فصلنامه بیماری های عفونی و گرمسیری وابسته به انجمن متخصصین بیماری های عفونی و گرمسیری
سال دوازدهم ، شماره ۳۹ ، صفحات ۵۳ تا ۵۶ ، زمستان۱۳۸۶ ـــــــ

موضوع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی برای اولین بار با بروز و گسترش وسیع سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین در استافیلوکوکوس ارئوس اهمیت یافت. در سال ۱۹۷۰ و اوایل ۱۹۸۰ باسیل‌های گرم منفی چند مقاومتی، بزرگترین مشکل کنترل عفونت محسوب می‌شدند. اخیراً موارد زیادی از مقاومت نسبت به این داروها در E.coli مشاهده شده است (۲و۳). دراین بین مطالعه ساختار ژنتیکی E.coli می تواند راهگشای اصلی در جهت درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها باشد، بطوریکه PCR روش بسیار مؤثر، سریع و اختصاصی جهت شناسائی بسیاری از عوامل بیماری‌زا و از جمله مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد که تا کنون تحقیقات بسیاری در رابطه با استفاده از این تکنیک در شناسائی ژن های عامل مقاومت بر علیه اکثر آنتی بیوتیک‌ها صورت گرفته که در برخی از تحقیقات تنها ژن gyrA و در برخی دیگر علاوه بر این ژن، ژن‌های gyrB وparC مورد بررسی قرار گرفته است.مکانیسم غالب در ایجاد مقاومت نسبت به نالیدیکسیک، از تغییر ژن های تولیدکننده زیرواحد آنزیم های DNA gyrase (gyrB و gyrA) وTopo IV (parE و parC) که اهداف این داروها می باشند، ناشی می شود. تحقیقات نشان داده اند که یک ناحیهٔ کوچک در - N terminal پروتئین gyrA از آمینو اسید ۶۷ تا ۱۰۶ در E.coli باعث ایجاد مقاومت نسبت به داروها می شود. این ناحیه اصطلاحاً ناحیهٔ تعیین کننده مقاومت به کینولونی (GRDR) نامیده می شود. چنین ناحیه ای در ژن ParC نیز شناسایی شده است و چنین به نظر می رسد که ناحیهٔ - N terminal در پروتئین gyrA و ParC به یکدیگر شباهت زیادی داشته باشند(۶-۴). بیشتر موتاسیون‌ها در باکتری E.coli در ناحیهٔ QRDR ژن gyrA و در نوکلئوتید ۲۴۸ و ۲۵۹/۲۶۰ رخ می دهند که منجر به تغییر آمینواسید ser-83 وASP-87 می شود. در ناحیهٔ QRDR ژن parC نیز موتاسیون‌ها عمدتاً در نوکلئوتید ۲۳۸/۲۳۹ و ۲۵۰/۲۵۱ اتفاق می‌افتد که منجر به تغییر آمینواسید ser-80 یا Glu-84 می شود. موتاسیون های یاد شده عموماً به صورت منحصر به فرد رخ می دهند، اما مواردی از موتاسیون مضاعف نیز گزارش شده است که در مورد پروتئین gyrA معمولاً آمینواسید لوسین در جایگاه ۸۳ جایگزین سرین و در جایگاه ۸۷ آمینواسید آسپارژین یا تیروزین جایگزین آسپارتیک اسید می شوند. در مقایسه با موتاسیون یاد شده در gyrA و ParC، موتاسیون در ژن های gyrB و parE از اهمیت کمتری برخوردارند و نقش ناچیزی در تولید مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های یاد شده دارند (۹-۸).

