ORIGINAL ARTICLE

Mutations of GyrA Gene in Fluoroquinolone Resistant Isolates of Pseudomonas aeruginosa in Guilan Province

Forough Rahnamay Roodposhti[1],
Najmeh Ranji[2],
Leila Asadpour[3]

[1] MSc in Microbiology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

(Received January 6, 2015 ; Accepted May 9, 2016)

Abstract

Background and purpose: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen in patients with chronic respiratory disease or in immunocompromised hosts. This bacterium shows intrinsic and acquired resistance to diverse antimicrobial agents. An important mechanism of resistance to fluoroquinolones in *P. aeruginosa* is the mutation in *gyrA*, a subunit of topoisomerases II. The aim of this study was to investigate the *gyrA* mutations in ciprofloxacin resistant isolates in Guilan province.

Materials and methods: In this cross-sectional study, 44 *P. aeruginosa* strains were isolated from different clinical samples such as burn, urine and respiratory secretions identified by biochemical tests. The antibiotic resistance and susceptibility of strains was determined by Kirby Bauer method. Chi-square test was carried out and *P* value of < 0.05 was considered statistically significant. PCR-sequencing was carried out to assess the *gyrA* mutations in drug resistant isolates. CLC main workbench v3.5 and BLAST softwares was used to compare *gyrA* sequence in resistant isolates with reference gene in PAO1.

Results: The highest MIC of ciprofloxacin in some strains was >512 µg/ml. T83I and D87Y mutations were determined in *gyrA* gene in resistance isolates. Also, this study showed no relationship between MIC of ciprofloxacin in resistant isolates and mutation in *gyrA.*

Conclusion: These results demonstrated that *gyrA* mutations are one of the most important mechanisms of resistance to ciprofloxacin in clinical strains of *P. aeruginosa* in Guilan. It is believed that mutations in *gyrA* alongside several genes that are involved in development of resistance have increased the resistance in different strains.

Keywords: *Pseudomonas aeroginosa*, Quinolone, *gyrA*, Mutation

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(139): 84-92 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۳۹ مرداد سال ۱۳۹۵ (۹۲-۸۴)

جهش های ژن *gyrA* در جدایه های سودوموناس آئروزینوزا مقاوم به فلوروکوئینولون ها در استان گیلان

فروغ رهنمای رودپشتی[۱]
نجمه رنجی[۲]
لیلا اسدپور[۳]

چکیده

سابقه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن مهم فرصت طلب در افراد مبتلا به بیماری تنفسی مزمن یا افراد با نقص ایمنی است. این باکتری مقاومت ذاتی و اکتسابی به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان می‌دهد. یک مکانیسم مهم مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها در سودوموناس آئروژینوزا جهش در *gyrA*، یک زیرواحد توپوایزومراز نوع II می باشد. هدف از این مطالعه بررسی جهش‌های ژن *gyrA* در جدایه های مقاوم به دارو در استان گیلان بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، ۴۴ جدایه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های مختلف از جمله سوختگی، ادرار و ترشحات تنفسی به کمک روش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. حساسیت و مقاومت به آنتی بیوتیک به روش کربی بور تعیین گردید. از آزمون χ^2 بهره برده شد و برای معنی‌دار بودن نتایج $P < ۰/۰۵$ لحاظ شد. برای بررسی جهش های ژن *gyrA* در جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین، PCR- سکونسینگ انجام شد. نرم افزار CLCmain workbench v3.5 و نرم افزار بلاست (BLAST) برای مقایسه توالی ژن gyrA در جدایه‌های مقاوم با ژن رفرنس در PAO1 مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: بالاترین میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه‌ها MIC>512 µg/ml بود. دو جهش T83I و D87Y در ژن *gyrA* در جدایه‌های مقاوم شناسایی شد. هم‌چنین این مطالعه نشان داد که بین میزان MIC در جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین و جهش در ژن *gyrA* ارتباطی وجود ندارد.

استنتاج: این نتایج نشان می‌دهد که جهش در ژن *gyrA* یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه‌های کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا در گیلان بوده و به نظر می‌رسد جهش در *gyrA* به همراه چند ژن درگیر در ایجاد مقاومت، باعث افزایش مقاومت در جدایه‌های مختلف شده باشد.

