Multi drug resistant) MDRها طبقه‌بندی شدند. از ۵۷ سویه مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۵۵ (۹۶/۵درصد) سویه MDR بودند و از شش سویه نیمه حساس به سیپرو فلوکساسین ۳ (۵۰ درصد) مورد فنوتیپ MDR نشان دادند.

نتایج حاصل از PCR ژن‌های *acrB, acrA, oqxB, oqxA*:

روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نشان داد که ۹۶درصد از سویه‌های کلبسیلاپنومونیه دارای ژن‌های *oqxA* و *oqxB* بودند. همچنین ۹۷درصد از سویه‌های جداشده حاوی ژن‌های *acrA* و *acrB* بودند. همه سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها (افلوکساسین، سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین) جز سه مورد دارای ژن‌های *oqxA* و *oqxB* بودند. همچنین این سویه‌های مقاوم جز در دو مورد، بقیه وجود *acrA* و *acrB* را هم نشان دادند.

نتایج CCCP:

همانطور که گفته شد برای آشکارشدن نقش پمپ دفعی در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، MIC در حضور و عدم حضور CCCP، انجام و نتایج با هم مقایسه شد. نمونه‌های مقاوم و نیمه حساس به سیپروفلوکساسین به دو دسته تقسیم شدند. دسته اول آن‌هایی که در حضور CCCP, MIC آن‌ها تغییری نکرد. دسته دوم کاهش ۱۶-۲ برابری MIC را در حضور CCCP نشان دادند. در گروه اخیر به دلیل کاهش MIC در حضور CCCP، احتمال دخالت پمپ دفعی در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین در سویه‌های مذکور وجود دارد. رشد این سویه‌ها در پلیت حاوی CCCP ۲۵ µg/mL موید این مطلب بود که مهارکننده در این غلظت به تنهایی اثر ضدمیکروبی ندارد.

از ۵۷ نمونه مقاوم به سیپروفلوکساسین و شش نمونه نیمه حساس، ۳۸ ایزوله (۶۰درصد) در حضور CCCP تغییر MIC نشان ندادند. اما ۲۵ نمونه (۴۰درصد) کاهش ۲-۱۶ برابری داشتند.

نتایج Real-time PCR:

واضح است که ارتباطی بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و حضور بعضی ژن‌ها وجود دارد. برای تعیین نقش ژن‌های *oqxA* و *acrA* در مقاومت به فلوروکینولون‌ها به‌ویژه سیپروفلوکساسین، از روش Real-time PCR استفاده شد. در مطالعه حاضر ۶۸/۷درصد از ایزوله‌ها مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۷/۲درصد نیمه حساس و ۲۴/۱درصد به سیپروفلوکساسین حساس بودند. همانطور که گفته شد نمونه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین به دو دسته تقسیم شدند. دسته اول ایزوله‌هایی که با مهار کننده، تغییری در MIC نداشتند، اما دسته دوم، ایزوله‌هایی بودند که در حضور مهارکننده، کاهشی در MIC را نشان دادند. نتایج Real-time PCR برای سویه‌هایی که تغیر در MIC سیپروفلوکساسین در حضور مهارکننده را نشان داده بودند، حاکی از افزایش چهار برابری بیان *acrA* و ۲/۳ برابری *oqxA* نسبت به سویه استاندارد کلبسیلاپنومونیه ATCC700603 بود. همچنین میزان بیان ایزوله‌های ذکر شده، بیشتر از نمونه‌های حساس بود. با توجه به اینکه MIC سویه استاندارد کمتر از دو بود و همچنین میزان بیان پمپ در آن بیشتر از سویه‌های بالینی حساس به سیپروفلوکساسین بود؛ از طرفی هیچ ژن مقاومت به سیپروفلوکساسین در این سویه مشاهده نشده(۱۲)نقش این پمپ در مقاومت به سیپرو فلوکساسین مشخص می‌شود.

بحث:

تحقیق نشان داد بیشترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های کلیستین،استرپتومایسین، کلرامفنیکل و ایمیپنم نشان داده شد. مقاومت فلوروکینولون‌ها از جمله سیپروفلوکساسین، نوروفلوکساسین و افلوکساسین بترتیب ۶۸/۷درصد، ۶۶/۳درصد، ۶۵درصد بود. Yuan و همکارانش(۲۳) مقاومت به سیپروفلوکساسین را در ۶۶درصد و حضور ژن‌های *oqxA* و *oqxB* را در نمونه‌های مقاوم به کلبسیلاپنومونیه۱۰۰درصد گزارش کردند(۲۳). نتایج مطالعه حاضر که مقاومت ۶۸/۷ درصد به سیپروفلوکساسین را نشان داد و اینکه۹۶ درصد سویه‌ها دارای ژن‌های *oqxA* و *oqxB* بودند با نتایج Yuan مطابقت دارد. همچنین ۹۷ درصد از ایزوله‌های کلبسیلاپنومونیه دارای ژن *acrA* بودند. در مطالعه پاکزاد و همکارانش تمام سویه‌های کلبسیلاپنومونیه مقاوم به سیپروفلوکساسین در PCR ژن *acrA* را دارا بودند(۱۶) که با نتیجه مطالعه حاضر هماهنگ است.

