Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:41 +0330 on Friday January 19th 2018

مقاله پژوهشی

جهش در زیرواحد parC توپوایزومراز IV در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سیپروفلوکساسین در استان گیلان

کبری احمدپور بیجارگاه[۱]، محمد فائزی قاسمی[۲*]، نجمه رنجی[۳]

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش ۱۳۹۶/۰۲/۰۹

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: *کلبسیلا پنومونیه* یکی از دلایل شایع عفونت‌های بیمارستانی ازجمله عفونت مجاری ادراری، تنفسی و زخم می‌باشد. چندین مکانیسم مقاومت به فلوئوروکوئینولون‌ها ازجمله جهش در زیرواحدهای توپوایزومراز IV (*parC* و *parE*) پیشنهاد شده است. هدف از این مطالعه بررسی جهش‌های ژن *parC* در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به سیپروفلوکساسین در استان گیلان بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۴۰ سویه *کلبسیلا پنومونیه* از چندین بیمارستان و آزمایشگاه در رشت و لاهیجان جداسازی شد و به کمک روش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. حساسیت و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، ایمی‌پنم، آمیکاسین، سفکسیم، سفوتاکسیم، سفالکسین، جنتامایسین و نالیدیکسیک اسید تعیین گردید. به روش کربی بوئر و MIC تعیین گردید. سپس به روش PCR- سکونسینگ جهش‌های ژن *parC* در جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین بررسی گردید.

یافته‌ها: ۱۵ درصد جدایه‌ها به همه هشت آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. سیزده جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین (۳۲/۵ درصد) بودند. بیشترین درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای سفالکسین (۷۰ درصد) پیدا شد و کم‌ترین درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای جنتامایسین (۱۷/۵ درصد) تعیین شد. آنالیز توالی یابی نشان داد سه جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای جهش‌های بدمعنی L38F و یا E84K در ژن *parC* بودند.

نتیجه‌گیری: در استان گیلان به نظر می‌رسد جهش‌های *parC* در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین در کلبسیلا پنومونیه از طریق تغییر در تمایل سیپروفلوکساسین به توپوایزومراز IV نقش داشته باشند.

کلمات کلیدی: مقاومت به سیپروفلوکساسین، *کلبسیلا پنومونیه*، جهش‌های بدمعنی، *parC*، توالی یابی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هشتم، شماره سوم، ص ۲۳۰-۲۲۳، خرداد ۱۳۹۶

آدرس مکاتبه: لاهیجان. دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان. دانشکده علوم. گروه میکروبیولوژی. ۰۹۱۱۳۳۱۴۱۸۷

Email: faezi@liau.ac.ir

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه یک پاتوژن شایع و فرصت‌طلب بیمارستانی است که موجب ایجاد عفونت‌های مختلفی چون ذات‌الریه، عفونت دستگاه تنفسی، دستگاه ادراری، زخم‌های باز، سپتی سمی وباکتریمی در انسان می‌گردد. در سال‌های اخیر، ظهور جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در کلبسیلا پنومونیه تبدیل به یک مشکل و نگرانی بزرگ در سراسر جهان شده است(۱-۳). فلوروکوئینولون‌ها آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که به‌طور گسترده‌ای در درمان عفونت‌های باکتریایی مورداستفاده قرار می‌گیرند که استفاده گسترده موجب افزایش مقاومت به آن‌ها در سراسر جهان شده است(۳-۵). فلوروکوئینولون‌ها با مهار آنزیم‌های DNA ژیراز و توپوایزومراز IV در باکتری باعث مهار رونویسی و همانندسازی می‌شوند (۷). در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی DNA ژیراز و توپوایزومراز IV هدف اصلی فلوروکوئینولون‌ها می‌باشند(۶، ۷). آنزیم DNA ژیراز از دو زیر واحد A و B (*gyrA* و *gyrB*) و توپوایزومراز IV از دو زیر واحد C و E (*parC* و *parE*) تشکیل شده است (۷). علل ایجاد مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها شامل جهش‌های کروموزومی، افزایش بیان ژن‌های درگیر در پمپ‌های افلاکس، تغییر در آنزیم هدف و