واژه های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، کوئینولون، *gyrA*، جهش

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک علت شایع عفونت‌های بیمارستانی، قابلیت کسب مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را به به طور ذاتی و اکتسابی داراست(۲،۱). این باکتری به عنوان عامل عفونت‌های فرصت طلب

مولف مسئول: نجمه رنجی: رشت، گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت E-mail: n_ranji@iaurasht.ac.ir
۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
۲. استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
۳. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۱۰/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۱۱/۳ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۲/۲۰

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

بیمارستانی مانند زخم، عفونت مجاری ادراری و عفونت دستگاه تنفسی گزارش شده است(۳). فلوروکوئینولون‌ها یک کلاس مهم از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان عفونت با سودوموناس هستند(۴). فلوروکوئینولون‌ها به‌طور گسترده‌ای جهت درمان عفونت‌های بیمارستانی استفاده می‌شوند(۵). کوئینولون‌ها با مهار آنزیم‌های DNA جیراز و توپوایزومراز IV در باکتری باعث مهار رونویسی و همانند سازی می‌شوند(۴). در باکتری‌های گرم منفی، DNA جیراز و در باکتری‌های گرم مثبت توپوایزومراز IV هدف اصلی کوئینولون می‌باشد(۶). سودوموناس آئروژینوزا به دلیل نفوذپذیری پایین غشای خارجی خود و حضور چندین سیستم پمپ مواد، به طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است. این ویژگی‌ها در مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی که در درمان عفونت با این ارگانیسم‌ها به کار می‌روند، کمک می‌کند(۷). مقاومت سودوموناس آئروژینوزا به فلوروکوئینولون می‌تواند به واسطه جهش در DNA جیراز و توپوایزومراز IV، کاهش نفوذپذیری دیواره سلول و افزایش بیان سیستم های افلاکس پمپ به وجود آید(۹،۸). در این بین تغییر در DNA جیراز یا توپوایزومراز IV ناشی از جهش در ژن کدکننده DNA جیراز (*gyrA*) و توپوایزومراز IV (*parC*) نقش عمده‌ای در مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها در میان جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا ایفا می‌کنند(۱۳-۱۰). استفاده خارج ازنظارت فلوروکوئینولون‌ها می‌تواند موجب افزایش سویه‌های دارای جهش در ژن *gyrA* (کدکننده زیرواحد DNA A جیراز)- آنزیم هدف فلوروکوئینولون‌ها- شود(۶).

مصرف بیش از حد و خودسرانه آنتی‌بیوتیک در درمان و هم‌چنین وقوع جهش و انتقال افقی ژن‌های مقاومت از جمله دلایل افزایش مقاومت به دارو در عفونت‌های مختلف محسوب می‌شود. هرچند سودوموناس آئروژینوزا جزء باکتری‌های دارای مقاومت ذاتی به انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد، اما وقوع جهش در بعضی از ژن‌ها و یا کسب ژن‌های مقاومت به دارو در این باکتری باعث افزایش مقاومت در نمونه‌های بیمارستانی شده است. با وجود مقاومت به دوز بالای آنتی‌بیوتیک‌های روتین کشور به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های بیمارستانی، هم‌چنان از این آنتی‌بیوتیک‌ها در افراد مختلف استفاده می‌شود. در حالی که شناسایی عامل مقاومت در هر عفونت می‌تواند به درمان مؤثرتر و سریع‌تر فرد کمک نماید، اما با توجه به هزینه بالای چنین غربالگری‌هایی در هر فرد لازم است مطالعه بر روی یک جمعیت از بیماران صورت گیرد تا شایع‌ترین انواع مقاومت‌های ژنی شناسایی گردد و درمان در آینده نزدیک بر اساس شیوع مقاومت‌ها در بیماران انجام شود. با توجه به این که تا به حال در استان گیلان مکانیسم‌های مختلف مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا مورد ارزیابی قرار نگرفته بود، این مطالعه به هدف بررسی جهش‌های ژن gyrA انجام شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه مقطعی، در بازه زمانی یک ساله ۹۳-۹۴، نمونه‌های مختلف بالینی (سوختگی، تنفسی، ادرار و پروتز) از بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های سطح استان گیلان (بیمارستان ولایت، آریا، قائم و رازی و آزمایشگاه‌های مهر و رازی لاهیجان) جمع‌آوری گردید. ابتدا نمونه‌ها بر روی آگار خون دار کشت داده شدند و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. سپس شناسایی باکتری بر اساس مرفولوژی کلنی، بوی کلنی، تشکیل رنگدانه، تولید همولیزین بر روی آگار خون دار، مشاهده مرفولوژی باکتری در رنگ آمیزی گرم، مثبت بودن تست اکسیداز، رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد بر روی آگار مغذی، مثبت بودن تست حرکت، عدم تخمیر قندها در محیط‌های آگار مک کانکی و TSI انجام گرفت و تعداد ۴۴ جدایه به عنوان سودوموناس آئروژینوزا تشخیص داده شدند(۱۴). پس از جداسازی نمونه‌های سودوموناس، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

