

جهاش در زیرواحد *parC* توبوایزومراز IV در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سیپروفلوکسازین 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 از جمله عفونت مجاری ادراری، تنفسی و زخم می‌باشد. چندین مکانیسم مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها از جمله جهاش در زیرواحدات توبوایزومراز IV (*parE* و *parC*) پیشنهاد شده است. هدف از این مطالعه بررسی جهاش‌های ژن *parC* در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سیپروفلوکسازین در استان گیلان بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۴۰ سویه کلبسیلا پنومونیه از چندین بیمارستان و آزمایشگاه در رشت و لاهیجان جدادازی شد و به کمک روش‌های ببوشیمیایی تعیین هویت شدند. حساسیت و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکسازین، ایمی‌پنم، آمیکاسین، سفکسیم، سفوتاکسیم، سفالکسین، جنتامایسین و نالیدیکسیک اسید تعیین گردید. به روش کربی بوئر و MIC تعیین گردید. سپس به روش PCR-SK و PCR-L38F-PCR در جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکسازین بررسی گردید.

یافته‌ها: ۱۵ درصد جدایه‌ها به همه هشت آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. سیزده جدایه مقاوم به سیپروفلوکسازین (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 سیپروفلوکسازین دارای جهاش‌های بدمعنی *parC* E84K و *L38F* یا در ژن *parC* بودند.

نتیجه‌گیری: در استان گیلان به نظر می‌رسد جهاش‌های *parC* در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکسازین در کلبسیلا پنومونیه از طریق تغییر در تمایل سیپروفلوکسازین به توبوایزومراز IV نقش داشته باشند.

کلمات کلیدی: مقاومت به سیپروفلوکسازین، کلبسیلا پنومونیه، جهاش‌های بدمعنی، *parC* توالی یابی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هشتم، شماره سوم، ص ۲۳۰-۲۲۲، خرداد ۱۳۹۶

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

Email: faezi@liau.ac.ir

مقدمه

افزایش مقاومت به آنها در سراسر جهان شده است(۳-۵). 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 و باکتریمی 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 به طور گسترده‌ای در درمان عفونت‌های باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گیرند که استفاده گسترده موجب

فلوروکوئینولون‌ها با مهار آنزیم‌های DNA ژیراز و توبوایزومراز IV در باکتری باعث مهار رونویسی و همانندسازی می‌شوند(۷). در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی DNA ژیراز و توبوایزومراز IV هدف اصلی فلوروکوئینولون‌ها می‌باشند(۶، ۷). آنزیم DNA ژیراز از دو زیر واحد A (gyrA) و B (gyrB) و توبوایزومراز IV از دو زیر واحد C (parC) و D (parE) تشکیل شده است(۷). علل ایجاد مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها شامل جهاش‌های کروموزومی، افزایش بیان ژن‌های درگیر در پمپ‌های افلاکس، تغییر در آنزیم هدف و

¹ دانشجوی کارشناس ارشد، میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

² دانشیار، میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

³ استادیار، ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

اسید ($30\text{ }\mu\text{g}$)، سفوتاکسیم ($30\text{ }\mu\text{g}$)، سفالکسین ($30\text{ }\mu\text{g}$) و جنتامایسین ($10\text{ }\mu\text{g}$) تعیین گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت High Media (هند) خریداری شد. بعد از ۲۴–۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای 37°C ، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت گردید.

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

در این مطالعه از فلوروکوئینولون‌ها سیپروفلوکسازین و نالیدیکسیک اسید از نظر 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^۵ ۳۷ نگهداری شد. سپس اولین لوله‌ای که عدم رشد در آن مشاهده شد به عنوان MIC^۲ در نظر گرفته شد.

۴-۲- واکنش PCR و تعیین توالی ژن parC

در ابتدای جدایه‌ها در محیط مولر هینتون براث کشت داده شدند و به مدت ۱۸–۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند. سپس از کیت TOP General Genomic DNA Purification (شرکت توپازرژن، 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 AccuPower® PCR حجم نهایی $1\text{ }\mu\text{l}$ با استفاده از کیت PreMix (شرکت Pioneer، کره جنوبی) با افزودن DNA ژنومی، جفت پرایمر ($100\text{ }\mu\text{M}$) و آب استریل به محلول PreMix (حاوی آنزیم، کوفاکتور و بافر مخصوص) آماده شد. سنتز پرایمرها توسط شرکت Pioneer صورت گرفت. واکنش PCR طبق برنامه ذیل انجام شد: یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در 95°C به مدت 90 s دقيقه، 30 s سیکل در دمای 92°C به مدت 30 s ثانیه، 50°C به مدت 30 s ثانیه، 72°C به مدت ۱ دقیقه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای 72°C به مدت 10 min دقیقه. بعد از اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR، نمونه‌ها با حفظ زنجیره سرمایی توسط شرکت تکاپو زیست (ایران، تهران) به شرکت Pioneer کشور کره جنوبی فرستاده شد. بعد از تخلیص محصولات PCR از روی ژل آگارز، نمونه‌ها توسط شرکت Pioneer تعیین توالی شد. سپس نتایج حاصل به کمک نرم‌افزار v3.5 main workbench CLC (BLAST) از نرم‌افزار آنلاین بلاست (BLAST) از نظر وجود جهش در نمونه‌های مقاوم نسبت به نمونه استاندارد رفرنس (ATCC 13883) موجود در سایت NCBI موردنبررسی قرار گرفت.

² Minimal inhibitory concentration

کاهش سطح انباشت فلوروکوئینولون‌ها در سلول می‌باشد^{۸، ۹}. اگرچه فلوروکوئینولون‌هایی چون سیپروفلوکسازین اغلب برای درمان عفونت‌های ناشی از کلبسیلا پنومونیه مورداستفاده قرار می‌گیرد، اما مقاومت این باکتری به این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها در حال افزایش است. به طوری که مشخص شده یکی از دلایل ایجاد مقاومت به فلوروکوئینولون‌هایی چون سیپروفلوکسازین کاهش تمایل توبوایزومرازهای II (ژیاز) و IV به این دارو است. این امر نتیجه جهش در زیر واحدهای این دو آنزیم (DNA ژیاز *gyrA* و *gyrB*) و توبوایزومراز IV و *parE* و *parC*) می‌باشد^{۱۰}.

استفاده نادرست و طولانی‌مدت سفالوسبورین‌ها باعث شده جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به بتالاکتام‌ها افزایش یابد. کوئینولون‌ها از داروهای مؤثر در درمان این گروه از عفونت‌ها محسوب می‌شوند. با این حال مصرف بی‌رویه این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها در سال‌های اخیر باعث افزایش مقاومت به آن‌ها شده^{۱۱}، به طوری که محققین به دنبال شناسایی دلایل ایجاد کننده مقاومت در این جدایه‌ها جهت انتخاب استراتژی‌های درمانی مناسب‌تر هستند. هدف از این مطالعه بررسی نقش جهش‌های ژن *parC* در ایجاد مقاومت چنددارویی در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه جدایش 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 از نظر میزان MIC و جهش‌های ژن *parC* به کمک روش سکوتئنسینگ موردنبررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

۱- جمع‌آوری نمونه و شناسایی باکتری

در این مطالعه، تعداد ۴۰ نمونه در بازه زمانی یک ساله ۹۳–۹۴ 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 آر، اورنتین دکربوکسیلаз و رشد در دمای 37°C تشخیص داده شدند^{۱۰}.

۲- سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی

پس از جداسازی نمونه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاومت آنتی‌بیوتیکی با انجام تست آنتی‌بیوگرام از طریق روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Baur-Kirby) و طبق استاندارد CLS^۱، با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سیپروفلوکسازین ($30\text{ }\mu\text{g}$)، ایمی پن ($10\text{ }\mu\text{g}$)، آمیکاسین ($30\text{ }\mu\text{g}$)، سفکسیم ($30\text{ }\mu\text{g}$)، نالیدیکسیک

¹ Clinical and Laboratory Standard institute

جدول (۱): مشخصات پرایمرهای مربوط به ژن ParC

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

بیشترین مقاومت نسبت به سفالکسین و بیشترین حساسیت نسبت به جنتامايسین مشاهده شد. در این مطالعه از ۴۰ جدایه، ۱۳ جدایه مقاوم به سیپروفلوکسازین بودند که از نظر میزان MIC موردنبررسی قرار گرفتند.

یافته ها
در این بررسی ۴۰ نمونه از بیمارانی که دچار عفونت به کلیسیلا پنومونیه شده بودند از بیمارستان های سطح استان گیلان جدا شد. نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت این باکتری نسبت به هشت آنتی بیوتیک در جدول ۲ نشان داده شده است. در این آزمون

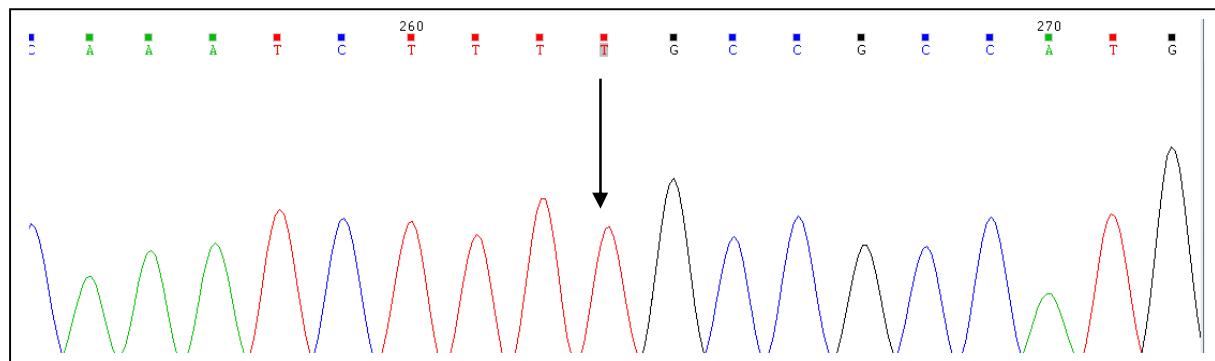
جدول (۲): الگوی مقاومت ایزوله های کلیسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه های بالینی نسبت به آنتی بیوتیک

نوع آنتی بیوتیک	مقاطوم تعداد (درصد)	حساس تعداد (درصد)	حساس وابسته دوز تعداد	حساس تعداد (درصد)
سیپروفلوکسازین	(۳۲.۵) ۱۳	(۳۲.۵) ۲۷	(۰) ۰	(۶۷.۵) ۲۷
ایمی پنم	(۲۲.۵) ۹	(۵) ۲	(۵) ۲	(۷۲.۵) ۲۹
آمیکاسین	(۲۰) ۸	(۲.۵) ۱	(۲.۵) ۱	(۷۷.۵) ۳۱
سفالکسین	(۳۰) ۱۲	(۰) ۰	(۰) ۰	(۷۰) ۲۸
نالیدیکسیک اسید	(۳۲.۵) ۱۳	(۲۰) ۸	(۰) ۰	(۴۷.۵) ۱۹
سفوتاکسین	(۲۵) ۱۰	(۱۰) ۴	(۱۰) ۴	(۶۵) ۲۶
سفالکسین	(۷۰) ۲۸	(۵) ۲	(۵) ۲	(۲۵) ۱۰
جنتامايسین	(۱۷.۵) ۷	(۱) ۱	(۱) ۱	(۸۰) ۳۲

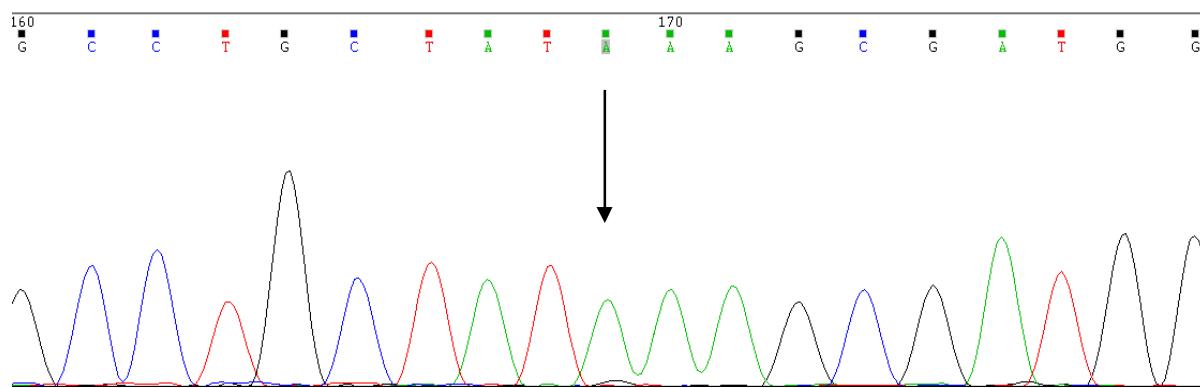
از تک بانده بودن محصولات PCR، نمونه ها مورد آنالیز به کمک سکونسینگ قرار گرفتند. نتایج سکونسینگ نشان داد که دو نمونه دارای جهش L38F بودند که آمینواسید لوسین به فنیل آلانین تبدیل شده بود. این جهش در اثر جابجایی T به A در نوکلئوتید ۱۱۴ ایجاد شده بود (شکل ۱). همچنین دو نمونه دارای جهش E84K بودند که آمینواسید گلوتامیک اسید به لایزین تبدیل شده بود که در اثر جهش بد معنی تغییر G به A در نوکلئوتید ۲۵۰ رخداده بود (شکل ۲).

در این مطالعه از ۱۳ جدایه مقاوم به سیپروفلوکسازین، در ۱۰ جدایه مقاومت به سیپروفلوکسازین با $\text{MIC}=1024 \mu\text{g/ml}$ ، در دو $\text{MIC}=128 \mu\text{g/ml}$ و در یک مورد $\text{MIC}=256 \mu\text{g/ml}$ گزارش شد. همچنین در ۱۳ نمونه مقاوم به نالیدیکسیک اسید، یک مورد دارای $\text{MIC}\geq 512 \mu\text{g/ml}$ و بقیه موارد $\text{MIC}=128 \mu\text{g/ml}$ بود.

جهت بررسی مولکولی مقاومت به سیپروفلوکسازین، ژن *parC* در نمونه های جدا شده به روش PCR تکثیر شدند و بعد از اطمینان



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



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

شدن(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. قابل ذکر است شیوع متفاوت عفونتها در استان‌های مختلف و همچنین دلایل متعدد زنگنه‌کی در ایجاد مقاومت در این عفونتها می‌تواند باعث تفاوت در میزان شیوع مقاومت در این عفونتها باشد. از سوی دیگر تفاوت در موقعیت جمع‌آوری جدایه‌ها می‌تواند از دلایل تفاوت در میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در مطالعات مختلف باشد.

مقاومت به سیپروفلوکساسین به واسطه جیش در چندین ژن از جمله زیر واحد parC در توبوایزومر IV کلیسیلا پنومونیه رخ می‌دهد. در مطالعات مختلف انواع جیش‌ها در ژن parC در کلیسیلا پنومونیه که با مقاومت در سیپروفلوکساسین همراه است گزارش شده است. در این بین مطالعات زیادی جیش در کبدون‌های ۸۰ و ۸۴ را در ژن parC گزارش کرده‌اند که شامل S80I و E84K می‌باشد. در مطالعه بریس و همکاران در جدایه‌های کلیسیلا پنومونیه چندین جیش از جمله S80I و E84K مشاهده شد (۱۶). در مطالعه پیه کارسکا و همکاران در سال ۲۰۱۵، نیز هر دو جیش در جدایه‌های مقاوم به فلوروکوئینولون‌ها شناسایی شد (۱۷). در مطالعه مینارینی و همکاران جیش‌های S80I در شش جدایه از ۲۱ جدایه مقاوم به کوئینولون‌ها به دست آمده از مراجعین به آزمایشگاه‌های چند شهر بزریل بین سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۵ شناسایی شد. در این مطالعه جیش E84K گزارش نشد (۱۸). به نظر می‌رسد عدم وجود جیش S80I در این مطالعه به دلیل اهمیت کمتر این جیش در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه‌های کلیسیلا پنومونیه در استان گیلان باشد. همچنین در بعضی مطالعات همراهی این جیش 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 کلیسیلا پنومونیه مورد مطالعه در تایوان هیچ جیشی در ژن parC مشاهده

بحث

مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از مشکلات مهم کشورها در درمان بیماری‌های عفونی می‌باشد. کلیسیلا پنومونیه یک پاتوژن فرستطلبه است که معمولاً باعث ایجاد عفونت‌های باکتریایی در انسان می‌گردد. در سال‌های اخیر، ظهور جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در کلیسیلا 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 کلیسیلا پنومونیه دارند، اما استفاده گسترده موجب ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آن‌ها شده است (۲۰).

در مطالعه حاضر که بر روی ۴۰ نمونه کلیسیلا پنومونیه جدادشده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های سطح استان گیلان انجام گرفت، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در ۳۰ درصد از جدایه‌ها گزارش گردید. در حالی که در مطالعه پورمحمد و همکاران در سال ۲۰۱۳ در تبریز از ۶۱ نمونه کلینیکی کلیسیلا پنومونیه جدادشده از خون، ادرار، زخم و دیگر نمونه‌های بخش ICU، ۶۱/۹ درصد جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین مقاوم بودند (۲۱). همچنین در مطالعه صورت گرفته توسط نوروزی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در کرمان از ۱۱۱ نمونه کلیسیلا پنومونیه جدادشده از خون، ادرار، ترشحات تنفسی و زخم ۱۹ درصد جدایه‌ها به سیپروفلوکساسین مقاوم بوده است (۲۲). در مطالعه پورعلی شش بلوکی و همکاران در سال ۱۳۹۵ در بیمارستان‌های شیراز مشخص شد از ۱۱۱ جدایه کلیسیلا پنومونیه به دست آمده از نمونه‌های خون، ادرار، زخم، تراشه و برونوکولوئلار، ۳۳ درصد موارد مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند (۲۳). در مطالعه مولانا و همکاران در سال ۱۳۸۹ بر روی ۳۰ جدایه کلیسیلا پنومونیه نمونه‌برداری شده از محیط و تجهیزات بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان شهید بهشتی شهر بابل ۶۰ درصد موارد مقاوم به سیپروفلوکساسین تشخیص داده

هلند سال ۲۰۰۱ (۱۶)، دگوچی و همکاران سال ۱۹۹۶ در ژاپن (۲۱) مشاهده شد. و این در حالی است که در دو نمونه موردمطالعه 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 سیپروفلوکسازین به *parC* باعث کاهش حساسیت به دارو در جایه‌های کلیسیلا پنومونیه در استان گیلان شده باشد که به مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه سیپروفلوکسازین جزء آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر در درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از کلیسیلا پنومونیه می‌باشد وجود ۱۳ جدایه مقاوم به سیپروفلوکسازین از ۴۰ جدایه و همچنین مقاومت به دوزهای بالای نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکسازین در این مطالعه خطر خاموش افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی را در استان نشان می‌دهد. همچنین وقوع یک جهش شایع در دو *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 سیپروفلوکسازین در این باکتری در استان گیلان می‌باشد. به طوری که به نظر می‌رسد این جهش‌ها باعث کاهش تمایل سیپروفلوکسازین به تپوابیزومراز IV و درنتیجه کاهش اثر سیپروفلوکسازین در مهار تکثیر سلولی شوند.

تشکر و قدردانی

این مقاله تحقیقاتی حاصل پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی می‌باشد. نویسنده‌گان 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

- 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.
- Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. N Engl J Med 2010;362(19):1804-13
- MohammadAlipour Z, Asadpour L, Ranji N. Fluoroquinolone resistance and mutation in *gyrA* gene in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Iran J Med Microbiol 2016;10(5): 31-7.
- Ambrozic Avgustin J, Keber R, Zerjavic K, Orazem T, Grabnar M. Emergence of the quinolone

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 کلیسیلا پنومونیه مقاوم به سیپروفلوکسازین، شش جدایه دارای جهش در ژن *gyrA* بودند (۳). در مطالعه پارک و همکاران در سال ۲۰۱۷ از ۴۲ جدایه کلیسیلا پنومونیه مقاوم به سیپروفلوکسازین ۳۶ جدایه حداقل یک جهش در یکی از ژن‌های *parC* و *gyrB* داشتند. در این مطالعه هر دو جهش E84K و S80I 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 از جمله *gyrA* در استان باشد.

از سوی دیگر در این مطالعه در دو جدایه مقاوم به سیپروفلوکسازین، جهش E84K شناسایی شد. در مطالعات مختلفی چون مطالعه پیه کارسکا (۱۷) و مطالعه بریس (۱۶) نیز در E84K بعضی از جدایه‌های مقاوم به فلوروکوئینولون‌ها جهش گزارش شد. در مطالعه نوروزی و همکاران از بین ۱۱۱ جدایه کلیسیلا پنومونیه ۶ جدایه 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 مقاوم به فلوروکوئینولون‌ها گزارش شده است. وقوع این جهش در دو جدایه کلیسیلا پنومونیه مقاوم به سیپروفلوکسازین 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 آمینوسیدهای لایزین، آلانین و گلایسین در مطالعات مختلف از جمله مطالعه مینارینی و همکاران در برزیل بین سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۲ (۱۸)، بریس و همکاران در

- 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. Piekarzka 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.

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.

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

Kobra Ahmadpour Bijargah¹, Mohammad Faezi Ghazemi^{2}, Najmeh Ranji³*

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

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