جهش در زيرواحد parC توپوايزومراز IV در جدايه‌هاي کلبسيلا
پنومونيه مقاوم به سيپروفلوکساسين در استان گيلان

کبري احمدپور بيجارگاه[[1]](#footnote-1)، محمد فائزي قاسمي[[2]](#footnote-2)**\***، نجمه رنجي[[3]](#footnote-3)

تاريخ دريافت 21/11/1395 تاريخ پذيرش 09/02/1396

چکيده

**پيش‌زمينه و هدف:** *کلبسيلا پنومونيه* يکي از دلايل شايع عفونت‌هاي بيمارستاني ازجمله عفونت مجاري ادراري، تنفسي و زخم مي‌باشد. چندين مکانيسم مقاومت به فلوئوروکوئينولون‌ها ازجمله جهش در زيرواحدهاي توپوايزومراز IV (*parC* *و parE*) پيشنهاد شده است. هدف از اين مطالعه بررسي جهش‌هاي ژن *parC* **در جدايه‌هاي** *کلبسيلا پنومونيه* **مقاوم به سيپروفلوکساسين در استان گيلان بود.**

**مواد و روش‌ها:** در اين مطالعه 40 سويه *کلبسيلا پنومونيه* از چندين بيمارستان و آزمايشگاه در رشت و لاهيجان جداسازي شد و به کمک روش‌هاي بيوشيميايي تعيين هويت شدند. حساسيت و مقاومت به آنتي‌بيوتيک‌هاي سيپروفلوکساسين، ايمي‌پنم، آميکاسين، سفکسيم، سفوتاکسيم، سفالکسين، جنتامايسين و ناليديکسيک اسيد تعيين گرديد. به روش کربي بوئر و MIC تعيين گرديد. سپس به روش PCR- سکونسينگ جهش‌هاي ژن *parC* در جدايه‌هاي مقاوم به سيپروفلوکساسين بررسي گرديد.

**يافته‌ها:** 15 درصد جدايه‌ها به همه هشت آنتي‌بيوتيک مقاوم بودند. سيزده جدايه مقاوم به سيپروفلوکساسين (5/32 درصد ) بودند. بيشترين درصد مقاومت آنتي‌بيوتيکي براي سفالکسين (70 درصد) پيدا شد و کم‌ترين درصد مقاومت آنتي‌بيوتيکي براي جنتامايسين (5/17 درصد ) تعيين شد. آناليز توالي يابي نشان داد سه جدايه مقاوم به سيپروفلوکساسين داراي جهش‌هاي بدمعني L38F و يا E84K در ژن *parC* بودند.

**نتيجه‌گيري:** در استان گيلان به نظر مي‌رسد جهش‌هاي *parC* در ايجاد مقاومت به سيپروفلوکساسين در کلبسيلا پنومونيه از طريق تغيير در تمايل سيپروفلوکساسين به توپوايزومراز IV نقش داشته باشند.

