

## Evaluation of Resistance to Fluoroquinolones and its Relationship with *parC* Gene mutation in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates

Massoumeh Chanbari<sup>1</sup> , Reza Mirnejad<sup>2</sup> , Ebrahim Babapour<sup>3\*</sup> 

1. Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2. Molecular Biology Research Center, Systems biology and poisonings institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

doi [10.30699/ijmm.14.3.247](https://doi.org/10.30699/ijmm.14.3.247)



### ABSTRACT

**Background:** *Klebsiella pneumoniae* has received attention due to a wide range of diseases and antibiotic resistance. The resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria is often due to chromosomal mutations in the *gyr* and *par* genes. This research aimed at investigating the pattern of fluoroquinolone resistance and its relation with a mutation in the *parC* gene among clinical isolates of *K. pneumoniae*.

**Materials & Methods:** In this descriptive-analytical study, 95 *K. pneumoniae*, after biochemical and molecular diagnosis, were evaluated for resistance to different antibiotics by disk diffusion agar according to CLSI recommendations and screening for ciprofloxacin-resistant isolates. Mutation in the ciprofloxacin resistance determinant region of the *parC* gene of *K. pneumoniae* resistant to ciprofloxacin was performed by PCR amplification and then amplified fragment sequencing and finally with the standard bacterial genome sequencing available at NCBI site, became BLAST through online software, Insilico, and Clustalw2.

**Results:** The result of the antibiogram showed implies an expansion of MDR bacteria. 3.1% of isolates were resistant to all 13 antibiotics studied and 24.2% were ciprofloxacin-resistant. The highest and lowest percentages of antibiotic resistance were determined for ampicillin and amoxicillin (98.9%) and imipenem (13.6%), respectively. Sequence analysis of the *parC* gene showed that of 23 isolates resistant to ciprofloxacin, 16 isolates at codon 80 (I80S), one at codon 84 (E84K) were and 3 isolates also had frame-shift mutations.

**Conclusion:** Mutations in the *parC* gene can be one of the major contributors to resistance to fluoroquinolones and increased MDR bacteria and nosocomial infections.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, Fluoroquinolones, *parC* gene, PCR

Received: 2019/10/29;

Accepted: 2020/03/21;

Published Online: 2020/05/12

### Corresponding Information:

Ebrahim Babapour, 3. Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran  
Email: e\_babapoor@yahoo.com



Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Chanbari M, Mirnejad R, Babapour E. Evaluation of Resistance to Fluoroquinolones and its Relationship with *parC* Gene Mutation in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (3) :270-289

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

### Introduction

*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) is an opportunistic bacterium and an important pathogen is responsible for a wide range of nosocomial acquired from the hospital and is the cause of urinary tract infections, neonatal arthritis, meningitis, wound infections,

nosocomial pneumonia, bacteremia, septicemia, and soft tissue infections (1). The microorganism is also a potentially pathogenic community-acquired pathogen (1). Most *K. pneumoniae* isolates are multidrug-resistant (2). Although fluoroquinolones such as ciprofloxacin are often

used to treat *K. pneumoniae* infections, the resistance of this bacterium to this group of antibiotics is increasing (3, 4). The resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria is often due to chromosomal mutations in the *gyr* and *par* genes (5, 6). This research aimed at investigating the pattern of fluoroquinolone resistance and its relation with a mutation in the *parC* gene among clinical isolates of *K. pneumoniae*.

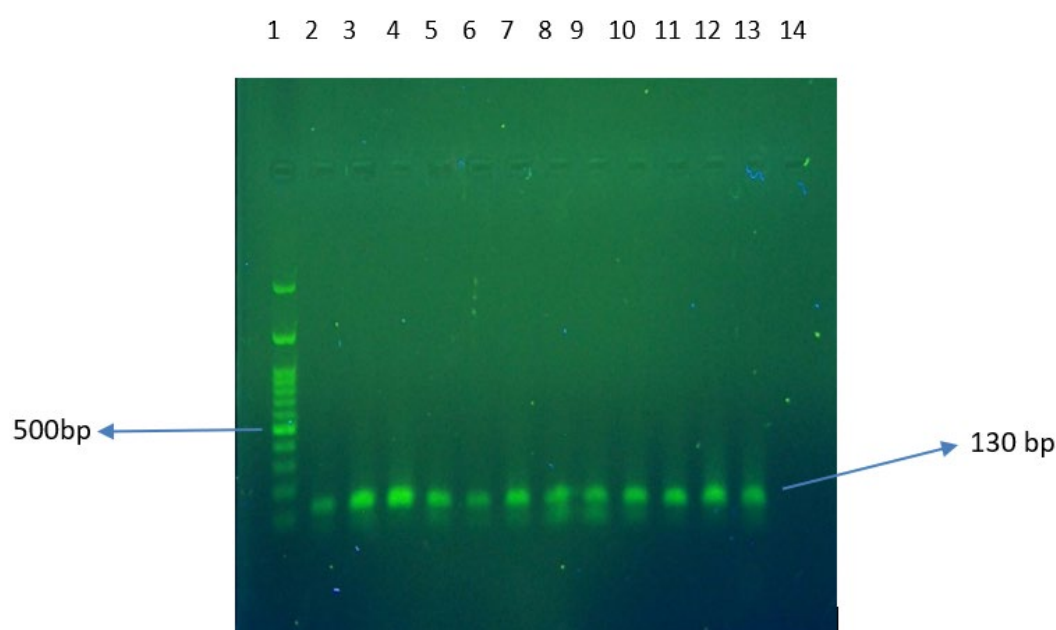
## Materials and Methods

### Bacterial identification and Antibacterial susceptibility testing

In this descriptive-analytic study, 95 *K. pneumoniae*. Isolates were initially identified using standard laboratory methods including growth on MacConkey agar medium (Merck, Germany) at 37 °C, showing the purple appearance, Gram stain (Gram-negative coccobacillus), oxidase test (negative), sulfide indole

motility (SIM), methyl red-Voges-Proskauer (MR-VP), citrate utilization, urease test, triple sugar iron (lactose fermentative or acid/acid, G+, H<sub>2</sub>S) and for molecular diagnosis, Presence of *16S rRNA* gene was verified using PCR (fig 1). The total genomic DNA was extracted from *K. pneumoniae* colonies grown on LB broth (Merck Co., Germany) by the boiling method. DNA quality and concentrations were determined by Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and agarose gel electrophoresis. Whole extracted DNAs were immediately stored at -70°C.

After biochemical and molecular diagnosis screened for resistance to fluoroquinolones and another antibiotics by the Kirby-Bauer disc diffusion technique on Mueller-Hinton Agar (Merck Co., Germany) medium according to the Clinical and Laboratory Standards Institute 2018 (CLSI) strategies.



**Figure 1.** PCR product electrophoresis results for proliferation of *16S rRNA* gene with molecules with a molecular weight of 130 bp, column1, marker100 bp (Sina Clone Company) and column 2, positive control, columns 3-13, product bp130 PCR gene *16S rRNA* gene, clinical isolates of *K. pneumoniae* and Column 14 Negative control

**Table 1.** Primers used in this study

Gene	Seq	Product size	Reference
<i>parC</i>	F 5'-CAGCTCGGCATACTTCGAC-3' R 5'-CCTGAACTACTCCATGTACGTGAT-3'	340 bp	(4)
<i>16S rRNA</i>	F 5'-ATTTGAAGAGGTTGCAACGAT-3' R 5'-TTCACCTCTGAAGTTTCTTGTGTTC-3'	130 bp	(15)

**Table 2.** Thermocycler PCR protocol for the 16S rRNA gene

Steps	Temperature	Time
Initial Denaturation	94°C	4 min
Denaturation	94°C	45 sec
Annealing	59°C	45 sec
Extension	72°C	45 sec
Final Extension	72°C	10 min

**Table 3.** Thermocycler PCR protocol for the *parC* gene

Steps	Temperature	Time
Initial Denaturation	94°C	4 min
Denaturation	94°C	30 sec
Annealing	50°C	30 sec
Extension	72°C	1 min
Final Extension	72°C	7min

#### Determination of MIC of ciprofloxacin by microbial dilution method

The MIC of ciprofloxacin was measured by dilution microbial assay at concentrations ranging from 0.25 - 1024 µg / ml.

#### PCR assay for detection of *parC* genes

The mutation in the determining area for resistance to ciprofloxacin in the *parC* gene of resistant *K. pneumoniae* was performed by the reproduction of this gene using the PCR method and nucleotide sequencing analysis (Figure 2,3 ,4 5).

