

## Evaluation of the Phenotypic and Molecular Pattern of Efflux Pumps in Clinical Isolates of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Jalal Ghaderkhani<sup>1</sup>, Hamed Tahmasebi<sup>2</sup>, Behruz Zeyni<sup>3</sup>, Sanaz Dehbashi<sup>1</sup>, Mohammad Reza Arabestani<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup> PhD Student, Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>2</sup> MSc, Department of Microbiology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

<sup>3</sup> MSc, Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor, Nutrition Health Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

\* **Corresponding Author:** Mohammad Reza Arabestani, Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. Email: mohammad.arabestani@gmail.com

### Abstract

**Received:** 16.05.2017

**Accepted:** 10.09.2017

#### How to Cite this Article:

Ghaderkhani J, Tahmasebi H, Zeyni B, Dehbashi S, Arabestani MR. Evaluation of the Phenotypic and Molecular Pattern of Efflux Pumps in Clinical Isolates of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Sci J Hamadan Univ Med Sci*. 2017; 24(3): 183-191. DOI: 10.18869/acadpub.ajcm.24.3.183.

**Background and Objective:** Efflux pumps are regarded as one of the most important mechanisms of antibiotic resistance in this era. *Staphylococcus aureus* is one of the bacterial groups with efflux pumps. The pumps' activity is coded by specific genes. The aim of this study was to determine the phenotypic and molecular pattern of efflux pumps in the clinical isolates of methicillin-resistant *S. aureus*.

**Materials and Methods:** This study was conducted on 302 *S. aureus* bacteria collected from different clinical specimens. We detected 145 isolates of methicillin-resistant using disk diffusion method with cefoxitin (30 µg) as well as minimum inhibitory concentration with E-test strips and cefoxitin disks. In addition, multiplex polymerase chain reaction method was employed to identify the genes responsible for resistance to efflux pump and gyrase. The data were analyzed using SPSS software version 16.

**Results:** Among the 145 isolates of methicillin-resistant *S. aureus*, norfloxacin and ciprofloxacin had the highest frequency. Furthermore, *norA*, *norB*, *norC*, *griA*, *griB*, *gyrA*, and *gyrB* genes were positive in 39 (25.825%), 12 (9.97%), 41 (49.15%), 75 (49.66%), 37 (26.50%), 58 (38.41%), and 19 clinical isolates (12.58%), respectively.

**Conclusion:** As the findings indicated, the presence of efflux pumps in the strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* provided the ground for the emergence of multi-drug resistant bacteria.

**Keywords:** Efflux Pumps; Fluoroquinolone; Resistant to Methicillin; *Staphylococcus aureus*

## ارزیابی شیوع فنوتیپی و مولکولی پمپ های افلاکس در ایزوله های بالینی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین

جلال قادر خانی<sup>۱</sup>، حامد طهماسبی<sup>۲</sup>، بهروز زینی<sup>۳</sup>، ساناز ده باشی<sup>۱</sup>، محمد رضا عربستانی<sup>۴\*</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکترای تخصصی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران  
<sup>۲</sup> کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران  
<sup>۳</sup> کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران  
<sup>۴</sup> دانشیار، مرکز تحقیقات سلامت تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

\* نویسنده مسئول: محمد رضا عربستانی، گروه میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.  
 ایمیل: mohammad.arabestani@gmail.com

### چکیده

**سابقه و هدف:** پمپ های افلاکسی بعنوان یکی از مهمترین خطوط ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در عصر جدید شناخته شده اند. *استافیلوکوک اورئوس* یکی از گروه های باکتریایی دارای پمپ های افلاکسی میباشد. فعالیت این پمپها توسط ژن های خاصی کد میشود. هدف از این مطالعه تعیین الگوی فنوتیپی و مولکولار عامل پمپ های افلاکسی در ایزوله های بالینی *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی سیلین می باشد.

**مواد و روش ها:** ۳۰۲ باکتری *استافیلوکوک اورئوس* از نمونه های مختلف بالینی جمع اوری شد. ۱۴۵ ایزوله مقاوم به متی سیلین با استفاده از روش های دیسک دیفیوژن سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) و همچنین تعیین حداقل غلظت مهاری با استفاده نوارهای E-test سفوکسیتین، تعیین شدند. جهت شناسایی ژن های عامل مقاومت به ژیراز ها و افلاکس پمپ ها از روش Multiplex PCR استفاده گردید. داده های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ تجزیه و تحلیل شد.

**یافته ها:** از ۱۴۵ ایزوله *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی سیلین بیشترین فراوانی مربوط به آنتی بیوتیک های نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین بود. همچنین، ژن *norA* در ۳۹ ایزوله بالینی (۲۵/۸۲ درصد)، ژن *norB* در ۱۲ ایزوله بالینی (۹/۹۷ درصد)، ژن *norC* در ۴۱ ایزوله بالینی (۴۹/۱۵ درصد)، ژن *griA* در ۷۵ ایزوله بالینی (۴۹/۶۶ درصد)، ژن *griB* در ۳۷ ایزوله بالینی (۲۶/۵۰ درصد)، ژن *gyrA* در ۵۸ ایزوله بالینی (۳۸/۴۱ درصد) و ژن *gyrB* در ۱۹ ایزوله بالینی (۱۲/۵۸ درصد) مثبت بودند.

**نتیجه گیری:** حضور پمپ های افلاکسی در سویه های مقاوم به متی سیلین *استافیلوکوک اورئوس*، زمینه ظهور باکتری های دارای مقاومت چند گانه را فراهم کرده است.

