



بررسی جهش در ژن *gyrA* جدایه های بالینی *اسیتوباکتر بامانی* مقاوم به کینولون

حسین فاضلی^۱، بهاره وکیلی^{۲*}، فرزین خوروش^۳، پریسا شعاعی^۴، اشرف کریمی نیک^۵، مجید یاران^۶، بهروز عطایی^۷، موج خالقی^۸، طاهره مطلبی^۹

^۱ استادیار، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، ^۲ کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات کرمان، گروه میکروب شناسی، ^۳ دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات عفونت های بیمارستانی، ^۴ دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات عفونت های بیمارستانی، ^۵ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات کرمان، گروه میکروب شناسی، ^۶ کارشناس، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، ^۷ دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، ^۸ استادیار، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، ^۹ کارشناس ارشد، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: *اسیتوباکتر بامانی* یکی از علل مهم عفونت های بیمارستانی در سراسر دنیا است. سویه های *اسیتوباکتر* مقاوم به آنتی بیوتیک ها باعث محدودیت هایی در درمان موثر می شوند. این مطالعه با هدف بررسی جهش در ژن *gyrA* جدایه های بالینی *اسیتوباکتر بامانی* مقاوم به کینولون و ارزیابی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی آن ها در اصفهان انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی-توصیفی، ۷۰ جدایه *اسیتوباکتر* از بیماران بستری در ICU بیمارستان الزهرا اصفهان جمع آوری گردید. به منظور شناسایی بیشتر جدایه ها از تست های بیوشیمیایی استاندارد استفاده شد. حساسیت آنتی بیوتیکی با روش انتشار دیسک برای ۸ آنتی بیوتیک انجام گرفت. حداقل غلظت باز دارندگی (MIC) سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین با روش E-test برای جدایه ها مطابق با استاندارد CLSI تعیین شد. همچنین به منظور شناسایی جهش در ژن *gyrA* در جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین از روش PCR-RFLP استفاده گردید.

یافته ها: جدایه ها بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی را نسبت به سیپروفلوکساسین (۱۰۰٪)، جنتامایسین (۱۰۰٪) و کمترین میزان را نسبت به ایمپنم (۹۲/۸٪) و مروپنم (۹۰٪) نشان دادند. در روش MIC میزان مقاومت جدایه ها به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین ۱۰۰٪ و ۶۵/۷٪ بود. میزان مقاومت چند دارویی ۶۶/۷٪ درصد و فراوانی جهش ژن *gyrA* در جدایه ها ۹۳٪ بود. **نتیجه گیری:** در این مطالعه مشاهده شد که جدایه های *اسیتوباکتر بامانی* مقاوم به کینولون دارای جهش در ژن *gyrA* بودند. این جهش نقش مهمی در افزایش مقاومت در جدایه ها دارد. تشخیص سریع جدایه های *اسیتوباکتر بامانی* مقاوم به کینولون می تواند کمک مناسبی برای درمان این عفونت ها باشد.

واژگان کلیدی: *اسیتوباکتر بامانی*، ژن *gyrA*، کینولون.

پذیرش برای چاپ: دی ماه ۹۲

دریافت مقاله: مهر ماه ۹۲

مقدمه

شناخته شده اند (۱ و ۲). در بیست سال گذشته این میکروارگانیسم به عنوان یک پاتوژن مهم فرصت طلب در عفونت های بیمارستانی مطرح بوده اند (۳ و ۴). گونه های مختلف *اسیتوباکتر* (*Acinetobacter*) به ویژه *اسیتوباکتر بامانی* می توانند عفونت ادراری، پنومونی، زخم های عفونی و مننژیت ایجاد کنند (۵). بیشتر عفونت های *اسیتوباکتر بامانی* از

اسیتوباکتر بامانی (*Acinetobacter baumannii*)، باسیل های گرم منفی، هوازی، غیرتخمیری، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت هستند که به عنوان یک عامل بیماری زای مهم بیمارستانی

(*) آدرس برای مکاتبه: اصفهان، خیابان خرم، چهار راه شهیدان، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری. تلفن: ۰۹۱۲۵۴۴۸۶۴۶ پست الکترونیک: bahareh.vakili@yahoo.com

