Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 16, No. 2, Summer 2016, Pages 116-123

Effect of QRDR Mutations on Ciprofloxacin Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Nouri R[1,3,5], Ahangarzadeh Rezaee M*[1,2,3], Hasani A[1,3], Aghazadeh M[3], Asgharzadeh M[4], Ghojazadeh M[6]

1. Infectious and Tropical Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
2. Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
3. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
4. Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
5. Student Research Committee, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
6. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

**** Corresponding author:*** Tel/Fax: +98 41 33364661 E-mail: rezaee@tbzmed.ac.ir

Received: Dec 20, 2015 Accepted: Feb 28, 2016

ABSTRACT

Background & objectives*:* Fluoroquinolones have important role in treatment of *P. aeruginosa* infections. The main mechanism of fluoroquinolones resistance in *P. aeruginosa* is mutations in the quinolone-resistance-determining region (QRDR) of *gyrA* and *parC* genes. The aim of this study was to investigate the role of these mutations in ciprofloxacin resistance in different clinical isolates of *P. aeruginosa*.

Methods: A total of 75 clinical *P. aeruginosa* isolates were collected from different university-affiliated hospitals in Tabriz. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of ciprofloxacin were evaluated by Etest assay. DNA sequences of the QRDR of *gyrA* and *parC* were determined by dideoxy chain termination method.

Results: From 75 isolates, 77.33% were resistant to ciprofloxacin. No amino acid changes were detected in *gyrA* or *parC* genes of the ciprofloxacin susceptible isolates. Thr-83→Ile substitution in *gyrA* was observed in all ciprofloxacin resistant isolates. About 90% of them had Ser-87→Leu substitution in *parC*. Geometric mean MICs of ciprofloxacin were different for various clinical isolates of *P. aeruginosa* which had the same situation in type and location of *gyrA* and *parC* mutations. Moreover, the geometric mean MIC in isolates from urine was significantly ($p<0.05$) higher than isolates from tracheal aspirates.

Conclusion: Mutations in *gyrA* and *parC* genes are the major mechanisms for ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *P. aeruginosa*. Moreover, the role of different effective factors in fluoroquinolone resistance can be different in various clinical isolates of *P. aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Fluoroquinolone; Antibiotic Resistance; QRDR.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-15]

تأثیر وجود جهش در ناحیه QRDR بر میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا

رقیه نوری [۱و۳و۵]، محمد آهنگرزاده رضایی [۱و۲و۳*]، آلکا حسنی [۱و۳]، محمد آقازاده [۳]، محمد اصغرزاده [٤]، مرتضی قوجازاده [۶]

۱. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران ۲. مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران ۳. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران ٤. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران ۵. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران ۶. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول. تلفاکس: ۰٤۱ ۳۳۳۶٤۶۶۱ پست الکترونیک: rezaee@tbzmed.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: فلوروکینولون‌ها نقش مهمی در درمان عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا بر عهده دارند. بنظر می‌رسد مهمترین مکانیسم مقاومت به فلوروکینولون‌ها جهش در ناحیه QRDR ژن های *gyrA* و *parC* باشد. هدف از این مطالعه بررسی نقش جهش های مذکور بر میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد.

روش کار: تعداد ۷۵ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا از مراکز آموزشی درمانی شهر تبریز جمع آوری شد. از روش رقیق سازی در آگار برای تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC) سیپروفلوکساسین استفاده شد. توالی ناحیه تعیین‌کننده مقاومت به کینولون ها (QRDR) در ژن های *gyrA* و *parC* با استفاده از روش Dideoxy Chain Termination Method تعیین گردید.

یافته ها: از ۷۵ ایزوله ۷۳/۳۳٪ به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. در ایزوله های حساس به سیپروفلوکساسین هیچ جهشی در QRDR ژن های *gyrA* و *parC* وجود نداشت. تغییر اسید آمینه Thr-83 → Ile در تمام ایزوله های مقاوم به سیپروفلوکساسین مشاهده شد. ۹۰/۹٪ از ایزوله های مقاوم در ژن *parC* نیز تغییر اسید آمینه Ser-87 → Leu را داشتند. میانگین MIC سیپروفلوکساسین در ایزوله های نمونه های مختلف بالینی که از نظر نوع و موقعیت جهش در دو ژن *gyrA* و *parC* شرایط یکسانی داشتند متفاوت بود و این میانگین در ایزوله های ادراری به صورت معنی‌داری ($p<0/05$) بیشتر از ایزوله های لوله تراشه بود.