**واژگان کلیدی:** *استافیلوکوک اورئوس*؛ پمپ های ترشحی؛ فلور کوئینولون؛ مقاومت به متی سیلین

### مقدمه

ناپایدار، ژن های وابسته به کد شدن این پمپ ها را فعال کرده، و مقاومت هایی در سطح گسترده را سبب شود [۳]. مقاومت به ژیرازها و کوئینولون ها از مهمترین دلایل حضور پمپ های افلاکسی در *استافیلوکوک اورئوس* می باشد [۴]. از زمان شناسایی عفونت های وابسته به باکتری ها و اتخاذ راه های متفاوت جهت درمان این عفونت ها، باکتریها با کسب ویژگی های خاصی برای حفظ بقاء و قدرت بیماری زایی خود، به سمت تکامل و مقاوم شدن در برابر طیف گسترده ایی از آنتی بیوتیک ها حرکت کرده اند [۱]. این پمپ ها که دارای انواع مختلفی می باشند وابسته به انرژی فعال بوده و از انرژی ATP و یا نیروی

پمپ های افلاکسی به عنوان یکی از مهم ترین خطوط ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در عصر جدید شناخته شده اند. حضور این پمپ ها علاوه بر اینکه باکتری را در مقابل گروه های مختلف آنتی بیوتیکی مقاوم می کنند، می توانند سبب بروز مقاومت به شوینده هایی مانند کلرهگزیدین و ضد عفونی کننده هایی مانند آنتی موآنهای چهار ظرفیتی شوند [۱]. یکی از مهمترین گروه های باکتریایی دارای پمپ های افلاکسی، *استافیلوکوک اورئوس* می باشد [۲]. این باکتری که دومین عامل عفونت های سطح جامعه و سومین عامل خطرناک عفونت زا محسوب می شود، با تغییر کردن شرایط محیطی و شرایط

صورت گرفت، ۳۰۲ نمونه بالینی شامل خون، ادرار، کاتاتر، سواپ بینی، زخم، ترشحات، ترشه، خلط، بزاق و سایر موارد، از بیماران بستری در بخش های مختلف مراکز منتخب درمانی دانشگاه علوم پزشکی شهر همدان در سال ۱۳۹۵ در ماه های تیر تا آذر ماه جمع آوری شد. در این پژوهش که با استفاده از روش نمونه گیری آسان و دردسترس صورت گرفت، بیماران بستری در بیمارستان جهت معیار ورود و خروج در این مطالعه تعیین گردیدند. نمونه های بدست آمده بر روی محیط Blood Agar (Merck آلمان) پایه غنی شده با ۵ درصد خون تازه گوسفندی (sinapooyesh) ایران) بصورت خطی کشت داده شد و بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. تست های تشخیصی با توجه به پروتکل های تشخیصی پی گرفته شد [۱۱، ۱۲].

در ابتدا مقاومت به متی سیلین با استفاده از روش دیسک دیفیوژن سفوکسیتین دیسک (۳۰ میکروگرمی) (Mast آلمان) و نوارهای E-test سفوکسیتین (Liofilchem ایتالیا) تعیین شد. الگوی مقاومت آنتی بیوتیک به انتی بیوتیک های برای تعیین حساسیت ایزوله های بالینی از ۶ آنتی بیوتیک شامل دیسک های آنتی بیوتیکی تتراسایکلین ۳۰ میکروگرمی، جنتامایسین ۱۰ میکروگرمی، نورفلوکساسین ۱۰ میکروگرمی و سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرمی، گاتی فلوکساسین ۵ میکروگرمی و اوفلوکساسین ۵ میکروگرمی با روش Disk Diffusion استفاده گردید (همگی Mast انگلستان) تعیین شد. مراحل کار مطابق با استاندارد CLSI پیس برده شد. برای کنترل کیفی و ارزیابی نتایج، از استافیلوکوک اورئوس ATCC25923 کنترل منفی استافیلوکوک اورئوس ATCC43300 بعنوان منترل مثبت استفاده شد [۱۳].

برای انجام استخراج DNA ژنومیک از کیت استخراج شرکت سینا ژن ایران بر اساس پرتکل شرکت سازنده انجام شد. DNA بدست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد برای انجام آزمونهای مولکولی، ذخیره شد [۱۲].

پرایمرهای تهیه شده (جدول ۱) از شرکت ماکروژن به سفارش پیشگام ایران برای شناسایی ژنهای *gyrB*، *gyrA*، *grlB*، *grlA*، *norA*، *norB*، *norC* و *mecA* مورد استفاده قرار گرفت. حجم واکنش در ۲۵ میکرولیتر که شامل ۲ میکرولیتر از