**کلمات کليدي:** مقاومت به سيپروفلوکساسين، *کلبسيلا پنومونيه*، جهش‌هاي بدمعني، *parC*، توالي يابي

**مجله پزشکي اروميه، دوره بيست و هشتم، شماره سوم، ص 230-223، خرداد 1396**

**آدرس مکاتبه**: لاهيجان. دانشگاه آزاد اسلامي لاهيجان. دانشکده علوم. گروه ميکروبيولوژي. 09113314187

Email: faezi@liau.ac.ir

مقدمه

*کلبسيلا پنومونيه* يک پاتوژن شايع و فرصت‌طلب بيمارستاني است که موجب ايجاد عفونت‌هاي مختلفي چون ذات‌الريه، عفونت دستگاه تنفسي، دستگاه ادراري، زخم‌هاي باز، سپتي سمي وباکتريمي در انسان مي‌گردد. در سال‌هاي اخير، ظهور جدايه‌هاي مقاوم به آنتي‌بيوتيک در کلبسيلا پنومونيه تبديل به يک مشکل و نگراني بزرگ در سراسر جهان شده است([1-3](#_ENREF_1)). فلوروکوئينولون‌ها آنتي‌بيوتيک‌هايي هستند که به‌طور گسترده‌اي در درمان عفونت‌هاي باکتريايي مورداستفاده قرار مي‌گيرند که استفاده گسترده موجب افزايش مقاومت به آن‌ها در سراسر جهان شده است([3-5](#_ENREF_3)). فلوروکوئينولون‌ها با مهار آنزيم‌هاي DNA ژيراز و توپوايزومراز IV در باکتري باعث مهار رونويسي و همانندسازي مي‌شوند (7). در باکتري‌هاي گرم مثبت و گرم منفي DNA ژيراز و توپوايزومراز IV هدف اصلي فلوروکوئينولون‌ها مي‌باشند([6](#_ENREF_6), [7](#_ENREF_7)). آنزيم DNA ژيراز از دو زير واحد A و B (*gyrA* و *gyrB*) و توپوايزومراز IV از دو زير واحد C و E (*parC* و *parE*) تشکيل شده است ([7](#_ENREF_7)). علل ايجاد مقاومت به فلوروکوئينولون‌ها شامل جهش‌هاي کروموزومي، افزايش بيان ژن‌هاي درگير در پمپ‌هاي افلاکس، تغيير در آنزيم هدف و کاهش سطح انباشت فلوروکوئينولون‌ها در سلول مي‌باشد ([8](#_ENREF_8), [9](#_ENREF_9)). اگرچه فلوروکوئينولون‌هايي چون سيپروفلوکساسين اغلب براي درمان عفونت‌هاي ناشي از کلبسيلا پنومونيه مورداستفاده قرار مي‌گيرد، اما مقاومت اين باکتري به اين گروه از آنتي‌بيوتيک‌ها در حال افزايش است. به‌طوري‌که مشخص‌شده يکي از دلايل ايجاد مقاومت به فلوروکوئينولون‌هايي چون سيپروفلوکساسين کاهش تمايل توپوايزومرازهاي II (ژيراز) و IV به اين دارو است. اين امر نتيجه جهش در زير واحدهاي اين دو آنزيم (DNA ژيراز (*gyrA* و *gyrB*) و توپوايزومراز IV (*parC* و *parE*)) مي‌باشد (14).

استفاده نادرست و طولاني‌مدت سفالوسپورين‌ها باعث شده جدايه‌هاي کلبسيلا پنومونيه مقاوم به بتالاکتامازها افزايش يابد. کوئينولون‌ها از داروهاي مؤثر در درمان اين گروه از عفونت‌ها محسوب مي‌شوند. بااين‌حال مصرف بي‌رويه اين گروه از آنتي‌بيوتيک‌ها در سال‌هاي اخير باعث افزايش مقاومت به آن‌ها شده ([3](#_ENREF_3))، به‌طوري‌که محققين به دنبال شناسايي دلايل ايجادکننده مقاومت در اين جدايه‌ها جهت انتخاب استراتژي‌هاي درماني مناسب‌تر هستند. هدف از اين مطالعه بررسي نقش جهش‌هاي ژن *parC* در ايجاد مقاومت چنددارويي در سويه‌هاي کلبسيلا پنومونيه جداشده از عفونت‌هاي بيماران بستري در بخش‌هاي مختلف بيمارستاني استان گيلان بود. بدين منظور بعد از جداسازي نمونه‌هاي مقاوم و بررسي نوع مقاومت به آنتي‌بيوتيک‌هاي مختلف، انواعي که بيشترين مقاومت به يک يا چند دارو را داشتند ازنظر ميزان MIC و جهش‌هاي ژن *parC* به کمک روش PCR- سکوئنسينگ موردبررسي قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

2-1-**جمع‌آوري نمونه و شناسايي باکتري**

در اين مطالعه، تعداد 40 نمونه در بازه زماني يک‌ساله 94-93 از نمونه‌هاي مختلف باليني (ادرار، خون، ترشحات واژن) از مراکز درماني و بيمارستان‌هاي سطح استان گيلان جمع‌آوري گرديد. ابتدا جدايه‌ها بر اساس رنگ گرم، تست اوره آز، اورنتين دكربوكسيلاز و رشد در دماي ° c 37 تشخيص داده شدند([10](#_ENREF_10)).

2-2- سنجش حساسيت آنتي‌بيوتيکي

پس از جداسازي نمونه‌هاي *کلبسيلا* *پنومونيه* مقاومت آنتي‌بيوتيکي با انجام تست آنتي بيوگرام از طريق روش استاندارد ديسک ديفيوژن (Baur-Kirby) و طبق استاندارد [[4]](#footnote-4)CLS ([11](#_ENREF_11))، با استفاده از ديسک‌هاي آنتي‌بيوتيکي سيپروفلوکساسين (μg5)، ايمي پنم (μg10)، آميکاسين (μg30)، سفکسيم (μg30)، ناليديکسيک اسيد (μg30)، سفوتاکسيم (μg30)، سفالکسين (μg30) و جنتامايسين (μg10) تعيين گرديد. ديسک‌هاي آنتي‌بيوتيکي از شرکت High Media (هند) خريداري شد. بعد از 18-24 ساعت انکوباسيون در دماي °C37، قطر هاله عدم رشد اطـراف هـر ديسک اندازه‌گيري و نتايج آن ثبت گرديد.