نتیجه گیری: در ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا جهش در ژن های *gyrA* و *parC* مهم ترین نقش را در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین بر عهده دارد، با اینحال تأثیر عوامل مؤثر بر میزان این مقاومت در ایزوله های مختلف می‌تواند متفاوت باشد.

واژه های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، فلوروکینولون، مقاومت آنتی بیوتیکی، QRDR، جهش

دریافت: ۹٤/۹/۲۸ **پذیرش:** ۹٤/۱۲/۹

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باسیل گرم منفی، هوازی، غیرتخمیرکننده و کم نیاز برای رشد است [۱]. این باکتری به دلیل سازگاری خوب با شرایط مختلف محیطی می‌تواند در جامعه و محیط بیمارستان حضور داشته باشد [۲]. سودوموناس آئروژینوزا به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت ذاتی داشته و در عین حال می‌تواند مقاومت به انواع مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌ها

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-15]

نظیر بتالاکتام‌ها، فلوروکینولون‌ها، تتراسایکلین‌ها، کلرامفنیکل و اریترومایسین را کسب نماید [۳]، بنابراین درمان عفونت‌های این باکتری به سختی امکان پذیر است [٤]. فلوروکینولون‌ها آنتی بیوتیک‌های وسیع‌الطیفی هستند که تاثیر بسیار خوبی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارند و برای درمان طیف وسیعی از عفونت‌ها از قبیل عفونت‌های پوستی، تنفسی و ادراری به کار می‌روند [۵]. سیپروفلوکساسین فعال‌ترین فلوروکینولون بر علیه سودوموناس آئروژینوزا بوده [۶] و در شرایط آزمایشگاهی و بدن انسان تأثیر خوبی بر این باکتری دارد [۷]. از این رو به طور گسترده جهت درمان عفونت‌های حاد و مزمن سودوموناس آئروژینوزا به کار می‌رود [۸]. فلوروکینولون‌ها مانع عملکرد آنزیم‌های DNA gyrase و topoisomerase IV می‌شوند که در رونویسی و تکثیر DNA نقش دارند [۹]. DNA gyrase ساختار هترومری داشته و از دو زیر واحد A و B تشکیل شده که توسط ژن‌های *gyrA* و *gyrB* کد می‌شوند. آنزیم توپوایزومراز topoisomerase IV نیز هومولوگ DNA gyrase است که زیرواحدهای C و E این آنزیم توسط ژن‌های *parC* و *parE* ساخته می‌شوند [۱۰]. مهمترین مکانیسم‌های مقاومت به فلوروکینولون‌ها جهش در ژن‌های کدکننده DNA gyrase (*gyrA*)، توپوایزومراز IV (*parC*) و جهش در ژن‌های تنظیم‌کننده پمپ‌های افلاکس می‌باشد [۱۱] بر اساس مطالعات ژنتیکی، بیوشیمیایی و اپیدمیولوژیک، آنزیم DNA gyrase اولین هدف و topoisomeras IV بعنوان دومین هدف فلوروکینولون‌ها می‌باشند [۱۲]. جهش در ناحیه تعیین‌کننده مقاومت به کینولون‌ها (QRDR) در ژن *gyrA* عامل اصلی مقاومت به فلوروکینولون‌ها در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا است [۱۵،۱۳] و بیشترین میزان مقاومت در سویه‌هایی دیده می‌شود که در QRDR ژن‌های *gyrA* و *parC* دچار جهش شده‌اند. البته جهش در ژن‌های *gyrB* و *parE* نیز با فرکانس پایین‌تری رخ می‌دهد اما این جهش‌ها نقش اصلی را در مقاومت ایفا نمی‌کنند [۲]. با جستجو در بانک‌های اطلاعات پزشکی معتبر به نظر می‌رسد تاکنون مقایسه‌ای در رابطه با نقش جهش‌های ژن‌های کدکننده آنزیم‌های DNA gyrase و topoisomerase IV بر میزان مقاومت به فلوروکینولون‌ها در ایزوله‌های مختلف بالینی سودوموناس آئروژینوزا در ایران صورت نگرفته است ولی مطالعات محدودی که در سایر نقاط جهان انجام گرفته نشان می‌دهد که در سویه‌های جدا شده از بیماران سیستیک فیبروزیس، جهش در ژن‌های *gyrA* و *parC* نسبت به سویه‌های سایر نمونه‌های بالینی نقش کمتری در ایجاد مقاومت به فلوروکینولون‌ها بر عهده دارد [۱۱،۱۶]. ولی به نظر می‌رسد نقش این جهش‌ها بر میزان مقاومت به فلوروکینولون‌ها در سویه‌های جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی از قبیل زخم، ادرار، لوله تراشه و خون بررسی نشده است. هدف از این مطالعه بررسی جهش‌های ژن‌های *gyrA* و *parC* در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا و همچنین مقایسه تاثیر این جهش‌ها بر میزان MIC سیپروفلوکساسین در ایزوله‌های نمونه‌های مختلف بالینی می‌باشد.

