Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:54 +0330 on Monday November 19th 2018

ORIGINAL ARTICLE

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

Behnam Hashemi[1],
Alireza Rafiei[2],
Reza Valadan[3],
Maryam Abdollahi[1],
Mohammad Ahanjan[4],
Eisa Nazar[5],
Zaher Morsaljahan[6],
Rezvan Khajavi[7],
Maryam Salehiyan[8]

[1] MSc Student in Microbiology, Student Reseach Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Professor, Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Associate Professor, Department of Microbiology, Pediatric Infectious Diseases Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] PhD Student in Biostatistics, Student Research Committee, Faculty of Health, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[6] MSc Student in Immunology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[7] MSc in Molecular Biology, Molecular Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[8] MSc in Microbiology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

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

Abstract

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

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

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

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

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

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

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

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:54 +0330 on Monday November 19th 2018

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۴ شهریور سال ۱۳۹۷ (۳۰-۲۱)

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

بهنام هاشمی[۱]
علیرضا رفیعی[۲]
رضا ولدان[۳]
مریم عبدالهی[۱]
محمد آهنجان[۴]
عیسی نظر[۵]
ظاهر مرسل جهان[۶]
رضوان خواجوی[۷]
مریم صالحیان[۸]

چکیده

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

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

یافته‌ها: از ۱۰۳ ایزوله جدا شده، ۶۵ نمونه (۶۳/۲ درصد) اشرشیاکلی و ۳۸ نمونه (۳۶/۸ درصد) کلبسیلا پنومونیه بودند. ایزوله‌های جدا شده با روش SSCP PCR بررسی شدند. در همه‌ی نمونه‌های اشرشیاکلی مقاوم به سیپروفلوکساسین، حداقل یک موتاسیون مشاهده گردید. هم‌چنین در همه نمونه‌های کلبسیلای مقاوم به سیپروفلوکساسین، حداقل یک موتاسیون و در ۱۴ نمونه در هر ۲ نقطه موتاسیون مشاهده گردید، در حالی که در ۵ نمونه حساس به سیپروفلوکساسین هیچ موتاسیونی دیده نشد.

استنتاج: نتایج نشان داد که جهش در gyrA ارتباط نزدیکی با مقاومت کینولون‌ها دارد. افزایش شیوع مقاومت کینولون ها در میان باکتری E.coli و K.penumune جدا شده، نشان دهنده نیاز به برنامه‌های کنترل عفونت می باشد.

واژه های کلیدی: اشرشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، کینولون ها، مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه

اشرشیا کلی (E.coli) و کلبسیلا پنومونیه (K.penumune) از اعضای خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد که جزء پاتوژن‌های فرصت طلب و از عوامل شایع عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند. اشرشیاکلی اولین

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

مولف مسئول: محمد آهنجان: ساری- کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی E-mail: ahanjan2007@gmail.com

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبشناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استاد، گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استادیار، گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشیار، گروه میکروبشناسی، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. دانشجوی دکترای آمار زیستی، کمیته تحقیقات دانشجویی، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۶. دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، کلیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۷.کارشناس ارشد بیولوژی مولکولی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۸ کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

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

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:54 +0330 on Monday November 19th 2018

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

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

موتاسیون در ژن‌های gyrB و parE از اهمیت کم تری برخوردارند(۱۶). موتاسیون در ژن gyrA باعث تغییر آمینواسید Ser-83 و Asp-87 می‌گردد. با این حال افزایش روزافزون استفاده از فلوروکینولون‌ها موجب افزایش مقاومت نسبت به کینولون‌ها در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی شده است(۱۷). هم‌چنین با توجه به افزایش روز افزون استفاده از فلوروکینولون‌ها، افزایش مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه‌ها مشاهده شده است(۱۸). هدف اصلی ما در این مطالعه، تشخیص مقاومت کروموزومی(ژن gyrA) علیه کینولون‌ها (سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید) در سویه‌های بالینی اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه با استفاده از متد sscp pcr می‌باشد.