2-3-**تعيين حداقل غلظت مهارکنندگي رشد** (**MIC**)

در اين مطالعه از فلوروکوئينولون‌ها سيپروفلوکساسين و ناليديکسيک اسيد ازنظر ميزان MIC به روش براث دايلوشن بر اساس استاندارد CLSI در جدايه‌هاي *کلبسيلا پنومونيه* بررسي شدند ([11](#_ENREF_11)). به اين منظور جدايه‌ها در محيط کشت مولر هينتون براث در غلظت‌هاي مختلف دارو به مدت 24 ساعت در انکوباتور° c 37 نگهداري شد. سپس اولين لوله‌اي که عدم رشد در آن مشاهده شد به‌عنوان [[5]](#footnote-5)MIC در نظر گرفته شد.

2**-4-**واکنش **PCR** و تعيين توالي ژن ***parC***

**در ابتدا جدايه‌ها در محيط مولر هينتون براث کشت داده شدند و به مدت 24-18 ساعت در دماي °** C**37 انکوبه شدند. سپس از کيت** TOP General Genomic DNA Purification **(شرکت توپازژن، ايران) جهت استخراج** DNA **استفاده شد. براي تأييد استخراج، نمونه‌ها در ژل آگارز 2 درصد مورد ارزيابي قرار گرفتند. بعد از حصول اطمينان از تشکيل تک باند، اجزاي واکنش** PCR **در حجم نهايي** µl**25 با استفاده از کيت** AccuPower**®** PCR PreMix **(شرکت** Bioneer**، کره جنوبي) با افزودن** DNA **ژنومي، جفت پرايمر (**µM **100) و آب استريل به محلول** PreMix **(حاوي آنزيم، کوفاکتور و بافر مخصوص) آماده شد. سنتز پرايمرها توسط شرکت** Bioneer **صورت گرفت. واکنش** PCR **طبق برنامه ذيل انجام شد: يک مرحله واسرشت شدن ابتدايي در °** C**92 به مدت 3 دقيقه، 30 سيکل در دماي ° C92 به مدت 30 ثانيه، °** C**50 به مدت 30 ثانيه، °** C**72 به مدت 1 دقيقه و يک مرحله گسترش نهايي در دماي °** C**72 به مدت 10 دقيقه. بعد از اطمينان از تک باند بودن محصولات** PCR**، نمونه‌ها با حفظ زنجيره سرمايي توسط شرکت تکاپو زيست (ايران، تهران) به شرکت** Bioneer **کشور کره جنوبي فرستاده شد. بعد از تخليص محصولات** PCR **از روي ژل آگارز، نمونه‌ها توسط شرکت** Bioneer **تعيين توالي شد. سپس نتايج حاصل به کمک نرم‌افزار** CLC main workbench v3.5 **و نرم‌افزار آنلاين بلاست (**BLAST**) ازنظر وجود جهش در نمونه‌هاي مقاوم نسبت به نمونه استاندارد رفرنس (**ATCC 13883**) موجود در سايت** NCBI **موردبررسي قرار گرفت.**

جدول (1): **مشخصات پرايمرهاي مربوط به ژن** ParC

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| رفرنس | طول محصول PCR | توالي پرايمر | نام پرايمر |
| ([12](#_ENREF_12)) | 340 bp | 3'-CAGCTCGGCATACTTCGAC-5' | ParC-F |
| 5'-CCTGAACTACTCCATGTACGTGAT-3' | ParC-R |

يافته‌ها

در اين بررسي 40 نمونه از بيماراني که دچار عفونت به *کلبسيلا پنومونيه* شده بودند از بيمارستان‌هاي سطح استان گيلان جدا شد. نتايج حاصل از آزمون تعيين حساسيت اين باکتري نسبت به هشت آنتي‌بيوتيک در جدول 2 نشان داده شده است. در اين آزمون بيشترين مقاومت نسبت به سفالکسين و بيش‌ترين حساسيت نسبت به جنتامايسين مشاهده شد. در اين مطالعه از 40 جدايه، 13 جدايه مقاوم به سيپروفلوکساسين بودند که ازنظر ميزان MIC موردبررسي قرار گرفتند.

