Daneshvar Medicine
Basic and Clinical Research Journal Vol. 28, No. 2, 2020

Research Paper

Evaluation of prevalence of MepA, MdeA, NorA and NorC genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from Tehran hospitals

Maryam Shakiba[1], Fatemeh Ashrafi[*2]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch Islamic Azad University,Tehran, Iran
2. Department of Biology, Tehran North Branc, Islamic Azad University,Tehran, Iran

*** Corresponding author e-mail: f-ashrafi@iau-tnb.ac.ir**

Citation: Shakiba M, Ashrafi F. Evaluation of prevalence of MepA, MdeA, NorA and NorC genes in Staphylococcus aureus strains isolated from Tehran hospitals. Daneshvar Medicine 2020; 28(2):1-13.

Abstract

Background and Objective: Today some *Staphylococcus* strains are known as methicillin-resistant *Staphylococcus* aureus or MRSA causes infections which are resistant to conventional therapies and antibiotics. One of the most important reasons for this resistance is the presence of efflux pumps in these strains. The purpose of this project was to investigate the prevalence of NorA, NorC, MdeA and MepA germs in clinical strains of *Staphylococcus aureus*.

Materials and Methods: 250 clinical samples were isolated from Tehran hospitals and identified by *Staphylococcus aureus* strains using microbiological methods. Results of microbial isolation showed that 50 samples (20%) out of them belong to *Staphylococcus aureus* isolates. Continuously, the resistance of *Staphylococcus aureus* strains to different antibiotics was investigated by using diffusion disk method. DNA extraction of strains was performed and in order to investigate presence of NorA, NorC, MdeA and MpeA genes by using PCR method.

Results: 68% of strains were methicillin resistant (MRSA) and 56% of MRSA strains were also resistant to ciprofloxacin. Also, the results of PCR assay demonstrated that the prevalence level of NorA, NorC, MdeA and MpeA genes in the staphylococcus resistance to ciprofloxacin were 60%, 16%, 6% and 10%, respectively.

Conclusion: According to the prevalence of the efflux pump genes in resistant strains to ciprofloxacin and methicillin, better approaches should be utilized to prevent and treat the infections associated with methicillin-resistant strains.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, NorA, NorC, MdeA, MepA

Received: 15 Mar 2020
Last revised: 16 June 2020
Accepted: 24 June 2020

مقاله پژوهشی

بررسی شیوع ژنهای MepA، MDeA، NorA و NorC در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از بیمارستانهای شهر تهران

نویسندگان: مریم شکیبا[1]، فاطمه اشرفی*[2]

۱. گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه بیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: فاطمه اشرفی **E-mail: f-ashrafi@iau-tnb.ac.ir**

چکیده

مقدمه و هدف: امروزه برخی از سویه های استافیلوکوک که به سویه های استافیلوکوکی مقاوم به متیسیلین و یا به اختصار MRSA معروف هستند، عفونت‌هایی را ایجاد می‌کنند که به روش‌های درمانی و آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم مقاوم هستند. یکی از مهمترین دلایل این مقاومت وجود پمپهای افلاکس مقاومت دارویی در این سویه‌ها است. هدف از انجام این پروژه بررسی میزان شیوع ژنهای پمپ افلاکس NorA، NorC، MdeA و MepA در سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس بود.

مواد و روش ها: ۲۵۰ نمونه بالینی از بیمارستانهای شهر تهران جداسازی گردید و با استفاده از روش‌های میکروب‌شناسی سویه‌های استافیلوکوک اورئوس شناسایی شدند. نتایج جداسازی میکروبی نشان داد که ۵۰ نمونه (۲۰٪) از نمونه‌های جداسازی شده متعلق به ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس است. سپس با استفاده از روش های دیسک دفیوژن میزان مقاومت سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بررسی شد. استخراج DNA از سویه‌ها صورت گرفت و واکنش PCR جهت بررسی وجود ژنهای NorA، NorC، MdeA و MepA انجام گردید.

نتایج: ٦٨ درصد سویه ها مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و ٥٦ درصد از سویه‌های MRSA به سیپروفلوکساسین هم مقاوم هستند. همچنین نتایج PCR نشان داد که میزان شیوع ژنهای NorA، NorC، MdeA و MepA در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ٦٠ درصد، ١٦ درصد، ٦ درصد و ١٠ درصد است.

نتیجه‌گیری: با توجه به شیوع ژنهای پمپ افلاکس در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین و متیسیلین، می‌باید از راهکارهایی بهتر در مورد پیشگیری و درمان عفونت‌های مرتبط با سویه‌های مقاوم به متیسیلین استفاده کرد.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، NorA، NorC، MdeA، MepA

دریافت: ۹۸/۱۲/۲۵
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۹/۰۳/۲۷
پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۰۴

مقدمه

از جمله پاتوژنهای خطرناک می‌توان به استافیلوکوکوس اورئوس اشاره کرد که مطالعات مختلف، مقاومت دارویی آن را به آنتی‌بیوتیک‌های رایج نشان داده‌اند. از خصوصیات مورفولوژی و بیوشیمیایی این باکتری می‌توان به گرم مثبت، کروی شکل، بی هوازی، بدون اسپور و غیر حرکتی بودن اشاره کرد. البته کپسول پلی ساکاریدی در برخی از سویه های این باکتری وجود دارد که باعث عفونت های بسیاری مانند اندوکاردیت، استئومیلیت، سپتی سمی و ... می شود (۱،۲). آنزیم هایی که از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تولید می شود، می‌توانند به لخته کردن خونریزی بوسیله آنزیم کواگولاز و جلوگیری از فاگوسیتوز توسط گلبول های سفید خون منجر شوند (۲).

