مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ٤٢٦/هفته‌ی دوم خرداد ماه ١٣٩٦

تاریخ دریافت: ١٣٩٥/١٠/٢٥
تاریخ پذیرش: ١٣٩٥/١٢/٢٧

تعیین جهش ژن‌های gyrA و parC در جدایه‌های Pseudomonas Aeruginosa مقاوم به سیپروفلوکساسین در نمونه‌های زخم سوختگی در یزد

سحر سادات عمادی[١]، احمد مصدق[٢]، محمود وکیلی[٣]، مجید ابراهیم‌زاده[١]، گلنار ایزدی[١]، اکرم آستانی[٤]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Pseudomonas aeruginosa یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی به ویژه در بخش سوختگی با درصد مقاومت بالا در برابر دارو می‌باشد. یکی از مکانیسم‌های مقاومت در این باکتری، جهش‌های کروموزومی در ناحیه‌ی Quinolone-resistance-determining region (QRDR) ژن‌های کروموزومی می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی جهش ژن‌های gyrA و parC در جدایه‌های Pseudomonas aeruginosa مقاوم به سیپروفلوکساسین در نمونه‌های زخم سوختگی بود.

روش‌ها: تعداد ٥٠ جدایه‌ی بالینی Pseudomonas aeruginosa جدا شده از بیماران بستری در بخش سوختگی بیمارستان سوانح سوختگی شهید صدوقی یزد تعیین هویت گردید. جهت تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum inhibitory concentration یا MIC) سیپروفلوکساسین از روش E-test و برای بررسی جهش در ژن‌های gyrA و parC در جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، از روش Polymerase chain reaction-sequencing (PCR-sequencing) استفاده شد.

یافته‌ها: ٦٢ درصد نمونه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. جهش در gyrA در تمامی نمونه‌ها (١٠٠ درصد) و جهش در parC در ٤١ جدایه (٨٢ درصد) از ٥٠ جدایه دیده شد. فراوان‌ترین جهش در ژن gyrA تبدیل T83I و در ژن parC تبدیل S87L بود. هیچ گونه جهشی در جدایه‌های حساس یافت نشد.

نتیجه‌گیری: جهش در منطقه‌ی تعیین شده‌ی مقاومت کینولونی، یکی از مهم‌ترین مکانسیم‌های مقاومت به فلوروکینولون در جدایه‌های بالینی Pseudomonas aeruginosa می‌باشد. با توجه به شیوع این ژن‌ها، این جهش‌ها نقش مهم و اساسی را در ایجاد مقاومت ایفا می‌کنند.

واژگان کلیدی: Pseudomonas aeruginosa، زخم، سوختگی، فلوروکینولون‌ها

ارجاع: عمادی سحر سادات، مصدق احمد، وکیلی محمود، ابراهیم‌زاده مجید، ایزدی گلنار، آستانی اکرم. **تعیین جهش ژن‌های gyrA و parC در جدایه‌های Pseudomonas aeruginosa مقاوم به سیپروفلوکساسین در نمونه‌های زخم سوختگی در یزد.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ١٣٩٦؛ ٣٥ (٤٢٦): ٤٢٧-٤٢٢

مقدمه

Pseudomonas aeruginosa باکتری گرم منفی و پاتوژن فرصت طلبی است که در تمام محیط‌ها قدرت زیست دارد و عامل بسیاری از عفونت‌های شدید در انسان مانند آندوکاردیت، مننژیت و سپتی‌سمی می‌باشد. یکی از دلایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی Pseudomonas aeruginosa، استفاده‌ی بی رویه در مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. این مقاومت، می‌تواند ذاتی و یا اکتسابی باشد (١). از مکانیسم‌های مقاومت ذاتی در Pseudomonas aeruginosa، می‌توان به جهش در DNA ژیراز یا توپوایزومراز IV که باعث مقاومت به فلوروکینولون‌ها در باکتری‌های گرم منفی می‌شود، اشاره کرد. فلوروکینولون‌ها، آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف صناعی مهمی هستند که دو هدف اصلی آن‌ها DNA ژیراز و توپوایزومراز IV در باکتری می‌باشد. ژیراز، یک هتروترامر شامل دو زیر واحد A و دو زیر واحد B است که باعث ایجاد سوپرکویل منفی در باکتری می‌شود

١- گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
٢- مربی، گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
٣- دانشیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
٤- استادیار، گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: اکرم آستانی
Email: astani_ir@yahoo.com

و توپوایزومراز IV از ۲ زیر واحد C و ۲ زیر واحد E تشکیل شده است. توپوایزومراز IV در مراحل انتهایی همانندسازی DNA عمل می‌کند و سبب جدا شدن دو رشته‌ی DNA از هم می‌شود (۳-۲). این آنتی‌بیوتیک‌ها، به کمپلکس DNA ژیراز- DNA و توپوایزومراز- DNA IV به طور محکم متصل می‌شوند و مانع از حرکت این آنزیم‌ها در چنگال همانندسازی می‌شوند و سرانجام، سنتز DNA میکروبی را مهار می‌کنند (۵-٤).

از میان فلوروکینولون‌هایی که برای درمان این ارگانیسم استفاده می‌شود، سیپروفلوکساسین بیشترین اثر مهاری را بر روی Pseudomonas aeruginosa دارد. با این حال، استفاده از سیپروفلوکساسین به عنوان درمان تک دارویی برای این باکتری توصیه نمی‌شود؛ چرا که این باکتری، به راحتی می‌تواند در طول مدت بستری و درمان به دارو مقاوم شود (٦). با وجود پیشرفت‌های پزشکی و امکانات مراقبت‌های ویژه جهت بیماران مبتلا به سوختگی، هنوز عامل اصلی مرگ و میر در این بیماران عفونت ایجاد شده بر روی زخم می‌باشد که در این بین، Pseudomonas aeruginosa نقش مهمی ایفا می‌کند (۷). با توجه به این که بررسی این جهش‌ها و مکانیسم‌های مقاومت آن به سیپروفلوکساسین در نمونه‌های زخم سوختگی تا به حال در ایران صورت نگرفته بود، مطالعه‌ی حاضر، با هدف بررسی جهش ژن‌های کروموزومی و تأثیر آن بر میزان Minimum inhibitory concentration (MIC) سیپروفلوکساسین صورت گرفت.

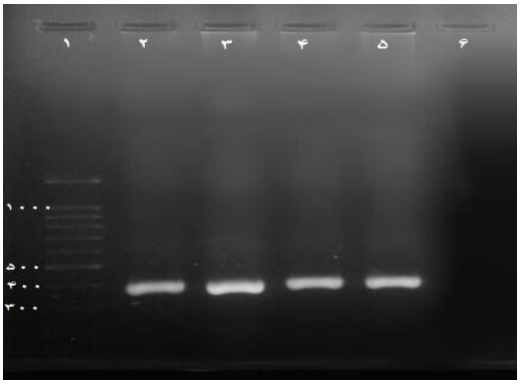
روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها و تعیین هویت باکتری: در این مطالعه‌ی توصیفی- تحلیلی، در طول مدت ۸ ماه تعداد ۵۰ جدایه‌ی Pseudomonas aeruginosa از بیماران بستری در بخش سوانح سوختگی بیمارستان شهید صدوقی یزد که دچار زخم سوختگی بودند، قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک به بیمار جمع‌آوری گردید. سپس، نمونه‌ها به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه شهید صدوقی واحد پردیس منتقل گردید. نمونه‌ها در محیط‌های کشت آگار خون‌دار حاوی ۵ درصد خون گوسفندی و محیط ائوزین- متیلن‌بلو کشت داده شد. باکتری‌ها با استفاده از روش‌های تشخیصی بیوشیمیایی معمول شامل روش‌های افتراقی Triple-sugar-iron (TSI)، سیترات، اکسیداز، بررسی حرکت، تولید اندول، گاز، Sulfid-indole-motility (SIM)، Methyl-red و Voges-Proskauer (MR & VP)، روش oxidative-fermentative (OF) و رشد در ٤۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و همچنین، تولید پیگمان پیوسیانین در محیط Muller-Hinton agar انجام شد که در نهایت، تعداد ۵۰ نمونه مورد تأیید قرار گرفت.

