

شناسایی و بررسی جهش های ژن *norA* توسط توالی یابی نوکلئوتیدی در استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین در شهرستان سنندج

شیدا السادات ذوالنوری^{۱*}، صبریه امینی^۲

(۱) باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
(۲) گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۵

چکیده

مقدمه: فلوروکوبنولون ها از جمله آنتی بیوتیک های مفید در مقابل عفونت های ناشی از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می باشند اما امروزه ایجاد مقاومت نسبت به این دسته از آنتی بیوتیک ها یکی از مشکلات جدی در روند درمان بیماران به شمار می رود. از جمله مکانیسم های ایجاد مقاومت فلوروکوبنولونی در این باکتری ها بیان بیش از حد ژن *norA* می باشد که در این مطالعه بررسی شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تعداد ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران مبتلا به عفونت بینی در شهرستان سنندج جدا گردید و با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی مرسوم تعیین هویت شدند، آزمایش دیسک دیفیوژن برای بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و آزمایش PCR برای بررسی ژن *norA* انجام گرفت، سپس محصولات آزمایش PCR برای آزمایش توالی یابی *DNA* به شرکت Bioneer ارسال شدند. بر اساس نتایج توالی یابی و ترجمه گر ExPasy جهش های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی بررسی شد.

یافته های پژوهش: نتایج آزمایشات بیوشیمیایی به صورت کواگولاز، تخمیر قند مانیتول، *DNase* و همولیز مثبت، حساس به نوبیوسین و مقاوم به پلی میکسین بودند. مقاومت به آنتی بیوتیک های استفاده شده به صورت اکساسیلین (۴۲ درصد)، اریترومایسین (۴۶ درصد)، داکسی سیلین (۱۰ درصد)، آمیکاسین (۲۰ درصد)، تتراسایکلین (۲۴ درصد)، پنی سیلین (۶۸ درصد)، سیپروفلوکساسین (۱۰ درصد)، ونکومایسین (۶ درصد) و نالیدیکسیک اسید (۷۰ درصد) بود. همه سویه های مقاوم دارای ژن *norA* بودند و با بررسی توالی *DNA*، ۴ جهش نقطه ای نوکلئوتیدی یکسان، به ترتیب A->G491، T->C537، G->A585 و T->C593 شناسایی و پس از ترجمه در جایگاه ۳۱۵ آمینواسید اسپارتیک اسید (D) به گلیسین (G) تبدیل شده بود.

بحث و نتیجه گیری: در ۴ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین جهش نوکلئوتیدی و آمینواسیدی مشترک مشاهده شد لذا لازم است مطالعات بیشتر انجام شود که آیا جهش های ذکر شده قطعاً عامل افزایش بیان این ژن هستند یا خیر.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، دیسک دیفیوژن، بلاست، ExPasy، توالی یابی