آنزیم هیالورونیداز، امکان گسترش باکتری در بدن را با تجزیه بافت همبند ایجاد می‌کند. همچنین، این باکتری آنزیم **DNase** را تولید می‌کند و توکسین این باکتری نیز باعث ایجاد علائم گوارشی نظیر اسهال، استفراغ و همچنین سرگیجه می‌شود. پروتئین **A** در این باکتری می‌تواند به بخش **FC** از آنتی بادی (**IgG3،IgG1**) متصل شود و جهش در این پروتئین با کاهش بیماری‌زایی آن همراه است (۳). ماتریکس خارج سلولی پروتئین های پلاسما از جمله فیبرینوژن، فیبرونکتین و ویترونکتین با اتصال باکتری به سطح سلول میزبان نقش مهمی در افزایش عفونت دارد. از سوی دیگر، مقاومت آنتی بیوتیکی که به دنبال مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها شایع است، تحت کنترل کروموزوم و پلاسمید قرار دارد (٤،٥). قبل از سال ۱۹٤۰، پنی‌سیلین به عنوان اولین دارو برای درمان استافیلوکوکوس اورئوس عفونی در نظر گرفته می‌شد. با این وجود به علت استفاده بیش از حد از پنی‌سیلین، سویه مقاوم به پنی‌سیلین در طی دو سال افزایش یافت (۵).

در همین رابطه، پمپ‌های افلاکس وابسته به هیدرولیز **ATP** می‌باشند که شامل پمپ‌های افلاکس تک مقاومتی و با مقاومت چندگانه هستند که می‌توانند باعث ایجاد مقاومت نسبت به طیف گسترده‌ای از ترکیبات دارویی از جمله عوامل شیمی درمانی شوند (٦). در دهه های اخیر، پمپ‌های افلاکس با مقاومت چندگانه گزارش شده است. برخلاف سایر ژنهای مقاومتی که توسط پلاسمید کد می‌شوند و مقاومت به یک آنتی‌بیوتیک ویژه را ایجاد می‌کنند، ژنهای پمپ‌های افلاکس در تمام موجودات زنده وجود دارند (٦،۷). یکی از ژن **NorA** از جمله ژنهای مهم در پمپ افلاکس است که توسط کروموزوم کد می‌شود. این پمپ می‌تواند ترکیبات مختلفی مانند آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید و ترکیبات چهارظرفیتی آمونیوم را به سمت بیرون پمپ کند و افزایش بیان این ژن موجب مقاومت به سیپروفلوکساسین می‌شود (۸-۱۱).

NorC نیز مقاومت پایینی نسبت به ترکیبات آبدوست و آبگریز فلوروکینولونها و همینطور رنگ‌ها داشته و این مقاومت پایین ناشی از بیان بالای ژن **norC** است و این در حالی است که در ژن وحشی این پمپ هیچ مقاومتی نسبت به ترکیبات مذکور وجود ندارد (۱۱،۱۲).

ژن **MdeA** یکی از ژنهای کروموزومی پمپ افلاکس است که پروتئین ناشی از آن ٤۷۹ اسیدآمینه داشته و از پمپ پروتونی برای انتقال مواد استفاده می‌کند. افزایش بیان این ژن باعث مقاومت به رنگ اتیدیوم بروماید، آنتی‌بیوتیک‌های ویرجینیامایسین، نوبیوسین، موپیروسین، فوسیدیک اسید و برخی بیوسایدها مانند بنزالکونیوم کلراید می‌شود (۱۳). **MepA** از اعضای خانواده **MATE** (خانواده انتقال دهنده پروتئین ها) است که شامل ٤۵۱ اسید آمینه است. در سویه های **MDR** استافیلوکوکوس اورئوس وجود دارد و موجب مقاومت به ترکیبات چهار ظرفیتی آمونیوم می‌شود (١٤).

عفونت‌های استافیلوکوکی یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در میان جوامع به شمار می‌روند و علیرغم اینکه اکثر این عفونت‌ها به راحتی درمان می‌شوند، اما امروزه برخی از سویه های استافیلوکوک که به سویه های استافیلوکوکی

مقاوم به متی سیلین و یا به اختصار **MRSA** معروف هستند، عفونت‌هایی را ایجاد می‌کنند که به روش‌های درمانی و آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم مقاوم هستند (۱۵،۱۶). همانطور که گفته شد، یکی از مهمترین دلایل این مقاومت وجود پمپهای افلاکس مقاومت دارویی در این سویه ها است که از اثر دارویی آن و در نتیجه بهبود بیماری جلوگیری می‌کند؛ بنابراین در این مطالعه به بررسی میزان شیوع ژنهای پمپ افلاکس **NorA**، **NorC**، **MdeA** و **MepA** در سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس پرداخته شده است.

مواد و روش ها

جمع‌آوری نمونه ها

در مجموع تعداد ۲۵۰ نمونه بالینی از قبیل خون، چرک زخم و ادرار از بیمارستانهای صارم، آتیه، پارس و امام حسین جمع‌آوری شد و برای تأیید ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آزمایشگاه منتقل و صحت وجود ایزوله‌های مذکور توسط تستهایی از قبیل کاتالاز، محیط مانیتول سالت آگار، تست کواگولاز و تست **DNase** بررسی گردید.

