Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 5 (November - December)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Prevalence of *norA* and *norB* efflux pump genes in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and their contribution in ciprofloxacin resistance

Mohadeseh Alsadat Haddadi Zahmatkesh[1], Mohadeseh Laripoor[1], Amir Mirzaie[2], Fatemeh Ashrafi[1]

1. Department of Biology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Young Researchers Club and the elite, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2016/06/18
Accepted: 2016/12/28
Available online: 2016/10/17

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 2016; 10(5): 20-30

Corresponding author at:

Dr. Fatemeh Ashrafi

Department of Biology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Tel: 0982122949793

Email:
F_ashrafi@iau-tnb.ac.ir

Abstract

Background and Aim: Recently, ciprofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* strains due to efflux pumps has become a significant challenge. This study was performed to evaluate the frequency of *norA* and *norB* efflux pump genes and their roles in resistance to ciprofloxacin in clinical isolates of *S. aureus*.

Materials and Methods: A total of 250 clinical samples were collected from different hospitals Tehran-Iran during 2015-2016 and *S. aureus* isolates were identified by standard microbiological tests. Antimicrobial susceptibility patterns were determined by disk diffusion method using CLSI guideline. Subsequently, the presence of *norA* and *norB* efflux pump genes in ciprofloxacin isolates were detected using PCR method. Finally, active efflux pumps were evaluated using ciprofloxacin and ethidium bromide MICs.

Results: Among 250 clinical samples, 50 *S. aureus* isolates were recovered and the results of antibiotic susceptibility tests showed the 34 out of 50 *S. aureus* isolates (68%) were resistant to methicillin (MRSA) and from the 34 MRSA, 12 isolates (24%) were resistant to ciprofloxacin. Moreover, the *norA* and *norB* genes were found in 100% and 83% of ciprofloxacin resistant isolates, respectively.

Conclusions: The results of this study show the potential role played by *norA* and *norB* efflux pumps in the development of resistance to ciprofloxacin in clinical isolates of *S. aureus* and the detection of these genes could be important for the suggestion of an effective treatment model for the *S. aureus* infections.

KeyWords: *Staphylococcus aureus*, Efflux pump, *nor A*, *norB*

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Haddadi Zahmatkesh M A, 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. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (5) :20-30

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۵ – آذر و دی ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی فراوانی ژن‌های پمپ افلوکس *norA* و *norB* در سویه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* و بررسی نقش آن در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین

محدثه السادات حدادی زحمت‌کش[۱]، محدثه لاری پور[۱]، امیر میرزایی[۲]، فاطمه اشرفی[۱]

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۲۹

پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۰۸

انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۰۷/۲۶

موضوع:

باکتری‌شناسی پزشکی

IJMM 1395; 10(5): 20-30

نویسنده مسئول:

دکتر فاطمه اشرفی

گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۲۱۲۲۹۴۹۷۹۳

پست الکترونیک:

F_ashrafi@iau-tnb.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: اخیراً مقاومت به سیپروفلوکساسین در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان یکی از چالش‌های مهم مطرح می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن‌های پمپ افلوکس *norA* و *norB* در سویه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* و ارزیابی نقش آن‌ها در مقاومت به سیپروفلوکساسین بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه تعداد ۲۵۰ نمونه بالینی درحدفاصل سال های ۱۳۹۵-۱۳۹٤ از بیمارستان‌های مختلف شهر تهران جمع‌آوری شد و ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش‌های میکروبیولوژیک شناسایی شدند. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش انتشار دیسک بر اساس دستورالعمل CLSI انجام گرفت. همچنین، وجود ژن‌های پمپ افلوکس *norA* و *norB* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با روش PCR مشخص گردید. درنهایت پمپ‌های افلوکس ازنظر فعال بودن توسط تعیین MIC سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از میان ۲۵۰ نمونه بالینی، تعداد ۵۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شد و نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که ٦٨ درصد از نمونه‌ها (٣٤ نمونه) مقاوم به متی سیلین و از میان این‌ها ٢٤ درصد (١٢ نمونه) مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. فراوانی ژن‌های *norA* و *norB* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین به ترتیب ١٠٠٪ و ٨٣٪ بودند. همچنین، پمپ افلوکس تمامی سویه‌های مقاوم ازنظر فنوتیپی فعال بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که پمپ‌های افلوکس *norA* و *norB* در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین نقش اساسی دارند و بررسی حضور این ژن‌ها می‌تواند در پیشنهاد الگوی درمانی حائز اهمیت باشد.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، پمپ افلوکس، *norA*، *norB*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری پاتوژن از خانواده میکروکوکاسه است که به‌عنوان یک باکتری بیماری‌زای شایع در عفونت‌های بیمارستانی در سرتاسر جهان است. قسمت قدامی بینی منبع اولیه *استافیلوکوکوس اورئوس* در بین افراد بزرگسال و کودکان می‌باشد و ۲۰ تا ۴۰ درصد افراد سالم جامعه حامل این باکتری می‌باشند که به‌عنوان عامل اصلی عفونت‌های استافیلوکوکی به‌حساب می‌آید (۱). این باکتری دامنه وسیعی از بیماری‌ها از قبیل پنومونی، عفونت‌های پوستی، اندوکاردیت، استئومیلیت و بسیاری از بیماری‌های دیگر را به وجود می‌آورد (۲-۳).

