مقاله پژوهشی

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی موتاسیون در ژن‌های gyrA و parC در سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری

دکتر جمشید فقری*، راضیه دهبانی پور**، سینا مباشری زاده***، نفیسه ملکی**

دریافت: ۹۴/۹/۲۳ پذیرش: ۹۵/۲/۲۱

چکیده:

مقدمه و هدف: فلوروکینولون‌ها یکی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج در شروع درمان تجربی عفونت ادراری می‌باشند اما به علت ایجاد جهش در ژن‌های gyrA و parC که کد کننده‌ی آنزیم‌های هدف فلوروکینولون‌ها هستند مقاومت چشمگیری نسبت به این عوامل ضد میکروبی به دست آورده‌اند. این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی جهش‌های رخ داده در ژن‌های gyrA و parC اشریشیاکلی‌های عامل عفونت ادراری انجام گردید.

روش کار: مطالعه حاضر در سال ۱۳۹۲ بر روی ۱۳۵ نمونه از عفونت ادراری در آزمایشگاه بیمارستان الزهرا (س) اصفهان انجام گرفت. شناسایی باکتری بر اساس روش‌های میکروب‌شناسی و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش Kirby bauer انجام شد. سپس DNA ایزوله‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها با روش جوشاندن استخراج گردید و واکنش PCR و تعیین توالی جهت ردیابی جهش‌های رخ داده در ژن‌های gyrA و parC انجام شد.

نتایج: از مجموع ۱۳۵ ایزوله اشریشیاکلی مورد آزمایش، ۶۱ ایزوله (٤٥٪) مقاوم به فلوروکینولون‌ها بوده و همگی واجد ژن‌های gyrA و parC بودند. نتایج تعیین توالی ۱۳ ایزوله مقاوم به فلوروکینولون‌ها نشان داد که همه ایزوله‌ها دارای حداقل یک جهش در ژن‌های مذکور هستند. در سایر ایزوله‌ها جهش در ژن gyrA به صورت Ser83Leu و Asp87Asn مشاهده شد و جهش در ژن parC نیز به شکل GLy78Ser و Ser80Ile و Ser80VaL و Ser80Arg و GLu84VaL مشاهده شد.

نتیجه نهایی: نتایج به‌دست‌آمده از توالی‌یابی ژن‌های gyrA و parC در این بررسی نشان دهنده بروز جهش‌هایی بود که باعث ایجاد مقاومت بالا نسبت به فلوروکینولون‌ها می‌گردند. برای غلبه بر این مشکل، باید تجویز بی‌رویه محدود گردد و تجویز آنتی‌بیوتیک بر اساس الگوهای حساسیت میکروارگانیسم صورت گیرد.

کلید واژه ها: اشریشیاکلی/ ژن ها / عفونت دستگاه ادراری / فلوروکینولون

مقدمه:

عفونت دستگاه ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریال در سراسر جهان است که سالانه ۱۵۰ میلیون نفر به این عفونت مبتلا شده و منجر به بیش از ۶ بیلیون دلار هزینه درمان می‌شود. تخمین زده می‌شود که ۵۰-۴۰ درصد زنان حداقل یک بار در طول عمر خود به عفونت دستگاه ادراری مبتلا شده باشند (۱،۲). بر اساس مطالعات، اشریشیاکلی‌های یوروپاتوژنیک شایع‌ترین عامل عفونت‌های دستگاه ادراری می باشند (۴-۲). اشریشیاکلی‌های یوروپاتوژنیک دارای فاکتورهای بیماریزایی متعددی از قبیل ادهسین‌های فیمبریال، ادهسین افیمبریال، توکسین‌ها، سیدروفورها و پلی-ساکاریدهای کپسولی می باشند که به کلونیزاسیون باکتری و ایجاد عفونت در مجرای ادراری کمک

