

موتاسیون کدون های ۸۳ و ۸۷ ژن *gyrA* باکتری اشرشیاکلی مقاوم به نالیدیکسیک اسید به روش ARMS PCR

علی کریمی^{۱*}، خانعلی نقوی^۲، نعمت اله جنیدی جعفری^۳، رحیم سروری^۱، محمدجواد سلطان پور^۴، زهرا سفیری^۵، رضا رنجبر^۶

۱. دکترای بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع» - مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

۲. کارشناس ارشد زیست مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع» - مرکز تحقیقات بهداشت نظامی

۳. متخصص بیماریهای عفونی و گرمسیری، استادیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع» - مرکز تحقیقات بهداشت نظامی

۴. دکترای علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

۵. کارشناس ارشد زیست مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع» - مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

۶. دکترای میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع» - مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

* نشانی برای مکاتبه: تهران، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، پژوهشکده طب نظامی، مرکز تحقیقات بهداشت نظامی، تلفن و
نمبر ۰۸۸۰۳۹۸۸۳، Karami@bmsu.ac.ir

دریافت مقاله: اردیبهشت هشتاد و شش پذیرش برای چاپ: مرداد هشتاد و شش

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به اهمیت آنتی بیوتیک های رده کینولونی این مطالعه با هدف تعیین وضعیت موتاسیون بر روی کدون های ۸۳ و ۸۷ ژن *gyrA* در مقاومت دارویی به نالیدیکسیک اسید در *E. coli* های ایزوله شده از نمونه های ادرار بیماران انجام گرفت. روش کار: در این مطالعه ۷۹ نمونه مثبت *E. coli* اعم از حساس و غیرحساس که از نمونه های ادرار بیماران مراجعه کننده به بیمارستان بقیه اله... جدا شده بود، مورد مطالعه قرار گرفتند. طی چهار مرحله واکنش PCR به بررسی موتاسیون های عامل مقاومت به نالیدیکسیک اسید در ناحیه شایع موتاسیون و بخصوص کدون های ۸۳ و ۸۷ از ژن *gyrA* در نمونه های کلینیکی پرداخته شد. در خاتمه تعیین ردیف ژنی در ناحیه مورد نظر انجام گردید.

یافته ها: نتایج تعیین ردیف DNA موید عدم وجود موتاسیون در نمونه های حساس بود. ولی در نمونه های مقاوم پنج مورد موتاسیون در کدون های ۸۱، ۸۵، ۱۰۷، ۹۷، ۸۷ مشاهده شد. یکی از موتاسیون ها (۸۷) جز موتاسیون های اصلی مقاومت به نالیدیکسیک اسید می باشد.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این تحقیق، وجود حتی یک موتاسیون در کدون های ۸۷ یا ۸۳ موجب بروز مقاومت *E. coli* نسبت به نالیدیکسیک اسید می شود.

واژگان کلیدی: اشریشیاکلی، عفونت ادراری، مقاومت آنتی بیوتیکی، نالیدیکسیک اسید، PCR، MIC

مقدمه

های فوقانی سیستم ادراری (کلیه ها) غیر طبیعی بوده و موجب عفونت در سیستم ادراری می شود (۱).

کینولون ها مانند نالیدیکسیک اسید و فلوروکینولون ها مانند سیپروفلوکساسین، دسته ای از آنتی بیوتیک هائی هستند که در پزشکی و دامپزشکی برای درمان بیماری های عفونی که توسط باکتری های روده ای نظیر *E. coli* ایجاد می شوند، مورد استفاده قرار می گیرند. اما ظهور میکروب های مقاوم به عوامل ضد میکروبی، از میان سوبه های حساس تهدید جدی علیه سلامت دنیا محسوب شده و پزشکان، میکروب شناسان و داروسازان را با مشکل مواجه کرده است. این مشکل منحصر به مکان یا زمان خاصی نبوده و تبدیل به یکی از معضلات بزرگ جهان شده است (۲).