روش کار

در یک مطالعه توصیفی از آذرماه ۱۳۹۲ لغایت شهریورماه ۱۳۹۳ تعداد ۷۵ ایزوله بالینی و غیرتکراری سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های بالینی مختلف از جمله ادرار (۲۰ ایزوله، ۲۶/۶۶٪)، زخم (۱۸ ایزوله، ۲٤٪)، ترشحات لوله تراشه (۱۷ ایزوله، ۲۲/۶۶٪)، خون (۱۰ ایزوله، ۱۳/۳۳٪) و سایر نمونه‌ها به صورت تصادفی از بیماران مراجعه کننده به مراکز آموزشی- درمانی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (کودکان، امام رضا، شهید مدنی و سینا) جمع‌آوری شد. برای تعیین حجم نمونه بر اساس فرمول آماری ($N=Z^2 \times P \times q / d^2$) و اطلاعات اولیه

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-15]

شامل درصد مقاومت سودوموناس آئروژینوزا به سیپروفلوکساسین در منطقه که از نتایج مطالعات انجام یافته قبلی در تبریز بدست آمد و با در نظرگرفتن سطح اطمینان ۹۵٪ و خطای قابل قبول ۱۰٪، حجم نمونه مورد نیاز برای مطالعه حاضر ۷۵ ایزوله برآورد شد. تمام سویه‌های ایزوله شده بر اساس ویژگی‌های ظاهری مانند مورفولوژی و بوی کلنی، رنگ‌آمیزی گرم، تولید پیگمان، نتیجه تست‌های کلیگلر آیرون آگار و سیمون سیترات، تست مثبت اکسیداز و کاتالاز، تست OF و توانایی رشد در ۴۲ درجه سانتیگراد به عنوان سودوموناس آئروژینوزا تعیین هویت شدند [۱۷].

پس از تأیید هویت، میزان MIC سیپروفلوکساسین (محدوده ۰/۲۵ تا ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر) (Sigma-Aldrich) ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از روش رقیق سازی در آگار تعیین گردید. باکتری سودوموناس آئروژینوزای ATCC 27853 به عنوان سویه استاندارد جهت کنترل کیفی تست‌ها مورد استفاده قرار گرفت و برای تفسیر نتایج از جدول استاندارد CLSI (Document M100-S23) استفاده شد [۱۸]. نمونه DNA ایزوله‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA (Yekta Tajhiz Azma, Iran) و بر اساس دستورالعمل کارخانه سازنده استخراج گردید. واکنش PCR برای تکثیر قطعات 287 bp و 267 bp از ناحیه تعیین کننده مقاومت کینولون‌ها که به ترتیب مربوط به ژن‌های *gyrA* و *parC* بودند، طراحی و انجام گرفت. برای این منظور از سکانس‌های الیگونوکلئوتیدی زیر به عنوان پرایمر استفاده شد [۹].

