

Paper Type: Original Article



## Evaluation of norB Gene Expression in Ciprofloxacin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains

Salman Asadi Pirzadeh<sup>1</sup>, Mehdi Ebrahimi<sup>2,\*</sup>, Mohamad Ebrahimzadeh<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc. Student, Department of Genetics, College of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran; [salmanasadi2035@gmail.com](mailto:salmanasadi2035@gmail.com).

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Biochemistry and Biophysics, College of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran; (**Corresponding author:** [ebrahimi@iauvaramin.ac.ir](mailto:ebrahimi@iauvaramin.ac.ir)).

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Biology, College of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran; [ebrahimzadeh\\_md@yahoo.com](mailto:ebrahimzadeh_md@yahoo.com).

### Citation:

Asadi Pirzadeh, S., Ebrahimi, M., & Ebrahimzadeh, M. (2023). Evaluation of norB gene expression in ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *The quarterly scientific journal of applied biology*, 36 (3), 7-16.

Received: 31/10/2022

Accepted: 12/06/2023

### Abstract

**Introduction:** Today, antibiotic resistance to staphylococcal infection has become a major problem in hospitals and the community. This study aims to investigate the norB gene expression level in quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples in Qom City.

**Methods:** *Staphylococcus aureus* isolates were obtained from different clinical samples using standard biochemical and culture methods. The presence of femA genes as a molecular diagnosis of *Staphylococcus aureus*, norB as a target gene, and rpoD as a reference gene were investigated using the Multiplex PCR technique. The pattern of antibiotic resistance was determined using the standard disk diffusion method, and the minimum inhibitory concentration of the ciprofloxacin antibiotic of the isolated strains was determined using the microdilution method. The expression level of the norB gene was determined using a real-time PCR method.

**Results:** 82 isolates were obtained from 240 clinical samples using standard biochemical and culture methods. Multiplex PCR technique had shown that genes femA, norB, and rpoD are simultaneously present in 40 isolates (48/78%). Also, after analyzing the antibiotic pattern, 26 strains were resistant to ciprofloxacin. The results of the real-time PCR technique indicated an increase in norB gene expression among ciprofloxacin-resistant strains. According to the obtained results, the norB efflux pump plays an essential role in creating resistance to ciprofloxacin, and investigating the presence of this gene can be important in suggesting a treatment model.

**Conclusion:** The low diversity and abundance of food items in the cave habitat implies a more intense competition for food in the cave's unique environment with low energy resources. The presence of various-sized prey among the food items indicates an opportunistic feeding habit in this toad, as well.

**Keywords:** Ciprofloxacin, Efflux pump, Gene norB, Real-time PCR, *Staphylococcus aureus*.



Corresponding Author: [ebrahimi@iauvaramin.ac.ir](mailto:ebrahimi@iauvaramin.ac.ir)



<https://doi.org/10.22051/jab.2023.42160.1522>



## بررسی میزان بیان ژن پمپ افلاکس norB در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم در برابر سیپروفلوکساسین

سلمان اسدی پیرزاده<sup>۱</sup>، مهدی ابراهیمی<sup>۲</sup>، محمد ابراهیم زاده<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران.

<sup>۲</sup> استادیار، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران.

<sup>۳</sup> استادیار، روه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران.

نویسنده مسئول: ebrahimi@iauvaramin.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۲

دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۰۹

### چکیده

**مقدمه:** امروزه مقاومت آنتی‌بیوتیکی عفونت استافیلوکوکی هم در بیمارستان‌ها و هم در محیط جامعه به یک مشکل اساسی تبدیل شده است. هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان ژن norB در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به کینولون جدا شده از نمونه‌های بالینی در شهر قم در سال ۱۳۹۶ است.

