

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

Arezoo Saadatian Farivar¹, Jamileh Nowroozi*¹, Gita Eslami², Azar Sabokbar¹, Ali Hashemi²

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

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های کلبسیلاپنومونیه و میزان بیان ژن‌های *acrA* و *oqxA* با استفاده از Real-Time PCR

آرزو سعادتیان فریور^۱، جمیله نوروزی^{۱*}، گیتا اسلامی^۲، آذر سبکبار^۱، علی هاشمی^۲

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

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۲/۲۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۹/۲۹

چکیده

سابقه و هدف: افزایش مقاومت ضد میکروبی در باکتری‌های گرم منفی به خصوص خانواده اتروباکتریاسه به مشکل جهانی تبدیل شده است. کلبسیلاپنومونیه پاتوژن فرصت طلب گرم منفی است که به دلیل ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها و مقاومت آنتی بیوتیکی امروزه مورد توجه قرار گرفته است. پمپ‌های ترشحی به عنوان یکی از مکانیزم‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در این باکتری مطرح است. بنابراین هدف از این مطالعه تشخیص ژن‌های *acrA*, *acrB*, *oqxA*, *oqxB* تعیین میزان بیان ژن‌های *acrA*, *oqxA* و بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در میان ایزوله‌های بالینی کلبسیلاپنومونیه جدا شده از بیمارستان‌های تهران بوده است. **روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی، تعداد ۸۳ کلبسیلاپنومونیه از بیماران مراجعه کننده به سه بیمارستان در تهران جمع آوری شدند. تست حساسیت آنتی بیوتیکی با روش انتشار از دیسک انجام شد. وجود ژن‌های مقاومت *acrA*, *oqxA*, *oqxB* با استفاده از تکنیک PCR بررسی شد. از *CCCP* به عنوان مهارکننده استفاده شد و سپس میزان بیان ژن‌های *acrA* و *oqxA* از طریق *Real-time PCR* بررسی شد.

یافته‌ها: اکثر نمونه‌ها دارای پمپ‌های *OqxAB* (۹۶ درصد) و *AcrAB* (۹۷ درصد) 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. **نتیجه گیری:** وجود ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی، 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 می‌کند.

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

مقدمه:

آبسه‌های کبدی 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 انتگران‌ها به دست آورده‌اند (۲). از جمله ژن‌های مقاومت می‌توان به ژن مقاومت به کینولون‌ها (۳)، ژن‌های

کلبسیلاپنومونیه باسیل گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، غیرمتحرک و از خانواده اتروباکتریاسه است. این باکتری به عنوان پاتوژن فرصت طلب و عامل عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی است. از جمله عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌توان به پنومونی، عفونت‌های ادراری، سپتیسمی، عفونت زخم، عفونت‌های تنفسی،

نویسنده مسئول: جمیله نوروزی

پست الکترونیک: nowroozij@yahoo.com

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 مسدود کردن 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 امکان پذیر است (۱۲). بنابراین هدف از این مطالعه نقش ژن‌های *acrB*، *acrA*، *oqxAB*، *oqxAX* در میان ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه جداسده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های مفید، طالقانی و امام خمینی بوده است. همچنین بررسی میزان بیان ژن‌های *acrA* و *oqxAX* 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 کلبسیلا پنومونیه از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های مفید، طالقانی و امام خمینی 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، MRVP، TSI، SIM، اوره و سیترات و تست اکسیداز برای تأیید کلبسیلا پنومونیه انجام شد. سپس باکتری‌ها در محیط TSB (Tryptic 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 مولر هینتون آگار، نسبت به ۱۶ دیسک آنتی‌بیوتیکی (Mast Group، UK) افلوکساسین ۵μgr، OFx، سیپروفلوکساسین ۵μgr، CIP، نورفلوکساسین ۱۰μgr، NOR، جنتامایسین ۱۰μgr، GM، آمیکاسین ۳۰μgr، AK، استرپتومایسین ۱۰μgr، HLS، توبرامایسین ۱۰μgr، TOB، کانامایسین ۳۰μgr، K، تیکارسیلین ۷۵μgr، TIC، سفوتاکسیم، CTX، ۳۰μgr، سفتازیدیم ۳۰μgr، CAZ، آزترنوم ۳۰μgr، ATM، ایمپینم ۱۰μgr، IMI، تری متوپریم ۵μgr، TR، کلرامفنیکل ۳۰μgr، C، کلیستین ۱۰μgr، CO انجام و از E. coli ATCC ۲۵۹۲۲ به عنوان 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*، *oqxAB*، *oqxAX*:

حضور ژن‌های *acrB*، *acrA*، *oqxAB*، *oqxAX* 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 (eppendorf Master Cycler 25μL) شامل 12/5μL از مخلوط اصلی (master mix 2x) شرکت سیناکلون، کرج-ایران (CAT. NO: PR8252C)، 0/4 mM، 3mM mgCl2 از هر کدام از داکسی نوکلئوتیدتری فسفات و 0/۰۸ واحد Taq DNA پلیمرز، 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 درجه سانتی‌گراد برای ۵' و به دنبال آن ۳۶ چرخه شامل دناتوره شدن ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵"، annealing (وابسته به پرایمر استفاده شده)، طولیل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵" و طولیل شدن نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد 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

16SrRNA متیل ترانسفراز، بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) اشاره کرد (۴). از طرف دیگر، پمپ‌های دفع آنتی‌بیوتیک، مکانیسم شناخته شده‌ای از مقاومت باکتری‌هاست که نخستین بار به عنوان 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^۱، MFS^۲، MATE^۳، SMR^۴، RND^۵، DMT^۶ (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 غیر ضروری از میان غشای سیتوپلاسمی عمل می‌کنند (۸). در مقابل، در باکتری‌های گرم مثبت، پمپ‌های دفعی ABC و MFS 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 کلبسیلا پنومونیه هم گزارش شده است (۱۰). پمپ دفعی *OqxAB* از دو ژن *oqxAB* و *oqxAX* تشکیل شده که هم روی کروموزوم و هم روی پلاسمید قرار دارند (۱۱ و ۱۲). این پمپ‌ها عامل ایجاد مقاومت در برابر فلوروکینولون‌ها و بیوسایدی‌های 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 خمیر دندان وجود دارد، در سویه‌های حاوی پمپ *OqxAB* گزارش شده است (۱۳). به تازگی دو ژن در ارتباط با اپرون *oqxAB* روی کروموزوم کلبسیلا پنومونیه 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 *oqxAB* می‌شود (۱۵).

پمپ ترشحی *AcrAB* از پمپ‌های اصلی ایجادکننده مقاومت ذاتی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه 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 می‌آید انتخابی مناسب در درمان عفونت‌های ناشی از کلبسیلا پنومونیه باشد، در مطالعه‌های بسیاری، افزایش مقاومت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های فوق گزارش شده است (۱۳). این مسئله مشکلات جدی در درمان انسان‌ها به وجود آورده و انتخاب‌های درمانی را محدود کرده است. در کلبسیلا پنومونیه 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 *oqxAB* که در نتیجه جهش در ژن *oqxR* است، به مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه 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

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

جدول ۲. پرایمرهای استفاده شده در Real Time PCR	
<i>oqx</i> A-F	PCRGGCAAGAGCCCCAAAAACGCAGG
<i>oqx</i> A-R	GGGGCGTCATTGTTGGTG
RPOB-F	AACGTCGTATCTCCGCACTC
RPOB-R	CGATACGGCGTCTCAAGGAA
<i>acr</i> A-F	ATTAACCCTGACGCCCTGCT
<i>acr</i> A-R	TGCGCTTTTACCTGCACACC
<i>rrs</i> E-F	TTGACGTTACCCGCAGAAGAA
<i>rrs</i> E-R	GCTTGACCTCCGTATTACC

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 (۳۵ درصد) باکتری از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان طالقانی، ۲۱ (۲۵/۳ درصد) باکتری از بیمارستان مفید، ۳۹/۸ (۳۹/۸ درصد) 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 مراجعه‌کننده 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 مراجعه‌کننده 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٪)
ایمپینم	۳۸ (۴۵/۸٪)	۷ (۸/۴٪)	۳۸ (۴۵/۸٪)
تری‌متوپریم	۱۷ (۲۰/۵٪)	۴ (۴/۸٪)	۶۲ (۷۴/۷٪)
کلروامفنیکل	۴۶ (۵۵/۴٪)	۱۹ (۲۲/۹٪)	۱۸ (۲۱/۷٪)
کلیستین	۶۹ (۸۳/۱٪)	—	۱۴ (۱۶/۹٪)

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

<i>oqx</i> A-F	GGCAAGAGCCAAAAACGCAGG
<i>oqx</i> A-R	GGGGCGTCATTGTTGGTG
<i>oqx</i> B-F	CGAAGAAAGACCTCCACCC
<i>oqx</i> B-R	CGCCGCCAATGAGATACA
<i>Acr</i> A-F	ATTAACCCTGACGCCCTGCT
<i>Acr</i> A-R	TGCGCTTTTACCTGCACACC
<i>Acr</i> B-F	CGTCTCCATCAGCGACATTAAC
<i>Acr</i> B-R	GAACCGTATTCCCAACGCGA

