Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 5 (November - December)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Fluoroquinolone resistance and mutation in *gyrA* gene in clinical isolates of *Klebsiella pnemoniae*

Zahra Mohammadalipour[1], Leila Asadpour[1], Najmeh Ranji[2]

1. Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Rasht, Rasht, Iran
2. Department of Genetic, Faculty of Science, Islamic Azad University of Rasht, Rasht, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2015/11/02
Accepted: 2016/09/04
Available online: 2016/10/17

Article Subject:
Drug Resistance

IJMM 2016; 10(5): 31-37

Corresponding author at:

Dr. Leila Asadpour

Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Rasht, Rasht, Iran

Tel: 0989113383860

Email:
Asadpour@iaurasht.ac.ir

Abstract

Background and Aim: Fluoroquinolone resistance has been mainly associated with mutation in *gyr* and *par* genes bacteria and specific amino acids alteration in gram negative bacteria. In the present study, urinary tract infection isolates of *Klebsiella pneumonia* were investigated for fluoroquinolone resistance and mutation patterns of *gyrA* gene in ciprofloxacin resistant isolates.

Materials and Methods: In 2014, Susceptibility to fluoroquinolones in 46 isolates of *K. pneumoniae* was tested by the disc diffusion method whereas broth macrodilution method was used to investigate ciprofloxacin minimum inhibitory concentration. Mutations in the quinolone resistance-determining regions (QRDR) was investigated in chromosomal *gyrA* gene in quinolone-resistant *K. pnemoniae* isolates, by PCR amplification of *gyrA* gene and sequencing.

Results: Out of 46 tested bacteria, ten (21.7%) isolates recognized as fluoroquinolones resistant. Minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin for resistant isolates ranged between 64 to 2048 µg/mL. In *gyrA* gene sequence analyses, 8 (80%) isolates had an amino acid substitution. In six isolates mutation occurred in Asp87 that amino acid alters with Alanine and asparagine. Also Ser83Ile substitution was found in one isolate.

Conclusions: The obtained results demonstrated that *gyrA* mutation is one of the most important mechanisms of resistance to ciprofloxacin in clinical isolates of *K. pneumonia* in Rasht.

KeyWords: *Klebsiella pnemoniae*, Fluoroquinolone resistance, *gyrA*

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

MohammadAlipour Z, Asadpour L, Ranji N. Fluoroquinolone resistance and mutation in gyrA gene in clinical isolates of Klebsiella pnemoniae. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (5) :31-37

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۵ – آذر و دی ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

مقاومت به فلورکینولون ها و موتاسیون ژن *gyrA* در جدایه های بالینی *کلبسیلا پنومونیه*

زهرا محمد علی پور[۱]، لیلا اسدپور[۱]، نجمه رنجی[۲]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، رشت، ایران

۲. گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، رشت، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۴/۰۸/۱۱

پذیرش: ۱۳۹۵/۰۶/۱۴

انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۰۷/۲۶

موضوع:

مقاومت دارویی

IJMM 1395; 10(5): 31-37

نویسنده مسئول:

دکتر لیلا اسدپور

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، رشت، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۱۳۳۸۳۸۶۰

پست الکترونیک:

m.maghbooli@zums.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: مقاومت باکتری‌های گرم منفی به فلورکینولون ها اغلب درنتیجه موتاسیون کروموزومی و جابجایی اسیدهای آمینه خاصی در ژن‌های *gyr* و *par* می‌باشد. در مطالعه حاضر مقاومت *کلبسیلا پنومونیه* های جداشده از عفونت ادراری به آنتی‌بیوتیک‌های فلورکینولونی و موتاسیون های ژن *gyrA* در جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین بررسی گردید.

مواد و روش کار: در سال ۱۳۹۳، مقاومت ٤٦ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* به فلورکینولون با روش انتشار از دیسک و MIC سیپروفلوکساسین، به روش براث ماکرودایلوشن تعیین گردید. موتاسیون در ناحیه تعیین‌کننده مقاومت به کینولون ها در ژن *gyrA* *کلبسیلا پنومونیه* های مقاوم، از طریق تکثیر این ژن در واکنش PCR و بررسی توالی نوکلئوتیدی محصول بررسی گردید.

