Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2021 ;Vol.45; No.2

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 Nowroozi[1], Gita Eslami[2]

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

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

(Received: 2020/05/31 Accepted: 2020/09/8)

Abstract

Backgrond*: 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*

* *Corosponding author: Arezoo BostanmaneshRad*

Email: a_bmr@yahoo.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-02-25]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۵، شماره ۲، ۱۴۰۰، صفحات ۵۵ تا ۶۱

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 ۹۷-۹۶

آرزو بستان منش راد[1*]، جمیله نوروزی[1]، گیتا اسلامی[2]

۱.گروه میکـروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسـلامی واحـد تهـران شمـال، تهـران، ایـران
۲.گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

دریافت: ۱۳۹۹/۳/۱۱ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۱۸

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 ۹۷- ۹۶ 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 دایلوشن بررسی شد. فعال بودن پمپ ترشحی توسط تعیین MIC سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. فراوانی ژن *norA* با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR و تعیین توالی محصولات PCR مشخص گردید. . داده های مربوطه با استفاده از آزمون کای اسکوئر تحلیل شدند.

یافته‌ها: از مجموع ۱۰۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده ۴۵ جدایه مقاوم به متی سیلین بودندکه از این میان ۳۸ سویه۸۲/۲٪ به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. میزان شیوع ژن *norA*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.

نتیجه‌گیری: به نظر می رسد افزایش قابل توجه مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هاي مختلف باید هشداری جدي در کنترل عفونت محسوب شود.

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

مقدمه

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 بیوتیکهای 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 احتمالا نبود درمان سریع و مناسب برای MRSA می باشد(۱).

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

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-02-25]

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، جراحت چرکی، اندوکاردیت، پنومونی، مننژیت، سپتی سمی نوزادی و باکتریمی(۲، ۳). استافیلوکوکوس ارگانیسمی 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 MFSاست که شامل پمپ های *norA , norB, norC, MdeA,SdrM , QacA/B*می باشند(۶).*norA* مسئول انتقال انواع مختلفی از داروها مثل اتیدیوم بروماید، فلوروکوئینولون ها، بنزآلکونیوم کلراید، استریمید، آکریفلاوین و تترافنیل فسفونیوم بروماید می باشد(۵). از جمله داروهای ضد میکروبی رایج که برای درمان سیستیک فیبروزیس استفاده میشود شامل سیپروفلوکساسین و لوفلوکساسین هستند. این عوامل به خاطر پذیرش خوب بیمار، طیف فعالیتی علیه پاتوژن های موردنظر و فارماکینتیک مطلوبشان مورد استفاده قرار می گیرند. این دارو داری اثرات متوسط بر علیه باکتری های گرم مثبت می باشد. سیپروفلوکساسین از مشتقات فلوروکینولون 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 بسرعت 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 *norA* 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 تیوپ های استریل حاوی محیط کشت مولر هینتون 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 مانیتول 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) انتشار از دیسک انجام شد. حساسیت ایزوله ها نسبت به آنتی بیوتیک های اریترومایسین (۱۵ میلی گرم)، کلیندامایسین(۲ میلی گرم)، سیپروفلوکساسین(۵ 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 وانکومایسین از روش حداقل غلظت مهاری (MIC) با استفاده از نوار E-test (Liofilchem ، ایتالیا) استفاده گردید. جهت تعیین MIC ابتدا سوسپانسیونی از کشت تازه باکتری مورد نظر با کدورت نیم مک فارلند تهیه و به کمک سواب استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت انجام شد. پس از قرار دادن نوار E-test ونکومایسین 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 MICدر نظر گرفته شد. بر اساس استاندارد CLSI برای ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس*، میزان MIC ، ≤ ۲، ۸-۴ و ≤۱۶میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب بیانگر سویه های حساس، حد واسط و مقاوم به ونکومایسین می باشند. در تمامی مراحل انجام آزمایش از سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC49775به عنوان کنترل مثبت استفاده شد(۹، ۱۰).