مواد و روش ها

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

استخراج DNA

از باکتری‌های رشد یافته، DNA ژنومیک به روش

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:54 +0330 on Monday November 19th 2018

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

تست حساسیت آنتی بیوتیکی

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

Polymerase chain reaction (PCR)

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

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده در واکنش PCR

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

پرایمرها از طریق پایگاه اطلاعاتی NCBI تایید و Blast شدند. پس از آن توسط شرکت تکاپوزیست برای ساخت به شرکت Bioner کره ارسال گردید. این پرایمرها با غلظت ۱۰۰ pmol ساخته شدند و برای انجام PCR، غلظت pmol ۱۰ از آن ها تهیه شد، به این ترتیب که مقدار ۹۰ میکرولیتر آب با ۱۰ میکرولیتر از پرایمر مخلوط شدند. مخلوط اصلی واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۷/۵ میکرولیتر مستر میکس، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر DNA و ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر، تهیه شد. برنامه دستگاه ترموسایکلر شامل مرحله واسرشته شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه بود که با ۳۰ سیکل ادامه یافت. مرحله واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه ادامه یافت. برای بررسی محصولات PCR از الکتروفورز ژل آگاروز ۲ درصد استفاده شد.

SSCP PCR (single strand conformation polymorfism)

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

تعیین توالی

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

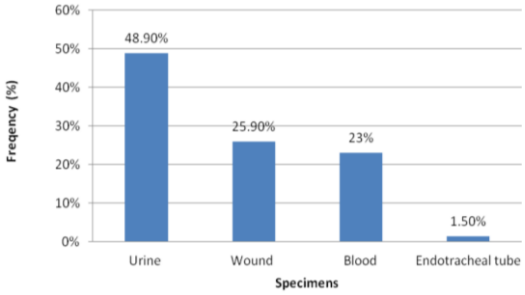
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:54 +0330 on Monday November 19th 2018

تکاپوزیست انجام شد و سپس توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار CLC main work bench 5 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها

از ۱۰۳ نمونه ایزوله شده در این مطالعه، ۶۵ ایزوله اشرشیا کلی و ۳۸ مورد کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های مختلف بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) ساری ایزوله گردید. بیش‌ترین ایزوله های جدا شده از نمونه‌های ادرار می‌باشند که شامل ۵۰ نمونه از اشرشیاکلی و ۱۶ مورد کلبسیلا پنومونیه می‌باشد. در حالی که ۲۶ مورد کلبسیلا پنومونیه و ۹ مورد اشرشیا کلی از زخم جداسازی گردیدند. لازم به ذکر است که کم‌ترین نمونه جدا شده از endotracheal secretions، تنها ۲ مورد (کلبسیلا پنومونیه) ایزوله گردید. از بین نمونه‌های اشرشیا کلی، ۴۲ مورد (۶۴/۶ درصد) و از بین نمونه‌های کلبسیلا، ۲۵ مورد (۶۵/۷ درصد) از جنس مذکر و بقیه‌ی نمونه‌ها از خانم‌ها جدا شدند. در جنس مذکر، از بین اشرشیاکلی‌های جدا شده، بیش‌ترین تعداد نمونه مربوط به نمونه ادراری (۲۸ مورد (۶۶/۶۶ درصد) و از بین نمونه‌های کلبسیلا، بیش ترین تعداد نمونه مربوط به نمونه زخم (۱۸ مورد (۴۶/۱۵ درصد) بوده است و از بین اشرشیا کلی های جدا شده از جنس مونث، بیش ترین تعداد نمونه مربوط به نمونه ادراری ۲۲ (۷۵/۸۶ درصد) و از بین نمونه‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از جنس مونث، بیش‌ترین تعداد نمونه مربوط به نمونه خون ۹ (۳۷/۵ درصد) می‌باشد. که نشان‌دهنده این است که در بین عفونت‌های مختلف اشرشیاکلی، این باکتری بیش‌تر موجب عفونت ادراری می‌شود، به خصوص در خانم‌ها ولی در بین عفونت‌های مختلف کلبسیلا، الگوی خاصی دیده نشد و میزان عفونت در نمونه‌های مختلف تقریباً از نظر آماری نزدیک هم است. فراوانی ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی در نمودار شماره ۱ مشاهده می‌شود.