انتقال پروتون استفاده می کنند. افلاکس پمپ های آنتی بیوتیکی در باکتری ها از نظر فیلوژنی به پنج خانواده بزرگ تعلق دارند که شامل Small multidrug resistant (SMR)، ATP binding، Resistant nodulation divition (RND)، (ABC) cassette، Multidrug and Major facilitator superfamily (MFS) و MATE) toxic efflux (MATE) می باشند [۵، ۶]. سیستم افلاکس ABC وابسته به هیدرولیز ATP (انتقال فعال اولیه) می باشد و در حالیکه سیستمهای SMR، MFS و RND پمپ های افلاکس منتقل کننده پروتون می باشند و پمپ افلاکس MATE، سیستم آنتی پورت دارو با  $Na^+/H^+$  (انتقال فعال ثانویه) می باشد [۷]. در کنار مقاومت های آنتی بیوتیکی حاصل از افلاکس پمپ ها، این پمپ ها مقاومت به شوینده ها و آنتی سبتیک ها را نیز سبب می شوند که بیشتر ژن های آن بر روی پلاسمید حمل می گردند [۸]. استافیلوکوک های مقاوم به پنی سیلین بعد از شناسایی در سال ۱۹۵۰، به مرور به سایر آنتی بیوتیک های بتالاکتام نیز مقاوم شدند، بطوریکه تا ۱۹۷۵ سویه های جدیدی که مقاومت کاملی به متی سیلین داشتند ظهور کردند که استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) نام گرفتند [۹]. افلاکس پمپ ها نقش بسیار مهمی در ظهور سویه های استافیلوکوک اورئوس دارای مقاومت چندگانه دارند، این عوامل با خنثی کردن گروه های متنوعی از آنتی بیوتیک ها، حساسیت باکتری را در برابر این عوامل کاهش می دهند [۲]. با کم کردن و یا مهار فعالیت این پمپ ها، علاوه بر اینکه از بروز مقاومت به طیف گسترده ای از آنتی بیوتیک ها جلوگیری می شود، می توان مانع بروز مقاومت به شوینده ها و آنتی سبتیک ها شد [۱۰]. بنابراین، با شناخت عملکرد ژن های افلاکسی چند دارویی به منظور طراحی راهکارهای نوین درمانی و درک نقش پمپ ها در تداوم و بقاء باکتری از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشند. لذا هدف از این مطالعه تعیین الگوی فوتیپی و مولکولار عامل پمپ های افلاکسی در ایزوله های بالینی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین می باشد.

## مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی- تحلیلی، که طی یک دوره ۹ ماهه

جدول ۱: توالی های نوکلئوتیدی مورد استفاده جهت شناسایی عوامل مقاومت به فلوروکوئینولونی

ژن های مورد مطالعه	پرایمرهای مورد مطالعه	توالی های نوکلئوتیدی	طول آمپلیکون (جفت باز)
<i>grlB</i>	grlB-1 grlB-2	CGATTAAGCACAACAAGCAAG CATCAGTCATAATAATTACTC	۳۷۵
<i>gyrA</i>	gyrA-1 gyrA-2	AATGAACAAGGTATGACACC TACGCGCTTCAGTATAACGC	۲۳۲
<i>gyrB</i>	gyrB-1 gyrB-2	CAGCGTTAGTGTAGCAAGC CCGATTCCTGTACCAAATGC	۲۵۰
<i>grlA</i>	grl-a grl-b	GATGTTATGGTCAATATCATCCA AAGAACTGTCTCTTTATTAATATCACGT	۲۱۹
<i>norA</i>	norA-F norA-R	TTTGTTTTCAGTGTGAGAATTTATGTTTG GGCTTGGTGAATATCAGCTATTAAC	۱۴۰
<i>norB</i>	norB-F norB-R	GTAATGGTACTAATTATGATTCGTGTTGG CTGGCAAGAAAGTTAATGAAATGAGAC	۱۳۰

دو برای مقایسه یافته‌های کیفی و تست مثبت مستقل برای مقایسه یافته‌های کمی مورد استفاده قرار گرفتند. در این مطالعه مقدار معنی دار  $P \leq 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

در مجموع ۱۵۱ ایزوله استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از ۳۰۲ ایزوله بالینی استافیلوکوک اورئوس، ایزوله (۵۰ درصد) دارای قطر هاله ۲۱ یا کمتر و مقاوم به سفوکسیتین بودند که با توجه به CLSI به عنوان سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در نظر گرفته شدند. از این میان، ۱۴۸ ایزوله (۴۹/۲ درصد) دارای قطر هاله ۲۱ و مقاوم به اوگزاسیلین بودند. همچنین برای آنتی‌بیوتیک‌های کیئونولونی، ۵۱ ایزوله (۷۸/۸۳ درصد) دارای قطر هاله کمتر از ۱۸ و مقاوم به نورفلوکساسین، ۶۶ ایزوله (۴۳/۷۳ درصد) دارای قطر هاله کمتر از ۱۸ و مقاوم به گاتی‌فلوکساسین و ۱۲۱ ایزوله (۸۰/۱۳ درصد) دارای قطر هاله ۱۸ و مقاوم به اوفلوکساسین بودند (شکل ۱، ۲).



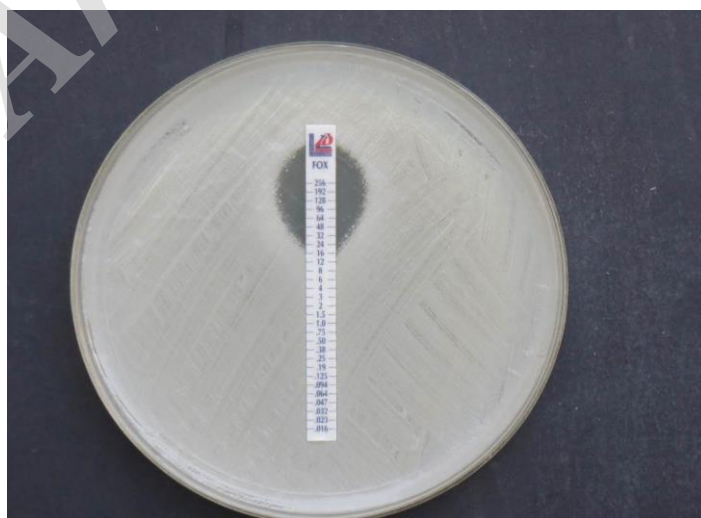
شکل ۱: فراوانی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های بالینی استافیلوکوک اورئوس

DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۲۵ پیکومولار و ۱۲،۵ میکرولیتر از MasterMixe (Ampliqon آلمان) (شامل: Tris-HCl PH8.5, (NH<sub>4</sub>) SO<sub>4</sub>, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0/2 unit Ampliqon, 0/4M dNTP, 0/2% Tween20, polymerase, insert red dye and stabilizer) استفاده شد. حجم باقیمانده با آب مقطر دیونیزه به حجم مورد نظر رسانده شد. در این مطالعه از پرایمرهای زیر جهت بررسی‌های مولکولی استفاده شد. از توالی‌های زیر جهت شناسایی ژن‌های مورد نظر استفاده شد [۱۴].