[۱] دانشجوی کارشناس ارشد، میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

[۲] دانشیار، میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

[۳] استادیار، ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی دانشکده علوم، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:41 +0330 on Friday January 19th 2018

کاهش سطح انباشت فلوروکوئینولون‌ها در سلول می‌باشد (۸، ۹). اگرچه فلوروکوئینولون‌هایی چون سیپروفلوکساسین اغلب برای درمان عفونت‌های ناشی از کلبسیلا پنومونیه مورداستفاده قرار می‌گیرد، اما مقاومت این باکتری به این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها در حال افزایش است. به‌طوری‌که مشخص‌شده یکی از دلایل ایجاد مقاومت به فلوروکوئینولون‌هایی چون سیپروفلوکساسین کاهش تمایل توپوایزومرازهای II (ژیراز) و IV به این دارو است. این امر نتیجه جهش در زیر واحدهای این دو آنزیم (DNA ژیراز (*gyrA* و *gyrB*) و توپوایزومراز IV (*parC* و *parE*)) می‌باشد (۱۴).

استفاده نادرست و طولانی‌مدت سفالوسپورین‌ها باعث شده جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به بتالاکتامازها افزایش یابد. کوئینولون‌ها از داروهای مؤثر در درمان این گروه از عفونت‌ها محسوب می‌شوند. بااین‌حال مصرف بی‌رویه این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها در سال‌های اخیر باعث افزایش مقاومت به آن‌ها شده (۳)، به‌طوری‌که محققین به دنبال شناسایی دلایل ایجادکننده مقاومت در این جدایه‌ها جهت انتخاب استراتژی‌های درمانی مناسب‌تر هستند. هدف از این مطالعه بررسی نقش جهش‌های ژن *parC* در ایجاد مقاومت چندداروییی در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه جداشده از عفونت‌های بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستانی استان گیلان بود. بدین منظور بعد از جداسازی نمونه‌های مقاوم و بررسی نوع مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، انواعی که بیشترین مقاومت به یک یا چند دارو را داشتند ازنظر میزان MIC و جهش‌های ژن *parC* به کمک روش PCR-سکوئنسینگ موردبررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

۲-۱-جمع‌آوری نمونه و شناسایی باکتری

در این مطالعه، تعداد ۴۰ نمونه در بازه زمانی یک‌ساله ۹۴-۹۳ از نمونه‌های مختلف بالینی (ادرار، خون، ترشحات واژن) از مراکز درمانی و بیمارستان‌های سطح استان گیلان جمع‌آوری گردید. ابتدا جدایه‌ها بر اساس رنگ گرم، تست اوره آز، اورنتین دکربوکسیلاز و رشد در دمای $37\ ^{\circ}c$ تشخیص داده شدند(۱۰).

۲-۲- سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی

پس از جداسازی نمونه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاومت آنتی‌بیوتیکی با انجام تست آنتی بیوگرام از طریق روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Baur-Kirby) و طبق استاندارد CLS[1] (۱۱)، با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سیپروفلوکساسین (۵µg)، ایمی پنم (۱۰µg)، آمیکاسین (۳۰µg)، سفکسیم (۳۰µg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، سفالکسین (۳۰µg) و جنتامایسین (۱۰µg) تعیین گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت High Media (هند) خریداری شد. بعد از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C، قطر هاله عدم رشد اطـراف هـر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت گردید.

۲-۳-تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC)

در این مطالعه از فلوروکوئینولون‌ها سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید ازنظر میزان MIC به روش براث دایلوشن بر اساس استاندارد CLSI در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* بررسی شدند (۱۱). به این منظور جدایه‌ها در محیط کشت مولر هینتون براث در غلظت‌های مختلف دارو به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور $37\ ^{\circ}c$ نگهداری شد. سپس اولین لوله‌ای که عدم رشد در آن مشاهده شد به‌عنوان MIC[2] در نظر گرفته شد.

