مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۷، شماره ۲، تابستان ۹۶، صفحات ۱۳۳ تا ۱۳۷

Original Article

تغییرات ژن gyrA درانتروباکتریاسه‌های جداشده از عفونت ادراری مقاوم به آنتی بیوتیک‌های کینولونی

آتوسا منوری[۱]، فاطمه نوربخش[۲]، روزبه یلفانی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا
[۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا
[۳] استادیار، دانشکده پرستاری – مامایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا

چکیده

سابقه و هدف: *عفونت ادراری یکی از عفونت‌های شایع در سراسر جهان است که در صورت عدم درمان به موقع می‌تواند بیمار را دچار عارضه کند. یکی از راه‌های درمان این نوع عفونت‌ها مصرف آنتی بیوتیک است. امروزه مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها به یک چالش برای پزشکان و بیماران در سراسر جهان تبدیل شده است. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات ژن gyrA در انتروباکتریاسه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌های کینولونی جدا شده از عفونت ادراری از تعدادی از بیمارستانهای شهر تهران در سال ۱۳۹۴ بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه، ۱۰۰ جدایه از باکتری های خانواده انتروباکتریاسه از نمونه عفونت های ادراری جمع آوری شدند. جدایه‌ها جهت تعیین مقاومت به آنتی بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین، افلوکساسین، اینروفلوکساسین و لووفلوکساسین به روش دیسک دیفیوژن مطابق با دستور العمل های استاندارد (CLSI 2014) مورد غربالگری قرار گرفتند. همچنین واکنش PCR جهت بررسی تغییرات ژن gyrA در جدایه های مقاوم به کینولون مورد استفاده قرار گرفت.*

یافته‌ها: *باکتری‌ها به سیپروفلوکساسین ۳۶٪، نالیدیکسیک اسید ۴۵٪، نورفلوکساسین و افلوکساسین ۳۸٪، لووفلوکساسین ۳۵٪ و اینروفلوکساسین ۳۹٪ مقاومت نشان دادند. به طور کلی، ۳۶ باکتری به همه آنتی بیوتیک‌ها مقاوم بودند و ۲۹ مورد (۸۰/۵۵٪) دارای موتاسیون در ژن gyrA بودند.*

نتیجه‌گیری: *در این مطالعه مشاهده شد که جدایه‌های انتروباکتریاسه مقاوم به کینولون دارای جهش در ژن gyrA بودند که این جهش نقش مهمی در افزایش مقاومت در جدایه‌ها دارد.*

واژگان کلیدی: *مقاومت آنتی بیوتیکی، کینولون، ژن gyrA، انتروباکتریاسه، PCR.*

مقدمه

اعضای خانواده انتروباکتریاسه جزو فلور طبیعی روده محسوب می‌شوند، ولی به محض ورود به سایر نقاط بدن ایجاد عفونت می‌کنند. امروزه به دلیل مقاومت آنتی بیوتیکی به بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها، فلوروکینولون‌ها داروهای انتخابی درمان عفونت‌های ادراری ناشی از این باکتری هستند (۱). کینولون‌ها خانواده‌ای از آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف هستند. این عوامل به عنوان داروی انتخابی اول در درمان عفونت‌های دستگاه ادراری ناشی از باکتری‌های گرم منفی هوازی از جمله اشریشیا کلی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴-۲).