با انجام تست آنتی بیوگرام از طریق روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Baur-Kirby) و طبق استاندارد CLSI 2013[1] (۱۵)، با استفاده از دیسک های آنتی‌بیوتیکی (جنتامایسین(۱۰µg)، آمیکاسین(۳۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، ایمی‌پنم (۱۰µg)، آمپی‌سیلین (۱۰µg)، سفوتاکسیم (۳۰ µg) تعیین گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت High Media (هند) خریداری شد. بعد از ۲۴–۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت گردید. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد از آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین به روش براث مایکرودایلوشن بر اساس استاندارد CLSI 2013 استفاده شد. به این منظور جدایه‌ها در محیط کشت مولر هینتون براث در غلظت‌های مختلف دارو به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C نگهداری شد. سپس اولین لوله ای که عدم رشد در آن مشاهده شد، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. جهت تعیین MIC از سیپروفلوکساسین تزریقی (200mg/20ml) ساخت شرکت روناک دارو بهره برده شد. جهت واکنش PCR و تعیین توالی ژن *gyrA* ،در ابتدا جدایه ها در محیط مولر هینتون براث کشت داده شدند و به مدت ۲۴–۱۸ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. سپس از کیت TOP General Genomic DNA Purification (شرکت توپازژن، ایران) جهت استخراج DNA استفاده شد. برای تأیید استخراج، نمونه‌ها در ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند. بعد از حصول اطمینان از تشکیل تک باند، اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵µl با استفاده از کیت AccuPower® PCR PreMix (شرکت BIONEER، کره جنوبی) با افزودن DNA ژنومی، جفت پرایمر (۱۰۰ µM) و آب استریل به محلول PreMix (حاوی آنزیم، کوفاکتور و بافر مخصوص) آماده شد. سنتز پرایمرها (۵) توسط شرکت Bioneer صورت گرفت. واکنش PCR با استفاده از ترموسایکلر Labcycler 48 (SensoQuest GmbH، آلمان) طبق برنامه ذیل انجام شد: یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در ۹۲°C به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل در دمای ۹۲°C به مدت ۳۰ ثانیه،۵۲°C به مدت ۳۰ ثانیه ،۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه. توالی پرایمرها به صورت زیر است: پرایمر مستقیم '5'-GTGTGCTTTATGCCATGAG-3 و پرایمر برگشتی '5'-GGTTTCCTTTTCCAGGTC-3 (۵). بعد از اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR، نمونه‌ها با حفظ زنجیره سرمایی توسط شرکت تکاپو زیست (ایران، تهران) به شرکت Bioneer کشور کره جنوبی فرستاده شد. بعد از تخلیص محصولات PCR با طول ۲۸۷ جفت باز از روی ژل آگارز، نمونه ها توسط شرکت Bioneer تعیین توالی شد. سپس نتایج حاصل به کمک نرم‌افزار CLC main workbench v3.5 و نرم‌افزار آنلاین بلاست (BLAST) از نظر وجود جهش در نمونه‌های مقاوم نسبت به نمونه استاندارد رفرنس (PAO1) موجود در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفت.جهت بررسی معنی‌دار بودن نتایج تحقیق شامل موضع عفونت و هم سه وضعیت مقاوم، نیمه حساس و حساس به هر دارو از آزمون آماری $\chi 2$ بهره برده شد. برای معنی دار بودن نتایج $p <$ ۰/۰۵ لحاظ شد.

