Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Frequency and analysis of gene expression of norA and norB efflux pump in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* using Ethidium bromide and Real Time PCR

Amir Mirzaie[1*], Hassan Noorbazargan[2], Kamal Paseban[3], Seyed Ataollah Sadat Shandiz[4]

[1]Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran
[2]Department of Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Department of Genetic, Biology Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.
[4]Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

*Corresponding author; E-mail: A.mirzaie@riau.ac.ir

Received: 4 January 2017 Accepted: 12 February 2017 First Published online: 17 January 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 February-March; 40(6):64-73

Abstract

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

Methods: In this experimental study**,** a total of 250 clinical samples were collected from different hospitals in Tehran and *S. aureus* isolates were identified. Antimicrobial susceptibility patterns were determined by disk diffusion method based on CLSI standard. The presence of *norA* and *norB* efflux pump genes in ciprofloxacin isolates were detected using PCR method. Finally, active efflux pump was evaluating using MIC of ciprofloxacin-Ethidium bromide and Real Time PCR method.

Results: Among 250 clinical samples, 50 *S. aureus* isolates were recovered and the results of antibiotic susceptibility tests show that 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% in isolates, respectively. Real Time PCR results show that more resistant strains had increased expression in *norA and norB* efflux genes.

Conclusion: 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 suggestion of an effective treatment model for the *S. aureus* infections.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Efflux pump, *nor A, norB,* Real Time PCR.

How to cite this article: Mirzaie A, Noorbazargan H, Paseban K, Sadat Shandiz S A. [Frequency and analysis of gene expression of norA and norB efflux pump in clinical isolates of Staphylococcus aureus using Ethidium bromide and Real Time PCR]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 February-March;40(6):64-73. Persian.

© 2019 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

فراوانی و آنالیز بیان ژن های پمپ افلاکس *norA* و *norB* در سویه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط روش اتیدیوم بروماید و Real Time PCR

امیر میرزایی[1*]، حسن نوربازرگان[2]، کمال پاسبان[3]، سید عطا اله سادات شاندیز[4]

[1]گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران.
[2]گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران.
[3]گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات بیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.
[4]گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[*]نویسنده مسئول؛ ایمیل: A.mirzaie@riau.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۵ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۴ انتشار برخط: ۱۳۹۷/۱۰/۲۷
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۷ بهمن و اسفند؛ ۴۰(۶):۶۴-۷۳

چکیده

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

روش‌کار: در این مطالعه تجربی، تعداد ۲۵۰ نمونه بالینی از بیمارستان‌های مختلف شهر تهران جمع‌آوری شد و ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شدند. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی بر اساس روش دیسک دیفیوژن و استاندارد CLSI انجام گرفت. همچنین، حضور ژن‌های *norA* و *norB* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با روش PCR مشخص گردید. در نهایت پمپ‌های افلاکس از نظر فعال بودن توسط MIC سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید و Real Time PCR بررسی شد.

یافته‌ها: از میان ۲۵۰ نمونه بالینی، تعداد ۵۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شد و نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که ۶۸٪ از نمونه‌ها (۳۴ نمونه) مقاوم به متی‌سیلین و از میان اینها ۲۴٪ (۱۲ نمونه) مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. فراوانی ژن‌های *norA* و *norB* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین به ترتیب ۱۰۰٪ و ۸۳٪ بودند و هم چنین سویه‌های مقاوم‌تر میزان بیان بالاتری از ژن *norA* و *norB* داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که پمپ‌های افلاکس *norA* و *norB* در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین نقش اساسی دارند و بررسی حضور این ژن ها می‌تواند در پیشنهاد الگوی درمانی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس حائز اهمیت باشد.

کلید واژه‌ها: *استافیلوکوکوس اورئوس*، پمپ افلاکس، *norA*، *norB*، Real Time PCR.

نحوه استناد به این مقاله: میرزایی ا، نوربازرگان ح، پاسبان ک، سادات شاندیز س ع. فراوانی و آنالیز بیان ژن‌های پمپ افلاکس *norA* و *norB* در سویه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط روش اتیدیوم بروماید و Real Time PCR. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۷؛ ۴۰(۶):۶۴-۷۳

