

Evaluating the gyrA Gene Mutation in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae Isolates in Sari Imam Khomeini Hospital, Iran

Behnam Hashemi¹,
Alireza Rafiei²,
Reza Valadan³,
Maryam Abdollahi¹,
Mohammad Ahanjan⁴,
Eisa Nazar⁵,
Zaher Morsaljahani⁶,
Rezvan Khajavi⁷,
Maryam Salehiyan⁸

¹ MSc Student in Microbiology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Microbiology, Pediatric Infectious Diseases Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ PhD Student in Biostatistics, Student Research Committee, Faculty of Health, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁶ MSc Student in Immunology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ MSc in Molecular Biology, Molecular Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁸ MSc in Microbiology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 28, 2017 ; Accepted July 16, 2018)

Abstract

Background and purpose: Increasing resistance to Quinolones in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Sari, has caused many problems in treatment. Mutation in *gyrA* gene lead to changes in amino acids and resistance against Fluoroquinolones in *E. coli* and *K. pneumoniae*. This study aimed at identifying remarkable mutations in *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates using PCR-SSCP analysis.

Materials and methods: Antibiotic sensitivity test (ciprofloxacin, nalidixic acid) was performed using Agar Disk Diffusion method. Resistance to fluoroquinolones was confirmed by E-test. (MIC experiment). We used PCR-SSCP method to detect mutation in *gyrA* (ser83 – asp 87) genes. Then, the PCR products were randomly sequenced.

Results: From 103 isolates, 65 (63.2 %) were *E. coli* and 38 (36.8%) were *K. pneumoniae*. In all *E. coli* isolates resistant to Ciprofloxacin, at least one mutation was observed. Also, in all *K. pneumoniae* samples resistant to Ciprofloxacin, at least one mutation was seen and in 14 samples two mutation points were observed, but in 5 samples that were sensitive to Ciprofloxacin no mutation was observed.

Conclusion: This study showed that the mutation in *gyrA* genes is closely related to quinolones resistance. High prevalence of quinolones resistance in *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates requires more appropriate infection control programs.

Keywords: *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumoniae*, Quinolones, Antibiotic resistance

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (164): 21-30 (Persian).

* Corresponding Author: Mohammad Ahanjan - Pediatric Infectious Diseases Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: ahanjan2007@gmail.com)

بررسی موتاسیون در ژن gyrA در سویه های بالینی اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیمارستان امام خمینی (ره) شهرستان ساری

بهنام هاشمی^۱
علیرضا رفیعی^۲
رضا ولدان^۳
مریم عبدالمهی^۱
محمد آهانجان^۴
عیسی نظر^۵
ظاهر مرسل جهان^۶
رضوان خواجهوی^۷
مریم صالحیان^۸

چکیده

سابقه و هدف: افزایش تعداد مقاومت به کوئینولون‌ها در باکتری‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه‌های جدا شده از ساری، مشکلات فراوانی را در درمان ایجاد نموده است. موتاسیون در ژن gyrA منجر به تغییر اسیدهای آمینه و مقاومت به فلئوروکینولون‌ها در باکتری‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه می‌باشد. هدف ما از این مطالعه، تشخیص جهش‌های قابل توجه از ایزوله‌های جدا شده به روش SSCP PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ایزوله‌های جدا شده جمع‌آوری و تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی (سیروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید) معمول به روش دیسک دیفیوژن آگار انجام شد. مقاومت فلوروکینولون با استفاده از آزمون MIC به روش E-test تایید شد. از روش SSCP PCR برای تشخیص جهش در ژن gyrA (ser83-asp87) استفاده شد. نتایج به دست آمده از روش SSCP PCR برای تایید به‌طور راندوم، تعیین توالی گردید.

یافته‌ها: از ۱۰۳ ایزوله جدا شده، ۶۵ نمونه (۶۳/۲ درصد) اشریشیا کلی و ۳۸ نمونه (۳۶/۸ درصد) کلبسیلا پنومونیه بودند. ایزوله‌های جدا شده با روش SSCP PCR بررسی شدند. در همه‌ی نمونه‌های اشریشیا کلی مقاوم به سیروفلوکساسین، حداقل یک موتاسیون مشاهده گردید. هم‌چنین در همه نمونه‌های کلبسیلا مقاوم به سیروفلوکساسین، حداقل یک موتاسیون و در ۱۴ نمونه در هر ۲ نقطه موتاسیون مشاهده گردید، در حالی که در ۵ نمونه حساس به سیروفلوکساسین هیچ موتاسیونی دیده نشد. **استنتاج:** نتایج نشان داد که جهش در gyrA ارتباط نزدیکی با مقاومت کینولون‌ها دارد. افزایش شیوع مقاومت کینولون‌ها در میان باکتری E.coli و K.pneumone جدا شده، نشان دهنده نیاز به برنامه‌های کنترل عفونت می‌باشد.