روش کار

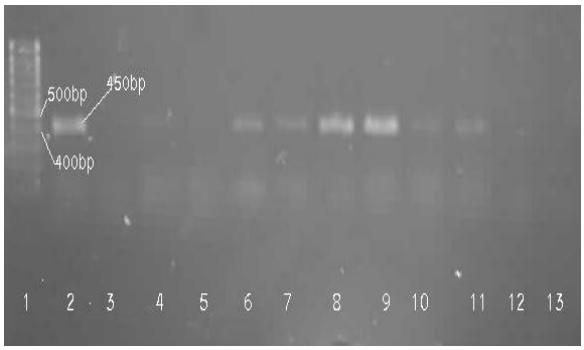
در این تحقیق کلیه مواد مورد استفاده در فرآیند PCR از شرکت Fermentas و مواد مورد نیاز برای تخلیص DNA ژنومیک و الکتروفورز از شرکت Roche تهیه گردید. پودر نالیدیکسیک اسید از شرکت البرز دارو تهیه شد.۷۹ نمونه مثبت از نظر E.coli که از بین ۲۵۰۰ نمونهٔ ادرار بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه بالینی بیمارستان بقیه ا...(عج) طی ۵ ماه (بهمن ۱۳۸۳ تا خرداد ۱۳۸۴) جدا شده بود، جهت واکنش PCR انتخاب گردید. با در نظر گرفتن تمام پارامترهای لازم جهت طراحی یک پرایمر مناسب برای شناسایی ژن های مقاوم به نالیدیکسیک اسید، به روش ARMS اقدام شد. ARMS یا سیستم تکثیر منعکس کننده جهش، تکنیکی قدرتمند برای مشخص کردن جهش های نقطه ای است. در این تکنیک از پرایمرهای نوع جهش یافته و نرمال در دو لوله جداگانه استفاده می شود. اساس این تکنیک بر این پایه استوار است که DNA پلی مراز عمل پلی مریزاسیون را از انتهای پرایمر در جهت ´۳ – ´۵ ، زمانی آغاز می کند که باز انتهای ´۳ پرایمر، ناجور(Mismatch) نباشد، یعنی به ترادف مکمل خود بچسبد.اگر عمل پلی مریزاسیون در لوله حاوی پرایمر نرمال انجام شود، نشان دهندهٔ نبود جهش نقطه ای در باز مورد نظر است و اگر عمل پلی مریزاسیون در لوله حاوی پرایمر جهش یافته انجام شود، نشان دهندهٔ حضور جهش نقطه ای در باز مورد نظر می باشد. از این تکنیک به عنوان MAMA-PCR و COP- PCR نیز یاد می-شود.بنابراین ما جهت طراحی پرایمر برای کدون‌های ۸۳ و ۸۷ ژن gyrA که با استناد به اکثر مقالات، بیشتر موتاسیون‌ها در آنها صورت می گیرند. پرایمرهای mismatch را طراحی کردیم. بدین صورت که با قرار دادن کدون tac در پرایمر ریورس شمارهٔ ۳ از آن به عنوان پرایمر جهش یافته برای کدون ۸۳ استفاده گردید و برای کدون ۸۷ نیز دو پرایمر ریورس طراحی شد. یکی از پرایمرهای ۸۷ دارای کدون tac بود که به عنوان پرایمر جهش یافته اول به کار رفت(پرایمر شمارهٔ ۴) و پرایمر دیگر دارای کدون aac بود که از آن نیز به عنوان پرایمر ریورس دوم استفاده شد(پرایمر شمارهٔ ۵). از پرایمر شمارهٔ یک به عنوان پرایمر فوروارد استفاده شد. از پرایمر شمارهٔ دو نیز به عنوان پرایمر ریورسی که خارج ازمحدوده کدون های ۸۳ و ۸۷ بود، استفاده گردید. بدیهی است از پرایمرهای ۴و۵ باید یکی جواب بدهد. شکل ۱ و ۲.

یافته ها

با توجه به مواردی که ذکرشد می‌توان نتیجه گرفت که پرایمرهای طراحی شده چه از نظر حساسیت و چه از نظر اختصاصی بودن قابلیت شناسائی ژن‌های مقاوم را با موفقیت داراست و می‌توان از این پرایمرها در شناسائی موتاسیون‌های مقاومت دارویی به نالیدیکسیک اسید در نمونه‌های بالینی استفاده کرد. در نهایت نتایج PCR ها بدین ترتیب خواهد بود: نمونه هایی که جواب ۴ واکنش PCR آنها به ترتیب P1,2(+) ، P1,3(+) ، P1,4(+) و P1,5(-) و یا P1,2(+) ،P1,3(+)، P1,4(-) و P1,5(+) باشند، به عنوان E.coli مقاوم به نالیدیکسیک اسید با موتاسیون در کدون های ۸۷ و ۸۳ شناخته می‌شوند.نمونه هایی که جواب PCR های آنها به ترتیب P1,2(+)، P1,3(-) ، P1,4(+) و P1,5(-) یا P1,2(+)، P1,3(-) ، P1,4(-) و P1,5(+) و یا P1,2(+)، P1,3(-) ، P1,4(+) و P1,5(-) باشد، نشان دهندهٔ گونهٔ E.coli هایی هستند که کدون ۸۳ ژن gyrA فاقد موتاسیون بوده و کدون ۸۷ آن موتاسیون داشته است. همچنین نمونه هایی که جواب PCR های آنها به ترتیب: P1,2(+)، P1,3(+) ، P1,4(-) و P1,5(-) باشند. E.coli هایی هستند که کدون ۸۳ ژن gyrA آنها موتاسیون داشته و کدون ۸۷ آن فاقد موتاسیون می باشد. E.coli هایی به عنون E.coli حساس شناخته می شوند که جواب PCR های آنها به صورت P1, 2(+) ، P1,3(-) ، P1,4(-) و P1,5(-) باشد. در ادامه کار دو محصول PCR نمونه های شماره یک (P1-2)جهت ردیف DNA برای بررسی موتاسیون‌ها به شرکت سیناژن سفارش داده شد. نتایج سکانسینگ همانطور که انتظار می رفت یکی از نمونه ها را به عنوان نمونه حساس بدون موتاسیون معرفی کرد ولی در مورد نمونه مقاوم پنج مورد موتاسیون در کدون های ۸۵،۸۱، ۸۷،۹۷،۱۰۷ مشاهده شد.که یکی از موتاسیون‌ها (۸۷) جز موتاسیون های اصلی مقا ومت به نالیدیکسیک اسید می باشد.که نتایج آن در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: موتاسیون های موجود در نمونهE.coli مقاوم به نالیدیکسیک