**روش‌ها:** ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های مختلف بالینی با روش‌های استاندارد بیوشیمیایی و کشت به دست آمد. در ادامه با استفاده از تکنیک Multiplex PCR حضور ژن‌های femA به‌عنوان تشخیص مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس، norB به‌عنوان ژن هدف و rpoD به‌عنوان ژن رفرنس مورد بررسی قرار گرفتند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت مهارتی آنتی‌بیوتیک سویه‌های جدا شده با روش میکروداپلیوشن تعیین شد. میزان بیان ژن norB با استفاده از روش Real-Time PCR اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** از ۲۴۰ نمونه بالینی جمع‌آوری شده، تعداد ۸۲ سویه استافیلوکوکوس اورئوس با روش‌های استاندارد بیوشیمیایی و کشت جداسازی شد. با بررسی مولکولی، حضور هم‌زمان ژن‌های femA، norB و rpoD در ۴۰ ایزوله (۱۶.۷٪) تایید شد. هم‌چنین با بررسی الگوی آنتی‌بیوتیکی تعداد ۲۶ سویه مقاوم به سیپروفلوکساسین شناسایی شدند. نتایج به‌دست‌آمده از تکنیک Real Time PCR نشان‌دهنده افزایش بیان ژن norB در میان سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین بود.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتیجه به‌دست‌آمده پمپ افلاکس norB در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین نقش اساسی دارد و بررسی حضور این ژن می‌تواند در پیشنهاد الگوی درمانی حایز اهمیت باشد.

کلیدواژه‌ها: استافیلوکوکوس اورئوس، پمپ افلاکس، ژن norB، سیپروفلوکساسین، Real-Time PCR.

### ۱- مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس از جمله مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی در جامعه است [1]-[3]. تخمین زده می‌شود که ۲۰٪ جمعیت انسانی، حاملین طولانی‌مدت استافیلوکوکوس اورئوس باشند. استافیلوکوکوس‌ها، کوکسی‌های گرم مثبت، بی‌حرکت، دارای کپسول

در درون میزبان، فاقد پیللی و فاقد اسپور محسوب می‌شوند. در چرک به صورت تکی، دوتایی، چهارتایی، زنجیره‌های کوتاه و توده‌های نامنظم شبیه خوشه انگور دیده می‌شوند [4]. استافیلوکوکوس اورئوس به دلیل قدرت بیماری‌زایی بالقوه و مقاومت روزافزون در برابر عوامل ضد باکتریایی به یکی از مشکلات بهداشتی مهم در جهان تبدیل شده است. این باکتری توانایی ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها را دارد و از طریق تولید انواع سم‌ها، تهاجم مستقیم و تظاهرات بالینی متنوعی را پدید می‌آورد [3]-[1]. امروزه ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس (MRSA) به‌عنوان خطرناک‌ترین سویه‌های بیماری‌زایی تلقی می‌گردند [5]. پمپ‌های افلاکس با انتقال فعال ترکیبات دارویی به خارج از سلول موجب کاهش نفوذپذیری غشا نسبت به ترکیبات دارویی و در نتیجه بروز مقاومت‌های چنددارویی می‌شوند [6]. کینولون‌ها در دهه ۱۹۶۰ از ترکیبات ضد مالاریایی کینین به‌عنوان یک محصول فرعی به دست آمدند. مشتقات فلوردار کینولون‌ها مانند سیپروفلوکساسین، نوروفلوکساسین و اوفلوکساسین در دهه ۱۹۸۰ معرفی شدند. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های فوق‌علیه پاتوژن‌های گرم مثبت مانند ایزوله‌های MRSA می‌تواند منجر به مقاوم‌شدن آن‌ها در برابر این آنتی‌بیوتیک‌ها شود. در حال حاضر، مقاومت نسبت به کینولون‌ها در ایزوله‌های MRSA را شاید بتوان حدود ۹۰٪ تخمین زد [7]، [8].

مقاومت نسبت به کینولون‌ها بر اثر موتاسیون‌های کروموزومی ایجاد می‌شود. علاوه بر این، سیستم‌های افلاکس به‌ویژه پمپ افلاکس NorA و NorB و سبب دفع آنتی‌بیوتیک و کاهش غلظت درون‌سلولی می‌شود که نتیجه آن، کاهش عملکرد ترکیبات دارویی است. از همین رو این پمپ‌ها نقش بسزایی در مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به کینولون‌ها به‌ویژه سیپروفلوکساسین ایفا می‌کنند. این سازمان‌دهی و عملکرد، موجب خارج شدن آنتی‌بیوتیک از میان هردو غشای داخلی و خارجی در باکتری‌ها می‌شود [6]، [9]، [10]. پمپ‌های خانواده Nor می‌توانند علاوه بر دفع انواع مختلف کینولون‌ها، (مانند نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین که جزء آب‌دوست‌ها هستند و موکسی‌فلوکسایین و اسپارفلوکساسین جزء آب‌گریزها هستند)، ترکیبات شیمیایی دیگر مانند برومایدبرمید، ستریمید و تترافنیل فسفونیوم را نیز دفع کنند [11].