باکتری *E. coli* یکی از اعضا مهم خانواده انتروباکتریاسه ها محسوب می شود. این باکتری شایعترین علت بعضی از عفونت های شایع باکتریایی مانند عفونت های سیستم ادراری، باکتریی و اسهال باکتریایی مسافران می باشد. همچنین یکی از علل اصلی مننژیت دوران نوزادی است. این باکتری به طور طبیعی در روده بزرگ کلونیزه می شود. در حالیکه مکان اصلی کلونیزاسیون طبیعی انتروباکتریاسه ها در دستگاه گوارش می باشد، اما شایعترین محل ایجاد عفونت توسط آنها در سیستم ادراری است. با توجه به اینکه سیستم ادراری به طور طبیعی استریل و فاقد هر گونه باکتری می باشد، ورود باکتری *E. coli* از طریق مجرای ادرار به قسمت

پلی مرز عمل پلی مرزاسیون را از انتهای پرایمر در جهت ۳' - ۵' ، زمانی آغاز می کند که باز انتهای ۳' پرایمر، ناجور (Mismatch) نباشد، یعنی به ترادف مکمل خود بچسبد. اگر عمل پلی مرزاسیون در لوله حاوی پرایمر نرمال انجام شود، نشان دهنده نبود جهش نقطه ای در باز مورد نظر است و اگر عمل پلی مرزاسیون در لوله حاوی پرایمر جهش یافته انجام شود، نشان دهنده حضور جهش نقطه ای در باز مورد نظر می باشد. از این تکنیک به عنوان MAMA-PCR و COP-PCR نیز یاد می - شود. بنابراین ما جهت طراحی پرایمر برای کدون های ۸۳ و ۸۷ ژن *gyrA* که با استاندارد به اکثر مقالات، بیشتر موتاسیون ها در آنها صورت می گیرند. پرایمرهای mismatch را طراحی کردیم. بدین صورت که با قرار دادن کدون tac در پرایمر ریورس شماره ۳ از آن به عنوان پرایمر جهش یافته برای کدون ۸۳ استفاده گردید و برای کدون ۸۷ نیز دو پرایمر ریورس طراحی شد. یکی از پرایمرهای ۸۷ دارای کدون tac بود که به عنوان پرایمر جهش یافته اول به کار رفت (پرایمر شماره ۴) و پرایمر دیگر دارای کدون aac بود که از آن نیز به عنوان پرایمر ریورس دوم استفاده شد (پرایمر شماره ۵). از پرایمر شماره یک به عنوان پرایمر فوروارد استفاده شد. از پرایمر شماره دو نیز به عنوان پرایمر ریورس که خارج از محدوده کدون های ۸۳ و ۸۷ بود، استفاده گردید. بدیهی است از پرایمرهای ۵ و ۴ باید یکی جواب بدهد. شکل ۱ و ۲.

یافته ها

با توجه به مواردی که ذکر شد می توان نتیجه گرفت که پرایمرهای طراحی شده چه از نظر حساسیت و چه از نظر اختصاصی بودن قابلیت شناسایی ژن های مقاوم را با موفقیت داراست و می توان از این پرایمرها در شناسایی موتاسیون های مقاوم دارویی به نالیدیکسیک اسید در نمونه های بالینی استفاده کرد. در نهایت نتایج PCR ها بدین ترتیب خواهد بود: نمونه هایی که جواب ۴ واکنش PCR آنها به ترتیب (+)P1,2 ، (+)P1,3 ، (+)P1,4 و (-)P1,5 و (+)P1,3 ، (+)P1,4 و (+)P1,2 یا (+)P1,3 ، (+)P1,2 و (+)P1,4 ، (-)P1,5 و (-)P1,4 باشند، به عنوان *E. coli* مقاوم به نالیدیکسیک اسید با موتاسیون در کدون های ۸۷ و ۸۳ شناخته می شوند. نمونه هایی که جواب PCR های آنها به ترتیب (+)P1,2 ، (-)P1,3 ، (+)P1,4 و (-)P1,5 یا (+)P1,2 ، (-)P1,3 ، (-)P1,4 و (+)P1,5 و (+)P1,2 ، (-)P1,3 ، (-)P1,4 و (-)P1,5 باشد، نشان دهنده گونه *E. coli* هایی هستند که کدون ۸۳ ژن *gyrA* فاقد موتاسیون بوده و کدون ۸۷ آن موتاسیون داشته است. همچنین نمونه هایی که جواب PCR های آنها به ترتیب: (+)P1,2 ، (+)P1,3 ، (-)P1,4 و (-)P1,5 باشند. *E. coli* هایی هستند که کدون ۸۳ ژن *gyrA* آنها موتاسیون داشته و کدون ۸۷ فاقد موتاسیون می باشد. *E. coli* هایی به عنوان *E. coli* حساس شناخته می شوند که جواب PCR های آنها به صورت (+)P1,2 ، (-)P1,3 ، (-)P1,4 و (-)P1,5 باشد. در ادامه کار دو محصول PCR نمونه های شماره یک (P1-2) جهت ردیف DNA برای بررسی موتاسیون ها به شرکت سیناژن سفارش داده شد. نتایج سکانسینگ همانطور که انتظار می رفت یکی از نمونه ها را به عنوان نمونه حساس بدون موتاسیون معرفی کرد ولی در مورد نمونه مقاوم پنج مورد موتاسیون در کدون های ۸۵، ۸۱، ۸۷، ۹۷، ۱۰۷ مشاهده شد. که یکی از موتاسیون ها (۸۷) جز موتاسیون های اصلی مقاومت به نالیدیکسیک اسید می باشد. که نتایج آن در جدول ۱ آمده است.