برای تکثیر ژن‌های مورد مطالعه ترموسایکلر Eppendorf 5331 (آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. سیکل‌های دمایی برای واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه حرارتی شامل واسرشتگی ثانویه در ۹۵ درجه بدمت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۷ درجه سانتیگراد بدمت ۹۰ ثانیه، تکثیر اولیه هم بدمت ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و برای تکثیر نهایی هم در مدت زمان ۱۰ دقیقه از دمای ۷۲ درجه سانتیگراد لحاظ گردید. در این بررسی از سویه استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC43300 بعنوان کنترل مثبت استفاده شد. از سویه استافیلوکوک اورئوس ATCC25923 هم بعنوان کنترل منفی استفاده شد.

در نهایت ۵ میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل‌آگارز ۵،۱ درصد در بافر ۵X الکتروفورز گردید. نتایج اولیه روی ژل با دستگاه ترانس لومیناتور (Syngene انگلیس) مورد بررسی قرار گرفت و عکسبرداری نهایی توسط Gel Documentation تهیه شد. از مارکر ۱۰۰ bp فرمنتاز (Thermofisher آمریکا) برای شناسایی باند مورد نظر استفاده شد.

برای تجزیه و تحلیل نتایج بدست آمده از روش‌های آماری توصیفی (تعیین فراوانی، درصد و میانگین) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. همچنین آزمون آماری کای-مربع



شکل ۲: غربالگری اولیه نمونه‌های بالینی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به روش تعیین حداقل غلظت مهارت توسط نوار E-test Cefoxitin. ناحیه مهارت بیشتر از ۴ μg/ml حساس در نظر گرفته شده است. از سویه استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC43300 بعنوان کنترل مثبت و استافیلوکوک اورئوس ATCC25923 هم بعنوان کنترل منفی استفاده شد.

درصد)، ژن *griA* در ۷۵ ایزوله بالینی (۴۹/۶۶ درصد)، ژن *griB* در ۳۷ ایزوله بالینی (۲۶/۵۰ درصد)، ژن *gyrA* در ۵۸ ایزوله بالینی (۳۸/۴۱ درصد) و ژن *gyrB* در ۱۹ ایزوله بالینی (۱۲/۵۸ درصد) مثبت بودند (شکل ۳-۵).

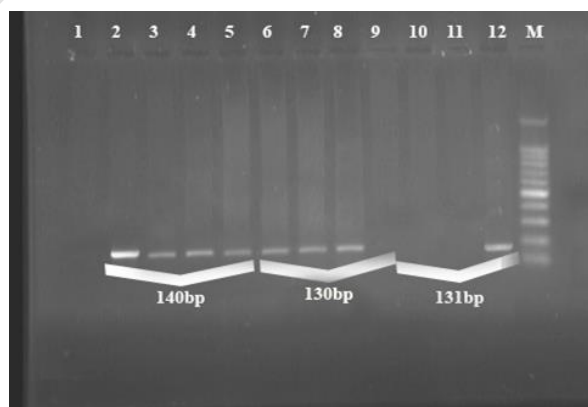
فراوانی ژن های وابسته به عوامل مقاومتی به فلوروکوئینولون ها و پمپ های افلاکسی بصورت زیر بود که ژن *norA* در ۳۹ ایزوله بالینی (۲۵/۸۲ درصد)، ژن *norB* در ۱۲ ایزوله بالینی (۹/۹۷ درصد)، ژن *norC* در ۴۱ ایزوله بالینی (۴۹/۱۵ درصد).



شکل ۳: نتیجه الکتروفورز تکثیر موفقیت آمیز محصولات ژن های *griB* و *griA* با طول آمپلیکون ۲۱۹ جفت باز برای ژن *griA* و ۳۷۵ جفت باز برای ژن *griB* بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد. چاهک ۱ تا ۶ نمونه های مثبت از نظر حضور ژن ها، چاهک ۷ کنترل مثبت، چاهک ۸ کنترل منفی، چاهک M مارکر با طول ۱۰۰ جفت باز



شکل ۴: نتیجه الکتروفورز تکثیر موفقیت آمیز محصولات ژن های *gyrB* و *gyrA* با طول آمپلیکون ۲۲۵ جفت باز برای ژن *gyrA* و ۲۵۰ جفت باز برای ژن *gyrB* بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد. چاهک ۱ تا ۴ و ۹ تا ۱۰ نمونه های مثبت از نظر حضور ژن ها، چاهک ۵ کنترل مثبت، چاهک ۱۰ کنترل منفی، چاهک M مارکر با طول ۱۰۰ جفت باز.



شکل ۵: نتیجه الکتروفورز تکثیر موفقیت آمیز محصولات ژن های *norA* و *norB* و *norC* با طول آمپلیکون ۱۴۰ جفت باز برای ژن *norA* و ۱۳۰ جفت باز برای ژن *norB* و ۱۳۱ جفت باز برای ژن *norC* بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. چاهک ۲ تا ۵ نمونه های مثبت از نظر حضور ژن *norA*، چاهک ۶ تا ۹ نمونه های مثبت از نظر حضور ژن *norB* و چاهک های ۱۰ تا ۱۲ نمونه های مثبت از نظر حضور ژن *norC*، چاهک ۱ کنترل منفی، چاهک M مارکر با طول ۱۰۰ جفت باز.