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری پاتوژن از خانواده میکروکوکاسه است که به عنوان یک باکتری بیماری زای شایع در مراقبت‌های بیمارستانی در سرتاسر جهان است. قسمت قدامی بینی منبع اولیه *استافیلوکوکوس اورئوس* در بین افراد بزرگسال و کودکان می‌باشد و ۲۰ تا ۴۰٪ افراد سالم جامعه حامل این باکتری می‌باشند که به عنوان عامل اصلی عفونت‌های استافیلوکوکی به حساب می‌آید (۱). این باکتری دامنه وسیعی از بیماری‌ها از قبیل پنومونی، عفونت‌های پوستی، اندوکاردیت، استئومیلیت و بسیاری از بیماری‌های دیگر را بوجود می‌آورد (۲). *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) یکی از عوامل فرصت طلب بیماری‌زای بیمارستانی می‌باشد و مقاومت به متی‌سیلین از طریق تولید یک پروتئین اختصاصی اتصالی به پنی‌سیلین به نام PBP2a ایجاد می‌شود که توسط ژن *mecA* رمزگذاری می‌شود. سویه‌های MRSA تا امروزه به بسیاری از عوامل ضد باکتریایی مقاوم شده‌اند و این امر موجب محدودیت‌های درمان بیماری‌های ناشی از این باکتری شده است (۳). داروهای فلوروکینولون مانند سیپروفلوکساسین یکی از داروهای مناسب و جایگزین برای درمان بیماری‌های ناشی از سویه‌های MRSA *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد (۴). با این وجود، به دنبال تجویز این دارو جهت درمان این باکتری‌ها، مقاومت به این آنتی‌بیوتیک نیز رخ داده است به‌طوری که در برخی از موارد میزان مقاومت به ۱۰۰٪ رسیده است (۵). مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* متفاوت است که یکی از مکانیسم‌ها ممانعت از تجمع دارو درون سلول به وسیله سیستم‌های افلاکس می‌باشد. پمپ‌های افلاکس، مواد سمی مانند آنتی‌بیوتیک را به محیط خارج پمپ می‌کنند (۸-۶) و به طور کلی پمپ‌های افلاکس باکتریایی بر اساس ترادف و شباهت اسیدهای آمینه در پنج گروه اصلی قرار می‌گیرند (۱۱-۹). پمپ‌های افلاکس از نظر بالینی بطور موثری در ارتباط با گروه‌های Nodulation Division (RND) یا Major Facilitator Super Family (MFS) می‌باشند که با آزادسازی انرژی نیرو محرکه پروتون در خارج کردن آنتی‌بیوتیک نقش دارند (۱۲). سیستم افلاکس MFS یکی از سیستم‌های مهم افلاکس در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد که پمپ افلاکس norA یکی از پمپ‌های مهم این خانواده است و مطالعات مختلفی نشان می‌دهد که norA می‌تواند ترکیبات مختلفی مانند فلوروکینولون‌های هیدروفوب از قبیل نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین، اتیدیوم بروماید و ترکیبات چهار ظرفیتی آمونیوم را به سمت بیرون پمپ کند (۱۳). 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 فلوروکینولون‌ها با افزایش بیان پمپ افلاکس norA ارتباط دارد (۱۴). پمپ افلاکس norB نیز یکی دیگر از پمپ‌های MFS در *استافیلوکوکوس اورئوس* و دارای ۴۶۳ اسیدآمینه می‌باشد و باعث ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک های فلوروکینولون و بیوسایدها می‌شود و مطالعات نشان می‌دهد که این پمپ در افزایش بیماری‌زایی این باکتری نیز حایز اهمیت است (۱۵). 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 فرصت طلب *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد که به هر دو آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین و سیپروفلوکساسین مقاوم شده‌اند (۱۶). از آنجایی که تاکنون مطالعات کمی در مورد نقش پمپ افلاکس در مقاومت بخشی به سیپروفلوکساسین در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایران انجام شده است، این مطالعه با هدف تشخیص مولکولی وجود ژن‌های پمپ افلاکس *norA* و *norB* بیان آن‌ها در سویه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* و ارزیابی نقش آن در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین انجام گرفت.

روش‌کار

این مطالعه تجربی از فروردین تا تیر ماه ۱۳۹۵ با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق انجام گرفت، بطوریکه در مجموع تعداد ۲۵۰ نمونه بالینی مختلف نظیر زخم، خلط، ادرار، مایع نخاعی و مایع مفصل طی ۴ ماه از بیمارستان‌های مختلف شهر تهران به روش تصادفی جمع‌آوری گردید. ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از آزمایش‌های کاتالاز، رنگ آمیزی گرم، کواگولاز، تخمیر مانیتول و DNase تشخیص قطعی داده شدند. در نهایت از تمامی سویه‌ها در محیط نوترینت براث حاوی ۱۵٪ گلیسرول کشت ذخیره تهیه و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگه‌داری شد. پس از حصول اطمینان از شناسایی و تایید سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، حساسیت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف با روش دیسک دیفیوژن بر اساس استاندارد CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) مورد بررسی قرار گرفت (۲۱). حساسیت جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوکسیتین (۱۰ میکروگرم)، ونکومایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، پنی‌سیلین (۱۰ واحد)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، تری‌متوپریم (۲۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۱۵ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، آموکسی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، کلرامفنیکول (۳۰ میکروگرم) و کلیندامایسین (۲ میکروگرم) (MAST, UK) در محیط کشت Muller Hinton agar (مرک،