کینولون‌ها به دلیل مکانیسم منحصر به فرد و متفاوت با سایر داروها نظیر آمینوگلیکوزیدها و بتالاکتام‌ها در شرایطی که مقاومت دارویی ایجاد شده باشد، قابل مصرف هستند. مقاومت میکروبی ایجاد شده در برابر کینولون‌ها به علت موتاسیون بر روی کروموزوم باکتریایی است. مکانیسم عمل این داروها مهار

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین ، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی، فاطمه نوربخش (**Email:**niloofar_noorbakhsh@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۵/۷/۲۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۶/۱/۳۰

DNA ژیراز و توپوایزومراز IV است (۵). کینولون‌ها به طور مستقیم سنتز DNA را مهار می‌کنند؛ این مهار از طریق اثر متقابل دارو بر کمپلکس DNA – آنزیم (DNA ژیراز) صورت می‌گیرد و فعالیت آنزیمی مختل شده در نتیجه همانندسازی متوقف شده و سلول می‌میرد. علت اصلی مقاومت به کینولون ها در گرم منفی‌ها، جهش در ژن‌های کد کننده زیر واحدهای A و DNA B ژیراز و توپوایزومراز است (۶). این دو آنزیم هدف اصلی کینولون‌ها هستند. مهم‌ترین جهش‌ها، در ناحیه تعیین کننده مقاومت به کینولون ها در gyrA و ناحیه مشابه آن در ژن parC رخ می‌دهد. این ناحیه، جایگاه فعال gyrA در DNA است و کینولون با اتصال به این جایگاه از عمل آنزیم جلوگیری می‌کند، اگر چه جهش در خارج از این ناحیه نیز گزارش شده است (۷). میزان حساسیت باکتری‌های جدا شده از بیماران به آنتی بیوتیک ها در مناطق مختلف متفاوت است. اختلاف در الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در مناطق مختلف دنیا می‌تواند نتیجه اختلاف در میزان و نوع مصرف آنتی بیوتیک‌ها در هر منطقه باشد (۸). هدف از مطالعه حاضر، بررسی شیوع ژن gyrA مقاوم به آنتی بیوتیک‌های کینولونی در انتروباکتریاسه های جدا شده از عفونت ادراری از تعدادی از بیمارستان‌های شهر تهران در سال ۱۳۹۴ بود.

مواد و روشها

تعداد۱۵۰ نمونه مشکوک به عفونت ادراری بیمارستان‌های شهر تهران (شریعتی، پارس، سینا...) دراسفند ۱۳۹۴ جمع آوری شد. جدایه‌های به دست آمده پس از کشت در محیط-های اختصاصی و افتراقی و انجام آزمون‌های بیوشیمیایی EMB، مکانکی آگار، IMViC، SIM، TSI و کشت در محیط اوره مورد تعیین هویت مجدد قرار گرفتند.

برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سوسپانسیون استاندارد معادل نیم مک فارلند تهیه شد. سوآپ استریلی آغشته به این سوسپانسیون شد و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین، افلوکساسین، اینروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، نورفلوکساسین (۱۰ میکروگرم) به روش دیسک دیفیوژن (Kirby baur) طبق استاندارد جهانی CLSI بر روی آن قرار گرفت (۱۰). سپس، به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری شد.

جدایه‌های مقاوم جهت بررسی موتاسیون در ژن gyrA انتخاب شدند. استخراج ژنوم با روش فنل-کلروفورم انجام شد. جهت بررسی ژن gyrA آزمون PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی صورت گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن gyrA و دستیابی به آمپلیکون با اندازه ۱۹۲ جفت باز در جدول ۱ آمده است.

جدول۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر ژنgyrA

F	ACGTACTAGGCAATGACTGG
R	AGAAGTCGCCGTCGATAGAAC

پرایمرها از شرکت سیناژن تهیه شده و مطابق دستورالعمل شرکت آماده شدند. واکنش PCR به کمک کیت سیناژن انجام گرفت مواد مورد استفاده و غلظت مورد نیاز در جدول ۲ آمده است.