* دانشیار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

** کارشناسی ارشد میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (dp.razieh@gmail.com)

*** دانشجوی دوره دکتری میکروب شناسی، مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

می کنند (۲،۵،۶). ژن این فاکتورهای بیماریزایی بر روی مناطقی واقع در کروموزوم به نام «جزایر بیماریزایی» مستقر شده‌اند (۷). به علت افزایش چشمگیر مقاومت چند دارویی در میان پاتوژن‌های گرم منفی، فلوروکینولون‌ها اغلب به عنوان درمان تجربی بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی و غیر بیمارستانی تجویز می‌شدند (۸). 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 (۱۱-۹). سیپروفلوکساسین خوراکی یا وریدی به خاطر جذب سریع و ترشح مناسب به داخل ادرار بیشترین کاربرد را جهت درمان عفونت ادراری دارد (۱۲،۱۳). این ترکیبات اثرات ضد باکتریال خود را از طریق اثر بازدارندگی بر آنزیم های توپوایزومراز مشخص به نام DNA ژیراز (توپوایزومرازII) و توپوایزومرازIV که به ترتیب توسط ژن‌های gyrB/gyrA و parE/parC کد می‌گردند اعمال می‌کنند. این دو آنزیم پروتئین‌های هتروتترامریک هستند که از دو زیر واحد A وB ساخته شده‌اند (۱۴). از آنجا که این آنزیم‌ها نقش اساسی در رونویسی DNA، جداسازی کروموزوم و به هم فشردگی DNA دارند برای حیات سلولی بسیار ضروری هستند. آنزیم های مورد هدف معمولا در نواحی نزدیک به جایگاه فعال آنزیم تغییر می‌کنند و در بعضی موارد تمایل به اتصال دارو را کاهش می‌دهند (۱۴). یک ناحیه کوچک در N-ترمینال پروتئین gyrA از آمینواسید ۶۷ تا ۱۰۶ در Escherichia coli باعث ایجاد مقاومت نسبت به داروها می‌شود. این ناحیه اصطلاحا ناحیه تعیین کننده مقاومت به کینولون (Quinolone Resistance Determining Region) نامیده می شود. رایج‌ترین تغییرات در نوکلئوتید ۲۴۸ و ۲۶۰ رخ می‌دهد که منجر به تغییر آمینواسید Ser-83 و Asp-87 می‌شود. چنین ناحیه‌ای در ژن *parC* نیز شناسایی شده است و چنین به نظر می رسد که ناحیه N-ترمینال در پروتئین *gyrA* و *parC* به یکدیگر شباهت زیادی داشته باشند. تغییر در نوکلئوتید ۲۳۸ و ۲۵۰ که منجر به تغییر آمینواسید Ser-80 و Glu-84 در ژن *parC* می شود نیز متداول‌ترین جهش‌ها در اشریشیاکلی است (۱۵). با این حال افزایش روزافزون استفاده از فلوروکینولون‌ها موجب افزایش مقاومت نسبت به کینولون‌ها در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی شده است (۱۰،۱۴).

از این رو در این مطالعه سعی بر آن شده است تا از طریق انجام تست‌های آنتی بیوگرام الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی اشریشیاکلی‌های مولد عفونت ادراری مشخص شده و با استفاده از روش‌های مولکولی جهش‌های موجود در ژن‌های gyrA و parC در اشریشیاکلی‌های مقاوم به فلوروکنیولون‌ها تعیین گردد .

روش کار:

مطالعه حاضر از نوع مقطعی ـ توصیفی بوده و به مدت ۱۰ ماه در اصفهان به طول انجامید. در این مطالعه ۱۳۵ نمونه اشریشیاکلی جدا شده از عفونت‌های ادراری متعلق به بیماران سرپایی و بستری در بخش‌های مختلف مرکز آموزشی درمانی الزهراء اصفهان در سال ۱۳۹۲ جمع آوری و مورد آزمایش قرار گرفتند. جهت کشت نمونه‌های ادراری از محیط‌های بلاد آگار و ائوزین‌متیلن‌بلو استفاده گردید. نمونه‌های کشت داده شده به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد اینکوبه شدند. سویه‌های اشریشیاکلی بر اساس روش‌های میکروبیولوژیک از جمله رنگ آمیزی گرم و انجام تست‌های بیوشیمیایی تخمیر گلوکز، لاکتوز، تولد گاز، تولید اندول از تریپتوفان، واکنش ووگس پروسکوئر بر روی محیط های تریپل شوگر آیرون آگار، Sulfide Indol Motility و متیل رد- وژوسپروسکار تشخیص داده شده و تایید گردید.