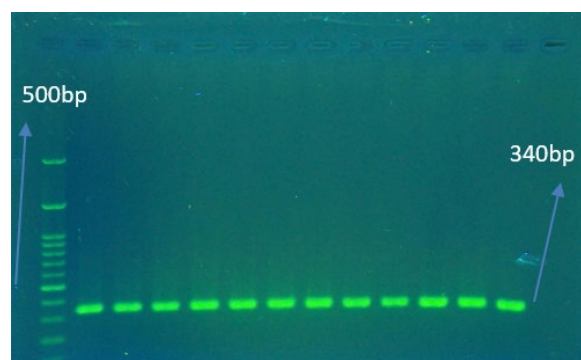
The desired genes and their primer sequences used in our study were demonstrated in **Table 1**. The total volume of reaction per each PCR test was 25 µL in the PCR tube. The reaction mixtures for detection of *parC* gene contained 1 µL DNA (10 pmol/L), 12.5 µL ready 2× PCR Master Mix (SinaClon BioScience Co., Iran), 1 µL of 10 pmol/L of each primer and 9.5 µL of sterile ultrapure water up to 25 µL volumes. Thermal cycling conditions for gene amplification were performed in **Table 2 & 3**. Finally, the effect of the mutation on the structure of IV topoisomerase enzyme and its possible role in resistance to Ciprofloxacin was investigated using online Blast, Insilico, and Clustalw2 software.

## Results

The antimicrobial susceptibility pattern of *K. pneumoniae* isolates was determined by the Kirby-Bauer disc diffusion technique on Mueller-Hinton Agar (Merck Co., Germany) medium. The results showed that 1.3% of isolates were resistant to all 13 antibiotics and 23 isolates were resistant to ciprofloxacin (24.2%). The highest percentage of antibiotic resistance was obtained for ampicillin and amoxicillin (98.9%) and the lowest percentage of antibiotic resistance was

determined for ampicillin (13.6%). The results of the antimicrobial susceptibility pattern of *K. pneumoniae* isolates showed in table 4. Results showed 67 isolates from 95 isolates studied were Multi-Drug Resistant (MDR) and 8 isolates were Extensive Drug-Resistant (XDR).

Sequencing analysis showed that 16 of 23 isolates resistant to ciprofloxacin had I80S mutations and an isolate also had an E84K mutation in the *parC* gene. According to the results, a mutation in *parC* gene is one of the most important mechanisms of resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *K. pneumoniae*. The mutation in the *parC* gene induces resistance to ciprofloxacin in *K. pneumoniae* by altering the tendency of ciprofloxacin to IV topoisomerase, and this can contribute to the increase of *K. pneumoniae* isolates resistant to common antibiotics and the increased incidence of nosocomial infections.



**Figure 1.** Electrophoresis results of PCR product for *parC* gene proliferation with bands with a molecular weight of 340 bp, column 1 of 100 bp marker (Sina Clone Company) and column 2 of positive control, columns 3-13 of product 340 bp PCR gene of *parC* gene, clinical isolates of *K. pneumoniae* and Column 14 Negative control

**Table 4.** The results of the antimicrobial susceptibility pattern of *K. pneumoniae* isolates

Antibiotics	Susceptible	Intermediate	Resistance
<b>Cefepime 30 µg</b>	67 (70.53%)	1 (1.05%)	27 (28.42%)
<b>Tobramycin 10 µg</b>	72 (75.79%)	8 (8.42%)	15 (15.79%)
<b>Chloramphenicol 30 µg</b>	71 (74.74%)	8 (8.42%)	16 (15.79%)
<b>Ciprofloxacin 5 µg</b>	61 (64.21%)	11 (11.58%)	23 (24.21%)
<b>Nalidixic acid 30 µg</b>	56 (58.95%)	13 (13.68%)	26 (27.37%)
<b>Trimethoprim-sulfamethoxazole 75 µg</b>	62(65.26%)	0	33(34.74%)
<b>Piperacillin 100 µg</b>	9 (9.48%)	20 (21.05%)	66 (69.47%)
<b>Tetracycline 30 µg</b>	65(68.42%)	6 (6.32%)	24 (25.26%)
<b>Imipenem 10 µg</b>	77 (81.05%)	5 (5.26%)	13(13.69%)
<b>Cefecxim 5 µg</b>	57 (60%)	3 (3.16%)	35 (36.84%)
<b>Meropenem 10 µg</b>	75 (78.95%)	1 (1.05%)	19 (20%)
<b>Ampicillin 10 µg</b>	1 (1.05%)	0	94 (98.95%)
<b>Amoxicillin 10 µg</b>	1 (1.05%)	0	94 (98.95%)

DNA topoisomerase IV subunit A

Query 11 GCATGGCGGCG--AGATTGGGATCGTCCGGCGCCCCCAGTTTCCCTGACCATCCACCA 68

|||||

Sbjct 701656 GCATGGCGGCGAAAGATTGGGATCGTCCGGCGCCCCCAGTTTCCCTGACCATCCACCA 701597

Query 69 GCGGATAGCGGTAAGAGAACGGCTGCGCCATCAGCACCATCGCTTCATAGCAGGCGATGT 128

|||||

Sbjct 701596 GCGGATAGCGGTAAGAGAACGGCTGCGCCATCAGCACCATCGCTTCATAGCAGGCGATGT 701537

Query 129 CGCCGTGCGGGTGATATTTACCCAACACGTCGCCGACAGTGCGGGCGGACTTTTTGAATT 188

|||||

Sbjct 701536 CGCCGTGCGGGTGATATTTACCCAACACGTCGCCGACAGTGCGGGCGGACTTTTTGAATT 701477

Query 189 TCGCGCTGGCGTTCAGCCCCAGCTCGGACATCGCATAGACGATGCGACGCTGGACCGGTT 248

|||||

Sbjct 701476 TCGCGCTGGCGTTCAGCCCCAGCTCGGACATCGCATAGACGATGCGACGCTGGACCGGTT 701417

Query 249 TTAAGCCATCGCCAATAAACGGTAATGCCCTGTCCATGATCACGTACATGGAGTAGTTCA 308

|||||

Sbjct 701416 TTAAGCCATCGCCAATAAACGGTAATGCCCTGTCCATGATCACGTACATGGAGTAGTTCA 701357

Query 309 GG 310

||

Sbjct 701356 GG 701355





due to their high oral absorption. However, the widespread use of these antibiotics has led to an increase of resistance to them in recent years (17-19). Enzymes, DNA gyrase, and topoisomerase IV, which are essential for replication and transcription, are the targets of fluoroquinolones. The resistance of gram-negative bacteria to fluoroquinolones is often the result of chromosomal mutations and the displacement of certain amino acids in the Quinolone-Resistance Determining Region (QRDR) (20, 21). This study aimed to investigate the pattern of resistance to fluoroquinolones and its association with mutation in the *parC* gene among the clinical isolates of *K. pneumoniae*. The results of this study showed an increase in the rate of resistance of *K. pneumoniae* isolates to various antibiotics, which is compatible with studies conducted by Ahanjan et al, and Hashemi et al (22, 23). The results of this research also showed that 72.6% of the isolates were ESBLs + and 70.5% of the isolates being studied were MDR and 8.4% of the isolates were XDR. No drug-resistant isolate (PDR) was observed in this study; The results of the significant increase in ESBLs + and MDR isolates compared to Pourali Sheshblouki et al study in 2016 (24), but the results of Shivaee et al study are consistent (25). The results also showed that from 95 isolates of *K. pneumoniae*, 24.2% were resistant to ciprofloxacin; Which was almost consistent with the studies conducted by Norouzi et al in 2014 in Kerman and a study by Pourali Sheshblouki et al in 2016 (24,26). But the results were not consistent with Molana et al's study in 2010 and Mohammad Alipore et al's study in 2013 in Tabriz (4,27). This can be due to the different distribution of infections in different provinces, genetic diversity, differences in the location of isolates, the number of isolates, the type of samples collected, the type of discs used, or personnel errors could be the reasons for the differences in various studies. Various studies have suggested a variety of mutations, including mutations in codons 80 and 84 in the *parC* gene, which include S80I and E84K, and major causes of resistance to ciprofloxacin. The results of the present study showed that all 23 studied isolates in the *parC* gene had mutations at one or more points, and a comparison of the nucleotide sequence of the *parC* gene with the *parC* gene of the standard *K. pneumoniae* ATCC13883 showed that the mutation changed the amino acid sequence at 20 isolates from 23 being researched isolates; Of these, 16 mutations were observed in codon No. 80, which resulted in the conversion of serine (S) to isoleucine (I), and in a sample in codon No. 84 in which amino acid E (glutamic acid) was mixed with the amino acid. K (lysine) was displaced, 3 mutations caused a change in the framework and a wide change in the sequence of the enzyme topoisomerase IV, and in three samples the mutation did not change the amino acid sequence;