جدول (2): الگوي مقاومت ايزوله‌هاي *کلبسيلا پنومونيه* جداشده از نمونه‌هاي باليني نسبت به آنتي‌بيوتيک

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| نوع آنتي‌بيوتيک | مقاوم تعداد (درصد) | حساس وابسته دوز تعداد (درصد) | حساس تعداد (درصد) |
| سيپروفلوکساسين | 13 (32.5) | 0(0) | 27 (67.5) |
| ايمي پنم | 9 (22.5) | 2 (5) | 29 (72.5) |
| آميکاسين | 8 (20) | 1 (2.5) | 31 (77.5) |
| سفکسيم | 12 (30) | 0(0) | 28 (70) |
| ناليديکسيک اسيد | 13(32.5) | 8 (20) | 19 (47.5) |
| سفوتاکسيم | 10 (25) | 4 (10) | 26 (65) |
| سفالکسين | 28 (70) | 2 (5) | 10 (25) |
| جنتامايسين | 7 (17.5) | 1 (2.5) | 32 (80) |

در اين مطالعه از 13 جدايه مقاوم به سيپروفلوکساسين، در 10 جدايه مقاومت به سيپروفلوکساسين با MIC=1024 µg/ml، در دو مورد MIC=256 µg/ml و در يک مورد MIC=128 µg/ml گزارش شد. همچنين در 13 نمونه مقاوم به ناليديکسيک اسيد، يک مورد داراي MIC=128 µg/ml و بقيه موارد MIC≥512 µg/ml بود.

جهت بررسي مولکولي مقاومت به سيپروفلوکساسين، ژن *parC* در نمونه‌هاي جداشده به روش PCR تکثير شدند و بعد از اطمينان از تک بانده بودن محصولات PCR، نمونه‌ها مورد آناليز به کمک سکونسينگ قرار گرفتند. نتايج سکونسينگ نشان داد که دو نمونه داراي جهش L38F بودند که آمينواسيد لوسين به فنيل آلانين تبديل شده بود. اين جهش در اثر جابجايي T به A در نوکلئوتيد 114 ايجاد شده بود (شکل 1). همچنين دو نمونه داراي جهش E84K بودند که آمينواسيد گلوتاميک اسيد به لايزين تبديل شده بود که در اثر جهش بد معني تغيير G به A در نوکلئوتيد 250 رخ‌داده بود (شکل 2).



**شکل (1):** تغيير نوکلئوتيد A در نوکلئوتيد 114 م به T: TTA(Leu)>TTT(Phe) با تغيير آمينواسيدي L38F



**شکل (2):** تغيير نوکلئوتيد G در نوکلئوتيد 250 م به A: GAA(Glu)>AAA(Lys) با تغيير آمينواسيدي E84K

بحث

مقاومت آنتي‌بيوتيکي يکي از مشکلات مهم کشورها در درمان بيماري‌هاي عفوني مي‌باشد. *کلبسيلا پنومونيه* يک پاتوژن فرصت‌طلب است که معمولاً باعث ايجاد عفونت‌هاي باکتريايي در انسان مي‌گردد. در سال‌هاي اخير، ظهور جدايه‌هاي مقاوم به آنتي‌بيوتيک در کلبسيلا پنومونيه تبديل به يک مشکل و نگراني بزرگ در سراسر جهان شده است. کوئينولون‌ها دسته‌اي از آنتي‌بيوتيک‌هاي وسيع‌الطيف هستند که کارايي بسيارخوبي در درمان بيماري‌هاي عفوني ايجاد شده توسط *کلبسيلا پنومونيه* دارند، اما استفاده گسترده موجب ايجاد مقاومت آنتي‌بيوتيکي نسبت به آن‌ها شده است([3](#_ENREF_3)).