gyrA F: 5’ GTG TGC TTT ATG CCA TGA G 3’
gyrA R: 5’ GGT TTC CTT TTC CAG GTC 3’
parC F: 5’ CAT CGT CTA CGC CAT GAG 3’
parC R: 5’ AGC AGC ACC TCG GAA TAG 3’

واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ µl شامل ۰/۵ pmol از هر پرایمر (CinnaGen, Iran)، ۱ X بافر Pfu (Yekta Tajhiz Azma, Iran) DNA polymerase، ۱/۵ mM از $MgCl_2$، ۰/۲ mM از مخلوط dNTP (CinnaGen, Iran)، ۱ U از آنزیم Pfu DNA polymerase (Yekta Tajhiz Azma, Iran) و ng ۱۰۰-۱۰ از DNA الگو بود.

برنامه‌ریزی دستگاه ترموسایکلر برای هر دو ژن *gyrA* و *parC* به شرح زیر می‌باشد: Denaturation اولیه ۹۴ درجه به مدت ۶ دقیقه، سیکل اصلی با ۳۵ بار تکرار شامل Denaturation در ۹۴ درجه به مدت ۵۰ ثانیه، Annealing در ۵۳ درجه به مدت ۵۰ ثانیه، Extension در ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و Extension انتهایی در ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه.

محصولات PCR بعد از خالص سازی با استفاده از کیت Accu Prep purification (Bioneer Co., Korea) با روش dideoxy chain termination و با استفاده از سیستم 3730/3730xl Biosystems DNA analyzers sequencing (ABI) تعیین توالی شدند (Takapouzist, Iran) نتایج بدست آمده از این بررسی با توالی ژن‌های *gyrA* (Gene ID: 882800) و *parC* (Gene ID: 879741) مربوطه در سویه وحشی PAO1 (NC_002516.2) موجود در بانک ژنی (www.ncbi.nlm.nih.gov) و با استفاده از نرم افزار Chromas 2.4.3 مورد مقایسه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌های به دست آمده از مطالعه حاضر با استفاده از نرم افزار SPSS-18 و روش‌های آماری توصیفی (تعیین فراوانی- درصد) از جمله آزمون کای اسکوئر مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌ها

از مجموع ۷۵ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا ۵۵ (۷۳/۳۳٪) ایزوله مقاوم و ۲۰ ایزوله (۲۶/۶۷٪)

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-15]

حساس به سیپروفلوکساسین بودند. نتیجه تعیین توالی نشان داد که در سویه‌های حساس به سیپروفلوکساسین هیچ جهشی در ناحیه QRDR ژن *gyrA* وجود ندارد. جهش در کدون ۸۳ ژن *gyrA* (Thr-83 → Ile) در تمام ۵۵ (۱۰۰٪) ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین مشاهده شد. علاوه بر این در کدون ۸۷ ژن*parC* (Ser-87 → Leu) نیز در ۵۰ (۹۰/۹٪) ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین جهش تأیید شد. همانند ژن *gyrA* در ژن *parC* هم هیچ تغییر اسید آمینه‌ای در ایزوله‌های حساس به سیپروفلوکساسین مشاهده نشد. در ۹۰/۹٪ از ایزوله‌های مقاوم، به طور همزمان در دو ژن *gyrA* و *parC* جهش شناسایی شد (ژن *gyrA* تغییر در Thr-83 → Ile و ژن *parC* تغییر در Ser-87 → Leu). میزان و میانگین هندسی MIC سیپروفلوکساسین در ایزوله‌های ۱۲ نمونه ادرار، ۱۵ نمونه زخم، ۱۵ نمونه لوله تراشه و ۸ نمونه خون که از لحاظ تعداد و موقعیت جهش در دو ژن *gyrA* (Thr-83 → Ile) و *parC* (Ser-87 → Leu) شرایط یکسانی داشتند که در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. مقادیر کمترین غلظت مهارکننده (MIC) سیپروفلوکساسین در ایزوله های سودوموناس به تفکیک نوع نمونه بالینی