۲-۴-واکنش PCR و تعیین توالی ژن *parC*

در ابتدا جدایه‌ها در محیط مولر هینتون براث کشت داده شدند و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای 37° 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 ۲ 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 توسط شرکت Bioneer صورت گرفت. واکنش PCR طبق برنامه ذیل انجام شد: یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در 92° C به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل در دمای **C** 92° به مدت ۳۰ ثانیه، 50° C به مدت ۳۰ ثانیه، 72° C به مدت ۱ دقیقه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای 72° C به مدت ۱۰ دقیقه. 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 از روی ژل آگارز، نمونه‌ها توسط شرکت Bioneer تعیین توالی شد. سپس نتایج حاصل به کمک نرم‌افزار CLC main workbench v3.5 و نرم‌افزار آنلاین بلاست (BLAST) ازنظر وجود جهش در نمونه‌های مقاوم نسبت به نمونه استاندارد رفرنس (ATCC 13883) موجود در سایت NCBI موردبررسی قرار گرفت.

[1] Clinical and Laboratory Standard institute

[2] Minimal inhibitory concentration

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:41 +0330 on Friday January 19th 2018

جدول (۱): مشخصات پرایمرهای مربوط به ژن ParC

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول PCR	رفرنس
ParC-F	5'-CAGCTCGGCATACTTCGAC-3'	340 bp	(۱۲)
ParC-R	5'-CCTGAACTACTCCATGTACGTGAT-3'		

یافته‌ها

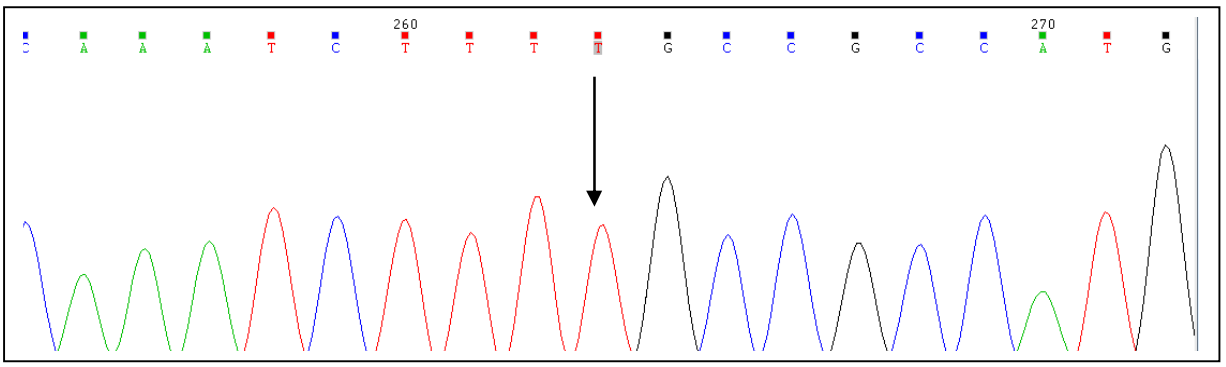
در این بررسی ۴۰ نمونه از بیمارانی که دچار عفونت به *کلبسیلا پنومونیه* شده بودند از بیمارستان‌های سطح استان گیلان جدا شد. نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت این باکتری نسبت به هشت آنتی‌بیوتیک در جدول ۲ نشان داده شده است. در این آزمون بیشترین مقاومت نسبت به سفالکسین و بیش‌ترین حساسیت نسبت به جنتامایسین مشاهده شد. در این مطالعه از ۴۰ جدایه، ۱۳ جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند که ازنظر میزان MIC موردبررسی قرار گرفتند.