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) یکی از عوامل فرصت‌طلب بیماری‌زای بیمارستانی می‌باشد و مقاومت به متی سیلین از طریق تولید یک پروتئین اختصاصی اتصالی به پنی‌سیلین به نام PBP2a ایجاد می‌شود که توسط ژن *mecA* رمزگذاری می‌شود. سویه‌های MRSA امروزه به بسیاری از عوامل ضد باکتریایی مقاوم شده‌اند و این امر موجب محدودیت‌های درمان بیماری‌های ناشی از این باکتری شده است. (۴-۵). داروهای فلورکینولون مانند سیپروفلوکساسین یکی از داروهای مناسب و جایگزین برای درمان بیماری‌های ناشی از سویه‌های MRSA *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد (۶).

بااین‌وجود، به دنبال تجویز این دارو جهت درمان این باکتری‌ها، مقاومت به این آنتی‌بیوتیک نیز رخ داده است، به‌طوری‌که در برخی از موارد میزان مقاومت به ۱۰۰ درصد رسیده است (۷).

مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* متفاوت است که یکی از مکانیسم‌ها ممانعت از تجمع دارو درون سلول به‌وسیله سیستم‌های افلوکس می‌باشد پمپ‌های افلوکس، مواد سمی مانند آنتی‌بیوتیک را به محیط خارج پمپ می‌کنند (۱۱-۸) و به‌طورکلی پمپ‌های افلوکس باکتریایی بر اساس ترادف و شباهت اسیدهای آمینه در پنج گروه اصلی قرار می‌گیرند (۱۳-۱۲). به‌طوری‌که پمپ‌های افلوکس ازنظر بالینی به‌طور مؤثری در ارتباط با گروه‌های افلوکس Nodulation Division (RND) یا Major Facilitator Super Family (MFS) می‌باشند که با آزادسازی انرژی نیرومحرکه پروتون در خارج کردن آنتی‌بیوتیک نقش دارند (۱۵-۱۴). سیستم افلوکس MFS یکی از سیستم‌های مهم افلوکس در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد که پمپ افلوکس norA یکی از پمپ‌های مهم این خانواده است و مطالعات مختلفی نشان می‌دهد که norA می‌تواند ترکیبات مختلفی مانند فلورکینولون‌های هیدروفوب از قبیل نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین، اتیدیوم بروماید و ترکیبات چهار ظرفیتی آمونیم را به سمت بیرون پمپ کند (۱۷، ۱۶). هم‌چنین محققان نشان دادند که ژن *norA* دارای یک بیان پایه در درون سلول می‌باشد که باعث ایجاد کمی مقاومت به ترکیبات آنتی‌بیوتیکی می‌شود. افزایش مقاومت به فلورکینولون ها با افزایش بیان پمپ افلوکس norA ارتباط دارد (۱۸). پمپ افلوکس norB نیز یکی دیگر از پمپ‌های MFS در *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد که دارای ۴۶۳ اسیدآمینه می‌باشد و باعث ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های فلورکینولون و بیوسایدها می‌شود و مطالعات نشان می‌دهد که این پمپ در افزایش بیماری‌زایی این باکتری نیز حائز اهمیت است (۱۹). از نقطه نظر درمانی، اولین داروی مناسب برای درمان باکتری‌های MRSA، آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین می‌باشد و امروزه بزرگ‌ترین چالش و نگرانی در بیمارستان‌ها، ایجاد عفونت‌های بیمارستانی توسط باکتری‌های فرصت‌طلب *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد که به هر دو آنتی‌بیوتیک متی سیلین و سیپروفلوکساسین مقاوم شده‌اند (۲۰).

ازآنجایی‌که تاکنون مطالعات کمی در مورد نقش پمپ افلوکس در مقاومت بخشی به سیپروفلوکساسین در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایران انجام‌شده است، این مطالعه باهدف تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تشخیص مولکولی وجود ژن‌های پمپ افلوکس *norA* و *norB* در سویه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* و ارزیابی نقش آن در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری، کشت و تشخیص ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

در این مطالعه توصیفی، درمجموع تعداد ۲۵۰ نمونه بالینی طی ۶ ماه در حدفاصل سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ از بیمارستان‌های مختلف شهر تهران جمع‌آوری گردید. ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از آزمایش‌های کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم، تخمیر مانیتول و DNase تشخیص قطعی داده شدند.

بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جداسازی شده

پس از حصول اطمینان از شناسایی و تأیید سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، حساسیت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن بر اساس استاندارد CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015) مورد بررسی قرار گرفت (۲۱). حساسیت ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوکسیتین (۱۰ میکروگرم)، وانکومایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، پنی‌سیلین (۱۰ واحد)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، تری متوپریم (۲۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۱۵ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، آموکسی سیلین (۱۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم) و کلیندامایسین (۲ میکروگرم) (MAST, UK) در محیط کشت Muller Hinton agar (مرک، آلمان) انجام گردید. لازم به ذکر است که جهت تشخیص مقاومت به متی سیلین (MRSA)، از دیسک آنتی‌بیوتیکی سفوکسیتین استفاده شد. هم‌چنین برای تعیین میزان حساسیت سویه‌ها به وانکومایسین از روش حداقل غلظت مهاری (MIC) با E-test استفاده شد. جهت تعیین MIC ابتدا سوسپانسیونی از کشت تازه باکتری موردنظر با کدورت نیم مک فارلند تهیه و به کمک سواب استریل بر روی محیط کشت

مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از گذاشتن نوار وانکومایسین بر روی محیط کشت، در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس با بررسی پلیت ها، عددی که در مقابل محل تلاقی هاله عدم رشد با نوار E-test قرار داشت، به‌عنوان مقدار کمی MIC در نظر گرفته شد. بر اساس استانداردهای CLSI، برای ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، میزان MIC برابر با ≤ ۲، ۸-۴ و ≤ ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به ترتیب بیانگر سویه‌های حساس، حد واسط و مقاوم به وانکومایسین می‌باشند.