یافته ها

در این بررسی ۴۴ نمونه از بیمارانی که دچار عفونت به سودوموناس آئروژینوزا شده بودند، از بیمارستان‌های سطح استان گیلان جدا شد. ۲۳ باکتری از نمونه‌های ادراری (۵۲ درصد)، ۱۴ باکتری از موارد سوختگی (۳۲ درصد)، ۶ باکتری از ترشحات تنفسی (۱۴ درصد) و ۱ باکتری از نکروز بافتی (ناشی از پروتز) (۲ درصد) تهیه شد. به کمک آزمون آماری مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین محل عفونت سودوموناس آئروژینوزا در مبتلایان وجود ندارد. نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت این باکتری نسبت به ۶ آنتی‌بیوتیک

1. Clinical and Laboratory Standard institute

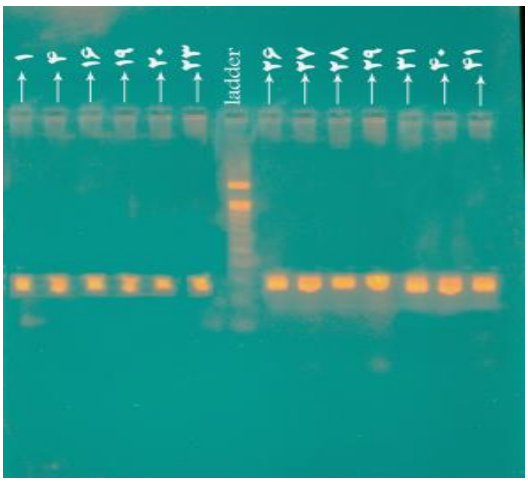
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

در جدول شماره ۱ نشان داده شده است که تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌های مقاوم، نیمه حساس و حساس مشاهده نگردید. در این آزمون بیش‌ترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین و بیش‌ترین حساسیت نسبت به آمیکاسین مشاهده شد. در این مطالعه از ۴۴ جدایه، ۱۴ جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند که از نظر میزان MIC مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه بالاترین میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین MIC>512 µg/ml در ۷/۲ درصد موارد و کم‌ترین میزان آن (MIC= 32µg/ml) در ۲۱/۴ درصد جدایه‌ها شناسایی شد.

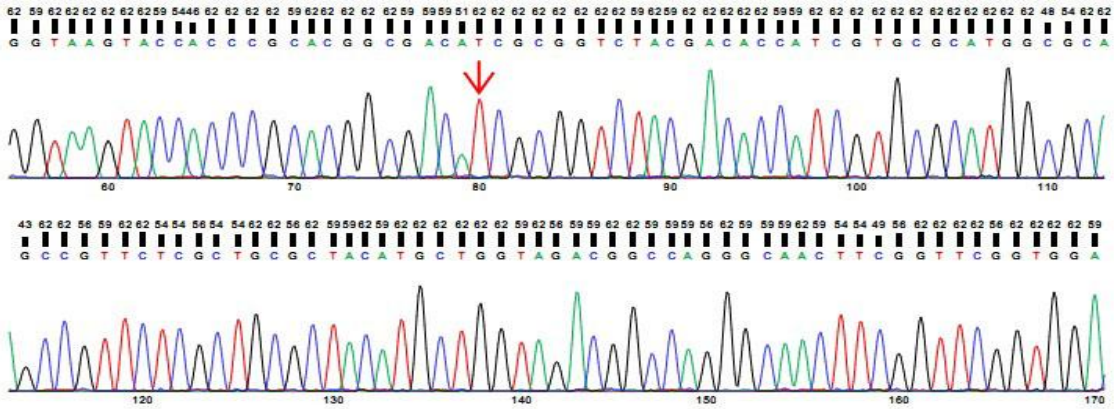
جدول شماره ۱: الگوی مقاومت ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های بالینی نسبت به آنتی بیوتیک

نوع آنتی بیوتیک	مقاوم تعداد (درصد)	نیمه حساس تعداد (درصد)	حساس تعداد (درصد)
سیپروفلوکساسین	۱۴(۳۱,۸)	۳(۶,۸۱)	۲۷(۶۱,۳۶)
آمیکاسین	۱۵(۳۳,۳۳)	۰(۰)	۲۹(۶۵,۹)
ایمی پنم	۲۰(۴۵,۴۵)	۱(۲,۲۷)	۲۳(۵۲,۲۷)
سفوتاکسیم	۲۷(۶۱,۳۶)	۷(۱۵,۹)	۱۰(۲۲,۷۲)
جنتامایسین	۲۰(۴۵,۴۵)	۴(۹,۰۹)	۲۰(۴۵,۴۵)
آمپی سیلین	۴۴(۱۰۰)	۰(۰)	۰(۰)