جدول (۲): الگوی مقاومت ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از نمونه‌های بالینی نسبت به آنتی‌بیوتیک

نوع آنتی‌بیوتیک	مقاوم تعداد (درصد)	حساس وابسته دوز تعداد (درصد)	حساس تعداد (درصد)
سیپروفلوکساسین	۱۳ (۳۲،۵)	۰(۰)	۲۷ (۶۷،۵)
ایمی پنم	۹ (۲۲،۵)	۲ (۵)	۲۹ (۷۲،۵)
آمیکاسین	۸ (۲۰)	۱ (۲،۵)	۳۱ (۷۷،۵)
سفکسیم	۱۲ (۳۰)	۰(۰)	۲۸ (۷۰)
نالیدیکسیک اسید	۱۳(۳۲،۵)	۸ (۲۰)	۱۹ (۴۷،۵)
سفوتاکسیم	۱۰ (۲۵)	۴ (۱۰)	۲۶ (۶۵)
سفالکسین	۲۸ (۷۰)	۲ (۵)	۱۰ (۲۵)
جنتامایسین	۷ (۱۷،۵)	۱ (۲،۵)	۳۲ (۸۰)

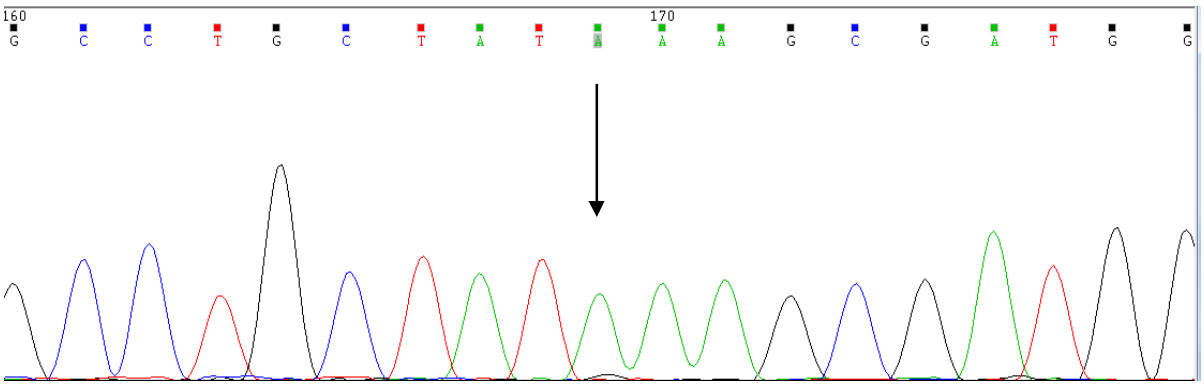
در این مطالعه از ۱۳ جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین، در ۱۰ جدایه مقاومت به سیپروفلوکساسین با MIC=1024 µg/ml، در دو مورد MIC=256 µg/ml و در یک مورد MIC=128 µg/ml گزارش شد. همچنین در ۱۳ نمونه مقاوم به نالیدیکسیک اسید، یک مورد دارای MIC=128 µg/ml و بقیه موارد MIC≥512 µg/ml بود.

جهت بررسی مولکولی مقاومت به سیپروفلوکساسین، ژن *parC* در نمونه‌های جداشده به روش PCR تکثیر شدند و بعد از اطمینان از تک بانده بودن محصولات PCR، نمونه‌ها مورد آنالیز به کمک سکونسینگ قرار گرفتند. نتایج سکونسینگ نشان داد که دو نمونه دارای جهش L38F بودند که آمینواسید لوسین به فنیل آلانین تبدیل شده بود. این جهش در اثر جابجایی T به A در نوکلئوتید ۱۱۴ ایجاد شده بود (شکل ۱). همچنین دو نمونه دارای جهش E84K بودند که آمینواسید گلوتامیک اسید به لایزین تبدیل شده بود که در اثر جهش بد معنی تغییر G به A در نوکلئوتید ۲۵۰ رخداده بود (شکل ۲).