باعث مهار فرآیند رونویسی می گردد (۴، ۱۵ و ۱۶). آنزیم DNA گیراز دارای دو زیر واحد *gyrA* و *gyrB* است که ژن کد کننده آن ها در ناحیه ای به نام Quinolone Resistance determining regions (QRDR) وجود دارد. به طور معمول جهش کروموزومی تنها با یک جانشینی Leu به Ser 83 در ژن *gyrA* باعث مقاومت بالا به کینولون ها می شود (۴، ۵ و ۱۶). علاوه بر باکتری *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*)، مطالعات قبلی نشان داده است که جهش در ژن مورد بررسی نقش مهمی در ایجاد مقاومت در اسپیتوباکتر بامانی ایفا می نماید (۱۷). هدف از این مطالعه بررسی فراوانی جهش ژن *gyrA* در جدایه های بالینی اسپیتوباکتر بامانی مقاوم به کینولون و ارزیابی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی آن ها در اصفهان بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه گیری، کشت و جدا سازی جدایه ها: این مطالعه به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۷۰ جدایه باکتریایی به دست آمده از بیماران بستری شده در بخش مراقبت های ویژه (ICU) بیمارستان الزهرا اصفهان در سال ۹۱-۱۳۹۰ انجام شد. جدایه های اسپیتوباکتر شامل ۲۸ نمونه تنفسی، ۲۳ نمونه ادراری، ۱۴ نمونه خون و ۵ نمونه مایع مغزی نخاعی بودند. نمونه ها بر روی محیط های بلاد آگار و مک کانکی آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C و ۴۴ °C قرار گرفتند.

به کمک تست های کاتالاز، اکسیداز، تست TSI و رنگ آمیزی گرم سویه ها در حد جنس (اسپیتوباکتر) شناخته شدند. سپس به منظور شناسایی دقیقتر در حد گونه (اسپیتوباکتر بامانی) از آزمون های بیوشیمیایی استاندارد مانند OF، گلوکز، هیدرولیز اسکولین، احیای نیتрат و سیترات استفاده گردید (۱۸).

ب) تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی: برای این منظور از روش انتشار دیسک مطابق با دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI 2012) استفاده شد. میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین (۳۰ µg)، سفنازیدیم (۳۰ µg)، سفپیم (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg)،

بخش مراقبت های ویژه (ICU)، سوختگی و جراحی گزارش می شود که ریشه کن کردن آن به دلیل ماندگاری زیاد آن در محیط بیمارستان کاری دشوار است (۴ و ۶). بیماری های سخت، افزایش زمان بستری شدن در بیمارستان و درمان با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف از جمله عوامل بروز آلودگی به این باکتری می باشند (۴). از سال ۱۹۹۷ تا ۲۰۰۰ فراوانی اسپیتوباکتر و مقاومت آنتی بیوتیکی آن روند افزایشی داشته است (۷). از سال ۲۰۰۰ به بعد این باکتری به بیشتر آنتی بیوتیک های رایج مانند سفالوسپورین ها، کینولون ها و آمینوگلیکوزیدها مقاوم شده است. اسپیتوباکتر پتانسیل بالایی در مقاومت آنتی بیوتیکی اکتسابی دارد. بنابراین مقاومت چند دارویی نیز در آن ها افزایش یافته است (۸).

مقاومت چند دارویی اسپیتوباکتر بامانی در بیمارستان های آمریکای شمالی، اروپا، آرژانتین، تایوان، چین، کره و ایران گزارش شده است (۹-۱۱). مصرف روز افزون آنتی بیوتیک ها به ویژه در بیماران بستری شده در بیمارستان موجب ایجاد سویه های دارای مقاومت چندگانه می گردد (۱۲ و ۱۳). در اروپا و آمریکا اسپیتوباکتر بامانی در بخش ICU به ترتیب حدود ۳٪ و ۱۰٪ عامل عفونت های ایجاد شده می باشد (۵ و ۱۴). نتایج به دست آمده در مطالعه انجام شده بر روی بیماران بستری شده در بخش مراقبت های ویژه بیمارستان امام رضا تبریز در سال ۲۰۱۳ نشان داد که فراوانی اسپیتوباکتر بامانی بین ۱/۹۴٪ تا ۱۷/۴۷٪ بوده است (۱۱).