کشت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی

میزان ۱۰ میکرولیتر از سویه مورد نظر برداشته و در لوله فالکون استریل محتوی یک میلی لیتر محیط کشت نوترین براث کشت داده شده است. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت در گرمخانه روی شیکر گرما گذاری شد تا باکتری‌ها بصورت یکسان در تمامی سطوح محیط کشت تکثیر یابند. در صورت رشد در مدت زمان مذکور، باکتری در محیط کشت ایجاد کدورت می‌کند. برای تمامی سویه ها مراحل فوق تکرار شد. پس از رشد باکتری محیط کشت را از گرمخانه خارج کرده و برای استخراج **DNA** و بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی آماده گردید.

بررسی میزان مقاومت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس روش کربی بائر

مقداری از سویه مورد نظر را با استفاده از سواپ برداشته و در ۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی حل می‌کنیم. غلظت باکتری با استفاده از غلظت نیم مک فارلند سنجیده می‌شود تا در نهایت از هرکدام از سویه ها، غلظت یکسانی در لوله ها موجود باشد. سپس باکتری با استفاده از سواپ به محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل شد. پس از کشت باکتری، دیسک های آنتی بیوتیکی که محتوی آنتی بیوتیک های ونکومایسین، اریترومایسین، آمیکاسین، آمپی‌سیلین، جنتامایسین، کلیندامایسین، پنی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، سیپروفلوکساسین، متی سیلیم، سفوکسیتین، تریمتوپریم، کلسیتین و کلرامفنیکل هستند با استفاده از یک پنس استریل روی محیط کشت بصورت حلقوی قرار می‌گیرند. پس از پایان مرحله دیسک گذاری محیط‌های کشت به گرمخانه منتقل شده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت گرماگذاری می‌شوند. پس از طی این مدت زمان، محیط‌های کشت از دستگاه خارج و برای هر کدام از دیسکها قطر هاله‌ی عدم رشد – در صورت وجود – اندازه گیری گردید. عدم وجود هاله در اطراف دیسک آنتی بیوتیک ناشی از مقاومت باکتری به آن آنتی بیوتیک خاص است.

استخراج DNA

جهت استخراج **DNA** از کیت استخراج سیناژن استفاده شد به این صورت که به میکروتیوب حاوی نمونه، به میزان ٤۰۰ میکرولیتر بافر لیز اضافه و ورتکس گردید، سپس ۳۰۰ میکرولیتر از محلول پرسیپیتاسیون به آن افزوده شد و ورتکس گردید. محتویات میکروتیوب توسط سمپلر به ستون چرخش محتوی لوله ی جمع آوری اضافه شد و در دور **rpm 13000** به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع رویی دور ریخته شد. ٤۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی شماره ۱ به ستون اضافه و سانتریفیوژ گردید (**rpm 13000**، یک دقیقه). مایع رویی دور ریخته شد و ٤۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی شماره ۲ ریخته و مجدد سانتریفیوژ گردید (**rpm 13000**، یک دقیقه). نهایتاً ستون به یک میکروتیوب ۲ میلی لیتری منتقل شده و **30 L** μ از

بافر شست و شو اضافه شد، درِ ستون بسته شده و برای ۳ تا ۵ دقیقه در دمای ٦٥ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. سپس برای تخلیص **DNA**، میکروتیوب به مدت ۱ دقیقه در دور **rpm13000** سانتریفیوژ گردید؛ و برای اطمینان از کیفیت **DNA** استخراج شده، از الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید.

بررسی وجود ژن های **mdeA،mepA،norC،norA** برای اطمینان از وجود ژنهای مذکور در سلول باکتری، از روش **PCR** استفاده شد و پرایمر هرکدام از ژنهای مذکور طراحی گردید. با استفاده از پرایمرهای طراحی شده و مسترمیکس مربوطه واکنش **PCR** انجام شد و ژنهای نامبرده با متد **PCR** تکثیر شدند.

در انجام تمامی مراحل این تست ها استانداردهای (**clinical and laboratory standard instiute**) **CLSI** به طور کامل اجرا گردید.

نتایج

جداسازی نمونه های بالینی

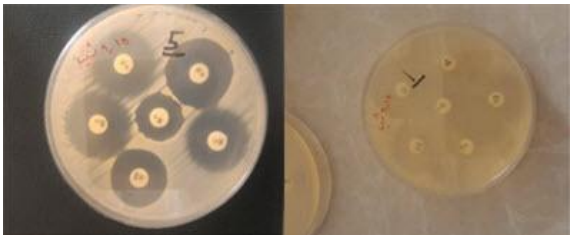
نمونه های بالینی از خون، زخم، پوست و ادرار جداسازی شدند که بر حسب نوع نمونه و جنس در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. جداسازی نمونه های بالینی نمونه های بالینی از خون، زخم، پوست و ادرار

جنس / نوع نمونه	زن		مرد		جمع هر دو جنس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
خون	۱۵	۶	۲۰	۸	۳۵	۱۴
زخم	۳۲	۱۲/۸	۱۰	۴	۴۲	۱۶/۸
پوست	۲۸	۱۱/۲	۱۵	۶	۴۳	۱۷/۲
ادرار	۶۰	۵۰	۷۰	۲۸	۱۳۰	۵۲