بیوتیکی و ژن‌های عامل افلاکسی مشاهده شد. برای همه متغیرهای مورد بررسی  $P \leq 0.05$  در نظر گرفته شد (جدول ۲).

با توجه به فراوانی سویه‌های بدست آمده و نتایج حاصل از تحلیل‌های آماری، ارتباط معنی‌داری بین الگوی مقاومت آنتی

**جدول ۲:** آنالیز آماری بررسی احتمال ارتباط بین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و پمپ‌های افلاکس در جدایه‌های بالینی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

قطر آنتی بیوتیکی	جدایه‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (n=14)								غلظت آنتی بیوتیک	آنتی بیوتیک‌ها
	<i>mecA</i> (n=145)	<i>norC</i> (n=41)	<i>norB</i> (n=12)	<i>norA</i> (n=39)	<i>gyrB</i> (n=19)	<i>gyrA</i> (n=58)	<i>grlB</i> (n=37)	<i>gria</i> (n=75)		
R≤1mm	$P \leq 0.11$	$P \leq 0.44$	$P \leq 0.16$	$P \leq 0.09$	$P \leq 0.13$	$P \leq 0.01$	$P \leq 0.49$	$P \leq 0.26$	۵ (میکروگرم)	نورفلوکساسین
R≤1mm	$P \leq 0.10$	$P \leq 0.47$	$P \leq 0.28$	$P \leq 0.49$	$P \leq 0.26$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.19$	$P \leq 0.09$	۵ (میکروگرم)	گاتی فلوکساسین
R≤1.4mm	$P \leq 0.41$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.22$	$P \leq 0.04$	$P \leq 0.08$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.24$	۳۰ (میکروگرم)	تتراسایکلین
R≤1mm	$P \leq 0.28$	$P \leq 0.49$	$P \leq 0.04$	$P \leq 0.11$	$P \leq 0.19$	$P \leq 0.01$	$P \leq 0.01$	$P \leq 0.12$	۵ (میکروگرم)	اوفلوکساسین
R≤1.2mm	$P \leq 0.26$	$P \leq 0.07$	$P \leq 0.08$	$P \leq 0.01$	$P \leq 0.16$	$P \leq 0.16$	$P \leq 0.08$	$P \leq 0.22$	۱۰ (میکروگرم)	جنتامایسین

## بحث

سطح جامعه و دنیا شود [۱۸]. فراوانی ۱۰۰ درصدی گاتی فلوکساسین در مطالعاتی که یوچون و همکاران در سال ۲۰۱۵ در کشور تایوان داشتند نیز موید این مطلب می‌باشد که با تغییرات و شرایط مکانی می‌توان شاید تغییرات متفاوتی در نتایج بدست آمده بود [۱۹].

از مجموع ۱۵۱ سویه مقاوم به متی‌سیلین فراوانی ژن‌های وابسته به عوامل مقاومتی به فلوروکوئینولون‌ها و پمپ‌های افلاکسی بصورت زیر بود که ژن *norA* در ۲۵/۸۲ درصد ایزوله‌ها، ژن *norB* در ۹/۹۷ درصد ایزوله‌ها و ژن *norC* در ۴۹/۱۵ درصد ایزوله‌ها مثبتا بود. در مطالعات سیرا و همکاران هم ژن‌های *nor* در مقاومت‌های فلوروکوئینولونی دارای بیشترین اثر و فراوانی بودند [۲۰]. مطالعات حاضر با نتایج بدست آمده از بررسی‌های کاظمیان و همکاران در سال ۲۰۱۷ در تهران نیز بیان‌کننده الگوی ژنی ژن‌های وابسته به *nor* بود [۲۱]. همچنین ژن *gria* در ۴۹/۶۶ درصد و ژن *grlB* در ۲۶/۵۰ درصد ایزوله‌ها مثبت مشاهده شدند این در حالی بود که نتایج بدست آمده با نتایج یافته‌های سوفیا و همکاران در سال ۲۰۱۳ در کشور پرتغال داشت همخوانی دارد. در این مطالعه مروری که بر روی میزان فراوانی خانواده‌های ژنی عامل مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های کینولونی و ژیرازی صورت گرفته مشخص شد که فراوان‌ترین ژن‌های عامل مقاوم به گروه‌های ذکر شده *norA* و *gyrA* و *gria* می‌باشد. بطوریکه در مطالعه حاضر نیز فراوانی این ژن‌ها بیشتر از سایر ژن‌های بود [۲۲]. ژن *gyrA* در ۳۸/۴۱ درصد و ژن *gyrB* در ۱۲/۵۸ درصد از ایزوله‌ها مثبت بودند که از این نظر نیز با مطالعات کاستا و همکاران در سال ۲۰۱۳ همخوانی دارد [۱۵].

سویه‌های مختلف استافیلوکوک اورئوس که از نمونه‌های بالینی بدست آمده‌اند، در بسیاری از موارد خانواده‌های پمپ‌های افلاکسی را بطور کامل دارا نمی‌باشند و از نظر مقاومت

استفاده از فلوروکوئینولون‌ها به عنوان ریسک فاکتوری برای بروز سویه‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به شمار می‌رود. افزایش مقاومت کینولونی همچنین در باکتری‌های انتریک در بخش مراقبت‌های ویژه در ایالات متحده دیده می‌شود، که اغلب در ارتباط با دیگر مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی رخ می‌دهد [۱۵، ۱۶]. مطالعه بر روی آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکوئینولونی در کنار سایر آنتی‌بیوتیک‌های موثر بر روند همانند سازی، می‌تواند نقش مهمی در شناسایی سویه‌های دارای مقاومت‌های چندگانه داشته باشد.

