مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره چهارم (پیاپی ۲۹) زمستان ۱۳۹۵
صفحات ۲۹۶-۲۸۶

Original Article

بررسی مقاومت میکروبی، ارزیابی فنوتیپی و ژنتیکی پمپ افلاکس *norA* در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) و سیپروفلوکساسین

سمانه سادات کاظمی[۱]، فهیمه نعمتی منصور[۲]، امیر میرزایی[۳]، فاطمه اشرفی[۴*]

[۱] کارشناس ارشد، گروه آموزشی بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، [۲] استادیار، گروه آموزشی بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، [۳] استادیار، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، [۴] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از مهمترین علل عفونت های فرصت طلب بیمارستانی در سرتاسر جهان می باشد. پمپ های افلاکس از جمله *norA* نقش اساسی در بروز مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف در این باکتری دارد. این مطالعه با هدف ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و بررسی وجود پمپ افلاکس *norA* به صورت فنوتیپی و ژنوتیپی در سویه های MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی تعداد ۲۵۰ نمونه بالینی از بیمارستان های مختلف شهر تهران جمع آوری گردید. جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی و الگوی حساسیت دارویی آنها مشخص شد. حداقل غلظت بازدارنده (MIC) سیپروفلوکساسین در سویه های MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین تعیین گردید. همچنین، وجود پمپ افلاکس *norA* از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی به ترتیب با استفاده از MIC سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید در حضور مهار کننده پمپ افلاکس (CCCP) و واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) انجام شد.

یافته ها: در مطالعه حاضر ۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شد. آزمون حساسیت میکروبی نشان داد که ۳٤ سویه (٦٨ درصد) از جدایه ها مقاوم به متی سیلین (MRSA) بودند. از این میان ۱۲ سویه (٢٤ درصد) مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. همچنین تمامی سویه های مقاوم دارای ژن پمپ افلاکس *norA* و دارای پمپ افلاکس فعال بودند.

نتیجه گیری: به نظر می رسد ارتباطی بین پمپ افلاکس *norA* و مقاومت به سیپروفلوکساسین در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* وجود دارد. به طوری که توسعه مهارکننده های پمپ افلاکس می تواند در کنترل سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین مفید باشد.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، پمپ افلاکس، ژن *norA*، مقاومت به سیپروفلوکساسین.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۵

مقدمه

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) یکی از عوامل عفونت زای فرصت طلب بیمارستانی است که بیماری های مختلفی مانند آبسه، عفونت خون، عفونت پس از جراحی و گاهی مرگ و میر ایجاد می کند. این باکتری گرم مثبت، کاتالاز مثبت، بی هوازی اختیاری و فاقد اسپور می باشد که در قسمت قدامی ۲۰ درصد افراد وجود دارد و مهم ترین راه انتقال این باکتری به بیماران بستری شده در بیمارستان از طریق دست های آلوده پرسنل بهداشتی می باشد (۳-۱).

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۰۲۱۲۲۹٤۹۷۹۳ پست الکترونیک: f_ashrafi@iau-tnb.ac.ir

مقاومت به آنتی بیوتیک به خصوص متی سیلین در این باکتری شیوع بسیار زیادی پیدا کرده است و در سال های گذشته با توجه به منطقه جغرافیایی دستخوش تغییرات قابل توجهی در الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی شده است (٤). مطالعات نشان داده است که حدود ۳۰ تا ۵۰ درصد از *استافیلوکوکوس اورئوس* ها به متی سیلین مقاوم شده اند. به این سویه ها، سویه های مقاوم به متی سیلین یا MRSA گفته می شود و علت آن مربوط به حمل ژن *mecA* توسط این سویه ها است. این ژن پروتئین متصل شونده به پنی سیلین با نام PBP2a را کد می کند. این پروتئین میل پیوندی پایینی برای اتصال به آنتی بیوتیک های خانواده ی بتا لاکتام ها دارد و توسط این پروتئین باکتری علی رغم حضور این آنتی بیوتیک ها به ساخت دیواره سلولی ادامه داده و در برابر آنتی بیوتیک های ذکر شده مقاومت می کند (۵).

یکی از مشکلات عمده در درمان و پیش گیری از عفونت های ایجاد شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت این باکتری به آنتی بیوتیک می باشد. این امر موجب گسترش عفونت های ناشی از این باکتری و هم چنین بروز مشکلاتی از قبیل افزایش میزان مرگ و میر، افزایش میزان جراحات وارده به بیماران بستری شده، افزایش هزینه های درمان و افزایش مدت زمان بستری بیماران در بیمارستان ها می شود. این مساله پزشکان را جهت درمان عفونت های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* با محدودیت بسیاری مواجه کرده است (٦).

سه مکانیسم عمده که در مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک نقش دارند شامل تغییر هدف، غیرفعال کردن آنتی بیوتیک با استفاده از آنزیم ها و ممانعت از تجمع دارو درون سلول به وسیله سیستم های افلاکس می باشد (۷).