Therefore, the most common mutation was codon No. 80, which was caused by isoleucine mutation instead of serine. However, the conversion of glutamic acid to lysine amino acids, alanine, and glycine in various studies, including the study of Minarini et al, in Brazil between 2002 and 2005 (27), Brisse et al, in the Netherlands in 2001 (29), Deguchi et al, 1996 in Japan. (3) was observed. In the study of Brisse et al, several mutations, including S80I and E84K, were observed in the isolates of *K. pneumoniae* (29). In a 2015 study by Piekarska et al, both mutations were detected in fluoroquinolone-resistant isolates (30). In the Minarini et al study, S80I mutations were identified in six of the 21 quinolone-resistant isolates obtained, but no E84K mutation was reported (28). In a 2003 study of Chen et al, no mutations in the *parC* gene were found among the 34 resistant strains of *K.pneumoniae* studied in Taiwan, but it was found that some resistant strains had mutations in *gyrA* (32). In the study of Mohammad Alipore et al, in 2015, on 10 isolates of *Cibrosila pneumoniae* resistant to ciprofloxacin, six isolates had mutations in the *gyrA* gene (27). In the study of Park et al in 2017, of the 42 *K. pneumoniae*-resistant Ciprofloxacin isolates, 36 isolates had at least one mutation in one of the *gyrA*, *gyrB*, and *parC* genes (31). In various studies such as the study of Brisse and Piekarska, E84K mutations were reported in some fluoroquinolone-resistant isolates (30, 29). In the Norouzi et al study, 6 out of 111 *K. pneumoniae* isolates had mutations in the *parC* gene that had only two common S80I mutations but no E84K mutations (26). The E84K mutation is one of the most common mutations in *parC* that has been reported in fluoroquinolone-resistant isolates. The occurrence of this mutation in a ciprofloxacin-resistant *K. pneumoniae* isolates in this study indicates its importance in drug resistance. Most of the results studied and also the results of this study show that point mutation in codons 80 and 84 of the *parC* gene is present in most samples resistant to ciprofloxacin, and in the meantime, point mutations in codon 80 are more important it has.

## Conclusion

Drug resistance is still increasing in *K. pneumoniae*. Considering that ciprofloxacin is one of the effective antibiotics in the treatment of nosocomial infections caused by *K. pneumoniae*, the presence of 23 ciprofloxacin-resistant isolates from 95 isolates as well as resistance to high doses of ciprofloxacin antidepressants in this study increased the risk of silent resistance. Also, the occurrence of point mutations in the *parC* gene in all ciprofloxacin-resistant isolates indicates the importance of these mutations in the resistance to ciprofloxacin resistance in this bacterium.

### Acknowledgment

This research article is taken from a Master's Degree in Microbiology.

The authors of this article are grateful to the Honorable President of Molecular Laboratory and

Expert of Microbiology Research Laboratory, Islamic Azad University, Karaj Branch.

### Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.



## بررسی مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها و ارتباط آن با موتاسیون در ژن *parC* در جدایه‌های کلینیکی کلبسیلا پنومونیه

معصومه چنبری<sup>۱</sup>، رضا میرنژاد<sup>۲</sup>، ابراهیم باباپور<sup>۳\*</sup>

۱. گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
۲. مرکز تحقیقات زیست شناسی مولکولی، انستیتوی زیست‌شناسی و مسمومیت‌ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
۳. گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

#### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۰۷

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۰۲

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۲/۲۳

#### موضوع:

مقاومت پادزیستی

#### نویسنده مسئول:

ابراهیم باباپور، استادیار

گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم، واحد

کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

ایمیل:

[e\\_babapoor@yahoo.com](mailto:e_babapoor@yahoo.com)

**زمینه و اهداف:** کلبسیلا پنومونیه به دلیل ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بسیار مورد توجه است. مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها در این باکتری‌های گرم منفی، ممکن است در نتیجه موتاسیون کروموزومی در ژن‌های *par* و *gyr* باشد. هدف از این مطالعه بررسی الگوی مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها و ارتباط آن با موتاسیون در ژن *parC* در میان جدایه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه هست.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، تعداد ۹۵ کلبسیلا پنومونیه پس از تشخیص بیوشیمیایی و مولکولی، از نظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، مطابق توصیه موسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی CLSI بررسی و جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین غربالگری شدند. برای بررسی وجود موتاسیون در ژن *parC* در کلبسیلا پنومونیه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، از طریق تکثیر این ژن به روش PCR و سپس تعیین توالی قطعه تکثیرشده و در نهایت مقایسه آن با توالی ژنوم باکتری استاندارد موجود در سایت NCBI، از طریق نرم‌افزارهای آنالیز، Insilico و Clustalw2، بلاست گردید.

**یافته‌ها:** نتایج تست آنتی‌بیوگرام حاکی از گسترش باکتری‌های Multi Drug Resistant (MDR) بود. ۳/۱٪ جدایه‌ها به همه ۱۳ آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه و ۲۴/۲٪ جدایه‌ها سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. بیشترین و کم‌ترین درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب برای آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین (۹۸/۹٪) و ایمی‌پنم (۱۳/۶٪) تعیین شد. آنالیز توالی یابی ژن *parC* نشان داد از ۲۳ جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۱۶ جدایه در کدون ۸۰ (I80S)، یکی در کدون ۸۴ (E84K) و ۳ جدایه نیز دچار جهش در چارچوب بودند.

**نتیجه‌گیری:** جهش در ژن *parC* می‌تواند یکی از عوامل اصلی مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها و افزایش باکتری‌های MDR و ایجاد عفونت‌های بیمارستانی باشد.

**کلیدواژه‌ها:** کلبسیلا پنومونیه، فلوروکوئینولون‌ها، ژن *parC*، PCR

کپی‌رایت © مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

### مقدمه

(MDR) می‌باشند (۲). فلوروکوئینولون‌ها، آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیفی می‌باشند که هم در انسان و هم در حیوانات و دامپزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳). علت اهمیت این آنتی-بیوتیک‌ها، ویژگی‌هایی است که آن‌ها را به آنتی‌بیوتیکی ایده‌آل برای درمان بیماری‌ها تبدیل نموده است که اثربخشی و دسترسی زیستی بالا، وسیع‌الطیف بودن، فرمولاسیون خوراکی و تزریقی داخل عروقی، سطوح سرمی بالا و پایین بودن احتمال بروز عوارض جانبی از جمله

کلبسیلا پنومونیه، مهم‌ترین گونه جنس کلبسیلا و از خانواده بزرگ انتروباکتریاسه است. این باکتری، یک پاتوژن فرصت‌طلب و مهم کسب‌شده از بیمارستان‌ها و عامل عفونت‌های مجاری ادراری، آرتریت نوزادان، مننژیت، عفونت زخم‌ها، پنومونی بیمارستانی، باکتریسمی، سپتی‌سمی و عفونت‌های بافت نرم هست. کلبسیلا پنومونیه همچنین پاتوژن بالقوه بیماری‌زای کسب‌شده از جامعه است (۱). بیشتر ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چندین دارو



این خصوصیات می‌باشد (۴). از علل ایجاد مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها می‌توان به جهش‌های کروموزومی، افزایش بیان ژن‌های درگیر در پمپ‌های تخلیه آنتی‌بیوتیکی و در نتیجه کاهش سطح انباشت فلوروکوئینولون‌ها در سلول و تغییر در آنزیم را نام برد (۵، ۶). به دنبال مصرف گسترده سفالوسپورین‌ها در سال‌های اخیر، شیوع عفونت‌های ایجادشده به‌وسیله جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، به‌طور چشمگیری از سراسر جهان گزارش شده است (۷). در بین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی-بیوتیک، بتالاکتامازها به عنوان دفاع اصلی باکتری‌های گرم منفی بویژه کلبسیلا پنومونیه در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام محسوب می‌شوند (۷). به علت افزایش چشمگیر مقاومت چند دارویی در میان پاتوژن‌های گرم منفی، فلوروکوئینولون‌ها اغلب به‌عنوان درمان تجربی بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی و غیر بیمارستانی تجویز می‌شدند (۴). بطوریکه مصرف سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید برای درمان عفونت‌های مجاری ادراری در اکثر کشورها در حال افزایش است و استفاده بیش‌ازحد مجاز این داروها منجر به ایجاد مقاومت و ناموفق بودن درمان شده است. ظهور مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در میان پاتوژن‌ها به‌ویژه در مراکز درمانی و بیمارستان‌ها به معضل بزرگ در رابطه با سلامت عمومی تبدیل شده است (۸، ۳). اگرچه فلوروکوئینولون‌هایی چون سیپروفلوکساسین اغلب برای درمان عفونت‌های ناشی از کلبسیلا پنومونیه مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما مقاومت این باکتری به این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها در حال افزایش است. به‌طوری‌که مشخص شده یکی از دلایل ایجاد مقاومت به فلوروکوئینولون‌هایی چون سیپروفلوکساسین کاهش تمایل توپوایزومرازهای II (DNA ژیراز و IV به این دارو است. این امر نتیجه جهش در زیر واحدهای این دو آنزیم DNA ژیراز (*gyrA* و *gyrB*) و توپوایزومراز IV (*parC* و *parE*) است (۱).

در حقیقت، فلوروکوئینولون‌ها با مهار آنزیم‌های DNA ژیراز و توپوایزومراز IV در باکتری باعث مهار رونویسی و همانندسازی می‌شوند. آنزیم DNA ژیراز از دو زیر واحد A و B (*gyrA* و *gyrB*) و توپوایزومراز IV از دو زیر واحد C و E (*parC* و *parE*) تشکیل شده است (۹).