به منظور تعیین الگوی مقاومت دارویی اشریشیاکلی-های جدا شده از طریق دیسک ـ دیفوژن (به روش Kirby-bauer)، تست آنتی بیوگرام انجام گردید. در این آزمایش از دیسک‌های آنتی بیوتیکی مختلف (ساخت شرکت MAST انگلستان) به شرح زیر استفاده شد: سیپروفلوکساسین (۵ µg)، کوتریموکسازول (۲۳/۷۵ µg/ ۱/۲۵)، جنتامایسین (۱۰ µg)، آمیکاسین (۳۰ µg)، سفتازیدیم (۳۰ µg)، نالیدیکسیک‌اسید (۳۰ µg)، نیتروفورانتوئین (۳۰۰ µg)، نورفلوکساسین (۱۰ µg)، اوفلوکساسین (۵ µg)، سفالوتین (۳۰ µg)، سفوتاکسیم (۳۰ µg)، آمپی‌سیلین (۱۰ µg)، سفوکسیتین (۳۰ µg)، مروپنم (۱۰ µg)، سفپیم (۳۰ µg). پس از انکوباسیون، با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی و مقایسه آن‌ها با جداول استاندارد، حساسیت یا مقاومت هر ایزوله نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مشخص گردید.

استخراج DNA: در این مطالعه برای استخراج ژن‌های

gyrA و parC از ایزوله‌های اشریشیاکلی از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد (۱۶). برای این کار به کمک یک آنس استریل کلنی تک از کشت ۲۴ ساعته اشریشیاکلی در محیط مولر هینتون آگار برداشته و در یک میکروتیوب استریل ۱/۵ میلی‌لیتر حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیرشده حل گردید. سپس میکروتیوب حاوی نمونه به مدت ۱۰ دقیقه داخل آب در حال جوش قرار گرفت. در ادامه کار نمونه با دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. لایه رویی حاصل از سانتریفیوژ به‌عنوان محلول حاوی DNA خام باکتری جداسازی شد.

انجام Polymerase chain reaction (PCR) و تعیین توالی DNA:

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

جدول ۱: توالی پرایمرهای PCR

پرایمر	توالی	PCR Product Size (bp)
Topoisomerase IV	parC-F 5′- TTCAGCGCCGCATTGTGTAT -3′ parC-R 5′-GTTATGCGGTGGAATATCGGTC-3′	395
Topoisomerase II	gyrA-F 5′-TTACACCGGTCAACATTGAGG -3′ gyrA-R 5′- GACGACCGTTAATGATTGCC -3′	647

پرایمرهای مورد نظر ابتدا توسط نرم افزار Gene Runner طراحی و سپس از طریق پایگاه اطلاعاتی NCBI تأیید و Blast شد و پس از آن توسط شرکت ژن‌فن‌آوران برای ساخت به شرکت Macrogene کره ارسال گردید .این پرایمرها با غلظت 100pmol ساخته شدند و برای انجام PCR غلظت pmol 10 از آن‌ها تهیه شد به این ترتیب که مقدار ۹۰ میکرولیتر آب با ۱۰میکرولیتر از پرایمر مخلوط شدند.

فرآیند PCR در دستگاه ترموسایکلراپندورف شامل ۵ دقیقه ۹۵ درجه سانتیگراد، به دنبال آن ۳۰ سیکل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه در ۵۵ و ۵۸ درجه سانتیگراد مرحله Annealing (به ترتیب برای ژن‌های gyrA و parC) و ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام گرفت. برای بررسی محصولات PCR از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۲درصد و رنگ‌آمیزی DNA با رنگ اتیدیوم برماید استفاده شد. ژل‌ها با استفاده از دستگاه Gel-Documentation (شرکت سازنده؛ Major Science) مورد بررسی قرار گرفتند.

محصول PCR حاصل از ۱۳ ایزوله مقاوم به فلوروکینولون‌ها (سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین، اوفلوکساسین) که دارای باند باکیفیت و مناسب برای توالی‌یابی بودند به اندازه ۵۰ میکرولیتر برای تعیین توالی توسط شرکت ماکروژن کره ارسال شد. سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC25922 به عنوان سویه کنترل برای فرآیند PCR و توالی‌یابی مورد استفاده قرار گرفت.

قطر منطقه عدم رشد در اطراف دیسک‌ها برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری و با استفاده از جدول CLSI میزان حساسیت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش گردید. از اشریشیاکلی سویه ATCC25922 به‌عنوان سویه کنترل استفاده گردید. اطلاعات به‌دست‌آمده در این مرحله با استفاده از نرم‌افزار Whonet5.6 مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت.

تفسیر نتایج حاصله از توالی‌یابی با نرم افزار MEGA4 و Chromas و پایگاه اطلاعاتی NCBT انجام گرفت. به این منظور از توالی نوکلئوتیدی استاندارد ژن‌های gyrA و parC گرفته شده از بانک اطلاعات ژنی با شماره‌ی FN554766.1 و CP003034.1 استفاده شد.

