مجلۀ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هجدهم، شماره ۱۱، آبان ۱۳۹۵، صفحه ۷۰-۶۳

فعالیت و بیان ژن پمپ افلاکس *norA* در ایزوله های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین

امیر میرزایی (PhD) *[۱]، حسن نوربازرگان (MSc)[۲]، حسن رحمتی (MSc)[۳]، مسعود زندی (MSc)[۴]

۱-باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی
۲-دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
۳-بخش میکروب شناسی، آزمایشگاه بالینی دکتر ایزد دوست تهران
۴-گروه پرستاری، واحد تویسرکان، دانشگاه آزاد اسلامی

دریافت: ۹۵/۴/۵، اصلاح: ۹۵/۵/۶، پذیرش: ۹۵/۷/۶

خلاصه

سابقه و هدف: یکی از مکانیسم های مقاومت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیک ها از جمله سیپروفلوکساسین، وجود پمپ های افلاکس همانند norA می باشد. در این مطالعه وجود پمپ های افلاکس *norA*، بیان و فعالیت آن در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، تعداد ۲۵۰ نمونه بالینی خون، ادرار، زخم و نای از بیماران بستری در چند بیمارستان شهر تهران جمع آوری شد. ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی گردید و به دنبال آن الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، وجود و بیان ژن پمپ افلاکس *norA* توسط روش های PCR و Real Time PCR و همچنین فعالیت پمپ افلاکس توسط روش کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: از میان ۲۵۰ نمونه بالینی، تعداد ۵۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شد و نتایج حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که ۶۸ درصد از نمونه ها (۳۴ نمونه) مقاوم به متی سیلین و ۳۲ درصد (۱۶ نمونه) حساس به متی سیلین بودند و از میان اینها ۲۴ درصد (۱۲ نمونه) مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. نتایج Real Time PCR نشان داد که سویه های مختلف بیان متفاوتی از ژن *norA* دارند و همچنین سویه های مقاومتر میزان بیان بالاتری از ژن *norA* دارند. همچنین تمامی سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای پمپ افلاکس فعال بودند.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که بین بیان ژن پمپ افلاکس *norA*، فعالیت آن و مقاومت به سیپروفلوکساسین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ارتباط وجود دارد.

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

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل عفونت زای فرصت طلب بیمارستانی در سرتاسر جهان می باشد و پیدایش استافیلوکوکوس اورئوسهای مقاوم به متی سیلین (Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus=MRSA) در سالهای اخیر به عنوان یکی از چالشهای مهم تبدیل شده است و علت ایجاد مقاومت به متی سیلین، وجود ژن *mecA* توسط این سویه ها است (۳-۱). آنتی بیوتیک های فلوروکوئینولون مانند سیپروفلوکساسین بطور معمول برای درمان عفونت های ناشی از باکتری‌های MRSA استفاده می‌شود. متاسفانه پس از تجویز سیپروفلوکساسین جهت درمان عفونت های ناشی از سویه های MRSA، این باکتری‌ها سریعا به سیپروفلوکساسین مقاوم شده اند (۴و۵). مکانیسم‌های مختلفی جهت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس وجود دارد و یکی از مکانیسم های مهم مقاومت به آنتی بیوتیک، وجود پمپ های افلاکس در این باکتری می باشد (۸-۶). بطور کلی پمپهای افلاکس باکتریایی بر اساس ترادف و شباهت اسیدهای آمینه در پنج گروه اصلی Major Facilitator Super Family (MFS)، ATP Binding Cassette، Resistance-Nodulation Division (RND)، Small Multidrug Resistance (SMR)، Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) قرار می‌گیرند (۱۲-۹). norA از خانواده پمپ افلاکس MFS بوده و یک پروتئین ۳۸۸ اسیدآمینه ای است که دارای ۱۲ جزء عبورکننده از غشا سلول می باشد که دارای شباهت ۲۴٪ با پمپ افلاکس Tet (A) در باکتری اشرشیاکلی می باشد (۱۵-۱۳). Jo و همکارانش نشان دادند که میزان بیان ژن های پمپ افلاکس *norA* در سویه های مختلف، متفاوت است (۱۶). از آنجایی که تاکنون مطالعه ای در زمینه بیان ژنهای پمپ افلاکس و بررسی عملکرد آن در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین در ایران صورت نگرفته است، این مطالعه بمنظور بررسی الگوی مقاومت میکروبی، وجود پمپ های افلاکس *norA* و همچنین بررسی عملکرد و بیان ژن پمپ افلاکس *norA* در سویه های بالینی مقاوم به سیپروفلوکساسین استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد.