روش CCCP:

حداقل غلظت بازدارندگی یا Minimum inhibitory concentration (MIC) سیپروفلوکساسین با استفاده از روش میکرودیلوژن برات 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:

از RNA 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 RNA های 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 RT-PCR، annealing انجام شد. در جدول ۲ پرایمرهای استفاده شده برای ژن‌های *oqx*A، *acr*A نشان داده شده است. سپس Real time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت شرکت Genet bio CAT. NO: Q9210 کره جنوبی به‌صورت زیر انجام شد: ۱۰ میکرولیتر از Prime Qmaster mix (2x) with syber green، پنج میکرولیتر از Depc water، یک میکرولیتر از پرایمر Forward، یک میکرولیتر 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 *oqx*A (۲۱) از ژن‌خانه‌دار *PROB* (۲۲) و برای ژن *acr*A از ژن‌خانه‌دار *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

گزارش کردند (۲۳). نتایج مطالعه حاضر که مقاومت ۶۸/۷ درصد به سیپروفلوکساسین را نشان داد و اینکه ۹۶ درصد سویه‌ها دارای ژن‌های *oqx*A و *oqx*B بودند با نتایج Yuan مطابقت دارد. همچنین ۹۷ درصد از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه دارای ژن *acr*A بودند. در مطالعه پاکزاد و همکارانش تمام سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سیپروفلوکساسین در PCR ژن *acr*A را دارا بودند (۱۶) که با نتیجه مطالعه حاضر هماهنگ است.

همانطور که گفته شد در مواقعی، مقاومت آنتی بیوتیکی 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 آنتی بیوتیک‌ها هستند (۲۴). بنابراین برای بررسی اینکه آیا وجود پمپ‌ها در کلبسیلا پنومونیه 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 در ۴۰ درصد 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 ۶۰ درصد 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 به عنوان مثال این امکان وجود دارد که استفاده از مهارکننده دیگری مثل PABN (Phe-Arg-B-naphthylamine) ممکن بود، حساسیت سیپروفلوکساسین را به سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین برگرداند (۲۴). اما وجود سویه‌های که تغییر در MIC سیپروفلوکساسین آن‌ها ایجاد نشد، می‌تواند مؤید 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 توپویازومراز IV یا دارا بودن *qnr* که مقاومت به سیپروفلوکساسین را ایجاد می‌کنند (۲۵).

پاکزاد و همکارانش (۱۶) گزارش کردند که پس از استفاده از CCCP به عنوان مهارکننده، کاهش ۳۲-۲ برابری MIC در ۴۷/۵ درصد از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سیپروفلوکساسین مشاهده کردند (۱۶) که می‌تواند تأییدی بر نتیجه مطالعه حاضر باشد (۴۰ درصد کاهش ۱۶-۲ برابری). کاهش MIC آنتی بیوتیک‌ها 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 *AcrAB*، *OqxAB* با MDR بودن، یافته‌های مقاومت دارویی برای هر سویه کلبسیلا پنومونیه بررسی شد و میزان بیان ژن‌های *acr*A و *oqx*A از طریق روش Real-time-PCR مشخص شد. آنتی بیوتیک‌های استفاده شده شامل گروه‌های: آمینوگلیکوزید، فلوروکینولون، پنی‌سیلین، کرباپنم، سفالوسپورین‌های نسل سوم، منوآکتام، سولفانامید و کلیستین بود. با توجه به اینکه MDR به سویه‌هایی اطلاق می‌شود که به سه گروه آنتی بیوتیکی یا بیشتر مقاوم باشد (۲۵)، ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به دو گروه MDR (۷۹/۵ درصد) و non-MDR (۲۰/۵ درصد) تقسیم شدند. از کل نمونه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین ۵۵ (۹۶/۵ درصد) ایزوله فنوتیپ MDR را نشان دادند. از این ۵۵ نمونه، ۲۳ (۴۱/۸ درصد) ایزوله در حضور مهارکننده CCCP، کاهش ۱۶-۲ برابری در MIC سیپروفلوکساسین را نشان دادند. ۲ (۳/۶ درصد) 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 کلبسیلا پنومونیه MDR انجام دادند، افزایش بیان پمپ‌های *AcrAB* در این سویه‌ها را گزارش کردند (۳۰). با وجود اثر مستقیم پمپ‌های دفعی روی مقاومت فلوروکینولون‌ها و برخی از آنتی بیوتیک‌های دیگر، الگوی مقاومتی اکثر آنتی بیوتیک‌های استفاده شده تحت تأثیر بیان پمپ‌ها

بود. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی 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 ضد میکروبی استفاده شده در این مطالعه (جز کلیستین) هم مقاوم بودند.