نتایج:

از میان ۱۳۵ نمونه مطالعه شده، ۶۷ درصد (۹۱ نمونه) ایزوله‌های اشریشیاکلی متعلق به بیماران سرپایی و ۳۲/۵ درصد (۴۴ نمونه) نیز متعلق به بیماران بستری بودند (جدول ۲).

جدول ۲: فراوانی ایزوله‌ها برحسب جنس و در دو گروه بستری و غیربستری

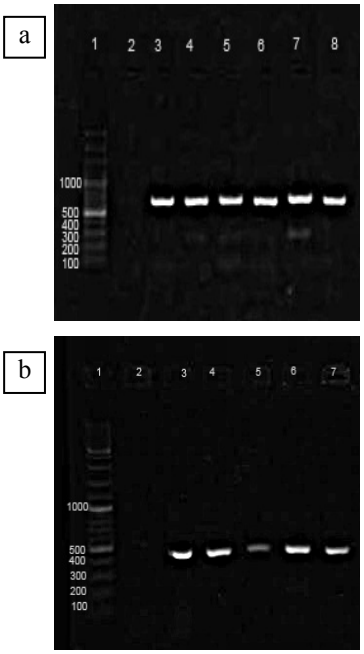
	تعداد ایزوله‌ها	بیماران سرپایی	بیماران بستری
مونث	۹۲	۶۸	۲۴
مذکر	۴۳	۲۳	۲۰
مجموع	۱۳۵	۹۱	۴۴

بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، آنتی-بیوتیک مروپنم، سفوتاکسیم، آمیکاسین، نیتروفورانتوئین و جنتاماسین بهترین فعالیت را در برابر سویه‌های اشریشیاکلی نشان دادند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های مورد مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده است. در حالی که آمپی‌سیلین کمترین فعالیت را نسبت به ایزوله‌های اشریشیاکلی نشان داد هیچ گونه مقاومتی نسبت به مروپنم مشاهده نشد.

جدول۳: مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های اشریشیاکلی

	حساس(٪)	نیمه حساس(٪)	مقاوم(٪)
نالیدیکسیک اسید	۳۷/۵	۱/۱	۶۱/۴
آمیکاسین	۸۹/۱	۸/۷	۲/۲
آمپی سیلین	۱۰/۵	۵/۳	۸۴/۲
سفالوتین	۴۸/۸	۲/۴	۴۸/۸
سفپیم	۵۱	۴/۱	۴۴/۹
سفوتاکسیم	۵۰	۲/۶	۴۷/۴
سفوکسیتین	۹۴/۱	۰	۵/۹
سفتازیدیم	۴۰	۴	۵۶
سیپروفلوکساسین	۵۳/۳	۱/۵	۴۵/۲
جنتامایسین	۸۲/۴	۱/۲	۱۶/۵
مروپنم	۹۱/۵	۸/۵	۰
نیتروفورانتوئین	۸۵/۹	۵/۹	۸/۱
نورفلوکساسین	۵۴/۸	۰	۴۵/۲
اوفلوکساسین	۵۴/۱	۰/۷	۴۵/۲
کوتریموکسازول	۳۸/۸	۰	۶۱/۲

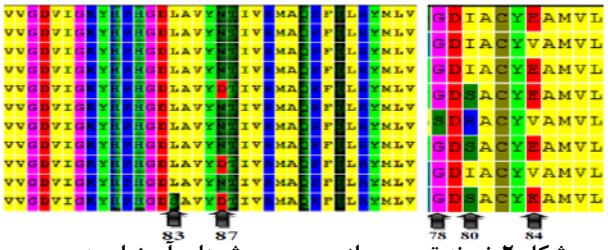
در این مطالعه مقاومت بالایی نسبت به فلوروکینولون‌ها مشاهده شد. میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و اوفلوکساسین مساوی و برابر با ۴۵/۲ درصد بود. از میان ۱۳۵ ایزوله مورد بررسی، ۶۱ ایزوله مقاوم به فلوروکینولون‌ها بودند. پس از انجام الکتروفورز بر روی محصولات PCR ایزوله‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها، همه نمونه‌ها واجد ژن‌های gyrA و parC ارزیابی شدند (شکل ۱).



