

# 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<sup>1\*</sup>, Jamileh Nowroozi<sup>1</sup>, Gita Eslami<sup>2</sup>

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-chlorophenylhydrazine).

**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<sup>۱\*</sup>، جمیله نوروژی<sup>۱</sup>، گیتا اسلامی<sup>۲</sup>

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، 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

Downloaded from pejouhesh.sbm.ac.ir on 2024-04-26]

## 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* و *norA-R* GACATTTACCAAGCCATCAA و -TGCCATA- با طول محصول ۱۰۲ جفت باز و ژن *gmk* از پرایمرهای *gmk-F* و *gmk-R* TCAGGACCATCTGGAGTAGGTAAG و -TTCACGCATTGACGTGTTG 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 SSPS 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

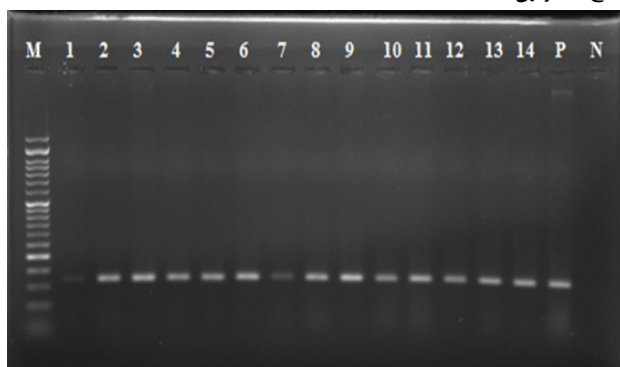
| نمونه MSSA<br>تعداد: ۵۵ |           |          | نمونه MRSA<br>تعداد: ۴۵ |           |           | آنتی بیوتیک                 |
|-------------------------|-----------|----------|-------------------------|-----------|-----------|-----------------------------|
| مقاوم                   | نیمه حساس | حساس     | مقاوم                   | نیمه حساس | حساس      |                             |
| ۳۶ (۸۰٪)                | ۰         | ۹ (۲۰٪)  | ۰                       | ۰         | ۴۵ (۱۰۰٪) | کلیندامایسین                |
| ۰                       | ۰         | ۰        | ۰                       | ۰         | ۰         | لینزولاید                   |
| ۴ (۸٪)                  | ۰         | ۴۱ (۹۱٪) | ۰                       | ۰         | ۰         | کلرامفنیکل                  |
| ۳۷ (۸۲٪)                | ۰         | ۸ (۱۷٪)  | ۰                       | ۰         | ۰         | سفازولین                    |
| ۴۱ (۹۱٪)                | ۳ (۶٪)    | ۱ (۲٪)   | ۰                       | ۰         | ۰         | اریترومایسین                |
| ۴۵ (۱۰۰٪)               | ۰         | ۰        | ۰                       | ۰         | ۰         | آمپی سیلین                  |
| ۳۸ (۸۴٪)                | ۰         | ۷ (۱۵٪)  | ۰                       | ۰         | ۰         | سیپروفلوکسازین              |
| ۹ (۲۰٪)                 | ۰         | ۳۶ (۸۰٪) | ۰                       | ۰         | ۰         | تری متوپریم- سولفامتوکسازول |

جدول ۲: بررسی نتایج E-Test در ونکومایسین

| غلظت های مورد استفاده شده بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر (تعداد) |     |      |      |      |   |   |   |   |   | آنتی بیوتیک |
|----------------------------------------------------------------|-----|------|------|------|---|---|---|---|---|-------------|
| ۱                                                              | ۱/۵ | ۲    | ۳    | ۴    | ۵ | ۶ | ۷ | ۸ | ۹ |             |
| ۰/۷۵                                                           | ۰/۵ | ۰/۳۸ | ۰/۲۵ | ۰/۱۹ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ونکومایسین  |
| ۲۳                                                             | ۱۳  | ۳    | ۲    | ۲    | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | 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* مارکر ۱۰۰ bp، P: کنترل مثبت، N: کنترل منفی

۱-۱۴: 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، ونکومايسين، 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.