یافته‌ها: از ٤٦ جدایه مورد بررسی، تعداد ۱۰ جدایه (۲۱/۷٪) مقاوم به فلورکینولون ها بودند. میزان *MIC* سیپروفلوکساسین در این جدایه ها از ٦٤ تا ۲۰٤۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود. در ۸ جدایه از ۱۰ جدایه مقاوم، موتاسیون منجر به جابجایی اسیدهای آمینه مشاهده گردید. در ٦ جدایه در کدون شماره ۸۷ موتاسیون منجر به‌جایگزینی آلانین و آسپارژین به‌جای آسپارتیک اسید گردید. همچنین در یک مورد در کدون شماره ۸۳ جایگزینی سرین به ایزولوسین مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد جهش در ژن *gyrA* یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* در رشت می‌باشد.

کلمات کلیدی: *کلبسیلا پنومونیه*، مقاومت به فلورکینولون، ژن *gyrA*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه یکی از باکتری‌های گرم منفی روده‌ای است که جزئی از میکروفلور طبیعی بدن انسان را تشکیل می‌دهد. *کلبسیلا* عامل طیف وسیعی از بیماری‌ها شامل باکتریمی، 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 (۱). متأسفانه جدایه های با مقاومت چندگانه *کلبسیلا*، پلاسمید های کد کننده بتالاکتاماز را دریافت نمودند که به‌سرعت در میان *انتروباکتریاسه* گسترش یافت و منجر به افزایش مرگ‌ومیر در عفونت‌های ناشی از این باکتری گردید (۲، ۳). به‌ویژه به دنبال استفاده گسترده از سفالوسپورین ها در سال‌های اخیر ، شیوع عفونت‌های ایجادشده به‌وسیله جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف، به‌طور چشم‌گیری از سراسر جهان گزارش‌شده است (۴). فلورکینولون ها، دسته‌ای از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف هستند که به دلیل جذب خوراکی بالا کاربرد گسترده در پزشکی دارند. این آنتی‌بیوتیک‌ها کارایی بالایی بر ضد باکتری‌های *انتروباکتریاسه* داشته در درمان عفونت‌های دستگاه ادراری ناشی از باکتری‌های گرم منفی هوازی مورداستفاده قرار می‌گیرند (۵). به دلیل اینکه فلورکینولون ها 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 (۹-۶) که این امر به‌ویژه در اعضای *انتروباکتریاسه* تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع الطیف متداول است (۱۰،۱۱). آنزیم‌های DNA gyrase و توپوایزومرازIV که عملکرد آن‌ها در همانندسازی و رونویسی ضروری است، اهداف داروهای فلورکینولون می‌باشند. مقاومت باکتری‌های گرم منفی به فلورکینولون ها اغلب درنتیجه موتاسیون کروموزومی و جابجایی اسیدهای آمینه خاصی در ناحیه تعیین‌کننده مقاومت به کینولون (QRDR) ژن‌های *gyrA* و *gyrB* که آنزیم DNA gyrase را کد می‌کنند و ژن‌های *parC* و *parE* که کد کننده توپوایزومرازIV هستند رخ می‌دهد (۱۲،۱۳). در *gyrA* بروز موتاسیون های نقطه‌ای فراوان‌تر است و منطقه QRDR در ارتباط نزدیک با جایگاه فعال آنزیم که با مولکول DNA و فلورکینولون ها برهم‌کنش دارد، می‌باشد. به همین دلیل موتاسیون در این منطقه، سبب تغییر در ساختار آنزیم و کاهش تمایل آن به فلورکینولون ها می‌گردد (۱۴). همچنین مقاومت به فلورکینولون ها در باکتری‌ها با بروز موتاسیون در ژن پمپ‌های ورود دارو و درنتیجه کاهش تجمع دارو در سلول باکتری و نیز افزایش شیوع ژن‌های مقاومت پلاسمیدی (PMQR) مرتبط است. محصولات ژنی پلاسمید های مقاومت، باکتری را در برابر اثرات کشنده آنتی‌بیوتیک محافظت می‌نماید (۱۵). به دلیل اهمیت و کاربرد گسترده فلورکینولون ها در درمان عفونت‌های ادراری و وجود مکانیسم‌های متعدد در بروز مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها، هدف از مطالعه حاضر تعیین الگوی مقاومت *کلبسیلا پنومونیه* های جداشده از عفونت ادراری به آنتی‌بیوتیک‌های فلورکینولونی و بررسی موتاسیون های ژن *gyrA* در جدایه های مقاوم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و جداسازی باکتری

