

Assessing the antibiotic resistance patterns dependent on efflux pump genes of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Blood culture in Shahid Beheshti hospital centers during 1396-1397

Arezoo BostanmaneshRad^{1*}, Jamileh Nowroozi¹, Gita Eslami²

1.Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

2.Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran

(Received: 2020/05/31

Accepted: 2020/09/8)

Abstract

Background: *Staphylococcus aureus* is a major cause of nosocomial infections in the world. Efflux pumps are well known as a key role to fluoroquinolone resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The present study was performed to determine resistance to antimicrobial agents related to efflux pumps isolates recovered from blood cultures of patients referred to several hospitals affiliated with Shahid Beheshti University of Medical Sciences between 1396-1397.

Materials and Methods: In the present descriptive cross-sectional study, a total of 100 clinical samples were collected from blood cultures over a 12-month period. *S. aureus* isolates were identified using standard microbiological tests. Antimicrobial susceptibility patterns were determined using disk diffusion method and micro-dilution method. Subsequently, the presence of *norA* efflux pump gene was detected using PCR method. Finally, active efflux pumps were evaluated using ciprofloxacin and ethidium bromide MICs. Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequencing were used to investigate the *norA* efflux pump gene. Chi-square test was used for statistical analyses.

Results: Among 100 clinical samples, 38 out of 45 MRSA isolates (84.4%) showed resistance to ciprofloxacin. Moreover, the *norA* gene was found in 100% of ciprofloxacin resistant isolates. Among 38 ciprofloxacin-resistant isolates, 8 isolates showed active efflux activity by reducing EtBr and ciprofloxacin MIC values by 2 to 4 folds in the presence of CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone).

Conclusion: It seems that a rising trend of antimicrobial resistance among *S. aureus* isolates to different antibiotics has become a widespread concern in infection control.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Blood samples; *norA*; Efflux pump

* Corresponding author: Arezoo BostanmaneshRad

Email: a_bmr@yahoo.com

بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی وابسته به پمپ ترشحی در سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از کشت خون بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی طی سال ۹۶-۹۷

آرزو بستان منش راد^{۱*}، جمیله نوروزی^۱، گیتا اسلامی^۲

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۱۸

دریافت: ۱۳۹۹/۳/۱۱

چکیده:

سابقه و هدف: شیوع استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از شایع ترین پاتوژن های بیمارستانی سالانه در حال افزایش بوده و در حال تبدیل شدن به یک نگرانی عمده سلامت عمومی در جهان است. پمپ های ترشحی نقش مهمی در مقاومت به فلوروکینولون ها در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین دارند. هدف از این مطالعه تعیین مقاومت دارویی از طریق پمپ ترشحی در استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از کشت خون بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی طی سال های ۹۶-۹۷ بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، تعداد ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس از کشت خون بیماران در طول یک سال جمع آوری شد. مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن و میکروبراث دایلوژن بررسی شد. فعال بودن پمپ ترشحی توسط تعیین MIC سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. فراوانی ژن *nra* با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR و تعیین توالی محصولات PCR مشخص گردید. داده های مربوطه با استفاده از آزمون کای اسکور تحلیل شدند.

یافته ها: از مجموع ۱۰۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده ۴۵ جدا به مقاوم به متی سیلین بودند که از این میان ۳۸ سویه ۸۲/۲٪ به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. میزان شیوع ژن *nra* ۱۰۰٪ بود. از میان ۳۸ ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین، در ۸ ایزوله با استفاده از CCCP کاهش MIC سیپروفلوکساسین مشاهده شد. که در ۶ ایزوله کاهش ۴ برابری و در ۲ ایزوله کاهش ۸ برابری مشاهده گردید.

نتیجه گیری: به نظر می رسد افزایش قابل توجه مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف باید هشدار جدی در کنترل عفونت محسوب شود.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، کشت خون، پمپ ترشحی، ژن *nra*

مقدمه

مقاوم به بتا-لاکتاماز می شوند اشاره نمود. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بویژه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) چالش مهمی در کنترل عفونت در بیمارستان ها محسوب می شود که علت آن احتمالاً نبود درمان سریع و مناسب برای MRSA می باشد (۱).