واژه های کلیدی: اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، کینولون‌ها، مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه

اشریشیا کلی (E.coli) و کلبسیلا پنومونیه
می‌باشد که جزء پاتوژن‌های فرصت طلب و از عوامل
شایع عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند. اشریشیا کلی اولین
از اعضای خانواده انترو باکتریاسه

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۱۸۲۵ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

E-mail: ahanjan2007@gmail.com

مؤلف مسئول: محمد آهانجان - ساری - کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استاد، گروه ایمنولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. استادیار، گروه ایمنولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، کمیته تحقیقات عفونی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. دانشجوی دکتری آمار زیستی، کمیته تحقیقات دانشجویی، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۶. دانشجوی کارشناسی ارشد ایمنولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۷. کارشناس ارشد بیولوژی مولکولی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۸. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۹/۱۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۴/۲۵

افزایش مقاومت نسبت به کینولون‌ها در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی شده است (۱۷). هم‌چنین با توجه به افزایش روز افزون استفاده از فلورو کینولون‌ها، افزایش مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه‌ها مشاهده شده است (۱۸). هدف اصلی ما در این مطالعه، تشخیص مقاومت کروموزومی (ژن *gyrA*) علیه کینولون‌ها (سپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید) در سویه‌های بالینی اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه با استفاده از متد *sscp pcr* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، ایزوله‌های باکتریایی مورد استفاده از ۲۵۰ نمونه بالینی مختلف (شامل ادرار، خون، ترشحات و زخم) از خرداد تا دی ماه ۲۰۱۵ از بیماران بستری و سرپایی که به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی مرکز آموزشی-درمانی امام خمینی (ره) ساری ارسال شده بودند، جداسازی و با استفاده از تست‌های میکروبی‌شناسی به عنوان اشرشیا کلی شناسایی شدند. نمونه‌های ارسالی ابتدا در محیط‌های بلاد آگار و مک کانکی آگار یا محیط EMB (مرک، آلمان) آگار (برای کشت ادرار) کشت شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شد. پس از رشد کلنی‌ها، جهت تعیین هویت و شناسایی اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه از تست‌های فنوتیپی شامل رنگ‌آمیزی گرم، تست اکسیداز، واکنش در محیط TSI آگار (مرک، آلمان)، بررسی تحرک، تولید اندول و H₂S در محیط SIM، مصرف سیترات، دکربوکسیلاسیون لیزین، آرژینین و ارنیتین و تست‌های MR/VP (مرک، آلمان) استفاده گردید. پس از تعیین هویت، نمونه‌ها در نوترینت برات حاوی ۱۵ درصد گلیسرول کشت شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای بررسی‌های بعدی ذخیره شدند.

استخراج DNA

از باکتری‌های رشد یافته، DNA ژنومیک به روش

پاتوژن کلیدی در عفونت‌های بیمارستانی و شایع‌ترین عامل ایجادکننده عفونت‌های مجاری ادراری کسب شده از جامعه می‌باشد (۱). بعد از اشرشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، شایع‌ترین عامل ایجادکننده عفونت‌های ادراری در بیماران با سیستم ایمنی تضعیف شده و دارای کاتتر می‌باشد (۲). عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این باکتری‌ها اغلب به‌طور موفقیت‌آمیزی با آنتی‌بیوتیک‌هایی چون کینولون‌ها و بتالاکتام‌ها درمان می‌شوند (۳). از این رو مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان پاتوژن‌های بیمارستانی دلیل اکثر نگرانی‌ها است (۳-۵).