پمپ های افلاکس مواد سمی مانند آنتی بیوتیک را به محیط خارج پمپ می کنند و افزایش بیان یک یا چند پمپ افلاکس باعث ممانعت از ایجاد تجمع داخل سلولی در حد آستانه مورد نیاز برای فعالیت داروها می گردد (۸). به طور کلی پمپ های افلاکس باکتریایی بر اساس ترادف و شباهت اسیدهای آمینه در پنج گروه اصلی قرار می گیرند. این گروه ها شامل خانواده Major Facilitator Super Family (MFS)، ATP Binding Cassette، Resistance-Nodulation Division (RND)، Small Multidrug Resistance (SMR)، Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) هستند (۹).

پمپ های افلاکس از نظر بالینی به طور موثری در ارتباط با گروه های RND یا MFS می باشند. به طوری که با آزادسازی انرژی نیرو محرکه پروتون، در خارج کردن آنتی بیوتیک نقش دارند (۱۰).

سیستم افلاکس MFS یکی از سیستم های مهم افلاکس در *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد که پمپ افلاکس norA یکی از پمپ های مهم این خانواده است. norA یک پروتئین ۳۸۸ اسیدآمینه ای است که دارای ۱۲ جزء عبور کننده از غشا سلول و شباهت ٢٤ درصدی با پمپ افلاکس Tet (A) در باکتری *اشریشیا کلی* می باشد.

مطالعات مختلفی نشان می دهد که norA می تواند ترکیبات مختلفی مانند فلئوروکینولون های هیدروفوب شامل نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین، اتیدیوم بروماید و ترکیبات چهار ظرفیتی آمونیوم را به سمت بیرون پمپ نماید (۱۱ و ۱۲).

همچنین محققان نشان دادند که ژن *norA* دارای یک بیان پایه در درون سلول می باشد و باعث ایجاد کمی مقاومت به ترکیبات آنتی بیوتیکی می شود. افزایش مقاومت نسبت به فلئوروکوئینولون ها با افزایش بیان پمپ افلاکس norA ارتباط دارد. جهش های ایجاد شده در ژن *norA* می تواند باعث بیان دایمی این ژن شود. به طوری که این جهش ها باعث تغییر در ساختار دوم mRNA، افزایش نیمه عمر آن و کاهش حساسیت به آنزیم RNases می شوند (۱۳).

از نظر درمانی، اولین داروی مناسب برای درمان باکتری های MRSA، آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین می باشد. امروزه بزرگترین چالش و نگرانی در بیمارستان ها، ایجاد عفونت های بیمارستانی توسط باکتری های فرصت طلب *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد که به هر دو آنتی بیوتیک متی سیلین و سیپروفلوکساسین مقاوم شده اند (١٤). از آنجایی که تاکنون مطالعات کمی در مورد نقش پمپ افلاکس *norA* در مقاومت

بخشی به سیپروفلوکساسین در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایران انجام شده است، هدف از این مطالعه ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و نقش پمپ افلاکس *norA* در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه های MRSA *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به سیپروفلوکساسین بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه گیری، کشت و جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس: در این مطالعه در طی یک سال (۱۳۹۳-۱۳۹۲) تعداد ۲۵۰ نمونه بالینی مختلف (زخم، پوست، خون و ادرار) از مراکز تشخیصی درمانی مختلف تهران (بیمارستان میلاد، صارم و امام حسین) جمع آوری گردید. شناسایی فنوتیپی جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط آزمون های رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، کوآگولاز، DNase (Deoxyribonuclease)، کشت روی محیط برد پارکر آگار و مانیتول سالت آگار (مرک، آلمان) صورت گرفت. نمونه های مورد تائید تا انجام آزمایش های بعدی در محیط کشت اسلنت BHI (مرک، آلمان) حاوی نوترین گلیسیرین ۱۸ درصد و در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس نگهداری شدند (۱۵).

ب) انجام تست حساسیت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک ها: برای این منظور از روش Kirbey bauer و دستورالعمل انستیتو استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CSLI) (Clinical and laboratory standards institute) استفاده شد (۱۶). حساسیت جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به دیسک های آنتی بیوتیکی سفوکسیتین (۱۰ میکروگرم)، ونکومایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، پنی سیلین (۱۰ واحد)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، تری متوپریم (۲۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۱۵ میکروگرم)، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، آموکسی سیلین (۱۰ میکروگرم)، کلرامفنیکول (۳۰ میکروگرم) و کلیندامایسین (۲ میکروگرم) (MAST, UK) در محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) بررسی گردید. لازم به ذکر است که به منظور تشخیص مقاومت به متی سیلین (MRSA)، از دیسک آنتی بیوتیکی سفوکسیتین استفاده شد. در این مطالعه از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 33591 به عنوان کنترل مثبت مقاوم به متی سیلین (حاوی ژن *mecA*)، از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 به عنوان کنترل مثبت مقاوم به سیپروفلوکساسین و از *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ATCC 12228 به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