شکل (۱): تغییر نوکلئوتید A در نوکلئوتید ۱۱۴ م به T: TTA(Leu)>TTT(Phe) با تغییر آمینواسیدی L38F

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:41 +0330 on Friday January 19th 2018



شکل (۲): تغییر نوکلئوتید G در نوکلئوتید ۲۵۰ م به A: GAA(Glu)>AAA(Lys) با تغییر آمینواسیدی E84K

بحث

مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از مشکلات مهم کشورها در درمان بیماری‌های عفونی می‌باشد. *کلبسیلا پنومونیه* یک پاتوژن فرصت‌طلب است که معمولاً باعث ایجاد عفونت‌های باکتریایی در انسان می‌گردد. در سال‌های اخیر، ظهور جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در کلبسیلا پنومونیه تبدیل به یک مشکل و نگرانی بزرگ در سراسر جهان شده است. کوئینولون‌ها دسته‌ای از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف هستند که کارایی بسیارخوبی در درمان بیماری‌های عفونی ایجاد شده توسط *کلبسیلا پنومونیه* دارند، اما استفاده گسترده موجب ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آن‌ها شده است(۳).

در مطالعه حاضر که بر روی ۴۰ نمونه *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های سطح استان گیلان انجام گرفت، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در ۳۰ درصد از جدایه‌ها گزارش گردید. درحالی‌که در مطالعه پورمحمد و همکاران در سال ۲۰۱۳ در تبریز از ۶۱ نمونه کلینیکی *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از خون، ادرار، زخم و دیگر نمونه‌های بخش ICU، ۶۱/۹ درصد جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین مقاوم بودند (۱۳). همچنین در مطالعه صورت گرفته توسط نوروزی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در کرمان از ۱۱۱ نمونه *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از خون، ادرار، ترشحات تنفسی و زخم ۱۹ درصد جدایه‌ها به سیپروفلوکساسین مقاوم بوده است (۸). در مطالعه پورعلی شش بلوکی و همکاران در سال ۱۳۹۵ در بیمارستان‌های شیراز مشخص شد از ۱۱۱ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* به‌دست‌آمده از نمونه‌های خون، ادرار، زخم، تراشه و برونکوآلوئلار، ۳۳ درصد موارد مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند(۱۴). در مطالعه مولانا و همکاران در سال ۱۳۸۹ بر روی ۳۰ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* نمونه‌برداری شده از محیط و تجهیزات بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان شهید بهشتی شهر بابل ۶۰ درصد موارد مقاوم به سیپروفلوکساسین تشخیص داده شدند(۱۵). بر این اساس در نواحی مختلف میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین متفاوت است ولی به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک انتظار می‌رود میزان مقاومت افزایش یابد. قابل‌ذکر است شیوع متفاوت عفونت‌ها در استان‌های مختلف و همچنین دلایل متنوع ژنتیکی در ایجاد مقاومت در این عفونت‌ها می‌تواند باعث تفاوت در میزان شیوع مقاومت در این عفونت‌ها باشد. از سوی دیگر تفاوت در موضع جمع‌آوری جدایه‌ها می‌تواند از دلایل تفاوت در میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در مطالعات مختلف باشد.

مقاومت به سیپروفلوکساسین به‌واسطه جهش در چندین ژن ازجمله زیر واحد *parC* در توپوایزومراز IV *کلبسیلا پنومونیه* رخ می‌دهد. در مطالعات مختلف انواع جهش‌ها در ژن *parC* در *کلبسیلا پنومونیه* که با مقاومت در سیپروفلوکساسین همراه است گزارش شده است. دراین‌بین مطالعات زیادی جهش در کدون‌های ۸۰ و ۸۴ را در ژن *parC* گزارش کرده‌اند که شامل S80I و E84K می‌باشد. در مطالعه بریس و همکاران در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* چندین جهش ازجمله S80I و E84K مشاهده شد (۱۶). در مطالعه پیه کارسکا و همکاران در سال ۲۰۱۵، نیز هر دو جهش در جدایه‌های مقاوم به فلوروکوئینولون‌ها شناسایی شد (۱۷). در مطالعه مینارینی و همکاران جهش‌های S80I در شش جدایه از ۲۱ جدایه مقاوم به کوئینولون‌ها به‌دست‌آمده از مراجعین به آزمایشگاه‌های چند شهر برزیل بین سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۵ شناسایی شد. در این مطالعه جهش E84K گزارش نشد (۱۸). به نظر می‌رسد عدم وجود جهش S80I در این مطالعه به دلیل اهمیت کم‌تر این جهش در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* در استان گیلان باشد. همچنین در بعضی مطالعات همراهی این جهش با مقاومت به غلظت‌های بالاتر سیپروفلوکساسین در جدایه‌های مقاوم به این دارو مشاهده شده است (۱۹). از سوی دیگر در مطالعه چن و همکاران در سال ۲۰۰۳ در بین ۳۴ جدایه مقاوم *کلبسیلا پنومونیه* موردمطالعه در تایوان هیچ جهشی در ژن *parC* مشاهده