کینولون‌ها برای اولین بار در سال ۱۹۶۲ از طریق نالیدیکسیک اسید معرفی شدند. در طول ۵ دهه، انواع متفاوتی از کینولون‌ها برای مصارف کلینیکی عرضه شد (۶-۸). سپروفلوکساسین خوراکی یا وریدی به خاطر جذب سریع و ترشح مناسب به داخل ادرار، بیش‌ترین کاربرد را جهت درمان عفونت ادراری دارد (۹، ۱۰). مقاومت به کینولون‌ها به‌طور محسوسی در حال افزایش است، به طوری که در چین بیش از ۵۰ درصد سویه‌های بالینی اشرشیا کلی به سپروفلوکساسین مقاوم شده‌اند (۱۱). در دهه اخیر، مقاومت به فلوروکینولون‌ها هم از شایع‌ترین و غیر قابل کنترل‌ترین عوامل به شمار می‌آید (۱۲). مکانیسم عمل کینولون‌ها، سیستم همانندسازی را هدف قرار داده و روی آنزیم‌های DNA ژیراز و توپوایزومراز IV عمل می‌کند (۱۳). مکانیسم مقاومت کینولون‌ها به دو صورت کروموزومی و پلاسمیدی گزارش شده است (۱۴). مقاومت کروموزومی شامل: (۱) انباشتگی موتاسیون در آنزیم‌های هدف کینولون، DNA ژیراز (*A, Bgyr*) و یا توپوایزومراز IV (*parC, parE*) و (۲) موتاسیون در ژن پمپ‌های موجود در باکتری که موجب انباشتگی دارو در داخل باکتری می‌شود (۱۵).

موتاسیون در ژن‌های *gyrB* و *parE* از اهمیت کم‌تری برخوردارند (۱۶). موتاسیون در ژن *gyrA* باعث تغییر آمینواسید Ser-83 و Asp-87 می‌گردد. با این حال افزایش روزافزون استفاده از فلوروکینولون‌ها موجب

جوشاندن استخراج گردید (۱۸). برای این کار به کمک یک آنس استریل، کلنی تک از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های اشیشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه در محیط مولر هینتون آگار برداشته و در یک میکروتیوب استریل ۱/۵ میلی لیتر حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر شده حل گردید. سپس به مدت ۸ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد جوشانده شد. در ادامه کار، نمونه‌ها با دور rpm ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. محلول رویی به عنوان DNA الگو، در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد برای انجام PCR نگهداری شد.

تست حساسیت آنتی بیوتیکی

بررسی MIC برای آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید (ساخت شرکت MAST انگلستان) با روش E-test انجام گردید. در این روش، پس از تهیه سوپانسیون باکتریایی به روش نیم مک فارلند، آن را روی پلیت مولر هینتون آگار منتقل نموده و سپس نوارهای E-test که هر کدام معرف یک نوع آنتی بیوتیک بود، بر روی آگار قرار داده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد، منطقه عدم رشدی به صورت مثلثی شکل ایجاد شد. سپس با مراجعه به جدول ارائه شده توسط شرکت سازنده نوارهای E-test، حساسیت باکتری‌های مذکور نسبت به آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید مشخص گردید.

Polymerase chain reaction (PCR)

پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده در واکنش PCR

Primer	Sequence (5' to 3')	Direction	Reference
gyrA	GTACACCGTCGCGTACTTTA	Forward	9۱
gyrA	TGCGCCATACGAACGATGGT	Reverse	9۱

پرایمرها از طریق پایگاه اطلاعاتی NCBI تایید و Blast شدند. پس از آن توسط شرکت تکاپوزیست برای ساخت به شرکت Bioner کره ارسال گردید. این

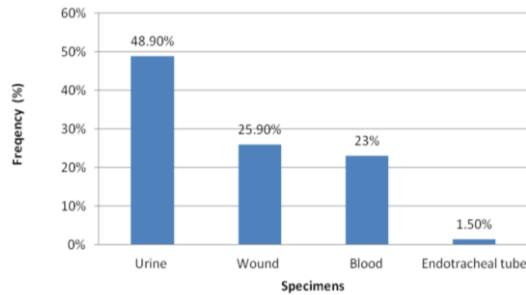
پرایمرها با غلظت ۱۰۰ pmol ساخته شدند و برای انجام PCR، غلظت ۱۰ pmol از آن‌ها تهیه شد، به این ترتیب که مقدار ۹۰ میکرولیتر آب با ۱۰ میکرولیتر از پرایمر مخلوط شدند. مخلوط اصلی واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۷/۵ میکرولیتر مستر میکس، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر DNA و ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر، تهیه شد. برنامه دستگاه ترموسایکلر شامل مرحله واسرشته شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه بود که با ۳۰ سیکل ادامه یافت. مرحله واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه ادامه یافت. برای بررسی محصولات PCR از الکتروفورز ژل آگاروز ۲ درصد استفاده شد.