به منظور درمان عفونت های ناشی از اسپیتوباکترها استفاده از کینولون ها ایمن تر و موثرتر از استفاده از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف مانند سفالوسپورین ها و آمینوگلیکوزیدها است، تا زمانی که مقاومت به کینولون ایجاد نشده باشد (۴ و ۶). مکانیسم های ایجاد مقاومت به کینولون ها به روش های مختلفی صورت می گیرد: ۱) جهش در آنزیم های هدف (DNA گیراز و توپوایزومراز IV، ۲) تغییراتی که در بیان پمپ های تراوشی صورت می پذیرد، ۳) حضور پلاسמיד *Qnr*.

بیشترین اثر کینولون ها بر روی آنزیم های هدف مانند DNA گیراز است که با اتصال به آن و ایجاد جهش در ژن این آنزیم

۱۰۰bp (شرکت Thermo، آمریکا) بر روی ژل آگاروز ۲٪ منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه ژل داک (شرکت Biorad، آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت.

د) واکنش *RFLP* (Restriction Fragment Length Polymorphism): در نهایت به منظور شناسایی موتاسیون در موقعیت Ser 83 ژن *gyrA* ابتدا ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR (دارای اندازه ۳۴۳ جفت باز) به همراه ۱۸ میکرولیتر آب استریل، ۳ میکرولیتر بافر آنزیم ۱۰X و ۲ میکرولیتر آنزیم محدودالانر *HinfI* (شرکت Thermo، آمریکا) به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷°C قرار گرفتند. محصول های به دست آمده از هضم آنزیمی به وسیله الکتروفورز در ژل آگاروز ۲٪ به کمک رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مشاهده و بررسی شدند. از سویه استاندارد اسپیتوباکتر بامانی ATCC17978 برای مقایسه استفاده گردید (۴).

یافته ها

الف) نتایج آزمون های بیوشیمیایی: اسپیتوباکتر در رنگ آمیزی گرم به صورت کوکوباسیل گرم منفی و در تست های بیوشیمیایی اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، نیتراژ منفی، تست TSI قلیایی و اسکولین منفی گزارش شد. توانایی رشد بر روی دو محیط کشت بلاد آگار و مک کانکی آگار در ۳۷°C و ۴۴°C داشت. بنابراین با توجه به نتایج آزمایش های بیوشیمیایی سیتراژ، احیای نیتراژ و هیدرولیز اسکولین و همچنین رشد بر روی دو محیط نام برده جدایه ها به عنوان اسپیتوباکتر بامانی تشخیص داده شدند.

ب) نتایج میزان حساسیت آنتی بیوتیکی: تمامی جدایه های باکتریایی به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. همچنین ۹۵٪ (۶۶ عدد) از جدایه ها به لووفلوکساسین مقاومت نشان دادند (جدول ۱). در مواردی که جدایه اسپیتوباکتر بامانی حداقل به سه کلاس آنتی بیوتیکی مقاومت داشتند سویه ها به عنوان Multi Drug Resistant (MDR) یا مقاومت چند دارویی شناخته شدند (۲). در ۴۷ جدایه (۶۶٪) اسپیتوباکتر بامانی مقاومت چند دارویی مشاهده گردید.

لووفلوکساسین (۵ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، ایمپی پنم (۱۰ μg) و مروپنم (۱۰ μg) (شرکت راین (ایران-مارک Mast انگلیس)) سنجیده شد.

حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum inhibitory concentration) MIC برای جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین با روش E-test (Epsilonometer test) بر اساس CLSI 2012 مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور از نوارهای شرکت Liofilchem، ایتالیا با شیب غلظت بین ۰/۰۰۲ تا ۳۲ μg/ml استفاده شد. همچنین از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27835) برای کنترل کیفیت آنتی بیوگرام و MIC استفاده گردید (۱۹).