در بررسی حاضر فراوانی آنتی‌بیوتیک‌های کینولونی، نورفلوکساسین و اوفلوکساسین دارای بیشترین میزان فراوانی بودند. در مطالعاتی که احمدی و همکاران در تهران انجام دادند مشخص شد که فراوانی نورفلوکساسین بیش از ۷۰ درصد گزارش شد. این در حالی است که در مطالعه حاضر نیز فراوانی نورفلوکساسین ۷۸/۸ درصد بدست آمد [۱۷]. در مطالعاتی که ولا و همکاران در سال ۲۰۱۳ در برزیل بر روی سویه‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین داشتند مشخص شد که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های گاتی فلوکساسین بیش از ۸۰ درصد و مقاومت به جنتامایسین بیش از ۶۰ درصد می‌باشد. در صورتی که در مطالعه پیش‌رو فراوانی آنتی‌بیوتیک‌های گاتی فلوکساسین در سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوک اورئوس ۴۳/۷ درصد و فراوانی جنتامایسین ۸۲/۱۱ درصد بود. این عدم همخوانی می‌تواند به دلایل متعددی ارتباط داد. وجود تغییرات جغرافیایی و اثر آنها بر سویه‌های بدست آمده، نوع نمونه‌ای که باکتری از آن ایزوله شده است، و همچنین نوع بیماری شخصی که از آن نمونه گرفته شده است می‌تواند نسبت داد. دو مورد اخیر، یعنی بیماری بیمار بستری شده در بخش و همچنین نوع نمونه بالینی که باکتری از آن ایزوله شده است، از مهمترین دلایلی است که می‌تواند سبب پراکنش مقاومت‌های پراکنده‌ای در

مواجهات متعدد در برابر این مواد، باکتری دارای مقاومتی نسبی در برابر طیف گسترده ای از آنتی بیوتیک ها می شود [۲۳]. همچنین، در مطالعه حاضر ارتباط معنی داری بین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به جنتامایسین و تتراسایکلین نیز مشاهده شد. بطوریکه حضور ژن های *gyr*، *nor* و *grr* با این آنتی بیوتیک ها ارتباط معنی داری را از خود نشان دادند. در مطالعاتی که مارتینانو و همکاران در سال ۲۰۰۰ در کشور کانادا و سان و همکاران در سال ۲۰۱۴ در هنگ کنگ داشتند، مشخص شد که فعالیت پمپ های افلاکسی می تواند زمینه فعال شدن برخی خانواده های افلاکسی را نیز فعال کند که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارند [۲۴، ۲۵].

این نکته را نباید از ذهن دور کرده که گاهی می توان بین میزان بیان برخی ژنها موثر در مقاومت های افلاکسی، حداقل غلظت مهاری و فراوانی حضور ژن ها ارتباط معنی داری را یافت. در مطالعه ای که و همکاران در سال ۲۰۱۵ در پرتغال داشتند مشخص شد که بین حداقل غلظت مهاری آنتی بیوتیک هایی مانند نورفلوکساسین و میزان بیان برخی از ژن ها و فراوانی ژن ها کینولونی و ژیرازی می تواند ارتباط معنی داری وجود داشته باشد [۲۶]. البته نباید این موضوع را نادید گرفت که در برخی موارد بروز جهش های خفیف باکتری را با تظاهرات بالینی خفیفی همراه می کند در صورتی در آزمایشگاه هیچگونه مقاومت آنتی بیوتیکی را از خود نشان نمی دهد. بروز چنین مشکلاتی که عموماً پزشک را نیز با مشکلاتی در درمان مواجه می کند، می تواند به دلیل وجود برخی متغیرهای سیال در خون باشد. بطوریکه که روی برخی سویه های دارای پمپ های افلاکسی فعال اثر کرده و در نهایت سبب مقاومت نسبی در بالین و حساسیت سویه در آزمایشگاه شود [۲۷]. در نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر در سویه هایی که از نمونه های خونی اخذ شده بود میزان بیان ژن های مورد مطالعه که بدون مداخله گرما مورد ارزیابی بیان سنجی قرار گرفته بودند، نسبت به نمونه های زخم و ادرار، افزایش داشت در صورتیکه برخی از این نمونه ها دارای خصوصیات آنتی بیوتیکی حساسی نسبت به آنتی بیوتیک های معمول کیتولونی و ژیرازی موثر پمپ های افلاکسی بودند. با مطرح کردن این موضوع، رسیدن به این دیدگاه که وارد کردن برخی متغیرهای موثر بر پمپ های افلاکسی می تواند روند بررسی های بالینی-آزمایشگاهی را با خطی سریع تر پیش ببرد را به میان می آورد.