ج) استخراج DNA: برای این منظور از روش فنل کلروفرم استفاده گردید. به طور خلاصه، به رسوب تهیه شده از کشت باکتری های MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین، به ترتیب ۶۰۰ میکرولیتر تامپون لیز (Tris-HCl, pH7.4; EDTA ۵۰mM، ۱۳ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات (SDS 25%)، ۳ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰ mg/ml) اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۶۰ درجه سلیسیوس قرار داده شد. به دنبال آن ۶۰۰ میکرولیتر محلول فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) اضافه شد تا یک فاز شیری رنگ یکنواخت تشکیل گردد. سپس با دور ۱۳۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. روماند لوله های جدید منتقل گردید. این مرحله ۲ بار تکرار شد.

به منظور رسوب DNA، هم حجم فاز آبی اتانول سرد و خالص به همراه ۰/۱ میکرولیتر استات سدیم (1M) اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس قرار داده شد. سپس سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور انجام گرفت. رسوب حاصل پس از خشک شدن و در بافر حل گردید و به عنوان DNA در ادامه کار استفاده گردید. در نهایت برای تائید صحت استخراج ژنوم از الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد استفاده شد (۱۵).

د) بررسی وجود ژن های mecA و norA توسط روش PCR: به منظور تکثیر ژن *mecA* از پرایمرهای اختصاصی با توالی *mecA*-F: 5'-TCCAGATTACAACTTCACCAGG-3' و *mecA*-R: 5'-CCACTTCATATCTTGTAACG-3' استفاده شد (۱۷). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از Master Mix (حاوی $MgCl_2$ ، dNTPs و

Taq DNA Polymerase)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ پیکومول)، ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر و ۱ میکرولیتر از DNA الگو انجام گرفت. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۲ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال در دمای ٦۰ درجه سلیسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد (۱۷). محصولات PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین برای تکثیر ژن *norA* از پرایمرهای اختصاصی با توالی norA-F 5'-ATCGGTTTAGTAATACCAGTCTTGC-3' و norA-R: 5'-GCGATATAATCATTTGAGATAACGC-3' استفاده گردید (۱۸). واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ٤ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۲ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال در دمای ٦۰ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ٤ دقیقه انجام شد (۱۸). برای مشاهده طول محصولات مورد نظر از روش الکتروفورز و ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید.

ه) تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی و حداقل غلظت مهاری (MIC) سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید: پس از تعیین جدایه های MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین، این جدایه ها برای تست MIC (Minimum Inhibitory Concentration) مورد مطالعه قرار گرفتند. آزمایش MIC بر اساس CLSI به روش رقیق سازی در میکروپلیت برای سیپروفلوکساسین، اتیدیوم بروماید انجام شد. MIC به صورت سه بار تکرار با استفاده از روش میکرودایلوشن در پلیت های ۹٦ خانه ای انجام گرفت. محلول اتیدیوم بروماید (۲۵۰-۲ µg/ml) به داخل چاهک A ریخته و با محیط کشت مولر هینتون براث (مرک، آلمان) به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. به چاهک های بعدی تا H مقدار ۵۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث اضافه گردید. از چاهک اول به ترتیب ۵۰ میکرولیتر به چاهک ها تا H اضافه شد تا رقت سازی متوالی انجام گیرد. به تمامی چاهک ها مقدار ۵۰ میکرولیتر از کشت میکروبی سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین با غلظت نیم مک فارلند اضافه شد. MIC به عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری محسوب تعریف گردید. لازم به ذکر است که جهت تعیین غلظت MIC سیپروفلوکساسین، از غلظت ۰/۵ تا ۱۲۸ µg/Ml استفاده شد. لازم به ذکر است که در یکی از چاهک ها، از CCCP به همراه باکتری به منظور تشخیص عدم کشندگی CCCP استفاده گردید (۱۹).

و) بررسی فنوتیپی وجود پمپ افلاکس فعال: این مرحله مانند روش تعیین غلظت MIC انجام می گیرد. به طور خلاصه، ابتدا غلظت MIC اتیدیوم بروماید تعیین گردید. غلظت ۰/۵ مک فارلند از کشت باکتری به داخل چاهک های حاوی غلظت های پایین تر از MIC اتیدیوم بروماید اضافه شد. به دنبال آن، ترکیب CCCP در غلظت ۵۰ µg/mL اضافه گردید. پمپ افلاکس فعال زمانی تشخیص داده می شود که MIC اتیدیوم بروماید به همراه CCCP از MIC اتیدیوم بروماید به تنهایی کمتر باشد (۱۹).