میانگین MIC سیپروفلوکساسین	تعداد ایزوله ها با میزان MIC سیپروفلوکساسین (µg/ml)					تعداد ایزوله ها	نوع نمونه بالینی
	۲۵۶	۱۲۸	۶۴	۳۲	۱۶		
۴۸/۵	-	۱	۸	۵	۱	۱۵	زخم
۳۵	-	۱	۵	٤	۵	۱۵	لوله تراشه
۶۰/٤	۱	۳	۳	٤	۱	۱۲	ادرار
٤۹/۳۵	-	-	۶	۱	۱	۸	خون

بر این اساس میانگین MIC سیپروفلوکساسین در ایزوله‌های سودوموناس جدا شده از ادرار، خون، زخم و لوله تراشه به ترتیب ۶۰/٤، ٤۹/۳۵، ۴۸/۵ و ۳۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود. ارزیابی آماری این نتایج نشان داد که میانگین MIC سیپروفلوکساسین در ایزوله‌های ادرار به صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بیشتر از ایزوله‌های لوله تراشه است. با این حال اختلاف معنی‌داری با ایزوله‌های جدا شده از سایر نمونه‌ها مشاهده نشد.

بحث

فلوروکینولون‌ها آنتی‌بیوتیک‌های باکتریسیدال و وسیع‌الطیفی هستند که کاربرد قابل توجهی در درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا داشته و در اغلب کشورها تنها آنتی‌بیوتیک‌های خوراکی در دسترس برای درمان عفونت‌های این باکتری محسوب می‌شوند [۱۱]. با این حال موارد متعددی از مقاومت ایزوله‌های سودوموناس به این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش می‌گردد. مهمترین مکانیسم مقاومت باکتری‌ها به فلوروکینولون‌ها، ایجاد جهش در ژن‌های کدکننده آنزیم DNA gyrase (*gyrA*) و توپوایزومراز IV (*parC*) می‌باشد [۱۰]. نتیجه تعیین توالی ناحیه QRDR ژن *gyrA* در تحقیق حاضر نشان داد که تمام ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین (۱۰۰٪) در کدون ۸۳ دچار جهش شده‌اند که این جهش باعث تغییر اسید آمینه ترئونین به ایزولوسین (Thr-83 → Ile) می‌شود. با تبدیل اسیدآمینه قطبی ترئونین به اسید آمینه غیرقطبی و شدیداً هیدروفوبیک ایزولوسین ساختار آنزیم DNA gyrase تغییر می‌یابد و در نتیجه تمایل آنزیم برای واکنش با آنتی‌بیوتیک کاهش یافته و نهایتاً منجر به مقاومت دارویی می‌شود [۱۳]. قابل توجه است که در سویه‌های حساس به سیپروفلوکساسین هیچ تغییر اسیدآمینه‌ای در ناحیه مذکور ژن *gyrA* مشاهده نشد. بر اساس مطالعه‌ای که توحیدپور و همکاران در سال ۲۰۱٤ در ایران انجام دادند این تغییر اسید آمینه

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-15]

در تمام ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین گزارش گردید [۱۳]. همچنین لی[1] و همکاران در ۹۸٪ [۱٤]، مون[2] و همکاران در ۹۰٪ [۱۵] و رایان[3] و همکاران در ۸۱/۸۱٪ ایزوله‌های مقاوم چنین جهش و تغییری را اعلام کرده‌اند [۱۹]. علاوه بر پژوهش‌های مذکور، در سایر تحقیقات انجام یافته نیز این جهش به عنوان مهم ترین عامل مقاومت به فلوروکینولون‌ها در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا معرفی شده است [۹،۱۵،۲۰].