SSCP PCR (single strand conformation polymorfism)

بعد از انجام PCR، ۶ میکرولیتر از محصول PCR با ۶ میکرولیتر از بافر بارگیری فرم آمید (فرمامید، برموفنول (۱۰ درصد)، EDTA (۰/۵ مولار)، زایلن سیانول) مخلوط و به مدت ۶ دقیقه داخل ترماسایکلر Eppendorf در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا DNA تک رشته‌ای شود. سپس نمونه‌ها سریعاً در ژل آکریل آمید ۱۰ درصد به مدت ۱۸ ساعت در ولتاژ ۲۲۰ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد الکتروفورز شدند تا از تشکیل مجدد DNA دو رشته‌ای ممانعت شود. بعد از اتمام الکتروفورز، برای رویت باندها از سه محلول تثبیت کننده، رنگ آمیزی و ظاهر سازی استفاده گردید.

تعیین توالی

به منظور تعیین توالی هر یک از الگوهای باندهای محصول PCR با غلظت مناسب (بیشتر از ۱۲۰ ng/μl) آماده و خالص سازی (Purification) انجام شد. تعیین توالی به صورت Forward & Reverse توسط شرکت



نمودار شماره ۱: فراوانی باکتری های اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه در عفونت های مختلف

نتایج حاصل از MIC به دست آمده توسط روش E-test برای سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید نشان داد که در باکتری *E. coli*، فقط یک نمونه (۱/۴ درصد) به نالیدیکسیک اسید حساس (MIC و ≥ 8 میکروگرم/ میلی لیتر) و ۳ نمونه (۴/۶ درصد) به سیپروفلوکساسین حساس (MIC و ≥ 1 میکروگرم/ میلی لیتر) بودند. ۶۱ نمونه (۹۳/۸ درصد) مقاوم در برابر سیپروفلوکساسین (MIC و ≤ 4 میکروگرم / میلی لیتر) بودند و ۱ مورد نیمه حساس مشاهده گردید. در میان کلبسیلا پنومونیه های جدا شده، همه به نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند، اما حساسیت سیپروفلوکساسین متفاوت بود: ۵ نمونه (۱۳/۱ درصد) حساس به سیپروفلوکساسین (MIC و ≥ 1 میکروگرم/ میلی لیتر)، ۶ نمونه (۱۵/۷ درصد) دارای مقاومت متوسط نسبت به سیپروفلوکساسین و ۲۷ نمونه نسبت به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: نمونه از MIC برای باکتری های اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه به روش E-test

تکاپوزیست انجام شد و سپس توالی ها با استفاده از نرم افزار 5 CLC main work bench مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها

از ۱۰۳ نمونه ایزوله شده در این مطالعه، ۶۵ ایزوله اشرشیا کلی و ۳۸ مورد کلبسیلا پنومونیه از نمونه های مختلف بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) ساری ایزوله گردید. بیشترین ایزوله های جدا شده از نمونه های ادرار می باشند که شامل ۵۰ نمونه از اشرشیا کلی و ۱۶ مورد کلبسیلا پنومونیه می باشد. در حالی که ۲۶ مورد کلبسیلا پنومونیه و ۹ مورد اشرشیا کلی از زخم جداسازی گردیدند. لازم به ذکر است که کمترین نمونه جدا شده از *endotracheal secretions* تنها ۲ مورد (کلبسیلا پنومونیه) ایزوله گردید. از بین نمونه های اشرشیا کلی، ۴۲ مورد (۶۴/۶ درصد) و از بین نمونه های کلبسیلا، ۲۵ مورد (۶۵/۷ درصد) از جنس مذکر و بقیه ی نمونه ها از خانم ها جدا شدند. در جنس مذکر، از بین اشرشیا کلی های جدا شده، بیشترین تعداد نمونه مربوط به نمونه ادراری (۲۸ مورد ۶۶/۶۶ درصد) و از بین نمونه های کلبسیلا، بیشترین تعداد نمونه مربوط به نمونه زخم (۱۸ مورد ۴۶/۱۵ درصد) بوده است و از بین اشرشیا کلی های جدا شده از جنس مونث، بیشترین تعداد نمونه مربوط به نمونه ادراری (۲۲ مورد ۷۵/۸۶ درصد) و از بین نمونه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از جنس مونث، بیشترین تعداد نمونه مربوط به نمونه خون (۹ مورد ۳۷/۵ درصد) می باشد. که نشان دهنده این است که در بین عفونت های مختلف اشرشیا کلی، این باکتری بیش تر موجب عفونت ادراری می شود، به خصوص در خانم ها ولی در بین عفونت های مختلف کلبسیلا، الگوی خاصی دیده نشد و میزان عفونت در نمونه های مختلف تقریباً از نظر آماری نزدیک هم است. فراوانی ایزوله های جدا شده از نمونه های مختلف بالینی در نمودار شماره ۱ مشاهده می شود.