موضوع مقاومت های آنتی بیوتیکی برای اولین بار با بروز و گسترش وسیع سویه های مقاوم به پنی سیلین در استافیلوکوکوس ارئوس اهمیت یافت. در سال ۱۹۷۰ و اوایل ۱۹۸۰ باسیل های گرم منفی چند مقاومتی، بزرگترین مشکل کنترل عفونت محسوب می شدند. اخیراً موارد زیادی از مقاومت نسبت به این داروها در *E. coli* مشاهده شده است (۲ و ۳). در این بین مطالعه ساختار ژنتیکی *E. coli* می تواند راهگشای اصلی در جهت درمان عفونت های ناشی از این باکتری ها باشد، بطوریکه PCR روش بسیار مؤثر، سریع و اختصاصی جهت شناسایی بسیاری از عوامل بیماری زا و از جمله مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها می باشد که تا کنون تحقیقات بسیاری در رابطه با استفاده از این تکنیک در شناسایی ژن های عامل مقاومت بر علیه اکثر آنتی بیوتیک ها صورت گرفته که در برخی از تحقیقات تنها ژن *gyrA* و در برخی دیگر علاوه بر این ژن، ژن های *gyrB* و *parC* مورد بررسی قرار گرفته است. مکانیسم غالب در ایجاد مقاومت نسبت به نالیدیکسیک، از تغییر ژن های تولیدکننده زیرواحد آنزیم های DNA gyrase (*gyrB* و *gyrA*) و *Topo IV* (*parE* و *parC*) که اهداف این داروها می باشند، ناشی می شود. تحقیقات نشان داده اند که یک ناحیه کوچک در - N terminal پروتئین *gyrA* از آمینو اسید ۶۷ تا ۱۰۶ در *E. coli* باعث ایجاد مقاومت نسبت به داروها می شود. این ناحیه اصطلاحاً ناحیه تعیین کننده مقاومت به کینولونی (GRDR) نامیده می شود. چنین ناحیه ای در ژن *ParC* نیز شناسایی شده است و چنین به نظر می رسد که ناحیه - N terminal در پروتئین *gyrA* و *ParC* به یکدیگر شباهت زیادی داشته باشند (۴-۶). بیشتر موتاسیون ها در باکتری *E. coli* در ناحیه QRDR ژن *gyrA* و در نوکلئوتید ۲۴۸ و ۲۵۹/۲۶۰ رخ می دهند که منجر به تغییر آمینواسید ser-83 و ASP-87 می شود. در ناحیه QRDR ژن *parC* نیز موتاسیون ها عمدتاً در نوکلئوتید ۲۳۸/۲۳۹ و ۲۵۰/۲۵۱ اتفاق می افتد که منجر به تغییر آمینواسید ser-80 یا Glu-84 می شود. موتاسیون های یاد شده عموماً به صورت منحصر به فرد رخ می دهند، اما مواردی از موتاسیون مضاعف نیز گزارش شده است که در مورد پروتئین *gyrA* معمولاً آمینواسید لوسین در جایگاه ۸۳ جایگزین سرین و در جایگاه ۸۷ آمینواسید اسپارژین یا تیروزین جایگزین اسپارتیک اسید می شوند. در مقایسه با موتاسیون یاد شده در *gyrA* و *ParC*، موتاسیون در ژن های *gyrB* و *parE* از اهمیت کمتری برخوردارند و نقش ناچیزی در تولید مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های یاد شده دارند (۸-۹).