با توجه به این‌که عفونت استافیلوکوکوس اورئوس به‌ویژه سویه‌های MRSA به دلیل فقدان درمان سریع و مناسب، عدم کارایی مناسب و گران بودن داروهای در دسترس، چالش مهمی در کنترل عفونت در بیمارستان‌ها محسوب می‌شود [12]. در این تحقیق فراوانی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم جدا شده از بیماران نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولونی بررسی شده و میزان بیان ژن norB به‌عنوان یکی از ژن‌های دخیل در بروز مقاومت در بین سویه‌های حساس و سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک فلوروکینولونی ارزیابی شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- جمع‌آوری نمونه‌های مشکوک

جامعه مورد مطالعه، شامل کلیه سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به‌دست‌آمده از نمونه‌های بالینی بیماران بستری و هم‌چنین نمونه‌های مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس در آزمایشگاه‌های بیمارستان‌ها و مراکز درمانگاهی سطح شهر قم است. نمونه‌های زخم جراحی با مراجعه به بیمارستان‌های نکونی-هدایتی (بخش جراحی زنان)، علی‌بن‌ابیطالب علیه‌السلام (بخش جراحی) جمع‌آوری گردیدند. هم‌چنین ایزوله‌های مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس از آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های نکونی-هدایتی، علی‌بن‌ابیطالب علیه‌السلام، امام رضا علیه‌السلام و درمانگاه امام صادق علیه‌السلام در مدت سه ماه (از شهریور ۹۶ الی آبان ۹۶) به دست آمدند. نمونه‌های بخش‌های بیمارستانی با استفاده از سوآپ استریل پس از تمیز کردن سطح زخم از بخش‌های عمقی زخم دریافت شد و بلافاصله در لوله‌های حاوی محیط مایع مغز و قلب (BHI) استریل تلقیح شده و ظرف مدت زمان ۴ ساعت تا ۶ ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. پس از آن لوله‌ها یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شده و سپس مقدار یک لوپ از محیط به‌صورت کشت چهارمرحله‌ای بر روی محیط مغز و قلب آگار کشت داده شد. پرگنه‌های به‌دست‌آمده با آزمایش‌های رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، کواگولاز لام و لوله‌ای، رشد بر روی مانتیول سالت آگار، رشد بر روی محیط بلاد آگار و آزمایش DNase ارزیابی شدند.

### ۲-۲- تکثیر ژن‌های femA, norB, rpoD با استفاده از Multiplex PCR

در این مرحله برای شناسایی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن norB از روش Multiplex PCR استفاده شد. در این تکنیک سه ژن femA, norB و rpoD در جدایه‌ها به‌صورت هم‌زمان بررسی شدند. پرایمرهای ژن femA برای شناسایی مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس، به‌عنوان

ژن تشخیص دهنده سویه‌ها، انتخاب شد [13]–[16]. پرایمرهای مربوط به ژن‌های norB با استفاده از نرم‌افزار oligo7 طراحی شد. همه پرایمرها توسط شرکت پیشگام سنتز شدند. توالی‌های استفاده شده در جدول ۱ و غلظت‌ها و مقادیر ترکیبات فرآیند PCR در جدول ۲ اشاره شده است. واکنش‌ها به‌صورت واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ دور شامل واسرشتگی (۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه)، اتصال (۵۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه) و گسترش (۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه) و گسترش نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۷ دقیقه انجام شد.

جدول ۱- توالی پرایمر ژن‌های femA، norB و rpoD.

Table 1- The sequence of primers for femA, norB, and rpoD genes.