مقاومت به کینولون‌ها در کلبسیلا پنومونیه و سایر باکتری‌های گرم منفی مانند /سینتوباکتر بومانی اغلب بر اثر جهش در نواحی تعیین‌کننده مقاومت به کینولون Quinolone (QRDRs) Resistance-Determining Regions از ژن‌های *gyrA*

*parC* رخ می‌دهد (۱۰-۱۲). این جهش‌ها منجر به تغییرات ساختاری در آنزیم‌های DNA ژیراز و توپوایزومراز IV و متعاقباً کاهش میل ترکیبی کینولون با کمپلکس DNA-آنزیم می‌شوند. برخی از متداول‌ترین تغییرات آمینواسیدی گزارش شده در بین سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به کینولون‌ها عبارت‌اند از: تبدیل گلیسین به والین در موقعیت ۸۱ (Gly81→Val)، استقرار لوسین به‌جای سرین در موقعیت ۸۳ (Ser83→Leu) تبدیل آلانین به پرولین در موقعیت ۸۴ (Ala84→Pro) و گلیسین به سیستئین در موقعیت ۸۱ (Gly81→Cys) در زیر واحد *gyrA* از DNA ژیراز و جایگزین شدن آمینواسیدهای لوسین و تریپتوفان در موقعیت ۸۰ به‌جای سرین (Ser80→Leu or phe) تبدیل گلوآمات به لیزین در موقعیت ۸۴ (Glu84→Lys) و لیزین به گلوآمات در موقعیت ۵۹ (Lys59→Gln) در زیر واحد *parC* از آنزیم توپوایزومراز IV است (۱۲-۱۴). جهش در موقعیت Ser83 از *gyrA* یک مکانیسم عمده است که می‌تواند سویه‌هایی مقاوم به نالیدیکسیک اسید یا فلوروکوئینولون‌ها با MIC برابر با ۴ mg/L به‌وجود آورد. با این وجود، جهش در ژن *parC* به‌عنوان یک مکانیسم ثانویه جهت ایجاد سویه‌های با مقاومت سطح بالا نسبت به کینولون‌ها، همواره با یکی از مکانیسم‌های وقوع جهش در *gyrA*، کاهش نفوذپذیری دارو و بیان زیاد پمپ‌های دفعی همراه می‌باشد (۱۴، ۱۳).

این تحقیق باهدف بررسی مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها و ارتباط آن با موتاسیون در ژن *parC* در جدایه‌های کلینیکی کلبسیلا پنومونیه انجام گردید.

## روش پژوهش

### جمع آوری، جدا سازی و تشخیص نمونه‌ها:

این مطالعه در سال ۱۳۹۷ و به‌صورت توصیفی - تحلیلی بر روی نمونه‌های کلینیکی جمع‌آوری شده از بیماران بستری شده در بخش‌های مراقبت ویژه، جراحی، مغز و اعصاب و نورولوژی از بیمارستان‌های بقیه‌الله، مسیح دانشوری، بعثت، هفت تیر و بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه مسعود تهران انجام شد. تمام ایزوله‌های مورد مطالعه پس از بررسی‌های بیوشیمیایی و همچنین با تکثیر منطقه 16S rRNA در واکنش PCR به‌عنوان کلبسیلا پنومونیه تأیید شدند. سپس از نظر مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها به روش دیسک‌دیفیوژن آگار مطابق توصیه موسسه استاندارد (CLSI 2018) غربالگری شدند.

## استخراج DNA

استخراج DNA با روش جوشاندن انجام شد (۱۵). پس از استخراج، برای اطمینان از وجود DNA، از دستگاه نانودراپ استفاده و سپس به منظور اطمینان از وجود DNA استخراج شده و بررسی کیفیت آن، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و در با استفاده از دستگاه Gel-Doc مشاهده و در دمای ۷۰- ذخیره شدند.

## تائید مولکولی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه

پس از شناسایی بیوشیمیایی ایزوله‌ها به منظور تائید مولکولی آن‌ها، حضور ژن *16S rRNA* از طریق واکنش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا پرایمرهای مورد استفاده طبق پروتکل شرکت سازنده با افزودن مقادیر مشخصی از آب دیونیزه استریل رقیق و

محلول‌های کاری از آن‌ها تهیه گردید، سپس واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرو لیتر جهت ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه انجام پذیرفت. بدین ترتیب که ۱۲/۵ میکرو لیتر از Master mix (شرکت سینا کلون)، ۱ میکرو لیتر از پرایمر رفت یا Forward، ۱ میکرو لیتر از پرایمر برگشت یا Reverse با میزان نهایی ۱۰ پیکومول، ۱ میکرو لیتر از DNA به عنوان الگو و ۹/۵ میکرو لیتر آب مقطر دو بار تقطیر استفاده گردید. پس از انجام واکنش PCR بر اساس پروتکل جدول ۵ میکرو لیتر از محصول PCR در چاهک ژل ساخته شده ریخته شد و در تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE 1x پس از برقراری جریان الکتریکی الکتروفورز شد. سپس ژل با استفاده از نورماورابنفش مورد ارزیابی قرار گرفت، اندازه باندهای به دست آمده در مقایسه با لدر ۱۰۰bp شرکت سینا کلون مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

Gene	Seq	Product size	Reference
<i>parC</i>	F 5'-CAGCTCGGCATACTTCGAC-3' R 5'-CCTGAAGTACTCCATGTACGTGAT-3'	۳۴۰bp	(۴)
<i>16S rRNA</i>	F 5'-ATTTGAAGAGGTTGCAACGAT-3' R 5'-TTCACCTCTGAAGTTTCTTGTGTTTC-3'	۱۳۰bp	(۱۶)

جدول ۲. برنامه دستگاه ترموسایکلر جهت PCR برای ژن 16S rRNA

Steps	Temperature	Time
Initial Denaturation	94°C	4 min
Denaturation	94°C	45 sec
Annealing	59°C	45 sec
Extension	72°C	45 sec
Final Extension	72°C	10 min

## آزمون آنتی‌بیوگرام

بعد از تعیین هویت نمونه‌های کلبسیلا پنومونیه، بررسی میزان مقاومت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، با انجام آزمون آنتی‌بیوگرام و با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی: آمپی‌سیلین ۱۰ میکروگرم، آموکسی‌سیلین ۱۰ میکروگرم، پپراسیلین ۱۰۰ میکروگرم، آمپی‌سیلین - سولباکتام ۱۰/۱۰ میکروگرم، سفپیم ۳۰ میکروگرم، سفیکسیم ۵ میکروگرم، ایمی‌پنم ۱۰ میکروگرم،

مروپنم ۱۰ میکروگرم، توپرامایسین ۱۰ میکروگرم، تتراسایکلین ۳۰ میکروگرم، سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم، نالیدیکسیک اسید ۳۰ میکروگرم، تری‌متوپریم - سولفامتوکسازول، کلرامفنیکل ۳۰ میکروگرم خریداری شده از شرکت MAST انگلستان به روش دیسک‌دیفیوژن آگار مطابق توصیه موسسه استاندارد (CLSI 2018) صورت گرفت و سپس قطر هاله عدم رشد به دست آمده را با جداول استاندارد (CLSI 2018) مقایسه و نتایج به صورت حساس، نیمه

آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین سولباکتام و آمپی‌سیلین کلاولانیک اسید (شرکت MAST انگلستان) انجام شد و تفاوت در قطر هاله عدم رشد آن‌ها باهم مقایسه گردید. در این آزمایش اگر قطر هاله عدم رشد در دیسک حاوی اسید کلاولانیک‌اسید و سولباکتام ۵ میلی‌متر یا بیشتر، از زمانی بود که فقط آنتی‌بیوتیک موردنظر بود، ESBL مثبت در نظر گرفته شد.

### شناسایی ژن *parC*

پس از انجام تست آنتی بیوگرام و مشخص شدن ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، به منظور بررسی وجود موتاسیون احتمالی در ژن *parC* و نقش احتمالی آن در مقاومت به این آنتی-بیوتیک قطعه‌ای از این ژن از طریق روش PCR و با استفاده پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) تکثیر گردید. مقدار مواد مورد استفاده در این مرحله همانند روش انجام PCR برای شناسایی ژن *16S rRNA* مرحله ۲-۳ و پروتکل دستگاه ترموسایکلر هم براساس (جدول ۳) بود. پس از انجام واکنش PCR برای ژن *parC*، محصول حاصل الکتروفورز و سپس از طریق دستگاه ژل داک مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت برای تعیین توالی، از طریق شرکت پیشگام بیوتکنولوژی به شرکت Applied Biosystems ارسال گردید. سپس نمونه‌های تعیین توالی شده از طریق نرم‌افزار Chromas خوانده شده و برای تأیید در سایت NCBI بلاست و تأیید شد که ژن تکثیرشده مربوط به زیر واحد A ژن توپوایزومراز IV باکتری کلبسیلا پنومونیه است. در ادامه برای بررسی وجود موتاسیون و برای درک تأثیر موتاسیون بر روی ساختار آنزیم توپوایزومراز IV و نقش احتمالی آن در مقاومت به سیپروفلوکساسین، از نرم‌افزارهای *Insilico* و *Clustalw2* استفاده شد. در این بررسی کلبسیلا پنومونیه ATCC 13883 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

حساس و مقاوم گزارش گردید. از سویه‌های رفرنس *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و ATCC 25922 برای کنترل دیسک‌های آنتی‌بیوگرام استفاده شد.