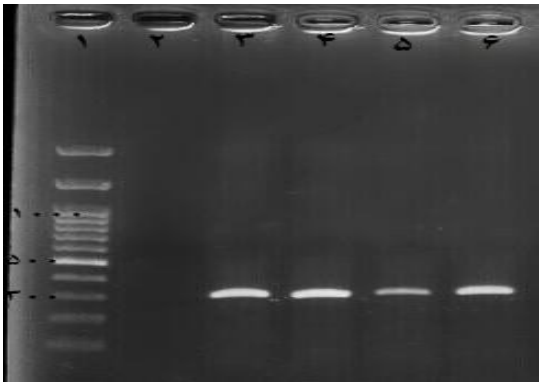
پس از تعیین هویت، میزان MIC سیپروفلوکساسین با روش E-test طبق دستورالعمل CLSI 2015 تعیین شد (۸). از سویه‌ی استاندارد Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 جهت انجام کنترل کیفی روش‌ها استفاده و تفسیر نتایج طبق جدول استاندارد Clinical & Laboratory Standards Institute 2015 (CLSI 2015) انجام شد. نمونه‌ی DNA ژنومی جدایه‌ها با روش Salting out (۹) انجام و برای تأیید استخراج، نمونه‌ها در ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. اجزای واکنش Polymerase chain reaction (PCR) با افزودن DNA ژنومی، جفت پرایمر و آب‌مقطر تزریقی استریل به محلول آماده‌ی Mastermix (Amplicon، دانمارک) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر آماده شد. توالی‌های نوکلئوتیدی زیر با اندازه‌ی ۳۷۸ bp و ۳۰٤ bp به ترتیب برای ژن‌های gyrA و parC به عنوان پرایمر مورد بررسی و استفاده قرار گرفت (۱۰):

gyrA: F: 5′- AGTCCTATCTCGACTACGCGAT- 3′
R: 5′- AGTCGACGGTTTCCTTTTCCAG- 3′
parC: F: 5′- CGAGCAGGCCTATCTGAACTAT- 3′
R: 5′- GAAGGACTTGGGATCGTCCGGA- 3′

واکنش PCR با دستگاه ترموسایکلر طبق برنامه‌ای شامل واسرشت اولیه در ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه در دمای ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه شامل واسرشت در ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه، اتصال پرایمرها برای هر دو ژن در دمای ۵۹ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای هر دو ژن انجام شد. بعد از حصول اطمینان از تشکیل تک باند بودن محصولات PCR (شکل‌های ۱ و ۲)، نمونه‌ها با حفظ زنجیره‌ی سرمایی برای شرکت پیشگام (ایران، تهران) جهت انجام تعیین توالی فرستاده شد.



شکل ۱. ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر ژن gyrA با طول قطعه معادل ۳۷۸ bp. ستون ۱: لدر ۱۰۰ bp، ۵-۲: نمونه‌ی مثبت، ٦: شاهد منفی



شکل ۲. ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر ژن parC با طول قطعه‌ی معادل ۳۰۴ bp. ستون ۱: لدر ۱۰۰ bp، ۲: شاهد منفی، ۳-۶: نمونه‌ی مثبت

سپس، توالی‌های مورد نظر Blast شد و در سایت EMBL_EBI به پروتئین تبدیل و با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین Praline از نظر وجود جهش در نمونه‌های مقاوم نسبت به سویه‌ی وحشی PAO1 موجود در سایت National Center for Biotechnology Information (NCBI) مورد مقایسه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌های به دست آمده از نتایج این بررسی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون χ^2 مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر $P < ۰/۰۵۰$ جهت معنی‌دار بودن نتایج لحاظ شد.