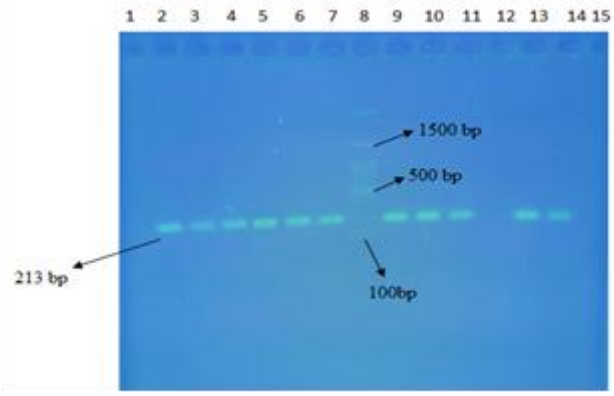
آلمان) انجام گرفت. لازم به ذکر است که جهت تشخیص مقاومت به متی‌سیلین (MRSA)، از دیسک آنتی‌بیوتیکی سفوکسیتین استفاده شد (۱۷). در تمامی انجام آزمایش‌ها، سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۳۳۹۵۱ به عنوان کنترل مثبت مقاوم به متی‌سیلین (حاوی ژن *mecA*) و از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۳ به عنوان کنترل مثبت مقاوم به سیپروفلوکساسین (حاوی ژن *norA* و *norB*) و از *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* ATCC ۱۲۲۲۸ به عنوان کنترل منفی استفاده شد. استخراج DNA به روش دستی (فنل کلروفرم) انجام شد. بطور خلاصه، به رسوب تهیه شده از کشت باکتری‌های MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین، به ترتیب ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز (Tris-Hcl, pH7.4; EDTA)، ۱۳ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات (۲۵٪ SDS)، ۳ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰mg/ml) اضافه شده و آن را در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. به دنبال آن ۶۰۰ میکرولیتر محلول فنل- کلروفرم – ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵ تهیه شده) افزوده تا یک فاز شیری رنگ یکنواخت تشکیل شود. سپس با دور ۱۳۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و فاز بالایی (فاز آبی) به لوله‌های جدید منتقل شد. این مرحله دوبار تکرار شده و به منظور رسوب DNA، هم حجم فاز آبی اتانول سرد و خالص به همراه ۰/۱ میکرولیتر استات سدیم (1M) اضافه کرده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از آن، لوله مورد را سانتریفیوژ (۵ دقیقه ۱۳۰۰۰ دور) نموده و رسوب حاصله را پس از خشک کردن و حل کردن در بافر به عنوان DNA مورد استفاده قرار گرفت و در نهایت برای تائید صحت استخراج ژنوم از الکتروفورز ژل آگاروز ۱٪ استفاده شد. واکنش PCR برای ژن mecA در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده به عنوان الگو، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر رفت (۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول)، ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس (سیناژن، ایران)، ۱۰/۵ میکرولیتر آب از مقطر دو بار تقطیر انجام گرفت. در ادامه واکنش PCR برای ژن *mecA* با استفاده از پرایمرهای F TCCAGATTACAACTTCACCAGG و R CCACTTCATATCTTGTAACG (۱۸)، ژن *norA* با پرایمرهای F ATCGGTTTAGTAATACCAGTCTTGC R GCGATATAATCATTTGAGATAACGC (۱۹) و ژن norB با پرایمرهای F AGCGCGTTGTCTATCTTTCC R GCAGGTGGTCTTGCTGATAA تکثیر داده شدند (۲۰). لازم به ذکر است برنامه دمایی مورد استفاده شده در جدول ۱ انجام گرفت.

همچنین برای تکثیر ژن *norA* و *norB* از پرایمرها و برنامه زمانی ذکر شده در جدول ۱ استفاده شد بطوری که واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (سیناژن، ایران)، ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده به عنوان الگو، ۵ پیکومول از پرایمر رفت و برگشت، ۱۰/۵ میکرولیتر آب از مقطر دو بار تقطیر انجام گرفت. بعد از تعیین سویه‌های MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین، این سویه‌ها جهت تست MIC (Minimum Inhibitory Concentration) مورد مطالعه قرار گرفتند. آزمایش MIC بر اساس CLSI به روش رقیق‌سازی در میکروپلیت برای سیپروفلوکساسین، اتیدیوم بروماید انجام شد. MIC به صورت سه بار تکرار با استفاده از روش میکرودایلوشن در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. محلول اتیدیوم بروماید را به داخل چاهک A ریخته و با محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) تا حجم ۱۰۰ میکرولیتر می‌رسانیم. به چاهک‌های بعدی تا H مقدار ۵۰ میکرولیتر محیط MHB اضافه می‌کنیم و از چاهک اول به ترتیب ۵۰ میکرولیتر به چاهک ها تا H اضافه می‌کنیم تا رقت سازی متوالی انجام گیرد (۲۵۰ µg/ml-۲). همه چاهک‌ها با مقدار ۵۰ میکرولیتر از کشت میکروبی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با غلظت نیم مک فارلند اضافه می‌کنیم. مقدار MIC به عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری محسوب می‌شود. لازم به ذکر است که جهت تعیین غلظت MIC سیپروفلوکساسین، از غلظت ۱ تا ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر و از چاهک حاوی باکتری استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC۲۵۹۲۳، فاقد سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید به عنوان کنترل منفی و از چاهک حاوی باکتری استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC۲۵۹۲۳، سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۲۱). این تست همانند روش تعیین غلظت MIC انجام شد؛ بطور 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 می‌کنیم. به دنبال آن، ترکیب CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) به عنوان مهارکننده پمپ افلاکس در غلظت ۲۰ µg/ml اضافه می‌شود. پمپ افلاکس فعال زمانی تشخیص داده می‌شود که MIC اتیدیوم بروماید به همراه CCCP از MIC اتیدیوم بروماید به تنهایی کمتر باشد. لازم به ذکر است در یکی از چاهک‌ها، از CCCP به همراه باکتری استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۳ (مقاوم به سیپروفلوکساسین) به منظور تشخیص اینکه خود CCCP کشنده نیست، به عنوان کنترل منفی و از چاهک حاوی باکتری استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۳، CCCP و اتیدیوم بروماید به عنوان کنترل مثبت استفاده کردیم (۲۲). جهت استخراج RNA، سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت مولر هینتون براث در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در مجاورت غلظت sub MIC از سیپروفلوکساسین کشت دادند. به