در تمامی انجام آزمایش‌ها، سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 33591 به عنوان کنترل مثبت مقاوم به متی سیلین (حاوی ژن *mecA*) و از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 به عنوان کنترل مثبت مقاوم به سیپروفلوکساسین و از *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ATCC 12228 به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

استخراج DNA و شناسایی ژن‌های *mecA*، *norA* و *norB* توسط روش PCR

استخراج DNA به روش دستی (فنل کلروفرم) انجام شد. به‌طور خلاصه، به رسوب تهیه‌شده از کشت باکتری‌های MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین، به ترتیب ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز (Tris-Hcl, pH7.4; EDTA 50mM)، ۱۳ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات (SDS 25%) و ۲۰ میکرولیتر از لیزوزیم (50 mg/mL) اضافه نموده و به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شوند. در ادامه ۳ میکرولیتر پروتئیناز K (20 mg/mL) اضافه و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت قرار داده شدند. به دنبال آن ۶۰۰ میکرولیتر محلول فنل-کلروفرم- ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵ تهیه شده) افزوده شد تا یک فاز شیری رنگ یکنواخت تشکیل گردد. سپس با دور ۱۳۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و فاز بالایی (فاز آبی) به لوله‌های جدید منتقل می‌شوند. این مرحله دو بار تکرار شده و به منظور رسوب DNA، هم‌حجم فاز آبی اتانول سرد و خالص به همراه ۰/۱ میکرولیتر استات سدیم (1M) اضافه می‌شود و آن به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفتند. بعد از آن، لوله مورد نظر سانتریفیوژ (۵ دقیقه ۱۳۰۰۰ دور) شده و رسوب حاصله پس از خشک‌کردن و حل کردن در بافر به‌عنوان DNA مورداستفاده قرار گرفت و در نهایت برای تائید صحت استخراج ژنوم از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده شد.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده به عنوان الگو، استخراج‌شده، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر رفت، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول)، ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس (سینا ژن، ایران)، ۱۰/۵ میکرولیتر آب از مقطر دو بار تقطیر انجام گرفت. در ادامه واکنش PCR برای ژن *mecA* با استفاده از پرایمرهای رفت 5′TCCAGATTACAACTTCACCAGG3′ و برگشت 5′CCACTTCATATCTTGTAACG3′ با چرخه دمایی واسرشتگی اولیه (Initial denaturation) در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و واسرشتگی (Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو (Annealing) در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، طویل شدن رشته الگو (Extension) در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵۰ ثانیه و طویل شدن نهایی (Final extension) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام گرفت (۲۲).

جهت تکثیر ژن *norA* از پرایمر norA-F شامل توالی 5′ATCGGTTTAGTAATACCAGTCTTGC3′ و پرایمر norA-R شامل توالی 5′GCGATATAATCATTTGAGATAACGC3′ استفاده گردید (۲۳). برنامه اجرایی چرخه‌های PCR برای ژن *norA* شامل واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه و واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن رشته الگو در دمای ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و طویل شدن نهایی به مدت ۴ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود.

هم‌چنین جهت تکثیر ژن *norB*، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (سینا ژن، ایران)، ۱ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده به‌عنوان الگو، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر رفت، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول) ۱۰/۵ میکرولیتر آب از مقطر دو بار تقطیر انجام گرفت. در ادامه واکنش PCR برای ژن *norB* با استفاده از پرایمرهای رفت 5′AGCGCGTTGTCTATCTTTCC3′ و برگشت 5′GCAGGTGGTCTTGCTGATAA3′ با برنامه دمایی واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه

و واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو در دمای ۵۳ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن رشته الگو در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و طویل شدن نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس در طی ۳۰ سیکل انجام گردید. لازم به ذکر است در کل واکنش‌های PCR، از ژنوم باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ATCC 12228 (فاقد ژن‌های *norA* و *norB*) به‌عنوان کنترل منفی و از DNA باکتری استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 (حاوی ژن‌های *norA* و *norB*) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی و حداقل غلظت مهاری (MIC) سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید

بعد از تعیین سویه‌های MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین، این سویه‌ها جهت تست MIC (Minimum Inhibitory Concentration) موردمطالعه قرار گرفتند. آزمایش MIC بر اساس CLSI به روش رقیق‌سازی در میکروپلیت برای سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید انجام شد. MIC به‌صورت سه بار تکرار با استفاده از روش میکرودایلوشن در پلیت های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. محلول اتیدیوم بروماید (۲-۲۵۰ µg/mL) به داخل چاهک A ریخته و با محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. به چاهک‌های بعدی تا H مقدار ۵۰ میکرولیتر محیط MHB اضافه شد و از چاهک اول به ترتیب ۵۰ میکرولیتر به چاهک‌ها تا H اضافه گردید تا رقت سازی متوالی انجام گیرد. همه چاهک‌ها با مقدار ۵۰ میکرولیتر از کشت میکروبی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با غلظت نیم مک فارلند اضافه شد. مقدار MIC به‌عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری محسوب می‌شود. لازم به ذکر است که جهت تعیین غلظت MIC سیپروفلوکساسین، از غلظت 0.5 to 128 µg/mL و از چاهک حاوی باکتری استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923، فاقد سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید به‌عنوان کنترل منفی و از چاهک حاوی باکتری استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923، سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۲۵).