از سوی دیگر بررسی توالی QRDR ژن *parC* در باکتری‌های بررسی شده نشان داد که ۹۰/۹٪ ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین دچار جهش در کدون ۸۷ شده‌اند. این جهش نیز موجب تغییر اسیدآمینه سرین به لوسین (Ser-87 → Leu) می‌گردد. با این حال در ایزوله‌های حساس به سیپروفلوکساسین هیچ تغییری در اسید آمینه مذکور مشاهده نشد. در مطالعه لی و همکاران ۳۶/۸٪ ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین در ژن *parC* دچار جهش بودند که در ۳۵/۹۲٪ آنها اسید آمینه سرین به لوسین تبدیل شده بود [۱٤]. در بررسی دیگری که در ژاپن صورت گرفته است ۵۹/۳۳٪ سویه‌های با کاهش حساسیت به سیپروفلوکساسین در ژن *parC* جهش داشتند که اغلب آنها در کدون ۸۷ بود [۱۰]. با این حال در مطالعات جلال[4] در دانمارک [۱۱]، گرگانی[5] در آمریکا [۹] و توحیدپور در ایران [۱۳] هیچ تغییر اسید آمینه‌ای در ژن *parC* گزارش نشده است.

در تحقیق حاضر میانگین MIC سیپروفلوکساسین در ایزوله‌های ادرار نسبت به ایزوله‌های لوله تراشه (با شرایط جهش یکسان در دو ژن *gyrA* و *parC*) بیشتر بود ($p<0/05$). با توجه به نتایج مطالعات مختلف، جهش در ژن‌های تنظیم‌کننده پمپ‌های افلاکس MexAB-OprM [۲۱،۲۲]، MexXY-OprM [۲۳]، MexEF-OprN [۲] و MexCD-OprJ [۲٤] پس از جهش در ژن‌های *gyrA* و *parC* به عنوان مهمترین عامل مقاومت به فلوروکینولون‌ها معرفی شده‌اند [۱۰،۲٤،۲۵،۲۶] به طوری که جهش‌های هم زمان ژن‌های تنظیم‌کننده این پمپ‌ها و ژن‌های *gyrA* و *parC* منجر به مقاومت با میزان MIC بالا به فلوروکینولون‌ها می‌شوند [۲۵،۲۷]. با این حال سایر عوامل از جمله جهش در زیر واحدهای دوم آنزیم‌های DNA gyrase و topoisomerase IV (*gyrB* و *parE*) نقش اساسی در ایجاد مقاومت بر عهده ندارند. بنابراین با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می‌رسد پمپ‌های افلاکس در ایزوله‌های ادراری سودوموناس سهم بیشتری در ایجاد مقاومت به فلوروکینولون‌ها بر عهده داشته‌اند.

اختلاف میانگین MIC سیپروفلوکساسین سایر ایزوله‌های نمونه‌های بالینی (با شرایط جهش یکسان در دو ژن *gyrA* و *parC*) از نظر آماری معنی‌دار نبود. با این وجود اختلاف موجود، ممکن است بیانگر این موضوع باشد که نقش فاکتورهای مختلف در ایجاد مقاومت به فلوروکینولون‌ها در ایزوله‌های بدست آمده از نمونه‌های مختلف بالینی متفاوت است. در تأیید این فرضیه، نتیجه تحقیق جلال و همکاران نیز نشان داده بود که در سویه‌های جداشده از بیماران سیستیک فیبروزیس نسبت به ایزوله‌های سایر نمونه‌های بالینی، پمپ‌های افلاکس نقش بیشتری در ایجاد مقاومت به فلوروکینولون‌ها بر عهده داشتند [۱۱]. با مطالعه روی نمونه‌های بالینی بیشتر و همچنین بررسی سایر عوامل مؤثر در ایجاد مقاومت به فلوروکینولون‌ها بویژه جهش در ژن‌های تنظیم‌کننده پمپ‌های افلاکس می‌توان سهم هرکدام از این فاکتورها را در میزان مقاومت به طور دقیق مشخص کرد.

[1] Lee
[2] Moune
[3] Rayan
[4] Jalal
[5] Gorgani

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-15]