در یک دوره شش‌ماهه، در نیمه دوم سال ۱۳۹۳، نمونه ادرار میانی از بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهر رشت، که حداقل از سه روز قبل آنتی‌بیوتیک دریافت نکرده بودند، در شرایط استریل جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در کمتر از ۲۰ دقیقه بر روی محیط‌های بلادآگار، مک کانگی آگار و EMB آگار کشت و پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. نمونه‌هایی که تعداد کلنی آن‌ها بیش از 10^5 CFU/mL بود، عفونت ادراری تلقی شد. سپس جنس و گونه باکتری بر اساس روش‌های استاندارد تعیین گردید (۱۶).

شناسایی مولکولی *کلبسیلا پنومونیه*.DNA ژنومی جدایه ها با استفاده از کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم منفی شرکت سینا ژن (تهران- ایران) بر اساس دستورالعمل کیت استخراج گردید. جهت شناسایی مولکولی *کلبسیلا پنومونیه* از یک جفت پرایمر اختصاصی ژن *16S rRNA* این باکتری در واکنش PCR استفاده گردید (۱۷). توالی نوکلئوتیدی پرایمر های مورداستفاده در جدول شماره ۱ آمده است. اسید نوکلئیک استخراج‌شده در واکنش PCR به‌عنوان الگو مورداستفاده قرار گرفت. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل dNTPS (۱۰ میلی مول) ۰/۵ میکرولیتر، بافر آنزیم (10X) ۵ میکرولیتر، پرایمر های پیشرو و پیرو (۱۰ پیکومول) ۳ میکرولیتر، DNA الگو (۲ میکروگرم) ۲ میکرولیتر، آنزیم (۲/۵ واحد) ۰/۵ میکرولیتر، آب مقطر ۱۴ میکرولیتر انجام گرفت. برنامه حرارتی ترموسایکلر به ترتیب شامل مراحل واسرشته شدن اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی ۹۴ درجه سلسیوس ۴۵ ثانیه ، ۵۹ درجه سلسیوس ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس ۴۵ ثانیه بود. سپس یک مرحله ده دقیقه‌ای تکثیر نهایی اضافه گردید و محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و نتایج ثبت گردید. سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* NCTC 5056 به‌عنوان کنترل مثبت در واکنش PCR استفاده گردید.

شناسایی سویه‌های مقاوم به فلورکینولون ها. مقاومت دارویی *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به نالیدیکسیک اسید و فلورکینولون های سیپروفلوکساسین، انروفلوکساسین و نورفلوکساسین با انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش استاندارد انتشار از دیسک و تعیین MIC سیپروفلوکساسین به روش براث ماکرودایلوشن انجام گرفت. سویه استاندارد *کلبسیلاپنومونیه* NCTC 5056 به‌عنوان کنترل استفاده گردید.

بررسی موتاسیون ژن *gyrA*. ژن *gyrA* جدایه های *کلبسیلاپنومونیه* با استفاده از پرایمر اختصاصی (جدول ۱) در واکنش PCR تکثیر گردید (۱۸). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل dNTPS (۱۰ میلی مول) ۰/۵ میکرولیتر، بافر آنزیم (10X) ۵ میکرولیتر، پرایمرهای پیشرو و پیرو (۱۰ پیکومول) ۳ میکرولیتر، DNA الگو (۲ میکروگرم) ۲ میکرولیتر، آنزیم *Pfu* (۲/۵ واحد) ۰/۵ میکرولیتر، آب مقطر ۱۴ میکرولیتر

انجام گرفت . برنامه حرارتی ترموسایکلر به ترتیب شامل مراحل واسرشته شدن اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی ۹۴ درجه سلسیوس ۴۵ ثانیه ، ۵۰ درجه سلسیوس ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس ۴۵ ثانیه بود. سپس یک مرحله ده دقیقه‌ای تکثیر نهایی اضافه گردید. پس از بررسی محصول PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد ، جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت Bioneer (کره جنوبی) ارسال گردید. پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن *gyrA* سویه‌های بالینی، تغییر در توالی بازی و آمینو اسیدی آن با نرم‌افزارهای آنلاین بلاست (BLAST) ، Chromas v.1.45 و CLC main workbench v3.5 تعیین گردید. توالی سویه‌های مورد مطالعه با توالی سویه استاندارد *کلبسیلاپنومونیه* ATCC 13883 در بانک ژنی مقایسه شد.

جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورداستفاده جهت تکثیر ژن‌های *16srRNA* و *gyrA* *کلبسیلا پنومونیه*

ژن	پرایمر	طول محصول (جفت باز)
16srRNA	F: 5′ ATTTGAAGAGGTTGCAACGAT 3′ R:5′TTCACTCTGAAGTTTTCTTGTGTTC 3′	۱۳۰
gyrA	F:5' CGTACTATACGCCATGAACGTA 3' 5' ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG 3'	۳۶۶

یافته‌ها

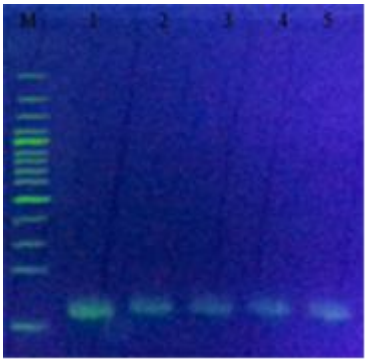
جداسازی باکتری

در این بررسی تعداد ۴۶ باکتری میله‌ای گرم منفی، غیر متحرک، با کلنی‌های موکوئیدی و تخمیرکننده لاکتوز در محیط مک کانکی، MR منفی، VP مثبت، اندول منفی، SH2 منفی، باقابلیت تولید آنزیم‌های کاتالاز، اوره آز، سیتراتاز به عنوان *کلبسیلاپنومونیه* تعیین هویت شدند.

شناسایی مولکولی *کلبسیلا پنومونیه*

تشخیص تمامی جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* با تکثیر منطقه *16s rRNA* این باکتری در واکنش PCR مورد تأیید قرار گرفت. پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز باندهایی با وزن مولکولی ۱۳۰ جفت باز مشاهده شد (شکل ۱).

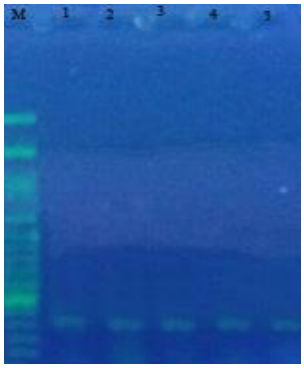
مقاومت جدایه ها به فلورکینولون ها. تعداد ۱۲ جدایه از ۴۶ باکتری مورد مطالعه مقاوم به نالیدیکسیک اسید و ۱۰ جدایه مقاوم به فلورکینولون های سیپروفلوکساسین، انروفلوکساسین و نورفلوکساسین بودند. همه جدایه هایی که به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند به نالیدیکسیک اسید هم مقاومت نشان داده‌اند. در جدایه های مقاوم به فلورکینولون، میزان MIC سیپروفلوکساسین از ۶۴ تا ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود.



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن 16srRNA *کلبسیلاپنومونیه*. ستون ۱: کنترل مثبت *کلبسیلا پنومونیه* (سویه استاندارد *کلبسیلاپنومونیه* NCTC 5056)، ستون‌های ۵-۲: محصول ۱۰۰ جفت بازی PCR نمونه‌های مثبت *کلبسیلاپنومونیه*، ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی

موتاسیون های ژن *gyrA*. از تکثیر ژن *gyrA* سویه‌های مقاوم در واکنش PCR باندهایی با وزن مولکولی ۳۶۶ جفت باز حاصل (شکل ۲) و تعیین توالی شد. از مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن *gyrA* با سویه استاندارد، در ۸ جدایه موردبررسی، موتاسیون منجر به جابجایی اسیدهای آمینه گردید. در ۶ جدایه از ۱۰ جدایه مورد بررسی در کدون شماره ۸۷ موتاسیون رخ داد که از این بین در ۳ مورد موتاسیون D87A و تبدیل آسپارتیک اسید به آلانین مشاهده گردید. در ۳ مورد نیز موتاسیون D87N و جایگزینی آسپارژین به‌جای آسپارتیک اسید رخ داد. این جابجایی‌های اسیدآمینه به ترتیب درنتیجه موتاسیون بد معنی

تبدیل ATC به TTC و AAC در موقعیت کدون ۸۷ این ژن رخ داد. همچنین در یک مورد علاوه بر موتاسیون در کدون ۷۸، در کدون شماره ۸۳ نیز موتاسیون I83S و جایگزینی سرین و ایزولوسین مشاهده گردید. در سویه‌های واجد موتاسیون در کدون ۸۷ ژن *gyrA* میزان MIC سیپروفلوکساسین بیشتر از ۲۵۶ میکروگرم و در سویه‌ای که موتاسیون هم‌زمان در کدون های ۸۳ و ۸۷ داشته است میزان آن ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است.