ج) واکنش زنجیره ای پلی مراز: به منظور استخراج DNA از کلنی های مجزای ۲۴ ساعته باکتری، از کیت شرکت سیناژن، ایران استفاده شد. برای تکثیر ژن *gyrA* از پرایمرهای (*gyrA*-F (5'-AAATCTGCCCCGTGTCGTTGGT-3') و *gyrA*-R (5'-GCCATACCTACGCGCATACC-3')) استفاده شد (۴). این پرایمر جهت تکثیر ناحیه QRDR به کار می رود. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۲ میلی مول $MgCl_2$ (50mM)، ۲۰۰ میکرومول dNTPs (10mM)، ۱۵ پیکومول از هر کدام از پرایمرها، یک واحد آنزیم Taq پلی مراز (شرکت سیناژن، ایران)، DNA (0.2μg) نمونه و ۱۹/۲۵ میکرولیتر آب مقطر دی یونیزه انجام شد.

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Master cycler Gradient, Germany) با شرایط دمایی ۱۰ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در نهایت محصول PCR، در کنار نشانگر

جدول ۱: میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های اسپیتوباکتر

آنتی بیوتیک	میزان مقاومت
ایمی پنم	۹۲/۸٪
مروپنم	۹۰٪
سیپروفلوکساسین	۱۰۰٪
لووفلوکساسین	۹۵٪
جنتامایسین	۱۰۰٪
آمیکاسین	۹۷/۱٪
سفپیم	۹۵/۷٪
سفتازیدیم	۹۸/۵٪

بامانی نشان داد. همچنین فراوانی جهش ژن *gyrA* در این جدایه ها ۹۳٪ بود.

عفونت های بیمارستانی ناشی از اسپیتوباکتر بامانی در حال پیشرفت به سوی مقاومت چند دارویی است. این امر به طور معمول در ICU ها رخ می دهد و روند درمان بیماران را با مشکل مواجه می سازد (۲۰).

میزان بروز مقاومت چند دارویی در مطالعه حاضر دارای فراوانی بالای ۶۷٪ بود. بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین و جنتامایسین (۱۰۰٪) و کمترین میزان نسبت به مروپنم (۹۰٪) مشاهده شد. در مطالعه ای که دنت (Dent) و همکاران در سال ۲۰۱۰ در ایالات متحده آمریکا انجام دادند، از ۲۴۷ جدایه اسپیتوباکتر بامانی، ۷۲٪ به حداقل سه کلاس آنتی بیوتیکی مقاومت داشتند (۲).

در همان سال شنگ (Sheng) و همکاران میزان حساسیت نسبت به سیپروفلوکساسین را در ۵۴ جدایه اسپیتوباکتر بامانی و ۲۸ جدایه از سایر گونه های اسپیتوباکتر مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که اغلب جدایه های اسپیتوباکتر بامانی نسبت به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. اما سایر گونه های اسپیتوباکتر نسبت به سیپروفلوکساسین حساس بودند (۳).

در مطالعه حاضر تمامی جدایه ها از گونه اسپیتوباکتر بامانی بودند و گونه دیگری از این جنس شناسایی نگردید. جدایه های بررسی شده در مطالعه حاضر، نسبت به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین مقاوم بودند و تمامی این جدایه ها نسبت به چند آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند. این یافته با نتایج شنگ (Sheng) و همکاران مطابقت دارد.

در گزارشی که از سروش (Soroush) و همکاران در سال ۲۰۰۹ منتشر گردید، در بین ۱۴۵ جدایه اسپیتوباکتر بامانی میزان مقاومت به آمیکاسین ۵/۵٪، سفتازیدیم ۸۵/۳٪،

میزان MIC اندازه گیری شده برای آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین مطابق با تعاریف ۲۰۱۲ CLSI در نظر گرفته شد (MIC سیپرو فلوکساسین ≤ 1 حساس، $= 2$ حدواسط، ≥ 4 مقاوم) و (MIC لووفلوکساسین ≤ 2 حساس، $= 4$ حدواسط، ≥ 8 مقاوم) (جدول ۲).