بررسی فنوتیپی وجود پمپ افلوکس فعال

این تست همانند روش تعیین غلظت MIC انجام گرفت. به طور خلاصه، ابتدا غلظت MIC اتیدیوم بروماید را تعیین کرده و غلظت ۰/۵ مک فارلند از کشت باکتری را به داخل چاهک‌های حاوی غلظت‌های پایین‌تر از MIC اتیدیوم بروماید اضافه شد. به دنبال آن، ترکیب CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) به‌عنوان مهارکننده پمپ افلوکس در غلظت 20 µg/mL اضافه می‌شود. پمپ افلوکس فعال زمانی تشخیص داده می‌شود که MIC اتیدیوم بروماید به همراه CCCP از MIC اتیدیوم بروماید به‌تنهایی کمتر باشد. لازم به ذکر است در یکی از چاهک‌ها، از CCCP به همراه باکتری استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 (مقاوم به سیپروفلوکساسین) به منظور تشخیص اینکه خود CCCP کشنده نیست، به‌عنوان کنترل منفی و از چاهک حاوی باکتری استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923، CCCP و اتیدیوم بروماید به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (۲۵).

تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ (IBM, Armonk, NY, USA) و آزمون مربع کای انجام گرفت. هم‌چنین، مرز معنی‌داری روی $P<0.05$ قرار گرفت.

یافته‌ها

جداسازی و تشخیص سویه‌ها از نمونه‌های بالینی

در این مطالعه در مجموع ۲۵۰ نمونه که از نمونه‌های ادرار، خون، پوست و زخم جداسازی شدند، با استفاده از تست‌های میکروبی رنگ‌آمیزی گرم، محیط مانیتول سالت آگار، محیط بردپارکر، تست کاتالاز، تست کواگولاز، ۵۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شد.

نتایج تست حساسیت میکروبی

نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که ۳۴ ایزوله از ۵۰ ایزوله موردبررسی (۶۸٪) نسبت به آنتی‌بیوتیک متی سیلین مقاوم بودند و به‌عنوان سویه‌های MRSA در نظر گرفته شدند. در این مطالعه ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به

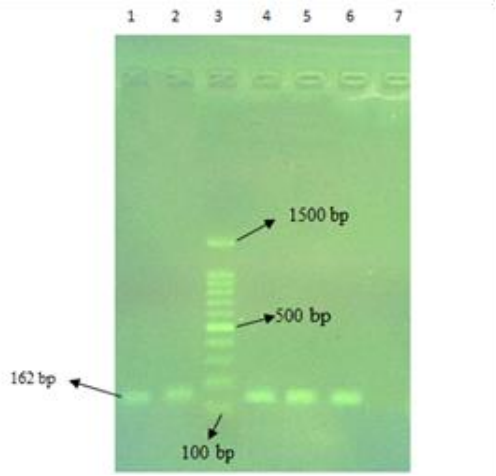
آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۹۸ درصد)، آمپی‌سیلین (۹۰ درصد)، آموکسی سیلین و تری متوپریم (۸۶ درصد)، سفوکسیتین (۶۸ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۷۴ درصد حساس)، وانکومایسین (۱۰۰ درصد حساس) بودند. هم‌چنین مقاومت به وانکومایسین در هیچ‌یک از سویه‌ها مشاهده نشده بود و تمامی سویه‌ها حساس به وانکومایسین بودند. نتایج آنتی بیوگرام سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از نمونه‌های بالینی در جدول ۱ خلاصه‌شده است.

جدول ۱: میزان مقاومت و حساسیت سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

آنتی‌بیوتیک	سویه‌های مقاوم		سویه‌های متوسط		سویه‌های حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
سفوکسیتین	۳۴	۶۸	۰	۰	۱۶	۳۲
سیپروفلوکساسین	۱۲	۲۴	۱	۲	۳۷	۷۴
پنی‌سیلین	۴۹	۹۸	۰	۰	۱	۲
اریترومایسین	۲۸	۵۶	۹	۱۸	۱۳	۲۶
تری متوپریم	۴۳	۸۶	۳	۶	۴	۸
آمیکاسین	۲۱	۴۲	۳	۶	۴	۸
آمپی‌سیلین	۴۵	۹۰	۰	۰	۵	۱۰
جنتامایسین	۲۰	۴۰	۳	۶	۲۷	۵۴
آموکسی سیلین	۴۳	۸۶	۰	۰	۷	۱۴
کلرامفنیکل	۴	۸	۷	۱۴	۳۹	۷۸
کلیندامایسین	۲۳	۴۶	۶	۱۲	۲۱	۴۲

نتایج تکثیر ژن *mecA*

برای بررسی مولکولی وجود ژن مقاومت به متی سیلین از تکثیر ژن *mecA* استفاده شد و با توجه به طراحی پرایمرها انتظار باند ۱۶۲ جفت باز وجود داشت (شکل ۱).

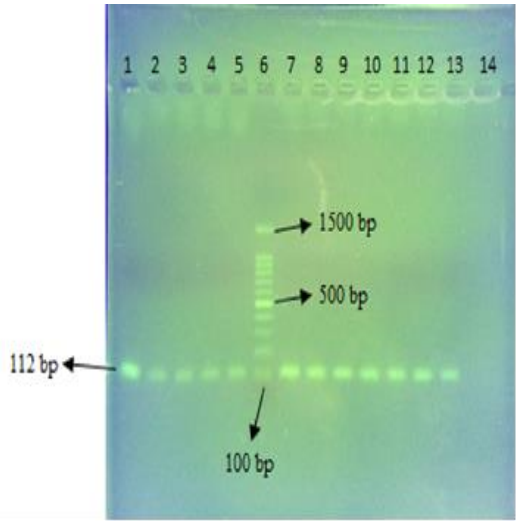


شکل ۱: نتایج تکثیر ژن *mecA* در سویه‌های مقاوم به متی سیلین.
شماره ۱ تا ۲، ۴، ۵: نمونه‌های مقاوم به متی سیلین، ۷: کنترل منفی، ۶: کنترل مثبت، ۳: مارکر DNA 100bp +