### سنجش MIC سیپروفلوکساسین با استفاده از روش میکروبراث دیلوژن

برای این منظور ابتداء رقت‌های ۰/۲۵-۱۰۲۴ µg/ml از سیپروفلوکساسین (مرک آلمان)، در محیط مولر هینتون براث (مرک آلمان) خالص، تهیه گردید. سپس از کشت خالص و ۲۴ ساعته باکتری‌های رشد یافته در محیط نوتریت آگار، سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل نیم مک فارلند (حاوی  $10^8 \times 1/5$  باکتری در هر میلی‌لیتر) در لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. سپس مقدار ۲۹۷ µl از محیط مولر هینتون براث حاوی رقت‌های مختلف از سیپروفلوکساسین به هر یک از چاهک‌های میکروتیتر پلیت اضافه شد و به هر یک از چاهک‌های حاوی رقت‌های مختلف سیپروفلوکساسین، مقدار ۳ µl از سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل نیم مک فارلند اضافه نموده و یک چاهک به عنوان کنترل مثبت (محیط کشت به همراه باکتری مورد آزمایش) و یک چاهک هم به عنوان کنترل منفی (فقط حاوی محیط کشت خالص) در نظر گرفته شد. سپس میکروپلیت‌ها را به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. در نهایت کمترین غلظتی از آنتی بیوتیک که فاقد کدورت قابل مشاهده بود، به عنوان MIC سیپروفلوکساسین تعیین گردید.

### آزمون تعیین وجود آنزیم‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs)

آزمون غربالگری اولیه برای شناسایی احتمال تولید ESBL در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه با استفاده از روش دیسک ترکیبی و با آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین به همراه

جدول ۳. برنامه ترموسایکلر جهت PCR برای ژن *parC*

Steps	Temperature	Time
Initial Denaturation	94°C	4 min
Denaturation	94°C	30 sec
Annealing	50°C	30 sec
Extension	72°C	1 min
Final Extension	72°C	7min

## یافته‌ها

### نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی

پس از آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی تعداد ۹۵ جدایه از مجموع نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه، کلبسیلا پنومونیه تشخیص داده شدند. (شکل شماره ۱). از ۹۵ ایزوله جدا سازی شده، ۱۲ جدایه مربوط به خون، ۵۶ جدایه مربوط به نمونه‌های ادراری و ۲۷ جدایه نیز مربوط به نمونه‌های حاوی خلط بیماران بود.

### نتایج حاصل از آنتی بیوگرام

نتایج حساسیت ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه نسبت به سیزده آنتی‌بیوتیک مختلف بکار رفته در این تحقیق در جدول شماره ۴ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین میزان مقاومت مربوط به دو آنتی-بیوتیک آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین (۹۸/۹٪)، کمترین میزان مقاومت ایمپنم (۱۳/۶٪) بود.

در این تحقیق از ۹۵ جدایه مورد مطالعه کلبسیلا پنومونیه، ۹۴ (۹۸/۹٪) جدایه به بیش از یک آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. تعاریف متفاوتی از باکتری‌های با مقاومت چند دارویی و مقاوم به همه‌ی داروها ارائه شده است، ولی اغلب، باکتری‌های MDR را به عنوان باکتری مقاوم به ۳ یا بیشتر از ۳ گروه آنتی‌بیوتیک یا به عنوان مقاوم به یک آنتی‌بیوتیک کلیدی در درمان و Extensive Drug Resistant (XDR) را به عنوان حساس به

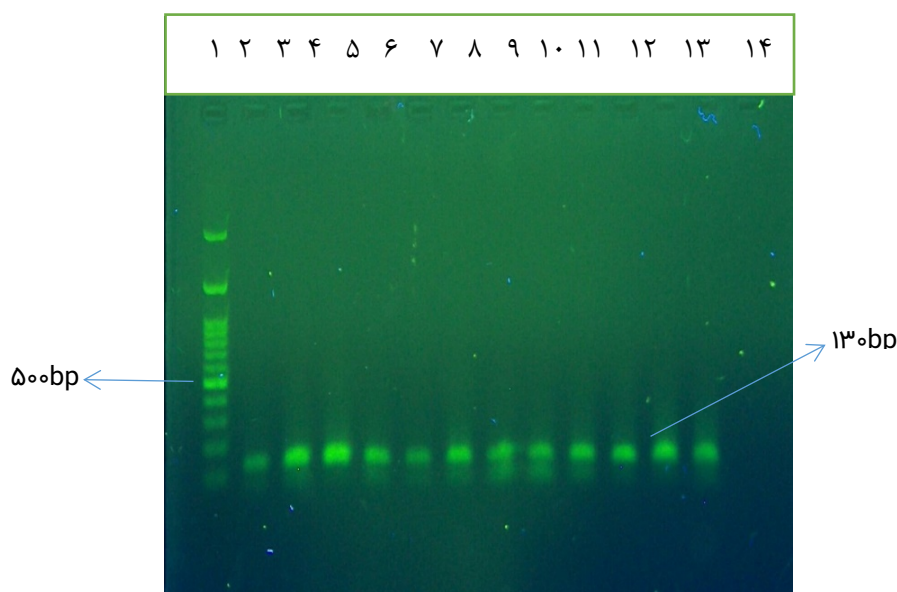
یک یا فقط دو گروه آنتی‌بیوتیک‌ها و Pandrug Resistant (PDR) را مقاوم به همه گروه‌های آنتی‌بیوتیکی در دسترس برای درمان تجربی عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌دانند. نتایج همچنین نشان داد که تقریباً ۶۷ جدایه از ۹۵ جدایه مورد بررسی به بیش از ۳ گروه آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه مقاومت دارند. با این توصیف حداقل ۷۰/۵٪ از جدایه‌های مورد بررسی، MDR و ۸ جدایه (۸/۴٪)، حساس به یک یا فقط دو گروه از آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه (XDR) بودند.

### نتایج حاصل از MIC ۲۳ ایزوله‌ی کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سیپروفلوکساسین

از ۹۵ ایزوله مورد مطالعه ۲۳ ایزوله نسبت به سیپروفلوکساسین (۲۴/۲٪) مقاوم بودند که نتایج بررسی MIC این باکتری‌ها نشان داد که میزان آن‌ها بین ۸ تا ۵۱۲ µg/ml متغیر بود (جدول شماره ۵).

### نتایج مربوط به آزمایش غربالگری اولیه و آزمون تأیید فنوتیپی جهت شناسایی جدایه‌های مولد ESBLs

از ۹۵ جدایه تأیید شده کلبسیلا پنومونیه، ۹۴ (۹۸/۹٪) جدایه‌های مقاوم به آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین (جدایه محتمل بر تولید ESBLs، ۷۲/۶٪) ۶۹ جدایه ESBLs<sup>+</sup> و ۲۶ جدایه ESBLs<sup>-</sup> شناخته شدند.



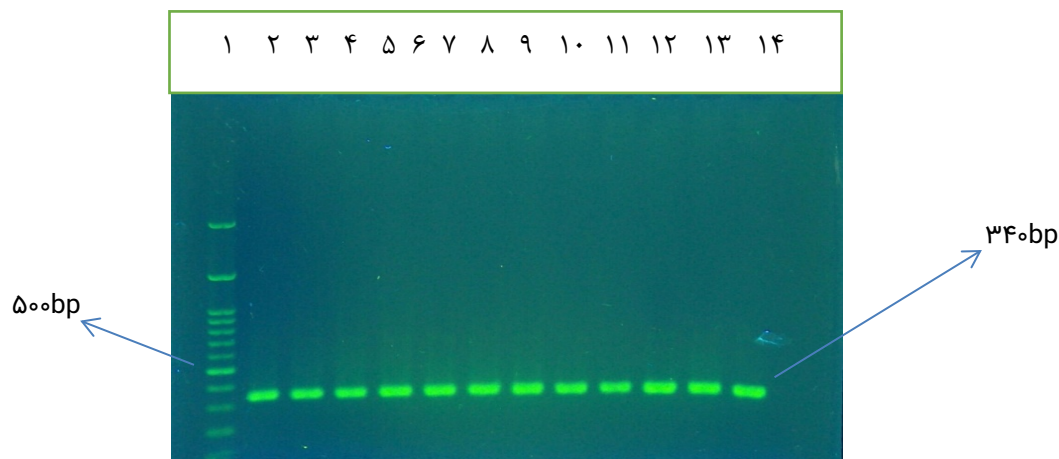
شکل ۱. نتایج الکتروفورز محصول PCR برای تکثیر ژن ۱۶ rRNA S با باندهایی با وزن مولکولی ۱۳۰ جفت باز ستون ۱ مارکر bp100 (شرکت سینا کلون) و ستون ۲ کنترل مثبت، ستون‌های ۱۳-۳ محصول PCR bp130 ژن 16S rRNA سویه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه و ستون ۱۴ کنترل منفی