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

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

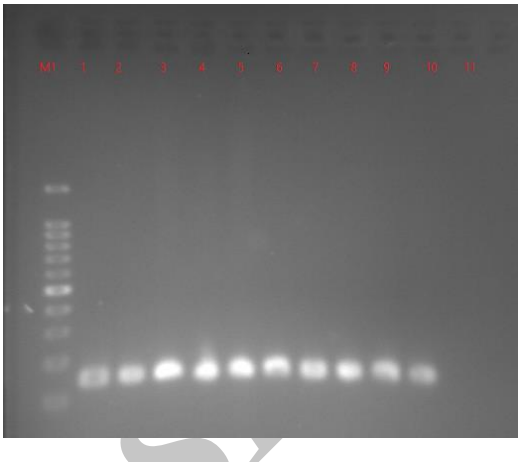
تصویر شماره ۲: نمونه از MIC برای باکتری های اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه به روش E-test

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:54 +0330 on Monday November 19th 2018

تشخیص ژن های مقاوم به کینولون ها با روش PCR

در مرحله بعد، ایزوله‌های مقاوم بـه کینولـون‌هـا بـه وسیله PCR مشخص گردید (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۳: الکتروفوروز محصـول ژن gyrA در بـاکتری هـای اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه

M1: (مارکر 100 bp)، ۲: کنتـرل مثبـت، ۱-۳-۴-۵-۶-۷-۸-۹-۱۰: (ژنgyrA، 152 bp)، ۱۱: کنترل منفی

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

با توجه بـه ایـن کـه تعیـین تـوالی در ایـن روش بـر اساس الگوهای متفاوت مـی باشـد، در مطالعـه مـا از ۹۵ نمونه، در ژن gyr A، ۷ الگوی متفاوت بر روی ژل پلـی آکریل مشاهده و تعیین توالی شد و به سکانس فرسـتاده شدند. نتایج به‌دست آمده از تعیین توالی (سکوینسینگ) در این مطالعه برای تشخیص موتاسیون پس از انجام متد sscp نشـان داد کـه در ژن gyr A، ۸۱ نمونـه (۸۵/۳ درصد) در یکـی از دو نقطـه gyrA (position 83 and 87) موتاسیون داشتند و ۱۴ مورد (۱۴/۷ درصد) در هر ۲ نقطـه gyrA (position 83 and 87) موتاسـیون داشـتند که باعث تبدیل اسید آمینه ایزولوسین به فنیـل آلانـین و آسپارژین به آلانـین گردیـده اسـت (جـدول شـماره ۲) (تصویر شماره ۴). لازم به ذکر است که ۷ نمونـه‌ای کـه جهت سکانس ارسال گردید (تصویر یکی از نمونه های ارسالی بـرای سکانس.تصـویر شـماره ۵)، بعـد از انجـام سکویسینگ در NCBI (Accession ANA95977.1 تا Accession ANA95971.1) ثبت گردید.

جـدول شـماره ۲: مربـوط بـه الگوهـای sscp بـرای ژن gyrA در باکتری های اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه

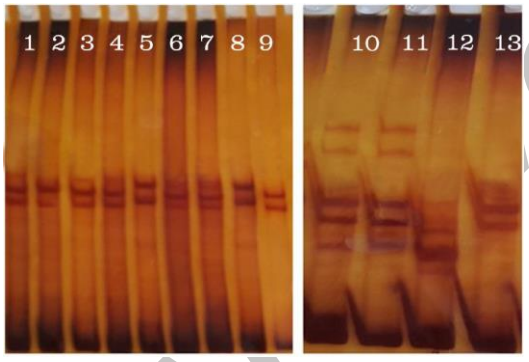
SSCP Patterns	E.coli and K.pneumoniae	Gene		Sequencing(N=7)		Amino acid changes
(A1-A7)		gyrA	parC	Gyr A83	GyrA87	
A1(n=10)	(E=6,K=4)	+	+	+	–	Leu-Iso
A2(n=8)	(E=5,K=3)	+	+	+	–	Iso-Leu
A3(n=14)	(E=10,K=4)	+	+	+	+	Iso-Phe Asp-Al
A4(n=14)	(E=7,K=7)	+	+	+	–	Iso-Phe
A5(n=17)	(E=12,K=5)	+	+	+	–	Iso-Tyr
A6(n=20)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

A1تا A7= الگوهایی که بر روی ژل مشاهده گردید (۷ الگو)

n= ۱۰ نمونه (اشرشیا یا کلبسیلا) از الگوی A1 می‌باشد.