در مطالعه حاضر که بر روي 40 نمونه *کلبسيلا پنومونيه* جداشده از بيماران مراجعه‌کننده به بيمارستان‌هاي سطح استان گيلان انجام گرفت، ميزان مقاومت به سيپروفلوکساسين در 30 درصد از جدايه‌ها گزارش گرديد. درحالي‌که در مطالعه پورمحمد و همکاران در سال 2013 در تبريز از 61 نمونه کلينيکي *کلبسيلا پنومونيه* جداشده از خون، ادرار، زخم و ديگر نمونه‌هاي بخش ICU، 9/61 درصد جدايه‌ها به آنتي‌بيوتيک سيپروفلوکساسين مقاوم بودند ([13](#_ENREF_13)). همچنين در مطالعه صورت گرفته توسط نوروزي و همکاران در سال 2014 در کرمان از 111 نمونه *کلبسيلا پنومونيه* جداشده از خون، ادرار، ترشحات تنفسي و زخم 19 درصد جدايه‌ها به سيپروفلوکساسين مقاوم بوده است ([8](#_ENREF_8)). در مطالعه پورعلي شش بلوکي و همکاران در سال 1395 در بيمارستان‌هاي شيراز مشخص شد از 111 جدايه *کلبسيلا پنومونيه* به‌دست‌آمده از نمونه‌هاي خون، ادرار، زخم، تراشه و برونکوآلوئلار، 33 درصد موارد مقاوم به سيپروفلوکساسين بودند([14](#_ENREF_14)). در مطالعه مولانا و همکاران در سال 1389 بر روي 30 جدايه *کلبسيلا پنومونيه* نمونه‌برداري شده از محيط و تجهيزات بخش مراقبت‌هاي ويژه بيمارستان شهيد بهشتي شهر بابل 60 درصد موارد مقاوم به سيپروفلوکساسين تشخيص داده شدند([15](#_ENREF_15)). بر اين اساس در نواحي مختلف ميزان مقاومت به سيپروفلوکساسين متفاوت است ولي به دليل مصرف بي‌رويه آنتي‌بيوتيک انتظار مي‌رود ميزان مقاومت افزايش يابد. قابل‌ذکر است شيوع متفاوت عفونت‌ها در استان‌هاي مختلف و همچنين دلايل متنوع ژنتيکي در ايجاد مقاومت در اين عفونت‌ها مي‌تواند باعث تفاوت در ميزان شيوع مقاومت در اين عفونت‌ها باشد. از سوي ديگر تفاوت در موضع جمع‌آوري جدايه‌ها مي‌تواند از دلايل تفاوت در ميزان مقاومت به سيپروفلوکساسين در مطالعات مختلف باشد.

مقاومت به سيپروفلوکساسين به‌واسطه جهش در چندين ژن ازجمله زير واحد *parC* در توپوايزومراز IV *کلبسيلا پنومونيه* رخ مي‌دهد. در مطالعات مختلف انواع جهش‌ها در ژن *parC* در *کلبسيلا پنومونيه* که با مقاومت در سيپروفلوکساسين همراه است گزارش شده است. دراين‌بين مطالعات زيادي جهش در کدون‌هاي 80 و 84 را در ژن *parC* گزارش کرده‌اند که شامل S80I و E84K مي‌باشد. در مطالعه بريس و همکاران در جدايه‌هاي *کلبسيلا پنومونيه* چندين جهش ازجمله S80I و E84K مشاهده شد ([16](#_ENREF_16)). در مطالعه پيه کارسکا و همکاران در سال 2015، نيز هر دو جهش در جدايه‌هاي مقاوم به فلوروکوئينولون‌ها شناسايي شد ([17](#_ENREF_17)). در مطالعه ميناريني و همکاران جهش‌هاي S80I در شش جدايه از 21 جدايه مقاوم به کوئينولون‌ها به‌دست‌آمده از مراجعين به آزمايشگاه‌هاي چند شهر برزيل بين سال‌هاي 2002 تا 2005 شناسايي شد. در اين مطالعه جهش E84K گزارش نشد ([18](#_ENREF_18)). به نظر مي‌رسد عدم وجود جهش S80I در اين مطالعه به دليل اهميت کم‌تر اين جهش در ايجاد مقاومت به سيپروفلوکساسين در جدايه‌هاي *کلبسيلا پنومونيه* در استان گيلان باشد. همچنين در بعضي مطالعات همراهي اين جهش با مقاومت به غلظت‌هاي بالاتر سيپروفلوکساسين در جدايه‌هاي مقاوم به اين دارو مشاهده شده است ([19](#_ENREF_19)). از سوي ديگر در مطالعه چن و همکاران در سال 2003 در بين 34 جدايه مقاوم *کلبسيلا پنومونيه* موردمطالعه در تايوان هيچ جهشي در ژن *parC* مشاهده نشد. در اين مطالعه مشخص شد که بعضي از جدايه‌هاي مقاوم داراي جهش در *gyrA* مي‌باشند([20](#_ENREF_20)). در مطالعه محمدعلي پور و همکاران در سال 1394 بر روي 10 جدايه *کلبسيلا پنومونيه* مقاوم به سيپروفلوکساسين، شش جدايه داراي جهش در ژن *gyrA* بودند([3](#_ENREF_3)). در مطالعه پارک و همکاران در سال 2017 از 42 جدايه *کلبسيلا پنومونيه* مقاوم به سيپروفلوکساسين 36 جدايه حداقل يک جهش در يکي از ژن‌هاي *gyrA*، *gyrB* و *parC* داشتند. در اين مطالعه هر دو جهش S80I و E84K در جدايه‌هاي مقاوم مشاهده شد([19](#_ENREF_19)). بنابراين عدم وقوع جهش S80I مي‌تواند نشان‌دهنده اهميت ديگر جهش‌ها در اين ژن و يا اهميت ديگر ژن‌هاي دچار جهش ازجمله *gyrA* در استان باشد.

