مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره دوم (پیاپی ۱۹) تابستان ۱۳۹۳
صفحات ۱۱۷-۱۰۹

Original Article

بررسی جهش در ژن *gyrA* جدایه های بالینی *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم به کینولون

حسین فاضلی[۱]، بهاره وکیلی[۲*]، فرزین خوروش[۳]، پریسا شعاعی[۴]، اشرف کریمی نیک[۵]، مجید یاران[۶]، بهروز عطایی[۷]، موج خالقی[۸]، طاهره مطلبی[۹]

[۱] استادیار، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، [۲] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات کرمان، گروه میکروب شناسی، [۳] دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات عفونت های بیمارستانی، [۴] دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات عفونت های بیمارستانی، [۵] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات کرمان، گروه میکروب شناسی، [۶] کارشناس، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، [۷] دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، [۸] استادیار، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، [۹] کارشناس ارشد، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: *اسینتوباکتر بامانی* یکی از علل مهم عفونت های بیمارستانی در سراسر دنیا است. سویه های *اسینتوباکتر* مقاوم به آنتی بیوتیک ها باعث محدودیت هایی در درمان موثر می شوند. این مطالعه با هدف بررسی جهش در ژن *gyrA* جدایه های بالینی *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم به کینولون و ارزیابی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی آن ها در اصفهان انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی-توصیفی، ۷۰ جدایه *اسینتوباکتر* از بیماران بستری در ICU بیمارستان الزهرا اصفهان جمع آوری گردید. به منظور شناسایی بیشتر جدایه ها از تست های بیوشیمیایی استاندارد استفاده شد. حساسیت آنتی بیوتیکی با روش انتشار دیسک برای ۸ آنتی بیوتیک انجام گرفت. حداقل غلظت باز دارندگی (MIC) سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین با روش E-test برای جدایه ها مطابق با استاندارد CLSI تعیین شد. همچنین به منظور شناسایی جهش در ژن *gyrA* در جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین از روش PCR-RFLP استفاده گردید.

یافته ها: جدایه ها بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی را نسبت به سیپروفلوکساسین (۱۰۰٪)، جنتامایسین (۱۰۰٪) و کمترین میزان را نسبت به ایمی پنم (۹۲/۸٪) و مروپنم (۹۰٪) نشان دادند. در روش MIC میزان مقاومت جدایه ها به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین ۱۰۰٪ و ۶۵/۷٪ بود. میزان مقاومت چند دارویی ۶۶/۷٪ درصد و فراوانی جهش ژن *gyrA* در جدایه ها ۹۳٪ بود.

نتیجه گیری: در این مطالعه مشاهده شد که جدایه های *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم به کینولون دارای جهش در ژن *gyrA* بودند. این جهش نقش مهمی در افزایش مقاومت در جدایه ها دارد. تشخیص سریع جدایه های *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم به کینولون می تواند کمک مناسبی برای درمان این عفونت ها باشد.

واژگان کلیدی: *اسینتوباکتر بامانی*، ژن *gyrA*، کینولون.

دریافت مقاله: مهر ماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: دی ماه ۹۲

مقدمه

اسینتوباکتر بامانی (*Acinetobacter baumannii*)، باسیل های گرم منفی، هوازی، غیرتخمیری، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت هستند که به عنوان یک عامل بیماری زای مهم بیمارستانی شناخته شده اند (۱ و ۲). در بیست سال گذشته این میکروارگانیسم به عنوان یک پاتوژن مهم فرصت طلب در عفونت های بیمارستانی مطرح بوده اند (۳ و ۴). گونه های مختلف *اسینتوباکتر* (*Acinetobacter*) به ویژه *اسینتوباکتر بامانی* می توانند عفونت ادراری، پنومونی، زخم های عفونی و منتژیت ایجاد کنند (۵). بیشتر عفونت های *اسینتوباکتر بامانی* از

*) آدرس برای مکاتبه: اصفهان، خیابان خرم، چهار راه شهیدان، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری. تلفن: ۰۹۱۲۵۴۴۸۶۴۶ پست الکترونیک: bahareh.vakili@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

بخش مراقبت های ویژه (ICU)، سوختگی و جراحی گزارش می شود که ریشه کن کردن آن به دلیل ماندگاری زیاد آن در محیط بیمارستان کاری دشوار است (۴ و ۶). بیماری های سخت، افزایش زمان بستری شدن در بیمارستان و درمان با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف از جمله عوامل بروز آلودگی به این باکتری می باشند (۴). از سال ۱۹۹۷ تا ۲۰۰۰ فراوانی *اسینتوباکتر* و مقاومت آنتی بیوتیکی آن روند افزایشی داشته است (۷). از سال ۲۰۰۰ به بعد این باکتری به بیشتر آنتی بیوتیک های رایج مانند سفالوسپورین ها، کینولون ها و آمینوگلیکوزیدها مقاوم شده است. *اسینتوباکتر* پتانسیل بالایی در مقاومت آنتی بیوتیکی اکتسابی دارد. بنابراین مقاومت چند دارویی نیز در آن ها افزایش یافته است (۸).

مقاومت چند دارویی *اسینتوباکتر بامانی* در بیمارستان های آمریکای شمالی، اروپا، آرژانتین، تایوان، چین، کره و ایران گزارش شده است (۱۱-۹). مصرف روز افزون آنتی بیوتیک ها به ویژه در بیماران بستری شده در بیمارستان موجب ایجاد سویه های دارای مقاومت چندگانه می گردد (۱۲ و ۱۳). در اروپا و آمریکا *اسینتوباکتر بامانی* در بخش ICU به ترتیب حدود ۳٪ و ۱۰٪ عامل عفونت های ایجاد شده می باشد (۵ و ۱۴). نتایج به دست آمده در مطالعه انجام شده بر روی بیماران بستری شده در بخش مراقبت های ویژه بیمارستان امام رضا تبریز در سال ۲۰۱۳ نشان داد که فراوانی *اسنیتوباکتر بامانی* بین ۱/۹۴٪ تا ۱۷/۴۷٪ بوده است (۱۱).

به منظور درمان عفونت های ناشی از *اسینتوباکتر*ها استفاده از کینولون ها ایمن تر و موثرتر از استفاده از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف مانند سفالوسپورین ها و آمینوگلیکوزیدها است، تا زمانی که مقاومت به کینولون ایجاد نشده باشد (۴ و ۶). مکانیسم های ایجاد مقاومت به کینولون ها به روش های مختلفی صورت می گیرد: ۱) جهش در آنزیم های هدف (DNA گیراز و توپوایزومراز IV)، ۲) تغییراتی که در بیان پمپ های تراوشی صورت می پذیرد، ۳) حضور پلاسمید Qnr. بیشترین اثر کینولون ها بر روی آنزیم های هدف مانند DNA گیراز است که با اتصال به آن و ایجاد جهش در ژن این آنزیم باعث مهار فرآیند رونویسی می گردد (۴، ۱۵ و ۱۶). آنزیم DNA گیراز دارای دو زیر واحد *gyrA* و *gyrB* است که ژن کد کننده آن ها در ناحیه ای به نام Quinolone Resistance determining regions (QRDR) وجود دارد. به طور معمول جهش کروموزومی تنها با یک جانشینی Leu به Ser 83 در ژن *gyrA* باعث مقاومت بالا به کینولون ها می شود (۴، ۵ و ۱۶). علاوه بر باکتری *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*)، مطالعات قبلی نشان داده است که جهش در ژن مورد بررسی نقش مهمی در ایجاد مقاومت در *اسینتوباکتر بامانی* ایفا می نماید (۱۷). هدف از این مطالعه بررسی فراوانی جهش ژن *gyrA* در جدایه های بالینی *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم به کینولون و ارزیابی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی آن ها در اصفهان بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه گیری، کشت و جداسازی جدایه ها: این مطالعه به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۷۰ جدایه باکتریایی به دست آمده از بیماران بستری شده در بخش مراقبت های ویژه (ICU) بیمارستان الزهرا اصفهان در سال ۹۱-۱۳۹۰ انجام شد. جدایه های *اسینتوباکتر* شامل ۲۸ نمونه تنفسی، ۲۳ نمونه ادراری، ۱۴ نمونه خون و ۵ نمونه مایع مغزی نخاعی بودند. نمونه ها بر روی محیط های بلاد آگار و مک کانکی آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C و ۴۴ °C قرار گرفتند.

به کمک تست های کاتالاز، اکسیداز، تست TSI و رنگ آمیزی گرم سویه ها در حد جنس (*اسینتوباکتر*) شناخته شدند. سپس به منظور شناسایی دقیقتر در حد گونه (*اسینتوباکتر بامانی*) از آزمون های بیوشیمیایی استاندارد مانند OF گلوکز، هیدرولیز اسکولین، احیای نیترات و سیترات استفاده گردید (۱۸).

ب) تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی: برای این منظور از روش انتشار دیسک مطابق با دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI 2012) استفاده شد. میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین (۳۰ µg)، سفتازیدیم (۳۰ µg)، سفپیم (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg)،

Archive of SID
www.SID.ir

لووفلوکساسین (۵ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، ایمی پنم (۱۰ µg) و مروپنم (۱۰ µg) (شرکت راین (ایران–مارک Mast انگلیس)) سنجیده شد.

حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum inhibitory concentration) MIC برای جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین با روش E-test (Eopsilometer test) بر اساس CLSI 2012 مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور از نوارهای شرکت Liofilchem، ایتالیا با شیب غلظت بین ۰/۰۰۲ µg/ml تا ۳۲ استفاده شد. همچنین از سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27835) برای کنترل کیفیت آنتی بیوگرام و MIC استفاده گردید (۱۹).

ج) *واکنش زنجیره ای پلی مراز:* به منظور استخراج DNA از کلنی های مجزای ۲۴ ساعته باکتری، از کیت شرکت سیناژن، ایران استفاده شد. برای تکثیر ژن *gyrA* از پرایمرهای *gyrA*–F (5′-AAATCTGCCCGTGTCGTTGGT-3′) و *gyrA* –R(5′- GCCATACCTACGGCGATACC -3′) استفاده شد (۴). این پرایمر جهت تکثیر ناحیه QRDR به کار می رود. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۲ میلی مول ($MgCl_2$ (50mM)، ۲۰۰ میکرومول dNTPs (10mM)، ۱۵ پیکومول از هر کدام از پرایمرها، یک واحد آنزیم Taq پلی مراز (شرکت سیناژن، ایران)، DNA (0.2µg) نمونه و ۱۹/۲۵ میکرولیتر آب مقطر دی یونیزه انجام شد.

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Master cycler Gradient, Germany) با شرایط دمایی ۱۰ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در نهایت محصول PCR، در کنار نشانگر ۱۰۰bp (شرکت Thermo، آمریکا) بر روی ژل آگاروز ۲٪ منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه ژل داک (شرکت Biorad، آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت.

د) *واکنش RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism):* در نهایت به منظور شناسایی موتاسیون در موقعیت Ser 83 ژن *gyrA*، ابتدا ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR (دارای اندازه ۳۴۳ جفت باز) به همراه ۱۸ میکرولیتر آب استریل، ۳ میکرولیتر بافر آنزیم ۱۰X و ۲ میکرولیتر آنزیم محدودالاثر HinfI (شرکت Thermo، آمریکا) به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷°C قرار گرفتند. محصول های به دست آمده از هضم آنزیمی به وسیله الکتروفورز در ژل آگاروز ۲٪ به کمک رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مشاهده و بررسی شدند. از سویه استاندارد *اسینتوباکتر بامانی* ATCC17978 برای مقایسه استفاده گردید (۴).

یافته ها

الف) نتایج آزمون های بیوشیمیایی: اسینتوباکتر در رنگ آمیزی گرم به صورت کوکوباسیل گرم منفی و در تست های بیوشیمیایی اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، نیترات منفی، تست TSI قلیایی و اسکولین منفی گزارش شد. توانایی رشد بر روی دو محیط کشت بلاد آگار و مک کانکی آگار در ۳۷ °C و ۴۴ °C داشت. بنابراین با توجه به نتایج آزمایش های بیوشیمیایی سیترات، احیای نیترات و هیدرولیز اسکولین و همچنین رشد بر روی دو محیط نام برده جدایه ها به عنوان *اسینتوباکتر بامانی* تشخیص داده شدند.

ب) نتایج میزان حساسیت آنتی بیوتیکی: تمامی جدایه های باکتریایی به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. همچنین ۹۵٪ (۶۶ عدد) از جدایه ها به لووفلوکساسین مقاومت نشان دادند (جدول ۱). در مواردی که جدایه *اسینتوباکتر بامانی* حداقل به سه کلاس آنتی بیوتیکی مقاومت داشتند سویه ها به عنوان Multi Drug Resistant (MDR) یا مقاومت چند دارویی شناخته شدند (۲). در ۴۷ جدایه (۶۶/۷٪) *اسینتوباکتر بامانی* مقاومت چند دارویی مشاهده گردید.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های *اسینتوباکتر*

آنتی بیوتیک	میزان مقاومت
ایمی پنم	٪۹۲/۸
مروپنم	٪۹۰
سیپروفلوکساسین	٪۱۰۰
لووفلوکساسین	٪۹۵
جنتامایسین	٪۱۰۰
آمیکاسین	٪۹۷/۱
سفپیم	٪۹۵/۷
سفتازیدیم	٪۹۸/۵

میزان MIC اندازه گیری شده برای آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین مطابق با تعاریف ۲۰۱۲ CLSI در نظر گرفته شد (MIC سیپرو فلوکساسین ≤۱ حساس، =۲ حدواسط، ≥۴ مقاوم) و (MIC لووفلوکساسین ≤۲ حساس، =۴ حدواسط، ≥۸ مقاوم) (جدول ۲).

ج) *نتایج آزمون PCR-RFLP*: نتیجه PCR-RFLP برای *اسینتوباکتر*های فاقد جهش پس از هضم آنزیمی، دو قطعه ۵۲ و ۲۹۱ جفت بازی است و در صورت دارا بودن جهش یک قطعه ۳۴۳ جفت بازی ایجاد می گردد. نتایج حاصل از PCR-RFLP نشان داد که ۹۳٪ جدایه ها دارای جهش (Ser 83) در ژن *gyrA* بودند (شکل ۱).

بحث

در این مطالعه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی جهش *gyrA* در بیماران بستری شده در بخش ICU بیمارستان الزهرا شهر اصفهان با روش فنوتیپی و PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده مقاومت بالای ۹۰٪ را به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه در جدایه های بالینی *اسینتوباکتر بامانی* نشان داد. همچنین فراوانی جهش ژن *gyrA* در این جدایه ها ۹۳٪ بود.

عفونت های بیمارستانی ناشی از *اسینتوباکتر بامانی* در حال پیشرفت به سوی مقاومت چند دارویی است. این امر به طور معمول در ICU ها رخ می دهد و روند درمان بیماران را با مشکل مواجه می سازد (۲۰).

میزان بروز مقاومت چند دارویی در مطالعه حاضر دارای فراوانی بالای ۶۷٪ بود. بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین و جنتامایسین (۱۰۰٪) و کمترین میزان نسبت به مروپنم (۹۰٪) مشاهده شد. در مطالعه ای که دنت (Dent) و همکاران در سال ۲۰۱۰ در ایالات متحده آمریکا انجام دادند، از ۲۴۷ جدایه *اسینتوباکتر بامانی*، ۷۲٪ به حداقل سه کلاس آنتی بیوتیکی مقاومت داشتند (۲).

در همان سال شنگ (Sheng) و همکاران میزان حساسیت نسبت به سیپروفلوکساسین را در ۵۴ جدایه *اسینتوباکتر بامانی* و ۲۸ جدایه از سایر گونه های *اسینتوباکتر* مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که اغلب جدایه های *اسینتوباکتر بامانی* نسبت به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. اما سایر گونه های *اسینتوباکتر* نسبت به سیپروفلوکساسین حساس بودند (۳).

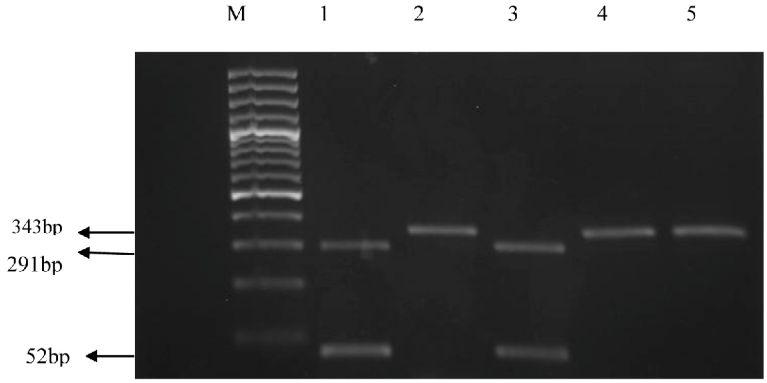
در مطالعه حاضر تمامی جدایه ها از گونه *اسینتوباکتر بامانی* بودند و گونه دیگری از این جنس شناسایی نگردید. جدایه های بررسی شده در مطالعه حاضر، نسبت به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین مقاوم بودند و تمامی این جدایه ها نسبت به چند آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند. این یافته با نتایج شنگ (Sheng) و همکاران مطابقت دارد.

در گزارشی که از سروش (Soroush) و همکاران در سال ۲۰۰۹ منتشر گردید، در بین ۱۴۵ جدایه *اسینتوباکتر بامانی* میزان مقاومت به آمیکاسین ۵۸/۵٪، سفتازیدیم ۸۵/۳٪،

جدول ۲: MIC سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین در جدایه های *اسینتوباکتر بامانی*

آنتی بیوتیک	درصد (تعداد) نمونه های حساس	درصد (تعداد) نمونه های حدواسط	درصد (تعداد) نمونه های مقاوم
سیپروفلوکساسین	-	-	٪۱۰۰ (۷۰)
لووفلوکساسین	-	٪۳۴/۳ (۲۴)	٪۶۵/۷ (۴۶)

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR-RFLP *اسینتوباکتر بامانی*. M) سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱) سویه استاندارد پس از هضم آنزیمی، ستون ۲) سویه استاندارد بدون اثر آنزیم، ستون ۳) نمونه مقاوم به کینولون فاقد جهش، ستون های ۴ و ۵) نمونه مقاوم به کینولون دارای جهش.

سیپروفلوکساسین ۷۹/۹٪، جنتامایسین ۶۵/۷٪، ایمی پنم ۵۰٪ و مروپنم ۵۳/۲٪ بود. همچنین میزان مقاومت چند دارویی ۴۰/۶٪ (۵۹ مورد) گزارش شد (۱۸). در سال ۲۰۱۰ محمدطاهری (Mohammadtaheri) و همکاران مقاومت جدایه های *اسینتوباکتر بامانی* به دست آمده از بخش ICU بیمارستان مسیح دانشوری تهران را نسبت به جنتامایسین ۳۹٪، سفپیم و آمیکاسین ۹۵/۷٪، سیپروفلوکساسین، سفتازیدیم و ایمی پنم هر کدام ۹۸/۸٪ گزارش نمودند. همچنین میزان مقاومت چند دارویی ۹۵/۵٪ اعلام گردید (۲۱). مقایسه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اسینتوباکتر بامانی* در این پژوهش و مطالعات مختلف نشان می دهد که میزان بروز مقاومت آنتی بیوتیک های مورد بررسی به سرعت در حال افزایش می باشد. تفاوت در میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف در نواحی متفاوت را می توان به فاکتورهای محیطی و وجود الگوهای متنوع در به کاربردن عوامل ضد میکروبی نسبت داد.

با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر که میزان مقاومت آنتی بیوتیکی بیش از ۹۰٪ ارزیابی شده است، نمی توان آنتی بیوتیک های مروپنم یا ایمی پنم را برای درمان عفونت های ناشی از *اسینتوباکتر بامانی* موثر دانست. بنابراین لازم است الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در خانواده پلی میکسین ها نیز مورد بررسی قرار گیرد.

فلوروکینولون ها جزء موثرترین و کم خطرترین آنتی بیوتیک هایی هستند که برای درمان عفونت های ناشی از گونه های *اسینتوباکتر* به کار می روند (۲۲). مطالعات گذشته نشان داده که جهش در DNA گیراز (ژن *gyrA*) و توپوایزومراز IV (ژن *parC*) باعث ایجاد مقاومت نسبت به کینولون ها می گردد. به طور معمول ابتدا جهش در کدون ۸۳ ژن *gyrA* رخ می دهد و باعث ایجاد مقاومت کینولون در باکتری های مختلفی مانند *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اسینتوباکتر بامانی*، *کمپیلوباکتر ژژونی* (*Campylobacter jejuni*) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) می شود (۴، ۱۶ و ۱۷).

لی (Lee) و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که ۹۰٪ جدایه های *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای جهش در ژن *gyrA* (Ser 83 Leu) هستند و وجود تنها یک جانشینی در ژن *gyrA* باعث ایجاد مقاومت شده است (۲۳). همچنین والنتین (Valentine) و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که تمامی ۲۰ جدایه بالینی *اسینتوباکتر بامانی* به سیپروفلوکساسین و ۱۸ جدایه به لووفلوکساسین مقاوم بودند. در مطالعه آن ها، نتایج حاصل از توالی یابی جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین نشان داد که تمامی جدایه های مقاوم دارای جهش در موقعیت Ser 83 ژن *gyrA* بودند. آنها بیان کردند که این جهش باعث ایجاد مقاومت به فلوروکینولون (مانند لووفلوکساسین) نیز می گردد (۵). یافته های ما نشان داد که ۹۳٪ جدایه های *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین دارای جهش در Ser 83 ژن *gyrA* هستند. این نتیجه با یافته

Archive of SID
www.SID.ir

های محققان یاد شده هماهنگی دارد.

همچنین با توجه به اطلاعات موجود امکان دارد در ۷٪ باقی مانده جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین با میزان MIC برابر ۳۲ µg/ml و ۱۶ µg/ml که فاقد جهش در کدون مورد بررسی بودند، جهش در سایر نقاط رخ داده باشد. چیئن (Chien) و همکاران در سال ۲۰۰۹ با روش PCR-RFLP نشان دادند که از ۱۲۸ جدایه *اسینتوباکتر بامانی* ۱۵ جدایه (۱۱/۷٪) دارای جانشینی Leu به Ser 83 در ژن *gyrA*بودند. آنها بیان کردند که جهش در ناحیه QRDR نقش مهم و اصلی در مقاومت به دارو به ویژه سیپروفلوکساسین ایفا نمی کند (۴). این یافته با نتایج مطالعه حاضر در تضاد است. همان طور که جهش در ژن *gyrA* در ایجاد مقاومت کینولونی نقش دارد، گزارش ها نشان می دهند که جهش در سایر ژن ها مانند *gyrB* و *parC* نیز می توانند باعث مقاومت کینولونی شوند (۲۴ و ۲۵).

اگرچه به غیر از جهش در ژن های یاد شده، فعالیت پمپ های تراوشی نیز در کاهش تجمع دارو نقش دارند اما نتایج مطالعات قبلی حاکی از آن است که وجود جهش در ناحیه QRDR عامل مقاومت دارویی به فلوروکینولون ها و کینولون ها است (۱۵ و ۲۶).

در مجموع با در نظر گرفتن نتایج مطالعه حاضر که نشان می دهد بیش از ۹۵ درصد جدایه های بالینی *اسینتوباکتر بامانی* به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین مقاوم بودند و این جدایه ها عموماً به دیگر آنتی بیوتیک ها نیز مقاوم می باشند، بنابراین برای پیشگیری از افزایش عفونت های بیمارستانی ناشی از *اسینتوباکتر بامانی* با مقاومت چند دارویی، شناسایی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی برای درمان مناسب توسط پزشکان امری ضروری است.

نتیجه گیری

در این بررسی مشاهده شد که جدایه های *اسینتوباکتر بامانی* مقاوم به کینولون دارای جهش در ژن *gyrA* بودند که نقش مهمی در افزایش مقاومت در جدایه ها دارد. روش PCR-RFLP می تواند جدایه های مقاوم به کینولون که دارای جهش در کدون ۸۳ هستند را شناسایی نماید و به عنوان یک روش غربالگری برای شناسایی به کار رود. همچنین پیشنهاد می گردد که جهش در سایر ژن ها (ژن *parC* و ژن *gyrB*) و همچنین نقش فعالیت پمپ های تراوشی که از عوامل ثانویه در ایجاد مقاومت به کینولون ها می باشند نیز مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل مرکز تحقیقات بیماری های عفونی وگرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Hujer KM, Hujer AM, Endimiani A, Thomson JM, Adams MD, Goglin K, Rather PN, Pennella TT, Massire C, Eshoo MW, Sampath R, Blyn LB, Ecker DJ, Bonomo RA. Rapid determination of quinolone resistance in *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 2009; 47(5): 1436-1442.
2. Dent LL., Marshall DR, Pratap S, Hulette RB. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: a descriptive study in a city hospital. BMC Infect Dis. 2010; 10(1): 196.
3. Sheng WH, Lin YC, Wang JT , Chen YC, Chang SC, Hsia KC, Wu RJ, Li SY. Identification of distinct ciprofloxacin susceptibility in *Acinetobacter* spp. by detection of the *gyrA* gene mutation using real-time PCR. Mol Cell Probes. 2009; 23(3-4): 154-156.

Archive of SID
www.SID.ir

4. Chien ST, Lin CH, Hsueh JC, Li PL, Hsu CH, Chang SH, Chien HI, Ben RY, Chang FH, Hsu LS. Mutation of *gyrA* and *parC* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and its relationship with antimicrobial drugs resistance in Taiwan. Ann Microbial. 2009; 59(2): 369-372.

5. Valentine SC, Contreras D, Tan S, Real LJ, Chu S, Xu HH. Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles County, California. J Clin Microbiol. 2008; 46(8): 2499-2507.

6. Liu YH, Kuo SC, Lee YT, Chang IC, Yang SP, Chen TL, Fung CP. Amino acid substitutions of quinolone resistance determining regions in *gyrA* and *parC* associated with quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. J Microbiol Immunol Infect. 2012; 45(2): 108-112.

7. Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003; 24(4): 284-295.

8. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, Ecker DJ, Massire C, Eshoo MW, Sampath R, Thomson JM, Rather PN, Craft DW, Fishbain JT, Ewell AJ, Jacobs MR, Paterson DL, Bonomo RA. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(12): 4114-4123.

9. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(10): 3471-3484.

10. Gootz TD, Marra A. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant threat. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008; 6(3): 309-325.

11. Aliakbarzade K, Farajnia S, Kariminik A. Prevalenec o aminoglycoside resistance genes in *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Tabriz city. J Microbial Word 2013; 6(3): 220-227. [In Persian]

12. Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Tocalli L, Gismondo MR. In vitro selection of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. by levofloxacin and ciprofloxacin alone and in combination with beta-lactams and amikacin. J Antimicrob Chemother. 2005; 56(2): 353-359.

13. Higgins PG, Stubbings W, Wisplinghoff H, Seifert H. Activity of the investigational fluoroquinolone finafloxacin against ciprofloxacin-sensitive and -resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(4): 1613-1615.

14. Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Karlowsky JA, Sahm DF, Wenzel RP. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit: a European and North American Surveillance study (2000-2002). Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2004; 3: 14.

15. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. Clin Infect Dis. 2005; 41: S120-126.

Archive of SID

www.SID.ir

16. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. Int J Antimicrob Agents. 2005; 25(5): 358-373.

17. Friedman SM, Lu T, Drlica K. Mutation in the DNA gyrase A Gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance-determining region. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(8): 2378-2380.

18. Soroush S, Haghi-Ashtiani MT, Taheri-Kalani M, Emaneini M, Aligholi M, Sadeghifard N, Pakzad I, Abedini M, Yasemi M, Paiman H. Antimicrobial resistance of nosocomial strain of *Acinetobacter baumannii* in Children's Medical Center of Tehran: a 6-year prospective study. Acta Med Iran. 2010; 48(3): 178-184.

19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty Second International Supplement M100-S22. Cockerill FR: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

20. Mohammadtaheri Z, Pourpaki M, Mohammadi F, Namdar R, Masjedi MR. Surveillance of antimicrobial susceptibility among bacterial isolates from intensive care unit patients of a tertiary-care university hospital in Iran: 2006-2009. Chemotherapy. 2010; 56(6): 478-484.

21. Srinivasan VB, Rajamohan G, Pancholi P, Stevenson K, Tadesse D, Patchanee P, Marcon M, Gebreyes WA. Genetic relatedness and molecular characterization of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in central Ohio, USA. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2009; 8: 21.

22. Heinemann B, Wisplinghoff H, Edmond M, Seifert H. Comparative activities of ciprofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, gemifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and trovafloxacin against epidemiologically defined *Acinetobacter baumannii* strains. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(8): 2211-2213.

23. Lee JK, Lee YS, Park YK, Kim BS. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Korea. Microbiol Immunol. 2005; 49(7): 647-653.

24. Vila J, Ruiz J, Marco F, Barcelo A, Goñi P, Giralt E, Jimenez de Anta T. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38(10): 2477-2479.

25. Yamagishi J, Yoshida H, Yamayoshi M, Nakamura S. Nalidixic acid-resistant mutations of the *gyrB* gene of *Escherichia coli*. Mol Gen Genet. 1986; 204(3): 367-373.

26. Chau SL, Chu YW, Houang ET. Novel resistance-nodulation-cell division efflux system AdeDE in *Acinetobacter* genomic DNA group 3. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48 (10): 4054-4055.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 2, June 2014

Original Article

Identification of mutation in *gyrA* gene obtained from quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*

Hossein Fazeli[1], Bahareh Vakili[2], Farzin Khorvash[3], Parisa Shoaei[4], Ashraf Kariminik[5], Majid Yaran[6], Behrooz Ataei[7], Moj Khaleghi[8], Tahre Motalebi[9]

[1]Associate Professor, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. [2]MSc, Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran. [3]Associate Professor, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. [4]PhD Student, Nosocomial Infections Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. [5] Associate Professor, Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran. [6] BS.c., Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.[7] Associate Professor, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. [8]Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran. [9] MS.c., Department of Microbiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Archive of SID

Abstract

Background & Objectives: *Acinetobacter* spp. is one of the most important ethiology of nosocomial infections worldwide. The presence of multiple antibiotic-resistant strains have limited effective treatments for *Acinetobacter* spp. The purposes of this study were to screen *gyrA* gene mutation in quinolone resistance clinical isolates of *A. baumannii* and their antimicrobial susceptibility pattern in Isfahan.

Material & Methods: In this cross-sectional study, 70 isolates of *Acinetobacter* were collected from patients hospitalized in the ICU of Isfahan Alzahra Hospital. Biochemical tests were used for detection of isolates. Antimicrobial susceptibility tests were performed on all isolates using the Kirby-Bauer Disk diffusion method and employment of eight antibiotics. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of ciprofloxacin and levofeloxacin resistant isolates were determined using the E-test method according to the CLSI guideline. Furthermore, a PCR-RFLP test was performed to investigate *gyrA* gene mutation in ciprofloxacin/ levofloxacin resistance isolates.

Results: The most antibiotic resistance was related to ciprofloxacin (100%) and gentamicin (100%) while the lowest antibiotic resistance were observed in case of application of imipenem (8.92%) and meropenem (90%). Based on MIC test the ratio of resistance to ciprofloxacin and levofeloxacin antibiotics were 100% and 65.7%, respectively. Also, overall 66.7% of these isolates showed multidrug resistant and 93% of the isolates carry a mutation at position 83 in *gyrA* gene.

Conclusion: The present study revealed that *A. baumannii* isolates carry a mutation in *gyrA* gene. This mutation causes increases in the microbial resistance to quinolone. Rapid detection of quinolone resistant *A. baumannii* isolates can help physicians to determine effective treatment for these infections

Keywords: *Acinetobacter baumannii, gyrA* gene, Quinolone.

Correspondence to: Bahareh Vakili

Tel: +983113359359

E-mail: bahareh.vakili@yahoo.com

Journal of Microbial World 2014, 7(2): 109-117.

www.SID.ir