مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۱، شماره۱۲، اسفند۱۳۹۵(شماره پی در پی۱۱۹)

بررسی موتاسیون ژن های *grlA* و *norA* در جدایه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به فلوروکینولون ها

لیلا اسدپور*، سعید ویسی

باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۹/۱٤ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/٤

چکیده

زمینه و هدف. فلوروکینولون‌ها دسته ای از آنتی‌بیوتیک‌های پرکاربرد و با طیف اثر وسیع هستند که مقاومت نسبت به آنها رو به گسترش است. از مکانیسم‌های مهم مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها در *استافیلوکوکوس اورئوس*، موتاسیون درgrlA یک زیرواحد توپوایزومراز نوع II و موتاسیون پمپ افلاکس norA است. هدف از پژوهش حاضر بررسی موتاسیون ژن‌های *grlA* و *norA* در جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون بود.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی، ۸۵ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های بالینی مختلف با استفاده از روش‌های کشت و مولکولی شناسایی گردید. مقاومت این جدایه‌ها به فلوروکینولون‌ها با روش انتشار از دیسک و MIC سیپروفلوکساسین، به روش براث ماکرودایلوشن تعیین شد. جهت بررسی ارتباط بین موضع عفونت و وضعیت مقاومت به هر دارو از آزمون آماری مجذور کای بهره برده شد. برای معنی‌دار بودن نتایج لحاظ شد($p<۰/۰۵$). موتاسیون در ناحیه تعیین کننده مقاومت به کینولون‌ها در ژن *grlA* و موتاسیون ژن *norA* سویه‌های مقاوم، از طریق تکثیر این ژن‌ها در واکنش PCR و بررسی توالی نوکلئوتیدی محصول، تعیین گردید.

یافته‌ها: در این بررسی ۲۰ درصد جدایه‌ها به همه آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون مورد مطالعه مقاوم بودند. به کمک آزمون آماری مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین مقاومت به فلوروکینولون‌ها در جدایه‌های مورد مطالعه و محل عفونت *استافیلوکوکوس اورئوس* در مبتلایان وجود ندارد. MIC سیپروفلوکساسین در جدایه‌های مقاوم به فلوروکینولون بین۵۱۲-۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. دو موتاسیون منفرد S80F و P144S و یک الگوی موتاسیون دوگانه P144S + S80F در ژن *grlA* سویه های مقاوم به فلوروکینولون *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی گردید، ولی در ژن *norA* سویه‌های مقاوم هیچ موتاسیونی دیده نشد. هم‌چنین بین میزان MIC در جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین و جهش در ژن *grlA* ارتباطی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: جهش در ژن *grlA* یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* در رشت بوده اغلب و سویه‌های مقاوم، موتاسیون شایع در کدن ۸۰ این ژن را کسب کرده‌اند.

واژه های کلیدی: فلوروکینولون، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *grlA* ، *norA*

***نویسنده مسئول: لیلا اسدپور**، رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان
Email: Asadpour@iaurasht.ac.ir

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از پاتوژن‌های مهم و از عوامل شایع در عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد که مسئول طیف وسیعی از عفونت‌ها شامل؛ عفونت‌های سطحی پوست، مسمومیت‌های غذایی، عفونت‌های ادراری و بسیاری از عفونت‌های جلدی نظیر سپتی سمی، اندوکاردیت و استئومیلیت در افراد بستری در بیمارستان‌ها می‌باشد(۲ و۱). از دلایل اهمیت عفونت‌های ناشی از این باکتری آن است که *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش از اکثر باکتری‌های دیگر مقاومت دارویی نشان می‌دهد. به ویژه با ظهور سویه‌های مقاوم به متی سیلین *استافیلوکوکوس اورئوس*(MRSA)، عفونت‌های بیمارستانی و مرگ و میر ناشی از این باکتری افزایش چشمگیر یافت و به سرعت به انواع خاصی از آنتی‌بیوتیک‌های متداول مقاوم شد(۴ و۳). ونکومایسین به عنوان دارویی انتخابی در درمان سویه‌های MRSA مورد استفاده قرار می‌گیرد و در مواردی که به دلیل عدم تحمل ونکوماسین به وسیله بیمار یا ظهور سویه‌های مقاوم به ونکومایسین *استافیلوکوکوس اورئوس* امکان استفاده از این آنتی‌بیوتیک نباشد، از آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر؛ مینوسایکلین، تری متوپریم- سولفامتوکسازول، کلیندامایسین و فلوروکینولون‌ها استفاده می‌گردد۶ و۵).

فلوروکینولون‌ها آنتی‌بیوتیک‌های با طیف اثر وسیع هستند که بدیل جذب گوارشی در پزشکی بسیار پر کاربرد هستند. این آنتی‌بیوتیک‌ها بیشتر در درمان عفونت ناشی از باکتری‌های گرم منفی به کار می‌روند. برخی از آنها مثل؛ سیپروفلوکساسین، افلوکساسین و پر فلوکساسین بر ضد گرم مثبت‌ها هم موثرند. فلوروکینولون‌های نسل جدید با فعالیت ضد میکروبی قوی بر ضد باکتری‌های گرم مثبت نیز تولید شده‌اند که در درمان عفونت‌های غیر تهاجمی ناشی از MRSA استفاده می‌گردد(۸ و۷). اگرچه استفاده گسترده از کینولون‌ها منجر به ظهور سریع MRSA مقاوم شده است، به گونه‌ای که برخی محققین معتقدند حتی اگر در آنتی‌بیوگرام سویه‌های MRSA حساس به فلوروکینولون ها باشند، می‌توانند در طول دوره درمان مقاومت کسب کنند(۹). این مقاومت به طور معمول در نتیجه موتاسیون خود به خودی کروموزومی‌در مکان‌های کلیدی DNA ژیراز (دارای زیر واحدهای *gyrA* و *gyrB*)و توپوایزومراز IV (دارای زیر واحدهای *grlA* و*grlB*) که منجر به مهار سنتز DNA می‌شود ایجاد می‌شود. اغلب سویه‌های مقاوم به کینولون‌ها در منطقه ای نزدیک به جایگاه فعال این آنزیم‌ها به نام QRDR[1] (ناحیه تعیین کننده مقاومت کوئینولونی) موتاسیون نقطه‌ای دارند. مطالعه‌ها نشان داده است موتاسیون در ژن *grlA* مهم‌ترین نقش را در بروز مقاومت کوئینولونی در *استافیلوکوکوس اورئوس* به عهده دارد(۱۱و۱۰). مکانیسم دیگر مقاومت به فلوروکینولون‌ها فعالیت پمپ افلوکس می‌باشد. این نوع مقاومت اغلب در نتیجه بروز

1-Quinolone Resistance Determining Region

موتاسیون در ژن *norA* رخ می‌دهد(۱۲). ژن کد کننده *norA* ابتدا در سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها شناسایی شد. این پمپ توانایی بیرون راندن آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین و ایجاد مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها را دارد(۱۳). هدف از پژوهش حاضر بررسی موتاسیون ژن‌های *grlA* و *norA* در سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه های بالینی در رشت بود.

روش بررسی

در این مطالعه مقطعی، جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های بالینی خون، ادرار، زخم و آبسه بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی رشت در سال ۹۴ جمع‌آوری گردید. جهت خالص‌سازی باکتری‌ها کشت بر روی محیط مانیتول سالت آگار و آگار خوندار (مرک[1]، آلمان) و تست‌های کواگولاز، کاتالاز، DNase انجام گرفت. جهت تأیید تشخیص جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از یک جفت پرایمر اختصاصی *23SrRNA* استفاده گردید که توالی نوکلئوتیدی آنها در جدول ۱ آمده است(۱۴).

مقاومت دارویی *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به فلوروکینولون‌های سیپروفلوکساسین، انروفلوکساسین، نورفلوکساسین و افلوکساسین (هایمویا، هند) با انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش استاندارد انتشار از دیسک و تعیین MIC سیپروفلوکساسین به روش براث ماکرودایلوشن انجام گرفت(۱۵).جهت تعیین MIC سیپروفلوکساسین از محلول تزریقی ساخت شرکت روناک دارو (ایران) استفاده شد.

بررسی موتاسیون ژن‌های *grlA* و *norA* در سویه‌های مقاوم جهت تکثیر ژن‌های *grlA* و *norA* سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از یک جفت پرایمر اختصاصی این ژن‌ها در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) استفاده گردید(۱۶). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل dNTPS (۱۰ میلی‌مول) ۰/۵ میکرولیتر، بافر آنزیم(10X)۵ میکرولیتر، پرایمرهای پیشرو و پیرو(۱۰ پیکومول) ۳ میکرولیتر، DNA الگو (۲ میکروگرم) ۲ میکرولیتر، آنزیم DNA پلی‌مراز *Pfu* (۲/۵ واحد) ۰/۵ میکرولیتر(بایونیر[2]، کره جنوبی)، آب مقطر ۱۴ میکرولیتر انجام گرفت. برنامه حرارتی ترموسایکلر به ترتیب شامل مراحل واسرشته شدن اولیه در ۹۴ درجه به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی ۹۴ درجه ۴۵ ثانیه ، ۵۷ درجه ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه ۴۵ ثانیه بود. سپس یک مرحله ده دقیقه ای گسترش نهایی اضافه گردید.

پس از اطمینان از تولید محصول مورد نظر جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت بایونیر (کره جنوبی) ارسال گردید. پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن‌های *grlA* و *norA* سویه‌های مورد مطالعه، توالی بازی و آمینو اسیدی آن با نرم‌افزارهای آنلاین بلاست

1-Merck
2-Bioneer

(BLAST)، Chromas v.1.45 و CLC main workbench v3.5 تعیین و با توالی سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* NCTC 8325 در بانک ژنی مقایسه گردید.

جهت بررسی معنی‌دار بودن ارتباط بین موضع عفونت و وضعیت مقاومت به فلوروکینولون‌ها، داده‌های آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون آماری کای دو تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه ۸۵ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های بالینی جداسازی و شناسایی آنها در واکنش PCR تأیید شد. ۴۷ باکتری از نمونه‌های ادراری(۵۵/۲۹ درصد)، ۲۱ باکتری از موارد زخم(۲۴/۷۰ درصد)، ۱۰ باکتری از کشت خون (۱۱/۷۶ درصد) و ۷ باکتری از آبسه (۸/۲۳ درصد) به دست آمد.

از این تعداد ۱۷ جدایه(۲۰ درصد) به همه آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون مورد مطالعه مقاوم بودند. به کمک آزمون آماری مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین مقاومت به فلوروکینولون‌ها در جدایه‌های مورد مطالعه و محل عفونت *استافیلوکوکوس اورئوس* در مبتلایان وجود ندارد. میزان MIC سیپروفلوکساسین در این جدایه‌ها بین ۵۱۲-۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود، به این ترتیب که در ۷ جدایه(۴۱/۲ درصد) این میزان ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌متر، در ۳ جدایه (۱۷/۳ درصد) معادل ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌متر، در ۵ جدایه (۲۹/۴ درصد) ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌متر و در ۲ جدایه (۱۱/۷ درصد)۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

در واکنش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن‌های *grlA* و *norA* سویه‌های مورد مطالعه به ترتیب محصولاتی به طول ۳۸۰ و ۳۵۰ جفت باز تولید شد. تصویر الکتروفورز محصولات PCR در شکل ۱ آمده است.

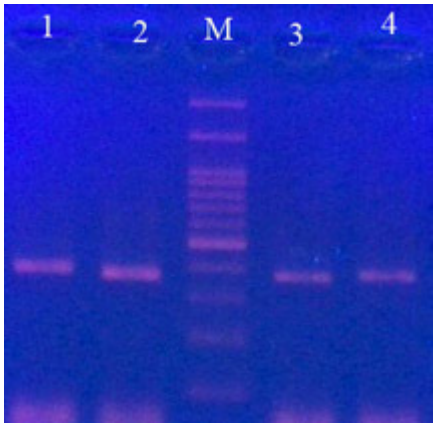
جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی پرایمر های پیشرو و پیرو مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های استافیلوکوکوس ارئوس

ژن	توالی نوکلئوتیدی پرایمر	طول محصول(جفت باز)
23SrRNA F	5'- ACGGAGTTACAAAGGACGAC -3'	۱۲۵۰
23SrRNA R	5'- AGCTCAGCCTTAACGAGTAC- 3′	
grlA F	5'-ACTTGAAGATGTTTTAGGTGAT-3'	۳۸۰
grlA R	(5' -TTAGGAAATCTTGATGGCAA-**3'**	
norA F	5'-GGTCATTATTATATTCAGTTGTTG-3'	۳۵۰
norA R	5'-GTAAGAAAAACGATGCTAAT-3	

در از مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن *grlA* سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها با سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* در بانک ژنی، در ۱۵ جدایه(۸۸/۲درصد) موتاسیون منجر به تغییر اسیدآمینه دیده شد. در ۱۳ جدایه(۷۶/۵ درصد) موتاسیون تبدیل TCC به TTC در کدون ۸۰ که منجر به جایگزینی اسیدآمینه فنیل آلانین به جای سرین گردیده است، دیده شد و در ٤ جدایه در کدن ١٤٤ موتاسیون تبدیل CCA به TCA رخ داد به این ترتیب اسیدآمینه سرین جایگزین پرولین گردید، که از این بین در دو سویه به صورت موتاسیون دوگانه Ser80Phe+Pro144Ser بود. همچنین در ٤ جدایه مورد بررسی موتاسیون‌های خاموش چندگانه در کدون‌های ۱۱۳، ۱٤۱ و ۱۵۰ و در ۱ جدایه موتاسیون های خاموش چندگانه در کدون های ٤۷، ۷۷، ۸۱ و ۱۱۳ دیده شد. در یکی از جدایه‌های مقاوم هیچ گونه موتاسیونی در ژن *grlA* مشاهده نگردید و نیز ارتباطی بین MIC سیپروفلوکساسین و وجود موتاسیون در ژن *grlA* در جدایه‌های مورد بررسی مشاهده نشد(جدول ۲). همچنین از مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن *norA* سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها با سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* در بانک ژنی، در هیچ یک از جدایه های مورد بررسی موتاسیون دیده نشد.

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از پاتوژن‌های مهم و از عوامل شایع در عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد که مسئول طیف وسیعی از عفونت‌ها شامل؛ عفونت‌های سطحی پوست، مسمومیت‌های غذایی، عفونت‌های ادراری و بسیاری از عفونت‌های جلدی نظیر سپتی سمی، اندوکاردیت و استئومیلیت در افراد بستری در بیمارستان‌ها می‌باشد(۲ و ۱)، لذا هدف از پژوهش حاضر بررسی موتاسیون ژن‌های *grlA* و *norA* در سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه های بالینی در رشت بود.



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن های *grlA* و *norA*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون های ۱ و ۲ : محصول PCR ژن *norA*، ستون های ۳و ۴: محصول PCR ژن *grlA*.

جدول ۲: موتاسیون ژن *grlA* و MIC سیپروفلوکساسین در جدایه‌های مقاوم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون

تعداد باکتری	منشا باکتری	MIC سیپروفلوکساسین (میکرگرم بر میلی لیتر)	نوع موتاسیون	نوع تغییر اسیدآمینه
۱۱	ادرار(۷ جدایه)،زخم(۲ جدایه)،آبسه(۱ جدایه)، خون(۱ جدایه)	۵۱۲(۴)،۲۵۶(۲)، ۱۲۸(۴)،۳۲(۱)	TCC80TTC	S80F
۲	ادرار	۳۲(۱)، ۵۱۲(۱)	TCC80TTC CCA144TCA CCG113CCA TCT141TCC ACA150ACG	S80F P144S P113P S141S T150T
۲	خون، آبسه	۳۲(۱)، ۵۱۲(۱)	CCG113CCA TCT141TCC CCA144TCA ACA150ACG	P113P S141S P144S T150T
۱	ادرار	۵۱۲	TAT47TAC CAT77CAC TCA81TCG CCG113CCA	Y47Y H77H S81S P113P
۱	زخم	۱۲۸	عدم موتاسیون	-

عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های متداول، یکی از مشکلات جدی بهداشتی در سراسر دنیاست. آگاهی از وضعیت این مقاومت‌ها در عوامل بیماری‌های عفونی برای کنترل عفونت‌ها ضروری می‌باشد(۱۷). وجود مقاومت‌های آنتی‌بیویکی چندگانه در *استافیلوکوکوس اورئوس* در کنار ویژگی گریز از پاسخ سیستم ایمنی، این پاتوژن را بسیار مورد توجه قرار داده است. این باکتری توانسته است نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌هایی که از دهه ۱۹٤۰ میلادی تاکنون شناخته شده‌اند، مقاومت کسب نماید(٦). مدت زمان کوتاهی پس از معرفی فلوروکینولون‌ها به ویژه سیپروفلوکساسین در درمان عفونت‌های جدی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس، سویه‌های مختلف این باکتری به ویژه MRSA، به سرعت نسبت به این ترکیب‌های ضدمیکروبی مقاومت کسب نمودند(۱۸). در اغلب مطالعه‌های مقاومت به فلوروکینولون‌ها وابسته به دو موتاسیون نقطه‌ای در کدون های ۸۰ ژن *grlA* و کدن ۸٤ ژن *gyrA* بوده است(۱۹). در مطالعه حاضر موتاسیون ژن‌های *grlA* و *norA* ، در سویه مقاوم به فلوروکینولون باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی در رشت بررسی گردید. در این بررسی ۲۰ درصد جدایه‌ها به همه آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون مورد مطالعه مقاوم بودند و علاوه بر موتاسیون منفرد شایعS80F ، موتاسیون منفرد P144S و یک الگوی موتاسیون دوگانه P144S + S80F نیز در ژن *grlA* سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده گردید. هم‌چنین در این مطالعه ارتباطی بین میزان MIC سیپروفلوکساسین و موتاسیون ژن *grlA* مشاهده نشد. در کشور ما مطالعه‌های متعددی در خصوص مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های

بالینی نسبت به فلوروکینولون‌ها و به ویژه سیپروفلوکساسین انجام شده است و میزان این مقاومت‌ها از ٤/٨ درصد در مطالعه مهراد و همکاران در زنجان تا بیش از ۹۰ درصد در مطالعه پرهیزکاری و همکاران در اهواز متغیر بوده است(۲۱ و ۲۰).در مطالعه پورعباس و همکاران ٤٤ درصد جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند(۲۲). در مطالعه مشابهی علیقلی و همکاران ٤١/٨ درصد جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون گزارش کردند که در تمام سویه‌های مقاوم موتاسیون در کدن ۸۰ ژن *grlA* وجود داشت(۱۲). اسمیت و همکاران نیز موتاسیون Ser80Phe را در ژن *grlA* ٩٦/٨ درصد استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به فلوروکینولون گزارش نمودند(١٦). که این میزان موتاسیون بیشتر از نتایج حاصل از پژوهش حاضر(٧٦/٥ درصد)، می‌باشد. در مطالعه‌های دیگری تغییرات آسیدآمینه‌ای کمتری در کدون ۸۰ ژن *grlA* سویه‌های مقاوم دیده شد. از جمله نوگوچی و همکاران موتاسیون منجر به تغییر اسیدآمینه در ژن *grlA* سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون *استافیلوکوکوس اورئوس* را ١٧/٤ درصد گزارش نمودند(۲۳). هم‌چنین در مطالعه‌ای در ترکیه در ٥٦ درصد استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی سیلین ـ مقاوم به سیپروفلوکساسین، موتاسیون در ژن‌های *grlA* و *gyrA* مشاهده گردید. موتاسیون منجر به تغییر اسید آمینه در کدن ۸۰ ژن *grlA* شایع‌ترین موتاسیون شناسایی شده بود و در ٥٤ درصد جدایه های مورد مطالعه گزارش شد(٢٤). کاستا و همکاران(۲۰۱۳) نیز در تمام سویه‌های مقاوم به فلوروکینولون *استافیلوکوکوس اورئوس* در پرتغال، تغییر اسیدآمینه در کدن ۸۰ ژن *grlA* را گزارش کردند. به این ترتیب که اسیدهای آمینه فنیل آلانین و یا تیروزین جایگزین سرین شده‌اند(۲۵).

مطالعه‌ها نشان داده موتاسیون در ژن *norA* می‌تواند سبب افزایش بیان این ژن و در نتیجه افزایش فعالیت افلاکس در *استافیلوکوکوس اورئوس* شود(٢٦). در مطالعه حاضر در ژن *norA* سویه‌های مقاوم هیچ گونه موتاسیونی دیده نشد. ولی موتاسیون این ژن در مطالعه نوگوچی و همکاران و اسمیت و همکاران به ترتیب ٢٦ درصد و ٢٧/٢ درصد گزارش شد(٢٣ و١٦). اگرچه تغییر در میزان بیان ژن *norA* از دیگر عوامل مؤثر بر مقاومت کینولونی می‌باشد. به گونه‌ای که پورمند و همکاران کاهش میزان MIC سیپروفلوکساسین در سویه‌های مقاوم *استافیلوکوکوس اورئوس* را کاهش بیان ژن *norA* نسبت دادند(١٨).

نتیجه‌گیری

با توجه به وقوع جهش در همه نمونه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین مورد مطالعه، به نظر می‌رسد که جهش در ژن *grlA* یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به سیپروفلوکساسین در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی در رشت باشد. هم‌چنین با توجه به این که در

بعضی از سویه‌ها موتاسیون منجر به تغییر اسید آمینه و در نتیجه عملکرد دیده نشده، است بررسی سایر مکانیسم‌های مؤثر در مقاومت به فلوروکینولون‌ها پیشنهاد می‌گردد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح پژوهشی مصوب باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد رشت می‌باشد. نویسندگان مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد رشت نهایت تقدیر و تشکر را دارند.

REFERENCES

1.Foster TJ. The *Staphylococcus aureus* superbug. The Journal of Clinical Investigation 2004; 114(12): 1693-6.

2.Gad GFM, El-Ghafar AE-GF, El-Domany RA, Hashem ZS. Epidemiology and antimicrobial resistance of staphylococci isolated from different infectious diseases. Brazilian Journal of Microbiology 2010; 41(2): 333-44.

3.Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology 2000; 38(3): 1008-15.

4.Huang YC, Su LH, Wu TL, Lin TY. Changing molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from a teaching hospital in Northern Taiwan. J Clin Microbiol 2006; 44(6): 2268-70.

5.Hashem RA, Yassin AS, Zedan HH, Amin MA. Fluoroquinolone resistant mechanisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Cairo, Egypt. The Journal of Infection in Developing Countries 2013; 7(11): 796-803.

6.Hiramatsu K, Katayama Y, Matsuo M, Sasaki T, Morimoto Y, Sekiguchi A, et al. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. Journal of Infection and Chemotherapy 2014; 20(10): 593-601.

7.Chakrakodi B, Prabhakara S, Nagaraj S, Etienne J, Arakere G. High Prevalence of Ciprofloxacin Resistance in Community Associated *Staphylococcus aureus* in a Tertiary Care Indian Hospital. Advances in Microbiology 2014; 4(02): 133.

8.Parkinson EI, Bair JS, Nakamura BA, Lee HY, Kuttab HI, Southgate EH, et al. Deoxynybomycins inhibit mutant DNA gyrase and rescue mice infected with fluoroquinolone-resistant bacteria. Nature Communications 2015; 6: 1-9.

9.Kim MJ, Yun HJ, Kang JW, Kim S, Kwak JH, Choi EC. In vitro development of resistance to a novel fluoroquinolone, DW286, in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2003; 51(4): 1011-6.

10.Gade ND, Qazi MS. Fluoroquinolone therapy in *Staphylococcus aureus* infections: Where do we stand?. Journal of Laboratory Physicians 2013; 5(2): 109.

11.Dalhoff A. Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implictions for clinical use. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases 2012; 1-37.

12.Aligholi M, Mirsalehian A, Halimi S, Imaneini H, Taherikalani M, Jabalameli F, et al. Phenotypic and genotypic evaluation of fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran. Medical Science Monitor 2011; 17(9): PH71-PH4.

13.Handzlik J, Matys A, KieKononowicz K. Recent advances in multi-drug resistance (MDR) efflux pump inhibitors of Gram-positive bacteria S. Antibiotics 2013; 2(1): 28-45.

14.Izadpanah MR, Asadpour L. Molecular identification and antibacterial drug resistance pattern of *Staphylococcus aureus* isolated in Rasht, Iran. Mljgoums 2015; 9(3): 40-6.

15.Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Document M100-S24. Wayne PU , 2014.

16.Schmitz FJ, Kohrer K, Schering S, Verhoef J, Fluit A, Heinz H, et al. The stability of grlA, grlB, gyrA, *gyrB* and *norA* mutations and MIC values of five fluoroquinolones in three different clonal populations of methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology and Infection 1999; 5(5): 287-90.

17.Soltani J, Poorabbas B, Miri N, Mardaneh J. Health care associated infections, antibiotic resistance and clinical outcome: A surveillance study from Sanandaj, Iran. World Journal of Clinical Cases 2016; 4(3): 63.

18.Pourmand MR, Yousefi M, Salami SA, Amini M. Evaluation of expression of NorA efflux pump in ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* against hexahydroquinoline derivative by Real-Time PCR. Acta Medica Iranica 2014; 52(6): 424.

19.Yamada M, Yoshida J, Hatou S, Yoshida T, Minagawa Y. Mutations in the quinolone resistance determining region in *Staphylococcus epidermidis* recovered from conjunctiva and their association with susceptibility to various fluoroquinolones. British Journal of Ophthalmology 2008; 92(6): 848-51.

20.Mehrad L, Ramazani A, Garshasbi M. Molecular characterization and sccmec typing in methicillin-resistant *staphylococcus aureus* isolated from the staff in zanjan tertiary hospitals. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2015; 24(121): 113-22.

21.Parhizgari N, Moosavian S, Sharifi A. Antibiotic resistant pattern of methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* isolated from patients durining 2009-2010, Ahvaz, Iran. Armaghane Danesh 2013; 18(9): 757-67.
22.Poorabbas B, Mardaneh J, Rezaei Z, Kalani M, Pouladfar G, Alami MH, et al. Nosocomial Infections: Multicenter surveillance of antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* and Gram negative rods isolated from blood and other sterile body fluids in Iran. Iranian Journal of Microbiology 2015; 7(3): 127.
23.Noguchi N, Tamura M, Narui K, Wakasugi K, Sasatsu M. Frequency and genetic characterization of multidrug-resistant mutants of *Staphylococcus aureus* after selection with individual antiseptics and fluoroquinolones. Biological and Pharmaceutical Bulletin 2002; 25(9): 1129-32.
24.Coskun-Ari F, Bosgelmez-Tinaz G. *grlA* and *gyrA* mutations and antimicrobial susceptibility in clinical isolates of ciprofloxacin-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* Eur J Med Res 2008; 13: 366-70.
25.Costa SS, 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.
26.García-Gómez E, Jaso-Vera ME, Juárez-Verdayes MA, Alcántar-Curiel MD, Zenteno JC, Betanzos-Cabrera G, et al. The 95 Δ G mutation in the 5′ untranslated region of the *norA* gene increases efflux activity in S*taphylococcus epidermidis* isolates. Microbial Pathogenesis 2017; 103: 139-48.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Mutations in *grlA* and *norA* Genes of Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Resistant to Fluoroquinolone

Asadpour L*, Veisi S

Young Researchers and Elite Club, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Received: 4 Dec 2016 Accepted: 22 Feb 2017

Abstract

Background and aim: Fluoroquinolones are group of antibiotics that are commonly used as broad-spectrum and resistance to them is expanding. The mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *S. aureus* is important in mutation a subunit of topoisomerase type II grlA and efflux pump. This study was aimed was to investigate mutations in *grlA* and *norA* genes of clinical isolates of *S. aureus* resistant to fluoroquinolones

Methods: In the present cross-sectional study, 85 S. aureus isolates from different clinical samples using culture and molecular methods were identified. The resistant of these isolates to fluoroquinolones was determined by disc diffusion method and MIC ciprofloxacin method was tested by macro dilution broth. To examine the relationship between infection and the position of each drug resistance status the chi-square test was used. A P value of < 0.05 was considered statistically significant. Mutations in the quinolone resistance-determining regions (QRDR) in chromosomal *grlA* gene and *norA* gen mutations was investigated in quinolone-resistant *S. aureus* isolates, by PCR amplification of *grlA* and *norA* genes and sequencing.

Results: In this study, 20% of isolates were resistant to all antibiotics fluoroquinolones studied. Using statistical analysis revealed no significant differences between fluoroquinolone resistance in isolates of *S. aureus* infection in patients and location was observed. MIC ciprofloxacin resistant isolates to fluoroquinolones was ranged between 32-512 mg/ml. Two single mutations S80F and S80F and a pattern of P144S+ P144S in the *grlA* gene of fluoroquinolone resistant strains of S. aureus were identified, but no mutations were found in genes norA resistant strains. Also, no relationship between MIC of ciprofloxacin in resistant isolates and mutation in *grlA* was seen.

Conclusion: The obtained results demonstrated that *grlA* gene mutation is one of the most important mechanisms of resistance to ciprofloxacin in clinical isolates of *S. aureus* in Rasht and most of resistant isolates acquired common mutation in codon 80.

Key Words: Fluoroquinolone, *S. aureus*, *grlA*, *norA*

***Corresponding author: Asadpour L,** Young Researchers and Elite Club, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
Email: Asadpour@iaurasht.ac.ir

Please cite this article as follows:
Asadpour L, Veisi S. Mutations in grlA and norA Genes of Clinical Isolates of Staphylococcus aureus Resistant to Fluoroquinolone. Armaghane-danesh 2017; 21 (12): 1236-1246.