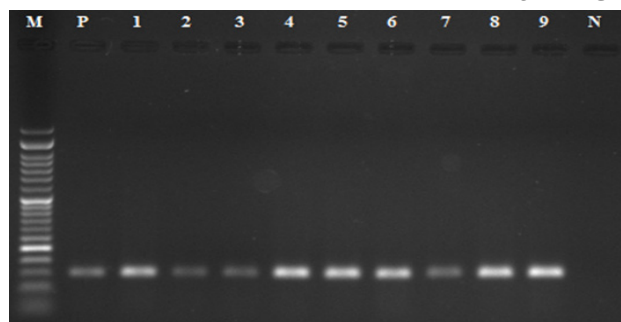
استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل اصلی عفونت های باکتریایی در کشورهای توسعه یافته است که مسئول طیف گسترده ای از بیماری ها، از عفونت های جزئی پوست تا پنومونی نکروز دهنده کشنده می باشد. استافیلوکوکوس ها از مهم ترین عوامل ایجادکننده عفونت های مزمن مرتبط با ابزار پزشکی قرار داده شده در بدن مانند کاتترهای دستگاه ادراری، دریچه های قلبی مصنوعی، مفاصل پروستاتیک و غیره می باشند. از جمله این عفونت ها می توان اندوکاردیت، استومیلیت، 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، اریترومايسين، کلرامفنیکل، نیتروفلورانتونین، کلیندامایسین، جنتامایسین، تری متوپریم سولفامتوکسازول در استافیلوکوکوس اورئوس جداسده از عفونت ادراری به ترتیب ۶۷، ۶۳، ۴۵، 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 عزیزی و همکاران مشخص شد که همه سویه های MRSA و MSSA نسبت به ونکومايسين، 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.

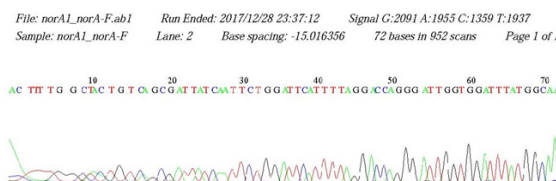
در مطالعه Costa و همکارانش در سال ۲۰۱۹، *norA* را به عنوان بهترین پمپ ترشحی مطالعه شده در استافیلوکوکوس اورئوس بیان نموده است همچنین به عنوان برترین مدل بررسی مقاومت های وابسته به پمپ ترشحی در این باکتری و اولین پاسخ به مواد ضد میکروبی در استافیلوکوکوس اورئوس ذکر نموده است (۱۸).

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 بدست آمده مشابه

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 جداسازی شده، ۱۶ سویه دارای ژن *norA* بودند و تمامی سویه ها دارای پمپ ترشحی فعال بودند (۱۹). در بین ایزوله های کلینیکی، Kosmid همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که افزایش بیان ژن پمپ ترشحی MDR در نمونه های بالینی موقتا



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 اتیدیوم بروماید به همراه آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین از MIC اتیدیوم 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: تأثیر CCCP روی MIC سیپروفلوکساسین در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین

| شماره ایزوله | MIC سیپروفلوکساسین | MIC سیپروفلوکساسین به همراه CCCP | MIC اتیدیوم بروماید | MIC سیپروفلوکساسین به همراه اتیدیوم 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 سیروفلوکساسین زمانی که سیروفلوکساسین همراه با CCCP مورد آزمایش قرار گرفت ۱۳ سویه پمپ ترشحی فعال را نشان دادند (۲۲). در مطالعه اردبیلی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در تهران، MIC سیروفلوکساسین 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 سیروفلوکساسین بودند. میزان شیوع ژن‌های *norA* و *norB* در سویه‌های مقاوم به سیروفلوکساسین به ترتیب ۱۰۰٪ و ۸۳٪ بود و همچنین تمام سویه‌های مقاوم به سیروفلوکساسین دارای پمپ ترشحی فعال بودند (۲۴). نتایج مطالعه آنها با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. از نقاط قوت این مطالعه ارزیابی حضور ژن *norA* پمپ ترشحی در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان عامل مهم در بروز مقاومت دارویی می‌باشد. با بررسی فعالیت مهارکننده‌های پمپ‌های ترشحی 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 سیروفلوکساسین 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 ترشحی و عوامل مهار کننده 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, Missiakos 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 ترشحی، فاکتوری کمک کننده به مقاومت سیروفلوکساسین در نمونه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* است و احتمالاً سبب شیوع بیشتر مقاومت به سیروفلوکساسین 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 سیروفلوکساسین، در ۸ ایزوله با استفاده از CCCP کاهش MIC سیروفلوکساسین مشاهده شد. که در ۶ ایزوله، کاهش ۴ برابری و در ۲ ایزوله، کاهش ۸ برابری مشاهده گردید. این نشان دهنده فعال بودن پمپ ترشحی در سویه‌های مقاوم به سیروفلوکساسین می‌باشد. در بررسی که میرزایی و همکاران در سال ۱۳۹۵ در شهر تهران انجام دادند نشان دادند که در مجاورت مهارکننده پمپ ترشحی CCCP، میزان MIC سیروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید کاهش یافته است که نشان دهنده فعال بودن پمپ ترشحی در سویه‌های مقاوم به سیروفلوکساسین 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 سیروفلوکساسین بودند. فراوانی ژن‌های *norA* و *norB* در سویه‌های مقاوم به سیروفلوکساسین به ترتیب ۱۰۰٪ و ۸۳٪ بودند. همچنین، پمپ ترشحی 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 سیروفلوکساسین مقاوم بودند MIC سیروفلوکساسین 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, & 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.