جدول ۴. نتایج آنتی‌بیوگرام ایزوله‌های بررسی‌شده در این مطالعه

آنتی‌بیوتیک	حساس n (%)	حد وسط n (%)	مقاوم n (%)
سفپیم ۳۰ میکروگرم	۶۷ (% ۷۰/۵۳)	۱ (% ۱/۰۵)	۲۷ (% ۲۸/۴۲)
توبرامایسین ۱۰ میکروگرم	۷۲ (% ۷۵/۷۹)	۸ (% ۸/۴۲)	۱۵ (% ۱۵/۷۹)
کلرامفنیکل ۳۰ میکروگرم	۷۱ (% ۷۴/۷۴)	۸ (% ۸/۴۲)	۱۶ (% ۱۶/۸۴)
سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم	۶۱ (% ۶۴/۲۱)	۱۱ (% ۱۱/۵۸)	۲۳ (% ۲۴/۲۱)
نالیدیکسیک اسید ۳۰ میکروگرم	۵۶ (% ۵۸/۹۵)	۱۳ (% ۱۳/۶۸)	۲۶ (% ۲۷/۳۷)
تری‌متوپریم - سولفامتوکسازول ۷۵ میکروگرم	۶۲ (% ۶۵/۲۶)	۰	۳۳ (% ۳۴/۷۴)
پیپراسیلین ۱۰۰ میکروگرم	۹ (% ۹/۴۸)	۲۰ (% ۲۱/۰۵)	۶۶ (% ۶۹/۴۷)
تتراسایکلین ۳۰ میکروگرم	۶۵ (% ۶۸/۴۲)	۶ (% ۶/۳۲)	۲۴ (% ۲۵/۲۶)
ایمی‌پنم ۱۰ میکروگرم	۷۷ (% ۸۱/۰۵)	۵ (% ۵/۲۶)	۱۳ (% ۱۳/۶۹)
سفکسیم ۵ میکروگرم	۵۷ (% ۶۰)	۳ (% ۳/۱۶)	۳۵ (% ۳۶/۸۴)
مروپنم ۱۰ میکروگرم	۷۵ (% ۷۸/۹۵)	۱ (% ۱/۰۵)	۱۹ (% ۲۰)
آمی‌سیلین ۱۰ میکروگرم	۱ (% ۱/۰۵)	۰	۹۴ (% ۹۸/۹۵)
آموکسی‌سیلین ۱۰ میکروگرم	۱ (% ۱/۰۵)	۰	۹۴ (% ۹۸/۹۵)

جدول ۵. میزان MIC ۲۳ ایزوله‌ی کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سیپروفلوکساسین

آنتی‌بیوتیک	طیف MIC (μg/ml)	تعداد ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه با میزان MIC تعیین‌شده
سیپروفلوکساسین	۰/۲۵ - ۵۱۲	۰/۲۵ ۰/۵ ۱ ۲ ۴ ۸ ۱۶ ۳۲ ۶۴ ۱۲۸ ۲۵۶ ۵۱۲ ۱۰۲۴
تعداد ایزوله‌ها	-	- - - ۲ ۱ ۳ - ۸ - - ۹ -



شکل ۲. نتایج الکتروفورز محصول PCR برای تکثیر ژن *parC* با باندهایی با وزن مولکولی ۳۴۰ جفت باز، ستون ۱ مارکر ۱۰۰ bp (شرکت سینا کلون) و ستون ۲ کنترل مثبت، ستون‌های ۱۳-۳ محصول ۳۴۰bp PCR ژن *parC* سویه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه و ستون ۱۴ کنترل منفی

### نتایج حاصل از تعیین توالی ژن *parC*

نتایج نشان داد تمامی ۲۳ نمونه مورد مطالعه در ژن *parC* دچار موتاسیون در یک یا چند نقطه می‌باشند. مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن *parC* با نمونه استاندارد (کلبسیلا پنومونیه ATCC ۱۳۸۸۳)، نشان داد که موتاسیون سبب تغییر توالی آمینواسیدی در ۱۷ جدایه از ۲۳ مورد بررسی گردیده است؛ که در ۱۶ جدایه از ۲۳ جدایه مورد بررسی، این جایابی در کدون شماره ۸۰ رخ داد که منجر به تبدیل سرین (S) به ایزولوسین (I) شد و

در یک نمونه نیز در کدون شماره ۸۴ دچار تغییر شده بود که در آن اسید آمینه گلوتامیک اسید (E) با اسید آمینه لیزین (K) جایجا گردید. ۳ موتاسیون نیز باعث تغییر در چارچوب و تغییر گسترده در توالی آنزیم توپوایزومراز IV شده بود و در سه نمونه نیز موتاسیون منجر به تغییر توالی اسید آمینه نشده بود؛ بنابراین شایع‌ترین موتاسیون مربوط به کدون شماره ۸۰ بود که در آن به جای سرین در اثر موتاسیون ایزولوسین ایجاد می‌شد (شکل‌های ۳، ۴ و ۵).

#### DNA topoisomerase IV subunit A

```
Query 11 GCATGGCGGCG--AGATTTGGGATCGTCCGGCGCCCCCAGTTTCCCTGACCATCCACCA 68
|||||
Sbjct 701656 GCATGGCGGCGAAGATTTGGGATCGTCCGGCGCCCCCAGTTTCCCTGACCATCCACCA 701597

Query 69 GCGGATAGCGGTAAGAGAACGGCTGCGCCATCAGCACCATCGCTTCATAGCAGGCGATGT 128
|||||
Sbjct 701596 GCGGATAGCGGTAAGAGAACGGCTGCGCCATCAGCACCATCGCTTCATAGCAGGCGATGT 701537

Query 129 CGCCGTGCGGGTGATATTTACCCAACACGTCGCCGACAGTGCGGGCGGACTTTTGAATT 188
|||||
Sbjct 701536 CGCCGTGCGGGTGATATTTACCCAACACGTCGCCGACAGTGCGGGCGGACTTTTGAATT 701477

Query 189 TCGCGCTGGCGTTTACCCCCAGCTCGGACATCGCATAGACGATGCGACGCTGGACCGGTT 248
|||||
Sbjct 701476 TCGCGCTGGCGTTTACCCCCAGCTCGGACATCGCATAGACGATGCGACGCTGGACCGGTT 701417

Query 249 TTAAGCCATCGCCAATAAACGGTAATGCCCTGTCCATGATCACGTACATGGAGTAGTTCA 308
|||||
Sbjct 701416 TTAAGCCATCGCCAATAAACGGTAATGCCCTGTCCATGATCACGTACATGGAGTAGTTCA 701357

Query 309 GG 310
||
Sbjct 701356 GG 701355
```

شکل ۳. بررسی وجود موتاسیون در قطعه از ژن *parC* تکثیر شده و مقایسه آن با نمونه استاندارد موجود در سایت NCBI، قسمت رنگی محل وقوع موتاسیون را در کدون شماره ۸۰ نشان می‌دهد.