* نویسنده مسئول: باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

Email: sheidazonoori@gmail.com

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

امروزه استفاده گسترده از آنتی بیوتیک های فلوروکوینولونی باعث ایجاد و ظهور مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک ها در گونه های باکتریایی مختلف مخصوصاً استافیلوکوکوس اورئوس شده است (۱). استافیلوکوکوس اورئوس عامل طیف وسیعی از بیماری ها مانند اندوکاردیت، استومیلیت، مسمومیت غذایی، سپتی سمی، عفونت های پوستی، کورک، کفگیرک، عفونت های بافت نرم و سندرم پوسته پوسته شدن پوست در انسان است (۲). آنتی بیوتیک های فلوروکوینولونی از جمله عوامل درمانی قابل استفاده در مقابل عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس است. هدف اصلی و اولیه فلوروکوینولون ها در استافیلوکوکوس اورئوس، توپوایزومراز IV است که توسط ژن های *grlA* و *grlB* کد می شوند، و هدف ثانویه این آنتی بیوتیک ها DNA جیراز است که توسط ژن های *gyrA* و *gyrB* کد می شوند (۳). یکی دیگر از مکانیسم هایی که باعث مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به کوینولون ها می شود مقاومت با واسطه پروتئین *NorA* است که محصول ژن *norA* می باشد (۴) *NorA* یکی از اعضای خانواده بزرگ MFS (Major Facilitator Superfamily) است که دارای ۳۸۸ آمینواسید است و شامل ۱۲ قطعه داخل غشایی سراسری و یک پمپ دفعی مقاومت چند دارویی (MDR) وابسته به (PMF) Proton motive force می باشد (۵). *NorA* اولین بار در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس در سال ۱۹۸۶ در بیمارستان ژاپن جمع آوری شد (۶) و عوامل دارویی از جمله فلوروکوینولون ها، اتیدیوم برماید، بنزوالکونیوم کلراید، تترا فنیل فسفونیوم برماید و آسریفلاوین را به خارج دفع می کند (۷) برخی از جهش های گزارش شده در ژن *norA* که عامل مقاومت به آنتی بیوتیک های کوینولونی هستند با افزایش سطح بیان این ژن مرتبط است (۳). در این مطالعه به بررسی جهش هایی که در ژن *norA* و هم چنین پروتئین *NorA* سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین جدا شده از مبتلایان به عفونت بینی در شهرستان سنج رخ داده شده است پرداخته و با ژن *norA* در سویه

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین NCTC8325 (نماد ژن: SAOUHSC_00703) مقایسه گردیده است.

مواد و روش ها

جمع آوری و تعیین هویت نمونه: در این مطالعه تجربی تعداد ۵۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس، از بیماران مبتلا به عفونت بینی مراجعه کننده به مراکز درمانی شهرستان سنج، در طی سه ماه از شهریور تا آبان سال ۱۳۹۴ جمع آوری شدند. شناسایی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از رنگ آمیزی گرم و آزمایشات بیوشیمیایی رایج از جمله آزمایش کواگولاز، حساسیت به نوویوسین، تخمیر قند مانیتول، DNase، همولیز و حساسیت به پلی میکسین B شناسایی شدند. آزمایش تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی: آزمایش تعیین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف با استفاده از روش دیسک دیفیوژن Kirby-Bauer روی محیط مولر هینتون آگار و طبق استاندارد ۰/۵ مک فارلند و انکوباسیون ۱۸ ساعته در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انجام گرفت. با استفاده از دستورالعمل CLSI مقاومت و حساسیت نسبت به دیسک های آنتی بیوتیکی سیپروفلوکساسین، ونکومایسین، آمیکاسین، اکساسیلین، اریترومایسین، نالیدیکسیک اسید، داکسی سیلین، تتراسایکلین، پنی سیلین و کوتریموکسازول خریداری شده از شرکت Mast بررسی شد.

استخراج DNA و تایید حضور ژن *norA* و پمپ دفعی *NorA* در سویه های استافیلوکوکوس جدا شده: سپس DNA سویه های جمع آوری شده با استفاده از کیت استخراج DNA باکتری های گرم مثبت خریداری شده از شرکت سیناکلون استخراج شد و کیفیت DNA های استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

واکنش PCR برای ژن *norA* تحت شرایط مندرج در جدول شماره ۱ انجام گرفت. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. مشخصات پرایمر در جدول شماره ۲ ذکر شده است. نتیجه آزمایش PCR با تزریق محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (به منظور وضوح تشخیص باندهای حاصله

کنترل کیفیت، سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC29213 به عنوان کنترل مثبت و از آب به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

در رنج bp ۲۰۰-۴۰۰ معمولاً غلظت آگارز ۱/۵ درصد استفاده می شود) با ولتاژ ۱۰۰v به مدت ۴۰ دقیقه و با استفاده از مارکر bp ۱۰۰ (شرکت سیناکلون) تعیین گردید. جهت بررسی