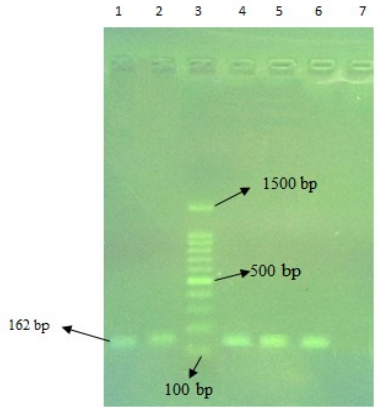
ز) تجزیه و تحلیل آماری: برای این منظور از نسخه بیست و یکم نرم افزار آماری SPSS و آزمون مربع کای استفاده شد. مرز معناداری روی $P<0.05$ قرار گرفت.

یافته ها

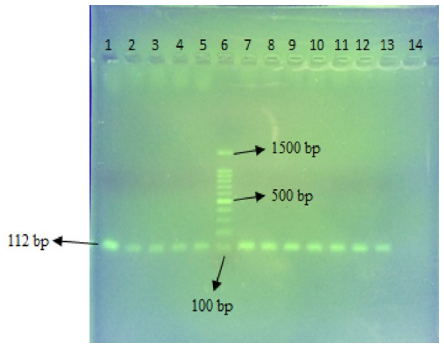
الف) جداسازی و تشخیص سویه ها از نمونه های بالینی: در این مطالعه در مجموع ۲۵۰ نمونه از آزمایشگاه ها و بیمارستان های شهر تهران در سال های ۱۳۹۳-۱۳۹۲ جمع آوری شد. نمونه ها از ادرار، خون، پوست و زخم جداسازی شدند. با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی مانند رشد بر روی محیط مانیتول سالت آگار، محیط بردپارکر و تست های کاتالاز

جدول ۱: میزان مقاومت و حساسیت سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی بیوتیک های مختلف.

آنتی بیوتیک	سویه های مقاوم		سویه های متوسط		سویه های حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
متی سیلین (سفوکسیتین)	۳٤	٦٨	۰	۰	۱٦	۳۲
ونکومایسین	۰	۰	۰	۰	۵۰	۱۰۰
سیپروفلوکساسین	۱۲	۲٤	۲	۱	۳۷	۷٤
پنی سیلین	٤۹	۹۸	۰	۰	۱	۲
اریترومایسین	۲۸	۵٦	۱۸	۹	۱۳	۲٦
تری متوپریم	٤۳	۸٦	۳	٦	٤	۸
آمیکاسین	۲۱	٤۲	۳	٦	٤	۸
آمپی سیلین	٤۵	۹۰	۰	۰	۵	۱۰
جنتامایسین	۲۰	٤۰	۳	٦	۲۷	۵٤
آموکسی سیلین	٤۳	۸٦	۰	۰	۷	۱٤
کلرامفنیکل	٤	۸	۷	۱٤	۳۹	۷۸
کلیندامایسین	۲۳	٤٦	٦	۱۲	۲۱	٤۲
کلیستین	۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۱۰۰



شکل ۱: نتایج تکثیر ژن *mecA* در سویه های مقاوم به متی سیلین. ستون های ۱، ۲، ٤ و ۵) نمونه های مقاوم به متی سیلین (تکثیر قطعه ۱٦۲ جفت بازی)، ستون ۳) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ٦) کنترل مثبت، ستون ۷) کنترل منفی.



شکل ۲: نتایج تکثیر ژن *norA* در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین. ستون های ۱ تا ۵ و ۷ تا ۱۲) نمونه های مقاوم به فلوکساسین (تکثیر قطعه ۱۱۲ جفت بازی)، ستون ٦) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱۳) کنترل مثبت، ستون ۱٤) کنترل منفی.

و کواگولاز، ۵۰ نمونه (۲۰ درصد) *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شد.

ب) نتایج تست حساسیت میکروبی: نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که ۳٤ جدایه از ۵۰ جدایه مورد بررسی (٦٨ درصد) نسبت به آنتی بیوتیک متی سیلین مقاوم بودند و به عنوان سویه های MRSA در نظر گرفته شدند. در این مطالعه ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های پنی سیلین (۹۸ درصد)، آمپی سیلین (۹۰ درصد)، آموکسی سیلین و تری متوپریم (۸٦ درصد)، سفوکسیتین (٦٨ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک سیپروفلاکساسین (۷٤ درصد حساس)، ونکومایسین (۱۰۰ درصد حساس) و کلیستین (۱۰۰ درصد) بودند. در مجموع میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های جداسازی شده از نمونه های ادرار و زخم بیشتر از سایر سویه ها بود. همچنین مقاومت نسبت به ونکومایسین در هیچ یک از سویه ها مشاهده نشد. نتایج آنتی بیوگرام سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از نمونه های بالینی در جدول ۱ خلاصه شده است.

ج) نتایج تکثیر ژن mecA برای بررسی مولکولی وجود ژن مقاومت به متی سیلین از پرایمر اختصاصی ژن *mecA* استفاده شد. با توجه به طراحی پرایمرها انتظار باند ۱٦۲ جفت باز وجود داشت (شکل ۱). نتایج نشان داد که ٦٨ درصد نمونه ها (۳٤ نمونه) واجد ژن *mecA* بودند. همچنین میزان شیوع ژن *mecA* در نمونه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از نمونه های زخم بیشتر از سایر نمونه ها بود. به طوریکه از ۳۰ نمونه تعداد ۱۵ نمونه متعلق به نمونه های زخم بود ($P<0.032$).