مقاومت آنتی بیوتیکی

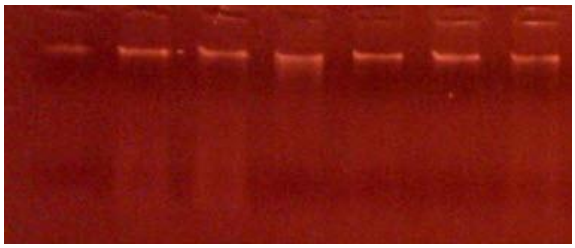
در این مطالعه ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۹۸ درصد)، آمپی‌سیلین (۹۰ درصد)، آموکسی‌سیلین و تریمتوپریم (٨٦ درصد)، سفوکسیتین (٦٨ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین (۱۰۰ درصد حساس) و سیپروفلوکساسین (٥٦ درصد حساس) بودند. در مجموع میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های جداسازی شده از نمونه‌های ادرار و زخم بیشتر از سایر سویه‌ها بود. همچنین مقاومت به ونکومایسین در هیچ یک از سویه‌ها مشاهده نشده بود (شکل ۱).



شکل ۱. مقاومت آنتی بیوتیکی. ارزیابی حساسیت و مقاومت سویه‌ها با روش انتشار از دیسک و اندازه گیری هاله عدم رشد

تخلیص DNA

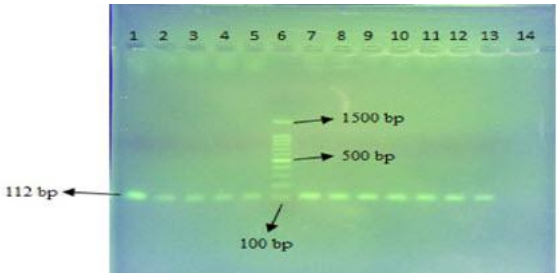
پس از استخراج **DNA** ژنومی از باکتری، برای حصول اطمینان از حضور و کیفیت **DNA** استخراج شده از ژل الکتروفورز استفاده شد؛ و کیفیت آن با استفاده از اسپکتوفوتومتری ماوراء بنفش درجه خلوص (**OD260/OD280= 1/8-2**). همچنین غلظت **DNA** موجود در نمونه ها تعیین گردید (شکل ۲).



شکل ۲. نتایج استخراج DNA **از نمونه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس بر روی ژل آگارز**

نتایج تکثیر ژن norA

برای تکثیر ژن مزبور از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده این ژن با توالی های **forward** و **reverse** که به صورت زیر می‌باشد: **F 5′- ATCGGTTTAGTAATACCAGTCTTGC -3′، R 5′- GCGATATAATCATTTGAGATAACGC -3′** استفاده کردیم. باند **bp**۱۱۲ در ژل الکتروفورز مشاهده شد. شکل شماره ۳ نتایج تکثیر ژن **norA** را نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که باندهای تشکیل شده شماره ۱ تا ۵ و ۷ تا ۱۳: نمونه های مقاوم به سیپروفلوکساسین، باند شماره ۱٤: کنترل منفی و باند شماره ٦، مارکر ۱۰۰ **bp DNA** می‌باشند. نتایج همچنین نشان داد که ژن **norA** در ۳۰ نمونه از ایزوله ها یعنی ٦۰٪ وجود داشت و ارتباط معناداری نیز بین سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین و این ژن وجود داشت (**P<0.05**). تمام نمونه های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای ژن **norA** بودند (شکل ۳).



شکل ۳. نتایج تکثیر ژن norA. **نتایج تکثیر ژن** norA **در سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس روی ژل نشان داده شده است. شماره ۱ تا ۵ و ۷ تا ۱۳: نمونه های مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۱۴: کنترل منفی، ۶: مارکر** DNA 100 bp

نتایج تکثیر ژن norC، mpeA **و** mdeA

برای تکثیر ژن های مزبور از پرایمرهای اختصاصی آنها استفاده گردید. وجود باندهای **bp**۲۰۰ برای ژن **norC** که توالی **forward** و **reverse** به صورت زیر می‌باشد: **F 5′ - AAA TGGTTCTAAGCGACCAA - 3′، R 5′ - ATAAATACCTGAAGCAACGCCAAC - 3′**

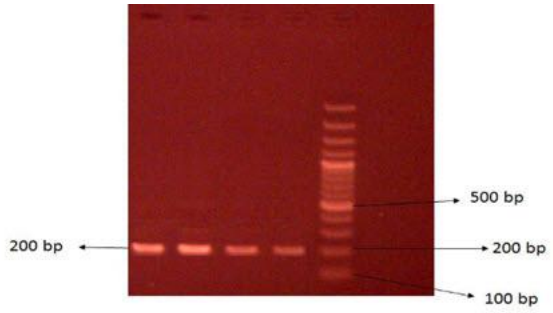
1419bp برای ژن **mepA** که توالی پرایمر آن به صورت زیر می‌باشد:

F 5′ - GCTAATTATTGGAAAAGACAAGG - 3′، R 5′ - ATATACTCAGCCAGAAGTGTAC - 3′

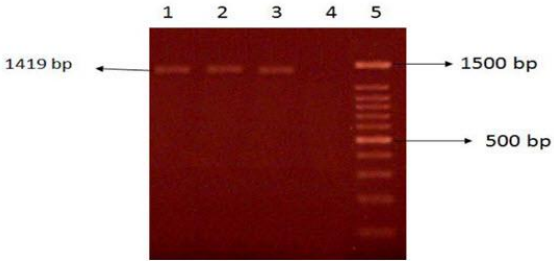
و **bp**۱۸٦ برای ژن **mdeA** که توالی پرایمر آن به صورت زیر می‌باشد:

F 5′ - TTCATCTCTATCCCTCCTTG - 3′، R 5′ - CTTCGACATTTAAAGCTTCCC - 3′

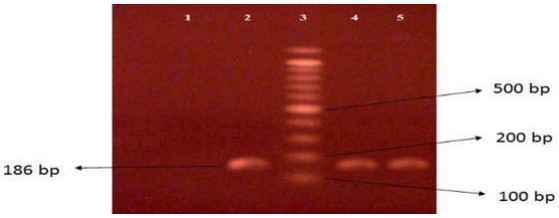
مشاهده شد که با توجه به پرایمرهای طراحی شده، باندهای بدست آمده مشاهده شد. میزان فراوانی ژنهای فوق به ترتیب برای ژن **norC**، **8) 16%** نمونه)، برای ژن **mepA 10% (5** نمونه) و برای ژن **3) 6% mdeA** نمونه) بود. نتایج نشان می‌دهد که تمامی سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای سه ژن فوق بودند و ارتباط معناداری بین وجود ژن های فوق در باکتری و مقاومت آنتی بیوتیکی وجود داشت (**P<0.05**) شکل های ٤،٥ و ٦.



شکل ٤. نتایج تکثیر ژن **norC** در سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس (باند شماره ۳ تا ٦). کنترل منفی (باند شماره ۱)، مارکر **DNA 200bp** (باند شماره ۲).



شکل ۵. نتایج تکثیر ژن mepA در سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس (باند شماره ۱ تا ۳). کنترل منفی (باند شماره ۴)، مارکر DNA 1500bp (باند شماره ۵)



شکل ۶. نتایج تکثیر ژن mdeA در سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس (باند شماره ۲، ۴ و ۵). کنترل منفی (باند شماره ۱). مارکر DNA 200bp (باند شماره ۳)

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از عوامل عفونت های فرصت طلب بیمارستانی در سرتاسر جهان شناخته می‌شود. این باکتری طیف وسیعی از بیماریها از جمله فساد مواد غذایی تا بیماریهای تهدیدکننده‌ی زندگی را ایجاد می‌کند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی بویژه متی‌سیلین در این باکتری شیوع بسیار زیادی پیدا کرده است و یکی از چالش های مهم سال های اخیر، پیدایش استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین و سیپروفلوکساسین می‌باشد (۱۵).

نتایج حاصل از این مطالعه، افزایش مقاومت به نمونه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در منطقه‌ی مورد مطالعه را نشان می دهد. نتایج این مطالعه نشان میدهد که میزان مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به سیپروفلوکساسین و سفوکسیتین در این منطقه بالا می‌باشد و از سوی دیگر مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیکها از جمله آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتامها، ماکرولیدها و کوئینولونها با افزایش همراه می‌باشد (۱۷). در این مطالعه، ٦٨ درصد از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از بیماران مقاوم به سفوکسیتین (متی سیلین، **MRSA**) بودند که این میزان بیشتر از مطالعات انجام شده توسط سایر محققین از جمله شکری، احمدی، حدادی، حقگو و کمتر از مطالعه‌ی واعظ و رضازاده می‌باشد. همچنین نتایج بیانگر این مطلب است که فراوانی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (**MRSA**) و مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این مطالعه بیشتر به بخشهای عفونی، جراحی و نورولوژی مربوط می‌شود. سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (**MRSA**) بدلیل خطر انتشار آن در بخش مراقبتهای ویژه به جهت مشکلات بیشتر بیماران، دستکاری‌های متعدد پزشکی و مصرف وسیع آنتی‌بیوتیکها همیشه مورد توجه بوده است. همچنین درمان عفونتهای ناشی از سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین و متی‌سیلین با محدودیت مواجه شده است چرا که اکثر این باکتریها به بسیاری از مواد ضدمیکروبی مقاوم شده‌اند (۱۸). بنابراین، برای درمان این باکتریها، از آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکوئینولون مانند سیپروفلوکساسین بطور معمول استفاده می‌شود. متأسفانه، عفونت های ناشی از سویه‌های **MRSA** که با تجویز سیپروفلوکساسین مورد هدف درمان قرار می‌گیرند، می‌توانند به سیپروفلوکساسین مقاومت پیدا کنند (۱۹).

در همین رابطه، کینولونها به عنوان عوامل ضد باکتریایی وسیع الطیف خوراکی و بصورت گسترده مورد استفاده درمانی قرار می‌گیرند. ترکیبهای قدیمی‌تر این خانواده از جمله نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین و انوفلوکساسین دارای تاثیرگذاری بهتری علیه باکتریهای گرم منفی نسبت به اقسام گرم مثبت می‌باشند. درحالیکه فلوروکینولونهای جدید همچون لووفلوکساسین، اسپارفلوکساسین و تروافلوکساسین دارای تأثیر فراوانی بر علیه باکتریهای گرم مثبت هستند. فلوروکینولونها فعالیت ضدباکتریایی خود را با مهار دسته‌ی **II** آنزیمهای توپوایزومرازی، یعنی **DNA** ژیراز ۱ (توسط دو ژن **gyrA** و **gyrB** کد می‌شود) و **DNA** توپوایزومراز **IV** (توسط دو ژن **parC** و **parE** کد می‌شود) اعمال می‌کنند (۲۰،۲۱).