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا، جهش در ژن‌های *gyrA* و *parC* مهمترین نقش را در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین بر عهده دارند. از طرفی نقش عوامل مؤثر در مقاومت به فلوروکینولون‌ها در ایزوله‌های مختلف بالینی می‌تواند متفاوت باشد، زیرا ایزوله‌های بدست آمده از نمونه‌های مختلف با جهش یکسان در ژن‌های *gyrA* و *parC* با مقادیر MIC متفاوت به سیپروفلوکساسین مقاومت نشان دادند.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر حاصل بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول می‌باشد که با حمایت مالی مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز (شماره طرح ۰۲-۹۳) اجرا شده است. ضمناً از راهنمایی‌های جناب آقای دکتر حسین صمدی کفیل برای تحلیل نتایج تعیین توالی، همکاری کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی مراکز آموزشی درمانی تبریز به ویژه سرکار خانم رسولی و جناب آقای کامران در جمع‌آوری ایزوله‌ها و جناب آقای احد بازمانی که در مراحل مختلف تحقیق ما را یاری نمودند، صمیمانه سپاسگزاری و قدردانی می‌گردد.

References

1- Rossolini G, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect. 2005 Jul;11 Suppl 4:17-32.
2- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms, Clin Microbiol Rev. 2009 Oct;22(4):582-610.
3- Li Y, Mima T, Komori Y, Morita Y, Kuroda T, Mizushima T, et al. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW–OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*, J Antimicrob Chemother. 2003 Oct;52(4):572-5.
4- Lim KT, Yasin RM, Yeo CC, Puthucheary SD, Balan G, Maning N, et al. Genetic fingerprinting and antimicrobial susceptibility profiles of *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates in Malaysia. J Microbiol Immunol Infect. 2009 Jun;42(3):197-209.
5- Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Sep;44(9):2233-41.
6- Wangd D, Sun TY, Hu YJ. Contributions of efflux pumps to high level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. Chin Med J. 2007 Jan;120(1):68-70.
7- Robillard NJ, Scarpa AL. Genetic and physiological characterization of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Antimicrob Agents Chemother. 1988 Apr;32(4):535-9.
8- Llanes C, Köhler T, Patry I, Dehecq B, Van Delden C, Plésiat P. Role of the efflux system MexEF-OprN in low level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Dec;55(12):5676-84.
9- Gorgani N, Ahlbrand S, Patterson A, Pourmand N. Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginos*a. Int J Antimicrob Agents. 2009 Nov;34(5):414-8.
10- Hooper DC. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. Clin Infect Dis. 2000 Aug;31 Suppl 2:S24-8.
11- Jalal S, Ciofu O, Høiby N, Gotoh N, Wretlind B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Mar;44(3):710-2.
12- Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Aug;45(8):2263-8.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-15]

13- Tohidpour A, Peerayeh SN, 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):1-7.
14- Lee JK, Lee YS, Park YK, Kim BS. Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents. 2005 Apr;25(4):290-5.
15- Mouneimné H, Robert J, Jarlier V, Cambau E. Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Jan;43(1):62-6.
16- Wong A, Kassen R. Parallel evolution and local differentiation inquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology. 2011 Apr;157(4):937-944.
17- Mahon CR, Leman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology. 3th ed. Ohio; Saunders-Elsevier; 2007. p. 564-85.
18- Clinical and Laboratory Standards Institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Document M100-S23. CLSI. Wayne, PA, USA, 2013.
19- 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. 2012 Jul;19(1):77-81.
20- Yonezawa M, Takahata M, Matsubara N, Watanabe Y, Narita H. DNA gyrase gyrA mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1995 Sep;39(9):1970-2.
21- Lambert P. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, J R Soc Med. 2002 Nov;95 Suppl 41:22-26.
22- Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Sep;44(9):2233-41.
23- Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plesiat P, Pechere J, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. J Antimicrob Chemother. 2003 Apr;51(5):1055-1065.
24- Higgins P, Fluit A, Milatovic D, Verhoef J, Schmitz F-J. Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents. 2003 May;21(5):409-13.
25- Jalal S, Wretlind B. Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Microb Drug Resist. 2009 Jan;4(4):257-61.
26- Adabi M, Talebi-Taher M, Arbabi L, Afshar M, Fathizadeh S, Minaeian S, et al. Spread of efflux pump overexpressing-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by using an efflux pump inhibitor. Infect Chemother. 2015 Jun;47(2):98-104.
27- Kobayashi H, Isozaki M, Fukuda T, Anzai Y, Kato F. Surveillance of fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Open J Med Microbiol. 2013 Jun;3(2):144-50.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-15]