روش کار

در این تحقیق کلیه مواد مورد استفاده در فرآیند PCR از شرکت Fermentas و مواد مورد نیاز برای تخلیص DNA ژنومیک و الکتروفورز از شرکت Roche تهیه گردید. پودر نالیدیکسیک اسید از شرکت البرز دارو تهیه شد. ۷۹ نمونه مثبت از نظر *E. coli* که از بین ۲۵۰۰ نمونه ادرار بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه بالینی بیمارستان بقیه ... (عج) طی ۵ ماه (بهمن ۱۳۸۳ تا خرداد ۱۳۸۴) جدا شده بود، جهت واکنش PCR انتخاب گردید. با در نظر گرفتن تمام پارامترهای لازم جهت طراحی یک پرایمر مناسب برای شناسایی ژن های مقاوم به نالیدیکسیک اسید، به روش ARMS اقدام شد. ARMS یا سیستم تکثیر منعکس کننده جهش، تکنیکی قدرتمند برای مشخص کردن جهش های نقطه ای است. در این تکنیک از پرایمرهای نوع جهش یافته و نرمال در دو لوله جداگانه استفاده می شود. اساس این تکنیک بر این پایه استوار است که DNA

چاهک شماره ۲۱ و ۱ - نشانگر اندازه وزن مولکولی ، **bp** ۱۰۰ و چاهک های شماره ۲ تا ۲۰ مثبت بجز چاهک های شماره ۸ و ۱۶ که منفی هستند.

بحث

رویداد شاخص های مقاومت پلاسمیدی و ترانسپوزونی در سویه های بالینی این پرسش را پیش می آورد که منشاء این شاخص ها کدام است. به احتمال زیاد برخی از این شاخص ها طی زمان طولانی و به دنبال یک سری جهش های پی در پی در ژن های کروموزومی موجود در باکتری یا به دنبال وارد شدن در پلاسمیدها و ترانسپوزون ها به وجود آمده باشد. این طرح احتمالاً در مورد تکامل بتالاتامازها در باکتری های گرم منفی روده ای نیز صادق است (۱۰).

به نظر می آید مصرف بی رویه و نامناسب آنتی بیوتیک ها در درمان بیماران بستری در بیمارستان یا بیماران سرپایی، مصرف آنتی بیوتیک ها در کشاورزی و دامپروری و فشار انتخابی ناشی از آن، منجر به گزینش سویه های مقاوم شده و امکان بقا و تکثیر آن ها را فراهم می سازد.

در یک مطالعه موتاسیون در ژن های *gyrA* و *gyrB* و *parC* که باعث مقاومت به نالیدیکسیک اسید در گونه های *E. coli* جدا شده از محصولات غذایی، حیوانی و انسانی می شد مورد آنالیز قرار گرفته است. در ۱۳ مورد نمونه حساس به نالیدیکسیک اسید هیچ تغییر اسید آمینه ای در پروتئین های *ParC* و *gyrA* مشاهده نشد در حالی که در همه گونه های مقاوم به نالیدیکسیک اسید حداقل یک مورد تغییر اسید آمینه در پروتئین *gyrA* در کدونهای ۸۷ یا ۸۳ دیده شده است. که با نتایج حاصل از مطالعه ما مبنی بر وجود حداقل یک موتاسیون در کدون های ۸۷ یا ۸۳ مطابقت داشت. (۱۱)

در مطالعه ای با نالیدیکسیک اسید با میزان MIC بیشتر از ۲۵۶ میلی گرم در لیتر فقط موتاسیون تبدیل *Ser* به *Leu* (۸۳) وجود داشت. در این مطالعه مشخص گردید که حتی یک موتاسیون برای بروز سطح بالایی از مقاومت به نالیدیکسیک اسید کافی می باشد. اما برای بروز سطح بالایی از مقاومت به سیپروفلوکساسین حداقل ۲ موتاسیون در ژن *gyrA* مورد نیاز می باشد. نتایج حاصل از این مطالعه نیز با مطالعه حاضر مشابهت دارد. (۱۲)

در یک بررسی دیگر ۸۰ مورد از گونه های *E. coli* مقاوم به نالیدیکسیک اسید با میزان MIC بیشتر از ۲۵۶ میلی گرم در لیتر تشخیص داده شده اند بصوری که در گونه ۶۱ *E. coli* مقاوم به نالیدیکسیک اسید جدا شده یک تغییر اسید آمینه در پروتئین *gyrA* در کدون های ۸۳ و ۸۷ مشاهده گردید (۱۳ و ۵).

نتیجه گیری

منطقه اطراف اسید آمینه ۸۳ زیر واحد A آنزیم DNA gyrase اهمیت ویژه ای در تشخیص مقاومت کینولونی داشته و تبدیل *Ser* به *Leu* یا *Trp* موجب این مقاومت می شود.