از سوي ديگر در اين مطالعه در دو جدايه مقاوم به سيپروفلوکساسين، جهش E84K شناسايي شد. در مطالعات مختلفي چون مطالعه پيه کارسکا ([17](#_ENREF_17)) و مطالعه بريس ([16](#_ENREF_16)) نيز در بعضي از جدايه‌هاي مقاوم به فلوروکوئينولون‌ها جهش E84K گزارش شد. در مطالعه نوروزي و همکاران از بين 111 جدايه *کلبسيلا پنومونيه* 6 جدايه داراي جهش در ژن *parC* بودند که تنها دو مورد جهش شايع S80I را داشتند. در مطالعه نوروزي جهش شايع E84K مشاهده نشد([8](#_ENREF_8)). جهش E84K يکي از چند جهش شايع در *parC* محسوب مي‌شود که در جدايه‌هاي مقلوم به فلوروکوئينولون‌ها گزارش شده است. وقوع اين جهش در دو جدايه *کلبسيلا پنومونيه* مقاوم به سيپروفلوکساسين در اين مطالعه نشان‌دهنده اهميت آن در ايجاد مقاومت به دارو است. هرچند در مطالعات مختلف وقوع يک يا چند جهش در *parC* در جدايه‌هاي مقاوم گزارش شده است، به نظر مي‌رسد در استان گيلان ديگر جهش‌هاي شايع در اين ژن رخ نداده باشد و جهش‌هاي ديگري در اين ژن يا ديگر ژن‌ها در ايجاد مقاومت اهميت داشته باشد. از سوي ديگر تبديل گلوتاميک اسيد به آمينواسيدهاي لايزين، آلانين و گلايسين در مطالعات مختلف ازجمله مطالعه ميناريني و همکاران در برزيل بين سال‌هاي 2002 تا 2005 ([18](#_ENREF_18))، بريس و همکاران در هلند سال 2001 ([16](#_ENREF_16))، دگوچي و همکاران سال 1996 در ژاپن ([21](#_ENREF_21)) مشاهده شد. و اين در حالي است که در دو نمونه موردمطالعه ما فقط تبديل گلوتاميک اسيد به لايزين گزارش شد. از سوي ديگر جهش جديد L38F در مطالعه حاضر براي اولين بار مشاهده شد. به نظر مي‌رسد اين جهش نيز همانند ديگر جهش‌هاي مشاهده شده در اين ژن با تغيير تمايل سيپروفلوکساسين به *parC* باعث کاهش حساسيت به دارو در جدايه‌هاي *کلبسيلا پنومونيه* در استان گيلان شده باشد که به مطالعات بيشتري در اين زمينه نياز دارد.

نتيجه‌گيري

با توجه به اينکه سيپروفلوکساسين جزء آنتي‌بيوتيک‌هاي مؤثر در درمان عفونت‌هاي بيمارستاني ناشي از *کلبسيلا پنومونيه* مي‌باشد وجود 13 جدايه مقاوم به سيپروفلوکساسين از 40 جدايه و همچنين مقاومت به دوزهاي بالاي ناليديکسيک اسيد و سيپروفلوکساسين در اين مطالعه خطر خاموش افزايش مقاومت‌هاي آنتي‌بيوتيکي را در استان نشان مي‌دهد. همچنين وقوع يک جهش شايع *parC* در دو جدايه و يک جهش جديد در دو جدايه براي اولين بار در دنيا در اين مطالعه نشانه اهميت اين جهش‌ها در ايجاد مقاومت به سيپروفلوکساسين در اين باکتري در استان گيلان مي‌باشد. به‌طوري‌که به نظر مي‌رسد اين جهش‌ها باعث کاهش تمايل سيپروفلوکساسين به توپوايزومراز IV و درنتيجه کاهش اثر سيپروفلوکساسين در مهار تکثير سلولي شوند.

تشکر و قدرداني

اين مقاله تحقيقاتي حاصل پايان‌نامه دانشجويي كارشناسي ارشد ميكروب‌شناسي مي‌باشد. نويسندگان اين مقاله از رياست و معاونت محترم پژوهشي و فناوري دانشگاه آزاد اسلامي واحد رشت و رياست دانشکده علوم پايه دانشگاه آزاد اسلامي واحد لاهيجان کمال تشکر و امتنان را دارند.