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR ژن *gyrA* *کلبسیلا پنومونیه*.
ستون‌های ۵-۱: محصول ۳۶۶ جفت بازی PCR ژن *gyrA* سویه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* (تأییدشده با Sequencing)، ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی

بحث

در این مطالعه از ۴۶ *کلبسیلا پنومونیه* جداسازی شده از نمونه‌های ادراری، تعداد ۱۰ جدایه مقاوم به فلورکینولون، ازنظر میزان MIC سیپروفلوکساسین و موتاسیون های ژن *gyrA* موردبررسی قرار گرفت. MIC سیپروفلوکساسین در همه جدایه‌های مقاوم بالا بوده موتاسیون منجر به تغییر اسیدآمینه در کدون‌های ۸۷ و ۸۳ در اغلب آن‌ها (۸۰٪) دیده شد. موتاسیون در کدون ۸۷ از موتاسیون های شایع در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به فلورکینولون ها می‌باشد. به نظر می‌رسد که منطقه اطراف اسیدهای آمینه ۸۷ زیر واحد A آنزیم DNA gyrase اهمیت ویژه‌ای در تشخیص مقاومت کینولونی دارد به طوری که در مطالعات مختلف نیز گزارش گردیده است. در مطالعه Al-Marzooq و همکاران (۲۰۱۴) نیز موتاسیون در کدون ۸۷ این ژن در ۴۱/۴ درصد جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به سیپروفلوکساسین دیده شد که با افزایش MIC سیپروفلوکساسین همراه بوده است (۱۳). همچنین نتایج حاصل از این مطالعه با یافته‌های Fu و همکاران (۲۰۱۳) مبنی بر اهمیت وجود موتاسیون در کدون های ۸۳ و ۸۷ ژن *gyrA* در مقاومت باکتری به سیپروفلوکساسین مطابقت دارد (۱۹). در مطالعه دیگری Fu و همکاران (۲۰۰۸) لازمه مقاومت به سیپروفلوکساسین را موتاسیون تبدیل Ser83 به Ile و موتاسیون دوگانه Ser83 و Asp87 گزارش نمودند (۲۰). در مطالعه حاضر میزان MIC سیپروفلوکساسین در سویه با موتاسیون دوگانه بسیار بالابود. در پژوهش مشابهی Vila و همکاران نیز گزارش نمودند وجود موتاسیون هم‌زمان در کدون های ۸۳ و ۸۷ ژن *gyrA* باعث افزایش میزان مقاومت به فلورکینولون ها می‌شود (۲۱). به عقیده برخی محققین برای بروز سطح بالایی از مقاومت به سیپروفلوکساسین حداقل ۲ موتاسیون در ژن *gyrA* موردنیاز می‌باشد (۲۲).