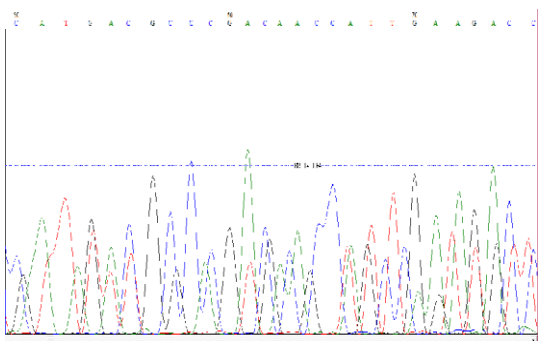
E= باکتری اشرشیا کلی

K= باکتری کلبسیلا



تصویر شماره ۴: الگوهای متفاوت SSCP PCR برای ژن GyrA

الگوی E1، ۵-۸: الگوی E2، ۶-۷: الگوی E3، ۹: الگوی E4، ۱۰ -۱۱: الگوی E5، ۱۲: الگوی E6، ۱۳: الگوی E7



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

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:54 +0330 on Monday November 19th 2018

بحث

در طول مطالعات قبلی نشان داده شد که باسیل‌های گرم منفی تولیدکننده ESBL و به خصوص اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه به عنوان عوامل پاتوژن خطرناک برای ایجاد عفونت‌ها در جامعه و بیمارستان می‌باشند. امروزه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان ایزوله‌های بالینی به ویژه خانواده انترو باکتریاسه از معضلات روند درمان عفونت‌های بیمارستانی است(۲۱). مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها باعث افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری شده است، به‌طوری که مقاومت این باکتری به سیپروفلوکساسین و بتالاکتام‌ها در سراسر دنیا گزارش شده است(۲۲).

در مطالعه حاضر، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیکی‌های سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید از طریق متد E تست اندازه‌گیری شد. در باکتری اشرشیاکلی، ۹۵/۳ درصد مقاوم به سیپروفلوکساسین و تنها ۱/۴ درصد به نالیدیکسیک اسید حساس بودند و در مورد باکتری کلبسیلا پنومونیه، ۷۱ درصد مقاوم به سیپروفلوکساسین و همگی مقاوم به نالیدیکسیک اسید می باشند که نشان از میزان مقاومت بالایی می‌باشد. در مطالعه حاضر، با انجام روش SSCP PCR، تمامی نمونه‌ها در ۷ الگوی متفاوت دسته‌بندی شدند و الگوهای متفاوت به سکانس فرستاده شدند. پس از انجام سکانس مشخص گردید که تمامی ۱۰۳ نمونه، در ژن gyrA در باکتری اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه در نقطه gyrA 83 موتاسیون داشتند. از ۷ الگوی فرستاده شده به سکانس از ژن gyrA، فقط در یک الگو (۱۴ نمونه) در هر دو نقطه gyrA 83 و gyrA 87 موتاسیون مشاهده گردید. چون سکانس کردن همه نمونه‌ها هزینه بر و زمان بر است، لذا در مطالعه حاضر برای تشخیص موتاسیون در ژن gyrA با یک متد جدیدتر (SSCP PCR) نسبت به سایر مطالعات انجام گرفت. موتاسیون در کدون gyrA83 و gyrA87 از جهش‌های شایع در باکتری‌های اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید می‌باشد، به‌طوری که در مطالعات مختلف نیز گزارش گردیده است. در مطالعه‌ی Minarini و همکاران در سال ۲۰۱۲، ۹۱ درصد جدایه‌های مقاوم اشرشیاکلی، موتاسیون در کدون‌های ۸۳ یا ۸۷ و یا هر دو را با هم داشتند و در نمونه‌های حساس هیچ موتاسیونی مشاهده نشد که با مطالعه حاضر تقریباً شیوع مشابهی داشتند(۲۳). مطالعه‌ای که توسط نخجوانی و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بر روی سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت‌های ادراری در شهر تهران انجام شد، میزان مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین، به ترتیب ۴۹/۳ درصد و ۴۰/۲ درصد بود(۲۴). با مقایسه نتیجه مطالعه حاضر با مطالعه انجام شده در تهران مشاهده می گردد که میزان مقاومت به نالیدیکسیک اسید در مطالعه حاضر بسیار بالاتر می‌باشد که می‌تواند به دلیل روند رو به افزایش میزان مقاومت به داروی فوق طی مدت زمان پنج سال و ناشی از فشار انتخابی حاصل از مصرف بالای داروی فوق باشد. اما از این نظر که در هر دو مطالعه میزان مقاومت به نالیدیکسیک اسید بالاتر بوده که پیش نیاز مقاومت به سیپروفلوکساسین می‌باشد، شباهت وجود دارد. افزایش مقاومت به سیپروفلوکساسین در انتروباکتریاسه با افزایش شیوع ژن‌های PMQR و این تغییر در مقاومت شامل افزایش در تنوع ژن‌های PMQR و شیوع جهش در ژن‌های gyrA و parC یا هر دو در سویه‌های PMQR مثبت است. در تحقیقات به دست آمده از Kmet و همکاران (۲۰۱۰) در خصوص جهش‌های رخ داده در gyrA parC نشان داده شده که جدایه‌های مقاوم به نالیدیکسیک اسید با سطح بالای MIC برای سیپروفلوکساسین دارای جهش در کدون‌های ۸۳ و ۸۷ در gyrA و ۸۰ در parC بوده‌اند و در همه‌ی جدایه‌ها جهش در gyrA رخ داده است که با مطالعه ما همخوانی داردکه در همه‌ی نمونه تقریباً در یکی از نقاط موتاسیون وجود داشته است(۲۵). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ در انگلستان انجام شد، با بررسی ۴۷ نمونه ی مقاوم به سیپروفلوکساسین شیوع ژن gyrA را ۳۲ درصد گزارش