یافته‌ها

در این مطالعه‌ی توصیفی- تحلیلی، ۵۰ نمونه‌ی Pseudomonas aeruginosa از بیماران مبتلا به عفونت زخم سوختگی که شامل ۲۹ نمونه بیمار مرد (۵۸ درصد) و ۲۱ نمونه بیمار زن (۴۲ درصد) بود، جمع‌آوری و تعیین هویت گردید. طیف حداقل غلظت مهاری سیپروفلوکساسین بین ۳۲-۰/۰۰۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۴ ≥ مقاوم، ۳-۲ نیمه حساس و ۱ ≤ حساس) است که از ۵۰ جدایه ۳۱ نمونه (۶۲ درصد) MIC بالای ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۹ نمونه (۳۸ درصد) نمونه با MIC کمتر از ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند. تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های مقاوم و حساس دیده نشد. نتایج Sequencing نمونه‌ها نشان داد که در تمامی نمونه‌ها، جهش gyrA با تغییر ترئونین به ایزولوسین در موقعیت ۸۳ و تعداد ۴۱ جدایه جهش parC را با بیشترین تغییر در اسید آمینه‌ی سرین به لوسین در موقعیت ۸۷ نشان دادند (شکل ۳).

بحث

Pseudomonas aeruginosa، یکی از عوامل عفونت‌های بیمارستانی به ویژه در زخم‌های سوختگی است.

شکل ۳. نمونه‌ای از هم‌ترازی توالی اسید آمینه در سایت Praline. الف: ردیف اول تغییر اسید آمینه‌ی ترئونین به ایزولوسین در موقعیت ۸۳ ژن gyrA، ب: ردیف اول تغییر اسید آمینه‌ی سرین به لوسین در موقعیت ۸۷ ژن parC

عفونت با این باکتری، می تواند سپتی سمی، پنومونی، منتژیت و بیماری‌های کشنده‌ی دیگری را نیز به دنبال داشته باشد. اغلب عفونت‌های بیمارستانی در بخش سوختگی به علت ایمنی ضعیف در بیماران توسط باکتری‌های فرصت طلب از جمله Pseudomonas aeruginosa ایجاد می‌شود و زخم‌های وسیع پس از سوختگی‌ها باعث تسهیل ورود این ارگانیسم به بافت‌ها می‌شود که به دنبال آن، عفونت‌های دیگر را در پی دارد (۱۱). فلوروکینولون‌ها، از جمله آنتی‌بیوتیک‌های مهم و پرکاربرد هستند که به طور گسترده‌ای در درمان عفونت‌های ناشی از Pseudomonas aeruginosa استفاده می‌شوند. این آنتی‌بیوتیک‌ها، با مهار آنزیم‌های DNA ژیراز و توپوایزومراز IV در باکتری‌ها، باعث مهار رونویسی و همانندسازی می‌شوند. یکی از عمده‌ترین راه‌های مقاومت این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها، جهش در آنزیم‌های DNA ژیراز و توپوایزومراز IV است که همین امر، باعث افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بی‌اثر بودن درمان بیماری شده است. مطالعات مروری گذشته نیز روند افزایش مقاومت را نشان می‌دهند (۱۴-۱۲).

در بررسی حاضر، جدایه‌های دارای جهش از MIC ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر تا بالای ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند. از ۵۰ نمونه‌ی مقاوم به سیپروفلوکساسین، تمامی نمونه‌ها (۱۰۰ درصد) دارای جهش در ژن gyrA بودند. ۴۱ جدایه از ۵۰ جدایه (۸۲ درصد) جهش در parC را نشان دادند. این گونه استنباط می‌شود که جهش‌های تکی gyrA به تنهایی، می‌تواند MIC سیپروفلوکساسین را تا بالاتر از ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش دهد. در نمونه‌های حساس به آنتی‌بیوتیک، هیچ گونه جهشی دیده نشد. عمده جهش اتفاق افتاده در ژن gyrA، تبدیل Thr-83-Ile و در ژن parC با تغییر در Ser87Leu همراه بود. اغلب تغییرات اسید آمینه و نوکلئوتید با مطالعات مروری هم‌خوانی داشت.