عوامل میکروبی متعددی مانند باکتری ها می توانند باعث پیدایش عفونت های بیمارستانی شوند که از جمله آنها می توان به استافیلوکوکوس اورئوس بخصوص سویه های مقاوم به متی سیلین که باعث مقاومت این باکتری به آنتی بیوتیک های

نویسنده مسئول: آرزو بستان منش راد
پست الکترونیک: a_bmr@yahoo.com

میلی گرم)، آمپی سیلین (۱۰ میلی گرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میلی گرم)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول (۲۵ میلی گرم) و لینزولاید (۳۰ میلی گرم) (Mast UK) در Muller Hinton Agar (مرک آلمان) تعیین گردید. نتایج آنتی بیوگرام با استفاده از جدول استاندارد CLSI (Clinical and laboratory standards institute) تفسیر شد. لازم به ذکر است برای تعیین میزان حساسیت سویه ها به وانکومايسين از روش حداقل غلظت مهاري (MIC) با استفاده از نوار E-test (Liofilchem)، ایتالیا) استفاده گردید. جهت تعیین MIC ابتدا سوسپانسیون از کشت تازه باکتری مورد نظر با کدورت نیم مک فارلند تهیه و به کمک سوآب استریل بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار کشت انجام شد. پس از قرار دادن نوار E-test وانکومايسين بر روی محیط کشت به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس با بررسی پلیت ها عددی که در محل تلاقی هاله عدم رشد با نوار E-test قرار داشت به عنوان مقدار کمی MIC در نظر گرفته شد. بر اساس استاندارد CLSI برای ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس، میزان MIC ≤ 2 ، $\leq 4-8$ و ≤ 16 میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب بیانگر سویه های حساس، حد واسط و مقاوم به وانکومايسين می باشند. در تمامی مراحل انجام آزمایش از سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC49775 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۹، ۱۰).

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی و حداقل غلظت مهاري (MIC) سیپروفلوکساسین و کربونیل سیانید ۳- کلروفنیل هیدرازون (CCCP)

در این مطالعه میزان MIC سیپروفلوکساسین و USA (Sigma، CCCP) برای ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس بر طبق استانداردهای CLSI تعیین شد. بر طبق استانداردهای CLSI، ابتدا در تمامی چاهک های پلیت های ۹۶ خانه ای، $100 \mu\text{l}$ محیط مولر هیتون برات ریخته شد و سپس در ردیف اول چاهک ها، $100 \mu\text{l}$ از آنتی بیوتیک یا CCCP را ریخته و در هر ردیف ستونی، شروع به رقت سازی شد. لازم به ذکر است از ردیف آخر هر ستون به میزان $100 \mu\text{l}$ دور ریخته شد. سپس $100 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون باکتری با رقت نهایی $5 \times 10^5 \text{ CFU/ml}$ نیز به چاهک ها تلقیح گردید. از مولر هیتون برات و سوسپانسیون باکتری به تهرایی به ترتیب به عنوان کنترل منفی و کنترل مثبت استفاده شد. پلیت ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. آخرین رقت از آنتی بیوتیک که در آن هیچ گونه رشدی مشاهده نگردید، به عنوان حداقل غلظت مهاري رشد (MIC) در نظر گرفته شد. قابل به ذکر است که از سویه *S. aureus* ATCC 29213 به عنوان سویه کنترل استفاده گردید (۱۱).

بررسی فنوتیپی وجود پمپ ترشحی با استفاده از کربونیل سیانید ۳- کلروفنیل هیدرازون (CCCP) و اتیدیوم بروماید

بعد از تعیین سویه های MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین، این سویه ها جهت تعیین حداقل غلظت مهاري مورد مطالعه قرار گرفتند. آزمایش MIC بر اساس استاندارد CLSI به روش رقیق سازی در میکروپلیت برای CCCP و اتیدیوم بروماید انجام شد. این مرحله مانند روش تعیین غلظت MIC انجام گرفت. این تست به صورت سه بار تکرار با استفاده از روش میکروداپلوشن در پلیت ۹۶ خانه ای انجام گرفت. برای تهیه محلول ذخیره از سیپروفلوکساسین با غلظت ۵۱۲۰، ابتدا $16 \mu\text{l}$ میکرو گرم از پودر این آنتی بیوتیک را در ۳ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و در حین کار این غلظت به وسیله آب مقطر به میزان $1:10$ رقیق شد. روش آماده سازی CCCP به این شکل بود که ابتدا DMSO با نسبت $1:10$ رقیق شد. سپس $200 \mu\text{l}$ لاندا از آن با $200 \mu\text{l}$ لاندا DMSO مطلق مخلوط شد و به آن $2/5$ میلی گرم از پودر CCCP اضافه شد و برای حل شدن مطلوب، ورتکس گردید. برای کنترل منفی از ترکیب محیط کشت و آنتی بیوتیک استفاده شد. برای کنترل و تشخیص عدم کسندگی CCCP از ترکیب محیط کشت به علاوه CCCP و به اضافه باکتری بدون افزودن آنتی بیوتیک استفاده شد، برای کنترل مثبت نیز از ترکیب محیط کشت همراه با باکتری بهره گرفته شد. برای اتیدیوم بروماید هم مانند روش فوق الذکر مراحل انجام شد (۱۲).

استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین ایزوله باکتری در میان تمام عفونت ها می باشد. استافیلوکوکوس اورئوس گستره وسیعی از بیماری های عفونی را در بر می گیرد، از عفونت های پوستی تا عفونت های شدید مثل تشکیل آبسه، جراحی چرکی، اندوکاردیت، پنومونی، مننژیت، سپتی سمی نوزادی و باکتری می (۲، ۳). استافیلوکوکوس ارگانسیسمی با قابلیت قابل توجه برای تطابق با محیط و کسب عوامل مقاومت آنتی بیوتیکی می باشد. در طی سال های اخیر بروز باکتری های مقاوم افزایش یافته و همچنان به عنوان یک مشکل بیمارستانی باقی مانده است (۲، ۴). مقاومت آنتی بیوتیکی موضوع مهمی در درمان عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس می باشد. مقاومت می تواند به وسیله غیرفعال شدن دارو، تغییر هدف آنتی بیوتیکی یا بیرون رانده شدن دارو توسط افلاکس پمپ ها صورت گیرد. استافیلوکوکوس اورئوس پمپ های ترشحی مختلفی را می سازد (۵).

تا کنون بیشتر از ده نوع پمپ ترشحی مختلف برای استافیلوکوکوس اورئوس تعریف شده است که بیشتر آنها متعلق به سوپر خانواده MFS است که شامل پمپ های انتقال انواع مختلفی از داروها مثل اتیدیوم بروماید، فلوروکوئینولون ها، بنزالکونیوم کلراید، ستریمید، آکریفلاوین و تترافیل فسفونیوم بروماید می باشد (۵). از جمله داروهای ضد میکروبی رایج که برای درمان سیستمیک فیروزیس استفاده میشود شامل سیپروفلوکساسین و لوفلوکساسین هستند. این عوامل به خاطر پذیرش خوب بیمار، طیف فعالیتی علیه پاتوژن های مورد نظر و فارماکینتیک مطلوبشان مورد استفاده قرار می گیرند. این دارو دارای اثرات متوسط بر علیه باکتری های گرم مثبت می باشد. سیپروفلوکساسین از مشتقات فلورو کوئینولون ها، یک ترکیب باکتریسید است که از طریق مهار آنزیم DNA ژیراز، دوباره سازی ترجمه و ترمیم DNA باکتری را مهار می کند (۷). استافیلوکوکوس اورئوس به دلیل انتقال ژن های مقاومت به شکل افقی سرعت در برابر آنتی بیوتیک ها مقاوم می شود. سویه های MRSA، پاتوژن مهم انسانی می باشد که سبب افزایش تعداد آلودگی های بیمارستانی و غیر بیمارستانی می شود. بسیاری از سویه های آن ها دارای مقاومت چند دارویی می باشند. وجود باکتری ها با این ویژگی نیازمند داروهای جدید می باشند (۸).

این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، بررسی مولکولی حضور پمپ ترشحی در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس و ارزیابی نقش این پمپ ها در مقاومت به سیپروفلوکساسین انجام گرفت. بررسی حضور ژن *nraA* می تواند در پیشنهاد الگوی درمانی حائز اهمیت باشد.

مواد و روش ها نمونه گیری

در این مطالعه مقطعی - توصیفی که طی سال های ۹۶ تا ۹۷ انجام شد با توجه به مطالعات قبلی و شیوع مقاومت تعداد ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از کشت خون بیماران بستری در بیمارستان های لقمان، شهید مدرس، امام حسین (ع)، طالقانی جمع آوری و نمونه ها با تیوب های استریل حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار به آزمایشگاه منتقل گردید (۹).

جدا سازی و تشخیص ایزوله ها

به منظور شناسایی اولیه سویه های جمع آوری شده از رنگ آمیزی گرم و تست های کاتالاز، کواگولاز، DNase و تخمیر مانیтол استفاده شد. جهت شناسایی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) از دیسک سفوکسیتین (۳۰ میلی گرم) استفاده شد. از میان ۱۰۰ نمونه جدا شده، تعداد ۴۵ (۴۵٪) با استفاده از دیسک سفوکسیتین مقاوم به متی سیلین (MRSA) بودند.

بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های جداسازی شده

تست تعیین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک ها به روش Kirby-Bauer Method (Kirby-Bauer Method) انتشار از دیسک انجام شد. حساسیت ایزوله ها نسبت به آنتی بیوتیک های اریترومايسين (۱۵ میلی گرم)، کلیندامایسین (۲ میلی گرم)، سیپروفلوکساسین (۵

استخراج DNA

در این مطالعه از کیت (Roche, Germany, and Lot. No) ۱۰۳۶۲۴۰۰ بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده جهت استخراج DNA استفاده شد. ابتدا غلظت DNA به وسیله الکتروفورز بررسی شد. این روش، روشی است که میزان DNA را بصورت کیفی و یا نیمه کمی مورد ارزیابی قرار می دهد. برای تأیید صحت استخراج ژنوم میزان ۵ میکرولیتر از DNA بر روی ژل آگارز ۱ درصد، الکتروفورز و مشاهده شد.

انجام PCR

به منظور تکثیر ژن *norA* از پرایمرهای *norA-F* GACATTTACCAAGCCATCAA و *norA-R* TGCCATA- با طول محصول ۱۰۲ جفت باز و ژن *gmk* *gmk-F* TCAGGACCATCTGGAGTAGGTAAG و *gmk-F* TTCACGCATTTGACGTGTTG با طول ۱۰۸ جفت باز استفاده شد (۱۳). مواد Master Mix در فریزر -۲۰ درجه نگهداری شدند، (زیرا آنزیم Taq پلیمرز نسبت به دماهای بالا بسیار حساس بوده و سریعاً غیر فعال می شود). برای انجام مراحل کار در هر میکروتیوب ۱۲٫۵ μl از Master Mix ، ۱ از هر کدام از پرایمرهای Forward، و Reverse،

۵٫۸ μl آب مقطر دیونیزه و ۲ μl از DNA ی نمونه مورد نظر وارد کرده و با استفاده از سمپلر آنرا خوب سمپلینگ نمودیم. همچنین در هر سری از تست PCR باید DNA ی مربوط به کنترل مثبت و کنترل منفی (جهت اطمینان از نبود آلودگی در تست) به همراه نمونه های مجهول PCR شود. سپس میکس های PCR که حاوی DNA های مجهول و DNA های کنترل بود، در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند. لازم به ذکر است که از *S.aureus* ATCC49775 به عنوان کنترل مثبت و برای کنترل منفی از تمام مواد مورد نیاز در یک واکنش PCR بجز DNA الگو (به جای آن از آب مقطر استریل دوبار تقطیر) استفاده شد.

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۷ درجه سلیسیوس برای ژن *norA* به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۰ درجه سلیسیوس برای ژن *gmk* به مدت ۴۵ ثانیه گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز گردید. محصولات PCR نمونه ها برای تعیین توالی به Bionner کشور کره جنوبی فرستاده شد و نتایج با نرم افزار ۱٫۴۵ Chromas مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از Blast در NCBI تأیید شدند.

آنالیز آماری

در مورد تجزیه و تحلیل داده ها، از نسخه ۱۲ نرم افزار SPSS و آزمون کای اسکور استفاده شد و مقادیر $P > 0.05$ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد. اطلاعات به دست آمده از آزمایش های تعیین حساسیت ضد میکروبی بر اساس آخرین نسخه منتشر شده ISLC (۲۰۱۸) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۱۰).

یافته ها

در این مطالعه ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه خون بیماران مختلف مراجعه کننده به بیمارستان های دولتی تحت پوشش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی جمع آوری گردید. که از این تعداد نمونه ۴۷ نفر (۴۷٪) مرد و ۵۳ نفر (۵۳٪) زن بودند. فراوانی بیماران با سن کمتر از ۴۰ سال، ۴۰ تا ۷۰ سال و بالاتر از ۷۰ سال به ترتیب ۱۶ بیمار (۱۶٪)، ۵۵ بیمار (۵۵٪) و ۹ بیمار (۹٪) بود. میانگین سن بیماران ۴۶٫۶ و انحراف معیار ۱۸٫۸ بود. بیشترین نمونه مربوط به بخش ICU و تعداد ۳۹ نمونه بود. همچنین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به سویه های استافیلوکوکوس اورئوس نشان می دهد بیشترین حساسیت مربوط به لینزولاید با حساسیت (۱۰۰٪) و بالاترین مقاومت متعلق به آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۹۶٪) بوده است.

نتایج تست حساسیت میکروبی

در نمونه های MRSA و MSSA بیشترین میزان مقاومت به آمپی سیلین دیده شد. در جدول شماره ۱-۳ میزان مقاومت نشان داده شده است که در نمونه های MRSA میزان مقاومت به آنتی بیوتیک ها بیشتر می باشد.