شکل۱: a) نتایج الکتروفورز محصول PCR برای ژن *gyrA* b) نتایج الکتروفورز محصول PCR برای ژن *parC* ۱)سایز مارکر 100bp DNA Ladder ۲)کنترل منفی ۳)کنترل مثبت ۴-۸) سویه های اشریشیا کلی مورد آزمایش

در ناحیه مقاومت به کینولون در ژن gyrA دو موتاسیون در کدون های ۸۳ و ۸۷ به صورت Ser83Leu و Asp87Asn مشاهده شد. از میان ۱۳ نمونه بررسی شده، ۱۱ نمونه دارای هر دو جهش ذکر شده بودند و ۲ نمونه تنها یک جهش (Ser83Leu) در ژن gyrA را نشان دادند.

همچنین ۵ موتاسیون مختلف در ۳ کدون ژن parC به صورت Glu84Val ، Ser80Arg ، Ser80Ile ، Gly78Ser شناسایی شد. البته در ۳ ایزوله اشریشیاکلی هیچ موتاسیونی در ژن *parC* مشاهده نشد (شکل۲، جدول۴).



شکل ۲: نمونه تصویری از بررسی جهش‌های آمینواسیدی به کمک نرم‌افزار MEGA4

جدول ۴: جهش‌های مشاهده شده در ژن‌های gyrA و parC در ۱۳ ایزوله اشریشیاکلی مقاوم به فلوروکینولون‌ها

Mutation	*gyrA*					*parC*						
Isolate	۸۳ Ser	۸۴ Ala	۸۵ Val	۸۶ Tyr	۸۷ Asp	۷۸ Gly	۷۹ Asp	۸۰ Ser	۸۱ Ala	۸۲ Cys	۸۳ Tyr	۸۴ Glu
E-1	Leu	.....	.....	.....	Asn	.....	.....	Ile	.....	.....	.....	.....
E-2	Leu	.....	.....	.....	Asn	.....	.....	Ile	.....	.....	.....	.....
E-3	Leu	.....	.....	.....	Asn	.....	.....	Ile	.....	.....	.....	Val
E-4	Leu	.....	.....	.....	Asn	.....	.....	Ile	.....	.....	.....	.....
E-5	Leu	.....	.....	.....	Asn	.....	.....	Val	.....	.....	.....	Val
E-6	Leu	.....	.....	.....	Asn	.....	.....	Ile	.....	.....	.....	.....
E-7	Leu	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E-8	Leu	.....	.....	.....	Asn	Ser	.....	Arg	.....	.....	.....	Val
E-9	Leu	.....	.....	.....	Asn	.....	.....	Ile	.....	.....	.....	.....
E-10	Leu	.....	.....	.....	Asn	.....	.....	Ile	.....	.....	.....	.....
E-11	Leu	.....	.....	.....	Asn	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E-12	Leu	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E-13	Leu	.....	.....	.....	Asn	.....	.....	Ile	.....	.....	.....	Val
E-14	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

E-14: سویه کنترل مثبت (*Escherichia coli* ATCC25922)

بحث:

عفونت دستگاه ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی در سراسر جهان است. زنان دارای خطر بالایی برای گسترش عفونت‌های ادراری هستند. در این مطالعه از میان ۱۳۵ ایزوله اشریشیاکلی جداشده از نمونه‌های بالینی در بیمارستان الزهراء (س) اصفهان ۹۲ مورد (۶۸٪) مربوط به خانم‌ها و ۴۳ مورد (۳۲٪) مربوط به آقایان بود. در مطالعه فرج نیا و همکاران ۷۶/۵٪ نمونه‌های کشت مثبت اشریشیاکلی مربوط به خانم‌ها بود. در مطالعه

ملاعباس زاده، شریف و همکاران شیوع عفونت ادراری ناشی از اشریشیاکلی در زنان به ترتیب ۵۳/۲۳٪ و ۷۵/۴٪ گزارش شد (۱۷،۱۸). به دلیل کوتاه‌تر بودن پیشاب‌راه زنان نسبت به مردان و نزدیکی آن به مقعد، دسترسی میکروارگانیسم‌ها به مثانه آسان‌تر بوده و امکان بروز عفونت ادراری در زنان بیشتر است.