## بحث

کلبسیلا عامل طیف وسیعی از بیماری‌ها شامل باکتری، پنومونی و عفونت مجاری ادراری بوده و یکی از مهم‌ترین باکتری‌هایی است که در دهه‌های اخیر به علت مصرف بی‌رویه و غیرعلمی آنتی‌بیوتیک‌ها شاهد ظهور و گسترش سویه‌های با مقاومت دارویی آن هستیم (۳). فلورکینولون‌ها، دسته‌ای از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف هستند که به دلیل جذب خوراکی بالا کاربرد گسترده در پزشکی دارند و به دلیل اینکه فلورکینولون‌ها کاملاً سنتزی بوده و مکانیسم عمل پیچیده‌ای دارند، ظهور سویه‌های میکروبی مقاوم به آن‌ها، در ابتدا امری بعید به نظر می‌رسید، اما متأسفانه استفاده گسترده از این آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به گسترش مقاومت نسبت به آن‌ها در سال‌های اخیر گردیده است (۱۷-۱۹). آنزیم‌های DNA gyrase و توپوایزومراز IV که عملکرد آن‌ها در همانندسازی و رونویسی ضروری است، اهداف داروهای فلوروکوئینولون می‌باشند. مقاومت باکتری‌های گرم منفی به فلورکینولون‌ها اغلب در نتیجه موتاسیون کروموزومی و جابجایی اسیدهای آمینه خاصی در ناحیه تعیین‌کننده مقاومت به کینولون (QRDR) ژن‌های *gyrA* و *gyrB* که آنزیم DNA gyrase و ژن‌های *parC* و *parE* که کد کننده توپوایزومراز IV هستند رخ می‌دهد (۲۰، ۲۱). هدف از این مطالعه بررسی الگوی مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها و ارتباط آن با موتاسیون در ژن *parC* در میان جدایه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه هست. در این تحقیق میزان مقاومت ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، پیراسیلین، سفیکسیم، تری‌متوپریم - سولفامتوکسازول، سفیپیم، نالیدیکسیک اسید، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، مروپنم، کلرامفنیکل، توبرامایسین و ایمی‌پنم، به ترتیب  $98/9\%$ ،  $98/4\%$ ،  $96/8\%$ ،  $36/8\%$ ،  $34/7\%$ ،  $28/4\%$ ،  $27/3\%$ ،  $25/2\%$ ،  $24/2\%$ ،  $20\%$ ،  $16/8\%$ ،  $15/7\%$ ،  $13/6\%$  است. ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه بیشترین مقاومت را به آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین  $98/9\%$  و کمترین میزان مقاومت را به ایمی‌پنم  $13/6\%$  نشان دادند. گزارش‌ها در ایران حاکی از افزایش میزان مقاومت جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی است و در این راستا مطالعات زیادی صورت گرفته است. از جمله مطالعه‌ای که در سال ۱۳۹۳ توسط Ahanjan et al، بر روی ۴۵ ایزوله کلبسیلا پنومونیه صورت گرفت بیشترین مقدار مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم (۱۰۰ درصد) و سفنازیدیم (۱۰۰ درصد) بود، جنتامایسین (۶۳ درصد) گزارش شد

و کمترین میزان مقاومت به کلیستین (۱۳ درصد) و کلرامفنیکل (۶ درصد) گزارش شد (۲۲).

در مطالعه ای دیگر که توسط Hashemi et al، در سال ۹۳ روی ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه صورت گرفت میزان مقاومت به آزترونام (۵۶ درصد)، مروپنم (۲۰ درصد)، جنتامایسین (۳۶ درصد)، سیپروفلوکساسین (۵۳ درصد)، سفوتاکسیم (۵۶ درصد)، کلیستین (۰ درصد)، سفوتاکسیم (۶۴ درصد)، تتراسایکلین (۵۰ درصد) گزارش شد (۲۳)؛ که با مقایسه آنتی‌بیوتیک‌های مشابه بکار رفته در این تحقیقات با مطالعه حاضر، تقریباً مشابه می‌باشند. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که  $72/6\%$  از جدایه‌ها  $ESBLs+$  و  $70/5\%$  از جدایه‌های موردبررسی، MDR و  $8/4\%$  از جدایه‌ها نیز XDR بودند. در این مطالعه هیچ ایزوله مقاوم به همه داروها (PDR) مشاهده نشد؛ که نتایج از افزایش قابل توجه جدایه‌های  $ESBLs+$  و MDR نسبت به مطالعه Pournali Sheshblouki et al، در سال ۱۳۹۵ دارد (۲۴) و لی بانایج حاصل از مطالعه Shivaee et al، مطابقت دارد (۲۵).

نتایج همچنین نشان داد از ۹۵ ایزوله کلبسیلا پنومونیه  $24/2\%$  از جدایه‌ها به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند؛ که تقریباً با مطالعه صورت گرفته توسط Norouzi et al، در سال ۲۰۱۴ در کرمان که از ۱۱۱ نمونه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از خون، ادرار، ترشحات تنفسی و زخم ۱۹ درصد جدایه‌ها به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و مطالعه Pournali Sheshblouki et al، در سال ۱۳۹۵ که بر روی ۱۱۱ جدایه کلبسیلا پنومونیه به دست آمده از نمونه‌های خون، ادرار، زخم، تراشه و برونکوالونلار در بیمارستان‌های شیراز انجام شد و در آن ۳۳ درصد موارد مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند، مطابقت داشت (۲۴، ۲۶) ولی با نتایج مطالعه Molana et al، در سال ۱۳۸۹ که بر روی ۳۰ جدایه کلبسیلا پنومونیه نمونه‌برداری شده از محیط و تجهیزات بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان شهید بهشتی شهر بابل انجام شد و در آن ۶۰ درصد ایزوله‌ها مقاوم به سیپروفلوکساسین تشخیص داده شدند و مطالعه Mohammad Alipor et al، در سال ۲۰۱۳ در تبریز از ۶۱ نمونه کلینیکی کلبسیلا پنومونیه جدا شده از خون، ادرار، زخم و دیگر نمونه‌های بخش ICU،  $61/9\%$  درصد جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین مقاوم بودند مطابقت نداشت (۲۷، ۴)؛ که علت آن می‌تواند مربوط به شیوع متفاوت عفونت‌ها در استان‌های مختلف و همچنین دلایل متنوع

ژنتیکی در ایجاد مقاومت در این عفونت‌ها، تفاوت در موضع جمع‌آوری جدایه‌ها، تعداد ایزوله‌ها، نوع نمونه‌های جمع‌آوری شده، نوع دیسک‌های مورد استفاده و یا خطای پرسنلی می‌تواند از دلایل تفاوت در میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در مطالعات مختلف باشد. با توجه به تحقیقات صورت گرفته در نواحی مختلف میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین متفاوت است ولی به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک انتظار می‌رود میزان مقاومت افزایش یابد. مقاومت به سیپروفلوکساسین به‌واسطه جهش در چندین ژن از جمله زیر واحد *parC* در توپوایزومراز IV کلبسیلا پنومونیه رخ می‌دهد. در مطالعات مختلف انواع جهش‌ها در ژن *parC* در کلبسیلا پنومونیه که با مقاومت در سیپروفلوکساسین همراه است گزارش شده است. در این بین مطالعات زیادی جهش در کدون‌های ۸۰ و ۸۴ را در ژن *parC* گزارش کرده‌اند که شامل S80I و E84K است. هرچند در مطالعات مختلف وقوع یک یا چند جهش در *parC* در جدایه‌های مقاوم گزارش شده است، در مطالعه حاضر نتایج نشان داد تمامی ۲۳ نمونه مورد مطالعه در ژن *parC* دچار موتاسیون در یک یا چند نقطه می‌باشند و مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن *parC* با ژن *parC* نمونه استاندارد کلبسیلا پنومونیه ATCC13883، نشان داد که موتاسیون سبب تغییر توالی آمینواسیدی در ۲۰ جدایه از ۲۳ مورد بررسی گردیده است؛ که در ۱۶ جدایه از ۲۳ جدایه مورد بررسی، این جابجایی در کدون شماره ۸۰ رخ داد که منجر به تبدیل سرین (S) به ایزولوسین (I) شد و در یک نمونه نیز در کدون شماره ۸۴ دچار تغییر شده بود که در آن اسیدآمینه E (گلوتامیک‌اسید) با اسیدآمینه K (لیزین) جابجا گردید، ۳ موتاسیون نیز باعث تغییر در چارچوب و تغییر گسترده در توالی آنزیم توپوایزومراز IV شده بود و در سه نمونه نیز موتاسیون منجر به تغییر توالی اسیدآمینه نشده بود؛ بنابراین شایع‌ترین موتاسیون مربوط به کدون شماره ۸۰ بود که در آن به‌جای سرین در اثر موتاسیون ایزولوسین ایجاد می‌شد.

البته تبدیل گلوتامیک‌اسید به آمینواسیدهای لیزین، آلانین و گلیسین در مطالعات مختلف از جمله مطالعه *Minarini et al*، در برزیل بین سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۵ (۲۷)، *Brisse et al*، در هلند سال ۲۰۰۱ (۲۹)، *Deguchi et al*، سال ۱۹۹۶ در ژاپن (۳) مشاهده شد.

در مطالعه *Brisse et al*، در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه چندین جهش از جمله S80I و E84K مشاهده شد (۲۹). در مطالعه *Piekarska et al*، در سال ۲۰۱۵، نیز هر دو جهش در جدایه‌های مقاوم به فلوروکوئینولون‌ها شناسایی شد (۳۰). در مطالعه

در مطالعات مختلفی چون مطالعه *Brise* و *Piekarska* نیز در بعضی از جدایه‌های مقاوم به فلوروکوئینولون‌ها جهش E84K گزارش شد (۲۹، ۳۰). در مطالعه *Norouzi et al*، از بین ۱۱۱ جدایه کلبسیلا پنومونیه ۶ جدایه دارای جهش در ژن *parC* بودند که تنها دو مورد جهش شایع S80I را داشتند. در مطالعه *Norouzi et al*، جهش E84K مشاهده نشد (۲۶). جهش E84K یکی از چند جهش شایع در *parC* محسوب می‌شود که در جدایه‌های مقاوم به فلوروکوئینولون‌ها گزارش شده است. وقوع این جهش در یک جدایه کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سیپروفلوکساسین در این مطالعه نشان‌دهنده اهمیت آن در ایجاد مقاومت به دارو است. اکثر نتایج مورد بررسی و همچنین نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که موتاسیون نقطه‌ای در کدون‌های ۸۰ و ۸۴ ژن *parC* در اغلب نمونه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین وجود دارد و در این میان موتاسیون نقطه‌ای در کدون ۸۰ از اهمیت بیشتری برخوردار است.