جدول ۱: استرسور های مورد استفاده در طی یک هفته اعمال استرس

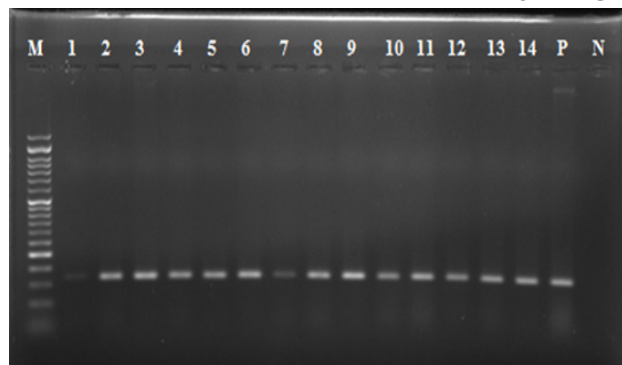
آنتی بیوتیک	نمونه MRSA تعداد: ۴۵		نمونه MSSA تعداد: ۵۵	
	مقاوم	نیمه حساس	مقاوم	نیمه حساس
کلیندامایسین	۳۶ (۸۰)	۰	۷ (۱۲/۷)	۱ (۱/۸)
لینزولاید	۰	۴۵ (۱۰۰)	۰	۵۵ (۱۰۰)
کلرامفنیکل	۴ (۸/۸)	۰	۲ (۳/۶)	۰
سفازولین	۳۷ (۸۲/۲)	۰	۲ (۳/۶)	۰
اریترومایسین	۴۱ (۹۱/۱)	۳ (۶/۶)	۷ (۱۲/۷)	۶ (۱۰/۸)
آمپی سیلین	۴۵ (۱۰۰)	۰	۵۱ (۹۲/۷)	۰
سیپروفلوکسازین	۳۸ (۸۴/۴)	۰	۳ (۵/۵۴)	۲ (۳/۶)
تری متوپریم- سولفامتو کسازول	۹ (۲۰)	۰	۳۶ (۸۰)	۵ (۹)

جدول ۲: بررسی نتایج E-Test در ونکومایسین

غلظت های مورد استفاده شده بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر (تعداد)	آنتی بیوتیک ونکومایسین									
	۱	۱/۵	۲	۳	۰/۷۵	۰/۵	۰/۳۸	۰/۲۵	۰/۱۹	۰
۳	۱	۱/۵	۲	۳	۰/۷۵	۰/۵	۰/۳۸	۰/۲۵	۰/۱۹	۰
۲	۱۸	۲۹	۸	۲۳	۱۳	۳	۲	۲	۲	۰

تأیید مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس

با استفاده از روش PCR، از میان ۱۰۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس که به روش فنوتیپی تأیید شده بودند، ۱۰۰٪ ایزوله ها دارای ژن *gmk* و ژن *norA* بودند. نتایج تکثیر ژن *gmk*



شکل ۱: محصول PCR حاصل از تکثیر ژن M: *gmk* ۱۰۰ bp، P: کنترل مثبت؛ N: کنترل منفی

۱۴-۱: نمونه های مجهول

بحث

در مطالعه حاضر در نمونه های MRSA و MSSA بیشترین میزان مقاومت نسبت به آمپی سیلین دیده شد، بیشترین حساسیت آنتی بیوتیکی به ترتیب نسبت به لینزولید، ونکومایسین، تری متوپریم-سولفامتوکسازول و کلرامفنیکل بدست آمد. علاوه بر این مقاومت سویه های MRSA به سیپروفلوکساسین (۳۸ ایزوله) ۸۴٫۴٪ گزارش شد. مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های MRSA نسبت به MSSA به طور قابل توجهی بیشتر بود.

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل اصلی عفونت های باکتریایی در کشورهای توسعه یافته است که مسئول طیف گسترده ای از بیماری ها، از عفونت های جزئی پوست تا پنومونی نکروز دهنده کشنده می باشد. استافیلوکوکوس ها از مهم ترین عوامل ایجادکننده عفونت های مزمن مرتبط با ابزار پزشکی قرار داده شده در بدن مانند کاتترهای دستگاه ادراری، دریچه های قلبی مصنوعی، مفاصل پروستاتیک و غیره می باشند. از جمله این عفونت ها می توان اندوکاردیت، استئومیلیت، عفونت های سیستم ادراری و عفونت های زخم را نام برد (۱۴).