علت اصلی مقاومت نسبت به فلوکینولون‌ها بروز جهش در ژن gyrA می باشد. توپوایزومرازIV هدف دوم و کم اهمیت‌تر فلوروکینولون‌ها در ایزوله‌های اشریشیاکلی می باشد. با این وجود، بروز جهش در ژن parC با کاهش حساسیت نسبت به کینولون‌ها در ارتباط است. موتاسیونهای شناسایی شده در ناحیه تعیین کننده مقاومت به کینولون در ژن‌های gyrA و parC جدول ۴ قابل مشاهده است. دو نمونه اشریشیاکلی که تنها یک جهش در ژن gyrA دارند به نالیدیکسیک اسید مقاوم و به فلوروکینولون‌ها حساس هستند. ۱۱ ایزوله دیگر جهش‌های متفاوت و متعددی را در ژن gyrA و parC نشان دادند و همگی نسبت به فلوروکینولون‌ها مقاوم بودند که این یافته‌ها ضرورت بروز جهش‌های متعدد را برای ایجاد سطح بالای مقاومت نسبت به فلوروکینولون‌ها تائید می‌کند (۸،۱۹،۲۰). جهش در ژن‌های gyrA و parC موجب مقاومت در سایر باکتری‌ها نیز می‌شود. در مطالعه فاضلی و همکاران جهش ژن gyrA در جدایه‌های بالینی اسینتوباکتر بامانی مقاوم به کینولون مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه مقاومت به سیپروفلوکساسین ۱۰۰٪ گزارش شد و همه نمونه‌ها دارای جهش در کدون ۸۳ ژن gyrA (Ser 83 Leu) بودند. Azmi و همکاران در مطالعه خود که به بررسی مکانیسم مقاومت به فلوروکینولون در شیگلا فلکسنری می‌پرداخت جهش‌هایی را در کدون های ۸۳، ۸۷، ۲۱۱ ژن gyrA و کدون ۸۰ ژن parC گزارش کردند. بر طبق گزارش Ya Meng و همکاران در چین جهش‌های ایجاد شده در ژن‌های gyrA و parC موجب مقاومت به فلوروکینولون‌ها در ایزوله‌های مایکوپلاسما هومینیس شده است (۲۳-۲۱).

در مطالعه حاضر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی (با تاکید بر فلوروکینولون‌ها) ایزوله‌های اشریشیاکلی جمع آوری شده از بیمارستان الزهرا (س) اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. به طور معمول درمان تجربی بیماران مبتلا به عفونت ادراری با استفاده از آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف به ویژه سیپروفلوکساسین آغاز می شود. بر اساس نوع و نحوه مصرف آنتی‌بیوتیک در هر کشور تفاوت قابل توجهی در میزان مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی در اشریشیاکلی‌های عامل عفونت ادراری مشاهده می شود. نتایج حاصل از این مطالعه نیز مانند سایر مطالعات انجام شده در نقاط مختلف ایران و اروپا حاکی از میزان بالای مقاومت نسبت به فلوروکینولون‌ها بود (۲۸-۲۴، ۶). منصوری جمشیدی و همکاران که در مطالعه خود در سال ۱۳۹۰ اشریشیاکلی‌های مولد عفونت ادراری در بیمارستان امام خمینی ایلام و میلاد تهران را مورد بررسی قرار داده بودند مقاومت به سیپروفلوکساسین را به ترتیب ۴۶٪ و ۴۰٪ گزارش کردند. در مطالعه عبدالهی خیرآبادی و همکاران در فسا در سال ۱۳۹۰ مقاومت به سیپروفلوکساسین ۲۲/۷٪ گزارش شد. مهدوی و همکاران در مطالعه خود در تبریز مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و اوفلوکساسین را به ترتیب ۳۳٪، ۳۴٪، ۳۰٪ گزارش کردند (۳۱-۲۹). از آنجا که فلوروکینولون‌ها آنتی‌بیوتیک ارجح در درمان عفونت‌های ادراری در ایران می‌باشند، مقاومت روز افزون نسبت به این عوامل باعث ایجاد نگرانی‌هایی در انتخاب درمان مناسب این عفونت شده است.

نتیجه نهایی :

از طریق انجام مطالعات مولکولی بیشتر بر روی مقاومت نسبت به فلوروکینولون‌ها، استراتژی‌های درمانی جدیدی پدید خواهد آمد. پیشنهاد می شود به دلیل تغییر مداوم الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی، به طور سالیانه حساسیت باکتریایی در میان جمعیت‌های بررسی و درمان تجربی مناسب انتخاب شود.

سپاسگزاری :

این مقاله منتج از پایان نامه کارشناسی ارشد میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می باشد. بدینوسیله از زحمات کارکنان بیمارستان الزهرا (س) صمیمانه تشکر می گردد. ضمناً نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تضاد نمی باشد.