جدول۲. مقادیر مورد نیابرای **PCR**

حجم مورد استفاده	مواد مورد نیاز
5mM	10X Buffer
2 mM	$MgCl_2$
1 mM	dNTP
10 (P_s)& 10 (P_{As}) pM	Primers
0.5 mM	Taq Polymerase
2 ml	DNA Tamplate
11.5 m1	H_2O (D.W)

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Techne, UK) با شرایط حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه (Initial denaturation) و ۳۲ سیکل شامل حرارت ۹۴ درجه سانتی-گراد ۵ دقیقه (Denaturation)، حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد ۱:۳۰ دقیقه (Annealing)، حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱:۳۰دقیقه (Extension) و در نهایت حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه (Final extension) انجام شد. محصول PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱ درصد و رنگ آمیزی با Safe Stain با استفاده از دستگاه Trans-illuminator مورد بررسی قرار گرفت.

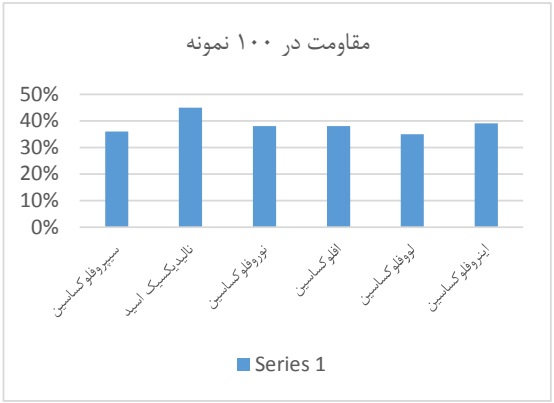
یافته‌ها

نمونه‌های مشکوک به عفونت ادراری جمع آوری شده در محیط کشت بلاد آگار و EMB کشت داده شدند و پس از جداسازی با انجام تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند که شامل ۶۰ مورد اشریشیا کلی، ۳۲ مورد کلبسیلا، ۵ مورد پروتئوس و ۳ مورد انتروباکتر بودند.

تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای این ۱۰۰ ایزوله بررسی شد. مقاومت در باکتری‌های مورد بررسی نسبت به

سیپروفلوکساسین ۳۶٪، نالیدیکسیک اسید ۴۵٪، نورفلوکساسین و افلوکساسین ۳۸٪، لووفلوکساسین ۳۵٪ و اینرو فلوکساسین ۳۹٪ بود (شکل ۱، نمودار ۱).

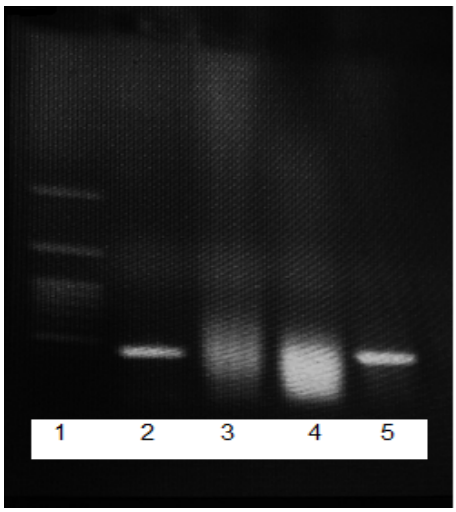
شکل ۱. نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی



نمودار۱. فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی

بر اساس نتایج حاصل از آزمون غربالگری دیسک دیفیوژن آگار مقاومت اشریشیا کلی به سیپروفلوکساسین ۳۸/۳۳٪، نالیدیکسیک اسید ۴۸/۳۳٪، نورفلوکساسین، افلوکساسین و اینرو فلوکساسین ۴۰٪، و لووفلوکساسین ۳۶/۶۶٪؛ مقاومت در کلبسیلا نسبت به هریک از این ۶ آنتی بیوتیک ۳۷/۵٪؛ و مقاومت در پروتئوس نسبت سیپرو فلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، نورفلوکساسین، افلوکساسین واینرو فلوکساسین ۴۰٪ بود و مقاومت نسبت به لووفلوکساسین مشاهده نشد. در انتروباکتر نیز هیچ مقاومت آنی بیوتیکی مشاهده نشد.