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

در این مطالعه میزان MIC سیپروفلوکساسین و CCCP (Sigma, USA) برای ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بر طبق استانداردهای CLSI تعیین شد. بر طبق استانداردهای CLSI، ابتدا در تمامی چاهک های پلیت‌های ۹۶ خانه ای، ۱۰۰ µl محیط مولر هینتون براث ریخته شد و سپس در ردیف اول چاهک ها، ۱۰۰ µl 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 ۱۰۰ µl دور ریخته شد. سپس ۱۰۰ µl از سوسپانسیون باکتری با رقت نهایی 5×10^5 CFU/ml نیز به چاهک‌ها تلقیح گردید. از مولر هینتون براث و سوسپانسیون باکتری به‌تنهایی به ترتیب به عنوان کنترل منفی و کنترل مثبت استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آخرین رقت از آنتی‌بیوتیک که در آن هیچ گونه رشدی مشاهده نگردید، به‌عنوان حداقل غلظت مهاری رشد (MIC) در نظر گرفته شد. قابل به ذکر است که از سویه *S. aureus* ATCC 29213 به‌عنوان 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 مهاری مورد مطالعه قرار گرفتند. آزمایش MIC بر اساس استاندارد CLSI به روش رقیق سازی در میکروپلیت برایCCCP 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 میکرودایلوشن در پلیت ۹۶ خانه ای انجام گرفت. برای تهیه محلول ذخیره از سیپروفلوکساسین با غلظت ۵۱۲۰، ابتدا ۱۶ 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 ۱:۱۰ رقیق شد. روش آماده سازی CCCP به این شکل بود که ابتدا DMSO با نسبت ۱:۱۰ رقیق شد. سپس ۲۰۰ لاندا از آن با ۲۰۰ لاندا DMSO مطلق مخلوط شد و به آن ۲/۵ 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 کشندگی 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).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-02-25]

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* GACATTTCACCAAGCCATCAA و *norA-R* TGCCATA-AATCCACCAATCC با طول محصول ۱۰۲ جفت باز و ژن gmk، *gmk-F* TCAGGACCATCTGGAGTAGGTAAAG و *gmk-F* TTCACGCATTTGACGTGTTG با طول ۱۰۸ جفت باز استفاده شد(۱۳). مواد Master Mix در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شدند، (زیرا آنزیم Taq پلیمراز نسبت به دماهای بالا بسیار حساس بوده و سریعاً غیر فعال می‌شود). برای انجام مراحل کار در هر میکروتیوب۱۲,۵ µl از Master Mix ۱ از هر کدام از پرایمرهای Reverse و Forward، ۵,۸ µl آب مقطر دیونیزه و ۲ µl از DNA ی نمونهٔ 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 درتست) به همراه نمونه‌های مجهول PCR شود. سپس میکس‌های PCR که حاوی DNAهای 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 سلسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۷ درجه سلسیوس برای ژن *norA* به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۰ درجه سلسیوس برای ژن *gmk* به مدت ۴۵ ثانیه گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگاروز۱درصد الکتروفورز گردید. محصولات PCR نمونه ها برای تعیین توالی به Bionner کشور کره جنوبی فرستاده شد و نتایج با نرم افزار Chromas۱,۴۵ 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 SSPSو آزمون کای اسکوئر استفاده شد و مقادیر P<۵۰,۰ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد. اطلاعات بدست‌آمده از آزمایش‌های تعیین حساسیت ضد میکروبی بر اساس آخرین نسخه منتشرشده ISLC(۸۱۰۲) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت(۰۱).

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 بخشICU 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 ۳-۱ میزان مقاومت نشان داده شده است که در نمونه های MRSA میزان مقاومت به آنتی بیوتیک ها بیشتر می باشد.