در مطالعه‌ی Lee و همکاران در کره بر روی ۱۰۳ جدایه‌ی Pseudomonas aeruginosa مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۹۸/۱ درصد دارای تعویض اسید آمینه در موقعیت ۸۳ gyrA بودند و تغییر شایع بعدی (۳۶/۸ درصد) در موقعیت ۸۷ parC با تبدیل سرین به لوسین بوده است که نشان داد در این مطالعه، نمونه‌هایی که MIC بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک مورد نظر داشتند، همراهی جهش parC با gyrA تأثیر به‌سزایی داشته است (۱۵). در میان جهش‌هایی که مورد بررسی قرار گرفت، تعدادی از تغییرات نوکلئوتیدی، جهش‌های خاموش (Silent mutation) به حساب می‌آیند که تغییری در توالی پروتئین ایجاد نمی‌کنند.

در بررسی حاضر، نشان داده شد که جهش gyrA در موقعیت ۸۳ منجر به تغییر اسید آمینه‌ی ترئونین –یک اسید آمینه‌ی قطبی و بدون بار– به ایزولوسین –یک اسید آمینه‌ی غیر قطبی و به شدت هیدروفوبیک– می‌شود. جهش در کدون ۸۷ باعث تغییر آسپارتات به عنوان یک اسید آمینهی قطبی و دارای بار منفی به گلایسین و گلوتامین که از اسید آمینه‌های غیر قطبی هستند، می‌شود. به احتمال زیاد، تغییر در این اسیدهای آمینه، باعث ایجاد تغییر در ساختار DNA ژیراز می‌شود و در نتیجه، تمایل آنزیم برای واکنش با آنتی‌بیوتیک کاهش می‌یابد و در نهایت، منجر به مقاومت دارویی می‌شود (۱۶).

Pasca و همکاران در ایتالیا با مطالعه بر روی ۴۵ جدایه، ۹۷/۸ درصد جهش در gyrA و ۸۸/۹ درصد جهش در parC را نشان دادند. نتایج نشان داد که جهش در ژن کد کننده‌ی اهداف سیپروفلوکساسین به نمایندگی از اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به فلوروکینولون‌ها می‌باشد (۱۷).

در مطالعه‌ی Wang و همکاران در تایوان بر روی نمونه‌های Pseudomonas aeruginosa، دو جهش در gyrA و parC همراه با سطح بالای مقاومت به سیپروفلوکساسین در MIC بالاتر از ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۱۰۱ جدایه از ۱۷۶ جدایه دیده شد. همچنین، جهش در parC و parE همراه با جهش gyrA به طور شایع در جدایه‌هایی با مقاومت بالا به سیپروفلوکساسین مشاهده شد (۱۸).

فاضلی و همکاران در اصفهان، جهش نقطه‌ای gyrA در موقعیت Thr-83-Ile با MIC بالای ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۶۵ جدایه‌ی Pseudomonas aeruginosa را گزارش کردند (۱۹). در مطالعه‌ای دیگر که در کانادا توسط Kureishi و همکاران انجام شد، نتایج جهش در ژن gyrA با تغییر اسید آمینه‌های Thr-83-Ile، Asp-87-Asn و Asp-87-Tyr گزارش شد (۲۰).

به نظر می‌رسد تغییر در موقعیت ۸۷ و ۸۳ در gyrA و موقعیت ۸۷ در parC، از اصلی‌ترین تغییرات می‌باشد و نقش مهمی را در مقاومت Pseudomonas aeruginosa نسبت به فلوروکینولون‌ها ایفا می‌کند. با توجه به مطالعات ژنتیکی و بیوشیمیایی که تا به امروز صورت گرفته است، DNA ژیراز جزء هدف اولیه و توپوایزومراز چهار هدف ثانویه‌ی آنزیمی برای فلوروکینولون‌ها در Pseudomonas aeruginosa محسوب می‌شود (۱۰). توحیدپور و همکاران، از بین ۱۳۳ نمونه‌ی کلینیکی جدا شده از سه بیمارستان اصلی در تهران، ۴۵ جدایه‌ی مقاوم به سیپروفلوکساسین با جایگزینی Thr-83-Ile ژن gyrA در تمامی جدایه‌ها بدون جهش در parC را گزارش کردند (۲۱).