د) نتایج تکثیر ژن norA به منظور بررسی وجود ژن پمپ افلاکس norA در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده، از پرایمرهای اختصاصی این ژن استفاده شد و انتظار وجود باند ۱۱۲ bp داشتیم که شکل آن در ژل الکتروفورز مشاهده شد (شکل ۲). ژن *norA* در تمامی سویه های MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین دیده شد

جدول ۲: تعیین MIC سیپروفلوکساسین، اتیدیوم بروماید، CCCP و ترکیب آنها در سویه های MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین.

MIC بر حسب میکروگرم در میلی لیتر				
سیپروفلوکساسین	اتیدیوم بروماید	CCCP	CCCP+اتیدیوم بروماید	CCCP+سیپروفلوکساسین
۷	۱۲۵	٦۲/۵	۳۱/۲۵	٦۲/۵
۹	۱۵/٦۲	۷/۸۱	۳/۹	۷/۸۱
۳۱	۳۱/۲۵	۷/۸۱	۷/۸۱	۳۱/۲۵
۳۲	٦۲/۵	۱۵/٦	۳/۹	۳۱/۲۵
۳۳	۱۲۵	٦۲/۵	۱۵/٦۲	٦۲/۵
۳٤	۲۵۰	۱۲۵	۳۱/۲۵	٦۲/۵
٤۳	۳۱/۲۵	۱۵/٦۲	۷/۸	۱۵/٦۲
٤۵	۳۱/۲۵	۷/۸۱	۱/۹۵	۱۵/٦۲
٤٦	۱۵/٦۲	۷/۸۱	۳/۹	۳/۹
٤۷	٦۲/۵	۱۵/٦۲	۷/۸۱	۱۵/٦
٤۸	۳۱/۲۵	۷/۸۱	۷/۸۱	۷/۸۱
۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۲۵
ATCC 25923	٦۲/۵	۳۱/۲۵	۷/۸۱	۳۱/۲۵

(۱۲ نمونه). لازم به ذکر است که ارتباط معناداری بین وجود ژن *norA* و ژن *mecA* در بین سویه ها وجود نداشت (P>0.05).

ه) *بررسی MIC و مطالعه فنوتیپی پمپ افلاکس*: نتایج حاصل از MIC و فعالیت CCCP در جدول ۲ آمده است. همانطور که مشخص است MIC سیپروفلوکساسین در سویه ها از محدوده ۱۵/٦۲ تا ۲۵۰ بود و در مجاورت مهارکننده پمپ افلاکس CCCP میزان MIC سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید کاهش یافته است. این امر نشان دهنده فعال بودن پمپ افلاکس در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین می باشد.

بحث

در مطالعه حاضر ۲۰ درصد نمونه های بالینی آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیک نشان داد که *جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس* به اکثر آنتی بیوتیک های مورد بررسی مقاوم بودند. تمامی سویه ها به آنتی بیوتیک ونکومایسین و کلیستین حساس بودند. با توجه به نتایج، درمان و کنترل عفونت های ناشی از این ارگانیسم امری نگران کننده به نظر می رسد. همچنین، با توجه به تاثیرات جانبی نامطلوب آنتی بیوتیک کلیستین بر روی سیستم عصب انسان، این دارو برای درمان عفونت های *استافیلوکوکوس اورئوس* مناسب نمی باشد.

از طرف دیگر، با نگاهی به مکانیسم عمل این آنتی بیوتیک که بر روی غشای ارگانیسم تاثیر دارد، می توان دریافت که با بهبود و بهینه سازی داروهای با مکانیسم تاثیر بر روی غشا این امکان وجود دارد که در آینده بتوان این نوع عفونت ها را کنترل نمود. تاکنون مطالعات مختلفی بر روی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* های جداسازی شده از نمونه های بالینی انجام شده است. اما تاکنون مطالعه ای در زمینه مقاومت سویه های MRSA به سیپروفلوکساسین در ایران انجام نشده است. همانطور که در مطالعات نشان داده شده است سویه های MRSA یکی از پاتوژن های مهم بیمارستانی می باشد که به سرعت در سرتاسر جهان شیوع پیدا کرده اند.

این ارگانیسم به اکثر آنتی بیوتیک های بتالاکتام مقاوم شده است و جایگزین های کمی برای درمان آن وجود دارد (۲۰). یکی از جایگزین های درمانی آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین از خانواده کوئینولون ها می باشد. اما مطالعات جدید نشان دهنده افزایش مقاومت به این آنتی بیوتیک نیز بوده است. در این مطالعه از میان ۳٤ سویه MRSA، ۱۲ سویه مقاوم به سیپروفلوکساسین (۲٤٪) بودند.