جهت بررسی مولکولی مقاومت به سیپروفلوکساسین، ژن *gyrA* در نمونه های جدا شده به روش PCR تکثیر شدند (تصویر شماره ۱) و بعد از اطمینان از تک بانده بودن محصولات PCR، نمونه‌ها مورد آنالیز به کمک سکونسینگ قرار گرفتند. نتایج سکونسینگ نشان داد که همه نمونه‌ها دارای جهش T83I (تصویر شماره ۲) بودند که در کدون ۸۳، آمینواسید ترئونین به ایزولوسین تبدیل شده بود که در اثر جهش بد، معنی، تغییر C به T در باز ۲۴۸م این ژن رخ داده بود. در ۶ نمونه یک جهش خاموش (پلی‌مورفیسم) در کدون ۱۳۲ مربوط به هیستدین، باز C در موقعیت ۳۹۶م این ژن تبدیل به T شده بود. هم‌چنین دو نمونه در کدون ۸۷، تغییر آسپارتیک اسید به تیروزین را داشتند (D87Y) که در اثر جهش بد معنی، G به T در باز ۲۵۹م رخ داده بود (تصویر شماره ۳).

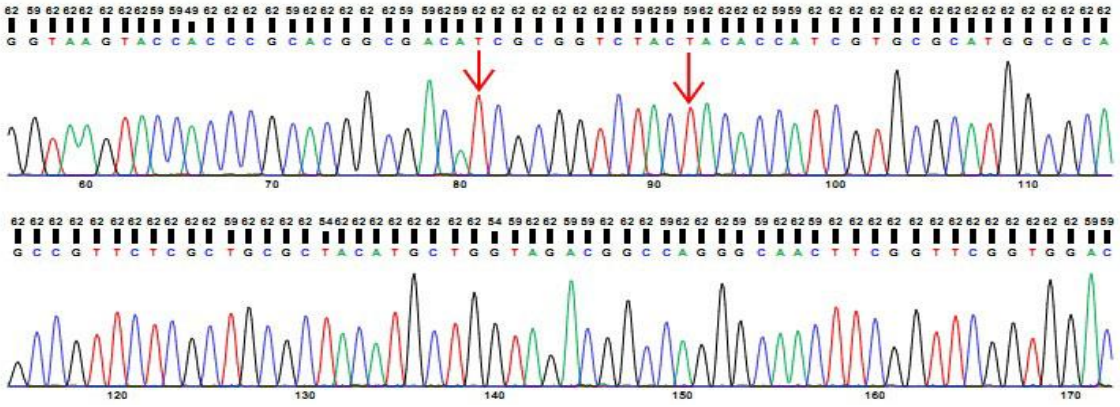


تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصولات PCR ژن *gyrA* بر روی ژل آگارز ۲ درصد. DNA لدر 100bp مورد استفاده قرار گرفته است. طول محصول ژن gyrA، 287 جفت باز بود که در همه نمونه های سودوموناس آئروژینوزا به روش PCR تکثیر گردید.



تصویر شماره ۲: نتیجه تعیین توالی ژن *gyrA*: پیکان قرمز رنگ تغییر باز C در موقعیت ۲۴۸ به T را نشان می دهد که باعث تبدیل آمینواسید ترئونین به ایزولوسین (ACC(Thr) >ATC(Ile در کدون ۸۳ این ژن (T83I) شده است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]



تصویر شماره ۳: نتیجه تعیین توالی ژن *gyrA*: پیکان قرمز رنگ سمت چپ تغییر باز C در موقعیت ۲۴۸ به T را نشان می دهد که باعث تبدیل آمینواسید ترئونین به ایزولوسین (ATC(Ile)< (ACC(Thr در کدون ۸۳ این ژن (T83I) شده است. هم چنین پیکان قرمز رنگ سمت راست، تغییر باز G در موقعیت ۲۵۹ به T را نشان می دهد که باعث تبدیل آمینواسید آسپارتیک اسید به تایروزین GAC(ASP)>TAC(TYR) در کدون ۸۷ این ژن (D87Y) شده است.