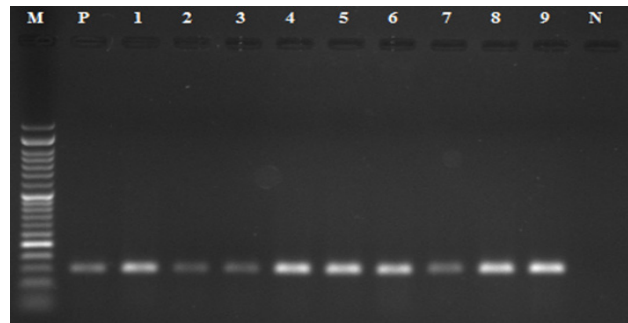
در مطالعه ای که توسط رنجبر و همکاران به انجام رسید، مقاومت به سیپروفلوکساسین، اریترومایسین، کلرامفنیکل، نیتروفوران توئین، کلیندامایسین، جنتامیسین، تری متوپریم سولفامتوکسازول در استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت ادراری به ترتیب ۶۷، ۶۳، ۶۵، ۱۲، ۲۴، ۵۷، ۶۱ درصد گزارش شد (۱۵). که نتایج مطالعه حاضر مقاومت بالاتری نسبت به سیپروفلوکساسین (۸۴/۴٪) و مقاومت پایین تری نسبت به تری متوپریم-سولفامتوکسازول (۲۰٪) نشان داد. در مطالعه عزیز و همکاران مشخص شد که همه سویه های MRSA و MSSA نسبت به ونکومایسین، لینزولید و کوئینوپریستین-دالفوپریستین حساس بودند (۱۶). علاوه بر این نتایج، مطالعه دیگری نیز نشان داد که تمام ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه حساس به لینزولید و کوئینوپریستین-دالفوپریستین هستند (۱۷). که نتیجه دو مطالعه اخیر نسبت به حساسیت به لینزولید همانند مطالعه حاضر بوده است.

در مطالعه Costa و همکارانش در سال ۲۰۱۹، *norA* را به عنوان بهترین پمپ ترشحی مطالعه شده در استافیلوکوکوس اورئوس بیان نموده است همچنین به عنوان برترین مدل بررسی مقاومت های وابسته به پمپ ترشحی در این باکتری و اولین پاسخ به مواد ضد میکروبی در استافیلوکوکوس اورئوس ذکر نموده است (۱۸).

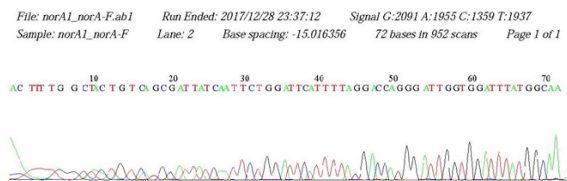
در مطالعه زحمتکش و همکارانش در سال ۲۰۱۵، تمام سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای ژن *norA* و ۸۳ درصد از ایزوله ها دارای ژن *norB* بودند و از نظر فنوتیپی تمامی سویه ها دارای پمپ ترشحی فعال بودند که نشان دهنده تأیید وجود ژن های پمپ ترشحی در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین می باشد (۱۲).

نتایج مطالعه حاضر بود. در مطالعه دیگری Saiful و همکارانش در سال ۲۰۰۸ پمپ های ترشحی *norA* را در سویه های MRSA مورد مطالعه قرار دادند که از ۱۹ سویه MRSA جدا سازی شده، ۱۶ سویه دارای ژن *norA* بودند و تمامی سویه ها دارای پمپ ترشحی فعال بودند (۱۹). در بین ایزوله های کلینیکی، Kosmid و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که افزایش بیان ژن پمپ ترشحی MDR در نمونه های بالینی موقتا

نتایج تکثیر ژن *norA*



شکل ۲: محصول PCR حاصل از تکثیر ژن *norA*، M: مارکر ۱۰۰ bp
P: کنترل مثبت، N: کنترل منفی
۱-۹: نمونه های مجهول



شکل ۳: توالی و کروماتوگرام ژن های مورد بررسی

بررسی MIC و مطالعه فنوتیپی پمپ ترشحی

نتایج حاصل از MIC و فعالیت CCCP در جدول ۳ آمده است. همانطور که مشخص است پمپ ترشحی فعال زمانی تشخیص داده می شود که MIC اتیديوم بروماید به همراه آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین از MIC اتیديوم بروماید به تنهایی کمتر باشد. از میان ۳۸ ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین، در ۸ ایزوله با استفاده از CCCP کاهش MIC سیپروفلوکساسین مشاهده شد. که در ۶ ایزوله کاهش ۴ برابری و در ۲ ایزوله کاهش ۸ برابری مشاهده گردید.