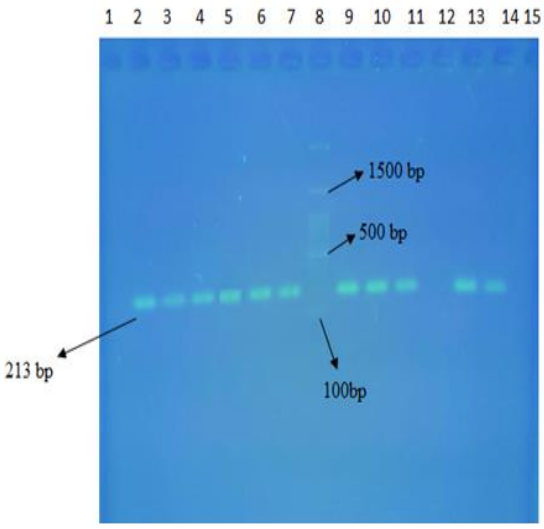
نتایج نشان داد که توزیع ژن *mecA* در نمونه‌های استافیلوکوکی در ۶۸ درصد نمونه‌ها (۳۴ نمونه) وجود داشت. لازم به ذکر است میزان شیوع ژن *mecA* در نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از نمونه‌های زخم بیشتر از سایر نمونه‌ها بود، به طوری که از ۳۰ نمونه، ۱۵ نمونه متعلق به نمونه‌های زخم بود ($P<0.032$).

نتایج تکثیر ژن *norA*

به منظور بررسی وجود ژن پمپ افلوکس *norA* در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده، از پرایمرهای اختصاصی این ژن استفاده شد و انتظار باند ۱۱۲ bp وجود داشت که نتیجه آن در ژل الکتروفورز مشاهده شد (شکل ۲). ژن *norA* در تمامی سویه‌های MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین دیده شد (۱۲ نمونه). لازم به ذکر است که ارتباط معنی‌داری بین وجود ژن *norA* و ژن *mecA* در بین سویه‌ها وجود نداشت ($P>0.05$).



شکل ۲: نتایج تکثیر ژن *norA* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین. شماره ۱ تا ۵ و ۷ تا ۱۲: نمونه‌های مقاوم به فلوکساسین، ۱۳: کنترل مثبت، ۱۴: کنترل منفی، ۶: مارکر DNA 100 bp+



شکل ۳: نتایج تکثیر ژن *norB*. چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک ۲: کنترل مثبت، چاهک‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۹، ۱۰، ۱۱: نمونه‌های مثبت، ۸: ماکر $100\ bp^{+}$، ۱۲ و ۱۵: نمونه‌های منفی

نتایج تکثیر ژن *norB*

تکثیر ژن پمپ افلوکس *norB* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، وجود باند ۲۱۳ bp را در ژل الکتروفورز نشان داد (شکل ۳). ژن *norB* در ۸۳ درصد از نمونه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین وجود داشت (۱۰ نمونه) که بین وجود ژن *norA* و *norB* ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($P<0.05$).

بررسی MIC و مطالعه فنوتیپی پمپ افلوکس

نتایج حاصل از MIC و فعالیت CCCP در جدول ۲ آمده است. همان‌طور که مشخص است MIC سیپروفلوکساسین در سویه‌ها از محدوده ۲۵۰-۱۵/۶۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و در مجاورت مهارکننده پمپ افلوکس CCCP، میزان MIC سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید کاهش‌یافته است که نشان‌دهنده فعال بودن پمپ افلوکس در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین می‌باشد.

جدول ۲: تعیین MIC سیپروفلوکساسین، اتیدیوم بروماید، CCCP و ترکیب آنها در سویه های MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین

Isolates	MIC (µg/mL)			
	Ciprofloxacin	EtBr	EtBr + CCCP	Ciprofloxacin +CCCP
۷	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵
۹	۱۵/۶۲	۷/۸۱	۳/۹	۷/۸۱
۳۱	۳۱/۲۵	۷/۸۱	۷/۸۱	۳۱/۲۵
۳۲	۶۲/۵	۱۵/۶	۳/۹	۳۱/۲۵
۳۳	۱۲۵	۶۲/۵	۱۵/۶۲	۶۲/۵
۳۴	۲۵۰	۱۲۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵
۴۳	۳۱/۲۵	۱۵/۶۲	۷/۸	۱۵/۶۲
۴۵	۳۱/۲۵	۷/۸۱	۱/۹۵	۱۵/۶۲
۴۶	۱۵/۶۲	۷/۸۱	۳/۹	۳/۹
۴۷	۶۲/۵	۱۵/۶۲	۷/۸۱	۱۵/۶
۴۸	۳۱/۲۵	۷/۸۱	۷/۸۱	۷/۸۱
۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
ATCC 25923	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۷/۸۱	۳۱/۲۵

بحث

در این مطالعه ۲۰ درصد از نمونه‌های بالینی جمع‌آوری‌شده آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند و نتایج حاصل از حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که بیشترین مقاومت مربوط به پنی‌سیلین (۹۸ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به وانکومایسین بود. هم‌چنین ۶۸ درصد سویه‌ها مقاوم به متی سیلین و ۲۴ درصد سویه‌ها مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. مطالعات مختلفی جهت بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام‌شده است.