در این مطالعه با استفاده از تکنیک PCR، ایزوله مقاوم به آنتی بیوتیک‌های کینولونی با پرایمرهای اختصاصی کد کننده gyrA تکثیر شدند. ژن کد کننده gyrA باندی حدود ۱۹۲ جفت باز ایجاد کرد.



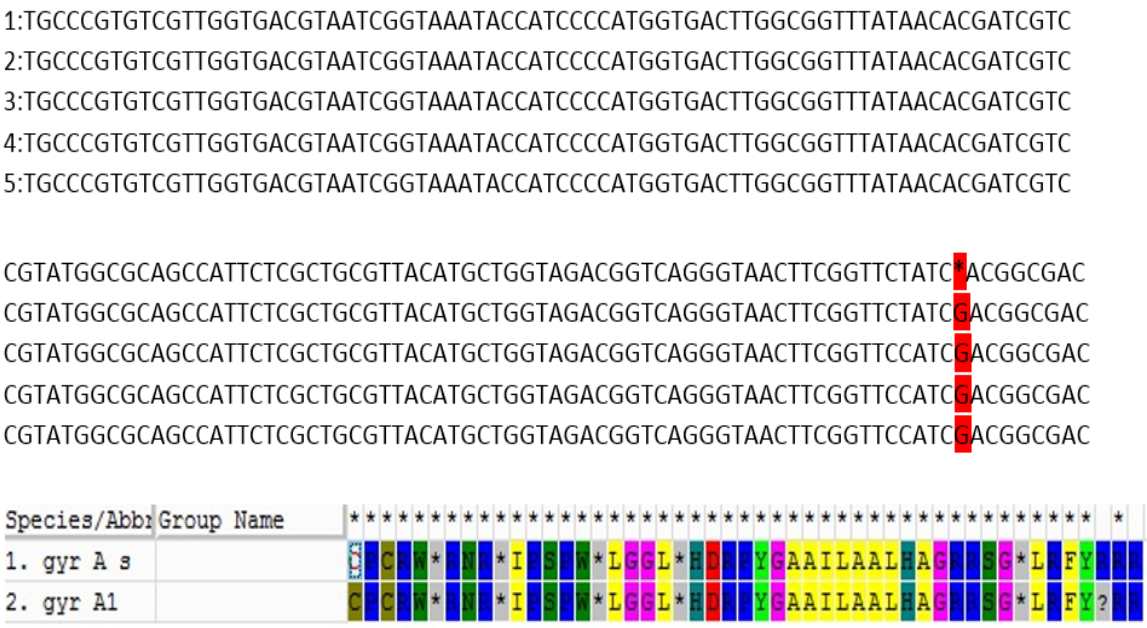
شکل۲. نتایج تکثیر ژن gyrA

پس از انجام PCR، محصول تکثیر یافته با استفاده از پرایمر sens و anti sens توالی یابی شد؛ سپس توالی ژن gyrA، با توالی ژن‌های مشابه درسویه‌های باکتری‌های مختلف در سایت NCBI مورد سنجش و مقایسه قرار گرفتند. طبق بررسی‌های صورت گرفته در این مطالعه، جهش‌های مشاهده شده منجر به جابه جایی نوکلئوتیدها شد؛ بنابراین تغییر در توالی نوکلئوتیدی ژن موجب تغییر در توالی اسید آمینه می‌شود. نتیجه حاصل به شرح زیر بود:

در نمونه gyrA به ترتیب مورد ۱ و ۲ اشریشیاکلی، نمونه شماره ۳ سالمونلا، شماره ۴انتروباکتر و شماره ۵ شیگلا بودند که نمونه شماره ۱، سوش مقاوم بررسی شده در این تحقیق بود و ۴ مورد دیگر نمونه‌هایی است که با این سوش مقایسه شدند که نتیجه آن حذف یک نوکلئوتید در انتهای توالی بود که این جهش در موقعیت Ser۸۳ بود (شکل ۲). نتیجه حاصل از تکنیک مولکولی (PCR) جهش Ser۸۳ در ژن gyrA بود.