این امر نشان دهنده شروع مقاومت به سیپروفلوکساسین در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد. در سال های اخیر مقاومت بالا به کوئینولون ها در سویه های MRSA گزارش شده است. در ایالات متحده در نیویورک، شیوع

سویه های MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین سه ماه پس از استفاده از سیپروفلوکساسین ایجاد شده است (۲۱). مکانیسم مقاومت به کوئینولون ها در باکتری ها مقاومت متفاوت است. در باکتری *اشریشیا کلی*، مکانیسم مقاومت ناشی از تغییر ساختار آنزیمی DNA جیراز می باشد (۲۲).

همانطور که قبلاً اشاره شد، یکی از مکانیسم های مقاومت به سیپروفلوکساسین در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس*، وجود پمپ های افلاکس می باشد. این پمپ ها باعث دفع و تراوش طیف گسترده ای از مواد شامل آنتی بیوتیک ها، ترکیبات آنتی سپتیک، رنگ ها و دترژنت ها می گردند. بنابراین در ایجاد مقاومت چند دارویی نقش بسزایی دارند (۲۳).

طیف وسیع مقاومت منجر به بی اثر شدن بسیاری از آنتی بیوتیک های رایج می شود. بنابراین جستجوی اهداف نوین درمانی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. تاکنون نقش این پمپ ها در مقاومت دارویی این باکتری به طور کامل شناسایی نشده است. در این مطالعه نقش پمپ افلاکس *norA* که از خانواده MFS که در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد، به صورت فنوتیپی و ژنوتیپی مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج نشان داد که تمام سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین، دارای ژن *norA* بودند. بنابراین درصد بالای وجود ژن *norA* در میان سویه های مقاوم به داروها را نباید نادیده گرفت. هر چند که باید توجه داشت که مقاومت ذاتی نسبت به آنتی بیوتیک ها در برخی از جدایه ها می تواند کاملاً ناشی از پمپ های افلاکس باشد.

با مقایسه نتایج فنوتیپی و ژنوتیپی پمپ افلاکس *norA* در این مطالعه می توان نتیجه گرفت که درصد فعالیت پمپ افلاکس *norA* به صورت فنوتیپی کمتر از ژنتیکی بوده است. دلیل این امر را می توان به خاموش بودن ژن ها، درصد بیان این ژن ها در بین سویه ها و جهش های کروموزومی نسبت داد. مطالعات مختلفی در زمینه بررسی پمپ های افلاکس در باکتری ها انجام شده است.

سیفول (Saiful) و همکاران در سال ۲۰۰۸ پمپ های افلاکس *norA* را در سویه های MRSA مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه ۱۹ سویه MRSA جداسازی شد و ژن های پمپ افلاکس با استفاده از PCR و فعالیت پمپ به کمک روش اتیدیوم بروماید مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که از ۱۹ سویه مورد بررسی، ۱۶ سویه دارای ژن *norA* بودند و تمامی سویه ها دارای پمپ های افلاکس فعال بودند (۲۴).

پورمند (Pourmand) و همکاران در سال ۲۰۱۴، بیان ژن پمپ افلاکس *norA* را در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین مورد بررسی قرار دادند. یافته های آنها نشان داد که ژن *norA* در تمامی سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین وجود دارد و بیان ژن آن در مجاورت بیوساید هگزاهیدروکوئینولون افزایش می یابد (۲۱).

در مطالعه حاضر برای اثبات اینکه آیا مقاومت به سیپروفلوکساسین ناشی از پمپ افلاکس می باشد یا خیر، فعالیت پمپ افلاکس توسط بررسی MIC سیپروفلوکساسین، در حضور و عدم حضور مهارکننده پمپ افلاکس CCCP انجام شد. نتایج نشان داد که CCCP میزان MIC را کاهش داد که نشان دهنده حضور پمپ افلاکس وابسته به پروتون می باشد. به منظور ارزیابی بیشتر نقش پمپ افلاکس در مقاومت، از اتیدیوم بروماید در حضور و عدم حضورCCCP استفاده گردید. همانطور که در نتایج اشاره شد، در حضور CCCP میزان MIC اتیدیوم بروماید کاهش می یابد. این یافته منطبق با سایر نتایج در مطالعات دیگر می باشد. این امر نشان دهنده این موضوع است که پمپ افلاکس مسئول مقاومت به آنتی بیوتیک است. اتیدیوم بروماید یکی از سوبسترای معمول پمپ افلاکس می باشد که در بسیاری از مطالعات به عنوان کنترل مثبت برای بررسی فعالیت پمپ افلاکس قرار می گیرد.

همچنین، ترکیب اتیدیوم بروماید-CCCP به عنوان استاندارد کنترل مثبت برای فعالیت پمپ افلاکس در *استافیلوکوکوس اورئوس* به کار می رود. پاتل (Patel) و همکاران در ۲۰۱۰، با استفاده از اتیدیوم بروماید فعالیت پمپ افلاکس را در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که این روش دارای اختصاصیت ۹۲

درصدی برای تشخیص فعالیت پمپ افلاکس بوده و فعالیت آن مرتبط با بیان ژن *norA* می باشد (۲۵).