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:41 +0330 on Friday January 19th 2018

نشد. در این مطالعه مشخص شد که بعضی از جدایه‌های مقاوم دارای جهش در *gyrA* می‌باشند(۲۰). در مطالعه محمدعلی پور و همکاران در سال ۱۳۹۴ بر روی ۱۰ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به سیپروفلوکساسین، شش جدایه دارای جهش در ژن *gyrA* بودند(۳). در مطالعه پارک و همکاران در سال ۲۰۱۷ از ۴۲ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به سیپروفلوکساسین ۳۶ جدایه حداقل یک جهش در یکی از ژن‌های *gyrA*، *gyrB* و *parC* داشتند. در این مطالعه هر دو جهش S80I و E84K در جدایه‌های مقاوم مشاهده شد(۱۹). بنابراین عدم وقوع جهش S80I می‌تواند نشان‌دهنده اهمیت دیگر جهش‌ها در این ژن و یا اهمیت دیگر ژن‌های دچار جهش ازجمله *gyrA* در استان باشد.

از سوی دیگر در این مطالعه در دو جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین، جهش E84K شناسایی شد. در مطالعات مختلفی چون مطالعه پیه کارسکا (۱۷) و مطالعه بریس (۱۶) نیز در بعضی از جدایه‌های مقاوم به فلوروکوئینولون‌ها جهش E84K گزارش شد. در مطالعه نوروزی و همکاران از بین ۱۱۱ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* ۶ جدایه دارای جهش در ژن *parC* بودند که تنها دو مورد جهش شایع S80I را داشتند. در مطالعه نوروزی جهش شایع E84K مشاهده نشد(۸). جهش E84K یکی از چند جهش شایع در *parC* محسوب می‌شود که در جدایه‌های مقلوم به فلوروکوئینولون‌ها گزارش شده است. وقوع این جهش در دو جدایه *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به سیپروفلوکساسین در این مطالعه نشان‌دهنده اهمیت آن در ایجاد مقاومت به دارو است. هرچند در مطالعات مختلف وقوع یک یا چند جهش در *parC* در جدایه‌های مقاوم گزارش شده است، به نظر می‌رسد در استان گیلان دیگر جهش‌های شایع در این ژن رخ نداده باشد و جهش‌های دیگری در این ژن یا دیگر ژن‌ها در ایجاد مقاومت اهمیت داشته باشد. از سوی دیگر تبدیل گلوتامیک اسید به آمینواسیدهای لایزین، آلانین و گلایسین در مطالعات مختلف ازجمله مطالعه مینارینی و همکاران در برزیل بین سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۵ (۱۸)، بریس و همکاران در هلند سال ۲۰۰۱ (۱۶)، دگوچی و همکاران سال ۱۹۹۶ در ژاپن (۲۱) مشاهده شد. و این در حالی است که در دو نمونه موردمطالعه ما فقط تبدیل گلوتامیک اسید به لایزین گزارش شد. از سوی دیگر جهش جدید L38F در مطالعه حاضر برای اولین بار مشاهده شد. به نظر می‌رسد این جهش نیز همانند دیگر جهش‌های مشاهده شده در این ژن با تغییر تمایل سیپروفلوکساسین به *parC* باعث کاهش حساسیت به دارو در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* در استان گیلان شده باشد که به مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه سیپروفلوکساسین جزء آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر در درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشد وجود ۱۳ جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین از ۴۰ جدایه و همچنین مقاومت به دوزهای بالای نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین در این مطالعه خطر خاموش افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی را در استان نشان می‌دهد. همچنین وقوع یک جهش شایع *parC* در دو جدایه و یک جهش جدید در دو جدایه برای اولین بار در دنیا در این مطالعه نشانه اهمیت این جهش‌ها در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین در این باکتری در استان گیلان می‌باشد. به‌طوری‌که به نظر می‌رسد این جهش‌ها باعث کاهش تمایل سیپروفلوکساسین به توپوایزومراز IV و درنتیجه کاهش اثر سیپروفلوکساسین در مهار تکثیر سلولی شوند.