---

* مسئول مقاله: دکتر امیر میرزایی
آدرس: تهران، جاده خاوران، شهرک قیامدشت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق. تلفن: ۰۲۱-۳۳۵۹۴۹۵۰
E-mail: Amir_mirzaie92@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.11.9.3]

[DOI: 10.22088/jbums.18.11.63]

مواد و روش‌ها

نمونه گیری، کشت و تشخیص ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس: در این مطالعه تجربی تعداد ۲۵۰ نمونه بالینی طی مدت ۶ ماه در بین سالهای ۱۳۹۳-۱۳۹۴ از خون، ادرار، زخم و نای از بیماران بستری در چند بیمارستان شهر تهران (بیمارستان امام حسین، صارم و بوعلی) که دارای بخشهای فعال عفونی بودند، جمع آوری شد. ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از تست های میکروبی رنگ آمیزی گرم، محیط مانیتول سالت آگار، محیط بردپارکر، تست کاتالاز، تست کواگولاز، آزمایش های کاتالاز، تخمیر مانیتول و DNase تشخیص قطعی داده شدند.

بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های جداسازی شده: پس از حصول اطمینان از شناسایی و تایید سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، حساسیت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف با روش دیسک دیفیوژن بر اساس استاندارد CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014) مورد بررسی قرار گرفت (۱۷).

حساسیت جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به دیسک های آنتی بیوتیکی سفوکسیتین (۱۰ μg)، ونکومایسین (۱۰ μg)، سیپروفلوکساسین (۵ μg)، پنی سیلین (۱۰ واحد)، اریترومایسین (۱۵ μg)، تری متوپریم (۲۵ μg)، آمیکاسین (۱۵ μg)، آمپی سیلین (۱۰ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، آموکسی سیلین (۱۰ μg)، کلرامفنیکول (۳۰ μg) و کلیندامایسین (۲ μg) (MAST, UK) در محیط کشت Muller Hinton agar (مرک، آلمان) انجام گردید. در تمامی آزمایشها، سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 33591 به عنوان کنترل مثبت مقاوم به متی سیلین (حاوی ژن *mecA*) و از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 به عنوان کنترل مثبت مقاوم به سیپروفلوکساسین و از استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس ATCC 12228 به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

استخراج DNA و شناسایی ژن های *mecA*، *norA* توسط روش PCR: استخراج DNA به روش دستی (فنل کلروفرم) انجام شد و در نهایت برای تائید صحت استخراج ژنوم از الکتروفورز ژل آگاروز ۱٪ استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده به عنوان الگو، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر رفت، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول)، ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس (سیناژن، ایران)، ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر انجام گرفت. در ادامه واکنش PCR برای ژن *mecA* با استفاده از پرایمرهای رفت 5’ TCCAGATTACAACTTCACCAGG 3’ برای و برگشت 5’ CCACTTCATATCTTGTAACG 3’ و ژن *norA* از پرایمرهای 5’ ATCGGTTTAGTAATACCAGTCTTGC 3’ و پرایمر *norA*-R شامل توالی 5’ GCGATATAATCATTTGAGATAACGC 3’ طبق برنامه دمایی و زمانی انجام گردید(جدول ۱). در کل واکنش های PCR، از آب به عنوان کنترل منفی و از DNA باکتری های استاندارد ATCC به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و آنالیز بیان ژن *norA* توسط روش Real Time PCR: جهت استخراج RNA، سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت مولر هینتون براث در دمای ۳۷ °C در مجاورت غلظت sub MIC از سیپروفلوکساسین کشت داده شد. به دنبال آن، استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA (کیاژن، امریکا) بر طبق دستورالعمل انجام گرفت.