بحث

در مطالعه حاضر، میزان مقاومت به آنتی بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید و اینرو فلوکساسین به ترتیب ۴۵٪ و ۳۹٪ به دست آمد که میزان مقاومت بالایی را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه از زمان تولید نالیدیکسک اسید در سال ۱۹۶۲ به عنوان اولین داروی خانواده کینولون ها بیش از ۷ دهه می-گذرد و به دلیل اینکه این دارو در همان ابتدا در درمان



شکل ۳. جهش در ژن gyrA

عفونت‌های ادراری استفاده شده است؛ بنابراین انتظار می‌رود که مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک از دیگر آنتی بیوتیک-های خانواده کینولونی بالاتر باشد.

Poirel و همکارانش در سال ۲۰۱۲، ۳۴۴ مورد از زنان سالمند مبتلا به پیلونفریت حاد را مورد بررسی قرار دادند که ۲۳٪ به نالیدیکسیک اسید و ۱۷/۴٪ به افلوکساسین مقاوم بودند که با تحقیق حاضر اختلاف دارد. در تحقیق حاضر مقاومت به نالیدیکسیک اسید ۴۵٪ و افلوکساسین ۳۸٪ بود که علت اختلاف با تحقیق حاضر را می‌توان تفاوت جغرافیای و همچنین مصرف خودسرانه آنتی بیوتیک در کشور ما عنوان کرد (۱۱).

طبق تحقیقاتی که اصغر شریفی و همکارانش بر روی عفونت های مربوط به دستگاه ادراری و مقاومت ۱۱ آنتی بیوتیک بر روی ۱۲۰ نمونه اشریشیاکلی در یاسوج انجام شد، مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید ۴۸/۳٪ و سیپروفلوکساسین ۲۸/۳٪ بود که با تحقیق حاضر مطابقت نزدیکی دارد. در تحقیق حاضر مقاومت به اشریشیاکلی ۴۸/۳٪ و مقاومت به سیپرو فلوکساسین ۳۸/۳٪ بود (۱۲).

طبق 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٪ و ۴۰/۲٪ به دست آمد که حدودا با تحقیق حاضر مطابق است.

در تحقیق حاضر نیز مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید ۴۵٪٪ و به سیپروفلوکساسین ۳۶٪ بود (۱۳).

در تحقیقات به عمل آمده توسط Kmet و همکارانش در خصوص جهش‌های رخ داده در ژن gyrA و parC در اسینتوباکتر بومانی نشان داده شد که جدایه‌های مقاوم به نالیدیکسیک اسید با سطح بالای MIC برای سیپروفلوکساسین و اینرو فلوکساسین دارای جهش در کدون های ۸۷ و ۸۳ در gyrA وکدون ۸۰ در parC بودند و در همه جدایه‌ها جهش در gyrA رخ داده بود. در مقایسه با تحقیق حاضر، جهش در کدون ۸۳ gyrA و در مورد جهش در ژن gyrA یکسان است (۱۴).

طبق تحقیقاتی که بهاره وکیلی و همکارانش در سال ۲۰۱۴ در ارتباط با جهش در ژن gyrA جدایه‌های بالینی اسینتوباکتربومانی مقاوم به کینولون انجام شد، به این نتیجه رسیدند که جدایه اسینتوباکتربومانی مقاوم به کینولون دارای جهش در ۸۳ ser در gyrA است که با تحقیق حاضر مطابقت دارد (۱۵).

در تحقیقات Ozawa و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در خصوص جهش‌های رخ داده در gyrA و parC باکتری های جدا شده از مدفوع نشان داده شد که جدایه‌های مقاوم به نالیدیکسیک اسید با سطح بالای MIC برای سیپروفلوکساسین و اینروفلوکساسین دارای جهش در کدون ۸۷ و ۸۳ در gyrA

بودند و جهشی در parC یافت نشد. درمقایسه با تحقیق حاضر جهش در کدون ۸۳ gyrA یکسان است (۱۶).