همانطور که گفته شد در مواقعی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند در نتیجه عملکرد پمپ‌های دفعی باشد. به تازگی مطالعه‌هایی مشخص کرده که مهارکننده‌های پمپ‌های دفعی قادر به تغییر الگوی مقاومت از طریق انسداد پمپ‌های دفعی و خارج کردن آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (۲۴). بنابراین برای بررسی اینکه آیا وجود پمپ‌ها در کلبسیلاپنومونیه می‌تواند عامل مقاومت باشد یا نه، از مهارکننده CCCP استفاده شد تا فعالیت پمپ دفعی ارزیابی شود. در مطالعه حاضر، CCCP باعث برگشت حساسیت دو تا ۱۶ برابری در۴۰درصد از سویه‌ها نسبت به سیپروفلوکساسین شد و می‌توان این احتمال را داد که وجود این پمپ‌ها می‌تواند در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین نقش داشته باشند، اما ۶۰درصد از سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، هیچ کاهشی را در MIC پس از استفاده از CCCP نشان ندادند. در نگاه اول می‌توان نتیجه گرفت که CCCP در مهار پمپ مؤثر نبوده است. این مسئله را می‌توان چنین توجیه کرد که عملکرد مهارکننده‌ها در مقابل پمپ‌های دفعی مختلف ممکن است اختصاصی باشد و به‌عنوان مثال این امکان وجود دارد که استفاده از مهارکننده دیگری مثل PABN (Phe-Arg-B-naphtylamine) ممکن بود، حساسیت سیپروفلوکساسین را به سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین برگرداند(۲۴). اما وجود سویه‌های که تغییری در MIC سیپروفلوکساسین آن‌ها ایجاد نشد، می‌تواند موئد این مطلب باشد که احتمال دارد مکانیسم‌های مقاومتی دیگری در این سویه‌ها وجود دارد که قوی‌تر از پمپ‌های دفعی عمل کرده و مقاومت به سیپروفلوکساسین را باعث شود(۲۴)، مثلاً موتاسیون در پروتئین هدف DNA جیراز و آنزیم توپوایزومراز IVیا دارا بودن qnr که مقاومت به سیپروفلوکساسین را ایجاد می‌کنند (۲۵).

پاکزاد و همکارانش (۱۶) گزارش کردند که پس از استفاده از CCCP به‌عنوان مهارکننده، کاهش ۳۲-۲ برابری MIC در ۴۷/۵درصد از سویه‌های کلبسیلاپنومونیه مقاوم به سیپروفلوکساسین مشاهده کردند (۱۶)که می‌تواند تأییدی بر نتیجه مطالعه حاضر باشد (۴۰درصد کاهش ۱۶-۲ برابری). کاهش MIC آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سیپروفلوکساسین، پس از استفاده از مهارکننده CCCP، در مطالعه‌های دیگری از جمله Abdi و همکاران(۲۶)، Hasdemir و همکاران(۲۷)، Aathitan و همکاران (۲۸) و Rana و همکاران(۲۹) نیز گزارش شده است.

برای بررسی ارتباط بین افزایش بیان *OqxAB*، AcrAB با MDR بودن، یافته‌های مقاومت دارویی برای هر سویه کلبسیلاپنومونیه بررسی شد و میزان بیان ژن‌های *oqxA* و *acrA* از طریق روش Real-time-PCR مشخص شد. آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده شامل گروه‌های: آمینوگلیکوزید، فلوروکینولون، پنی‌سیلین، کربابنم، سفالوسپورین‌های نسل سوم، منوباکتام، سولفانامید و کلیستین بود. با توجه به اینکه MDR به سویه‌هایی اطلاق می‌شود که به سه گروه آنتی‌بیوتیکی یا بیشتر مقاوم باشد(۲۵)، ایزوله‌های کلبسیلاپنومونیه به دو گروه MDR (۷۹/۵درصد) و non-MDR (۲۰/۵درصد) تقسیم شدند. از کل نمونه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین ۵۵ (۹۶/۵درصد) ایزوله فنوتیپ MDR را نشان دادند. از این ۵۵ نمونه، ۲۳ (۴۱/۸درصد) ایزوله در حضور مهارکننده CCCP، کاهش ۱۶-۲ برابری در MIC سیپروفلوکساسین را نشان دادند. ۲ (۳/۶درصد) نمونه مقاوم به سیپروفلوکساسین، فنوتیپ MDR را نشان ندادند، ولی در حضور CCCP، کاهش ۴-۲ برابری MIC را داشتند.