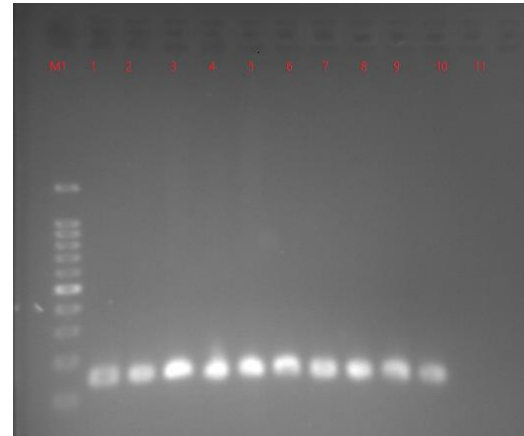
ارسالی برای سکانس. تصویر شماره ۵)، بعد از انجام سکویسنگ در NCBI (Accession ANA95977.1) تا Accession ANA95971.1 ثبت گردید.

تشخیص ژن های مقاوم به کینولون ها با روش PCR در مرحله بعد، ایزوله های مقاوم به کینولون ها به وسیله PCR مشخص گردید (تصویر شماره ۳).

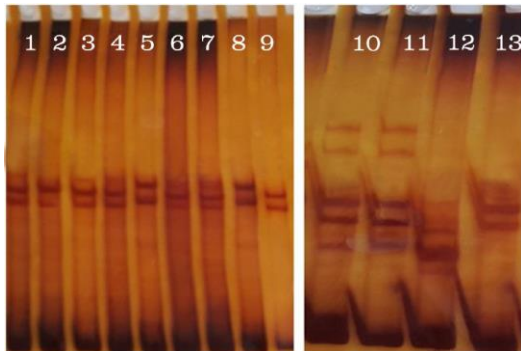
جدول شماره ۲: مربوط به الگوهای sscp برای ژن *gyrA* در باکتری های اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه

SSCP Patterns	E.coli and K.pneumoniae	Gene	Sequencing(N=7)		Amino acid changes
(A1-A7)		<i>gyrA</i> <i>parC</i>	Gyr A83	GyrA87	
A1(n=10)	(E=6,K=4)	+ +	+	-	Leu-Iso
A2(n=8)	(E=5,K=3)	+ +	+	-	Iso-Leu
A3(n=14)	(E=10,K=4)	+ +	+	+	Iso-Phe Asp-Al
A4(n=14)	(E=7,K=7)	+ +	+	-	Iso-Phe
A5(n=17)	(E=12,K=5)	+ +	+	-	Iso-Tyr
A6(n=20)	(E=13,K=7)	+ +	+	-	Iso-Ser
A7(n=12)	(E=9,K=3)	+ +	+	-	Iso-Leu Asp-Asn

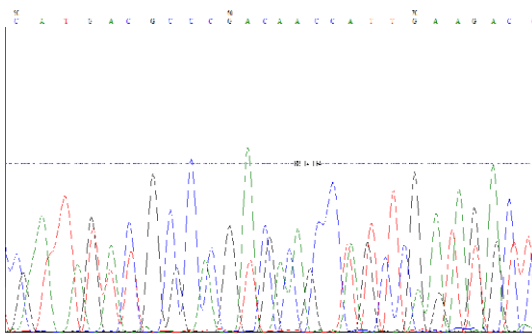
A1 تا A7 = الگوهایی که بر روی ژل مشاهده گردید (۷ الگو)
n = ۱۰ نمونه (اشرشیا یا کلبسیلا) از الگوی A1 می باشد.
E = باکتری اشرشیا کلی
K = باکتری کلبسیلا