در ادامه، سنتز cDNA با استفاده از کیت Quanti Tect Reverse Transcription kit (کیاژن، امریکا) انجام گرفت. در انتها، غلظت cDNAهای استخراج توسط نانودراپ تعیین غلظت شدند. به منظور بررسی ارزیابی بیان ژن پمپ افلاکس norA از روش Real Time PCR کمی (qRT-PCR) با استفاده مسترمیکس حاوی سایبرگرین (Applied Biosystem، انگلستان) انجام گرفت. مواد مورد استفاده در حجم ۲۰ میکرولیتر مسترمیکس شامل ۲ میکرولیتر از cDNA، ۱۰ پیکومول از پرایمرهای رفت و برگشت، ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس حاوی سایبر گرین بود که در دستگاه Bioneer کره انجام گرفت. برنامه دمایی مورد استفاده در qPCR شامل ۹۰°C به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ °C ۱۵ ثانیه، ۱ دقیقه دمای ۶۰°C بود که در ۴۰ سیکل انجام شد (جدول ۲). همچنین ژن *gmk* (گوانیلات کیناز) به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. در انتها بیان نسبی ژن *norA* توسط روش ΔΔCT محاسبه گردید.

جدول ۱. شرایط دمایی و زمانی واکنش PCR برای ژن mecA و norA.

زمان و دما ژن	دناتوراسیون اولیه (دقیقه/ سانتی‌گراد)	دناتوراسیون ثانویه (ثانیه و سانتی گراد)	اتصال پرایمرها (ثانیه و سانتی‌گراد)	پلیمریزاسیون (ثانیه و سانتی‌گراد)	پلیمریزاسیون نهایی (دقیقه و سانتی گراد)	تعداد سیکل
mecA	۵، ۹۴	۵۰، ۹۴	۵۰، ۶۰	۵۰، ۷۲	۵، ۷۲	۳۰
norA	۴، ۹۴	۵۰، ۹۵	۳۰، ۶۰	۶۰، ۷۲	۴، ۷۲	۳۰

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده در qRT-PCR.

Primer	Sequence (5-3)	Size (bp)	Ref.
norA-F	ATCGGTTTAGTAATACCAGTCTTGC	۱۱۲	۲۱
norA-R	GCGATATAATCATTTGAGATAACGC	۱۱۲	
Gmk-F	TATCAGGACCATCTGGAGTAGG	۱۲۲	۲۱
Gmk-R	CATCAACTTCACCTTCACGC	۱۲۲	

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.11.9.3]
[DOI: 10.22088/jbums.18.11.63]

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی و حداقل غلظت مهاری (MIC) سیپروفلوکساسین: آزمایش MIC (Minimum Inhibitory Concentration) بر اساس CLSI به روش رقیق سازی در میکروپلیت برای سیپروفلوکساسین، اتیدیوم بروماید انجام شد. MIC بصورت سه بار تکرار با استفاده از روش میکرودایلوشن در پلیت های ۹۶ خانه ای انجام شد. از غلظت (۲–۲۵۰ μg/ml) محلول اتیدیوم بروماید و از غلظت ۰/۵ تا ۱۲۸ μg/mL سیپروفلوکساسین جهت مطالعه MIC استفاده شد. لازم به ذکر است که از چاهک حاوی باکتری فاقد سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید به عنوان کنترل منفی و از چاهک حاوی باکتری استاندارد، سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

بررسی فنوتیپی وجود پمپ افلاکس فعال: در این تست از ترکیبی به نام CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) به عنوان مهارکننده پمپ افلاکس استفاده شد. این ترکیب فسفوریلاسیون اکسیداتیو و شیب غلظتی غشای سلولی را تخریب کرده و مانع از فعالیت پمپ افلاکس در باکتری ها می شود و این روش همانند روش تعیین غلظت MIC انجام می‌گیرد. در این روش بعد از تعیین غلظت MIC اتیدیوم بروماید، ترکیب CCCP به عنوان مهار کننده پمپ افلاکس در غلظت ۲۰ μg/mL به چاهکها اضافه و پمپ افلاکس فعال زمانی تشخیص داده می‌شود که MIC اتیدیوم بروماید به همراه CCCP از MIC اتیدیوم بروماید به تنهایی کمتر باشد.