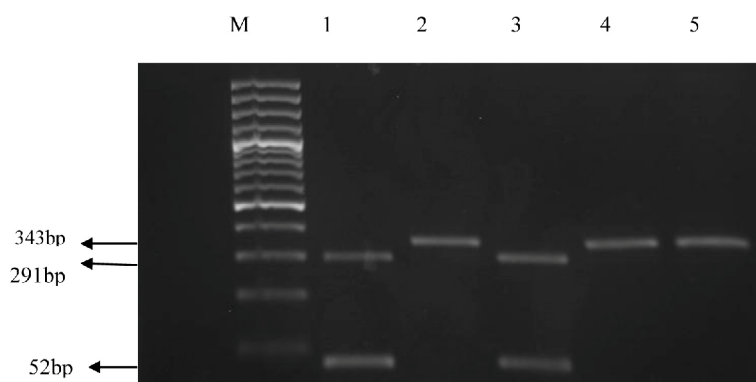
ج) نتایج آزمون PCR-RFLP: نتیجه PCR-RFLP برای اسپیتوباکترهای فاقد جهش پس از هضم آنزیمی، دو قطعه ۵۲ و ۲۹۱ جفت بازی است و در صورت دارا بودن جهش یک قطعه ۳۴۳ جفت بازی ایجاد می گردد. نتایج حاصل از PCR-RFLP نشان داد که ۹۳٪ جدایه ها دارای جهش (Ser 83) در ژن *gyrA* بودند (شکل ۱).

بحث

در این مطالعه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی جهش *gyrA* در بیماران بستری شده در بخش ICU بیمارستان الزهرا شهر اصفهان با روش فنوتیپی و PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده مقاومت بالای ۹۰٪ را به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه در جدایه های بالینی اسپیتوباکتر

جدول ۲: MIC سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین در جدایه های اسپیتوباکتر بامانی

آنتی بیوتیک	درصد (تعداد) نمونه های حساس	درصد (تعداد) نمونه های حدواسط	درصد (تعداد) نمونه های مقاوم
سیپروفلوکساسین	-	-	۱۰۰ (۷۰)٪
لووفلوکساسین	-	۳۴/۳ (۲۴)٪	۶۵/۷ (۴۶)٪



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR-RFLP اسپیتوباکتر بامانی. (M) سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون (۱) سویه استاندارد پس از هضم آنزیمی، ستون (۲) سویه استاندارد بدون اثر آنزیم، ستون (۳) نمونه مقاوم به کینولون فاقد جهش، ستون های ۴ و (۵) نمونه مقاوم به کینولون دارای جهش.

هایی هستند که برای درمان عفونت های ناشی از گونه های اسپیتوباکتر به کار می روند (۲۲). مطالعات گذشته نشان داده که جهش در DNA گیراز (ژن *gyrA*) و توپوایزومراز IV (ژن *parC*) باعث ایجاد مقاومت نسبت به کینولون ها می گردد. به طور معمول ابتدا جهش در کدون ۸۳ ژن *gyrA* رخ می دهد و باعث ایجاد مقاومت کینولون در باکتری های مختلفی مانند اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا، اسپیتوباکتر بامانی، کمپیلوباکتر ژرونی (*Campylobacter jejuni*) و استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) می شود (۴، ۱۶ و ۱۷).

لی (Lee) و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که ۹۰٪ جدایه های اسپیتوباکتر بامانی مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای جهش در ژن *gyrA* (Ser 83 Leu) هستند و وجود تنها یک جانشینی در ژن *gyrA* باعث ایجاد مقاومت شده است (۲۳). همچنین والتین (Valentine) و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که تمامی ۲۰ جدایه بالینی اسپیتوباکتر بامانی به سیپروفلوکساسین و ۱۸ جدایه به لووفلوکساسین مقاوم بودند. در مطالعه آن ها، نتایج حاصل از توالی یابی جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین نشان داد که تمامی جدایه های مقاوم دارای جهش در موقعیت Ser 83 ژن *gyrA* بودند. آنها بیان کردند که این جهش باعث ایجاد مقاومت به فلوروکینولون (مانند لووفلوکساسین) نیز می گردد (۵). یافته های ما نشان داد که ۹۳٪ جدایه های اسپیتوباکتر بامانی مقاوم به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین دارای جهش در Ser 83 ژن *gyrA* هستند. این نتیجه با یافته