تصویر شماره ۳: الکتروفوروز محصول ژن *gyrA* در باکتری های اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه
M1: مارکر (100 bp)، ۲: کنترل مثبت، ۱-۳-۴-۵-۶-۷-
۸-۹-۱۰: (ژن *gyrA*، 152 bp)، ۱۱: کنترل منفی



تصویر شماره ۴: الگوهای متفاوت SSCP PCR برای ژن *gyrA*
الگوی E1، ۵-۸: الگوی E2، ۶-۷: الگوی E3، ۹: الگوی E4،
۱۰-۱۱: الگوی E5، ۱۲: الگوی E6، ۱۳: الگوی E7



تصویر شماره ۵: نمونه ای از تعیین توالی برای ژن *gyrA*

تشخیص موتاسیون در ژن (*gyrA* position 83 and 87) در باکتری های اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه به وسیله روش SSCP PCR

با توجه به این که تعیین توالی در این روش بر اساس الگوهای متفاوت می باشد، در مطالعه ما از ۹۵ نمونه، در ژن *gyrA*، ۷ الگوی متفاوت بر روی ژل پلی آکریل مشاهده و تعیین توالی شد و به سکانس فرستاده شدند. نتایج به دست آمده از تعیین توالی (سکویسنگ) در این مطالعه برای تشخیص موتاسیون پس از انجام متد sscp نشان داد که در ژن *gyrA*، ۸۱ نمونه (۸۵/۳ درصد) در یکی از دو نقطه (*gyrA* position 83 and 87) موتاسیون داشتند و ۱۴ مورد (۱۴/۷ درصد) در هر ۲ نقطه (*gyrA* position 83 and 87) موتاسیون داشتند که باعث تبدیل اسید آمینه ایزولوسین به فنیل آلانین و اسپارژین به آلانین گردیده است (جدول شماره ۲) (تصویر شماره ۴). لازم به ذکر است که ۷ نمونه ای که جهت سکانس ارسال گردید (تصویر یکی از نمونه های

بحث

در طول مطالعات قبلی نشان داده شد که باسیل های گرم منفی تولیدکننده ESBL و به خصوص اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه به عنوان عوامل پاتوژن خطرناک برای ایجاد عفونت ها در جامعه و بیمارستان می باشند. امروزه مقاومت آنتی بیوتیکی در میان ایزوله های بالینی به ویژه خانواده انتر و باکتریاسه از معضلات روند درمان عفونت های بیمارستانی است (۲۱). مصرف گسترده آنتی بیوتیک ها باعث افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری شده است، به طوری که مقاومت این باکتری به سیپروفلوکساسین و بتالاکتام ها در سراسر دنیا گزارش شده است (۲۲).

در مطالعه حاضر، میزان مقاومت به آنتی بیوتیکی های سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید از طریق متد E تست اندازه گیری شد. در باکتری اشرشیاکلی، ۹۵/۳ درصد مقاوم به سیپروفلوکساسین و تنها ۱/۴ درصد به نالیدیکسیک اسید حساس بودند و در مورد باکتری کلبسیلا پنومونیه، ۷۱ درصد مقاوم به سیپروفلوکساسین و همگی مقاوم به نالیدیکسیک اسید می باشند که نشان از میزان مقاومت بالایی می باشد. در مطالعه حاضر، با انجام روش SSCP PCR، تمامی نمونه ها در ۷ الگوی متفاوت دسته بندی شدند و الگوهای متفاوت به سکانس فرستاده شدند. پس از انجام سکانس مشخص گردید که تمامی ۱۰۳ نمونه، در ژن *gyrA* در باکتری اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه در نقطه 83 *gyrA* موتاسیون داشتند. از ۷ الگوی فرستاده شده به سکانس از ژن *gyrA*، فقط در یک الگو (۱۴ نمونه) در هر دو نقطه 83 *gyrA* و *gyrA* 87 موتاسیون مشاهده گردید. چون سکانس کردن همه نمونه ها هزینه بر و زمان بر است، لذا در مطالعه حاضر برای تشخیص موتاسیون در ژن *gyrA* با یک متد جدیدتر (SSCP PCR) نسبت به سایر مطالعات انجام گرفت. موتاسیون در کدون *gyrA*83 و *gyrA*87 از جهش های شایع در باکتری های اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید

می باشد، به طوری که در مطالعات مختلف نیز گزارش گردیده است. در مطالعه *Minarini* و همکاران در سال ۲۰۱۲، ۹۱ درصد جدایه های مقاوم اشرشیاکلی، موتاسیون در کدون های ۸۳ یا ۸۷ و یا هر دو را با هم داشتند و در نمونه های حساس هیچ موتاسیونی مشاهده نشد که با مطالعه حاضر تقریباً شیوع مشابهی داشتند (۲۳). مطالعه ای که توسط نخجوانی و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بر روی سویه های اشرشیاکلی جدا شده از عفونت های ادراری در شهر تهران انجام شد، میزان مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین، به ترتیب ۴۹/۳ درصد و ۴۰/۲ درصد بود (۲۴). با مقایسه نتیجه مطالعه حاضر با مطالعه انجام شده در تهران مشاهده می گردد که میزان مقاومت به نالیدیکسیک اسید در مطالعه حاضر بسیار بالاتر می باشد که می تواند به دلیل روند رو به افزایش میزان مقاومت به داروی فوق طی مدت زمان پنج سال و ناشی از فشار انتخابی حاصل از مصرف بالای داروی فوق باشد. اما از این نظر که در هر دو مطالعه میزان مقاومت به نالیدیکسیک اسید بالاتر بوده که پیش نیاز مقاومت به سیپروفلوکساسین می باشد، شباهت وجود دارد. افزایش مقاومت به سیپروفلوکساسین در انتر و باکتریاسه با افزایش شیوع ژن های *PMQR* و این تغییر در مقاومت شامل افزایش در تنوع ژن های *PMQR* و شیوع جهش در ژن های *gyrA* و *parC* یا هر دو در سویه های *PMQR* مثبت است. در تحقیقات به دست آمده از *Kmet* و همکاران (۲۰۱۰) در خصوص جهش های رخ داده در *gyrA parC* نشان داده شده که جدایه های مقاوم به نالیدیکسیک اسید با سطح بالای MIC برای سیپروفلوکساسین دارای جهش در کدون های ۸۳ و ۸۷ در *gyrA* و ۸۰ در *parC* بوده اند و در همه جدایه ها جهش در *gyrA* رخ داده است که با مطالعه ما همخوانی دارد که در همه ی نمونه تقریباً در یکی از نقاط موتاسیون وجود داشته است (۲۵). در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۵ در انگلستان انجام شد، با بررسی ۴۷ نمونه ی مقاوم به سیپروفلوکساسین شیوع ژن *gyrA* را ۳۲ درصد گزارش

نسبت به فلوروکینولون‌ها، استراتژی‌های درمانی جدیدی پدید خواهد آمد، لذا توصیه می‌شود انجام مطالعات بیش‌تر در نژادها، مناطق جغرافیایی مختلف و با تعداد نمونه‌های بیش‌تر و هم‌چنین مطالعه این ژن‌ها (*gyrA*, *parC*) و ارتباطشان با ژن‌های *ESBL* بررسی شود تا بتوان راه کارهای درمانی مناسب را در پیش گرفت.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی از پایان نامه دوره ارشد رشته باکتری‌شناسی پزشکی مصوب دانشگاه علوم پزشکی مازندران می‌باشد. هزینه این مطالعه از طرف معاونت محترم پژوهشی تامین شده است. لذا نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی و کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران کمال تشکر و قدردانی را دارند.

کردند (۲۶). در مطالعه دیگری که توسط Whait و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد، نتایج مشابه مطالعه حاضر بود، با این تفاوت که یک جهش در کدون ۸۵ در ژن *parC* بوده است (۲۷).

در مطالعه دیگر که توسط Sáenz Y و همکاران (۲۰۰۳) بر روی جایگاه جهش در این ۴ ژن انجام داده بودند، در *parE* و *gyrB* موتاسیونی مشاهده نگردید و جایگاه جهش در *gyrA* و *parC* همانند سایر مطالعات گزارش شده است (۲۸). روش SSCP PCR که بر اساس تکفیک الکتروفورزی، اختلافات تطبیقی در ردیف DNA است، یک روش راحت و نسبتاً سریع برای نمونه‌هایی است که احتمالاً دارای موتاسیون هستند. هم‌چنین این روش با قطعه‌های بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ جفت بازی که به وسیله PCR ایجاد می‌شود را به خوبی عمل می‌کند. از طرفی انجام مطالعات مولکولی بیش‌تر بر روی مقاومت