بحث

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی و یک پاتوژن فرصت طلب محسوب می‌شود که از سیستم ایمنی ضعیف بیماران بهره گرفته و در آن‌ها عفونت ایجاد می‌کند. سودوموناس آئروژینوزا جزء باکتری‌هایی است که دارای مقاومت ذاتی به انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد، اما وقوع جهش‌های مختلف و یا کسب ژن‌های مقاومت به دارو در این باکتری باعث افزایش مقاومت در نمونه‌های بیمارستانی شده است. فلوروکوئینولون‌ها دسته مهمی از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان عفونت با سودوموناس می‌باشند. اما امروزه مقاومت به داروهای مختلف از جمله فلوروکوئینولون‌ها در جهان رو به افزایش است و شاهد مقاومت چند دارویی در انواع مختلف پاتوژن‌ها هستیم. داروها و استراتژی‌های درمانی جدیدی برای غلبه بر این مشکل موردنیاز است که برای نیل به این اهداف، اطلاع کاملی از انواع جهش‌های ایجادکننده مقاومت دارویی می‌تواند کمک‌کننده باشد.

در مطالعه ای مشابه، دیهم و خواسته در سال ۱۳۹۰ در دزفول ۱۵۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا را از ۷۲ نمونه کشت ادرار، ۵۵ نمونه ترشحات ریوی، ۱۲ نمونه کشت خون و ۱۱ نمونه کشت زخم جدا نمودند(۱۶). در مطالعه حاضر نیز بیش‌ترین فراوانی نمونه‌های سودوموناس مربوط به نمونه‌های ادراری بود. در حالی که در مطالعه زلالی در سال ۱۳۹۱ در تهران، از ۱۰۴ سویه سودوموناس آئروژینوزا جداشده، ۴۰ نمونه از عفونت زخم، ۲۱ نمونه عفونت ادراری، ۲۰ نمونه از ترشحات خلط و ۱۵ نمونه از عفونت خون و ۸ نمونه از عفونت چشم بود(۱۷).

در این مطالعه میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در ۳۱/۸ درصد از جدایه‌ها گزارش گردید. در حالی که فاضلی وهمکاران بین سال‌های ۱۳۸۸-۱۳۸۷ میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در اصفهان را در حدود ۴۱/۸ درصد از نمونه‌ها نشان دادند(۱۸). هم‌چنین دیهم و همکاران کم‌ترین میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین را در بین نمونه‌های سودوموناس (۲/۷ درصد) نشان دادند(۳). در مطالعه صالحی و همکاران میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین حدود ۶۴/۳ درصد موارد گزارش گردید(۵).

اکرامی و کلانتر در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که سویه‌های جدا شده از بیماران سوختگی، دارای مقاومت ۱۰۰ درصد به سیپروفلوکساسین بودند(۱۹). در حالی که در مطالعه حاضر، حدود ۶۴ درصد نمونه‌های سوختگی به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. در مطالعه Geyik و همکاران در سال ۲۰۰۳ در ترکیه از ۶۱۰ نمونه، نتایج

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا نشان داد که ۶۳ درصد موارد نسبت به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند(۲۰). براین اساس در نواحی مختلف میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین متفاوت است، ولی به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک انتظار می‌رود میزان مقاومت افزایش یابد. مقاومت به سیپروفلوکساسین به واسطه جهش در چندین ژن از جمله *gyrA* و *gyrB*، دو زیرواحد DNA جیراز در سودوموناس آئروژینوزا رخ می‌دهد. سیپروفلوکساسین با مهار فعالیت DNA جیراز باعث(۲۱) مهار همانندسازی سودوموناس آئروژینوزا و در نتیجه مهار رشد آن می‌گردد. در حالی که جهش در این آنزیم به خصوص در زیرواحد *gyrA*، باعث ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین در این باکتری می گردد. در مطالعات مختلف انواع جهش‌ها در ژن *gyrA* در سودوموناس آئروژینوزا که با مقاومت در سیپروفلوکساسین همراه است، گزارش شده بود. در این بین، مطالعات زیادی جهش در کدون های ۸۳ و ۸۷ را در ژن *gyrA* گزارش کرده‌اند که شامل THR-83-Ile و ASP-87-ASN و ASP-87-TYR می باشد(۲۳-۲۱).