جدول۱: استرسور های مورد استفاده در طی یک هفته اعمال استرس

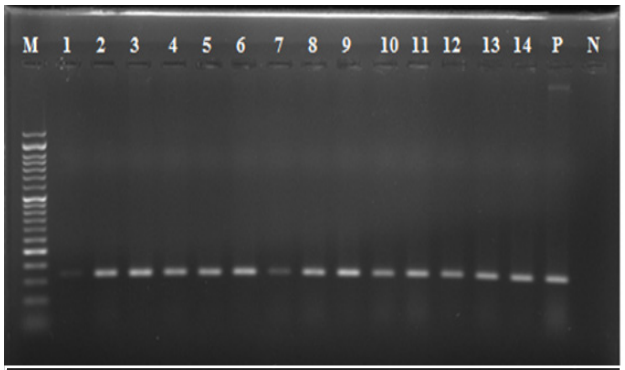
آنتی بیوتیک	نمونه MRSA تعداد:۴۵			نمونه MSSA تعداد:۵۵		
	مقاوم	نیمه حساس	حساس	مقاوم	نیمه حساس	حساس
کلیندامایسین	۳۶(۸۰)	۰	۹(۲۰)	۷(۱۲/۷)	۱(۱/۸)	۴۷(۸۵/۴)
لینزولاید	۰	۰	۴۵(۱۰۰)	۰	۰	۵۵(۱۰۰)
کلرامفنیکل	۴(۸/۸)	۰	۴۱(۹۱/۱)	۲(۳/۶)	۰	۵۳(۹۶/۳)
سفازولین	۳۷(۸۲/۲)	۰	۸(۱۷/۷)	۲(۳/۶)	۰	۵۳(۹۶/۳)
اریترومایسین	۴۱(۹۱/۱)	۳(۶/۶)	۱(۲/۲)	۷(۱۲/۷)	۶(۱۰/۸)	۴۲(۷۶/۳)
آمپی سیلین	۴۵(۱۰۰)	۰	۰	۵۱(۹۲/۷)	۰	۴(۷/۲۷)
سیپروفلوکساین	۳۸(۸۴/۴)	۰	۷(۱۵/۷)	۳(۵/۵۴)	۲(۳/۶)	۵۰(۹۰/۹)
تری متوپریم- سولفامتوکسازول	۹(۲۰)	۰	۳۶(۸۰)	۵(۹)	۰	۵۰(۹۰/۹)

جدول۲: بررسی نتایج E_Test در ونکومایسین

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

تأیید مولکولی *استافیلوکوکوس اورئوس*

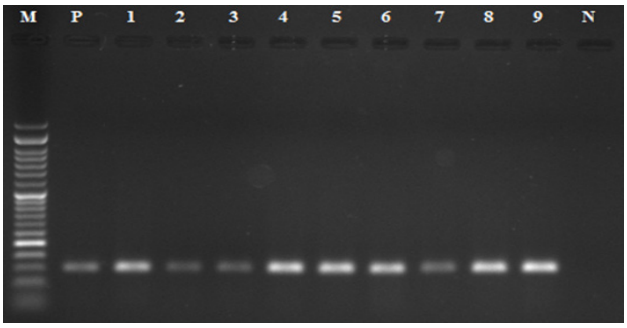
با استفاده از روش PCR، از میان ۱۰۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* که به روش فنوتیپی تأیید شده بودند، ۱۰۰٪ ایزوله ها دارای ژن gmk و ژن *norA* بودند. نتایج تکثیر ژن *gmk*



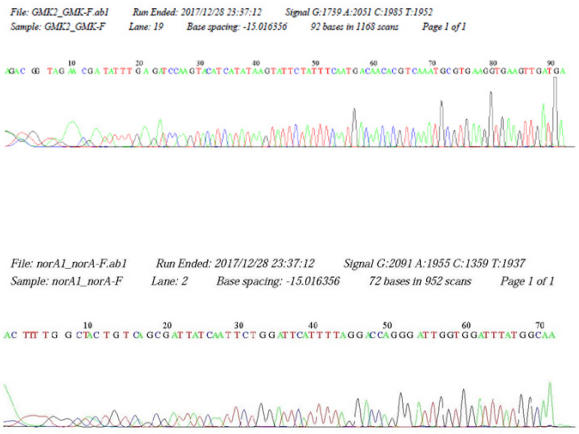
شکل۱: محصول PCR حاصل از تکثیر ژنM: ، gmkمارکر ۱۰۰bp، P:کنترل مثبت،N: کنترل منفی
۱-۱۴: نمونه های مجهول

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-02-25]

نتایج تکثیر ژن *norA*



شکل۲: محصول PCRحاصل از تکثیر ژن *norA*، M : مارکر ۱۰۰bp
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 MICاتیدیوم بروماید به همراه آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین ازMIC 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.