تغییر جایگاه هدف آنزیمی دارو با ایجاد موتاسیون در ناحیه‌ی درونی ژنهای کدکننده‌ی آنزیمهای توپوایزومرازی، از مکانیسم مقاومت میکروارگانیسم‌ها به این دسته‌ی دارویی می‌باشد که به نواحی القای مقاومت کینولونی ۳ معروف است؛ بنابراین، این جایگاهها دیگر توسط فلوروکینولونها قابل شناسایی نیستند و خروج دارو بوسیله مکانیسم افلاکس دارویی صورت می گیرد (۲۲). در باکتریهای گرم منفی نیز دفع فلوروکینولونها بوسیله سیستمهای سه جزئی چند دارویی خانواده **RND**، مانند پمپهای گوناگون خانواده **norA** در استافیلوکوکوس اورئوس و یا **AcrAB-TolC** در اشریشیا کلی اتفاق می‌افتد (۲۳). بنابراین چندین پمپ دفع کننده داروهای فلوروکینولونی در یک سویه باکتریایی می‌تواند وجود داشته باشد.

مکانیسمهای مختلفی جهت مقاومت به آنتی‌بیوتیکها در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس وجود دارد و یکی از مکانیسم های مهمِ مقاومت به آنتی‌بیوتیک، وجود پمپ‌های افلاکس در این باکتری است (۱۶). پمپ‌های افلاکس مواد سمی مانند آنتی بیوتیک را به محیط خارج پمپ می‌کنند و افزایش بیان یک یا چند پمپ افلاکس مانع از ایجاد تجمع داخل سلولی، در حد آستانه مورد نیاز برای فعالیت داروها میگردد (۲۴). پمپ‌های افلاکس از نظر بالینی بطور مؤثری در ارتباط با گروههای **RND** یا **MFS** هستند که با آزادسازی انرژی نیرو محرکه پروتون در خارج کردن آنتی‌بیوتیک نقش دارند (۲۵). سیستم افلاکس **MFS** یکی از سیستمهای مهم افلاکس در استافیلوکوکوس اورئوس است و پمپ افلاکس **norA** یکی از پمپ‌های مهم این خانواده است.

مطالعات متفاوت نشان داده‌اند که **norA** می‌تواند ترکیبات مختلفی مانند فلئوروکینولونهای هیدروفوب از قبیل نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین، اتیدیوم بروماید و ترکیبات چهارظرفیتی آمونیوم را به سمت بیرون پمپ کند (۲۳). همچنین محققان نشان دادند که ژن **norA** دارای یک بیان پایه در درون سلول است که باعث ایجاد مقاومت به میزان کم به ترکیبات آنتی‌بیوتیکی می‌شود. افزایش مقاومت به فلئوروکوئینولونها با افزایش بیان ژن پمپ افلاکس **norA** ارتباط دارد. جهش‌های ایجاد شده در ژن **norA** می‌تواند باعث بیان دایمی این ژن شود بطوری‌که این جهش‌ها باعث تغییر در ساختار دوم **mRNA**، افزایش نیمه عمر آن و کاهش حساسیت به آنزیم **RNases** می‌شوند (۲۶).

در مطالعه‌ی حاضر، به منظور بررسی وجود پمپهای افلاکس، غربالگری سویه ها به منظور وجود ژن **norA**، **norC** و **MepA** و **MdeA** انجام شد. نتایج نشان داد که تمامی سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای هر چهار ژن فوق بودند. این نشان می‌دهد که اصلی‌ترین راه مقاومت سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، وجود پمپ‌های افلاکس است. در همین رابطه،**D Patel** و همکاران در سال ۲۰۱۰ تعداد ۲۰۰ نمونه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس را از نظر وجود ژن های **MdeA**، **MepA** و **NorA** مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که به ترتیب ٪۷،٪ ۱۱٪ و ۱۳٪ از نمونه ها دارای این ژن بودند (۲۷). در سال ۲۰۰۸،

Yanpeng Ding و همکارانش بر روی بیان ژنهای پمپ افلاکس **NorA** در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که در شرایط بالینی میزان بیان ژن های **norA** به میزان ۱۷۱ برابر بیشتر بیان می شود (۱٤).

فلاح و همکارانش در سال ۲۰۱۱ تأثیر پمپ‌های افلاکس در مقاومت هلیکوباکتر پیلوری به مترونیدازول را از طریق آنالیز رونوشتی ژنهای **RND** پمپ‌های افلاکس توسط **RT – PCR** بررسی کردند و نشان دادند که حضور مترونیدازول منجر به افزایش بیان این ژن ها در سطح رونوشت گردیده و بنابراین به این شکل در مقاومت داروئی نقش دارند (۲۸). در سال ۲۰۰۳ نیز لیلیان و همکارانش در انگلیس روی سیستم های بیان همزمان دو پمپ افلاکس روی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم کار کردند. این تحقیقات نشان داد که بیان بیش از اندازه **MexB –Oprm** و **Mexef – Oprm** بطور همزمان در نمونه های بالینی جدا شده از سودوموناس آئروژینوزا منجر به مقاومت به چند آنتی بیوتیک می گردد (۲۹).