References

1. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpoor Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, et al. Uropathogenic Escherichia coli in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2013;12(8):1-8.
2. Kucheria R, Dasgupta P, Sacks S, Khan M, Sheerin N. Urinary tract infections: new insights into a common problem. Postgraduate Med J 2005;81(952):83.
3. De Francesco MA, Ravizzola G, Peroni L, Negrini R, Manca N. Urinary tract infections in Brescia, Italy: etiology of uropathogens and antimicrobial resistance of common uropathogens. Med Sci Monitor Basic Res 2007; 13(6): BR136-BR44.
4. Laupland K, Ross T, Pitout J, Church D, Gregson D. Community-onset urinary tract infections: a population-based assessment. Infection 2007; 35(3):150-3.
5. Tiba MR, Yano T, Leite DdS. Genotypic characterization of virulence factors in Escherichia coli strains from patients with cystitis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 2008;50(5):255-60.
6. Asadi S, Kargar M, Solhjoo K, Najafi A, Ghorbani-Dalini S. The association of virulence determinants of uropathogenic esch-erichia coli with antibiotic resistance. Jundishpur Microbial 2014; 7(5): e9936.
7. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli. Exp Mol Pathol 2008; 85(1): 11-9.
8. Minarini LA, Darini ALC. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of gyrA and parC in Enterobacteriaceae isolates from Brazil. Brazilian J Microbiol 2012; 43(4): 1309-14.
9. Oliphant CM, Green GM. Quinolones: a comprehensive review. Am Fam Phys 2002; 65(3) :455-64.
10. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. Clin Infect Dis 2005;41(Suppl 2): S120-S6.
11. Emmerson A, Jones A. The quinolones: decades of development and use. J Antimicrobial Chemother 2003;51(suppl 1):13-20.
12. King DE, Malone R, Lilley SH. New classification and update on the quinolone antibiotics. Am Fam Phys 2000;61(9):2741-8.
13. Drago L, De Vecchi E, Mombelli B, Nicola L, Valli M, Gismondo M. Activity of levofloxacin and ciprofloxacin against urinary pathogens. J Antimicrobial Chemother 2001;48(1):37-45.
14. Sosa AdJ, Byarugaba DK, Amabile-14.Cuevas CF, Hsueh P-R, Kariuki S, Okeke IN. Antimicrobial resistance in developing countries: Springer; 2010.
15. Bansal S, Tandon V. Contribution of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes to ciprofloxacin resistance in Escherichia coli clinical isolates. Int J Antimicrobial Agents 2011;37(3):253-5.
16. 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.
17. Farajnia S, Alikhani MY, Ghotaslou R, Naghili B, Nakhlband A. Causative agents and antimicrobial susceptibilities of urinary tract infections in the northwest of Iran. Int J Infect Dis 2009;13(2):140-4.
18. Molaabaszadeh H, Hajisheikhzadeh B, Mollazadeh M, Eslami K, Mohammadzadeh Gheshlaghi N. Study of sensibility and antimicrobial resistance in Escherichia coli isolated from urinary tract infection in Tabriz city. J Fasa Univ Med Sci 2013;3(2):149-54. (persian)
19. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J Antimicrobial Chemother 2003;51(5):1109-17.
20. Chenia HY, Pillay B, Pillay D. Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens. J Antimicrobial Chemother 2006;58(6):1274-8.
21. Fazeli H VB, Khorvash F, Shoaei P, Kariminik A, Yaran M, Ataei B, Khaleghi M, Motalebi T. Identification of mutation in gyrA gene obtained from quinoloneresistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii. J Microbial World 2014; 7(2):109-17.
22. Azmi IJ, Khajanchi BK, Akter F, Hasan TN, Shahnaij M, Akter M, et al. Fluoroquinolone resistance mechanisms of Shigella flexneri isolated in Bangladesh. PloS one. 2014; 9(7): e102533.
23. Dong-Ya M, Chang-Jian S, Jing-Bo Y, Jun M, Wen-Cheng X. Molecular mechanism of fluoroquinolones resistance in Mycoplasma hominis clinical isolates. Brazilian J Microbiol 2014;45(1):239-42.
24. Mohammad-Jafari H, Saffar MJ, Nemate I, Khalilian HSA-R. Increasing antibiotic resistance among uropathogens isolated during years 2006-2009: impact on the empirical management. Int Braz J Urol 2012;38(1):25-32.
25. Farshad S, Ranjbar R, Japoni A, Hosseini M, Anvarinejad M, Mohammadzadegan R. Microbial susceptibility, virulence factors, and plasmid profiles of uropathogenic Escherichia coli strains isolated from children in Jahrom, Iran. Arch Iranian Med 2012;15(5):312-6.
26. Madani SH, Khazaee S, Kanani M, Shahi M. Antibiotic resistance pattern of E. coli isolated from urine culture in Imam Reza Hospital Kermanshah-2006. J Kermanshah Univ Med Sci 2008;12(3): 74-76. (Persian)