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

نتایج حاصل از PCR ژن‌های *acrB*, *acrA*, *oqx*B, *oqx*A

روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نشان داد که ۹۶ درصد از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه دارای ژن‌های *oqx*A و *oqx*B بودند. همچنین ۹۷ درصد از سویه‌های جدا شده حاوی ژن‌های *acr*B و *acr*A بودند. همه سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها (افلوکساسین، سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین) جز سه مورد دارای ژن‌های *oqx*B و *oqx*A بودند. همچنین این سویه‌های مقاوم جز در دو مورد، بقیه وجود *acr*B و *acr*A را هم نشان دادند.

نتایج CCCP:

همانطور که گفته شد برای آشکار شدن 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 $25 \mu\text{g/mL}$ CCCP مؤید این مطلب بود که مهارکننده در این غلظت به تنهایی اثر ضد میکروبی ندارد.

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

نتایج Real-time PCR:

واضح است که ارتباطی بین مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها و حضور بعضی ژن‌ها وجود دارد. برای تعیین نقش ژن‌های *oqx*A و *acr*A در مقاومت به فلوروکینولون‌ها به ویژه سیپروفلوکساسین، از روش Real-time PCR استفاده شد. در مطالعه حاضر ۶۸/۷ درصد از ایزوله‌ها مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۷/۲ درصد نیمه حساس و ۲۴/۱ درصد به سیپروفلوکساسین حساس بودند. همانطور که گفته شد نمونه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین به دو دسته تقسیم شدند. دسته اول ایزوله‌هایی که با مهارکننده، 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 تغییر در MIC سیپروفلوکساسین در حضور مهارکننده را نشان داده بودند، حاکی از افزایش چهار برابری بیان *acr*A و ۲/۳ برابری *oqx*A نسبت به سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه 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 سیپروفلوکساسین مشخص می‌شود.

بحث:

تحقیق نشان داد بیشترین حساسیت به آنتی بیوتیک‌های کلیستین، استرپتومایسین، کلرامفنیکل و ایمینیم نشان داده شد. مقاومت فلوروکینولون‌ها از جمله سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و افلوکساسین برتریب ۶۸/۷ درصد، ۶۶/۳ درصد، ۶۵ درصد بود. Yuan و همکارانش (۲۳) مقاومت به سیپروفلوکساسین را در ۶۶ درصد و حضور ژن‌های *oqx*B و *oqx*A را در نمونه‌های مقاوم به کلبسیلا پنومونیه ۱۰۰ درصد

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.

منابع:

1. Hadžić S, Čustović 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 tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *E. coli*. *Proc Natl 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 antimicrobial 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 resistance to 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-Bisúe A, Guerriero L, Alborno 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*

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

2013;57 (6): 2467-2475 doi: 10. 1128/AAC. 01615-12

- 12- Hashemi A, Fallah F, Taherpour A, Goudarzi H, Erfanimesh S, Taki E. Evaluation of Genetic Pattern and Determination of *oqx A* 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 *acrAB*-*tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* Clinical Isolates as a Function of Fluoroquinolone and Multidrug Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55 (2): 921-924
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 pneumoniae*. *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, Biriates 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 *acrAB* and *ramA* expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob agents and chemother* 2008; 52 (9): 3430-3432

23. Yuan J, Xu X, Guo Q, Zhao X, Ye X, Guo Y, et al. . Prevalence of the *oqxAB* 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 *acrAB* and *oqxAB* Mediated Tigecycline Resistance in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Pre-Dating the Use of Tigecycline in a Chinese Hospital. *PLoS ONE* 2014; 9 (12): e115185. doi: 10. 1371/journal. pone.
25. Falagas M E, Koletsis P K, Bliziotis I A. 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 U O, Chevalier J, Nordmann P, Pagès J M. 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 G L. 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, Singh S. Efflux as an arising cause of drug resistance in Punjab- India. *IJB PAS* 2015; 4 (9): 5967-5979
30. Swick M C, Morgan-Linnell S K, Carlson K M, 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 and chemother* 2011; 921–924, doi: 10. 1128/AAC. 00996-10