درزمینه ارتباط بین موتاسیون های ژن *gyrA* و مقاومت به فلورکینولون ها نتایج مختلفی در مطالعات به‌دست‌آمده است. در مطالعه‌ای در برزیل که جهش ژنی در *gyrA* و *parC* در باکتری‌های روده‌ای جداشده از بیماران بررسی شد، ۹۱ درصد جدایه های مقاوم *اشریشیاکلی* موتاسیون در کدون های ۸۳ یا ۸۷ و یا هر دو باهم را داشته‌اند و هیچ‌یک از جدایه های حساس به سیپروفلوکساسین دارای جهش ژنی در توپوایزومراز نبودند (۲۳). از سوی دیگر Fu و همکاران ۷ الگوی موتاسیون شناسایی گردید که تأثیری بر بروز مقاومت دارویی در جدایه ها نداشتند که ازجمله آن‌ها موتاسیون در خارج از منطقه QRDR و تبدیل آلانین ۱۷۱ به سرین و والین ۱۹۸ به ایزولوسین بود (۱۹). در مطالعه حاضر از ۱۰ جدایه مقاوم موردبررسی دو جدایه که میزان MIC سیپروفلوکساسین در آن‌ها ۱۲۸ و۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود تنها یک موتاسیون منفرد خاموش در کدون ۱۸۸ داشته‌اند. Al-Marzooq و همکاران نیز در یک جدایه *کلبسیلاپنومونیه* مورد مطالعه نتیجه مشابهی دریافت نمودند به این ترتیب که یکی از جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین فاقد هر گونه موتاسیونی در ژن‌های *gyrA* و *parC* بوده است (۱۳). این امر بیانگر اهمیت سایر مکانیسم‌های مقاومت در برابر فلورکینولون ها ازجمله موتاسیون در سایر ژن‌های کروموزومی مثل ژن مربوط به پروتئین‌های پورینی و افزایش بیان پمپ‌های افلوکس ، وجود ژن‌های *16S rRNA متیلاز* و مقاومت‌های با منشأ پلاسمیدی می‌باشد (۲۶-۲۴). در سال‌های اخیر افزایش مقاومت به سیپرو فلوکساسین در *انتروباکتریاسه* با افزایش شیوع ژن‌های مقاومت پلاسمیدی (PMQR) همراه بوده است.حتی گفته می‌شود این ژن‌های پلاسمیدی سبب افزایش جهش در ژن‌های *gyrA* و *parC* و یا هر دو نیز می‌گردند (۲۷). Corkill و همکاران

در سال ۲۰۰۵ در انگلستان با بررسی ۴۷ جدایه *انتروباکتریاسه* مقاوم به سیپرو فلوکساسین شیوع ژن *gyrA* پلاسمیدی را در جدایه های تحت بررسی ۳۲ درصد گزارش کرده‌اند (۱۸) و در مطالعه دیگری فراوانی ژن‌های مقاومت پلاسمیدی در *کلبسیلاپنومونیه* ۶۰/۲ درصد بوده است (۲۸). بنابراین برای دستیابی به مکانیسم دقیق مقاومت جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* و دیگر اعضای *انتروباکتریاسه* نسبت به فلورکینولون ها و امکان تجزیه‌وتحلیل اهمیت هر یک از مکانیسم‌های مولکولی، لازم است در سویه‌های موردمطالعه انواع مکانیسم‌های مؤثر در مقاومت، هم‌زمان موردبررسی قرار گیرند.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت جهت حمایت از انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Hashemi A, Fallah F, Taherpour A, Goudarzi H, Erfanimanesh S, Taki E. Evaluation of genetic pattern and determination of *oqxA* gene expression levels among clinical isolates of *Klebsiella Pneumoniae* strains. J Mazandaran Univ Med Sci 2014;24(119):48-61. [in persion]
2. Won SY, Munoz-Price LS, Lolans K, Hota B, Weinstein RA, Hayden MK. Emergence and rapid regional spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. Clin Infec Dis 2011;53(6):532-40.
3. Patel G, Bonomo RA. Status report on carbapenemases: challenges and prospects. Expert Rev Anti Infect Ther 2011;1:9(5):555-70.
4. Kim MH, Lee HJ, Park KS, Suh JT. Molecular characteristics of extended spectrum β-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and the prevalence of *qnr* in extended spectrum β-lactamase isolates in a tertiary care hospital in Korea. Yonsei Med.J 2010;51(5):768-74.
5. Zibaei M, Firoozeh F. Detection of *qnrA* gene among quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Khorram Abad during 2011-2012. Feyz 2013;17(5):488-94. [in persion]
6. Fazeli H, Vakili B, Khorvash F, Shoaei P, Kariminik A, Yaran M, et al. Identification of mutation in *gyrA* gene obtained from quinolone resistant clinical isolates of *Acintobacter baumani*. Journal of Microbial World 2014;7(2):109-17. [in persion]
7. Gallini A, Degris E, Desplas M, Bourrel R, Archambaud M, Montastruc J-L, *et al.* Influence of fluoroquinolone consumption in inpatients and outpatients on ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in a university hospital. J Antimicrob Chemother 2010;65(12):2650-57.
8. Rushdy AA, Mabrouk MI, Abu-Sef FAH, Kheiralla ZH, Abdel-All SM, Saleh NM. Contribution of different mechanisms to the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Salmonella enterica*. Braz j infect dis 2013;17(4):431-7.
9. Vernaz N, Huttner B, Muscionico D, Salomon JL, Bonnabry P, Lopez-Lozano JM, *et al.* Modelling the impact of antibiotic use on antibiotic-resistant *Escherichia coli* using population-based data from a large hospital and its surrounding community. J Antimicrob Chemother dkq525;1-8.
10. Cremet L, Caroff N, Dauvergne S, Reynaud A, Lepelletier D, Corvec S. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL *Enterobacteriaceae* clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. Pathol Biol 2011;59(3):151-6.
11. Tumbarello M, Trecarichi EM, Bassetti M, De Rosa FG, Spanu T, Di Meco E, *et al.* Identifying patients harboring ESBL-Producing *Enterobacteriaceae* on hospital admission: Derivation and validation of a scoring system. Antimicrob Agents Chemother 2011;55(7):3485-90.
12. Koo SH, Kwon KC, Cho HH, Sung JY. Genetic basis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from three university hospitals in Chungcheong Province, Korea. Korean J Lab Med 2010;30(5):498-506.
13. Al-Marzooq F, Mohd Yusof MY, Tay ST. Molecular analysis of ciprofloxacin resistance mechanisms in malaysian ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates and development of mismatch amplification mutation assays (MAMA) for rapid detection of *gyrA* and *parC* mutations. Biomed Res Int 2014;601-30.