Real-Time-PCR در فنوتیپ‌های MDR، بیان پمپ را آشکار کرد. Michelle و همکارانش در مطالعه‌ای که روی ایزوله‌های کلبسیلاپنومونیه MDR انجام دادند، افزایش بیان پمپ‌های AcrAB در این سویه‌ها را گزارش کردند(۳۰). باوجود اثر مستقیم پمپ‌های دفعی روی مقاومت فلوروکینولون‌ها و برخی از آنتی‌بیوتیک‌های دیگر، الگوی مقاومتی اکثر آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده تحت تأثیر بیان پمپ‌ها

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-02-15]

نبودند. این مسئله احتمال ارتباط بین مقاومت به فلوروکینولون‌ها و MDR را نشان می‌دهد، چون فلوروکینولون‌ها زیاد تجویز شدند(۳۰) بنابراین این امر فشار انتخابی قوی برای مقاوم شدن باکتری‌ها به این گروه از آنتی‌بیوتیک‌هاست. اگر برخورد با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها قبل از فلوروکینولون‌ها پیش می‌آمد، نمونه‌هایی که به دنبال استفاده از فلوروکینولون‌ها افزایش بیان پمپ داشتند، به احتمال هم مقاوم به فلوروکینولون‌ها می‌شدند و هم فنوتیپ MDR را نشان می‌دادند. پس این پمپ‌ها باعث ایجاد سویه MDR نیستند، ولی می‌توانند به‌عنوان بیومارکری برای سویه‌های MDR باشند(۳۰).

با توجه به افزایش باکتری‌های مقاوم به درمان و هزینه‌های مالی و جانی که کشورها در درمان چنین عفونت‌هایی می‌پردازند، لزوم دستیابی به درمان‌های جدید احساس می‌شود. ساخت آنتی‌بیوتیک‌های جدید با کمترین عوارض جانبی و بیشترین اثربخشی مستلزم مطالعه و تحقیق در مدت زمان طولانی و صرف هزینه‌های بالاست. به همین دلیل امروزه استفاده از مهارکننده‌ها، به‌عنوان روشی نوین در درمان مورد توجه قرار گرفته است. اما با وجود تعداد زیاد مهارکننده‌های سنتتیک یا طبیعی برگرفته از عصاره گیاهان، هیچ‌کدام برای استفاده کلینیکی تأیید نشده‌اند. با توجه به گزارش‌هایی که حاکی از اثر مهارکننده‌ها روی کاهش MIC آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد، مطالعه‌های مرتبط با آن‌ها، ضروری به نظر می‌رسد. همچنین تشخیص ژن‌های مقاومت و یافتن راه‌حلی برای پیشگیری و کاهش مقاومت‌ها ضروری است. این مهم می‌تواند از طریق کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌های متداول و مطالعه‌های بیشتر در زمینه اثرگذاری و عوارض جانبی استفاده از مهارکننده‌های پمپ‌ها به جای آنتی‌بیوتیک‌ها حاصل شود.

منـابع:

1. Hadžić S, Čuštović A, Smajlović J, Ahmetagić S. Distribution of nosocomial infections caused by Klebsiella pneumoniae ESBL strain. J Environ Occup Sci 2012; 1 (3): 141-146

2. Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, et al. Community-acquired Klebsiella pneumoniae bacteremia: global differences in clinical patterns. Emerg Infect 2002; (8): 160-6.

3. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases..J Clin Microbiol. 2012; 50(12):3877-80.

4. Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998; 11 (4): 589-603.

5-Peña C, Pujol M, Ardanuy C. et al. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1998; (42): 53-8.

6. Mc Murry, Petrucci RE, Levy SB. Active efflux of tetracyclin encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in E. coli. Proc Natt Acad Sci USA 1980; (77): 3974-3977

7. Ball PR, Shales SW, Chopra I. Plasmid-mediated tetracycline resistance in E. coli involves increased efflux of antibiotic. Biochem Biophys Res commun 1980; (93): 74-81

8-Pool K. Efflux pumps as anyimicrobiol resistance mechanisms. Ann Med 2007; (39): 162-176

9. Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. Virulence. 2013; 4 (3): 223-229 doi: 10. 4161/ viru. 23724

10. Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Armstrong ES. Detection of methyltransferases conferring high-level resistanceto aminoglycosides in Enterobacteriaceae from Europe,North America, and Latin America. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52 (5): 1843–1845 doi: 10. 1128/AAC. 01477-07