**References**

1. Kang CI, Kim SH, Bang JW, Kim HB, Kim NJ, Kim EC, et al. Community-acquired versus nosocomial Klebsiella pneumoniae bacteremia: clinical features, treatment outcomes, and clinical implication of antimicrobial resistance. J Korean Med Sci 2006;21(5): 816-22.

2. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. N Engl J Med 2010;362(19):1804-13

3. MohammadAlipour Z, Asadpour L, Ranji N. Fluoroquinolone resistance and mutation in gyrA gene in clinical isolates of Klebsiella pnemoniae. Iran J Med Microbiol 2016;10(5): 31-7.

4. Ambrozic Avgustin J, Keber R, Zerjavic K, Orazem T, Grabnar M. Emergence of the quinolone resistance-mediating gene aac(6')-Ib-cr in extended-spectrum-beta-lactamase-producing Klebsiella isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(11):4171-3.

5. Ranji N, Rahbar Takrami S. Role of mexZ gene in ciprofloxacin resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates in Guilan province. Urmia Med J 2017;27(10): 902-13.

6. Koo SH, Kwon KC, Cho HH, Sung JY. Genetic basis of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates from three university hospitals in Chungcheong Province, Korea. Korean J Lab Med 2010;30(5): 498-506.

7. Al-Marzooq F, Mohd Yusof MY, Tay ST. Molecular analysis of ciprofloxacin resistance mechanisms in Malaysian ESBL-producing Klebsiella pneumoniae isolates and development of mismatch amplification mutation assays (MAMA) for rapid detection of gyrA and parC mutations. BioMed Res Int 2014;2014: 601630.

8. Norouzi A, Azizi O, Hosseini H, Shakibaie S, Shakibaie Mr. Amino acid Substitution Mutations Analysis of gyrA and parC Genes in Clonal Lineage of Klebsiella pneumoniae conferring High-Level Quinolone Resistance. J Med Microbiol Infectious Diseases 2014;2(3): 109-17.

9. Padilla E, Llobet E, Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Bengoechea JA, Alberti S. Klebsiella pneumoniae AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob Agents Chemother 2010;54(1): 177-83.

10. MGe LM. Enterobacteriaceae In: Textbook of diagnostic microbiology. 4th ed. Missouri: Saunders, Elsevier, Maryland Heights; 2011.P. 427-50.

11. Cockerill F, Patel J, Alder J, Bradford P, Dudley M, Eliopoulos G, et al. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement; M100-S23: Clinical & Laboratory Standards Institute; 2013.

12. Bratu S, Landman D, George A, Salvani J, Quale J. Correlation of the expression of acrB and the regulatory genes marA, soxS and ramA with antimicrobial resistance in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae endemic to New York City. J Antimicrob Chemother 2009;64(2):278-83.

13. Ali PorMohammad AH, Shams F, Aghazadeh M. Assessment of epsilometer test over molecular detection for quinolone resistance in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae clinical isolates: A predictable schedule on routine basis. Life Sci J 2014;11(12s): 1027-31.

14. Pourali Sheshblouki G, Mardaneh J, Hosseinzadeh Z. Klebsiella pneumoniae Infections in Hospitalized Patients: Characterization of Antibiotic Cross-resistance and Detection of Cefepime Susceptible-dose Dependent (SDD) Strains. J Fasa Univ Med Sci 2016;6(1): 52-9.

15. Molana Z, Ferdosi Shahandashti E, Gharavi S, Shafii M, Norkhomami S, Ahangarkani F, et al. Molecular Investigation of Class I Integron in Klebsiella Pneumoniae Isolated from Intensive Care Unit (Shahid Beheshti Hospital of Babol 2010). J Babol Univ Med Sci 2011;13(6): 7-13.

16. 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(Pt 3):915-24.

17. Piekarska K, Wolkowicz T, Zacharczuk K, Rzeczkowska M, Chrost A, Bareja E, et al. Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in gyrA and parC among fluoroquinolone-resistant clinical Enterobacteriaceae isolated in a tertiary hospital in Warsaw, Poland. [Int J Antimicrob Agents](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=International+journal+of+antimicrobial+agents.+2015%3B45%283%29%3A+238-43.+Epub+2014%2F12%2F04." \o "International journal of antimicrobial agents.) 2015;45(3):238-43.