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:54 +0330 on Monday November 19th 2018

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

در مطالعه دیگر که توسط Sáenz Y و همکاران (۲۰۰۳) بر روی جایگاه جهش در این ۴ ژن انجام داده بودند، در parE و gyrB موتاسیونی مشاهده نگردید و جایگاه جهش در gyrA و parC همانند سایر مطالعات گزارش شده است(۲۸). روش SSCP PCR که بر اساس تکفیک الکتروفورزی، اختلافات تطبیقی در ردیف DNA است، یک روش راحت و نسبتاً سریع برای نمونه‌هایی است که احتمالاً دارای موتاسیون هستند. هم‌چنین این روش با قطعه‌های بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ جفت بازی که به وسیله PCR ایجاد می‌شود را به خوبی عمل می‌کند. از طرفی انجام مطالعات مولکولی بیش‌تر بر روی مقاومت نسبت به فلوروکینولون‌ها، استراتژی‌های درمانی جدیدی پدید خواهد آمد، لذا توصیه می‌شود انجام مطالعات بیش‌تر در نژادها، مناطق جغرافیایی مختلف و با تعداد نمونه‌های بیش‌تر و هم‌چنین مطالعه این ژن‌ها (gyrA, parC) و ارتباطشان با ژن‌های ESBL بررسی شود تا بتوان راه کارهای درمانی مناسب را در پیش گرفت.

سپاسگزاری

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

References

1. Goettsch W, van Pelt W, Nagelkerke N, Hendrix MG, Buiting AG, et al. Increasing resistance to fluoroquinolones in Escherichia coli from urinary tract infections in the Netherlands. J Antimicrob Chemother 2000; 46(2): 223-228.
2. Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998; 11(4): 589-603.
3. Gold HS, Moellering Jr. Antimicrobial-drug resistance. N Engl J Med 1996; 335(۹) : 1445-1453.
4. Medeiros AA. Evolution and dissemination of β-lactamases accelerated by generations of β-lactam antibiotics. Clin Infect Dis 1997; 24(Supplement 1): S19-S45.
5. Karami A, Naghavi KH, Sorouri R, Ranjbar R, Khalilipour A. Use of a MAMA-PCR Method to detect gyrA Mutations in Nalidixic Acid-Resistant Clinical Isolates of Escherichia coli. Iran J Pub Health 2008; 37(1): 42-47 (Persian).
6. Oliphant CM, Green GM. Quinolones: a comprehensive review. Am Fam Physician 2002; 65(3): 455-464.
7. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. Clin Infect Dis 2005; 41(Suppl 2): S120-S126.
8. Emmerson AM, Jones AM. The quinolones: decades of development and use. J Antimicrobial Chemother 2003; 51(suppl 1): 13-20.
9. King DE, Malone R, Lilley SH. New classification and update on the quinolone antibiotics. Am Fam Phys 2000; 61(9): 2741-278.
10. Drago L, De Vecchi E, Mombelli B, Nicola L, Valli M, Gismondo M. Activity of levofloxacin and ciprofloxacin against

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:54 +0330 on Monday November 19th 2018

urinary pathogens. J Antimicrob Chemother 2001; 48(1): 37-45.

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

Archive of SID
www.SID.ir

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

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:54 +0330 on Monday November 19th 2018

Archive of SID

www.SID.ir