در مطالعه‌ی گرگانی و همکاران در امریکا، مانند مطالعه‌ی حاضر، جهش اصلی T83I و D87Y بود. از ۱۲ جدایه‌ی مقاوم، ۴ جدایه دارای جهش در gyrA بودند؛ در حالی که در مطالعه‌ی حاضر، همه‌ی نمونه‌های مقاوم دارای جهش در این ژن بودند. این نتایج، این ایده را حمایت می‌کند که کدون ۸۳ و ۸۷ اسیدهای آمینه در gyrA نقش مهمی در یک مکان اتصال برای فلوروکینولون را ایفا می‌کند. از سوی دیگر، به نظر می‌رسد منطقه‌ی مقاومت کینولونی در gyrA، جایگاه فعال آنزیمی نزدیک‌تری نسبت به gyrB دارد. به همین دلیل، تعداد تغییرات جهشی به ندرت در gyrB رخ می‌دهد (۲۲).

با توجه به مطالعات محدود و کمی که در این زمینه در کشور ما صورت گرفته است، بررسی‌های بیشتر در رابطه با این مکانیسم‌ها با نمونه‌های بالینی مختلف و همچنین، کلونینگ ژن‌های کروموزومی، برای تعیین دیگر عوامل دخیل در مقاومت و مکانیسم عملکرد این ژن‌ها و رابطه‌ی آن با میزان مقاومت به خصوص در کشور ایران ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری نهایی این که می‌توان جهش در Quinolone resistance determining region (QRDR) ژن‌های gyrA و parC را یکی از عوامل اصلی ایجاد مقاومت در جدایه‌های بالینی Pseudomonas aeruginosa به حساب آورد که می‌تواند همراه با ژن‌های دخیل دیگر، تأثیر به‌سزایی در افزایش MIC نمونه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی برای درمان جدایه‌های بالینی Pseudomonas aeruginosa داشته باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر، حاصل بخشی از نتایج پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی پزشکی می‌باشد. بدین‌وسیله، از همکاری پرسنل محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev 2009; 22(4): 582-610.
2. Adams DE, Shekhtman EM, Zechiedrich EL, Schmid MB, Cozzarelli NR. The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. Cell 1992; 71(2): 277-88.
3. Zechiedrich EL, Khodursky AB, Cozzarelli NR. Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in Escherichia coli. Genes Dev 1997; 11(19): 2580-92.
4. Andersson MI, MacGowan AP. Development of the quinolones. J Antimicrob Chemother 2003; 51(Suppl 1): 1-11.
5. Bayat E, Kamali M, Zareei Mahmoodabadi A, Mortazavi Y, Ebrahim Habibi A, Amini B, et al. Isolation, determination and cloning of translocation domain of exotoxin A from Pseudomonas aeruginosa. Trauma Mon 2010; 15(3): 149-154.
6. Wolf P, Elsasser-Beile U. Pseudomonas exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. Int J Med Microbiol 2009; 299(3): 161-76.
7. Michael B, Richard P. Organization for infection control. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone; 2010. p. 3669-76.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard. CLSI document M07-A10. 10th ed. Wayne, PA: CLSI; 2015. p. 950.
9. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16(3): 1215.
10. 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; 45(8): 2263-8.
11. Arvanitidou M, Katikaridou E, Douboyas J, Tsakris A. Prognostic factors for nosocomial bacteraemia outcome: a prospective study in a Greek teaching hospital. J Hosp Infect 2005; 61(3): 219-24.
12. Nouri R, Ahangarzadeh Rezaee M, Hasani A, Aghazadeh M, Asgharzadeh M, Ghojazadeh M. Effect of QRDR mutations on ciprofloxacin resistance in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. J Ardabil Univ Med Sci. 2016; 16 (2): 116-23. [In Persian].
13. 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 2013; 19(1): 77-81.
14. Adabi M, Talebi Taher M, Arbabi L, Afshar M, Fathizadeh S, Minaeian S, et al. Determination of antibiotic resistance pattern of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients with burn wounds. J Ardabil Univ Med Sci. 2015; 15(1): 66-74. [In Persian].
15. 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; 25(4): 290-5.
16. Akasaka T, Onodera Y, Tanaka M, Sato K. Cloning, expression, and enzymatic characterization of Pseudomonas aeruginosa topoisomerase IV. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(3): 530-6.
17. Pasca MR, Dalla VC, De Jesus Lopes Ribeiro AL, Buroni S, Papaleo MC, Bazzini S, et al. Evaluation of fluoroquinolone resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa multidrug resistance clinical isolates. Microb Drug Resist 2012; 18(1): 23-32.
18. Wang YT, Lee MF, Peng CF. Mutations in the quinolone resistance-determining regions associated with ciprofloxacin resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates from Southern Taiwan. Biomarkers and Genomic Medicine 2014; 6(2): 79-83.
19. Fazeli H, Solgi H, Havaei S A, Shokri D, Norouzi Barogh M, Zamani F Z. Carbapenem and fluoroquinolone resistance in multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa Isolates from Al-Zahra Hospital, Isfahan, Iran. J Med Microbiol Infec Dis 2014; 2(4): 147-152.
20. Kureishi A, Diver JM, Beckthold B, Schollaardt T, Bryan LE. Cloning and nucleotide sequence of Pseudomonas aeruginosa DNA gyrase gyrA gene from strain PAO1 and quinolone-resistant clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38(9): 1944-52.
21. Tohidpour A, Najar Peerayeh S, 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.
22. Gorgani N, Ahlbrand S, Patterson A, Pourmand N. Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. Int J Antimicrob Agents 2009; 34(5): 414-8.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 01.01.2017
Vol. 35, No. 426, 2nd Week, June 2017
Accepted: 17.03.2017