### نتیجه گیری

سویه های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی سیلین که به آنتی بیوتیک های مختلف مقاوم شده اند، همواره خطری جدی به حساب می آیند. این سویه ها که گاهی بصورت سویه های

های سطح بالا به چند آنتی بیوتیک فلوروکوئینولونی، فراوانی کمی دارند، از این عفونت های داخلی و منتشر را می توان با استفاده از دو یا چند آنتی بیوتیک بصورت همزمان، کنترل و از بین برد. این در حالی است که، در بسیاری از مطالعات، باکتری های جدا شده از سطوح، از آب های فاضلاب، از برخی ابزار آلات پزشکی که با شوینده ها و بیوساید ها در ارتباط هستند، به طور گسترده تری دیده می شود. نتایج حاصل از این مطالعه نیز نشان داد که سویه های استافیلوکوک اورئوس جدا شده از زخم و کاتاتر و حتی سواپ بینی، دارای مقاومت چند گانه نسبت به آنتی بیوتیک های فلوروکوئینولونی بود. از این رو، در نمونه هایی مانند خون و عفونت های منتشره، کمترین مقاومت به این گروه از آنتی بیوتیک ها دیده شد. در مطالعاتی که کاستا در سال ۲۰۱۳ در کشور پرتغال داشتند، مشخص شد که سویه های استافیلوکوک اورئوس بدست آمده از سطوح و آب های فاضلاب دارای بیشترین مقاومت به نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین و حتی برخی شوینده ها می باشد. این امر به دلیل اثر مستقیم بر شوینده ها بر فعالیت پمپ های افلاکسی می باشد [۶]. نتایج مطالعه حاضر، که نشان دهنده حضور گسترده سویه های دارای مقاومت چند گانه نسبت به آنتی بیوتیک های فلوروکوئینولونی در ایزوله های بدست آمده از کاتاترها و زخم ها بود، با این مطالعه دارای همخوانی می باشد. چون این سطوح و اعضا، بیشترین تماس را با مواد ضد عفونی کننده دارند و در با افزایش زمان مواجه با این مواد، آنها را توسط پمپ های خود به بیرون نشر می کنند و می توانند فعال تر ظاهر شوند.

اطلاعات حاصل از این مطالعه نشان داد که، بین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و پراکنش ژنهای عامل پمپ های افلاکسی، ارتباط مستقیمی وجود دارد. این در حالی بود که، بین میزان فراوانی الگوی فنوتیپی آنتی بیوتیک های گاتی فلوکساسین و نورفلوکساسین با ژن های گروه *nor* ارتباط معنی داری دیده شد. در بسیاری از مطالعات صورت گرفته، بین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و حضور ژن های *gyr* و *grr* ارتباط معنی داری مشاهده شده است. بلانکو و همکاران در یک مطالعه مروری که در سال ۲۰۱۶ در اسپانیا داشتند، نشان دادند که بین پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی در مقیاس های فنوتیپی و حضور برخی ژن های عامل مقاومت به گروه های فلوروکوئینولونی ارتباط مستقیمی وجود دارد. در این مطالعه به اثر برخی متغیرهای جانبی که اثر هم افزایی در مقاومت های افلاکسی دارند نیز اشاره شد. این متغیرهای جانبی که شوینده ها، فلزات سنگین و طیف گسترده ای از آنتی سبتیک ها را شامل می شود، می تواند علاوه بر بالا بردن فعالیت پمپ های افلاکس در استافیلوکوک اورئوس، به دلیل ریختن مواد سمی و کشنده به خارج از محیط زیستی باکتری، ساختار پروتئینی این پروتئین ها را به نحوی تغییر می دهد که بعد از

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح دانشجویی در سال ۱۳۹۵ با شماره IR.UMSHA.REC.1395.327 و کد اخلاقی ۹۵۰۷۱۳۴۲۰۲ که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان به انجام رسیده است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از این معاونت محترم ابراز می‌دارد. ضمناً نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض نیست.