تشکر و قدردانی

این مقاله تحقیقاتی حاصل پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی می‌باشد. نویسندگان این مقاله از ریاست و معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت و ریاست دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان کمال تشکر و امتنان را دارند.

References

1. Kang CI, Kim SH, Bang JW, Kim HB, Kim NJ, Kim EC, et al. Community-acquired versus nosocomial Klebsiella pneumoniae bacteremia: clinical features, treatment outcomes, and clinical implication of antimicrobial resistance. J Korean Med Sci 2006;21(5): 816-22.
2. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. N Engl J Med 2010;362(19):1804-13
3. MohammadAlipour Z, Asadpour L, Ranji N. Fluoroquinolone resistance and mutation in gyrA gene in clinical isolates of Klebsiella pnemoniae. Iran J Med Microbiol 2016;10(5): 31-7.
4. Ambrozic Avgustin J, Keber R, Zerjavic K, Orazem T, Grabnar M. Emergence of the quinolone

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:41 +0330 on Friday January 19th 2018

resistance-mediating gene aac(6')-Ib-cr in extended-spectrum-beta-lactamase-producing Klebsiella isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(11):4171-3.

5. Ranji N, Rahbar Takrami S. Role of mexZ gene in ciprofloxacin resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates in Guilan province. Urmia Med J 2017;27(10): 902-13.
6. Koo SH, Kwon KC, Cho HH, Sung JY. Genetic basis of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates from three university hospitals in Chungcheong Province, Korea. Korean J Lab Med 2010;30(5): 498-506.
7. Al-Marzooq F, Mohd Yusof MY, Tay ST. Molecular analysis of ciprofloxacin resistance mechanisms in Malaysian ESBL-producing Klebsiella pneumoniae isolates and development of mismatch amplification mutation assays (MAMA) for rapid detection of gyrA and parC mutations. BioMed Res Int 2014;2014: 601630.
8. Norouzi A, Azizi O, Hosseini H, Shakibaie S, Shakibaie Mr. Amino acid Substitution Mutations Analysis of gyrA and parC Genes in Clonal Lineage of Klebsiella pneumoniae conferring High-Level Quinolone Resistance. J Med Microbiol Infectious Diseases 2014;2(3): 109-17.
9. Padilla E, Llobet E, Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Bengoechea JA, Alberti S. Klebsiella pneumoniae AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob Agents Chemother 2010;54(1): 177-83.
10. MGe LM. Enterobacteriaceae In: Textbook of diagnostic microbiology. 4th ed. Missouri: Saunders, Elsevier, Maryland Heights; 2011.P. 427-50.
11. Cockerill F, Patel J, Alder J, Bradford P, Dudley M, Eliopoulos G, et al. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement; M100-S23: Clinical & Laboratory Standards Institute; 2013.
12. Bratu S, Landman D, George A, Salvani J, Quale J. Correlation of the expression of acrB and the regulatory genes marA, soxS and ramA with antimicrobial resistance in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae endemic to New York City. J Antimicrob Chemother 2009;64(2):278-83.
13. Ali PorMohammad AH, Shams F, Aghazadeh M. Assessment of epsilometer test over molecular detection for quinolone resistance in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae clinical isolates: A predictable schedule on routine basis. Life Sci J 2014;11(12s): 1027-31.
14. Pourali Sheshblouki G, Mardaneh J, Hosseinzadeh Z. Klebsiella pneumoniae Infections in Hospitalized Patients: Characterization of Antibiotic Cross-resistance and Detection of Cefepime Susceptible-dose Dependent (SDD) Strains. J Fasa Univ Med Sci 2016;6(1): 52-9.
15. Molana Z, Ferdosi Shahandashti E, Gharavi S, Shafii M, Norkhomami S, Ahangarkani F, et al. Molecular Investigation of Class I Integron in Klebsiella Pneumoniae Isolated from Intensive Care Unit (Shahid Beheshti Hospital of Babol 2010). J Babol Univ Med Sci 2011;13(6): 7-13.
16. 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(Pt 3):915-24.
17. Piekarska K, Wolkowicz T, Zacharczuk K, Rzeczkowska M, Chrost A, Bareja E, et al. Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in gyrA and parC among fluoroquinolone-resistant clinical Enterobacteriaceae isolated in a tertiary hospital in Warsaw, Poland. Int J Antimicrob Agents 2015;45(3):238-43.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:41 +0330 on Friday January 19th 2018