در این تحقیق، مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها با روش دیسک دیفیوژن مطالعه شد و با انجام PCR و Sequncing جهش (موتاسیون) موجود در ژن کد کننده gyrA بررسی شد که در آن علت مقاومت، موتاسیون در ژن‌ها بود، به جز در بعضی موارد که علت آن هم می‌تواند ایجاد مقاومت با مکانیسم دیگر باشد. همچنین فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی و ژن‌های مقاومت در هر منطقه و زمان متغیر است و ممکن است به دلیل بد مصرف کردن آنتی بیوتیک و یا استفاده از دوز درمانی نامناسب آنتی بیوتیک باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه کارکنان آزمایشگاه بیولوژی مولکولی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران که در انجام این پژوهش همکاری نمودند، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES

1. Ito CA, Gales AC, Tognim MC, Munerato P, Dalla Costa LM. Quinolone-resistant clinical escherchia coli. Braz J Infect Dis 2008;12:5-9.

2- Behringer MG. The effect of mutations in type II topoisomerase on fluoroquinolone resistance in clinical canine urine Escherichia coli isolates [PhD dissertations]. Auburn: Alabama University; 2011.

3- Wada K, Kariyama R, Mitsuhata R, Uehara S, Watanabe T, Monden K, et al. Experimental and clinical studies on fluroquinolone- insusceptible Escherchia coli isolated from patient with urinary tract infections from 1994-2007. Acta Med Okayama 2009;63:263-72.

4- Wang H, Dzink-Fox JL, Chen M, Levy SB. Genetic characterization of highly flouroquinoloneresistant clinical Escherchia coli strains from china: rule of acrR mutations. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:1515-21.

5-Negar MH, Taherpour M, Letafat B, Moshafi MH, fromadi AR. Synthesis and Evaluation of Antibacterial Activity of 1-cyclopropyl-6-folouro- 1,4-dihydro-8- methoxy-7-(4-(2-(2-thienyl)-2- yl)-2- hydroxy imino ethyl)-3- methyl piperazine-1- yl) -4- oxo-3- quinolone Carboxylic Acid. J Chem Pharm Res 2009; 9:47-51.

6- Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with Escherichia coli DNA gyrase. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:118-25.

7- Cavaco L, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. qnrD, anovel gene conferring transferable quinolone resistance in salmonella enteriaca serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:603-8.

8- Nicolle LE. Antimicrobial stewardship in long term care facilities: what is effective? Antimicrob Resist Infect Control 2014;12;3:6.

9- Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Text book of diagnostic microbiology. 4th ed. Sunders Elsevier; 2006. p. 430-5.

10- Clinical and laboratory standard institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. M100-S17. Wayne: CLSI;2007.

11- Poirel L, Rodriguez-Martinez J-M, Mammeri H, LiardA. A Nordman P.Originof plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:3523-5.

12- Sharifi A, Khoramrooz SS, Khosravani SA, Yazdanpanah M, Gharibpour F, Malekhoseini AA, Mohamadian M, et al. Antimicrobial resistance pattern of Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infection (UTI) in Yasuj city during 1391-1392. Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ) 2014;19:337-46. [In Persian]

13- Astal ZE. Increasing ciprofloxacin resistance among prevalent urinary tract bacterial isolates in the Gaza Strip. Singapor Med J 2005;46:457-9.

14- Kim T.E, Jeong Y.W, Cho SH., Kim S.J, Kwon H.J: Chronological study of antibiotic resistances and their relevant genes in korean avian pathogenic Escherichia coli isolates. J Clin Microbiol 2007; 45: 3309–15.

15- Fazeli H, Vakili B, Khorvash F, Shoaei P, Kariminik A, Yaran M, et al. Identification of mutation in gyrA gene obtained from quinolone resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii. Journal of Microbial World 2014,7:109-17. [In Persian]