مطالعه Zamani و همکارانش در سال ۱۳۸۴ بر روی ۷۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که ۵۰ درصد نمونه‌های مذکور نسبت به سفوکسیتین مقاوم بوده (MRSA) و بررسی الگوی آنتی‌بیوتیکی مشخص گردید که مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا در میان سویه‌های مقاوم به متی سیلین نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد)، تتراسایکلین (۷۴/۲ درصد)، کوتریموکسازول (۶۸/۵ درصد)، اریترومایسین (۶۸/۵ درصد) و سفتازیدیم (۵۱/۴ درصد) مشاهده گردید (۲۶). مطالعه Moradi و همکاران در سال ۱۳۹۰ بر روی ۱۰۴ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که بیشترین میزان حساسیت نسبت به وانکومایسین (۹۶/۲٪)، کلرامفنیکل (۸۸/۲٪)، ریفامپین (۸۱/۷٪) بوده و میزان مقاومت سویه‌ها به سفوکسیتین (۴۰/۴٪) بودند (۲۷). در مطالعه حاضر میزان مقاومت به متی سیلین ۶۸٪ گزارش شد و مقایسه دو مطالعه فوق و سایر گزارش‌ها صورت گرفته در زمینه بررسی شیوع سویه‌های مقاوم به متی سیلین با این مطالعه افزایش مقاومت به متی سیلین را نشان می‌دهد که یکی از دلایل افزایش مقاومت به متی سیلین در سال‌های اخیر ممکن است به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. بالا بودن میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به متی سیلین در بین سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجادکننده عفونت‌های بالینی پیشنهاد کننده بررسی مکانیسم‌های دخیل در ایجاد مقاومت و بررسی فعالیت ضد میکروبی داروهای جدید در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند به روند درمان مؤثر این عفونت‌ها کمک نماید.

همان‌طور که اشاره شد، سویه‌های MRSA یکی از پاتوژن های مهم بیمارستانی می‌باشد که به سرعت در سرتاسر جهان شیوع پیداکرده‌اند. این ارگانیسم به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم شده است و جایگزین‌های کمی برای درمان آن وجود دارد (۲۸). یکی از جایگزین‌های درمانی، آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین از خانواده کینولون‌ها می‌باشد اما مطالعات جدید نشان‌دهنده افزایش مقاومت به این آنتی‌بیوتیک نیز بوده است. در این مطالعه از میان ۳۴ سویه MRSA، ۱۲ سویه مقاوم به سیپروفلوکساسین (۲۴٪) بودند که نشان‌دهنده شروع مقاومت به سیپروفلوکساسین در میان سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* باشد. در سال‌های اخیر مقاومت بالا به کینولون‌ها در سویه‌های MRSA گزارش‌شده است. در ایالات‌متحده در نیویورک، شیوع سویه‌های MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین سه ماه بعد از استفاده از سیپروفلوکساسین ایجادشده است (۲۹).

مکانیسم مقاومت به کینولون‌ها در باکتری‌ها متفاوت است. در باکتری *اشرشیا کلی*، مکانیسم مقاومت به کینولون ها ناشی از تغییر ساختار آنزیمی DNA ژیراز می‌باشد (۳۰). همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد، یکی از مکانیسم‌های مقاومت به سیپروفلوکساسین در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، وجود پمپ‌های افلوکس می‌باشد. این پمپ‌ها باعث دفع و تراوش طیف گسترده‌ای از مواد شامل آنتی‌بیوتیک‌ها، ترکیبات آنتی‌سپتیک، رنگ‌ها و دترجنت ها می‌گردند؛ بنابراین در ایجاد مقاومت چند دارویی نقش بسزایی دارند.

بررسی‌های مختلفی در زمینه شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی پمپ‌های افلوکس در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شده است. در مطالعه حاضر، به‌منظور بررسی مقاومت به سیپروفلوکساسین و رابطه‌اش با پمپ افلوکس، غربال‌گری سویه‌ها به منظور وجود ژن *norA* و عملکرد آن به ترتیب توسط روش‌های PCR و MIC اتیدیوم بروماید در مجاورت ماده مهارکننده پمپ افلوکس CCCP انجام گرفت. ژن *norA* در تمام سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین وجود داشت. به‌طورکلی، ژن *norA* در کروموزوم واقع‌شده است و در میان سویه‌ها بسیار محافظت شده است. نتایج مشابه با نتایج حاضر در مطالعات دیگر نیز گزارش‌شده است. Pourmand و همکارانش در سال ۲۰۱۴، وجود ژن پمپ افلوکس *norA* و بیان آن در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با روش Real-time PCR مورد بررسی قراردادند. نتایج این مطالعه نشان داد که ژن *norA* در تمامی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین وجود دارد و بیان ژن آن در مجاورت بیوساید هگزاهیدروکینولون افزایش می‌یابد (۳۱).

در مطالعه دیگری، Saiful و همکارانش در سال ۲۰۰۸ پمپ‌های افلوکس norA را در سویه‌های MRSA موردمطالعه قراردادند که از ۱۹ سویه MRSA جداسازی شده، ۱۶ سویه دارای ژن *norA* هستند و تمامی سویه‌ها دارای پمپ افلوکس فعال بودند (۳۲).

در مطالعه ما نقش پمپ افلوکس norA و norB که از خانواده MFS که در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد، به صورت فنوتیپی و ژنوتیپی مورد مطالعه قرار گرفت. به طوری که تمام سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای ژن *norA* و ۸۳ درصد از ایزوله‌ها دارای ژن *norB* بودند و ازنظر فنوتیپی تمامی سویه‌ها دارای پمپ افلوکس فعال بودند که نشان دهنده تأیید وجود ژن‌های پمپ افلوکس در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین می‌باشد.