جدول ۱: موتاسیون های موجود در نمونه *E. coli* مقاوم به نالیدیکسیک

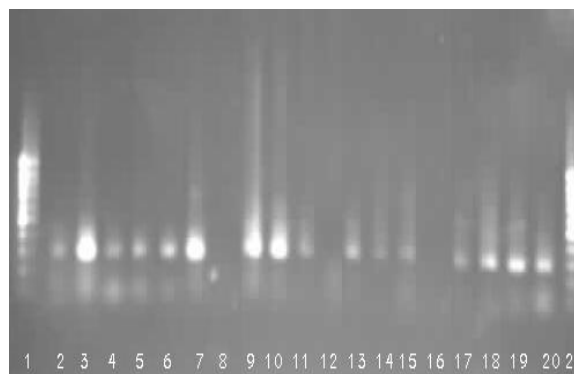
| کدون | تغییر اسید آمینه |
|------|------------------|
| ۸۱ | TAT → TTT |
| ۸۵ | TTG → TCG |
| ۸۷ | GCA → GTA |
| ۹۷ | ATA → ACA |
| ۱۰۷ | CTA → CCA |



شکل ۱- بررسی محصولات PCR -A : پرایمر P1 بعنوان

Forward و P2 بعنوان Reverse

چاهک شماره ۱۵ - نشانگر اندازه وزن مولکولی ، **bp** ۱۰۰ که جایگاه ۲ اندازه محدوده مورد نظر قطعه PCR که ۴۵۰ جفت باز می باشد یعنی باند های اندازه مولکولی ۴۰۰ و ۵۰۰ جفت باز نشان داده شده است. چاهک شماره ۲ تا ۱۳ - نمونه های ۲۶ تا ۳۷ همچنان که ملاحظه می گردد نمونه های ۲۷ ، ۲۸ ، ۲۹، ۳۶ و ۳۷ ، فاقد باند مورد نظر بوده منفی می باشند و در بقیه نمونه ها باند مورد نظر **bp** ۴۵۰ دیده می شود و مثبت است (توضیحات تکمیلی در متن)



شکل ۲- بررسی محصولات PCR- B:

پرایمرهای P1 بعنوان Forward و P3 بعنوان Reverse

REFERENCES

1. Gerald I. Mandell, John E. Bennett, Raphael Dolin. Principles and practice of infectious diseases: Michael S. Donnenberg. in: Enterobacteriaceae. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone. 2005; P:2567-2587.
2. Caballero – Granado F, et al., Comparative study of bacteremias caused by *Enterococcus* spp. With and without high-level resistance to gentamicin. *J Clin Microbiol*. 1998 Feb;36(2):520-5.
3. Casetta A, Hoi AB, de Cespedes G, Horaud T. Diversity of structures carrying the high-level gentamicin resistance gene (*aac6-aph2*) in *Enterococcus faecalis* strains isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Nov;42(11):2889-92.
4. Yolanda Sáenz, Myriam Zarazaga, Laura Briñas, Fernanda Ruiz-Larrea and Carmen Torres. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003;51:1001–1005.
5. Okuda J, Hayakawa E, Nishibuchi M, Nishino T., Sequence analysis of the *gyrA* and *parC* homologues of a wild-type strain of *Vibrio parahaemolyticus* and its fluoroquinolone-resistant mutants. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 May;43(5):1156-62.
6. Qiang YZ, Qin T, Fu W, Cheng WP, Li YS, Yi G, Use of a rapid mismatch PCR method to detect *gyrA* and *parC* mutations in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *J of Antimicrobial chemotherapy* 2002; 49:549-552.
7. Chenia HY, Pillay B, Pillay D. Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Oct 13; [Epub ahead of print].
8. Vila, J., Ruiz, J., Goñi, P. & Jiménez de Anta, T. (). Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996;40:491–3.
9. Giraud, E., Leroy-Sétrin, S., Flaujac, G., Cloeckaert, A., Dho-Moulin, M. & Chaslus-Dancla, E. Characterization of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* O78:K80 isolated from turkeys. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001;47:341–3.
10. Maria del mar Tavio. 1999. Mechanisms involved in the development of resistance to fluoroquinolones in *E.coli* isolates. *J. of Antimicrobial chemotherapy*. 44: 735-742.
11. Saenz Y, Zarazaga M, Brinas 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 Apr;51(4):1001-5. Epub 2003 Mar 13.
12. Erac B, Gill A, Amyes SG, Gulay Z. Mutations of *gyrA* in ciprofloxacin resistant *Escherichia coli* strains. *Mikrobiyol Bul*. 2003 Apr-Jun;37(2-3):125-30.
13. M.E. CULLEN. Cloning and characterization of a DNA Gyrase A Gene. *Antimicrobiol agent*. June 1989. p. 886-894.