تجزیه و تحلیل آماری: محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS ۲۱ انجام گردید، نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مـورد بررسی قرار گرفت و p<۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

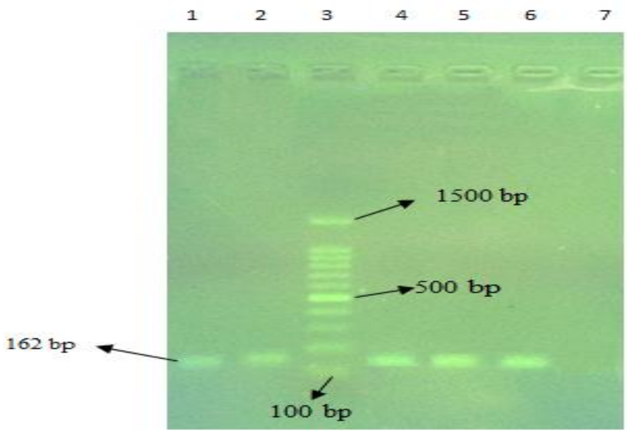
یافته ها

نتایج تست حساسیت میکروبی: نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که ۳۴ ایزوله از ۵۰ ایزوله مورد بررسی (۶۸٪) نسبت به آنتی بیوتیک متی سیلین مقاوم بودند و به عنوان سویه های MRSA در نظر گرفته شدند و میزان مقاومت به سیپروفلاکساسین ۲۴ درصد بود(جدول ۳).

جدول ۳. میزان مقاومت و حساسیت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیک‌های مختلف

سویه ها آنتی بیوتیک	مقاوم تعداد(درصد)	متوسط تعداد(درصد)	حساس تعداد(درصد)
متی سیلین (سفوکسیتین)	۳۴(۶۸)	۰(۰)	۱۶(۳۲)
ونکومایسین	۰(۰)	۰(۰)	۵۰(۱۰۰)
سیپروفلوکساسین	۱۲(۲۴)	۱(۲)	۳۷(۷۴)
پنی سیلین	۴۹(۹۸)	۰(۰)	۱(۲)
اریترومایسین	۲۸(۵۶)	۹(۱۸)	۱۳(۲۶)
تری متوپریم	۴۳(۸۶)	۶۹۳)	۴(۸)
آمیکاسین	۲۱(۴۲)	۳(۶)	۴(۸)
آمپی سیلین	۴۵(۹۰)	۰(۰)	۵(۱۰)
جنتامایسین	۲۰(۴۰)	۳(۶)	۲۷(۵۴)
آموکسی سیلین	۴۳(۸۶)	۰(۰)	۷(۱۴)
کلرامفنیکل	۴(۸)	۷(۱۴)	۳۹(۷۸)
کلیندامایسین	۲۳(۴۶)	۶(۱۲)	۲۱(۴۲)
کلیستین	۰(۰)	۰(۰)	۱۰۰(۱۰۰)

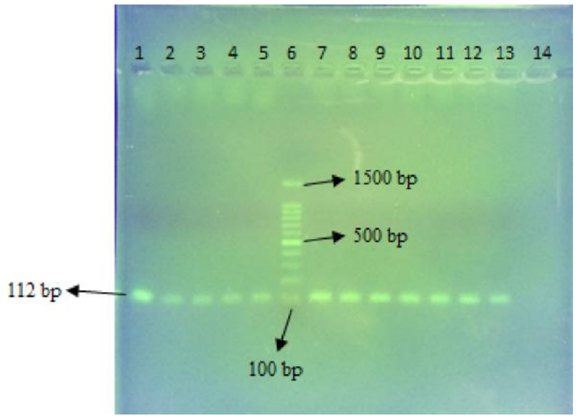
نتایج تکثیر ژن *mecA* : برای بررسی مولکولی وجود ژن مقاومت به متی سیلین از تکثیر ژن *mecA* استفاده شد و با توجه به طراحی پرایمرها انتظار باند ۱۶۲ جفت باز داشتیم (شکل ۱). نتایج نشان داد که توزیع ژن *mecA* در نمونه‌های استافیلوکوکی در ۶۸ درصد نمونه‌ها (۳۴ نمونه) وجود داشت. میزان شیوع ژن *mecA* در نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از نمونه های زخم بیشتر از سایر نمونه ها بود بطوریکه از ۳۰ نمونه، ۱۵ نمونه متعلق به نمونه های زخم بود (p<۰/۰۳۲).