برای تعیین اینکه آیا مقاومت به سیپروفلوکساسین ناشی از پمپ افلوکس است یا خیر، فعالیت پمپ افلوکس توسط بررسی MIC سیپروفلوکساسین، در حضور و عدم حضور مهارکننده پمپ افلوکس CCCP انجام شد. به‌منظور ارزیابی بیشتر نقش پمپ افلوکس در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین، از اتیدیوم بروماید در حضور و عدم حضور CCCP استفاده شد. همان‌طور که در بخش نتایج اشاره شد، در حضور CCCP میزان MIC اتیدیوم بروماید کاهش می‌یابد که منطبق با نتایج سایر مطالعات می‌باشد که نشان‌دهنده این موضوع است که پمپ افلوکس مسئول ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین است.

Huet و همکارانش در سال ۲۰۰۸، تعداد ۹ سویه MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین را ازنظر وجود و بیان پمپ‌های افلوکس موردبررسی قراردادند. در این مطالعه ابتدا این ژن‌ها با استفاده از روش PCR تشخیص داده شد و بیان این ژن‌ها در مجاورت غلظت‌های پایین بیوسایدها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که پمپ‌های افلوکس norA و norB در تمامی سویه‌ها وجود داشته و بیان آن‌ها در مجاورت بیوسایدها افزایش می‌یابد (۳۳). مقایسه نتایج این مطالعه بامطالعه حاضر نشان می‌دهد که ژن *norA* و *norB* در بیشتر سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین وجود دارد و احتمالاً مقاومت سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را به سیپروفلوکساسین ایجاد می‌کند. در سویه‌های فاقد ژن *norB* ولی مقاوم به سیپروفلوکساسین، احتمالاً مکانیسم‌های دیگری از قبلی غیرفعال سازی دارو، تغییر جایگاه هدف همراه با سایر پمپ‌های افلوکس بر ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین دخیل است.

Patel و همکارانش در ۲۰۱۰، فعالیت پمپ افلوکس را در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از اتیدیوم بروماید فعالیت مورد مطالعه قراردادند. نتایج این مطالعه نشان داد که این روش دارای اختصاصیت ۹۲٪ برای تشخیص فعالیت پمپ افلوکس می‌باشد و فعالیت آن مرتبط با بیان ژن *norA* می‌باشد (۳۴). Costa و همکارانش در سال ۲۰۱۳، پمپ‌های افلوکس را در ۵۲ سویه مقاوم به سیپروفلوکساسین با استفاده از اتیدیوم بروماید مورد مطالعه قراردادند. نتایج این مطالعه نشان داد که پمپ‌های افلوکس نقش مهمی را در کاهش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و هم‌چنین بیوسایدها دارد (۳۵). هم‌چنین در مطالعه ما ارتباط بین تست فنوتیپی (اتیدیوم بروماید) و ژنوتیپی (وجود ژن‌های پمپ افلوکس) پمپ افلوکس همانند دو مطالعه فوق نشان داده شد به طوری که تمامی سویه‌هایی که از نظر ژنوتیپی حاوی ژن‌های پمپ افلوکس بودند از نظر فنوتیپی نیز دارای پمپ افلوکس فعال بودند.

نتایج این مطالعه نشان داد که پمپ افلوکس norA و norB یکی از مکانیسم‌های مهم مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های فلورکینولون مانند سیپروفلوکساسین می‌باشد، اما نباید نقش سایر عوامل و مکانیسم‌های دخیل در مقاومت نادیده گرفته شود. در نهایت پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتر برای تولید و گسترش مولکول‌های مهارکننده افلوکس انجام بگیرد. توسعه مهارکننده‌های پمپ افلوکس، امکان کنترل سویه‌های مقاوم حاوی پمپ‌های افلوکس را ایجاد می‌کند. هم‌چنین پیشنهاد می‌شود بیان ژن‌های پمپ افلوکس در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با روش‌های مولکولی مانند Real-time PCR موردمطالعه قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از تلاش همکاران دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بخصوص جناب آقای حسن نور بازرگان و تمام کسانی که در انجام این پروژه همکاری نموده‌اند، تشکر و قدرانی می‌نماییم.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Corredor A, Luligo E, Moncayo O, Santacruz I, Álvarez A. Relationship between super antigenicity, antimicrobial resistance and origin of Staphylococcus aureus isolated. Colomb Med (Cali) 2016;47(1):15-20.
2. Hefzy EM, Hassan GM, AbdReheem F. Detection of panton-valentine leukocidin-positive methicillin-resistant Staphylococcus aureus nasal carriage among Egyptian health care workers. Surg Infect (Larchmt) 2016;17(3):369-75 .
3. Osman KM, Amer AM, Badr JM, Helmy NM, Elhelw RA, Orabi A, Bakry M, Saad AS. Antimicrobial resistance, biofilm formation and mecA characterization of methicillin-susceptible S. aureus and Non-S. aureus of beef meat origin in Egypt. Front Microbiol 2016;7(222):1-12 .
4. Jeremić LP, Kapulica NK, Ristanović E, Josić D, Lepsanović Z. Prevalence of Panton-Valentine leukocidin genes in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the district of Pomoravlje. Vojnosanit Pregl 2016;73(3):256-60.
5. Gómez P, Lozano C, Benito D, Estepa V, Tenorio C, Zarazaga M, Torres C. Characterization of Staphylococci in urban wastewater treatment plants in Spain, with detection of methicillin resistant Staphylococcus aureus ST398. Environ Pollut 2016; 212:71-6.
6. Firsov AA, Smirnova MV, Strukova EN, Vostrov SN, Portnoy YA, Zinner SH. Enrichment of resistant Staphylococcus aureus at ciprofloxacin concentrations simulated within the mutant selection window: bolus versus continuous infusion. Int J Antimicrob Agents 2008;32(6):488-93.
7. Mustapha M, Bukar-Kolo YM, Geidam YA, Gulani IA. Phenotypic and genotypic detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in hunting dogs in Maiduguri metropolitan, Borno State, Nigeria. Vet World 2016;9(5):501-6.
8. Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. Ann Med 2007;39: 162–176.
9. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. Drugs 2004;64; 159–204.
10. Kosmidis C, Schindler PL, Jacinto D, Patel K, Bains SM, Seo GW. Expression of multidrug resistance efflux pump genes in clinical and environmental isolates of Staphylococcus aureus. Int J Antimicrob Agents 2012; 40:204–209.
11. Paulsen IT, Lewis K. Microbial Multidrug Efflux. Horizon Scientific 2002; 3(2):143-4.
12. Mulet X, Moyá B, Juan C, Macià MD, Pérez JL, Blázquez J, Oliver A. Antagonistic interactions of Pseudomonas aeruginosa antibiotic resistance mechanisms in planktonic but not biofilm growth. Antimicrob Agents Chemother 2011;55(10):4560-8.
13. Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. Virulence 2013;1;4(3):223-9.
14. De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K, Iglewski BH, Storey DG. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2001;45(6):1761-70.
15. Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa and related organisms. J Mol Microbiol Biotechnol 2001;3(2):255-64.
16. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, et al. Nucleotide sequence and characterization of the Staphylococcus aureus norA gene, which confers resistance to quinolones. J Bacteriol 1990;172:6942–9.
17. Noguchi N, Okada H, Narui K, et al. Comparison of the nucleotide sequence and expression of norA genes and microbial susceptibility in 21 strains of Staphylococcus aureus. Microb Drug Resist 2004;10:197–203.
18. Sierra JM, Ruiz J, de Anta MTJ, et al. Prevalence of two different genes encoding NorA in 23 clinical strains of Staphylococcus aureus. J Antimicrob Chemother 2000;46:145–6.
19. Truong-Bolduc QC, Dunman PM, Strahilevitz J, et al. MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in Staphylococcus aureus. J Bacteriol 2005;187: 2395–405.
20. Motallebi M, Jabalameli F, Asadollahi K, Taherikalani M, Emaneini M. Spreading of genes encoding enterotoxins, haemolysins, adhesin and biofilm among methicillin resistant Staphylococcus aureus strains with Staphylococcal cassette chromosome mec type IIIA isolated from burn patients. Microb Pathog 2016;26; 97:34-37 .[in persion]
21. Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. CLSI, Wayne, Pa. M100-S16, 26, no. 3. 2015.
22. Wielders CL, Fluit AC, Brisse S, Verhoef J, Schmitz FJ. mecA gene is widely disseminated in Staphylococcus aureus population. J Clin Microbiol 2002;40(11):3970-5.

23. Costa SS, Falcão C, Viveiros M, Machado D, Martins M, Melo-Cristino J, Amaral L, Couto I. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of Staphylococcus aureus. BMC Microbiol 2011;27:11:241.

24. Ding Y, Onodera Y, Lee JC, et al. NorB, an efflux pump in Staphylococcus aureus strain MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses. J Bacteriol 2008;190(21):7123-9.

25. Ardebili A, Lari AR, Beheshti M, Lari ER. Association between mutations in gyrA and parC genes of Acinetobacter baumannii clinical isolates and ciprofloxacin resistance. Iran J Basic Med Sci 2015;18(6):623-6. [in persion]

26. Zamani A, Sadeghian S, Ghaderkhani J, Alikhani MY, Najafimosleh M, Taghi GoodarziM, et al. Detection of methicillin-resistance (mec-A) gene in Staphylococcus aureus strains by PCR and determination of antibiotic susceptibility. Ann microbiol 2007;57(2):273-6. [in persion]

27. Moradi N, Javadpour S, Karmostaji A. Reduced sensitivity of Staphylococcus aureus to vancomycin. Hormoz Uni of Med Sciences 2011;15(3):169-77. [in persion]

28. Ghosh S, Banerjee M. Methicillin resistance & amp; inducible clindamycin resistance in Staphylococcus aureus. Indian J Med Res. 2016;143(3):362-4.

29. Motallebi M, Jabalameli F, Asadollahi K, Taherikalani M, Emaneini M. Spreading of genes encoding enterotoxins, haemolysins, adhesin and biofilm among methicillin resistant Staphylococcus aureus strains with Staphylococcal cassette chromosome mec type IIIA isolated from burn patients. Microb Pathog 2016;26:97:34-37. [in persion]

30. Gruger T, Nitiss JL, Maxwell A, Zechiedrich EL, Heisig P, Seeber S, Pommier Y, Strumberg D. A mutation in Escherichia coli DNA gyrase conferring quinolone resistance results in sensitivity to drugs targeting eukaryotic topoisomerase II. Antimicrob Agents Chemother 2004;48(12):4495-504.

31. 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 Med Iran 2014;52(6):424-9. [in persion]

32. 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). J Basic Microbiol 2008; 48(4): 245-51.

33. Huet AA, Raygada JL, Mendiratta K, Seo SM, Kaatz GW. Multidrug efflux pump overexpression in Staphylococcus aureus after single and multiple in vitro exposures to biocides and dyes. Microbiol 2008;154(Pt 10):3144-53.

34. Patel D, Kosmidis C, Seo SM, Kaatz GW. Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 2010;54(12):5070-3.

35. Costa SS, Junqueira E, Palma C, Viveiros M, Melo-Cristino J, Amaral L, Couto I. Resistance to antimicrobials mediated by efflux pumps in Staphylococcus aureus. Antibiotics (Basel) 2013;13:2(1):83-99.