کاستا (Costa) و همکاران در سال ۲۰۱۳، پمپ های افلاکس را در ۵۲ سویه مقاوم به سیپروفلوکساسین با استفاده از اتیدیوم بروماید مورد مطالعه قرار دادند.یافته های آنها نشان داد که پمپ های افلاکس نقش مهمی در کاهش مقاومت به آنتی بیوتیک ها و هم چنین بیوسایدها ایفا می کنند (۲۶).

کاتو (Couto) و همکاران در سال ۲۰۰۸ پاسخ ناشی از پمپ افلاکس را در مقابل اتیدیوم بروماید در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که مقاومت به کوئینولون ها و بیوسایدها در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* ناشی از پمپ های افلاکس می باشد و در هنگام مواجه با آنتی بیوتیک بیان ژن *norA* نسبت به نمونه های کنترل، ۳۵ برابر بیشتر است (۲۷).

در نهایت پیشنهاد می شود که مطالعات جدیدی برای تولید و گسترش مولکول های مهار کننده افلاکس انجام شود. توسعه مهارکننده های پمپ افلاکس به امکان کنترل خطر سویه های مقاوم به حاوی پمپ های افلاکس منجر خواهد شد. همچنین پیشنهاد می شود بیان ژن های پمپ افلاکس در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین با روش Real Time PCR نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که فعالیت پمپ افلاکس *norA* یکی از اجزای مهم مقاومت به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین از خانواده فلئوروکوئینولون ها می باشد. اما نباید نقش سایر عوامل و مکانیسم های دخیل در مقاومت نادیده گرفته شود. همچنین، با توجه به وجود ۱۰۰ درصدی ژن *norA* در سویه های MRSA *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به سیپروفلوکساسین، بررسی حضور این ژن ها در پیشنهاد الگوی درمانی مناسب بیماران آلوده به این باکتری حائز اهمیت است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاران دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی به خصوص جناب آقای مهندس سهیل صالحی به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Iliyasu G, Daiyab FM, Tiamiyu AB, Abubakar S, Habib ZG, Sarki AM, Habib AG. Nosocomial infections and resistance pattern of common bacterial isolates in an intensive care unit of a tertiary hospital in Nigeria: A 4-year review. J Crit Care. 2016; 34: 116-120.
2. Changchien CH, Chen SW, Chen YY, Chu C. Antibiotic susceptibility and genomic variations in *Staphylococcus aureus* associated with Skin and Soft Tissue Infection (SSTI) disease groups. BMC Infect Dis. 2016; 10:16(1): 276.
3. Davoodabadi F, Mobasherizadeh S, Mostafavizadeh K, Shojaei H, Havaei SA, Koushki AM, Moghadasizadeh Z, Meidani M, Shirani K. Nasal colonization in children with community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Adv Biomed Res. 2016; 11; 5: 86.
4. Mustapha M, Bukar-Kolo YM, Geidam YA, Gulani IA. Phenotypic and genotypic detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hunting dogs in Maiduguri metropolitan, Borno State, Nigeria. Vet World. 2016; 9(5): 501-506.
5. Garonzik SM, Lenhard JR, Forrest A, Holden PN, Bulitta JB, Tsuji BT. Defining the active

fraction of daptomycin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using a pharmacokinetic and pharmacodynamic approach. PLoS One. 2016; 11(6): e0156131.

6. Borgmann S, Rieß B, von Wernitz-Keibel T, Bühler M, Layer F, Strommenger B. Recovery of a 10-year-old girl from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sepsis in response to low-dose ceftaroline treatment. Ther Clin Risk Manag. 2016; 11; 12: 749-753.

7. K. Poole. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. Ann Med. 2007; 39: 162-176.

8. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. Drugs. 2004; 64; 159-204.

9. Kosmidis C, Schindler BD, Jacinto PL, Patel D, Bains K, Seo SM, Kaatz GW. Expression of multidrug resistance efflux pump genes in clinical and environmental isolates of *Staphylococcus aureus.* Int J Antimicrob Agents. 2012; 40: 204-209.

10. Paulsen IT, Lewis K. Microbial multidrug efflux. Horizon Scientific. 2002; 3(2): 143-144.

11. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. Drugs. 2009; 69: 1555-1623.

12. Ding Y, Onodera Y, Lee JC, Hooper DC. NorB, an efflux pump in *Staphylococcus aureus* strain MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses. J Bacteriol. 2008; 190: 7123-7129.

13. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. Adv Drug Deliv Rev. 2005; 57: 1486-1513.

14. Motallebi M, Jabalameli F, Asadollahi K, Taherikalani M, Emaneini M. Spreading of genes encoding enterotoxins, haemolysins, adhesin and biofilm among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains with staphylococcal cassette chromosome *mec* type IIIA isolated from burn patients. Microb Pathog. 2016; 97: 34-37.