14. Jaktaji RP, Mohiti E. Study of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. Iran J Pharm Res 2010;9(1):43-8. [in persion]

15. Norouzi A, Azizi O, Hosseini H, Shakibaie S. Amino acid substitution mutations analysis of *gyrA* and *parC* genes in clonal lineage of *Klebsiella pneumoniae* conferring high-level quinolone resistance. Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases (JoMMID) 2014;2(3):109-17. [in persion]

16. Gupta V, Yadav A, Joshi R. Antibiotic resistance pattern in uropathogens. Indian J Med Microbiol 2002;20(2):96-8.

17. Song Y, Liu C, McTeague M, Finegold SM. 16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant gram-positive anaerobic cocci. J Clin Microbiol 2003;41(4):1363-9.

18. 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(3):915-24.

19. Fu Y, Zhang W, Wang H, Zhao S, Chen Y, Meng F, *et al.* Specific patterns of *gyrA* mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. BMC Infect Dis 2013;13(1):8-15.

20. Fu Y, Guo L, Xu Y, Zhang W, Gu J, Xu J, *et al.* Alteration of *gyrA* amino acid required for ciprofloxacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. Antimicrob Agents Chemother 2008;52(8):2980-3.

21. Vila A, Cassata A, Pagella H, Amadio C, Yeh K-M, Chang F-Y, *et al.* Appearance of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess syndrome in Argentina: case report and review of molecular mechanisms of pathogenesis. Open Microbiol J 2011;5:107-113.

22. Erac B, Gill A, Amyes S, Gulay Z. Mutations of *gyrA* in ciprofloxacin resistant *Escherichia coli* strains. Mikrobiyol Bul 2002;37(2-3):125-30.

23. Minarini LA, Darini ALC. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in *Enterobacteriaceae* isolates from Brazil. Braz J Microbiol 2012;43(4):1309-14.

24. Luo Y, Yang J, Zhang Y, Ye L, Wang L, Guo L. Prevalence of β-lactamases and 16S rRNA methylase genes amongst clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance determinants. Int J Antimicrob Agents 2011;37(4):352-5.

25. Singh M, Jadaun G, Ramdas KS, Chauhan V, Mishra R, Gupta K, *et al.* Effect of efflux pump inhibitors on drug susceptibility of ofloxacin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Indian J Med Res 2011;133(5):535-540.

26. Wang D, Wang H, Qi Y, Liang Y, Zhang J, Yu L. Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* harboring QnrB32, Aac (6')-Ib-cr, *GyrA* and CTX-M-22 genes. Folia Histochem Cytobiol 2012;50(1):68-74.

27. Bouchakour M, Zerouali K, Claude JDPG, Amarouch H, El Mdaghri N, Courvalin P, *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Morocco. J Infect Dev Ctries 2010;4(12):779-803.

28. Corkill JE, Anson JJ, Hart CA. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. J Antimicrob Chemother 2005;56(6):1115-7.