در سال ۱۳۹۳ در ایران روی شیوع فنوتیپی و ژنتیکی پمپ‌های افلاکس و مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا در بین بیماران سوختگی ارزیابی صورت پذیرفت که نشان داد از ۲۵۰ نمونه مورد بررسی ٦٦ مورد یعنی ٤۰ / ۲٦٪ آلوده به سودوموناس آئروژینوزا بوده که از این تعداد، ٦٦ / ٦٦٪ یعنی ٤٤ نمونه واجد پمپ افلاکس بودند (۳۰). این نتایج نشان داد که مقاومت آنتی بیوتیکی در ایران که از طریق پمپ‌های افلاکس ایجاد شده، از شیوع بالایی برخوردار است. در سال ۱۳۹۵ نیز در مطالعه ای که توسط حیدری بر روی ارتباط بین پمپ‌های افلاکس **QepA** و **AcrAB** و مقاومت به سیپروفلوکساسین در سویه های بالینی اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه صورت گرفت که طبق آن، شیوع پمپ‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین در بین این سویه ها به میزان نگران کننده‌ای افزایش داشته و به میانگین ۹٤ درصد رسیده است (۲۳). در دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت در اسفند ۹۵، بر روی موتاسیون ژن های **grlA** و **norA** در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به فلوروکینولون ها مطالعه ای صورت گرفت که نشان داد جهش در ژن **grlA** یکی از مهمترین مکانیسم های مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس در رشت بوده و در اغلب این سویه های مقاوم، موتاسیون در کدن ۸۰ این ژن شایع بوده است (۲٦). پژوهشی که در سال ۱۳۹۲ توسط احمدی صورت گرفت نشان داد که از بین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از میان ۱۰۰ نمونه بالینی، ٦٤ درصد از این سویه ها نسبت به متی سیلین مقاوم بوده اند (۳۱). در سال ۱۳۹۰ حدادی و همکاران با بررسی میزان فراوانی عفونت استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و سویه های مقاوم به ونکومایسین نشان دادند که حدود ۵۰ درصد از بیماران مقاوم به متی‌سیلین و فقط یک مورد عفونت بینابینی نسبت به ونکومایسین بودند (۱۷). در طی پژوهشی که رضا زاده و همکاران در سال ۱۳۹۱ در بیمارستان ولیعصر اراک بر روی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین انجام دادند، مشخص شد که ۸۰ درصد از سویه ها حاوی ژن مقاومت به متی‌سیلین بوده و بیشترین مقاومت این سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد (تتراسایکلین) ۵ / ۸۸ درصد (و لووفلوکساسین و سیپروفلوکساسین هرکدام ۷۰/۸۵)٪(بوده است. همچنین مشخص شد که کمترین میزان مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل و نتیل مایسین هرکدام به میزان) ۷۰ / ۵)٪ بوده است (۳۲).

نتیجه بررسی هایی که در سال ۱۳۹۳ بر روی نمونه های بالینی بیمارستان ایت ا... موسوی زنجان توسط شکری و همکاران انجام شد، نشان داد که میزان فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین ۲٦ مورد از

۴۵ مورد آلوده یعنی ۷۷ / ۵۷ درصد بوده که با نتایج بدست آمده همخوانی دارد (۱۸). نتایج مطالعه حاضر همسو با سایر مطالعات می‌باشد، همچنین نتایج بدست آمده آشکار کرد که اصلی‌ترین راه مقاومت سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، وجود پمپ‌های افلاکس است چرا که تمامی سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای هر چهار ژن **norA**، **norC** و **MepA** و **MdeA** می‌باشد.

نتیجه گیری

یافته های پژوهش حاضر نشان داد، با توجه به شیوع ژن‌های پمپ افلاکس در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین و متی سیلین و به دلیل اینکه اصلی ترین راه مقاومت سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین وجود همین پمپ های افلاکس است (چراکه تمامی سویه های مقاوم حاوی این چهار ژن پمپ افلاکس یعنی **NorA**، **NorC**، **MdeA** و **MepA** بودند)، می‌بایست از راه کارهایی بهتر در مورد پیشگیری و درمان عفونت‌های مرتبط با سویه های مقاوم به متی‌سیلین استفاده کرد، همچون پیشگیری از بروز بیماری با رعایت نکات بهداشتی و ایمنی بخصوص در بیمارستان ها توسط کادر پزشکی و پرسنل بطور مشخص در بخش های ،نوزادان وعفونی **ICU** ،بررسی بهتر و بیشتر میزان شیوع سویه های مقاوم و نوع آنتی بیوتیکی که به آن مقاومت نشان می دهند و میزان آن ، برای تجویز بهتر دارو و در نهایت پژوهش های گسترده تر برای یافتن راهکارهایی که از طریق آن بتوان مکانیسم های مقاومت دارویی را در سویه های مقاوم کاهش داد و یا از بین برد.

تضاد منافع

هیچ گونه تضادی در منافع بین نویسندگان مقاله وجود ندارد.

منابع

1. Hamdan-Partida A, Sainz-Espuñes T, Bustos-Martínez J. Characterization and persistence of Staphylococcus aureus strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community. Journal of Clinical Microbiology 2010;48(5):1701-5.
2. Shittu AO, Okon K, Adesida S, Oyedara O, Witte W, Strommenger B, et al. Antibiotic resistance and molecular epidemiology of Staphylococcus aureus in Nigeria. BMC Microbiology 2011;11(1):92.
3. Schaffer AC, Lee JC. Vaccination and passive immunisation against Staphylococcus aureus. International Journal of Antimicrobial Agents 2008;32:S71-S8.
4. Huveneers S, Truong H, Fässler R, Sonnenberg A, Danen EH. Binding of soluble fibronectin to integrin $\alpha 5 \beta 1$−link to focal adhesion redistribution and contractile shape. Journal of Cell Science 2008;121(15):2452-62.
5. Mcdougal LK, Thornsberry C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. Journal of Clinical Microbiology 1986;23(5):832-9.
6. Carlsen SA, Till JE, Ling V. Modulation of drug permeability in Chinese hamster ovary cells. Possible role for phosphorylation of surface glycoproteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1977;467(2):238-50.