27. Ghorashi Z, Ghorashi S, Soltani-Ahari H, Nezami N. Demographic features and antibiotic resistance among children hospitalized for urinary tract infection in northwest Iran. Infect Drug Resistance 2011;4:171.
28. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC, 2013.
29. Abdollahi Kheirabadi S, Najafipour S, Kafilzadeh F, Abdollahi A, Jafari S, et al. Evaluation of Drug Resistance Pattern of Escherichia coli Strains Isolated from Fasa Vali-e-Asr Hospital Patients. J Fasa Univ Med Sci 2013;2(4):273-8. (Persian)
30. Mansouri Jamshidi N PI, Tabaraei B, Hadadi A. Evaluating the Frequency of Ciprofloxacin Resistance Qnr Genes in Escherichia Coli Strains Isolated From Clinical Samples of Imam Khomani and Milad Hospitals in Ilam and Tehran, Iran. Scientific J Ilam Univ Med Sci 2013;21(6):16-22. (Persian)
31. Mahdavi A, Nahayi Mr, Akhi Mt, Nahayi M, Akbari M. Resistance pattern of E. coli strains isolated from urinary tract infections in patients admitted to intensive care unit and outpatient to Fluoroquinolones. Med J Tabriz Univ Med Sci Health Serv 2010;31(3):91-6. (Persian)

Original Article

Study of Antibiotic Resistance Pattern and Mutation in Genes gyrA and parC of Escherichia Coli Causing Urinary Tract Infection

J. Faghri, Ph.D.[*]; R. Dehbanipour, M.Sc.[**]; S. Mobasherizadeh, M.Sc.[***]
N. Maleki, M.Sc.[**]

Received: 14.12.2015 Accepted: 10.5.2016

Abstract

Introduction & Objective: Fluoroquinolones are essential antimicrobial agents used to treat UTIs. Clinical experiences have shown a high rate of antibiotic resistance among uropathogens. These resistance are usually the consequence of mutations involving genes encoding gyrA and parC. The aim of this study was to determine antimicrobial resistance pattern and the presence of mutations in regions that code for quinolone resistance in the genes gyrA and parC in clinical isolates of E. coli from a hospital in Isfahan, Iran.

Materials & Methods: A total of 135 isolates of E.coli (from urine) were collected from September to February 2013 from Alzahra Hospital (Isfahan, Iran). Bacterial susceptibility to antimicrobial agents was determined using disk diffusion method. PCR was performed to detect genes gyrA and parC. Then, 13 isolates were randomly chosen for genetic characterization of the quinolone-determining region (QRDR) of the parC and gyrA genes.

Results: Among 135 E. coli isolates, 61 isolates (45 %) were resistant to fluoroquinolones. From 13 isolates, 11 isolates showed two mutations (Ser83Leu/ Asp87Asn) and 2 isolates showed a single mutation (Ser83Leu) in gyrA gene. Also, five different mutations were detected in parC gene in the E. coli isolates, encoding Ser80Ile, Ser80Val, Ser80Arg, Glu84Val, Gly78Ser.

Conclusion: More research on the molecular basis of FQ resistance is required to develop new therapeutic strategies for FQ-resistant E. coli. To overcome antibiotic resistance antibiotic therapy should be limited and based on the susceptibility patterns of microorganisms.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2016; 23 (2):118-125)

Keywords: Esherichial coli / Fluorouinolone / Genes / Urinary Tract Infection

---

* Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine
Isfahan University of Medical Sciences & Health Services, Isfahan, Iran.
** M.Sc. in Microbiology, School of Medicine
Isfahan University of Medical Sciences & Health Services, Isfahan, Iran. (dp.razieh@gmail.com)
*** Ph.D. Student in Microbiology, Hospital Infections Research Center
Isfahan University of Medical Sciences & Health Services, Isfahan, Iran.