11. Andres P, Lucero C, Soler-Bistué A, Guerriero L, Albornoz E, Tran T, et al. Differential distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical Enterobacteria with unusual phenotypes of quinolone susceptibility from Argentina. Antimicrob Agents Chemother 2013;57 (6): 2467–2475 doi: 10. 1128/AAC. 01615-12

12- Hashemi A, Fallah F, Taherpour A, Goudarzi H, Erfanimanesh S, Taki E. Evaluation of Genetic Pattern and Determination of *oqxA* Gene Expression Levels among Clinical Isolates of Klebsiella Pneumoniae Strains. J Mazandaran univ Med sci 2014; 24 (119): 48-61

13. Swick MC, Morgan-Linnell S, Carlson K, Zechiedrich L. Expression of Multidrug Efflux Pump Genes *acrA*B-tolC, mdfA, and norE in Escherichia coli Clinical Isolates as a Function of Fluoroquinolone and Multidrug Resistance. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55 (2): 921–924

14. Veleba M, Higgins PG, Gonzalez G. et al. Characterization of RarA, a novel AraC family multidrug resistance regulator in Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother 2012; (56): 4450–8

15. Bialek-Davenet S, Lavigne JP, Guyot K, Mayer N, Tournebize R, Brisse S, et al. Differential contribution of AcrAB and *OqxAB* efflux pumps to multidrug resistance and virulence in Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Chemother 2014; doi: 10. 1093/jac/dku340

16. Pakzad I, Karin MZ, Taherikalani M, Boustanshenas M, Lari AR. Contribution of AcrAB efflux pump to ciprofloxacin resistance in Klebsiella pneumoniae isolated from burn patients. GMS Hygiene and Infection Control 2013; 8 (2).

17. Bialek-Davenet S, Lavigne JP, Guyot K, Mayer N, Tournebize R, Brisse S. et al. Efflux pumps AcrAB and *OqxAB* and porins OmpK35 and Ompk36: relationship, regulation and impact on multidrug resistance and virulence in Klebsiella pneumonia. Antimicrob. Agents Chemother 2010; (54): 4373-8

18. Sumithra T G, Chaturvedi V K, Cherian S, Krishnan B, Jacob SS. Efflux pump inhibitors for antibacterial therapy. JIVA 2012; 10 (1): 69-75

19. Rana T, Singh S, Kaur N, pathania K, Farooq U. A Review on Efflux Pump Inhibitors of Medically Important Bacteria from Plant Sources. Int. J. Pharm. Sci 2014; 26 (2): 101-111

20. Levy SB. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. Antimicrob chemother 2002; (49): 25-30

21. Rodriguez Martinez JM, Diaz de Alba P, Biriales A. et al. Contribution of *OqxAB* efflux pumps to quinolone resistance in ESBL Klebsiella pneumoniae. Antimicrob chemother 2013; 68 (1): 68-73

22. Ruzin A, Immerman FW, Bradford PA. Real- Time PCR and statistical analyses of *acrA*B and ramA expression in clinical issolates of Klebsiella pneumoniae. Antimicrob agents and chemother 2008; 52 (9): 3430-3432

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-02-15]

23. Yuan J, Xu X, Guo Q, Zhao X, Ye X, Guo Y, et al. . Prevalence of the *oqxA*B gene complex in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli clinical isolates. Antimicrob Chemother doi: 10. 1093/jac/dks086

24. Zhong X, Xu H, Chen D, Zhou H, Hu X,Cheng G.
First Emergence of *acrA*B and *oqxA*B Mediated Tigecycline Resistance in Clinical
Isolates of Klebsiella pneumoniae Pre-Dating the Use of Tigecycline in a Chinese
Hospital. PLoSONE 2014; 9 (12): e115185. doi: 10. 1371/journal. pone.

25. Falagas M E, Koletsi PK. Bliziotis IA. The diversity of
definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR)
Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa. J. Med. Microbiol 2006; (55): 1619–1629

26. Abdi A, Mohammadi M, Agha Alaei Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilmproducing Pseudomonas aeruginosa. Int J Antimicrob Agents 2006; (27): 196–200

27. Hasdemir UO, Chevalier J, Nordmann P, Pagès 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.

28. 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 2011; 30 (6): 745-52

29. Rana T, Kaur N, Farooq U, Khan A, Sngh S. Efflux as an arising cause of drug resistance in Punjab- India. IJBPAS 2015; 4 (9): 5967-5979

30. Swick MC, Morgan-Linnel SK, Carlson KM, Zechiedrich L. Expression of Multidrug Efflux Pump Genes *acrA*B-tolC, mdfA, and norE in Escherichia coli Clinical Isolates as a Function of Fluoroquinolone and Multidrug Resistance. Antimicrob agents and chemother 2011; 921–924, doi: 10. 1128/AAC. 00996-10

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-02-15]