دنبال آن، استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA (کیاژن، امریکا) بر طبق دستورالعمل انجام گرفت و در انتها از آنزیم DNase جهت حذف DNA های باقیمانده استفاده شد. در ادامه، RNA استخراج شده توسط نانودراپ تعیین غلظت شد. مقدار یک میکروگرم RNA از نمونه جهت سنتز cDNA با استفاده از کیت Quanti Tect Reverse Transcription kit (کیاژن، امریکا) استفاده شد. به منظور بررسی ارزیابی بیان ژن پمپ افلاکس norA از روش Real Time PCR کمی نسبی (qRT-PCR) با استفاده مسترمیکس حاوی سایبرگرین (Applied Biosystem، انگلستان) انجام گرفت. مواد مورد استفاده در حجم ۲۰ میکرولیتر مسترمیکس شامل ۲ میکرولیتر از cDNA، ۱۰ پیکومول از پرایمرهای رفت و برگشت، ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس حاوی سایبر گرین بود که در دستگاه Bioneer کره انجام گرفت. برنامه دمایی مورد استفاده در qPCR شامل ۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتیگراد ۱۵ ثانیه، ۱ دقیقه دمای ۶۰ درجه سانتیگراد بود که در ۴۰ سیکل انجام شد (۱۹). همچنین ژن *gmk* (گوانیلات کیناز) به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. در انتها بیان نسبی ژن *norA* توسط روش $\Delta\Delta C_T$ محاسبه شد. لازم به ذکر است پرایمرهای مورد استفاده برای ژن *gmk* (F-TATCAGGACCATCTGGAGTAGG-3) و (R CATCAACTTCACCTTCACGC) بوده و توالی پرایمر ژن های *norA* و *norB* در جدول ۱ آمده است. محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام گردید و داده های PCR با آزمون آماری $\chi 2$ و داده‌های Real Time PCR با آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت. $P<0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر قرار گرفته شد.

یافته‌ها

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 حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که ۳۴ جدایه از ۵۰ جدایه مورد بررسی (۶۸٪) نسبت به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین مقاوم بودند و به عنوان سویه‌های MRSA در نظر گرفته شدند. در این مطالعه ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک های پنی‌سیلین (۹۸٪)، آمپی‌سیلین (۹۰٪)، آموکسی‌سیلین و تری‌متوپریم (۸۶٪)، سفوکسیتین (۶۸٪) و کمترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک سیپروفلاکساسین (۷۴٪ حساس) و کلیستین (۱۰۰٪) بودند. در مجموع میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های جداسازی شده از نمونه‌های ادرار و زخم بیشتر از سایر سویه‌ها بود. برای بررسی مولکولی وجود ژن مقاومت به متی‌سیلین از تکثیر ژن *mecA* استفاده شد و با توجه به طراحی پرایمرها انتظار باند ۱۶۲ جفت باز داشتیم. نتایج نشان داد که توزیع ژن *mecA* در نمونه‌های استافیلوکوکی در ۶۸٪ نمونه‌ها (۳۴ نمونه) وجود داشت. لازم به ذکر است میزان شیوع ژن *mecA* در نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از نمونه های زخم بیشتر از سایر نمونه‌ها بود بطوری‌که از ۳۰ نمونه، ۱۵ نمونه متعلق به نمونه‌های زخم بود (آزمون آماری $\chi 2$ ($P<0/032$). همچنین، به منظور بررسی وجود ژن پمپ افلاکس norA در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده، از پرایمرهای اختصاصی این ژن استفاده شد و انتظار وجود باند ۱۱۲ bp داشتیم که شکل آن در ژل الکتروفورز مشاهده شد. ژن *norA* در تمامی سویه‌های MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین دیده شد (۱۲ نمونه). لازم به ذکر است که ارتباط معناداری بین وجود ژن *norA* ژن *mecA* در بین سویه‌ها وجود نداشت ($P>0/05$). تکثیر ژن پمپ افلاکس *norB* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، وجود باند ۲۱۳ bp را در ژل الکتروفورز نشان داد (شکل ۱). ژن *norB* در ۸۳٪ از نمونه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین وجود داشت (۱۰ نمونه) که بین وجود ژن *norA* و *norB* ارتباط معناداری وجود داشت (آنالیز آزمون آماری $\chi 2$ ($P<0/05$).



شکل ۱. نتایج تکثیر ژن *norB* چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک ۲: کنترل مثبت، چاهک های ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۳ و ۱۴: نمونه‌های مثبت، ۸: ماکر bp^+ ۱۰۰، ۱۲ و ۱۵: نمونه های منفی.

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 افلاکس CCCP میزان MIC سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید کاهش یافته است که نشان دهنده فعال بودن پمپ افلاکس در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین می‌باشد.

بیان نسبی ژن‌های پمپ افلاکس *norA* و *norB* در ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین تیمار شده با غلظت زیر حد مهارکنندگی (SubMIC) عصاره توسط روش Real Time PCR مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که سویه‌های مختلف با میزان مقاومت‌های مختلف به سیپروفلوکساسین، بیان ژن *norA* متفاوتی دارند، به صورتی که سویه‌های مقاوم‌تر میزان بیان نسبی بالاتری نسبت به سویه‌های کمتر مقاوم داشتند و از نظر آماری (One way ANOVA) تفاوت معناداری بین میزان بیان ژن‌های *norA* و *norB* در مقایسه با بیان ژن *gmk* به عنوان ژن کنترل وجود داشت (P<۰/۰۵). لازم به ذکر است که واکنش Real Time PCR به صورت سه بار تکرار انجام شد و نتایج بیان ژن‌های *norA* و *norB* به همراه انحراف از معیار در جدول ۳ ارایه شده است.

جدول ۱. شرایط دمایی و زمانی واکنش PCR برای ژن های *mecA*، *norA* و *norB*

ژن مورد بررسی	زمان و دمای دناتوراسیون اولیه (دقیقه/ سانتیگراد)	زمان و دمای دناتوراسیون ثانویه (ثانیه و سانتیگراد)	زمان و دمای اتصال پرایمرها (ثانیه و سانتیگراد)	زمان و دمای پلیمریزاسیون (ثانیه و سانتیگراد)	زمان و دمای پلیمریزاسیون نهایی (دقیقه و سانتیگراد	تعداد سیکل
mecA	۹۴و ۵	۹۴و ۵۰	۵۰و ۶۰	۷۲و ۵۰	۷۲و ۵	۳۰
norA	۹۴و ۴	۹۴و ۵۰	۳۰و ۶۰	۷۲و ۶۰	۷۲و ۴	۳۰
norB	۹۴و ۵	۵۰و ۹۴	۳۰و ۵۵	۶۰و ۷۲	۷۲و ۵	۳۰

جدول ۲: تعیین میزان غلظت مهارکنندگی سیپروفلوکساسین، اتیدیوم بروماید، CCCP و ترکیب آنها در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین

شماره سویه	MIC (میکروگرم/میلی‌لیتر)			
	سیپروفلوکساسین	اتیدیوم بروماید	اتیدیوم بروماید + CCCP	سیپروفلوکساسین+ 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 ۲۵۹۲۳	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۷/۸۱	۳۱/۲۵

جدول ۳: میزان بیان ژن‌های *norA* و *norB* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین.

شماره سویه	ژن *gmk*	ژن *norA*	ژن *norB*
۷	۱	۱۸۰/۵۸±۰/۲۳	۱۴۰/۰۲± ۰/۴۶
۹	۱	۱۴/۵۷±۰/۸۱	۰
۳۱	۱	۳۵/۷۷±۰/۵۲	۲۵/۵۵±۰/۶۱
۳۲	۱	۱۸/۴۴±۰/۱۶	۰
۳۳	۱	۱۱۴/۹۱±۰/۷۳	۹۵/۵۶±۰/۲۲
۳۴	۱	۴۰۰/۳۱±۰/۱۳	۳۲۰/۷۷±۰/۳۷
۴۳	۱	۱۴/۵۷±۰/۶۳	۵/۶±۰/۸۴
۴۵	۱	۲۰/۳۲±۰/۱۹	۱۵/۳۳±۰/۵۵
۴۶	۱	۱۵/۲۳±۰/۴۸	۱۵/۱۱±۰/۷۶
۴۷	۱	۴۰/۰۸±۰/۳۹	۳۳/۵۹±۰/۳۲
۴۸	۱	۶۲/۸۲±۰/۴۷	۵۱/۲۳±۰/۲۳
۵۰	۱	۲۰۰/۱۵±۰/۶۲	۱۹۰/۲۲±۰/۵۱
ATCC ۲۵۹۲۳	۱	۱۱/۵۲±۰/۶۴	۱۰/۱۵±۰/۹۹
ATCC ۱۲۲۲۸	۱	۰	۰

بحث

در این مطالعه ۲۰٪ از نمونه‌های بالینی جمع‌آوری شده آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند و نتایج حاصل از حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که بیشترین مقاومت مربوط به پنی‌سیلین (۹۸٪) و کمترین مقاومت مربوط به ونکومایسین و کلیستین بود. همچنین ۶۸٪ سویه‌ها مقاوم به متی‌سیلین و ۲۴٪ سویه‌ها مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. مطالعات مختلفی جهت بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شده است. در مطالعه‌ای که سال ۱۳۸۴ بر روی ۷۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام گرفت نشان داد که ۵۰٪ نمونه های مذکور نسبت به سفوکسیتین مقاوم بوده (MRSA) و بررسی الگوی آنتی‌بیوتیکی مشخص گردید که مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا در میان سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین نسبت به آنتی بیوتیک‌هایی مانند پنی‌سیلین (۱۰۰٪)، تتراسایکلین (۷۴/۲٪)، کوتریموکسازول (۶۸/۵٪)، اریترومایسین (۶۸/۵٪) و سفتازیدیم (۵۱/۴٪) مشاهده گردید (۲۱). مطالعه Moradi و همکاران در سال ۱۳۹۰ بر روی ۱۰۴ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که بیشترین میزان حساسیت نسبت به ونکومایسین ۹۶/۲٪، کلرامفنیکل ۸۸/۲٪، ریفامپین ۸۱/۷٪ بوده و میزان مقاومت سویه‌ها به سفوکسیتین ۴۰/۴٪ (MRSA) می‌باشند (۲۲). در مطالعه ما میزان مقاومت به متی‌سیلین ۶۸٪ گزارش شد و مقایسه دو مطالعه فوق و سایر گزارشات صورت گرفته در زمینه بررسی شیوع سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین با مطالعه ما افزایش مقاومت به متی‌سیلین را نشان می دهد که یکی از دلایل افزایش مقاومت به متی‌سیلین در سالهای اخیر ممکن است به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک ها باشد. بالا بودن میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به متی‌سیلین در بین سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد کننده 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 پاتوژن‌های مهم بیمارستانی می‌باشد که به سرعت در سرتاسر جهان شیوع پیدا کرده‌اند. این ارگانیسم به اکثر آنتی‌بیوتیک های بتالاکتام مقاوم شده است و جایگزین‌های کمی برای درمان آن وجود دارد (۲۳). یکی از جایگزین‌های درمانی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین از خانواده کوئینولون‌ها 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 نشان دهنده شروع مقاومت به سیپروفلوکساسین در میان سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* باشد. در سال‌های اخیر مقاومت بالا به کوئینولون‌ها در سویه‌های MRSA گزارش شده است. در ایالات متحده در نیویورک، شیوع سویه‌های MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین سه ماه بعد از استفاده از سیپروفلوکساسین ایجاد شده است (۲۴). مکانیسم مقاومت به کوئینولون‌ها در باکتری‌ها مقاومت متفاوت است. در باکتری اشرشیا کلی، مکانیسم مقاومت ناشی از تغییر ساختار آنزیمی DNA جیراز می‌باشد (۲۵). همانطور که پیشتر اشاره شد، یکی از مکانیسم‌های مقاومت به سیپروفلوکساسین در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، وجود پمپ‌های افلاکس می‌باشد. این پمپ‌ها باعث دفع و تراوش طیف گسترده‌ای از مواد شامل آنتی‌بیوتیک ها، ترکیبات آنتی‌سپتیک، رنگ‌ها و دترژنت‌ها می‌شوند و بنابراین در ایجاد مقاومت چند دارویی نقش بسزایی دارند. بررسی‌های مختلفی در زمینه شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی پمپ‌های افلاکس در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شده است. Pourmand و همکاران در سال ۲۰۱۴، وجود ژن پمپ افلاکس norA و بیان آن را در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که ژن *norA* در تمامی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین وجود دارد و بیان ژن آن در مجاورت بیوساید هگزاهیدروکوئینولون افزایش می‌یابد (۱۹). در مطالعه دیگری Saiful و همکاران در سال ۲۰۰۸ پمپ‌های افلاکس norA را در سویه‌های MRSA نشان دادند که از ۱۹ سویه MRSA جداسازی شده، ۱۶ سویه دارای ژن *norA* هستند و تمامی سویه‌ها دارای پمپ‌های افلاکس فعال بودند (۲۶). در مطالعه ما نقش پمپ افلاکس norA و norB که از خانواده MFS که در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد، به صورت فنوتیپی و ژنوتیپی مورد مطالعه قرار گرفت. بطوریکه تمام سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای ژن norA و ۸۳ ٪ از ایزوله‌ها دارای ژن norB بودند و از نظر فنوتیپی تمامی سویه‌ها دارای پمپ افلاکس فعال بودند که نشان دهنده تایید وجود ژن های پمپ افلاکس در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین می‌باشد. همچنین در این مطالعه، به منظور بررسی فعالیت پمپ افلاکس norA و norB و برای تعیین اینکه آیا مقاومت به سیپروفلوکساسین ناشی از پمپ افلاکس است یا خیر، فعالیت پمپ افلاکس توسط بررسی MIC سیپروفلوکساسین، در حضور و عدم حضور مهارکننده پمپ افلاکس CCCP و اتیدیوم بروماید انجام شد. بدین ترتیب که سویه‌های مقاوم به آنتی سیپروفلوکساسین و دارای پمپ افلاکس norA و norB، تحت تاثیر غلظت‌های مختلف از CCCP و اتیدیوم بروماید قرار گرفتند و میزان MIC آن‌ها مشخص گردید. نتایج نشان داد که میزان MIC اتیدیوم بروماید سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در مجاورت با CCCP به میزان ۱ تا ۴ برابر کاهش یافت. این امر نشان‌دهنده فعالیت ضد پمپ افلاکسی CCCP و فعال بودن آن‌ها بود. بدین صورت که CCCP فعالیت پمپ افلاکس norA و norB را متوقف کرده و اتیدیوم بروماید در غلظت‌های کمتری توانایی از بین بردن باکتری‌ها را دارد. کاهش

میزان MIC اتیدیوم بروماید در سویه‌های مختلف ممکن است فقط از طریق اثرات مهارکنندگی پمپ افلاکس توسط CCCP نباشد بلکه ممکن است CCCP از سایر مسیرها مانند منفذهای غشایی مانند پورین‌ها میزان MIC را تغییر دهند. همچنین، همانطور که در بخش نتایج اشاره شد، در حضور CCCP میزان MIC اتیدیوم بروماید کاهش می‌یابد که منطبق با نتایج سایر مطالعات می‌باشد که نشان دهنده این موضوع است که پمپ افلاکس مسئول ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین است. در تایید نتایج تحقیق حاضر، Saiful و همکاران در سال ۲۰۰۸ به ارتباط معنادار بین میزان بیان پمپ افلاکس norA و میزان MIC اتیدیوم بروماید رسیدند. همچنین این محققان نشان دادند که افزایش بیان پمپ افلاکس norA یک مکانیسم رایج کاهش حساسیت به متی‌سیلین در این باکتری می‌باشد (۲۶). Huet AA و همکاران در سال ۲۰۰۸، تعداد ۹ سویه MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین را از نظر وجود و بیان پمپ‌های افلاکس مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه ابتدا این ژن‌ها با استفاده از روش Real Time PCR تشخیص داده شد و بیان این ژن‌ها در مجاورت غلظت‌های پایین بیوسایدها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که پمپ‌های افلاکس *norA* و *norB* در تمامی سویه‌ها وجود داشته و بیان آن‌ها در مجاورت بیوسایدها افزایش می‌یابد (۲۷). مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعه ما نشان می‌دهد که ژن *norA* و *norB* در بیشتر سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین وجود دارد و احتمالا مقاومت سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را به سیپروفلوکساسین ایجاد می‌کند. در سویه‌های فاقد ژن *norB* ولی مقاوم به سیپروفلوکساسین، احتمالا مکانیسم‌های دیگری از قبلی غیرفعال سازی دارو، تغییر جایگاه هدف همراه با سایر پمپ های افلاکس بر ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین دخیل است. Costa و همکاران در سال ۲۰۱۳، پمپ‌های افلاکس را در ۵۲ سویه مقاوم به سیپروفلوکساسین با استفاده از اتیدیوم بروماید مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که پمپ‌های افلاکس نقش مهمی را در کاهش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها و همچنین بیوسایدها دارد (۲۸). همچنین در مطالعه ما ارتباط بین تست فنوتیپی (اتیدیوم بروماید) و ژنوتیپی (وجود ژن‌های پمپ افلاکس) پمپ افلاکس همانند دو مطالعه فوق نشان داده شد بطوری که تمامی سویه‌هایی که از نظر ژنوتیپی حاوی ژن‌های پمپ افلاکس بودند از نظر فنوتیپی نیز دارای پمپ افلاکس فعال بودند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که پمپ افلاکس *norA* یکی از مکانیسم‌های مهم مقاومت به آنتی‌بیوتیک های فلوروکینولون‌ها مانند سیپروفلوکساسین می‌باشد اما نباید نقش سایر عوامل و مکانیسم‌های دخیل در مقاومت نادیده گرفته شود. در نهایت پیشنهاد می‌شود که مطالعات جدید برای تولید و گسترش مولکول‌های مهارکننده افلاکس نیاز می‌باشد. توسعه مهارکننده های پمپ افلاکس از جمله عصاره‌های گیاهی به امکان کنترل خطر سویه‌های مقاوم به حاوی پمپ‌های افلاکس خواهد گردید. همچنین پیشنهاد می‌گردد که عصاره سایر گیاهان دارویی به صورت سینرژیسمی مورد مطالعه قرار گیرند.

قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه با شماره ۱۵۷۳۰۵۰۷۹۵۲۰۱۰ عنوان فراوانی و آنالیز بیان ژن‌های *norA* و *norB* در سویه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* در سال ۱۳۹۵ است که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال اجرا شده است و از تلاش همکاران بخصوص جناب آقای حسن رحمتی تشکر و قدردانی می‌نماییم.

ملاحظات اخلاقی

در این مطالعه به دلیل عدم استفاده از نمونه‌های انسانی ملاحظه اخلاقی وجود نداشت.

منابع مالی

حمایت مالی از این مطالعه تحقیقاتی توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال صورت گرفته است.

منافع متقابل

نویسندگان این مقاله اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله وجود ندارد.

مشارکت مولفان

ا. میرزایی و ح. نوربازرگان و همکاران طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مقاله را بر عهده داشتند. همچنین ا.میرزایی و توکلی. ز نسخه نهایی مقاله را خوانده و تایید نموده‌اند.

References

1. Sakoulas G, Gold H S, Cohen R A, Venkataraman L, Moellering R C, Eliopoulos G M. Effects of prolonged vancomycin administration on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a patient with recurrent bacteremia. *J Antimicrobial Chemotherapy* 2006; **57**(4): 699-704. doi: 10.1093/jac/dkl030.

2. Hefzy E M, Hassan G M, Abd E l, Reheem F. Detection of panton-valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage among Egyptian health care workers. *Surg Infec* 2016; **17**(3): 369-375. doi: 10.1089/sur.2015.192.
3. Petrović-Jeremić L, Kuljić-Kapulica N, Ristanović E, Jošić D, Lepšanović Z. Prevalence of panton-valentine leukocidin genes in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the District of Pomoravlje. *Vojnosanitetski Pregled* 2016; **73**(3): 256-260. doi: 10.2298/VSP140715003P.
4. Firsov A A, Smirnova M V, Strukova E N, Vostrov S N, Portnoy Y A, Zinner SH. Enrichment of resistant *Staphylococcus aureus* at ciprofloxacin concentrations simulated within the mutant selection window: bolus versus continuous infusion. *Inter J antimicrobial agents* 2008; **32**(6): 488-493. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.06.031.
5. Eed E M, Ghonaim M M, Hussein Y M, Al-Shehri S S, Khalifa A S. Molecular characterization of Panton-Valentine leucocidin-producing methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones isolated from the main hospitals in Taif, KSA. *Indian J Med Microbiol* 2016; **34**(4): 476-482. doi: 10.4103/0255-0857.195364.
6. Kosmidis C, Schindler B D, Jacinto P L, Patel D, Bains K, Seo SM, et al. Expression of multidrug resistance efflux pump genes in clinical and environmental isolates of *Staphylococcus aureus. Inter J Antimicrobial Agents* 2012; **40**(3): 204-209. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.04.014.
7. Li X-Z, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 2004; **64**(2):159-204. doi: 10.2165/00003495-200464020-00004.
8. Brown M H, Paulsen L T, Skurray R A. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters *Mol Microbiol* 1999; **31**(1): 394-395. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01162.x.
9. Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med* 2007; **39**(3): 162-176. doi: 10.1080/07853890701195262.
10. Li X-Z, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 2009; **69**(12): 1555-1623.
11. Soto S M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* 2013; **4**(3): 223-229. doi: 10.4161/viru.23724.
12. Netsvyetayeva I, Fraczek M, Piskorska K, Golas M, Sikora M, Mlynarczyk A, et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in Ukraine: antibacterial resistance and virulence factor encoding genes. *BMC Infect Dis* 2014; 5(14): 128. doi: 10.1186/1471-2334-14-128.
13. De Kievit T R, Parkins M D, Gillis R J, Srikumar R, Ceri H, Poole K, et al. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**(6): 1761-1770. doi: 10.1128/AAC.45.6.1761-1770.2001.
14. Deng X, Sun F, Ji Q, Liang H, Missiakas D, Lan L, He C. Expression of multidrug resistance efflux pump gene *norA* is iron responsive in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* 2012; **194**(7): 1753-1762. doi: 10.1128/JB.06582-11.
15. Truong-Bolduc Q C, Bolduc G R, Okumura R, Celino B, Bevis J, Liao C H, et al. Implication of the NorB efflux pump in the adaptation of *Staphylococcus aureus* to growth at acid pH and in resistance to moxifloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**(7): 3214-3219. doi: 10.1128/AAC.00289-11.
16. De Araújo R S A, Barbosa-Filho J M, Scotti M T, Scotti L, Cruz RMDd, Falcão-Silva VdS, et al. Modulation of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus* with Coumarin Derivatives. *Scientifica (Cairo)* 2016; **2016**: 6894758. doi: 10.1155/2016/6894758
17. Perrott J, Mabasa V H, Ensom M H. Comparing outcomes of meropenem administration strategies based on pharmacokinetic and pharmacodynamic principles: a qualitative systematic review. *Ann Pharmacother* 2010; **44**(3): 557-564. doi: 10.1345/aph.1M339.
18. Igbinosa O E, Beshiru A, Akporehe L U, Oviasogie F E, Lgbinosa O O. Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and other Staphylococcus species in raw meat samples intended for human consumption in Benin City, Nigeria: implications for public health. *Int J Environ Res Public Health* 2016; **13**(10): 949. doi:10.3390/ijerph13100949.
19. Chan B C, Ip M, Lau CB, Lui S L, Jolivalt C, Ganem-Elbaz C, et al. Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against *NorA* over-expressed methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *J Ethnopharmacol* 2011; **137**(1): 767-773. doi: 10.1016/j.jep.2011.06.039.
20. He X, Ahn J. Differential gene expression in planktonic and biofilm cells of multiple antibiotic-resistant *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 2011; **325**(2): 180-188. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02429.x
21. Liger F, Bouhours P, Ganem-Elbaz C, Jolivalt C, Pellet-Rostaing S, Popowycz F, et al. C2 Arylated Benzo [b] thiophene Derivatives as *Staphylococcus aureus* NorA Efflux Pump Inhibitors. *Chem Med Chem* 2016; **11**(3): 320-330. doi: 10.1002/cmdc.201500463.
22. Moradi N, Javadpou S, Karmostaji A. Reduced sensitivity of *Staphylococcus aureus* to vancomycin. *J Hormoz Uni Med Sci* 2011; **15**(3): 169-177. [persian].
23. Aslantaş Ö, Demir C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. *J Dairy Sci* 2016; **99**(11): 8607-8613. doi: 10.3168/jds.2016-11310.
24. Yang Y, Hu Z, Shang W, Hu Q, Zhu J, Yang J, et al. Molecular and phenotypic characterization revealed high prevalence of multidrug-resistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in chongqing, southwestern china.

Microb Drug Resist 2016; **18**: 56-61. doi: 10.1089/mdr.2016.0078.

25. Nakanishi A, Oshida T, Matsushita T, Imajoh-Ohmi S, Ohnuki T. Identification of DNA Gyrase Inhibitor (GyrI) in *Escherichia coli*. *J Bio Chemist* 1998; **273**(4): 1933-1938. doi: 10.1074/jbc.273.4.1933.
26. Saiful A J, Mastura M, Zarizal S, Mazurah MI, Shuhaimi M, Ali A M. Efflux genes and active efflux activity detection in Malaysian clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Basic Microbiol* 2008; **48**(4): 245-251. doi: 10.1002/jobm. 200700387.
27. Huet A A, Raygada J L, Mendiratta K, Seo S M, Kaatz G W. Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple in vitro exposures to biocides and dyes. *Microbiol* 2008; **154**(10): 3144-3153. doi: 10.1099/mic.0.2008/021188-0.
28. Costa S S, Junqueira E, Palma C, Viveiros M, Melo-Cristino J, Amaral L, et al. Resistance to antimicrobials mediated by efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* 2013; **2**(1): 83-99. doi: 10.3390/antibiotics 2010083.