جدول ۳: تاثیر CCCP روی MIC سیپروفلوکساسین در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین

شماره ایزوله	MIC سیپروفلوکساسین	MIC سیپروفلوکساسین به همراه CCCP	MIC اتیديوم بروماید	MIC سیپروفلوکساسین به همراه اتیديوم بروماید
۱	۶۴	۱۶	۳۲	۸
۳۹	۱۲۸	۳۲	۳۲	۸
۱۰۰	۱۶	۴	۸	۴
۸۷	۳۲	۴	۱۶	۴
۳۸	۶۴	۸	۶۴	۸
۶۲	۸	۲	۴	۱
۱۵	۶۴	۱۶	۳۲	۸
۳۱	۱۲۸	۳۲	۶۴	۳۲

مقاوم به سیپروفلوکسازین زمانی که سیپروفلوکسازین همراه با CCCP مورد آزمایش قرار گرفت ۱۳ سویه پمپ ترشچی فعال را نشان دادند (۲۲). در مطالعه اردبیلی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در تهران، MIC سیپروفلوکسازین بین ۴-۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر بود که در حضور CCCP در ۸۶٪ از نمونه‌ها به ۶۴-۲ مرتبه کاهش یافت (۲۳). تمامی مطالعات فوق نشانگر کاهش MIC ایزوله‌های باکتریایی در حضور CCCP می‌باشد که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مطالعه توکلی و همکاران از مجموع نمونه‌های مورد بررسی ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده ۱۲ جدایه (۲۴٪) مقاوم به سیپروفلوکسازین بودند. میزان شیوع ژن‌های *norA* و *norB* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکسازین به ترتیب ۱۰۰٪ و ۸۳٪ بود و همچنین تمام سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکسازین دارای پمپ ترشچی فعال بودند (۲۴). نتایج مطالعه آنها با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. از نقاط قوت این مطالعه ارزیابی حضور ژن *norA* پمپ ترشچی در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان عامل مهم در بروز مقاومت دارویی می‌باشد. با بررسی فعالیت مهارکننده‌های پمپ‌های ترشچی بر رشد باکتری می‌توان الگوی درمانی مناسب ارائه کرد.

نتیجه‌گیری:

به نظر می‌رسد که میزان مقاومت ژن *norA* نشان دهنده میزان مقاومت این باکتری به سیپروفلوکسازین می‌باشد بنابراین شاید بتوان در بالین از ترکیب آنتی‌بیوتیک با CCCP برای افزایش میزان اثر آنتی‌بیوتیک و کاهش میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی استفاده کرد. بررسی دیگر مکانیسم‌های مقاومت دارویی از جمله سایر پمپ‌های ترشچی و عوامل مهارکننده این پمپ‌ها را نباید نادیده گرفت.

منابع:

- Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(12):5442-8.
- Sabouni F, Mahmoudi S, Bahador A, Pourakbari B, Sadeghi RH, Ashtiani MTH, et al. Virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolates in an Iranian referral children's hospital. *Osong public health and research perspectives*. 2014;5(2):96-100.
- You Y-O, Choi N-Y, Kang S-Y, Kim K-J. Antibacterial activity of *Rhus javanica* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2013;2013.
- Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(4):1147-52.
- Deng X, Sun F, Ji Q, Liang H, Missiakas D, Lan L, et al. Expression of multidrug resistance efflux pump gene *norA* is iron responsive in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. 2012;194(7):1753-62.
- Kalia NP, Mahajan P, Mehra R, Nargotra A, Sharma JP, Koul S, et al. Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(10):2401-8.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology*: Elsevier Health Sciences; 2015.
- Mun S-H, Joung D-K, Kim Y-S, Kang O-H, Kim S-B, Seo Y-S, et al. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*. 2013;20(8-9):714-8.