15. Ruu HD, Cornelis V, Christel D, Michele B, Nancy L, Etienne EE, Stobberingh A. Rapid detection of panton-valentine leukocidin from clinical isolates of *Staphylococcus aureus* strains by Real-Time PCR. J FEMS Microbial Letters. 2004; 240(2): 225-228.

16. Clinical and laboratory standards institute (CLSI), 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. CLSI, Wayne, Pa. M100-S16, 26, no. 3. 2006.

17. Wielders CL,1Fluit AC, Brisse S, Verhoef J, Schmitz FJ. *mecA* gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. J Clin Microbiol. 2002; 40(11): 3970-3975.

18. Ding Y, Onodera Y, Lee JC. NorB, an efflux pump in *Staphylococcus aureus* strain MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses. J Bacteriol. 2008; 190(21): 7123-7129.

19. Ardebili A, Talebi M, Azimi L, Rastegar Lari A. Effect of efflux pump inhibitor carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone on the minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Jundishapur J Microbiol. 2014; 7(1): e8691.

20. Ghosh S, Banerjee M. Methicillin resistance & amp; inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Indian J Med Res. 2016; 143(3): 362-364.

21. Pourmand MR, Yousefi M, Salami SA, Amini M. Evaluation of expression of *NorA* efflux pump in ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* against hexa hydroquinoline derivative by

Real-time PCR. Acta Med Iran. 2014; 52(6): 424-429.

22. Ardebili A, Lari AR, Beheshti M, Lari ER. Association between mutations in *gyrA* and *parC* genes of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and ciprofloxacin resistance. Iran J Basic Med Sci. 2015; 18(6): 623-626.

23. Piddock LJV. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin Microbiol Rev. 2006; 19: 382-402.

24. Saiful AJ, Mastura M, Zarizal S, Mazurah MI, Shuhaimi M, Ali AM .Efflux genes and active efflux activity detection in Malaysian clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Basic Microbiol. 2008; 48(4): 245-251.

25. Patel D, Kosmidis C, Seo SM, Kaatz GW. Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(12): 5070-5073.

26. Costa SS, Junqueira E, Palma C, Viveiros M, Melo-Cristino J, Amaral L, Couto I. Resistance to antimicrobials mediated by efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. Antibiotics (Basel). 2013; 2(1): 83-99.

27. Couto I, Costa SS, Viveiros M, Martins M, Amaral L. Efflux-mediated response of *Staphylococcus aureus* exposed to ethidium bromide. J Antimicrob Chemother. 2008; 62(3): 504-513.

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 4, January 2017

Original Article

Antibiotic resistance assessment, and genotypic and phenotypic detection of *norA* efflux pump in methicillin and ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* isolates

Samaneh Sadat Kazemi[1], Fahimeh Nemati Mansoor[2], Amir Mirzaie[3], Fatemeh Ashrafi[4]

[1] MS.c., Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Science & Technology, Pharmaceutical Sciences branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [2] Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Science & Technology, Pharmaceutical Sciences branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [3] Assistant Professor., Young Researchers and Elite Club, East Tehran branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [4] Assistant Professor, Department of Biology, Tehran North branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Staphylococcus aureus* is one of the major causes of nosocomial infections throughout the world. Efflux pumps such as *norA* play a major role in the development of resistance to different antibiotics in this bacteria. The aim of this study was evaluation of the antibiotic resistance and detection of efflux pump (*norA*) in methicillin resistant (MRSA) and ciprofloxacin resistant *S. aureus* isolates using genotypic and phenotypic methods.

Materials & Methods: During this sectional study, 250 clinical samples were collected from different hospitals in Tehran, Iran. *S. aureus* isolates were identified and the antimicrobial susceptibility patterns were determined. Ciprofloxacin minimum inhibitory concentration (MIC) was determined in both MRSA and ciprofloxacin resistant isolates. Furthermore, the presence of *norA* efflux pump gene in MRSA and ciprofloxacin resistant isolates was assessed phenotypically using ciprofloxacin and ethidium bromide MIC, with CCCP as efflux pump inhibitor, and genetically using PCR method.

Results: Totally, 50 *S. aureus* isolates were recovered. The results of antibiotic susceptibility tests showed that 34 isolates (68%) were resistant to methicillin, of which 12 isolates (24%) were resistant to ciprofloxacin, as well. Moreover, all the MRSA- ciprofloxacin resistant strains harbored the *norA* gene and active efflux pump.

Conclusion: The results showed the correlation between ciprofloxacin resistance and *norA* efflux pump gene in MRSA isolates. Development of efflux pump inhibitors can be useful in the control of MRSA ciprofloxacin resistant strains.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Efflux pump, *norA*, Ciprofloxacin resistance.

Correspondence to: Fatemeh Ashrafi

Tel: +982122949793

E-mail: F_ashrafi@iau-tnb.ac.ir

Journal of Microbial World 2017, 9(4): 286-296.