سیپروفلوکساسین ۷۹/۹٪، جنتامایسین ۶۵/۷٪، ایمپنم ۵۰٪ و مروپنم ۵۳/۲٪ بود. همچنین میزان مقاومت چند دارویی ۴۰/۶٪ (۵۹ مورد) گزارش شد (۱۸). در سال ۲۰۱۰ محمدطاهری (Mohammadtaheri) و همکاران مقاومت جدایه های اسپیتوباکتر بامانی به دست آمده از بخش ICU بیمارستان مسیح دانشوری تهران را نسبت به جنتامایسین ۳۹٪، سفپیم و آمیکاسین ۹۵/۷٪، سیپروفلوکساسین، سفتازیدیم و ایمپنم هر کدام ۹۸/۸٪ گزارش نمودند. همچنین میزان مقاومت چند دارویی ۹۵/۵٪ اعلام گردید (۲۱). مقایسه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های اسپیتوباکتر بامانی در این پژوهش و مطالعات مختلف نشان می دهد که میزان بروز مقاومت آنتی بیوتیک های مورد بررسی به سرعت در حال افزایش می باشد. تفاوت در میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف در نواحی متفاوت را می توان به فاکتورهای محیطی و وجود الگوهای متنوع در به کار بردن عوامل ضد میکروبی نسبت داد.

با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر که میزان مقاومت آنتی بیوتیکی بیش از ۹۰٪ ارزیابی شده است، نمی توان آنتی بیوتیک های مروپنم یا ایمپنم را برای درمان عفونت های ناشی از اسپیتوباکتر بامانی موثر دانست. بنابراین لازم است الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در خانواده پلی میکسین ها نیز مورد بررسی قرار گیرد.

فلوروکینولون ها جزء موثرترین و کم خطرترین آنتی بیوتیک

های محققان یاد شده هماهنگی دارد. همچنین با توجه به اطلاعات موجود امکان دارد در ۷٪ باقی مانده جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین با میزان MIC برابر $32 \mu\text{g/ml}$ و $16 \mu\text{g/ml}$ که فاقد جهش در کدون مورد بررسی بودند، جهش در سایر نقاط رخ داده باشد. چیئن (Chien) و همکاران در سال ۲۰۰۹ با روش PCR-RFLP نشان دادند که از ۱۲۸ جدایه /اسیتوباکتر بامانی ۱۵ جدایه (۱۱/۷٪) دارای جانشینی Leu به Ser 83 در ژن *gyrA* بودند. آنها بیان کردند که جهش در ناحیه QRDR نقش مهم و اصلی در مقاومت به دارو به ویژه سیپروفلوکساسین ایفا نمی کند (۴). این یافته با نتایج مطالعه حاضر در تضاد است. همان طور که جهش در ژن *gyrA* در ایجاد مقاومت کینولونی نقش دارد، گزارش ها نشان می دهند که جهش در سایر ژن ها مانند *gyrB* و *parC* نیز می توانند باعث مقاومت کینولونی شوند (۲۴ و ۲۵).

نتیجه گیری

در این بررسی مشاهده شد که جدایه های /اسیتوباکتر بامانی مقاوم به کینولون دارای جهش در ژن *gyrA* بودند که نقش مهمی در افزایش مقاومت در جدایه ها دارد. روش PCR-RFLP می تواند جدایه های مقاوم به کینولون که دارای جهش در کدون ۸۳ هستند را شناسایی نماید و به عنوان یک روش غربالگری برای شناسایی به کار رود. همچنین پیشنهاد می گردد که جهش در سایر ژن ها (*parC* و ژن *gyrB*) و همچنین نقش فعالیت پمپ های تراوشی که از عوامل ثانویه در ایجاد مقاومت به کینولون ها می باشند نیز مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

ژن *gyrA* بودند. آنها بیان کردند که جهش در ناحیه QRDR نقش مهم و اصلی در مقاومت به دارو به ویژه سیپروفلوکساسین ایفا نمی کند (۴). این یافته با نتایج مطالعه حاضر در تضاد است. همان طور که جهش در ژن *gyrA* در ایجاد مقاومت کینولونی نقش دارد، گزارش ها نشان می دهند که جهش در سایر ژن ها مانند *gyrB* و *parC* نیز می توانند باعث مقاومت کینولونی شوند (۲۴ و ۲۵).