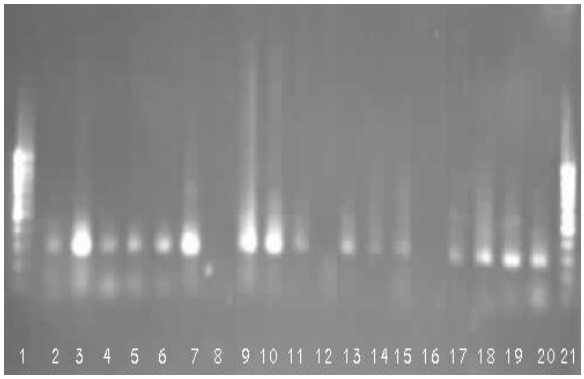
کدون	تغییر اسید آمینه
۸۱	TAT →TTT
۸۵	TTG→TCG
۸۷	GCA→ GTA
۹۷	ATA→ACA
۱۰۷	CTA→ CCA



شکل۱- بررسی محصولات PCR -A : پرایمرP1 بعنوان Forward و P2 بعنوان Reverse

چاهک شماره۱ - نشانگر اندازه وزن مولکولی ، ۱۰۰bp که جایگاه ۲ اندازه محدوده مورد نظر قطعه PCR که ۴۵۰ جفت باز می باشد یعنی باند هـای اندازه مولکولی ۴۰۰ و ۵۰۰ جفت باز نشان داده شده است.

چاهک شماره۲ تا ۱۳ – نمونه های ۲۶ تا ۳۷ همچنان کـه ملاحظـه مـی گردد نمونه های ۲۷ ، ۲۸ ، ۲۹،۳۶ و۳۷ ، فاقد باند مورد نظر بـوده منفـی می باشند و در بقیه نمونه ها باند مورد نظـر ۴۵۰bp دیـده مـی شـود و مثبت است (توضیحات تکمیلی در متن)



شکل۲- بررسی محصولاتPCR- B:
پرایمرهایP1 بعنوان Forward و P3 بعنوان Reverse

چاهک شماره ۲۱ و ۱ - نشانگر اندازه وزن مولکولی ، ۱۰۰ bp و چاهک های شماره۲ تا ۲۰ مثبت بجز چاهک های شماره۸ و۱۶که منفی هستند.

بحث

رویداد شاخص‌های مقاومت پلاسمیدی و ترانسپوزونی در سویه‌های بالینی این پرسش را پیش می‌آورد که منشاء این شاخص‌ها کدام است. به احتمال زیاد برخی از این شاخص‌ها طی زمان طولانی و به دنبال یک سری جهش‌های پی‌درپی در ژن‌های کروموزومی موجود در باکتری یا به دنبال واردشدن در پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها به وجود آمده باشد. این طرح احتمالاً در مورد تکامل بتالاکتامازها در باکتری‌های گرم منفی روده‌ای نیز صادق است (۱۰).

به نظر می‌آید مصرف بی‌رویه و نامناسب آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماران بستری در بیمارستان یا بیماران سرپایی، مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در کشاورزی و دامپروری و فشار انتخابی ناشی از آن، منجر به گزینش سویه‌های مقاوم شده و امکان بقا و تکثیر آن‌ها را فراهم می‌سازد.