شکل ۱. نتایج تکثیر ژن *mecA* در سویه های مقاوم به متی سیلین. شماره ۱ تا ۲، ۴، ۵: نمونه های مقاوم به متی سیلین، ۷: کنترل منفی، ۶: کنترل مثبت، ۳: مارکر + DNA 100bp

نتایج تکثیر ژن *norA* : به منظور بررسی وجود ژن پمپ افلاکس *norA* در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده، از پرایمرهای اختصاصی این ژن استفاده شد و انتظار وجود باند ۱۱۲ bp داشتیم که ژن *norA* در تمامی ۱۲ سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین دیده شد(شکل ۲).

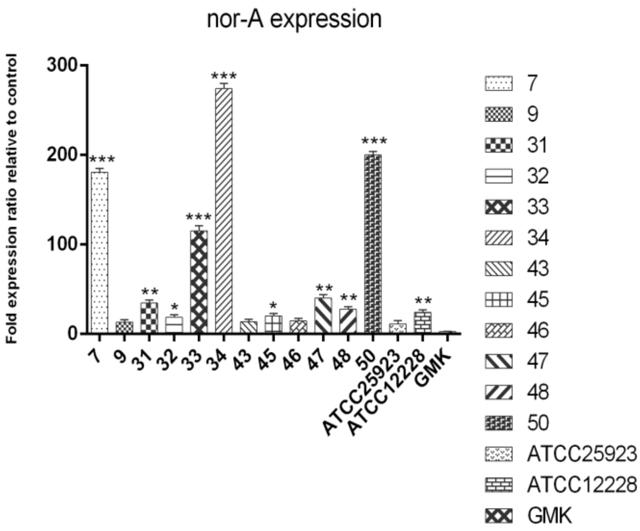
بررسی بیان ژن *norA* در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین: نتایج نشان داد که سویه های مختلف با میزان مقاومت مختلف، بیان متفاوتی از ژن *norA* دارند و سویه های مقاوم تر دارای بیان بیشتری از ژن *norA* بودند و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در مقایسه با بیان ژن *gmk* داشتند (p<۰/۰۵) (نمودار ۱).



شکل ۲. نتایج تکثیر ژن *norA* در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین. شماره ۱ تا ۵ و ۷ تا ۱۲: نمونه های مقاوم به فلوکساسین، ۱۳: کنترل مثبت، ۱۴: کنترل منفی، ۶: مارکر DNA 100 bp+

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.11.9.3]

[DOI: 10.22088/jbums.18.11.63]



نمودار ۱. نمودار بیان ژن *norA* در سویه‌های مختلف مقاوم به سیپروفلوکساسین. اعداد بیان ژن *norA* چندبرابر شدن بیان (Fold change) را نشان می دهد. نتایج به صورت چند برابر شدن بیان در مقایسه با نمونه های کنترل گزارش شده است (*p<۰/۰۵، **p<۰/۰۱، *** p<۰/۰۰۱، n=3)

بررسی MIC و مطالعه فنوتیپی پمپ افلاکس: نتایج حاصل از MIC و فعالیت CCCP در جدول ۴ آمده است. همانطور که مشخص است MIC سیپروفلوکساسین در سویه ها از محدوده ۲۵۰-۱۵/۶۲ بود و در مجاورت مهارکننده پمپ افلاکس CCCP میزان MIC سیپروفلوکساسین، اتیدیوم بروماید کاهش یافته است که نشان دهنده فعال بودن پمپ افلاکس در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین می باشد (جدول ۴).