18. Minarini LA, Darini AL. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of gyrA and parC in Enterobacteriaceae isolates from Brazil. Braz J Microbiol. 2012 Oct;43(4):1309-14.

19. Park KS, Yang HS, Nam YS, Lee HJ. Mutations in DNA Gyrase and Topoisomerase IV in Ciprofloxacin-Nonsusceptible Extended-Spectrum -Lactamase-Producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. Clin lab 2017;63(3): 535-41.

20. Chen FJ, Lauderdale TL, Ho M, Lo HJ. The roles of mutations in gyrA, parC, and ompK35 in fluoroquinolone resistance in Klebsiella pneumoniae. Microb Drug Resist. 2003;9(3):265-71.

21. Deguchi T, Fukuoka A, Yasuda M, Nakano M, Ozeki S, Kanematsu E, et al. Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother 1997;41(3):699-701.

MUTATIONS IN *PARC* SUBUNIT OF TOPOISOMERASE IV IN CIPROFLOXACIN RESISTANT ISOLATES OF *KLEBSIELLA PNEUMONIA* IN GUILAN PROVINCE

Kobra Ahmadpour Bijargah[[6]](#footnote-6), Mohammad Faezi Ghasemi[[7]](#footnote-7)\*, Najmeh Ranji[[8]](#footnote-8)

Received: 10 Feb, 2017; Accepted: 29 Apr, 2017

**Abstract**

***Background & Aims***: *Klebsiella Pneumonia* is a common cause of nosocomial infections including urinary tract, respiratory and wound infections. Several fluoroquinolones resistance mechanisms have been proposed, such as mutations in the topoisomerase IV subunits (*ParC* and *ParE*). The aim of this study was to investigate *parC* mutations in ciprofloxacin resistant isolates of *Klebsiella Pneumonia* from Guilan province.

***Materials & Methods*:** In this study, forty strains of *Klebsiella Pneumonia* were isolated from several Rasht and Lahijan hospitals and laboratories then were identified by biochemical tests. Antimicrobial susceptibility to ciprofloxacin, imipenem, [amikacin](https://www.google.com/search?q=amikacin&spell=1&sa=X&ved=0ahUKEwjYsPmoyJTUAhVGOJoKHTRDCs0QBQgkKAA), cefixime, cefotaxime, [cephalexin](https://www.google.com/search?biw=1517&bih=681&q=cephalexin&spell=1&sa=X&ved=0ahUKEwjP1trN0pTUAhWRJ1AKHf1_BMQQBQggKAA), gentamicin, and nalidixic acid was determined by Kirby-Bauer disk diffusion and MIC methods. Then PCR-sequencing was performed to assess *parC* mutations in ciprofloxacin resistant isolates.

***Results*:** 15% of isolates were resistant to all eight antibiotics. Thirteen isolates (32.5%) were ciprofloxacin resistance. The most antibiotic resistance percentage was found for [Cephalexin](https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682733.html) (70%) and the lowest resistance percentage was identified for [Gentamicin](https://en.wikipedia.org/wiki/Gentamicin) (17.5%). Sequencing analysis showed that three ciprofloxacin resistant isolates had missense mutations L38F and/or E84K in *parC* gene.

***Conclusion***: In Guilan province, it seems that *parC* mutations plays role in developing ciprofloxacin resistance in *Klebsiella Pneumonia* through change in ciprofloxacin affinity to topoisomerase IV.

***Keyword***: Ciprofloxacin resistance, *Klebsiella Pneumonia*, Missense mutations, *parC,* Sequencing

***Address***: Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

***Tel***: +989113314187

***Email***: faezi@liau.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2017: 28(3): 230 ISSN: 1027-3727

1. دانشجوي کارشناس ارشد، ميکروبيولوژي، گروه زيست شناسي، دانشکده علوم، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامي، رشت، ايران [↑](#footnote-ref-1)
2. دانشيار، ميکروبيولوژي، گروه ميکروبيولوژي دانشکده علوم، واحد لاهيجان، دانشگاه آزاد اسلامي، لاهيجان، ايران [↑](#footnote-ref-2)
3. استاديار، ژنتيک مولکولي، گروه زيست شناسي دانشکده علوم، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامي، رشت، ايران [↑](#footnote-ref-3)
4. Clinical and Laboratory Standard institute [↑](#footnote-ref-4)
5. Minimal inhibitory concentration [↑](#footnote-ref-5)
6. *MSc Student, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran* [↑](#footnote-ref-6)
7. *Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran (Corresponding Author)* [↑](#footnote-ref-7)
8. *Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran* [↑](#footnote-ref-8)