در مطالعه Takenouchi و همکاران در سال های ۱۹۹۴ تا ۱۹۹۵، از بین ۳۳۵ نمونه کلینیکی جدا شده از ۳۰ بیمارستان در ژاپن، ۲۶۵ نمونه سویه وحشی بود و از ۷۰ نمونه باقیمانده، ۶۳ نمونه MIC≥3.13 داشتند که در این بین سویه‌های دارای جهش T83I، مقاومت با MIC≥128µg/ml داشتند(۲۴). در حالی که در مطالعه حاضر، نمونه های مقاوم دارای جهش T83I، مقاومت به سیپروفلوکساسین با MIC≥32 µg/ml داشتند. توحیدپور و همکاران در سال ۲۰۱۳ از بین ۱۳۳ نمونه کلینیکی جدا شده از سه بیمارستان اصلی در تهران، ۴۵ نمونه مقاوم به سیپروفلوکساسین گزارش کردند که بررسی جهش توپوایزومراز از طریق PCR و تعیین توالی ژن *gyrA* جایگزینی ترئونین به ایزولوسین در موقعیت ۸۳ را در همگی سویه‌های مورد مطالعه نشان داد(۲۵).

همان‌طور که در مطالعه توحیدپور و Takenouchi هم ذکر شد، در مطالعه حاضر هم نتایج تعیین توالی در هر ۱۴ نمونه (تمام نمونه‌ها) جهش T83I را نشان داد که آمینواسید ترئونین (قطبی) به ایزولوسین (غیرقطبی) در اثر جهش بدمعنی تغییر C به T (ACC >ATC) در باز ۲۴۸ ام رخ داده بود. هم‌چنین در مطالعه گرگانی و همکاران(۵) همانند مطالعه حاضر، جهش اصلی D87Y و T83I بود. در مطالعه گرگانی از ۵۹ نمونه سودوموناس آئروژینوزا در بیمارستان استنفورد، ۱۲ نمونه مقاوم جداسازی شد که در این بین، ۴ نمونه مقاوم دارای جهش در ژن gyrA بودند. در حالی که در مطالعه حاضر، همه نمونه‌های مقاوم دچار جهش در این ژن بودند و این نشان‌دهنده شیوع جهش‌های ژنی در نمونه‌های پاتوژن بیمارستانی از نوع سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. ولی در مطالعه یونزاوا از ۱۸ نمونه مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۱۰ نمونه جهش تکی T83I و ۴ نمونه جهش دوتایی T83I و D87Y داشتند(۲۶). ولی در مطالعه حاضر از بین ۱۴ نمونه، ۲ نمونه دارای جهش دوتایی T83I و D87Y مشاهده شد. بنابراین، با توجه به مطالعات مختلف به نظر می‌رسد جهش T83I به خاطر شیوع بالاتر در بین سویه‌های مقاوم، دارای اهمیت بیش‌تری نسبت به جهش D87Y باشد. با این حال وقوع این دو جهش در همه سویه‌های مقاوم در این مطالعه و شیوع بالای آن در بین سویه‌های مقاوم در دیگر مطالعات، آن‌ها را به عنوان نقاط داغ جهش‌پذیری[1] ژن *gyrA* معرفی می‌کند. به طوری که پیشنهاد می‌شود با توجه به وجود نقاط خاص جهش‌پذیری، از آزمایشات مولکولی در تشخیص انواع مقاومت‌های دارویی از جمله مقاومت به فلوئوروکوئینولون‌ها در عفونت‌های بیمارستانی بهره گرفته شود.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در مطالعه حاضر با توجه به وقوع جهش در همه نمونه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، به نظر می‌رسد که جهش در ژن gyrA، یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به

1. Hotspot region

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

سیپروفلوکساسین در جدایه‌های کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا در استان گیلان باشد. هم‌چنین با توجه به این که در بعضی از نمونه‌ها، جهش‌هایی در ژن‌های دیگر نیز رخ داده (نتایج ارائه نشده)، به نظر می‌رسد همراهی جهش در این ژن و دیگر ژن‌ها باعث افزایش مقاومت در جدایه‌های مختلف و تفاوت میزان MIC شده باشد.

سپاسگزاری

این مقاله تحقیقاتی حاصل پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی می‌باشد. نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به جهت همکاری، نهایت تشکر را دارند. هم‌چنین نویسندگان کمال تشکر از جناب آقای دکتر محمد فائزی قاسمی، سعید نادر محمد، فاطمه اسدی و فاطمه حکیمی را دارند.