Mutations of gyrA and parC Genes in Ciprofloxacin-Resistance Isolates of Pseudomonas Aeruginosa from Burn Wounds in Yazd City, Iran

Sahar Sadat Emadi[1], Ahmad Mosadegh[2], Mahmoud Vakili[3], Majid Ebrahimzadeh[1], Golnar Izadi[1], Akram Astani[4]

Original Article

Abstract

Background: Pseudomonas aeruginosa is one of the most important factors for nosocomial infections with percentage of resistance to the drug, particularly in the burn wounds. One of the mechanisms of resistance in these bacteria is chromosomal mutation in the quinolone-resistance-determining region (QRDR) of chromosome gene. The aim of this study was to evaluate gyrA and parC gene mutation in Pseudomonas aeruginosa isolates from burn wound infections resistant to ciprofloxacin.

Methods: 50 clinical Pseudomonas aeruginosa isolates were identified from patients admitted to burn hospital. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of ciprofloxacin were evaluated by E-test method and polymerase chain reaction-sequencing (PCR-sequencing) method was carried out to assess the gyrA and parC mutations in ciprofloxacin-resistant isolates.

Findings: From 50 isolates, 62% were resistant to ciprofloxacin. Mutations were detected in all (100%) and 41 isolates (82%) in gyrA and parC genes, respectively. The most frequent mutations were observed in gyrA gene conversion (T83I) and parC (S87L). No mutation was found in sensitive isolates.

Conclusion: Results indicate that mutations in the quinolone-resistance-determining-region are the major mechanisms for ciprofloxacin resistance in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Considering the prevalence of these genes, these mutations play a major role in the development of resistance.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, Burns, Wounds, Fluoroquinolones

Citation: Emadi SS, Mosadegh A, Vakili M, Ebrahimzadeh M, Izadi G, Astani A. **Mutations of gyrA and parC Genes in Ciprofloxacin-Resistance Isolates of Pseudomonas Aeruginosa from Burn Wounds in Yazd City, Iran.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(426): 422-7.

1- Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
2- Instructor, Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
3- Associate Professor, Department of Community Medicine, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
4- Assistant Professor, Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
Corresponding Author: Akram Astani, Email: astani_ir@yahoo.com