(به شکل گذرا) و از نظر جغرافیایی تغییر می‌کند (۲۰). این نتایج مؤید آن است که افزایش بیان ژن‌های پمپ‌های ترشچی، فاکتوری کمک‌کننده به مقاومت سیپروفلوکسازین در نمونه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس است و احتمالاً سبب شیوع بیشتر مقاومت به سیپروفلوکسازین در سویه‌های MRSA می‌باشد. در مطالعه حاضر نمونه‌ها از یک منطقه جغرافیایی جدا شده و نتیجه حاضر با نتایج Kosmid و همکاران مغایرت داشت. از میان ۳۸ ایزوله مقاوم به سیپروفلوکسازین، در ۸ ایزوله با استفاده از CCCP کاهش MIC سیپروفلوکسازین مشاهده شد. که در ۶ ایزوله، کاهش ۴ برابری و در ۲ ایزوله، کاهش ۸ برابری مشاهده گردید. این نشان دهنده فعال بودن پمپ ترشچی در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکسازین می‌باشد. در بررسی که میرزایی و همکاران در سال ۱۳۹۵ در شهر تهران انجام دادند نشان دادند که در مجاورت مهارکننده پمپ ترشچی CCCP، میزان MIC سیپروفلوکسازین و اتیدیوم بروماید کاهش یافته است که نشان دهنده فعال بودن پمپ ترشچی در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکسازین می‌باشد. در مطالعه ایشان، از میان ۲۵۰ نمونه بالینی ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده ۳۴ سویه (۶۸٪) مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و ۱۲ سویه (۲۴٪) مقاوم به سیپروفلوکسازین بودند. فراوانی ژن‌های *norA* و *norB* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکسازین به ترتیب ۱۰۰٪ و ۸۳٪ بودند. همچنین، پمپ ترشچی تمامی سویه‌های مقاوم از نظر فنوتیپی، فعال بودند (۲۱). نتایج مطالعه آنها مشابه با نتایج حاضر بود. در مطالعه انجام شده توسط جابری و همکاران در میان ۱۰۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه، ۳۱ نمونه نسبت به سیپروفلوکسازین مقاوم بودند MIC سیپروفلوکسازین در سویه‌ها از ۱۶-۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر بود. که از میان سویه‌های

9):714-8.

9. Eslami G, Taghizadeh Maleki D, Ghalavand Z, Nikmanesh B, Hashemi A, Kadkhoda H. Identification of Virulence Genes in *Staphylococcus aureus* Isolates Segregated from Children's Wounds. *Pejouhesh dar Pezeshki (Research in Medicine)*. 2019;43(1):52-7.

10. Institute CaLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 28th 2018;28th(Approved Standard).

11. Abd El-Baky RM, Sandle T, John J, Abu-Rahma GE-DA, Hetta HF. A novel mechanism of action of ketoconazole: inhibition of the NorA efflux pump system and biofilm formation in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection and Drug Resistance*. 2019;12:1703.

12. Zahmatkesh H, Alsadat M, Laripoor M, Mirzaie A, Ashrafi F. Prevalence of *norA* and *norB* efflux pump genes in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and their contribution in ciprofloxacin resistance. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2016;10(5):20-30.

13. Kwak YG, Truong-Bolduc QC, Bin Kim H, Song K-H, Kim ES, Hooper DC. Association of *norB* overexpression and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013;68(12):2766-72.

14. Brooks GF, Jawetz M, Melnick, & Adelberg's medical microbiology/Geo. F. Brooks...[et al.]: New York; Chicago: McGraw Hill Medical; 2010.

15. Ranjbar R, HAGHI AM, JONEYDI JN, Abedini M. The prevalence and antimicrobial susceptibility of bacterial uropathogens isolated from pediatric patients. 2009.

16. El-Azizi M, Rao S, Kanchanapoom T, Khardori N. In vitro activity of vancomycin, quinupristin/dalfopristin, and linezolid against intact and disrupted biofilms of staphylococci. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2005;4(1):2.

17. Baysallar M, Kilic A, Aydogan H, Cilli F, Doganci L. Linezolid and quinupristin/dalfopristin resistance in vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prior to clinical use in Turkey. *International journal of antimicrobial agents*. 2004;23(5):510-2.
18. Costa SS, Sobkowiak B, Parreira R, Edgeworth JD, Viveiros M, Clark TG, et al. Genetic diversity of *norA*, coding for a main efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in genetics*. 2019;9:710.
19. 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). *Journal of basic microbiology*. 2008;48(4):245-51.
20. 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*. *International journal of antimicrobial agents*. 2012;40(3):204-9.
21. Mirzaei A NH, Rahmati H, Zandi M. . A study of gene expression and activity of *norA* efflux pump in clinical isolates of ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus*. *Babol university of Medical Sciences*. 2016(18(11):63-70).
22. Jaberi S, Fallah F, Hashemi A, Karimi AM, Azimi L. Inhibitory Effects of Curcumin on the Expression of NorA Efflux Pump and Reduce Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2018;12(1):95-103.
23. Ardebili A, Talebi M, Azimi L, Lari AR. Effect of efflux pump inhibitor carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone on the minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Jundishapur journal of microbiology*. 2014;7(1).
24. Tavakoli Z SH, Pishkar L, Alimadadi Z, Nourbazargan H, Mirazei A. Detection of efflux pump activity and gene expression among ciprofloxacin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Microbial World*. 2019;12(Number 3):294-304.