جدول شماره ۱. زمان و دمای دناتوراسیون، اتصال و بسط در PCR

	Initial Denaturation	94°C	10 min
30 cycle	Denaturation	94°C	30s
	Annealing	53.1	30s
	Extention	72°C	1 min
	Final Extention	72°C	10 min

جدول شماره ۲. توالی پرایمرهای استفاده شده

پرایمر	توالی	محصول اندازه	منبع
norA-Fw	5'-TTCACCAAGCCATCAAAAAG-3'	۷۰۵ bp	۸
norA-Rv	5'-CTTGCCTTCTCCAGCAATA-3'		

پس از بررسی پرونده افراد مراجعه کننده به مراکز درمانی ۴۳ درصد افراد مبتلا خانم و ۵۷ درصد آقایان بودند. پس از انجام آزمایشات دیسک دیفیوژن و بررسی فنوتیپی حساسیت به آنتی بیوتیک ها، میزان مقاومت نسبت آنتی بیوتیک های استفاده شده به صورت زیر گزارش شد:

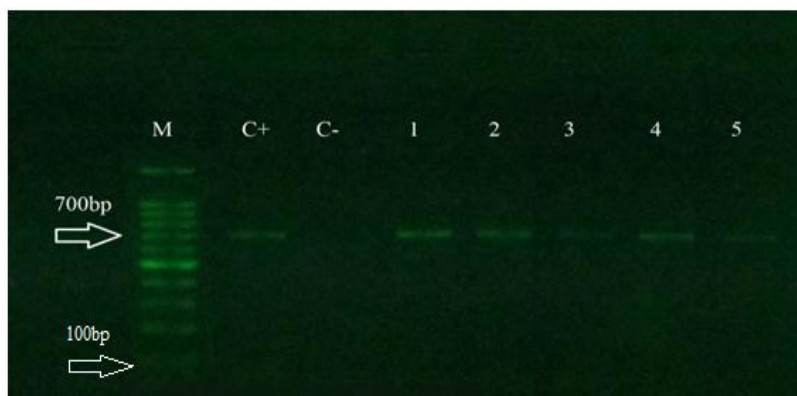
اکساسیلین (۴۲ درصد)، اریترومیسین (۴۶ درصد)، داکسی سیلین (۱۰ درصد)، آمیکاسین (۲۰ درصد)، تتراسایکلین (۲۴ درصد)، پنی سیلین (۶۸ درصد)، سیپروفلوکساسین (۱۰ درصد)، ونکومایسین (۶ درصد) و نالیدیکسیک اسید (۷۰ درصد).

پس از انجام آزمایش تعیین حساسیت و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها، سویه های مقاوم نسبت به سیپروفلوکساسین برای آزمایشات بعدی جدا شدند، از بین ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس ۵ مورد از آن ها نسبت به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. با استفاده از آزمایش PCR و پرایمرهای اختصاصی حضور ژن norA تایید گردید و مشخص شد همه سویه ها دارای پمپ دفعی NorA فعال می باشند (شکل شماره ۱).

تعیین توالی DNA: مقدار ۲۰ μl از محصول PCR ژن norA و هم چنین پرایمرهای استفاده شده، برای انجام آنالیزهای توالی یابی به شرکت ژن فناوران ارسال شد. پس از دریافت توالی های مورد نظر برای بررسی جهش های یکسان توالی دریافت شده از ژن مورد نظر در هر سویه را با توالی ژن norA در سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس NCTC8325 مقاوم به کونینولون (نماد ژن: SAOUHSC_00703) بلاست انجام گرفت. سپس با استفاده از ترجمه گر Expasy توالی های DNA در هر سویه به توالی آمینواسیدی تبدیل و تغییرات ایجاد شده در توالی آمینواسیدی با استفاده از بلاست پروتیین بررسی و گزارش شد.

یافته های پژوهش

در طی ۳ ماه از شهریور تا آبان سال ۱۳۹۴ تعداد ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از عفونت بینی جدا گردید و نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمیایی به صورت کواگولاز مثبت، حساس به نوویوسین، تخمیر قند مانیتول مثبت، DNase مثبت، همولیز مثبت و مقاوم به پلی میکسین بودند.



شکل شماره ۱. نتایج الکتروفورز محصول PCR حاصل از قطعه مورد نظر ژن *norA* (۷۰۵bp): M: مارکر ۱۰۰bp، C+ سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۹۲۱۳ به عنوان کنترل مثبت و C- آب به عنوان کنترل منفی

نتایج بلاست نوکلئوتید برای هر کدام از توالی ها با توالی استاندارد انجام گرفت و در چهار سویه چهار جهش نقطه ای یکسان $G491 \rightarrow A$ ، $C537 \rightarrow T$ ، $A585 \rightarrow G$ ، $C593 \rightarrow C$ شناسایی شد (شکل شماره ۲).

پس از ارسال محصولات PCR به شرکت تکاپوزیست و انجام آزمایش توالی یابی نوکلئوتیدی توسط شرکت Bioneer نتایج حاصل از خوانش نوکلئوتیدی مربوط به رشته رفت و برگشت این ژن در هر سویه به طور مجزا دریافت شد، با استفاده از این

EMBOSS_001	370	TTGGGGCACTTTTCCAAATCTATTTCTTCGATAAAATTTATGAAGTATTTTC	419
EMBOSS_001	749	TTGGGGCACTTTTCCAAATCTATTTCTTCGATAAAATTTATGAAGTATTTTC	798
EMBOSS_001	420	TCAGAGTTAACATTTATAGCTTGGTCATTATTATATTCAGTTGTTGTCTT	469
EMBOSS_001	799	TCAGAGTTAACATTTATAGCTTGGTCATTATTATATTCAGTTGTTGTCTT	848
EMBOSS_001	470	AATATTATTAGTTTTTGCTAATGGCTATTGGTCAATAATGTTAATCAGTT	519
EMBOSS_001	849	AATATTATTAGTTTTTGCTAATGGCTATTGGTCAATAATGTTAATCAGTT	898
EMBOSS_001	520	TTGTTGCTTCATAGGTCTCGATATGATACGACCAGCCATTACAAATTAT	569
EMBOSS_001	899	TTGTTGCTTCATAGGTTTTGATATGATACGACCAGCCATTACAAATTAT	948
EMBOSS_001	570	TTTTCTAATATTG-TAGAAAAAGGGAA	595
EMBOSS_001	949	TTTTCTAATATTGCTGGAGAAAGGCAA	975

شکل شماره ۲. نتیجه بلاست توالی نوکلئوتیدی ایزوله مقاوم شماره ۱ با سویه استافیلوکوکوس NCTC8325، چهار جهش $A \rightarrow G$ ، $T \rightarrow C$ ، $G \rightarrow A$ ، $C \rightarrow G$ در چهار سویه مشترک بودند.

آمینواسیدی رخ داده صورت گرفت در جایگاه ۳۱۵ در ۴ سویه آمینواسید آسپارٹیک اسید به گلايسين تبدیل شده بود (شکل شماره ۳).
GGU--> GAU

سپس توالی نوکلئوتیدها با استفاده از ترجمه گر Expassy به توالی آمینواسیدی تبدیل شدند و قسمت هایی که به پروتیین ترجمه می شوند را جدا کرده و بلاست پروتیین برای مقایسه تغییرات

EMBOSS_001	1	METAEVSHRMETPFYFAGALGILAFIMETSIALIHDPKKVSTNGFQKLEP	50
EMBOSS_001	166	METAEVSHRMETPFYFAGALGILAFIMETSIVLIHDPKVKSTTSGFQKLEP	215
EMBOSS_001	51	QLLTKINWKVFITPVILTLVLSFGLSAFETLYSLYTADKVNYSKDISIA	100
EMBOSS_001	216	QLLTKINWKVFITPVILTLVLSFGLSAFETLYSLYTADKVNYSKDISIA	265
EMBOSS_001	101	ITGGGIFGALFQIYFFDKFMETKYFSELTFIAWSLLYSVVVLILLVFANG	150
EMBOSS_001	266	ITGGGIFGALFQIYFFDKFMETKYFSELTFIAWSLLYSVVVLILLVFAND	315
EMBOSS_001	151	YWSIMETLISFVVFIGFDMETIRPAITNYFSNIA	184
EMBOSS_001	316	YWSIMETLISFVVFIGFDMETIRPAITNYFSNIA	349

شکل شماره ۳. بلاست پروتئین *norA* سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین شماره ۱ برای تعیین جهش های آمینو اسیدی. در چهار سویه D->G تبدیل شده بود.

بحث و نتیجه گیری

استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک عامل بیماری زای قدرتمند که عفونت های متعددی را ایجاد می کند شناخته شده است، این باکتری هم چنین یکی از عوامل اصلی عفونت های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است که امروزه مقاومت چندگانه ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها از جمله بتالاکتام ها، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین ها و فلوروکینولون ها و ماکرولیدها کسب کرده اند، بنا بر این امروزه تعداد محدودی از آنتی بیوتیک ها به عنوان داروهای ضد استافیلوکوکوس هم چون ونکومايسين، سیپروفلوکساسین و تیکوپلانیلین در دسترس هستند (۶).

مکانیسم های مختلفی برای ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم نسبت به فلوروکینولون ها از جمله سیپروفلوکساسین وجود دارد که یکی از آن ها وجود پمپ های دفعی می باشد که باعث خروج آنتی بیوتیک ها و افزایش غلظت آنتی بیوتیک های درون سلولی می شود (۹). مطالعات مختلفی برای بررسی ارتباط پمپ دفعی *norA* و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های فلوروکینولونی صورت گرفته است که نمونه هایی از نتایج به دست آمده بحث خواهد شد. دیدگاه یکسانی که در برخی مطالعات انجام شده به منظور افزایش بیان ژن *norA* و ایجاد مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین وجود داشت

گزارش جهش های مختلف در ناحیه پروموتور بود و هم چنین در برخی از مطالعات هیچ گونه جهشی مشاهده نشده و تفسیر دلیل ایجاد مقاومت نسبت به فلوروکینولون ها را امکان وجود سیستم پمپ دفعی دیگر در نظر گرفتند.

کاتز و همکاران در طی مطالعات خود در سال ۱۹۹۷-۱۹۹۳ به این نتیجه رسیدند که بیان بیش از حد ژن *norA* عامل مقاومت به فلوروکینولون ها می باشد و می تواند در حضور یا عدم حضور توپوایزومراز صورت بگیرد (۵،۱۰) و در سال ۲۰۰۴ بیان کردند جهش در ناحیه پروموتور ژن *norA* یا القای تغییر در عملکرد پروتئین های تنظیمی نیز از عوامل بیان بیش از حد این ژن است (۱۱). در سال ۱۹۹۴ مطالعه ان جی و همکاران تغییر آمینو اسیدی تیمین با آدنین در پروموتور ژن *norA* را عامل این دسته از مقاومت دانستند. در مطالعه دیگر هیچ جهشی در ژن *norA* و پروموتور آن دیده نشد و مقاومت به فلوروکینولون ها مستقیماً مربوط به پمپ دفعی افلاکس دانستند (۱۲) سال ۲۰۰۳ در مطالعه لورا و همکاران با بررسی توالی *norA* و پروموتور آن هیچ تفاوتی بین سویه های مقاوم نسبت به سیپروفلوکساسین وجود نداشت و northern blotting هیچ تفاوتی بین بیان ژن *norA* در سویه ها را تایید نکرد آن ها با توجه به این دستاوردها وجود سیستم دفعی دیگر را عامل این دسته

می تواند عامل بیان بیش از حد ژن norA و دلیل مقاومت به فلوروکوینولون ها باشد، که می تواند به دلیل منشاء جداسازی و محیط فرارگیری باکتری باشد. لذا نتایج حاصل شده در مطالعات مختلف وجود جهش های مختلف و حتی عدم جهش را به عنوان عامل مقاومت در این دسته از آنتی بیوتیک ها عنوان کرده است و انتظار هم خوانی بین نتایج بررسی های مختلف وجود ندارد. بررسی های بیشتری لازم است که تاییدکننده قطعی این موضوع باشد که جهش آمینواسیدی ذکر شده باعث بیان بیش از حد ژن norA و مقاومت به سیپروفلوکساسین می باشد. هم چنین با توجه به شیوع کم سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین یافتن راه هایی برای جلوگیری از گسترش آن ضروری و اجتناب ناپذیر می باشد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی باشگاه پژوهشگران و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج می باشد و با حمایت مالی این مرکز به انجام رسیده است، لذا بر خود لازم می دانیم از حامیان این طرح تشکر و سپاسگزاری نماییم.

References

1. Scmitz F, Jones M, Hofmann B, Hansen B, Scheuring S. Characterization of grlA grlB gyrA and gyrB mutation in 116 unrelated isolates of staphylococcus aureus and effects of mutation on ciprofloxacin MIC. *Antimicrob Agents Chemotherap*1998; 42: 1249-52
2. Ahmadi Z, Tajbakhsh E, Momtaz H. Antibiotic resistance pattern in staphylococcus aureus isolated from clinical sampels in imam Reza hospital of Kermanshah. *Microbs Worlds* 2013; 17: 299-311
3. Laura J, Piddock V, Jin Y, Mark A, Webber J, Martin J. Novel Ciprofloxacin resistant, nalidixic acid susceptible mutant of staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemotherap* 2002; 46: 2276-8.

از مقاومت دانستند(۳). در مطالعه فورنیر و همکاران روی پرموتور ژن norA در ناحیه ۸۹ bp بالادست کدون آغاز و موتیف ۱۰- پایین دست ناحیه UTR-۵ جهش هایی را مشاهده کردند(۱۳). در سال ۲۰۰۰ سیرا و همکاران هیچ ارتباطی بین مقاومت آنتی بیوتیکی و جهش های رخ داده در ناحیه کننده ژن norA مشاهده نکردند(۸). در سال ۲۰۰۷ در مطالعه کارمن و همکاران نیز عامل بیان بیش از حد ژن norA ایجاد جهش حذف یا اضافه شدن در ناحیه پرموتور بود(۱۴).

در مطالعه حاضر در سال ۲۰۱۶ در ۴ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین ۴ جهش نقطه ای مشترک در جایگاه های مختلف شناسایی شد، (C593->C, A585->G, C537->T, G491->A) و پس از بررسی توالی آمینواسیدی در جایگاه ۳۱۵ آمینو اسید اسپارتیک اسید GGU به گلیسین GAU تبدیل شد که جهش نقطه ای G->A عامل آن بود. یکی از سویه ها هیچ گونه جهش مشابهی با سایر سویه ها نداشت که علت آن خوانش نامناسب در حین آزمایش توالی یابی بود و امکان تفسیر آن وجود نداشت. با توجه به اطلاعات کسب شده از مطالعات مشابه مشخص است که عوامل و جهش های مختلف و در جایگاه های گوناگون

4. Kaatz G, Seo S. Inducible NorA mediate multidrug resistance in staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemotherap*1995; 39: 2650-5.
5. Neyfakh AA, Borsch CM, Kaatz GW. Fluoroquinolone resistance protein NorA of Staphylococcus aureus is a multidrug efflux trans-porter. *Antimicrob Agents Chemotherap*1993; 37: 128-9.
6. Costa S, Viveiros M, Amaral L, Couto I. Multidrug efflux pumps in Staphylococcus aureus an update. *Open Microbiol J* 2013; 7: 59-71.
7. Mohammed F, Marjani A, Ahlam K. Dawood S. Identification of an efflux pump gene NorA in methicillin resistant Staphylococcus aureus in Baghdad. *World J Pharmaceutical Res*2015; 4: 346-56.

8. Sierra J, Ruiz J, Jimenez D, Vila J. Prevalance of two different genes encoding NorA in 23 clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrobi Chemotherap* 2000; 46: 145-6.
9. Purmand R, Yusefi M, Salami S, 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; 52:424-9.
10. Kaatz GW, Seo SM. Mechanisms of Fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemotherap* 1997; 41: 2733-7.
11. Kaatz GW, Seo SM. Effect of substrate exposure and other growth condition manipulations on NorA expression. *J Antimicrob Chemotherap* 2004; 54: 364-9.
12. Ng E Y, Trucksis M, Hooper D C. Quinolone resistance mediated by NorA physiologic characterization and relationship to flqB, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. *Antimicrob Agents Chemotherap* 1994; 38:1345-55.
13. Fournier B, Truongbolduc QC, Zhang X. A mutation in the 5 untranslated region increases stability of NorA mRNA encoding a multidrug resistance transporter of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2001; 183: 2367-71.
14. Carmen E, Laurel A, Emmanuel F, Susan M, Tinevimbo A, Kaatz W. Efflux related resistance to Norfloxacin Dyes and Biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemotherap* 2007; 51: 3235-9.

Identification and Investigation of norA Gene Mutations by Nucleotide Sequencing in Ciprofloxacin Resistance Staphylococcus aureus Isolated from Nasal Infection in Sanandaj Town, Western Iran

Sadatzonouri S^{1*}, Amini S²

(Received: November 1, 2016

Accepted: March 5, 2017)

Abstract

Introduction: Fluoroquinolones are among useful antibiotics against infections caused by Staphylococcus aureus, but today resistance to these classes of antibiotics is a serious problem in patient's treatments. Overexpression of norA gene is a Fluoroquinolone resistance mechanism in Staphylococcus aureus to be studied through our investigation.

Materials & Methods: In this study, 50 Staphylococcus aureus strains were isolated from nasal infection in Sanandaj town. These strains were then identified by conventional biochemical tests. Disk diffusion testing for antibiotic resistance assessment and PCR for existence of norA gene were done. Then, PCR products were sent to Bioneer Company for sequential testing. As a result, nucleotides and amino acid mutations were studied, based on sequencing results and Expassy translator.

Findings: The results of biochemical tests were as coagulase, mannitol fermentation,

DNase and hemolysis positive, novobiocin sensitive and polymyxin resistance. Oxacillin (42%), erythromycin (46%), doxycyclin (10%), amikacin (20%), tetracycline (24%), penicillin (68%), ciprofloxacin (10%), vancomycin (6%), nalidixic acid (70%) were the antibiotics to which resistance rate was assessed. All the resistance strains had norA gene and 4 identical points of mutation were identified as, G491->A, C537-> T, C593-> C and A585->G respectively. Then, after translation in D315 base, aspartic acid (D) had been converted into Glycine (G).

Discussion & Conclusion: According to our results, common nucleotide and amino acid mutations were observed in four strains of ciprofloxacin resistant Staphylococcus aureus. Therefore, more studies are needed to find out if the mentioned mutation is the cause of overexpression of norA.

Keywords: staphylococcus aureus, disk diffusion, blast, expasy, sequencing

1. Young Researchers and Elite Club, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

2. Dept of Cellular and Molecular Biology, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

* Corresponding author Email: sheidazonoori@gmail.com