جدول۳: تاثیر 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

بحث

در مطالعه حاضر در نمونه های MRSA و MSSA بیشترین میزان مقاومت نسبت به آمپی سیلین دیده شد، بیشترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی 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 آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های MRSA نسبت به MSSA به‌طور قابل‌توجهی 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 مطالعه‌ای که توسط رنجبر و همکاران به انجام رسید، مقاومت به سیپروفلوکساسین، اریترومایسین، کلرامفنیکل، نیتروفورانتوئین، کلیندامایسین، جنتامیسین، تری متوپریم سولفامتوکسازول در *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده 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 سویه‌های MRSA و MSSA نسبت به ونکومایسین، لینزولید و کوئینوپریستین- دالفوپریستین حساس بودند(۱۶) . علاوه بر این نتایج، مطالعه دیگری نیز نشان داد که تمام ایزوله‌های *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 مطالعهCosta 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 هادارای 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، Kosmidو همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که افزایش بیان ژن پمپ ترشحیِ MDR در نمونه های بالینی موقتاً

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-02-25]

(به شکل گذرا) و از نظر جغرافیایی تغییر می کند(۲۰). این نتایج مؤید آن است که افزایش بیان ژن های پمپ های ترشحی ، فاکتوری کمک کننده به مقاومت سیپروفلوکساسین در نمونه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* است و احتمالاً سبب شیوع بیشتر مقاومت به سیپروفلوکساسین در سویه های MRSA می باشد. در مطالعه حاضر نمونه ها از یک منطقه جغرافیایی جدا شده و نتیجه حاضر با نتایج ، Kosmid و همکاران مغایرت داشت.

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. این نشان دهنده فعال بودن پمپ ترشحی در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین می باشد. 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 سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید کاهش یافته است که نشان دهنده فعال بودن پمپ ترشحی در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین می باشد. در مطالعه ایشان، از میان ۲۵۰ نمونه بالینی ۵۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده ۳۴ سویه (۶۸٪) مقاوم به متی سیلین(MRSA) و ۱۲ سویه (۲۴٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. فراوانی ژنهای *norA* و *norB* در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین به ترتیب ۱۰۰ ٪ و ۸۳ ٪ بودند. همچنین، پمپ ترشحی تمامی سویه های 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 سیپروفلوکساسین مقاوم بودند MIC سیپروفلوکساسین در سویه ها از ۱۲۸-۱۶ میکروگرم در میلی لیتر بود. که از میان سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین زمانی که سیپروفلوکساسین 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 سیپروفلوکساسین 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 نمونه های مورد بررسی ۵۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده ۱۲ جدایه (۲۴٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. میزان شیوع ژن های *norA* و norB در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین به ترتیب ۱۰۰٪ و ۸۳٪ بود و همچنین تمام سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین 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 سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان عامل مهم در بروز مقاومت دارویی می باشد. با بررسی فعالیت مهارکننده های پمپ های ترشحی بر رشد باکتری می توان الگوی درمانی مناسب ارائه کرد.

نتیجه گیری:

به نظر می رسد که میزان مقاومت ژن *norA* نشان دهنده میزان مقاومت این باکتری به سیپروفلوکساسین می باشد بنابراین شاید بتوان در بالین از ترکیب آنتی بیوتیک با CCCP برای افزایش میزان اثر آنتی بیوتیک و کاهش میزان مقاومت آنتی بیوتیکی استفاده کرد. بررسی دیگر مکانیسم های مقاومت دارویی از جمله سایر پمپ های ترشحی و عوامل مهار کننده این پمپ ها را نباید نادیده گرفت.

منابع:

1.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.

2.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.

3.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.

4.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.

5.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.

6.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.

7.Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology: Elsevier Health Sciences; 2015.

8.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.

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, Abuo-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, 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.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-02-25]

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, RahmatiH, 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.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-02-25]