## REFERENCES

- Tintino SR, Oliveira-Tintino CDM, Campina FF, Silva RLP, Costa MDS, Menezes IR, et al. Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog*. 2016;**97**:9-13. PMID: 27057677 DOI: 10.1016/j.micpath.2016.04.003
- Couderc C, Thiébaud AC, Lawrence C, Bouchiat C, Herrmann JL, Salomon J, et al. Fluoroquinolone impact on nasal methicillin-resistant and methicillin-sensitive staphylococcus aureus colonization durations in neurologic long-term-care facilities. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;**59**(12):7621-8. PMID: 26416866 DOI: 10.1128/AAC.01338-15
- Zarei Koosha R, Mahmoodzadeh Hosseini H, Mehdizadeh Aghdam E, Ghorbani Tajandareh S, Imani Fooladi AA. Distribution of *tsst-1* and *mecA* genes in staphylococcus aureus isolated from clinical specimens. *Jundishapur J Microbiol*. 2016;**9**(3):290-57. PMID: 27226873 DOI: 10.5812/jjm.29057
- Greninger AL, Chatterjee SS, Chan LC, Hamilton SM, Chambers HF, et al. Whole-genome sequencing of methicillin-resistant staphylococcus aureus resistant to fifth-generation cephalosporins reveals potential non-meca mechanisms of resistance. *PLoS One*. 2016;**11**(2):e0149541. PMID: 26890675 DOI: 10.1371/journal.pone.0149541
- Kaatz GW, DeMarco CE, Seo SM, MepR, a repressor of the *Staphylococcus aureus* MATE family multidrug efflux pump MepA, is a substrate-responsive regulatory protein. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;**50**(4):1276-81. PMID: 16569840 DOI: 10.1128/AAC.50.4.1276-1281.2006
- Costa SS, Junqueira E, Palma C, Viveiros M, Melo-Cristino J, Amaral L, et al. Resistance to antimicrobials mediated by efflux pumps in staphylococcus aureus. *Antibiotics*. 2013;**2**(11):83-99. PMID: 27029294 DOI: 10.3390/antibiotics2010083
- Khan A, Sultan A, Tyagi A, Zahoor S, Akram M, Kaur S, et al. Amplification of *mecA* gene in multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* strains from hospital personnel. *J Infect Dev Ctries*. 2007;**1**(3):289-95. PMID: 19734607
- Truong-Bolduc QC, Bolduc GR, Medeiros H, Vyas JM, Wang Y, Hooper DC. Role of the Tet38 efflux pump in staphylococcus aureus internalization and survival in epithelial cells. *Infect Immun*. 2015;**83**(11):4362-72. PMID: 26324534 DOI: 10.1128/IAI.00723-15
- Becker K, Denis O, Roisin S, Mellmann A, Idelevich EA, Knaack D, et al. Detection of *mecA*- and *mecC*-positive methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) isolates by the new *xpert mrsa gen 3* PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2016;**54**(1):180-4. PMID: 26491186 DOI: 10.1128/JCM.02081-15
- Wang S, Wang Y, Shen J, Wu Y, Wu C. Polymorphic mutation frequencies in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*: the role of weak mutators in the development of fluoroquinolone resistance. *FEMS Microbiol Lett*. 2013;**341**(1):13-7. PMID: 23330696 DOI: 10.1111/1574-6968.12085
- Tahmasebi H, Bokaeian M, Adabi J. Coagulase-negative, beta-lactam, antibiotic resistance, methicillin resistance. *Pars J Med Sci*. 2016;**14**(1):55-63. [Persian]
- Bokaeian M, Adabi J, Zeyni B, Tahmasebi H. The presence of *aac* (6') *Ie* / *aph* (2''), *aph* (3') - IIIa1, *ant* (4') - Ia1 genes and determining methicillin resistance in staphylococcus epidermidis and staphylococcus saprophyticus strains isolated from clinical specimens. *Arak Med Univ J*. 2017;**19**(11):11-25. [Persian]
- CLSI. M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI M100-S20. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- Truong-Bolduc QC, Hooper DC. The transcriptional regulators *NorG* and *MgrA* modulate resistance to both quinolones and  $\beta$ -Lactams in staphylococcus aureus. *J Bacteriol*. 2007;**189**(8):2996-3005. PMID: 17277059 DOI: 10.1128/JB.01819-06
- Costa SS, Viveiros M, Amaral L, Couto I. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. *Open Microbiol J*. 2013;**6**(7):59-71. PMID: 23569469 DOI: 10.2174/1874285801307010059
- Arabestani MR, Alikhani MY, Karami M, Salimi Ghale E. Prevalence of coagulase-negative staphylococci and determination of antimicrobial resistance in accompany with types of SCCmec in isolated of nosocomial infections. *Tehran Univ Med J*. 2016;**73**(12):888-94. [Persian]
- Ahmadi Z, Tajbakhsh E, Momtaz H. Detection of the antibiotic resistance pattern in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples obtained from patients hospitalised in Imam Reza hospital, Kermanshah. *J Microb World*. 2014;**6**(4):299-311. [Persian]
- Vola ME, Moriyama AS, Lisboa R, Vola MM, Hirai FE, Bispo PJ, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in ocular infections. *Arq Bras Oftalmol*. 2013;**76**(6):350-3. PMID: 24510081
- Kang CY, Chaudhry OO, Halabi WJ, Nguyen V, Carmichael JC, Mills S, et al. Risk factors for postoperative urinary tract infection and urinary retention in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Am Surg*. 2012;**78**(10):1100-4. PMID: 23025950
- Sierra JM1, Marco F, Ruiz J, Jiménez de Anta MT, Vila J. Correlation between the activity of different fluoroquinolones and the presence of mechanisms of quinolone resistance in epidemiologically related and unrelated strains of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*. 2002;**8**(12):781-90. PMID: 12519351
- Kazemi SS, Nematy MF, Mirzaie A, Ashrafi F. Antibiotic resistance assessment, and genotypic and phenotypic detection of *norA* efflux pump in methicillin and ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J Microb World*. 2017;**9**(4):286-96. [Persian]
- Santos Costa S, Viveiros M, Rosato AE, Melo-Cristino J, Couto I. Impact of efflux in the development of multidrug resistance phenotypes in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol*. 2015;**15**(1):232-45. PMID: 26498754 DOI: 10.1186/s12866-015-0572-8
- Blanco P, Hernando-Amado S, Reales-Calderon JA, Corona F, Lira F, Alcalde-Rico M, et al. Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms*. 2016;**4**(1):14. PMID: 27681908 DOI: 10.3390/microorganisms4010014
- Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;**453**(2):254-67. PMID: 24878531 DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.05.090
- Martineau F, Picard FJ, Lansac N, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, et al. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;**44**(2):231-38. PMID: 10639342
- Costa SS, Falcão C, Viveiros M, Machado D, Martins M,

دارای مقاومت چندگانه تظاهر پیدا می‌کنند، می‌توانند با استفاده از فاکتورهای القایی مختلف، شرایط بدمحیطی را براحتی تحمل کنند و در حالت تحمل قرار گیرند. حضور پمپ‌های افلاکسی می‌تواند یکی از مساعدترین شرایط را برای استافیلوکوک‌های اورئوس جهت میل پیدا کردن به سمت مقاومت‌های چندگانه داشته باشد، از این رو مصرف داروهای فلوروکوئینولونی را باید با الگوی مناسب تری مصرف کرد.



- Melo-Cristino J, et al. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 2011;**11**(9):110-29. PMID: 22032541 DOI: 10.1186/1471-2180-11-241
27. Ranjbarian P, Sadeghian S, Shirazi MH, Sarafnezhad A, Fazeli MR, Amin GH, et al. Survey of anti-bacterial effect of plant extracts (fennel-dill-caraway-cinnamon) by flow cytometry and disk diffusion. *Sci J Hamadan Univ Med Sci Health Ser.* 2004;**11**(3):42-7. [Persian]

Archive of SID