جدول ۴. تعیین MIC سیپروفلوکساسین، اتیدیوم بروماید، CCCP و ترکیب آنها در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین

MIC(µg/ml) Isolates	Ciprofloxacin	EtBr	EtBr+CCCP	Ciprofloxacin +CCCP
۷	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵
۹	۱۵/۶۲	۷/۸۱	۳/۹	۷/۸۱
۳۱	۳۱/۲۵	۷/۸۱	۷/۸۱	۳۱/۲۵
۳۲	۶۲/۵	۱۵/۶	۳/۹	۳۱/۲۵
۳۳	۱۲۵	۶۲/۵	۱۵/۶۲	۶۲/۵
۳۴	۲۵۰	۱۲۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵
۴۳	۳۱/۲۵	۱۵/۶۲	۷/۸	۱۵/۶۲
۴۵	۳۱/۲۵	۷/۸۱	۱/۹۵	۱۵/۶۲
۴۶	۱۵/۶۲	۷/۸۱	۳/۹	۳/۹
۴۷	۶۲/۵	۱۵/۶۲	۷/۸۱	۱۵/۶
۴۸	۳۱/۲۵	۷/۸۱	۷/۸۱	۷/۸۱
۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
ATCC ۲۵۹۲۳	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۷/۸۱	۳۱/۲۵

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، از میان ۵۰ سویه استافیلوکوس اورئوس جداسازی شده، ۳۴ سویه (۶۸٪) مقاوم به متی سیلین (MRSA) و ۱۲ سویه (۲۴٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. مقاومت آنتی بیوتیکی ناشی از پمپ افلاکس یکی از مکانیسم های مهم در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می باشد و اخیرا به عنوان یکی از موضوعات مهم برای محققان تبدیل شده است (۱۹و۱۸).

در این مطالعه MRSA بودن سویه ها توسط روش انتشار دیسک و PCR مورد مطالعه قرار گرفت. مطالعه Moradi و همکاران بر روی ۱۰۴ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که بیشترین میزان حساسیت نسبت به ونکومایسین ۹۶/۲ درصد، کلرامفنیکل ۸۸/۲ درصد، ریفامپین ۸۱/۷ درصد بوده و میزان مقاومت سویه ها به سفوکسیتین ۴۰/۴ درصد (MRSA) می باشند (۲۰). در مطالعه حاضر، به منظور بررسی مقاومت به سیپروفلوکساسین و رابطه اش با پمپ افلاکس، غربالگری سویه ها به منظور وجود ژن *norA* و عملکرد آن به ترتیب توسط روش های PCR و MIC اتیدیوم بروماید در مجاورت ماده مهارکننده پمپ افلاکس CCCP انجام گرفت. ژن *norA* در تمام سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین وجود داشت. ژن *norA* در کروموزوم واقع شده است و در میان سویه ها بسیار محافظت شده است.

نتایج مشابه با نتایج ما در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است. نتایج مطالعه Pourmand و همکارانش 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 Saiful و همکارانش نتایج نشان دادند که از ۱۹ سویه MRSA جداسازی شده، ۱۶ سویه دارای ژن *norA* هستند و تمامی سویه ها دارای پمپ های افلاکس فعال بودند (۲۲). مقایسه نتایج مطالعه ما با سایر مطالعات، نتیجه مشابهی را نشان می دهد که نشان دهنده تایید وجود ژنهای پمپ افلاکس در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین می باشد. همچنین جهت تست فعالیت پمپ افلاکس، ماده CCCP میزان MIC سویه ها را نسبت به اتیدیوم بروماید و سیپروفلوکساسین به میزان ۴-۲ برابر کاهش داد که در بیشتر مطالعات دیگر محققان نیز به آن اشاده شده است. اتیدیوم بروماید یک سوبسترای معمول پمپ افلاکس می باشد که در بیشتر مطالعات به عنوان کنترل مثبت به منظور اندازه گیری فعالیت پمپ افلاکس مورد استفاده قرار می گیرد. Costa و همکارانش نشان دادند که پمپ های افلاکس نقش مهمی را در کاهش مقاومت به آنتی بیوتیک ها و همچنین بیوسایدها دارد (۲۳).