References

1. Sherertz RJ, Sarubbi FA. A three-year study of nosocomial infections associated with Pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol 1983; 18(1): 160-164.
2. Oates JA, Wood AJ, Hooper DC, Wolfson JS. Fluoroquinolone antimicrobial agents. N Engl J Med 1991; 324(6): 384-394.
3. Hancock RE, Speert DP. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and impact on treatment. Drug Resist Updat 2000; 3(4): 247-255.
4. Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R. Nosocomial infections due to multidrugresistant Pseudomonas aeruginosa: epidemiology and treatment options. Pharmacotherapy 2005; 25(10): 1353-1364.
5. Gorgani N, Ahlbrand S, Patterson A, Pourmand N. Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. Int J Antimicrob Agents 2009; 34(5): 414-418.
6. Hooper DC. Clinical applications of quinolones. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression 1998; 1400(1-3): 45-61.
7. Yamaguchi K, Miyazaki S, Kashitani F, Iwata M, Kanda M, Tsujio Y, et al. Activities of antimicrobial agents against 5,180 clinical isolates obtained from 26 medical institutions during 1998 in Japan. Levofloxacin-Surveillance Group. Jpn J Antibiot 2000; 53(6): 387-408.
8. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. J R Soc Med 2002; 95(Suppl 41): 22-26.
9. Wang D D, Sun TY, Hu YJ. Contributions of efflux pumps to high level resistance of Pseudomonas aeruginosa to ciprofloxacin. Chin Med J (Engl) 2007; 120(1): 68-70.
10. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrA gene of Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34(6): 1271-1272.
11. Cambau E, Perani E, Dib C, Petinon C,Trias J, Jarlier V. Role of mutations in DNA gyrase genes in ciprofloxacin resistance of Pseudomonas aeruginosa susceptible or resistant to imipenem. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(10): 2248-2252.
12. Jalal S, Wretlind B. Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of Pseudomonas aeruginosa. Microb Drug Resist 1998; 4(4): 257-261.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]

13. Mouneimné H, Robert J, Jarlier V, Cambau E. Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob A Chemother 1999; 43(1): 62-66.
14. Dubois V, Arpin C, Melon M, Melon B, Andre C, Frigo C, Quentin C. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of Pseudomonas aeruginosa P12: efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. J Clin Microbiol 2001; 39(6): 2072-2078.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. M100-S23. Wayne, PA; Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
16. Deyham B, Basikhasteh M. The pattern of antibiotic resistance and Metallo-β-lactamases production in pseudomonas aeruginosa isolated from Clinical samples of Dr Ganjavian Hospital in Dezful. Journal of Microbial Biotechnology 2012; 4(14): 21-28.
17. Zolali M, Salehi M, Mosavari N, Bolfiun M, Taheri M, Mirzaei M. Investigation of mexX gene in pseudomonas aeruginosa isolated of clinical samples. Journal Of Microbiology Knowledge 2010; 2(6): 1-6.
18. Fazzeli H, Faghri J, Kabiri P, Fatahibafghi M, Arabestani MR. Identification of Beta-Lactamase-Producing Pseudomonas aeruginosa with Multiple Antibiotic Resistances. Journal of Isfahan Medical School 2007; 29(154): 1365-1374 (Persian).
19. Ekrami A, Kalantar E. Bacterial infections in burn patients at a burn hospital in Iran. Indian J Med Res 2007; 126(6): 541-544.
20. Geyik MF, Aldemir M, Hosoglu S, Tacyildiz HI. Epidemiology of burn unit infections in children. American Journal of Infection Ccontrol 2003; 31(6): 342-346.
21. Higgins PG, Fluit AC, Milatovic D, Verhoef J, Schmitz FJ. Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Int J Antimicrob Agents 2003; 21(5): 409-413.
22. Nakano M, Deguchi T, Kawamura T, Yasuda M, Kimura M, Okano Y, et al. Mutations in the gyrA and parC genes in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41(10): 2289-2291.
23. Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. Resistance mechanisms of multiresistant Pseudomonas aeruginosa strains from Germany and correlation with hypermutation. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(11): 4062-4070.
24. Takenouchi T, Sakagawa E, Sugawara M. Detection of gyrA Mutations among 335 Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated in Japan and Their Susceptibilities to Fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(2): 406-409.
25. Tohidpour A, Peerayeh SN, Najafi S. Detection of DNA Gyrase Mutation and Multidrug Efflux Pumps Hyperactivity in Ciprofloxacin Resistant Clinical Isolates of Pseud-omonas aeruginosa. J Med Microbiol Infec Dis 2013; 1(1): 1-7.
26. Yonezawa M, Takahata M, Matsubara N, Watanabe Y, Narita H. DNA gyrase gyrA mutations in quinolone-resistant clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(9): 1970-1972.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-19]