References

- Goettsch W, van Pelt W, Nagelkerke N, Hendrix MG, Buiting AG, et al. Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46(2): 223-228.
- Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(4): 589-603.
- Gold HS, Moellering Jr. Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med* 1996; 335(9): 1445-1453.
- Medeiros AA. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; 24(Supplement 1): S19-S45.
- Karami A, Naghavi KH, Sorouri R, Ranjbar R, Khalilipour A. Use of a MAMA-PCR Method to detect *gyrA* Mutations in Nalidixic Acid-Resistant Clinical Isolates of *Escherichia coli*. *Iran J Pub Health* 2008; 37(1): 42-47 (Persian).
- Oliphant CM, Green GM. Quinolones: a comprehensive review. *Am Fam Physician* 2002; 65(3): 455-464.
- Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005; 41(Suppl 2): S120-S126.
- Emmerson AM, Jones AM. The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrobial Chemother* 2003; 51(suppl 1): 13-20.
- King DE, Malone R, Lilley SH. New classification and update on the quinolone antibiotics. *Am Fam Phys* 2000; 61(9): 2741-278.
- Drago L, De Vecchi E, Mombelli B, Nicola L, Valli M, Gismondo M. Activity of levofloxacin and ciprofloxacin against

- urinary pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48(1): 37-45.
11. Ying H, James O, Jiarui G, Fengshu D, et al. Comparative Analysis of Quinolone Resistance in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from Chinese Children and Adults. *Bio Med Research International*; 2015; 2015: 6
 12. Lagacé -Wiens PR, Nichol KA, Nicole LE, DeCorby MR, McCracken M, fa MJ, et al. ESBL genotypes in fluoroquinolone-resistant and fluoroquinolone-susceptible ESBL-producing *Escherichia coli* urinary isolates in Manitoba. *Can J Infect Dis Med Microb* 2007; 18(2):133-137.
 13. Froelich-Ammon SJ, Osheroff N. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J Biol Chem*. 1995; 270(37): 1429-21432.
 14. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(4): 664-689.
 15. Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(7): 2242-2248.
 16. Vila J, Ruiz J, Goñi P, De Anta MT. Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(2): 491-493.
 17. Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Cattoir, and P. Nordmann, Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem? *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(4): 295-297.
 18. Sosa AdJ, Byarugaba DK, Amabile CF, Hsueh PR, Kariuki S, Okeke IN. Antimicrobial resistance in developing countries. Springer; 2010.
 19. Ahmed OB, Asghar AH, Elhassan MM. Comparison of three DNA extraction methods for polymerase chain reaction (PCR) analysis of bacterial genomic DNA. *African J Microbiol Res* 2014; 8(6): 598-602.
 20. Farmer J, Davis BR, Hickman-Benner FW, NcWhorter A, Huntly-Carter GP, Asbury MA, et al. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J Clin Microb* 1985; 21(1): 46-76.
 21. Chaudhary U, Aggarwal R. Extended spectrum- lactamases (ESBL)-An emerging threat to clinical therapeutics. *Indian J Med Microb* 2004; 22(2): 75-80.
 22. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. *Res Microbiol* 2004; 155(6): 409-421.
 23. Minarini LA, Darini ALC. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in *Enterobacteriaceae* isolates from Brazil. *Braz J Microbiol* 2012; 43(4): 1309-1314.
 24. Akbari-Nakhjavani F, Bonakdar Hashemi F, Taheri Kalani M, Kazemi B, Mirafshar M, Jabal Ameli F. Antimicrobial susceptibility testing of *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections to fluoroquinolones and detection of *gyrA* mutations in resistant strains. *DARU: J Pharmaceut Sci* 2007; 15(2): 94-99 (Persian).
 25. Kmet V, Kmet'ová M. High level of quinolone resistance in *Escherichia coli* from healthy chicken broilers. *Folia Microbiol (Praha)* 2010; 55(1): 79-82.

26. Brisse S, Verhoef J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51(3): 915-924.
27. White DG, Piddock LJV, Maurer JJ, Zhao S, Ricci V, Thayer SG, et al. Characterization of fluoroquinolone resistance among veterinary isolates of avian *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(10): 2897-2899.
28. Sáenz Y, Zarazaga M, Briñas L, Ruiz-Larrea F, Torres C. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(4): 1001-1005.