18. Minarini LA, Darini AL. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of gyrA and parC in Enterobacteriaceae isolates from Brazil. Braz J Microbiol. 2012 Oct;43(4):1309-14.
19. Park KS, Yang HS, Nam YS, Lee HJ. Mutations in DNA Gyrase and Topoisomerase IV in Ciprofloxacin-Nonsusceptible Extended-Spectrum -Lactamase-Producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. Clin lab 2017;63(3): 535-41.
20. Chen FJ, Lauderdale TL, Ho M, Lo HJ. The roles of mutations in gyrA, parC, and ompK35 in fluoroquinolone resistance in Klebsiella pneumoniae. Microb Drug Resist. 2003;9(3):265-71.
21. Deguchi T, Fukuoka A, Yasuda M, Nakano M, Ozeki S, Kanematsu E, et al. Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother 1997;41(3):699-701.

Original Article

MUTATIONS IN *PARC* SUBUNIT OF TOPOISOMERASE IV IN CIPROFLOXACIN RESISTANT ISOLATES OF *KLEBSIELLA PNEUMONIA* IN GUILAN PROVINCE

Kobra Ahmadpour Bijargah[1], Mohammad Faezi Ghasemi[2]*, Najmeh Ranji[3]

Received: 10 Feb, 2017; Accepted: 29 Apr, 2017

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:41 +0330 on Friday January 19th 2018

Abstract

Background & Aims: *Klebsiella Pneumonia* is a common cause of nosocomial infections including urinary tract, respiratory and wound infections. Several fluoroquinolones resistance mechanisms have been proposed, such as mutations in the topoisomerase IV subunits (*ParC* and *ParE*). The aim of this study was to investigate *parC* mutations in ciprofloxacin resistant isolates of *Klebsiella Pneumonia* from Guilan province.

***Materials & Methods*:** In this study, forty strains of *Klebsiella Pneumonia* were isolated from several Rasht and Lahijan hospitals and laboratories then were identified by biochemical tests. Antimicrobial susceptibility to ciprofloxacin, imipenem, amikacin, cefixime, cefotaxime, cephalexin, gentamicin, and nalidixic acid was determined by Kirby-Bauer disk diffusion and MIC methods. Then PCR-sequencing was performed to assess *parC* mutations in ciprofloxacin resistant isolates.

***Results*:** 15% of isolates were resistant to all eight antibiotics. Thirteen isolates (32.5%) were ciprofloxacin resistance. The most antibiotic resistance percentage was found for Cephalexin (70%) and the lowest resistance percentage was identified for Gentamicin (17.5%). Sequencing analysis showed that three ciprofloxacin resistant isolates had missense mutations L38F and/or E84K in *parC* gene.

Conclusion: In Guilan province, it seems that *parC* mutations plays role in developing ciprofloxacin resistance in *Klebsiella Pneumonia* through change in ciprofloxacin affinity to topoisomerase IV.

Keyword: Ciprofloxacin resistance, *Klebsiella Pneumonia*, Missense mutations, *parC,* Sequencing

Address: Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran
Tel: +989113314187
Email: faezi@liau.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2017: 28(3): 230 ISSN: 1027-3727

[1] *MSc Student, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran*
[2] *Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran (Corresponding Author)*
[3] *Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran*