



## تشخیص موتاسیون های نقطه ای مرتبط با مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه های سودوموناس آئروجینوسا در استان گیلان

نجمه رنجی<sup>۱\*</sup>، فاطمه اسدی رحمانی<sup>۲</sup>، سیده شیده پورخلیلی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> استادیار، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران، <sup>۲</sup> کارشناس ارشد، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران، <sup>۳</sup> کارشناس ارشد، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** سودوموناس آئروجینوسا یک پاتوژن فرصت طلب به ویژه در بیماران با نقص ایمنی است. مقاومت دارویی در سودوموناس آئروجینوسا به واسطه مکانیسم های مختلفی مانند جهش در زیرواحدهای توپوایزومرازها و تنظیم کننده های منفی سیستم های پمپ افلاکس ایجاد می شود. هدف از این مطالعه ارزیابی جهش های نقطه ای ژن های *gyrB*، *parC* و *nfxB* در جدایه های سودوموناس آئروجینوسا مقاوم به سیپروفلوکساسین استان گیلان بود.

**مواد و روش ها:** این پژوهش به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۲۰۰ سویه جمع آوری شده از بیمارستان ها و آزمایشگاه های رشت و لاهیجان انجام شد. با آزمون های بیوشیمیایی تعیین هویت جدایه ها انجام شد. حساسیت آنتی بیوتیکی به کمک روش های کربی-بائر و MIC تعیین گردید. برای ارزیابی جهش ها در ژن های *gyrB*، *parC* و *nfxB* در جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین از روش PCR و تعیین توالی استفاده شد.

**یافته ها:** از ۶۹ جدایه سودوموناس آئروجینوسا، ۲۶ سویه مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. MIC سیپروفلوکساسین در جدایه های مقاوم بین ۳۲-۱۰۲۴ μg/ml تعیین گردید. با آنالیز توالی یابی مشخص گردید که بعضی از جدایه های مقاوم، جهش های بدمعنی در ژن های *gyrB*، *parC* و *nfxB* داشتند. جهش های I524V و M520L، E468D، L464I، I424L، N368S در ژن *gyrB* اولین موارد گزارش شده در ایران می باشند.

**نتیجه گیری:** به نظر می رسد که جهش های گزارش شده در ژن های *parC* و *gyrB* روی تمایل توپوایزومرازها به سیپروفلوکساسین در جدایه های مقاوم تأثیر بگذارند. همچنین، جهش در ژن *nfxB* ممکن است موجب افزایش بیان پمپ افلاکس MexCD-OprJ و مقاومت به سیپروفلوکساسین گردد.

**واژگان کلیدی:** سیپروفلوکساسین، ژن *parC*، ژن *gyrB*، ژن *nfxB* سودوموناس آئروجینوسا.

پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹۶

دریافت مقاله: آبان ماه ۹۶

### مقدمه

باکتری می و عفونت های مجاری ادراری در دنیا محسوب می شود. رژیم درمانی عفونت های سودوموناس به طور معمول با بتالاکتام ها شامل مونوباکتام آزترونام (Aztreonam)، سفالوسپورین های نسل سوم و آنتی سودوموناس هایی مانند آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون ها صورت می گیرد (۱).

مقاومت چند دارویی (Multi-drug resistance (MDR) در سودوموناس آئروجینوسا (*Pseudomonas aeruginosa*) یکی از مشکلات مهم بهداشتی به ویژه در افراد بستری در بخش مراقبت های ویژه (ICU)، عفونت های حاصل از سوختگی ها،

\* آدرس برای مکاتبه: رشت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان. تلفن: ۰۱۳۳۳۴۲۴۰۸۰ پست الکترونیک: [n\\_ranji@iaurasht.ac.ir](mailto:n_ranji@iaurasht.ac.ir)

در بعضی مکانیسم‌های ایجادکننده مقاومت شود. در این راستا لازم است عوامل ژنتیکی موثر در ایجاد مقاومت‌های دارویی شناسایی شده و راهکارهای درمانی جدید و مناسب با وجود خزانه ژنتیکی در این عفونت‌ها جایگزین گردد.

هدف از این مطالعه بررسی جهش در ژن‌های موثر در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین شامل *gyrB*، *parC* و *nfxB* در جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا در استان گیلان به روش تعیین توالی بود.

### مواد و روش‌ها

**الف) جمع‌آوری نمونه و شناسایی باکتری:** در این مطالعه مقطعی، تعداد ۲۰۰ نمونه مشکوک به سودوموناس آئروجینوسا در بازه زمانی ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۵ از نمونه‌های سوختگی، نکروز بافتی، ادراری و ترشحات تنفسی در بیمارستان‌های ولایت، آریا، قائم و رازی رشت و آزمایشگاه‌های مهر و رازی لاهیجان جمع‌آوری گردید. جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا بر اساس رنگ گرم، تست اکسیداز، تولید رنگدانه، رشد در دمای ۴۲ درجه سلیسیوس و رشد در محیط کشت ستریمایید آگار تفکیک شدند (۱۱).

**ب) سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار از دیسک:** پس از جداسازی نمونه‌های سودوموناس آئروجینوسا مقاومت آنتی‌بیوتیکی با انجام تست آنتی‌بیوگرام از طریق روش استاندارد انتشار از دیسک (کربی - بائر) و طبق استاندارد CLSI ۲۰۱۳، با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی جنتامایسین ( $10 \mu\text{g}$ )، آمیکاسین ( $30 \mu\text{g}$ ) و سیپروفلوکساسین ( $5 \mu\text{g}$ ) (High Media، هند) تعیین گردید. پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس، قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت گردید (۱۲).

**ج) تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC):** برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد، از آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین به روش برات مایکروداپلوشن بر اساس استاندارد سال ۲۰۱۳ موسسه استانداردهای آزمایشگاه و بالین (CLSI) استفاده شد. برای این منظور جدایه‌ها در محیط کشت

مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، القای جهش در ژن‌های خاص (۴-۲) و همچنین انتقال افقی ژن‌های موثر (۵) در ایجاد مقاومت از عوامل ایجادکننده مقاومت چند دارویی در عفونت‌های باکتریایی محسوب می‌شوند. افزایش شیوع عفونت‌های بیمارستانی حاصل از سودوموناس آئروجینوسا مقاوم به چند دارو، انتخاب درمان‌های مناسب را به شدت با مشکل مواجه کرده است (۴).

فلوروکینولون‌ها، یکی از انتخاب‌های متداول در درمان سودوموناس آئروجینوسا است که امروزه با گستره وسیعی از مقاومت در جدایه‌های بیمارستانی همراه می‌باشند. دلایل ایجاد مقاومت به این گروه از داروها شامل تغییر در ساختار آنزیم هدف (جهش در ژن‌های موثر در سنتز توپوایزومراز II و IV) (۶)، افزایش بیان ژن‌های سیستم پمپ افلاکس و کاهش نفوذپذیری غشا می‌باشد. فلوروکینولون‌ها با مهار آنزیم‌های توپوایزومراز II و IV باعث مهار همانندسازی و دیگر مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با DNA می‌شوند (۷).

توپوایزومراز II از دو زیرواحد *gyrA* و *gyrB* و توپوایزومراز IV از دو زیرواحد *parC* و *parE* تشکیل شده است (۶). جهش در هر یک از این زیرواحد‌ها می‌تواند در ایجاد مقاومت به فلوروکینولون‌ها مؤثر باشد (۷). همچنین افزایش بیان ژن‌های پمپ افلاکس از دیگر عوامل ایجاد مقاومت به فلوروکینولون‌ها محسوب می‌شود که در اثر جهش در ژن‌های تنظیم‌کننده منفی بیان آن‌ها مانند ژن‌های *nalC* (۳)، *mexR* (۸) و *mexZ* رخ می‌دهد (۲).

با توجه به شیوع بالای مقاومت‌های دارویی در عفونت‌های بیمارستانی به ویژه سودوموناس آئروجینوسا و خطر مرگ در افراد با نقص سیستم ایمنی چون سوختگی‌ها (۹) و افراد تحت شیمی‌درمانی لازم است تدابیر پزشکی مناسبی برای درمان این گروه از عفونت‌ها اتخاذ گردد.

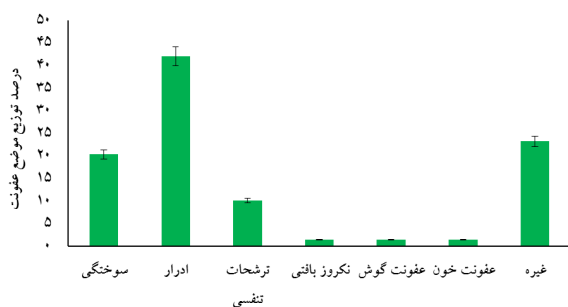
شایان یادآوری است که استفاده از فلوروکینولون‌هایی مانند سیپروفلوکساسین یا لووفلوکساسین در درمان عفونت‌های مقاوم به این دارو‌ها ممکن است موجب عدم پاسخ به آنتی‌بیوتیک‌های دیگری چون ایمی‌پنم (۱۰) به دلیل شباهت

افزار CLC main workbench از نظر وجود جهش در نمونه‌های مقاوم نسبت به نمونه استاندارد رفرنس (PAO1) موجود در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفتند. (و) آزمون آماری: به منظور بررسی ارتباط معنی‌دار نتایج شامل موضع عفونت، وضعیت حساسیت و مقاومت به دارو از آزمون آماری مربع کای استفاده گردید. سطح معنی‌داری روی  $P < 0/05$  قرار داده شد.

### یافته‌ها

در این تحقیق ۶۹ جدایه به عنوان سودوموناس آئروجینوسا تشخیص داده شد که از نمونه‌های سوختگی، ادراری، ترشحات تنفسی، نکروز بافتی، خون، گوش و غیره (موارد با موضع عفونت تعیین نشده) جمع‌آوری شدند (نمودار ۱). آنالیز آماری نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین محل عفونت سودوموناس آئروجینوسا در مبتلایان وجود ندارد.

بررسی حساسیت جدایه‌ها به روش انتشار از دیسک نشان داد مقاومت به هر یک از سه آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین  $\sim 40\%$  بود (جدول ۲). نتایج MIC سیپروفلوکساسین نشان داد که ۲۶ نمونه ( $37/68\%$ ) مقاوم به



نمودار ۱: توزیع عفونت‌های سودوموناس آئروجینوسا مقاوم به سیپروفلوکساسین بر حسب موضع عفونت. مواردی که موضع عفونت تعیین نشده بود، به صورت غیره نشان داده شده است.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده.

نام ژن	پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول PCR
<i>gyrB</i>	F	5'-GTTTCAGCTCGCAGACCAAGGAC-3'	۶۰۴ bp
<i>gyrB</i>	R	5'-GGGCTGGCGATGTAGATGTAG-3'	
<i>parC</i>	F	5'-GTTTCGCTGAGCAGCACCT-3'	۳۶۷ bp
<i>parC</i>	R	5'-ACCGAGCAGGCCTATCTGAA-3'	
<i>nfxB</i>	F	5'-AGCCATGACACCCGACCG-3'	۸۰۰ bp
<i>nfxB</i>	R	5'-CGAAGTCGACGGCAGCGGAT-3'	

مولر هینتون برات (Quelab، کانادا) در غلظت‌های مختلف دارو در محدوده غلظت  $1-2048 \mu\text{g/ml}$  به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  گرمخانه نگهداری شد. سپس اولین لوله‌ای که عدم رشد در آن قابل مشاهده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد (۱۳).

د) واکنش PCR و تعیین توالی ژن‌های *gyrB* و *nfxB* و *parC*: در ابتدا جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین در محیط کشت مولر هینتون برات به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  انکوبه شدند. پس از رسیدن به کدورت سلولی مناسب، از کیت PCR PreMix AccuPower® (شرکت BIONEER، کره جنوبی) جهت استخراج DNA استفاده شد. برای تأیید استخراج، نمونه‌ها در ژل آگاروز  $1/5$  درصد الکتروفورز گردید. پس از حصول اطمینان از تشکیل تک باند DNA، اجزای واکنش PCR در حجم نهایی  $25 \mu\text{l}$  با افزودن DNA ژنومی، جفت پرایمر ( $1 \mu\text{l}$ ) و آب استریل به محلول PreMix (۵ میکرولیتر در هر میکروتیوب شامل آنزیم *Pfu* و بافر واکنش) آماده شد. پس از طراحی پرایمرها و تأیید منحصربفرد بودن آن‌ها (جدول ۱)، سنتز پرایمرها توسط شرکت ماکروژن (کره جنوبی) صورت گرفت. واکنش PCR طبق برنامه ذیل با استفاده از ترموسایکلر Analytik Jena (آلمان) انجام شد: یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در  $92^\circ\text{C}$  به مدت ۳ دقیقه،  $30$  سیکل در دمای  $92^\circ\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه،  $54^\circ\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه،  $72^\circ\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای  $72^\circ\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه. پس از اطمینان از تولید محصولات PCR، نمونه‌ها با حفظ زنجیره سرمایی) به شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی ارسال شدند. پس از خالص‌سازی محصولات PCR از روی ژل آگاروز، نمونه‌ها توالی‌یابی شدند. نتایج حاصل به کمک نسخه  $3/5$  نرم

جدول ۲: قطر هاله عدم رشد استاندارد برای سویه‌های سودوموناس آئروجینوسا بر اساس معیار CLSI.

نام آنتی‌بیوتیک	قطر هاله (mm)			تعداد جدایه‌ها (درصد)		
	حساس	نیمه‌حساس	مقاوم	حساس	نیمه‌حساس	مقاوم
سیپروفلوکساسین	≥۲۱	۱۶-۲۰	≤۱۵	۵۹/۴۲ (۴۱)	۷/۲۴ (۵)	۳۳/۳۳ (۳۳)
جتتامایسین	≥۱۵	۱۳-۱۴	≤۱۲	۵۰/۷۲ (۳۵)	۱۰/۱۴ (۷)	۳۹/۱۳ (۲۷)
آمیکاسین	≥۱۷	۱۵-۱۶	≤۱۴	۵۵/۰۷ (۳۸)	۷/۲۴ (۵)	۳۷/۶۸ (۲۶)

می‌شود و محققان به دنبال یافتن راهکارهای درمانی مناسب جایگزین این داروها هستند. برای یافتن داروهای جایگزین مناسب لازم است دلایل مقاومت به این داروها شناسایی و سپس داروهای جدید مؤثر طراحی و ساخته شود. در این مطالعه در جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا مقاوم به سیپروفلوکساسین سه ژن مهم مؤثر در ایجاد مقاومت (*gyrB*، *parC* و *nalC*) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که در بعضی از جدایه‌ها جهش در این ژن‌ها رخ داده است. در مطالعه ایمانی فولادی (Imani Fooladi) و همکاران در سال ۲۰۱۱ در زنجان بر روی ۱۱۰ جدایه سودوموناس آئروجینوسا از نمونه‌های مختلف بالینی، میزان مقاومت به سه آنتی‌بیوتیک آمیکاسین، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین به ترتیب ۳/۱۷٪، ۲۵/۵٪ و ۲۰/۹٪ گزارش گردید (۱۴). همچنین صادقی (Sadeghi) و همکاران در سال ۲۰۱۲ با ارزیابی ۱۰۸ جدایه سودوموناس آئروجینوسا در اراک در ۱۱/۱٪ جدایه‌ها به آمیکاسین، ۱۵/۷٪ جدایه‌ها به جنتامایسین و ۱۷/۶٪ جدایه‌ها به سیپروفلوکساسین مقاومت به آنتی‌بیوتیک گزارش نمودند (۱۵).

در مطالعه نیکوکار (Nikokar) و همکاران در سال ۲۰۱۳ در گیلان بر روی نمونه‌های سوختگی میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ۶۳/۳٪، آمیکاسین ۴۸/۸٪ و جنتامایسین ۳۷/۲٪ گزارش نمودند (۱۶).

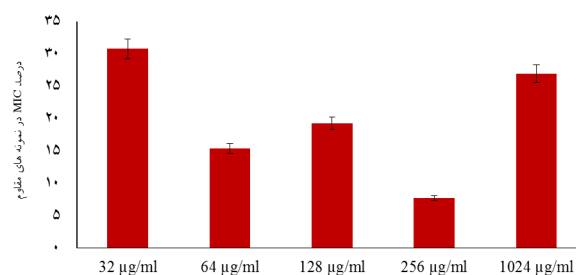
در مطالعه گلی (Goli) و همکاران در سال ۲۰۱۶ در تبریز مشخص شد که ۵۵ درصد جدایه‌ها به جنتامایسین و ۶۵ درصد جدایه‌ها به سیپروفلوکساسین مقاوم هستند. نمونه‌های بالینی پژوهش یاد شده مربوط به قسمت‌های مختلفی مانند:

این دارو بودند. در حالی که به روش انتشار از دیسک حدود ۲۳ جدایه (۳۳/۳۳٪) مقاوم تشخیص داده شدند که از دقت بالاتر روش MIC حکایت دارد (نمودار ۲). برای بررسی علل ژنتیکی مؤثر در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین، ژن‌های *parC* و *gyrB* در نمونه‌های جدا شده به روش PCR تکثیر گردید و به روش تعیین توالی خوانش شد. بر اساس نتایج تعیین توالی در سه جدایه مقاوم، جهش S87L در ژن *parC* شناسایی شد (شکل ۱-الف).

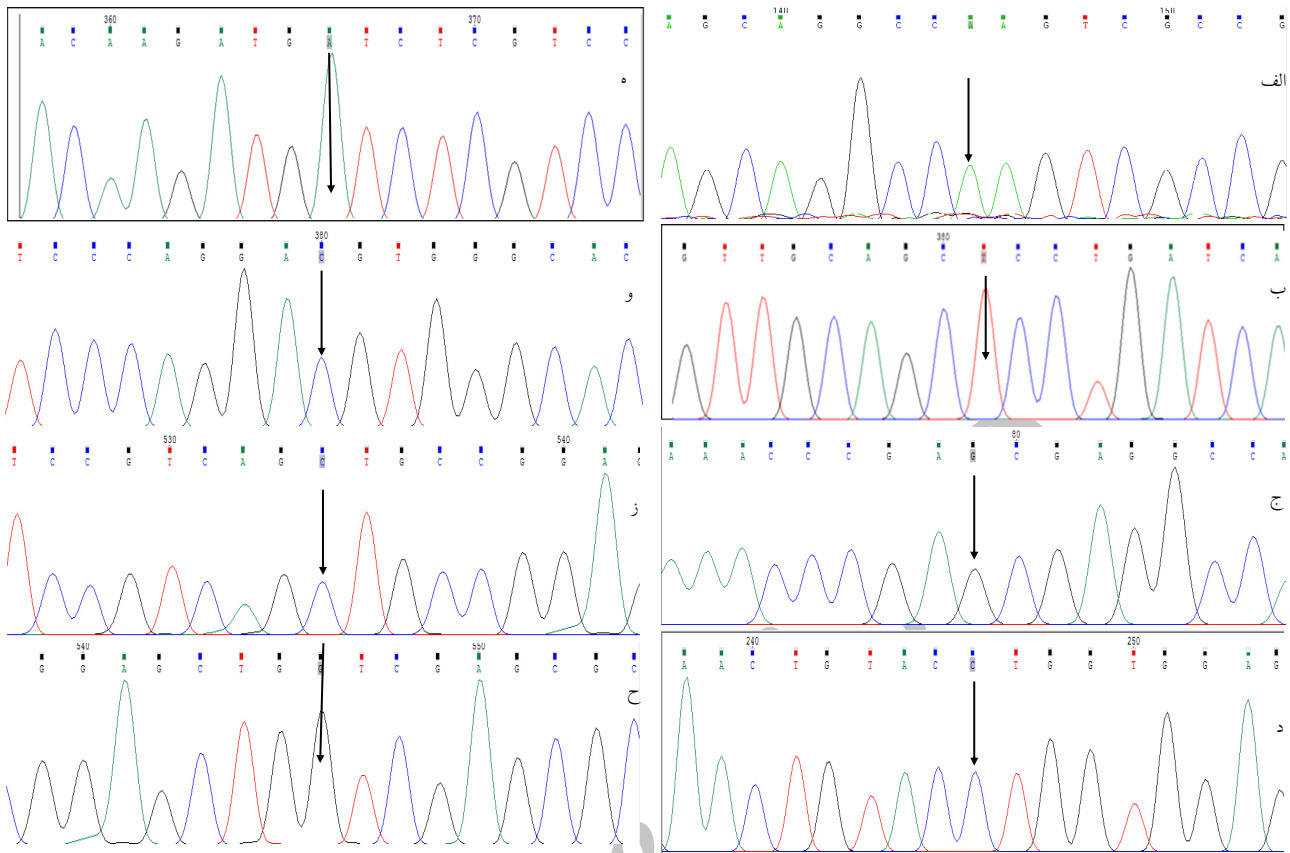
در یک جدایه جهش R82L در ژن *gyrB* شناسایی گردید (شکل ۱-ب). همچنین جهش‌های N368S، I424L، L464I، E468D، M520L و I524V در یک جدایه، E468D در سه جدایه و جهش S466F در یک جدایه در ژن *gyrB* شناسایی شد (شکل ۱-ج تا ح).

## بحث

افزایش مقاومت عفونت‌های بیمارستانی نسبت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از معضلات مهم در درمان محسوب



نمودار ۲: توزیع میزان MIC در جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا مقاوم به سیپروفلوکساسین.



شکل ۱: الکتروفورگرام مربوط به: الف) تغییر باز C در باز ۲۶۰ م به T: با تغییر کدونی TCG (Ser)>TTG (Leu) و تغییر آمینو اسیدی S87L در ژن *parC* (توالی ریورس نشان داده شده است). ب) تغییر باز G در باز شماره ۲۴۷ به T: با تغییر کدونی CGC (Arg)>CTC (Leu) و تغییر آمینو اسیدی R82L در ژن *nfxB* (ج) تغییر باز A در باز شماره ۱۱۰۳ به G: با تغییر کدونی AAC(Asn)>AGC(Ser) و تغییر آمینو اسیدی N368S در ژن *gyrB* (د) تغییر باز A در باز شماره ۱۲۷۰ به C: با تغییر کدونی ATG(Ile)>CTG(Leu) و تغییر آمینو اسیدی I424L در ژن *gyrB* (ه) تغییر باز A در باز شماره ۱۳۹۰ به C: با تغییر کدونی CTC(Leu)>ATC(Ile) و تغییر آمینو اسیدی L464I در ژن *gyrB* (و) تغییر باز G در باز شماره ۱۴۰۴ به C: با تغییر کدونی GAG(Glu)>GAC(Asp) و تغییر آمینو اسیدی E468D در ژن *gyrB* (ز) تغییر باز A در باز شماره ۱۵۵۸ به C: با تغییر کدونی ATG(Met)>CTG(Leu) و تغییر آمینو اسیدی M520L در ژن *gyrB* (ح) تغییر باز A در باز شماره ۱۵۷۰ به G: با تغییر کدونی ATC(Ile)>GTC(Val) و تغییر آمینو اسیدی I524V در ژن *gyrB*

مطالعه حاضر بیشتر می باشد که می تواند قابل انتظار باشد. شایان یادآوری است که در سال های اخیر در بیمارستان سوانح سوختگی ولایت رشت (محل نمونه گیری نیکوکار و همکاران) کاهش مرگ و میر ناشی از عفونت ها به دلیل درمان های پیشرفته سوختگی مشاهده شده است. بنابراین انتظار می رود که میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها نیز در نمونه های حاصل از سوختگی ها در رشت به دلیل درمان های مکمل کاهش یافته باشد. از سوی دیگر در مطالعه گلی و همکاران میزان مقاومت بالاتری نسبت به استان گیلان گزارش شده که ممکن است به دلیل مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها، جهش

ادرار، زخم و خون به دست آمده بودند (۱۷). در مطالعه حاضر نیز میزان مقاومت به سه آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین، آمیکاسین و جنتامایسین حدود ۴۰ درصد گزارش شد. در حالی که در مطالعات فولادی و صادقی میزان مقاومت نسبت به این سه آنتی بیوتیک کمتر از گزارش حاضر بودند. بنابراین می توان انتظار داشت که در آن مناطق در سال های اخیر افزایش میزان مقاومت رخ داده باشد. در مطالعه نیکوکار و همکاران نیز تنها نمونه های سوختگی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه در افراد دچار سوختگی شرایط رشد باکتری ها مساعدتر است، بنابراین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در این افراد نسبت به

۲۰۱۴ در تبریز جهش S87L و در هشت جدایه جهش A88L در ژن *parC* مشاهده شد (۲۳).

در مطالعه خالدی (Khaledi) و همکاران در آلمان، در ۴۴ جدایه جهش S87L در ژن *parC* گزارش شد (۲۴). در مطالعه ناشی متنو (Nascimento) و همکاران جهش‌های S87L و H262Q در ژن *parC* در جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین شناسایی شد (۲۵). در مطالعه سالما (Salma) و همکاران در لبنان در سال ۲۰۱۳ از بین ۲۲ جدایه سودوموناس آئروجینوسا مقاوم به فلوروکینولون‌ها تنها یک جدایه دارای جهش S80L در ژن *parC* بود (۲۶).

در مطالعه گرگانی (Gorgani) و همکاران در سال ۲۰۰۹ در ۱۲ جدایه سودوموناس آئروجینوسا مقاوم به سیپروفلوکساسین هیچ یک از جدایه‌ها جهش در ژن *parC* را نشان ندادند (۲۷). با توجه به اینکه جهش S87L در مطالعات مختلف در ژن *parC* گزارش شده است، به نظر می‌رسد این جهش یکی از مهم‌ترین جهش‌های تغییر ساختار و در نتیجه تغییر تمایل ParC در توپوایزومراز IV به سیپروفلوکساسین باشد. به طوری که این جهش می‌تواند مانع از اثر این دارو بر مهار همانندسازی باکتری به طور کامل شود.

شایان یادآوری است که در بیشتر مطالعات از بین چهار زیرواحد GyrA، GyrB، ParE و ParC، جهش در *gyrA* مهم‌ترین دلیل ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین گزارش شده است. اما جهش در هر یک از ژن‌های یاد شده نیز می‌تواند در افزایش مقاومت نقش داشته باشد. به طوری که در این مطالعه مشابه با بسیاری از مطالعات دیگر جهش در *parC* شناسایی شد. اما دلیل اینکه در دیگر جدایه‌ها جهشی در این ژن شناسایی نشد، می‌تواند اهمیت کمتر این ژن در ایجاد مقاومت به دارو باشد.

در مطالعه جلال (Jalal) و همکاران از بین ۲۰ جدایه سودوموناس آئروجینوسا جدا شده از مبتلایان به سیستمیک فایبروسیس در ۱۶ جدایه جهش R82L در ژن *nfxB* شناسایی شد (۲۸). در مطالعه ژینوت (Jeannot) و همکاران جهش‌های C113T و C199T و چندین حذف در ژن *nfxB* در جدایه‌های

در ژن‌های هدف این داروها و افزایش بیان ژن‌های افلاکس پمپ باشد (۳).

در مطالعه کوگلبگ (Kugelberg) و همکاران در جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا مقاوم به فلوروکینولون‌ها از بیماران سوختگی، جهش‌های Ser467Phe و Glu469Asp در ژن *gyrB* شناسایی شد (۱۸). در مطالعه وانگ (Wang) و همکاران از بین ۲۳۲ جدایه سودوموناس آئروجینوسا تنها یک نمونه دارای جهش Ser466Phe در ژن *gyrB* شناسایی شد (۱۹).

در مطالعه نیگا (Niga) و همکاران در سال ۲۰۰۵ جهش E470D در ژن *gyrB* در جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا گزارش شد (۲۰). در مطالعه میهارا (Miyahara) و همکاران جهش S466F در ژن *gyrB* در جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا شناسایی شد (۲۱).

در مطالعه سیکی گوچی (Sekiguchi) و همکاران جهش E468D در جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا مقاوم به دارو شناسایی شد (۲۲). در مطالعه حاضر نیز جهش E468D مشابه با مطالعه سیکی گوچی و همکاران و جهش S466F مشابه با مطالعه میهارا و همکاران مشاهده گردید. به جز جهش‌های E468D و S466F، سایر جهش‌ها (L464I، I424L، N368S) به نظر می‌رسد برای اولین بار در این ژن در سودوموناس آئروجینوسا در مطالعه حاضر گزارش می‌شود. با توجه به اینکه جهش‌هایی که در ژن‌های *gyrA* با *gyrB* می‌توانند در ساختار پروتئین‌های حاصل تغییراتی را القا کنند، این امر می‌تواند در تمایل سیپروفلوکساسین به آنزیم توپوایزومراز II اثر منفی داشته باشد و در نتیجه موجب کاهش تأثیر این دارو بر همانندسازی و در نتیجه افزایش رشد سلول در حضور این دارو شود. در مطالعه قبلی این گروه جهش‌هایی در ژن *gyrA* (دیگر زیرواحد توپوایزومراز II) شناسایی شده است. جهش در یک یا هر دو زیرواحد این آنزیم می‌تواند موجب کاهش تمایل به دارو و در نتیجه افزایش دوز مورد استفاده برای درمان شود (۷).

در مطالعه نوری (Nouri) و همکاران در ۳۱ جدایه از ۶۴ جدایه سودوموناس آئروجینوسا تهیه شده بین سال‌های ۲۰۱۳ تا

سیپروفلوکساسین به بیش از  $8\mu\text{g/ml}$  گردید (۳۴). در حالی که به نظر می‌رسد همراهی جهش در چند ژن در جدایه‌های مختلف به همراه افزایش بیان ژن‌های درگیر در پمپ افلاکس (نتایج نشان داده نشده است) در این مطالعه موجب ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین با  $\text{MIC} \geq 32\mu\text{g/ml}$  شده باشد.

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه جهش در سه ژن *gyrB*، *parC* و *nfxB* در بعضی از جدایه‌های مقاوم به چند دارو مشاهده شد. به نظر می‌رسد جهش در این ژن‌ها موجب تغییر در ساختار و عملکرد آنها گردد و این امر می‌تواند در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین نقش داشته باشد. با توجه به اینکه بعضی از موارد مقاوم به سیپروفلوکساسین در این مطالعه دارای یک یا چندین جهش در این ژن و همچنین جهش در سایر ژن‌های موثر (۳ و ۷) در ایجاد مقاومت به این دارو بودند، ضرورت توجه مراکز بهداشتی درمانی به استفاده از داروهای جایگزین مناسب وجود دارد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت کمال تشکر و قدردانی را دارند.

سودوموناس آئروجینوسا گزارش شد (۲۹).

در مطالعه پورسل (Purssell) و همکاران جهش‌های S48R، K49Q و G192D در ژن رپرسور *nfxB* بر افزایش بیان MexCD-OprJ در جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا مقاوم به دارو مورد بررسی قرار گرفت (۳۰). در مطالعه‌ای که توسط واعظ (Vaez) و همکاران در سال ۲۰۱۳ در اصفهان انجام گرفت، ۱۲ جهش نقطه‌ای در توالی *nfxB* شناسایی شد که اکثراً تغییر آدنین به سیتوزین در موقعیت‌های ۳۷۱ و ۳۷۲ بود و یک جهش E124A شناسایی شد (۳۱).

در مطالعه حاضر، جهش‌های R82L در یک جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین شناسایی شد. شایان یادآوری است که جهش R82L در مطالعه جلال و همکاران گزارش شده بود. به نظر می‌رسد این جهش بتواند با تغییر در جایگاه اتصال NfxB به ناحیه تنظیمی اپرون MexCD-OprJ موجب تنظیم منفی و در نتیجه افزایش بیان این ژن‌ها و افزایش قرار گرفتن این پمپ‌ها در سطح سلول شوند (۳۲ و ۳۳).

نتیجه افزایش پمپ‌های افلاکس در سطح سلول، خروج بیشتر داروهای ضدباکتریایی مانند سیپروفلوکساسین و در نتیجه افزایش غلظت مورد نیاز درمان می‌باشد. در مطالعه بروچمن (Bruchmann) و همکاران مشخص شد که همراهی جهش در چند ژن *gyrA*، *gyrB* و *parC* موجب افزایش میزان MIC

## References

1. Odumosu BT, Adeniyi BA, Chandra R. First detection of oxa-10 extended-spectrum beta-lactamases and the occurrence of *mexr* and *nfxb* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Nigeria. *Chemother*. 2016; 61(2): 87-92.
2. Ranji N, Rahbar Takrami S. Role of *mexZ* gene in ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Guilan province. *J Urmia Univ Med Sci*. 2017; 27(10): 902-913. [In Persian]
3. Hakimi F, Ranji N, Faezi Ghasemi M. Mutations in *nalC* gene in ciprofloxacin resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals and laboratories of Guilan province in 2014-2015 years. *J Arak Uni Med Sci*. 2016; 19(7): 12-21. [In Persian]
4. Motahhary Tashi H, Ranji N. Study on *oprD* mutation and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Gilan province. *J Microbial World*. 2017;10(1): 26-36.

[In Persian]

5. Shakibaie MR, Jalilzadeh KA, Yamakanamardi SM. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes among gram negative bacteria in sewage and lake water and influence of some physico-chemical parameters of water on conjugation process. J Environ Biol. 2009; 30(1): 45-49.
6. Ahmadpour Bijargah K, Faezi Ghasemi M, Ranji N. Mutations in parC subunit of topoisomerase IV in ciprofloxacin resistant isolates of *Klebsiella pneumonia* in Guilan province. J Urmia Univ Med Sci. 2017; 28(3): 223-230. [In Persian]
7. Rahnamay Roodposhti F, Ranji N, Asadpour L. Mutations of *gyrA* gene in fluoroquinolone resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Guilan province. J Mazandaran Univ Med Sci. 2016; 26(139): 84-92. [In Persian]
8. Vaez H, Faghri J, Isfahani BN, Moghim S, Yadegari S, Fazeli H. Efflux pump regulatory genes mutations in multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound infections in Isfahan hospitals. Adv Biomed Res. 2014; 3: 1-5.
9. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(2): 403-434.
10. Rajkumari N, John NV, Mathur P, Misra MC. Antimicrobial resistance in *Pseudomonas* sp. causing infections in Trauma patients: A 6 year experience from a south Asian country. J Glob Infect Dis. 2014; 6(4): 182-185.
11. Douraghi M, Ghasemi F, Dallal MM, Rahbar M, Rahimiforoushani A. Molecular identification of *Pseudomonas aeruginosa* recovered from cystic fibrosis patients. J Prev Med Hyg. 2014; 55 (2): 50-53.
12. Kittinger C, Lipp M, Baumert R, Folli B, Koraimann G, Toplitsch D. Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from the river Danube. Front Microbiol. 2016; 7: 1-8.
13. Ahmed Z, Saeed Khan S, Khan M. In vitro trials of some antimicrobial combinations against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Saudi J Biol Sci. 2013; 20(1): 79-83.
14. Imani Fooladi A, Rostami Z, Shapouri R. Antimicrobial resistance and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimen by phenotypic and genotypic methods, Zanjan, Iran. Iran J Med Microbiol. 2011; 10:189-198. [In Persian]
15. Sadeghi A, Rahimi B, Shojapour M. Molecular detection of metallo- $\beta$ -lactamase genes blaVIM-1, blaVIM-2, blaIMP-1, blaIMP-2 and blaSPM-1 in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients in Markazi province by duplex-PCR. Afr J Microbiol. 2012; 6(12): 2965-2969.
16. Nikokar I, Tishayar A, Flakiyan Z, Alijani K, Rehana-Banisaeed S, Hossinpour M. Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from burn patients in Guilan, Iran. Iran J Microbiol. 2013; 5(1): 36-41.
17. Goli HR, Nahaei MR, Ahangarzadeh Rezaee M, Hasani A, Samadi Kafil H, Aghazadeh M. Emergence of colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Tabriz hospitals, Iran. Iran J



Microbiol. 2016; 8(1): 62-69.

18. Kugelberg E, Löfmark S, Wretling B, Andersson D. Reduction of the fitness burden of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 2005; 55(1): 22-30.
19. Wang YT, Lee MF, Peng CF. Mutations in the quinolone resistance-determining regions associated with ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Southern Taiwan. Biomarkers Genomic Med. 2014; 6(2): 79-83.
20. Niga T, Ito H, Oyamada Y, Yamagishi J, Kadono M, Nishino T. Cooperation between alteration of DNA gyrase genes and over-expression of MexB and MexX confers high-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a patient who received a liver transplant followed by treatment with fluoroquinolones. Microbiol Immunol. 2005; 49(5): 443-446.
21. Miyahara E, Nishie M, Takumi S, Miyanochara H, Nishi J, Yoshiie K. Environmental mutagens may be implicated in the emergence of drug-resistant microorganisms. FEMS Microbiol Lett. 2011; 317(2): 109-116.
22. Sekiguchi J, Teruya K, Horii K, Kuroda E, Konosaki H, Mizuguchi Y. Molecular epidemiology of outbreaks and containment of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Tokyo hospital. J Infect Chemother. 2007; 13(6): 418-422.
23. Nouri R, Ahangarzadeh Rezaee M, Hasani A, Aghazadeh M, Asgharzadeh M. The role of gyrA and parC mutations in fluoroquinolones-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Iran. Braz J Microbiol. 2016; 47(4): 925-930.
24. Khaledi A, Schniederjans M, Pohl S, Rainer R, Bodenhofer U, Xia B. Transcriptome profiling of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2016; 60(8): 4722-4733.
25. Nascimento APB, Ortiz MF, Martins WMBS, Morais GL, Fehlberg LCC, Almeida LGP. Intracloonal genome stability of the metallo- $\beta$ -lactamase SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277, an endemic clone disseminated in Brazilian hospitals. Front Microbiol. 2016; 7: 1-16.
26. Salma R, Dabboussi F, Kassaa I, Khudary R, Hamze M. gyrA and parC mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Nini Hospital in north Lebanon. J Infect Chemother. 2013; 19(1): 77-81.
27. Gorgani N, Ahlbrand S, Patterson A, Pourmand N. Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents. 2009; 34(5): 414-418.
28. Jalal S, Ciofu O, Hoiby N, Gotoh N, Wretling B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(3): 710-712.
29. Jeannot K, Elsen S, K'hler T, Attree I, Van Delden C, PlÈsiat P. Resistance and virulence of

- Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 2455-2462.
30. Purssell A, Poole K. Functional characterization of the NfxB repressor of the mexCD-oprJ multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* 2013; 159(Pt 10): 2058-2073.
31. Vaez H, Faghri J, Isfahani B. Efflux pump regulatory genes mutations in multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound infections in Isfahan hospitals. *Adv Bjomed Res.* 2014; 3: 1-5.
32. Tohidpour A, Najari Peerayeh S, Najafi S. Detection of DNA gyrase mutation and multidrug efflux pumps hyperactivity in ciprofloxacin resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol Infec Dis.* 2013; 1: 1-7.
33. Jeannot K, Elsen S, Kohler T, Attree I, van Delden C, Plesiat P. Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(7): 2455-2462.
34. Bruchmann S, Dotsch A, Nouri B, Chaberny IF, Haussler S. Quantitative contributions of target alteration and decreased drug accumulation to *Pseudomonas aeruginosa* fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(3): 1361-1368.

Archive of SID



## Assessment of point mutations associated with ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Guilan province

Najmeh Ranji<sup>1</sup>, Fatemeh Asadi Rahmani<sup>2</sup>, Seyedeh Shideh PourKhalili<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Assistant Professor, Young Researchers and Elite Club, Rasht branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

<sup>2</sup>M.Sc., Faculty of Sciences, Lahijan branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

<sup>3</sup>M.Sc., Faculty of Sciences, Rasht branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

### Abstract

**Background & Objectives:** *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen especially in immunocompromised patients. Drug resistance in *P. aeruginosa* is caused by different mechanisms such as mutations in topoisomerases subunits and negative regulators of efflux pump systems. This study was aimed to investigate mutations in *gyrB*, *parC*, and *nfxB* genes in ciprofloxacin-resistant *P. aeruginosa* isolates in Guilan province.

**Materials & Methods:** In this cross-sectional study, 200 isolates were obtained from different clinical samples of Rasht and Lahijan hospitals and laboratories and subsequently identified by biochemical tests. Antibiotic susceptibility pattern was determined by Kirby Bauer disk diffusion susceptibility test and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test. PCR-sequencing was used to assess mutations in *gyrB*, *parC*, and *nfxB* genes in ciprofloxacin-resistant *P. aeruginosa* isolates.

**Results:** Out of 69 *P. aeruginosa* isolates, 26 isolates were ciprofloxacin-resistant. MIC of ciprofloxacin in resistant isolates was determined between 32-1024 µg/ml. PCR-sequencing analysis revealed that some resistant isolates have missense mutations in *gyrB*, *parC*, and *nfxB* genes. It seems that N368S, I424L, L464I, E468D, M520L, and I524V mutations in *gyrB* were reported for the first time in Iran.

**Conclusion:** It seems that reported mutations in *gyrB* and *parC* genes affect topoisomerases affinity to ciprofloxacin in resistant isolates. Furthermore, mutations in the *nfxB* gene may lead to overexpression of MexCD-OprJ efflux pump and ciprofloxacin resistance.

**Keywords:** Ciprofloxacin, *parC* gene, *gyrB* gene, *nfxB* gene, *Pseudomonas aeruginosa*.

---

Correspondence to: Najmeh Ranji

Tel: +98 1333424080

E-mail: [n\\_ranji@iaurasht.ac.ir](mailto:n_ranji@iaurasht.ac.ir)

Journal of Microbial World 2018, 11(1): 29-39.