در یک مطالعه موتاسیون در ژن های gyrA و gyrB و parC که باعث مقاومت به نالیدیکسیک اسید در گونه های E.coli جدا شده از محصولات غذایی، حیوانی و انسانی می شد مورد آنالیز قرار گرفته است. در ۱۳مورد نمونهٔ حساس به نالیدیکسیک اسید هیچ تغییر اسیدآمینه‌ای در پروتئین های ParC و gyrA مشاهده نشد در حالی که در همهٔ گونه های مقاوم به نالیدیکسیک اسید حداقل یک مورد تغییر اسیدآمینه در پروتئین gyrA در کدونهای ۸۷ یا ۸۳ دیده شده است. که با نتایج حاصل از مطالعه ما مبنی بر وجود حداقل یک موتاسیون در کدون های ۸۷ یا ۸۳ مطابقت داشت.(۱۱)

در مطالعه ای با نالیدیکسیک اسید با میزان MIC بیشتر از ۲۵۶ میلی گرم در لیتر فقط موتاسیون تبدیل Ser **به** Leu (۸۳) وجود داشت. در این مطالعه مشخص گردید که حتی یک موتاسیون برای بروز سطح بالائی از مقاومت به نالیدیکسیک اسید کافی می باشد. اما برای بروز سطح بالائی از مقاومت به سیپروفلوکساسین حداقل ۲ موتاسیون در ژن gyrA مورد نیاز می باشد. نتایج حاصل از این مطالعه نیز با مطالعه حاضر مشابهت دارد (۱۲).

در یک بررسی دیگر ۸۰ مورد از گونه‌های E.coi مقاوم به نالیدیکسیک اسید با میزان MIC بیشتر از ۲۵۶ میلی گرم در لیتر تشخیص داده شده-اند بصوری که در گونهٔ ۶۱ E.coli مقاوم به نالیدیکسک اسید جدا شده یک تغییر اسیدآمینه در پروتئین gyrA در کدون های ۸۳ و ۸۷ مشاهده گردید(۵و۱۳).

نتیجه گیری

منطقه اطراف اسیدآمینه ۸۳ زیرواحد A آنزیم DNA gyrase اهمیت ویژه‌ای در تشخیص مقاومت کینولونی داشته و تبدیل Ser به Leu یا Trp موجب این مقاومت می شود.

REFERENCES

1. Gerald l. Mandell, John E. Bennett, Raphael Dolin. Principles and practice of infectious diseases: Michael S. Donnenberg. in: Enterobacteriaceae. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone. 2005; P:2567-2587.

2. Caballero – Granado F, et al., Comparative study of bacteremias caused by Enterococcus spp. With and without high-level resistance to gentamicin. J Clin Microbiol. 1998 Feb;36(2):520-5.

3. Casetta A, Hoi AB, de Cespedes G, Horaud T. Diversity of structures carrying the high-level gentamicin resistance gene (aac6-aph2) in Enterococcus faecalis strains isolated in France. Antimicrob Agents Chemother. 1998 Nov;42(11):2889-92.

4. Yolanda Sáenz, Myriam Zarazaga, Laura Briñas, Fernanda Ruiz-Larrea and Carmen Torres. Mutations in gyrA and parC genes in nalidixic acid-resistant Escherichia coli strains from food products, humans and animals. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2003;51:1001–1005.

5. Okuda J, Hayakawa E, Nishibuchi M, Nishino T., Sequence analysis of the gyrA and parC homologues of a wild-type strain of Vibrio parahaemolyticus and its fluoroquinolone-resistant mutants. Antimicrob Agents Chemother. 1999 May;43(5):1156-62.

6. Qiang YZ, Qin T, Fu W, Cheng WP, Li YS, Yi G, Use of a rapid mismatch PCR method to detect gyrA and parC mutations in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of Escherichia coli. J of Antimicrobial chemotherapy 2002; 49:549-552.

7. Chenia HY, Pillay B, Pillay D. Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens. J Antimicrob Chemother. 2006 Oct 13; [Epub ahead of print].

8. Vila, J., Ruiz, J., Goñi, P. & Jiménez de Anta, T. (). Detection of mutations in parC in quinolone-resistant clinical isolates of Escherichia coli. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1996;40:491–3.

9. Giraud, E., Leroy-Sétrin, S., Flaujac, G., Cloeckaert, A., Dho-Moulin, M. & Chaslus-Dancla, E. Characterization of high-level fluoroquinolone resistance in Escherichia coli O78:K80 isolated from turkeys. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2001;47:341–3.

10. Maria del mar Tavio. 1999. Mechanisms involved in the development of resistance to fluoroquinolones in E.coli isolates. J. of Antimicrobial chemotherapy. 44: 735-742.

11. Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Ruiz-Larrea F, Torres C. Mutations in gyrA and parC genes in nalidixic acid-resistant Escherichia coli strains from food products, humans and animals. J Antimicrob Chemother. 2003 Apr;51(4):1001-5. Epub 2003 Mar 13.

12. Erac B, Gill A, Amyes SG, Gulay Z. Mutations of gyrA in ciprofloxacin resistant Escherichia coli strains. Mikrobiyol Bul. 2003 Apr-Jun;37(2-3):125-30.

13. M.E. CULLEN. Cloning and characterization of a DNA Gyrase A Gene. Antimicrobiol agent. June 1989. p. 886-894.