همانطور که در نتایج اشاره شد، در حضور CCCP میزان MIC اتیدیوم بروماید کاهش می یابد که منطبق با سایر نتایج مطالعات دیگر می باشد که نشان دهنده این موضوع است که پمپ افلاکس مسئول ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک است. در مطالعه ما همچنین بیان ژن *norA* در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج مطالعه ما نشان داد که سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای بیان متفاوتی از ژن *norA* هستند و سویه های مقاوم تر دارای بیان نسبی بیشتری از ژن norA هستند که مطالعات دیگرمحققان نیز به این موضوع اشاره شده است. نتایج مطالعه Huet و همکارانش نشان داد که پمپ های افلاکس norA در تمامی سویه‌ها وجود داشته و بیان آن ها در مجاورت بیوسایدها افزایش می یابد (۲۴). نتایج این مطالعه نشان داد که پمپ افلاکس norA رابطا

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.11.9.3]
[DOI: 10.22088/jbums.18.11.63]

مستقیم با مقاومت به سیپروفلوکساسین دارد و بنابراین توسعه مهارکننده های پمپ افلاکس به امکان کنترل خطر سویه های مقاوم به حاوی پمپ های افلاکس خواهد گردید.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاران دانشگاه آزاد واحد تهران شرق، آقای آرین رحیمی و تمامی کسانی که در انجام این مطالعه با ما همکاری کردند، تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.11.9.3]

[DOI: 10.22088/jbums.18.11.63]

A Study of Gene Expression and Activity of NorA Efflux Pump in Clinical Isolates of Ciprofloxacin Resistant Staphylococcus Aureus

A. Mirzaie (PhD)*[1], H. Noorbazargan (MSc)[2], H. Rahmati (MSc)[3], M. Zandi (MSc)[4]

1.Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, I.R.Iran

2.Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

3.Izaddoost Medical Laboratory, Tehran, I.R.Iran

4.Department of Nursing, Islamic Azad University, Tuyserkan Branch, Tuyserkan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(10); Oct 2016; PP: 63-70

Received: Jun 25th **2016, Revised:** Jul 27th **2016, Accepted:** Sep 27th **2016.**

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: The existence of efflux pumps such as *norA* is one the mechanisms of resistance to antibiotics like ciprofloxacin in *staphylococcus aureus* bacteria. *NorA* efflux pump and its gene expression and activity in ciprofloxacin resistant *S. aureus* strains are investigated in this study.

METHODS: In this experimental study, 250 clinical samples of blood, urine, wound and trachea were collected from patients hospitalized in various hospitals of Tehran. *S. aureus* isolates were detected and thereafter, antibiotic resistance profile, gene expression of *norA* efflux pump and its existence were investigated using PCR and Real-Time PCR and the activity of *norA* efflux pump was investigated using minimum inhibitory concentration (MIC).

FINDINGS: Of 250 clinical samples, 50 *S. aureus* isolates were detected and the antibiotic susceptibility test results revealed that 68% of samples (34 samples) were resistant to methicillin and 32% of samples (16 samples) were susceptible to methicillin and 24% of all samples (12 samples) were resistant to ciprofloxacin. Real-Time PCR test results revealed that each type of strain has a different expression of *norA* gene and more resistant strains have increased expression of *norA* gene. Moreover, all ciprofloxacin resistant strains had active efflux pump.

CONCLUSION: The results of the study demonstrated that there is a significant relationship between gene expression of *norA* efflux pump, its activity and resistance to ciprofloxacin in *S. aureus* strains.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus, Resistance to ciprofloxacin, Efflux pump, NorA.*

Please cite this article as follows:

Mirzaie A, Noorbazargan H, Rahmati H, Zandi M. A Study of Gene Expression and Activity of NorA Efflux Pump in Clinical Isolates of Ciprofloxacin Resistant Staphylococcus Aureus. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(11):63-70.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.11.9.3]

[DOI: 10.22088/jbums.18.11.63]

***Corresponding author: A. Mirzaie (PhD)**
Address: East Tehran Branch, Islamic Azad University, Ghiamdasht, Khavaran Highway, Tehran, I.R.Iran
Tel: +98 21 33594950
E-mail: Amir_mirzaie92@yahoo.com

References

1.Phillips CJ, Wells NA, Martinello M, Smith S, Woodman RJ, Gordon DL. Optimizing the detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus with elevated vancomycin minimum inhibitory concentrations within the susceptible range. Infect Drug Resist. 2016;31(9):87-92.