7. Loo TW, Clarke DM. Determining the structure and mechanism of the human multidrug resistance P-glycoprotein using cysteine-scanning mutagenesis and thiol-modification techniques. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1999;1461(2):315-25.

8. Fournier B, Aras R،Hooper DC. Expression of the multidrug resistance transporter NorA from Staphylococcus aureus is modified by a two-component regulatory system. Journal of Bacteriology 2000;182(3):664-71.

9. Huang J, O'Toole PW, Shen W, Amrine-Madsen H, Jiang X, et al. Novel chromosomally encoded multidrug efflux transporter MdeA in Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2004;48(3):909-17.

10. Kaatz GW, Seo SM. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1995;39(12):2650-5.

11. Truong-Bolduc QC, Zhang X, Hooper DC. Characterization of NorR protein،a multifunctional regulator of norA expression in Staphylococcus aureus. Journal of Bacteriology 2003;185(10):3127-38.

12. 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 Medica Iranica 2014;52(6):424-9.

13. Omote H, Hiasa M, Matsumoto T, Otsuka M, Moriyama Y. The Mate proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. Trends in Pharmacological Sciences 2006;27(11):587-93.

14. Ding Y, Onodera Y, Lee JC, Hooper DC. NorB an efflux pump in Staphylococcus aureus strain MW2 contributes to bacterial fitness in abscesses. Journal of Bacteriology 2008;190(21):7123-9.

15. Goetghebeur M, Landry P-A, Han D, Vicente C. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a public health issue with economic consequences. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology 2007;18(1):27-34.

16. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2002;46(7):2155-61.

17. Hadadi A, Moradi-Tabriz H, Aghabagher BM, Moslehi B, Esmaielzadeh P. Determining the prevalence of methicillin-and vancomycin-resistant Staphylococcus aureus by MIC and E-Test. Tehran University Medical Journal 2011;69(6).

18. Shokri R, Salouti M, Sorouri ZR, Heidari Z. Frequency of meticillin resistant staphylococcus aureus strains isolated from clinical samples in Mousavi hospital, Zanjan, and recognition mec a gene using pcr 2014.

19. Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM, Gemmell C, Kim M, Ploy M, Solh N, Ferraz V, Hiramatsu K. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. Journal of Clinical Microbiology 2003;41(1):5-14.

20. Eaves DJ, Randall L, Gray DT, Buckley A, Woodward MJ, White AP, Piddock L. Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of gyrA, gyrB, parC،and parE and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant Salmonella enterica. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2004;48(10):4012-5.

21. King DE, Malone R, Lilley SH. New classification and update on the quinolone antibiotics. American Family Physician 2000;61(9):2741-8.

22. Rubin RJ, Harrington CA, Poon A, Dietrich K, Greene JA, Moiduddin A. The economic impact of Staphylococcus aureus infection in New York City hospitals. Emerging Infectious Diseases 1999;5(1):9.

23. Heidary M, Bahramian A, Goudarzi H, Eslami G, Hashemi A, Khoshnood S. To study the association between AcrAB and Qep A efflux pumps and ciprofloxacin resistance among Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae clinical strains. Majallah-i dānishgāh-i ʿulūm-i pizishkī-i Arāk 2016;19(4):1-10.

24. Rahimi-Alang S, Asmar M, Cheraghali F, Yazarlou S, Amini A, Shakeri F, Ghaemi E. Frequency of methicillin resistant Staphylococcus aureus in health care. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences 2011;13(1):17-22.

25. Kumar S, Mukherjee MM, Varela MF. Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. International Journal of Bacteriology 2013;2013.

26. Asadpour L, Veisi S. Mutations in grlA and norA Genes of Clinical Isolates of Staphylococcus aureus Resistant to Fluoroquinolone. Armaghane Danesh 2017;21(12):1236-46.

27. McAleese F, Petersen P, Ruzin A, Dunman PM, Murphy E, Projan SJ, Bradford P. A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived Staphylococcus aureus mutants to tigecycline. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2005;49(5):1865-71.

28. Mehrabadi JF, Sirous M, Daryani NE, Eshraghi S, Akbari B, Shirazi MH. Assessing the role of the RND efflux pump in metronidazole resistance of Helicobacter pylori by RT-PCR assay. The Journal of Infection in Developing Countries 2010;5(02):88-93.

29. Pal R, Fatima Z, Hameed S. Efflux pumps in drug resistance of Mycobacterium tuberculosis: a panoramic view. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 2014;3(8):528-46.

30. Dashtizadeh Y, Moattari A, Gorzin AA. Phenotypic and genetically

evaluation of the prevalence of efflux pumps and antibiotic resistance in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa among burned patients Admitted to Ghotbodin Shirazi Hospital 2014.

31. 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 2014.

32. Rezazadeh M, Yousefi MR, Sarmadian H, Ghaznavirad E. Antibiotic profile of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with multiple-drug resistances isolated from nosocomial infections in Vali-Asr Hospital of Arak 2013.