اگرچه به غیر از جهش در ژن های یاد شده، فعالیت پمپ های تراوشی نیز در کاهش تجمع دارو نقش دارند اما نتایج مطالعات قبلی حاکی از آن است که وجود جهش در ناحیه QRDR عامل مقاومت دارویی به فلوروکینولون ها و کینولون ها است (۱۵ و ۲۶).

در مجموع با در نظر گرفتن نتایج مطالعه حاضر که نشان می دهد بیش از ۹۵ درصد جدایه های بالینی /اسیتوباکتر بامانی

References

1. Hujer KM, Hujer AM, Endimiani A, Thomson JM, Adams MD, Goglin K, Rather PN, Pennella TT, Massire C, Eshoo MW, Sampath R, Blyn LB, Ecker DJ, Bonomo RA. Rapid determination of quinolone resistance in *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 2009; 47(5): 1436-1442.
2. Dent LL., Marshall DR, Pratap S, Hulette RB. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: a descriptive study in a city hospital. BMC Infect Dis. 2010; 10(1): 196.
3. Sheng WH, Lin YC, Wang JT, Chen YC, Chang SC, Hsia KC, Wu RJ, Li SY. Identification of distinct ciprofloxacin susceptibility in *Acinetobacter* spp. by detection of the *gyrA* gene mutation using real-time PCR. Mol Cell Probes. 2009; 23(3-4): 154-156.

4. Chien ST, Lin CH, Hsueh JC, Li PL, Hsu CH, Chang SH, Chien HI, Ben RY, Chang FH, Hsu LS. Mutation of *gyrA* and *parC* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and its relationship with antimicrobial drugs resistance in Taiwan. *Ann Microbial*. 2009; 59(2): 369-372.
5. Valentine SC, Contreras D, Tan S, Real LJ, Chu S, Xu HH. Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles County, California. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(8): 2499-2507.
6. Liu YH, Kuo SC, Lee YT, Chang IC, Yang SP, Chen TL, Fung CP. Amino acid substitutions of quinolone resistance determining regions in *gyrA* and *parC* associated with quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *J Microbiol Immunol Infect*. 2012; 45(2): 108-112.
7. Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003; 24(4): 284-295.
8. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, Ecker DJ, Massire C, Eshoo MW, Sampath R, Thomson JM, Rather PN, Craft DW, Fishbain JT, Ewell AJ, Jacobs MR, Paterson DL, Bonomo RA. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(12): 4114-4123.
9. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(10): 3471-3484.
10. Gootz TD, Marra A. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant threat. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008; 6(3): 309-325.
11. Aliakbarzade K, Farajnia S, Kariminik A. Prevalence of aminoglycoside resistance genes in *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Tabriz city. *J Microbial World* 2013; 6(3): 220-227. [In Persian]
12. Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Tocalli L, Gismondo MR. In vitro selection of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. by levofloxacin and ciprofloxacin alone and in combination with beta-lactams and amikacin. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56(2): 353-359.
13. Higgins PG, Stubbings W, Wisplinghoff H, Seifert H. Activity of the investigational fluoroquinolone fleroxacin against ciprofloxacin-sensitive and -resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(4): 1613-1615.
14. Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Karlowsky JA, Sahm DF, Wenzel RP. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit: a European and North American Surveillance study (2000-2002). *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2004; 3: 14.
15. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*. 2005; 41: S120-126.

16. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents*. 2005; 25(5): 358-373.
17. Friedman SM, Lu T, Drlica K. Mutation in the DNA gyrase A Gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance-determining region. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(8): 2378-2380.
18. Soroush S, Haghi-Ashtiani MT, Taheri-Kalani M, Emaneini M, Aligholi M, Sadeghifard N, Pakzad I, Abedini M, Yasemi M, Paiman H. Antimicrobial resistance of nosocomial strain of *Acinetobacter baumannii* in Children's Medical Center of Tehran: a 6-year prospective study. *Acta Med Iran*. 2010; 48(3): 178-184.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty Second International Supplement M100-S22. Cockerill FR: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
20. Mohammadtaheri Z, Pourpaki M, Mohammadi F, Namdar R, Masjedi MR. Surveillance of antimicrobial susceptibility among bacterial isolates from intensive care unit patients of a tertiary-care university hospital in Iran: 2006-2009. *Chemotherapy*. 2010; 56(6): 478-484.
21. Srinivasan VB, Rajamohan G, Pancholi P, Stevenson K, Tadesse D, Patchanee P, Marcon M, Gebreyes WA. Genetic relatedness and molecular characterization of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in central Ohio, USA. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2009; 8: 21.
22. Heinemann B, Wisplinghoff H, Edmond M, Seifert H. Comparative activities of ciprofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, gemifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and trovafloxacin against epidemiologically defined *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(8): 2211-2213.
23. Lee JK, Lee YS, Park YK, Kim BS. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Microbiol Immunol*. 2005; 49(7): 647-653.
24. Vila J, Ruiz J, Marco F, Barcelo A, Goñi P, Giralt E, Jimenez de Anta T. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38(10): 2477-2479.
25. Yamagishi J, Yoshida H, Yamayoshi M, Nakamura S. Nalidixic acid-resistant mutations of the *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*. 1986; 204(3): 367-373.
26. Chau SL, Chu YW, Houang ET. Novel resistance-nodulation-cell division efflux system AdeDE in *Acinetobacter* genomic DNA group 3. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(10): 4054-4055.



Identification of mutation in *gyrA* gene obtained from quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*

Hossein Fazeli¹, Bahareh Vakili², Farzin Khorvash³, Parisa Shoaee⁴, Ashraf Kariminik⁵, Majid Yaran⁶, Behrooz Ataei⁷, Moj Khaleghi⁸, Tahre Motalebi⁹

¹Associate Professor, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. ²MSc, Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

³Associate Professor, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. ⁴PhD Student, Nosocomial Infections Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. ⁵Associate

Professor, Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran. ⁶BS.c., Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. ⁷Associate Professor,

Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. ⁸Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran. ⁹MS.c., Department of

Microbiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Acinetobacter* spp. is one of the most important etiology of nosocomial infections worldwide. The presence of multiple antibiotic-resistant strains have limited effective treatments for *Acinetobacter* spp. The purposes of this study were to screen *gyrA* gene mutation in quinolone resistance clinical isolates of *A. baumannii* and their antimicrobial susceptibility pattern in Isfahan.

Material & Methods: In this cross-sectional study, 70 isolates of *Acinetobacter* were collected from patients hospitalized in the ICU of Isfahan Alzahra Hospital. Biochemical tests were used for detection of isolates. Antimicrobial susceptibility tests were performed on all isolates using the Kirby-Bauer Disk diffusion method and employment of eight antibiotics. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of ciprofloxacin and levofloxacin resistant isolates were determined using the E-test method according to the CLSI guideline. Furthermore, a PCR-RFLP test was performed to investigate *gyrA* gene mutation in ciprofloxacin/ levofloxacin resistance isolates.

Results: The most antibiotic resistance was related to ciprofloxacin (100%) and gentamicin (100%) while the lowest antibiotic resistance were observed in case of application of imipenem (8.92%) and meropenem (90%). Based on MIC test the ratio of resistance to ciprofloxacin and levofloxacin antibiotics were 100% and 65.7%, respectively. Also, overall 66.7% of these isolates showed multidrug resistant and 93% of the isolates carry a mutation at position 83 in *gyrA* gene.

Conclusion: The present study revealed that *A. baumannii* isolates carry a mutation in *gyrA* gene. This mutation causes increases in the microbial resistance to quinolone. Rapid detection of quinolone resistant *A. baumannii* isolates can help physicians to determine effective treatment for these infections

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, *gyrA* gene, Quinolone.

Correspondence to: Bahareh Vakili

Tel: +983113359359

E-mail: bahareh.vakili@yahoo.com

Journal of Microbial World 2014, 7(2): 109-117.