2.Liu Y, Zhang J, Ji Y. PCR-based approaches for the detection of clinical methicillin-resistant staphylococcus aureus. Open Microbiol J. 2016;14(10):45-56.

3.Sganga G, Tascini C, Sozio E, Carlini M, Chirletti P, Cortese F, et al. Focus on the prophylaxis, epidemiology and therapy of methicillin-resistant Staphylococcus aureus surgical site infections and a position paper on associated risk factors: the perspective of an Italian group of surgeons. World J Emerg Surg. 2016;14(11):26.

4.Zarei KR, Mahmoodzadeh H, Mehdizadeh A, Ghorbani T, Imani Fooladi AA. Distribution of tsst-1 and mecA Genes in Staphylococcus aureus isolated from clinical specimens. Jundishapur J Microbiol. 2016;9(3): 29057.

5.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):501-6.

6.Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. Ann Med. 2007;39(3):162-76.

7.X.-Z. Li, H. Nikaido. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. Drugs. 2004;64(2);159-204.

8.Kosmidis C, Schindler BD, Jacinto PL, Patel D, Bains K, Seo SM, et al. Expression of multidrug resistance efflux pump genes in clinical and environmental isolates of staphylococcus aureus. Int J Antimicrob Agents. 2012;40(3):204-09.

9.Paulsen I.T, Lewis K. Microbial Multidrug Efflux. Horizon Sci. 2002;3(2):143-4.

10.Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. Drugs. 2009;69(12):1555-623.

11.Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. Virulence. 2013;4(3):223-9.

12.De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K, et al. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in pseudomonas aeruginosa biofilms. Antimic Age Chemother. 2001;45(6):1761-70.

13.Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, Ubukata K, Konno M. Nucleotide sequence and characterization of the Staphylococcus aureus norA gene, which confers resistance to quinolones. J Bacteriol. 1990;172(12):6942-9.

14.Noguchi N, Okada H, Narui K, Narui K, Sasatsu M. Comparison of the nucleotide sequence and expression of norA genes and microbial susceptibility in 21 strains of staphylococcus aureus. Microb Drug Resist. 2004;10(3):197-203.

15.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;97:34-7.

16.Jo A, Ahn J. Phenotypic and genotypic characterisation of multiple antibiotic-resistant Staphylococcus aureus exposed to subinhibitory levels of oxacillin and levofloxacin. BMC Microbiol. 2016;29;16(1):170.

17.Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. CLSI, Wayne, Pa. 2014;53(3):1-23.

18.Costa SS, Falcão C, Viveiros M, Machado D, Martins M, Melo-Cristino J, Amaral L, Couto I. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of staphylococcus aureus. BMC Microbiol. 2011;27(11):241.

19.Ding Y, Onodera Y, Lee JC, David C. Hooper. NorB, an efflux pump in Staphylococcus aureus strain MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses. J Bacteriol. 2008;190(21):7123-9.

20. Moradi N, Javadpour S, Karmostaji A. Reduced sensitivity of staphylococcus aureus to vancomycin. Hormozgan Uni of Med Sciences. 2011;15(3):169-77.[In Persian].

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.11.9.3]
[DOI: 10.22088/jbums.18.11.63]

21.Pourmand MR, Yousefi M, Salami SA, Amini M. Evaluation of expression of NorA efflux pump in ciprofloxacin resistant Staphylococcus aureus against hexahydroquinoline derivative by real-time PCR. Acta Med Iran. 2014; 52(6):424-9.

22.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):245-51.

23.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;13:2(1):83-99.

24.Huet AA, Raygada JL, Mendiratta K, Seo SM, Kaatz GW. Multidrug efflux pump overexpression in Staphylococcus aureus after single and multiple in vitro exposures to biocides and dyes. Microbiology. 2008; 154(10):3144-53.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.11.9.3]

[DOI: 10.22088/jbums.18.11.63]