### نتیجه‌گیری

مقاومت دارویی همچنان در حال افزایش است. با توجه به اینکه سیپروفلوکساسین جزء آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر در درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از کلبسیلا پنومونیه است وجود ۲۳ جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین از ۹۵ جدایه و همچنین مقاومت به دوزهای بالای سیپروفلوکساسین در این مطالعه خطر خاموش

محترم آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی  
واحد کرج نهایت تشکر و قدردانی رادارند.

## تعارض در منافع

در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ گونه تضاد منافی  
نداشته اند.

## منابع مالی

منابع مالی این مطالعه توسط نویسندگان تامین شده است.

## Referance

- Alves MS, Dias RC, De Castro AC, Riley LW, Moreira BM. Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp. J Clin Microbiol. 2006 October;44(10):3646-3640. [DOI:10.1128/JCM.00940-06] [PMID] [PMCID]
- Babypadmini S, Appalaraju B. Extended spectrum-lactamases in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* prevalence and susceptibility pattern in a tertiary care hospital. Indian Journal of Medical Microbiology. 2004;22(3):172.
- Deguchi T, Fukuoka A, Yasuda M, Nakano M, Ozeki S, Kanematsu E, et al. Alterations in the *gyrA* subunit of DNA gyrase and the *parC* subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(3):699. [DOI:10.1128/AAC.41.3.699] [PMID] [PMCID]
- Molana Z, Ferdosi Shahandashti E, Gharavi S, Shafii M, Norkhomami S, Ahangarkani F, et al. Molecular investigation of class I integron in *Klebsiella pneumoniae* isolated from intensive care unit (Shahid Beheshti Hospital of Babol 2010). J Babol Univ Med Sci 2011;13(6): 7-13.
- Ferragut C, Izard D, Gavini F, Kersters K, De Ley J, Leclerc H. *Klebsiella trevisanii*: a new species from water and soil. Int J Syst Bacteriol. 1983; 33(2):133-42. [DOI:10.1099/00207713-33-2-133]
- Izard D, Ferragut C, Gavini F, Kersters K, De Ley J, Leclerc H. *Klebsiella terrigena*, a new species from soil and water. Int J Syst Bacteriol. 1981; 31(2): 116-27. [DOI:10.1099/00207713-31-2-116]
- Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with 201 description of *R. ornithinolytica* comb. nov., *R. terrigena* comb. nov. and *R. planticola* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51(3): 925-32. [DOI:10.1099/00207713-51-3-925] [PMID]
- Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, Hansen DS, Von Gottberg A, Mohapatra S, et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. Emerg Infect Dis. 2002;8(2):160-6. [DOI:10.3201/eid0802.010025] [PMID] [PMCID]
- Rahmati Roodsari R, Fallah F, Taherpour A, Hakemi M, Hashemi A. Carbapenem- Resistant Bacteria and Laboratory Detection Methods. Archives of Pediatric Infectious Diseases. 2013; 1(4): 191-188. [DOI:10.5812/pedinfect.5193]
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008; 21(3): 538-582. [DOI:10.1128/CMR.00058-07] [PMID] [PMCID]
- Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Dacker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(10): 3471-84. [DOI:10.1128/AAC.01464-06] [PMID] [PMCID]
- Chien ST, Lin CH, Hsueh JC, Lip L, Hsu CH, Chang SH, et al. Mutation of *gyrA* and *parC* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and its relationship with antimicrobial drugs resistance in Taiwan. Annals of Microbiology. 2009; 59(2): 369-372 [DOI:10.1007/BF03178341]
- Hamouda A, Amyes SG. Novel *gyrA* and *parC* point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. J Antimicrob Chemother. 2004; 54(3): 695-6. [DOI:10.1093/jac/dkh368] [PMID]



14. Chiu CH, Lee HY, Tseng LY, Chen CL, Chia JH, Su LH, et al. Mechanisms of resistance to ciprofloxacin, ampicillin/sulbactam and imipenem in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 35(4): 382-6. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.009] [PMID]
15. Hujer K, Hujer A, Hulten E, Bajaksouzian S, Adams J, Donskey C, et al. "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): 4114-23. [DOI:10.1128/AAC.00778-06] [PMID]
16. Mohammad Alipour Z, Asadpour L, Ranji N. Fluoroquinolone resistance and mutation in *gyrA* gene in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Med Microbiol* 2016;10(5): 31-7.
17. Fallah F, Taherpour A, Hakemi Vala MH, Hashemi A. Global spread of New Delhi Mettallo - beta - lactamase -1 (NDM -1) *Archives of Clinical Infectious Diseases*. 2012; 6(4):177-171.
18. Chander Y, Ramakrishnan M, Jindal N, Hanson K, Goyal SM. Differentiation of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* by multiplex polymerase chain reaction. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 2011;9(2):138.
19. Conejo MC, Domínguez MC, López-Cerero L, Serrano L, Rodríguez-Baño J, Pascual A. Isolation of multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca* carrying bla IMP-8, associated with OXY hyperproduction, in the intensive care unit of a community hospital in Spain. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;3-1071: 65(5). [DOI:10.1093/jac/dkq063] [PMID]
20. Mahmood A, Al Hakawati MI. Non-beta-lactam Antimicrobials versus Extended Spectrum Beta-lactamase Producing Gram Negative Bacteria: In vitro Susceptibility Study. *Infect Dis Soc of Pak*. 2011;43(5): 507-11.
21. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(27): E3574-E81. [DOI:10.1073/pnas.1501049112] [PMID]
22. Ahanjan M, Naderi F, Solimanii A. Prevalence of Beta-lactamases genes and antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* isolated from teaching hospitals, Sari, Iran, 2014. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2017; 27 (149):79-87 (Persian).
23. Hashemi A, Fallah F, Taherpour A, Goudarzi H, Erfanianesh S, Taki E. Evaluation of genetic pattern and determination of *oqxA* gene expression levels among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* strains. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2014;24(119):48-61.
24. Pourali Sheshblouki G, Mardaneh J, Hosseinzadeh Z. *Klebsiella pneumoniae* Infections in Hospitalized Patients: Characterization of Antibiotic Cross-resistance and Detection of Cefepime Susceptible-dose Dependent (SDD) Strains. *J Fasa Univ Med Sci* 2016;6(1): 52-9.
25. Shivaee A, Meskini M, Shahbazi Sh, Hasani D, Masjedani Jazi F, Zargar M. Prevalence of *flmA*, *flmH*, *mrkA*, *ecpA*, and *mrkD* virulence genes affecting biofilm formation in clinical isolates of *K. pneumoniae*. *Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences*. 2019; 23, (2): 168-176.
26. Norouzi A, Azizi O, Hosseini H, Shakibaie S, Shakibaie Mr. Amino acid substitution mutations analysis of *gyrA* and *parC* genes in clonal lineage of *Klebsiella pneumoniae* conferring high-level quinolone resistance. *J Med Microbiol Infectious Diseases* 2014;2(3): 109-17.
27. Mohammad Alipor AH, Shams F, Aghazadeh M. Assessment of epsilometer test over 3 molecular detection for quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates: A predictable schedule on routine basis. *Life Sci J* 2014;11(12s): 1027-31.
28. Minarini LA, Darini ALC. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in Enterobacteriaceae isolates from Brazil. *Braz J Microbiol*. 2012 Oct;43(4):1309-14. [DOI:10.1590/S1517-83822012000400010] [PMID]
29. Brisse S, Verhoef J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51(Pt 3):915-24. [DOI:10.1099/00207713-51-3-915] [PMID]
30. Piekarska K, Wolkowicz T, Zacharczuk K, Rzeckowska M, Chrost A, Bareja E, et al. Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in *gyrA* and *parC* among fluoroquinolone-resistant clinical Enterobacteriaceae isolated in a tertiary hospital in Warsaw, Poland. *Int J Antimicrob Agents* 2015;45(3):238-43. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2014.09.019] [PMID]
31. Park KS, Yang HS, Nam YS, Lee HJ. Mutations in DNA Gyrase and Topoisomerase IV in Ciprofloxacin-Nonsusceptible Extended-Spectrum -

Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Clin lab 2017;63(3): 535-41.  
[DOI:10.7754/Clin.Lab.2016.160924] [PMID]

32. Chen FJ, Lauderdale TL, Ho M, Lo HJ. The roles of mutations in *gyrA*, *parC*, and *ompK35* in fluoroquinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Microb Drug Resist. 2003;9(3):265-71.  
[DOI:10.1089/107662903322286472] [PMID]