Gene	Primers (5'-3')	Product Size (bp)	Reference
femA	F-CGATCCATATTTACCATATCA R-ATCACGCTCTTCGTTTGTG	450	[16]
norB	F-ATGATTCGTGTWGGTGAAAA R-CATTTTATAGATACCTGMAGC	258	This study
RpoD	F- CACGAGTGATTGCTTGTC R- GATACGTAGGTCGTGGTATG	129	[17]

جدول ۲- غلظت‌ها و مقادیر اجزاء پروسه PCR برای ژن‌های femA، norB و rpoD.

Table 2- Concentrations and volume of PCR process components for femA, norB, and rpoD genes.

Content	Volume (μl)	Concentration
Primers (F, R) femA	1	20 pmol
Primers (F, R) norB	1	20 pmol
Primers (F, R) rpoD	1	20 pmol
Master Mix PCR	12.5	2x
DNA (Templet)	1	50 ng
DW	up to 25μl	

### ۳-۲- تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی پلی میکسین ب، سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، نورفلوکساسین و لووفلوکساسین استفاده شد. از کشت ۱۸ ساعته تا ۲۴ ساعته باکتری‌های رشد یافته در محیط بلاداآگار سوسپانسیون با کدورتی معادل غلظت ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد. سپس از این سوسپانسیون با سواب استریل روی محیط مولر هینتون آگار در سه جهت مختلف تلقیح کرده و پس از چند دقیقه دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فاصله ۲۲ میلی‌متر از یکدیگر و ۱۶ میلی‌متر از جداره پلیت روی محیط قرار داده شدند. پس از آن در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شده و سپس قطر هاله عدم رشد برای کلیه آنتی‌بیوتیک‌ها پس از ۱۶ ساعت تا ۲۰ ساعت با خط‌کش اندازه‌گیری شد. از سویه استاندارد *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 جهت کنترل آزمایشات تعیین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده شد.

### ۴-۲- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

آزمایش تعیین MIC با استفاده از محیط کشت مولر هینتون براث، محلول آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در DMSO (۴۰۹۶ میکروگرم پودر آنتی‌بیوتیک در یک میلی‌لیتر حلال) و سوسپانسیون باکتریایی در سرم فیزیولوژیک با کدورتی معادل غلظت ۰/۵ مک‌فارلند و در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای بر طبق استانداردهای CLSI انجام شد. مولر هینتون براث به‌تنهایی به‌عنوان کنترل منفی و سوسپانسیون باکتری نیز به‌تنهایی به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس کدورت هر خانه بررسی شده و اولین خانه از هر ستون که باکتری در آن رشد نکرده باشد، به‌عنوان غلظت MIC در نظر گرفته شد [18].

### ۵-۲- ارزیابی میزان بیان ژن norB

جدایه‌های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم و سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس در دو محیط کشت BHI حاوی غلظت sub MIC آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و بدون آنتی‌بیوتیک تا OD حدود ۰/۶ کشت داده شد. استخراج RNA توسط کیت استخراج RNX-plus (سیناژن) صورت گرفت. پس از آماده شدن RNA ساخت cDNA از آن با استفاده از کیت (vivantis) 2-steps RT-PCR Kit در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. واکنش Real-Time PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن rpoD به‌عنوان ژن رفرنس و ژن هدف norB با مخلوط آماده Real-

Time PCR انجام شد (جدول ۱). برای بررسی کارایی پرایمرها، واکنش real-time PCR با استفاده از غلظت‌های مختلف cDNA انجام شده و با رسم نمودار استاندارد کارایی واکنش ژن‌های *rpoD* و *norB* به ترتیب تعیین شد. واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر، با استفاده از ترکیب EvaGreen و مخلوط واکنش Real-Time PCR آماده (شرکت پیشگام) در دستگاه step one plus (آلمان) انجام شد. شرایط دما و زمان مورد استفاده برای Real-Time PCR در جدول ۳ بیان شده است. واکنش‌ها به صورت دو تکرار همراه با یک کنترل منفی انجام گرفت. داده‌های به دست آمده از واکنش Real-Time PCR و تغییرات بیان ژن *norB* در مقایسه با *rpoD* در حضور رقت‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار REST مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

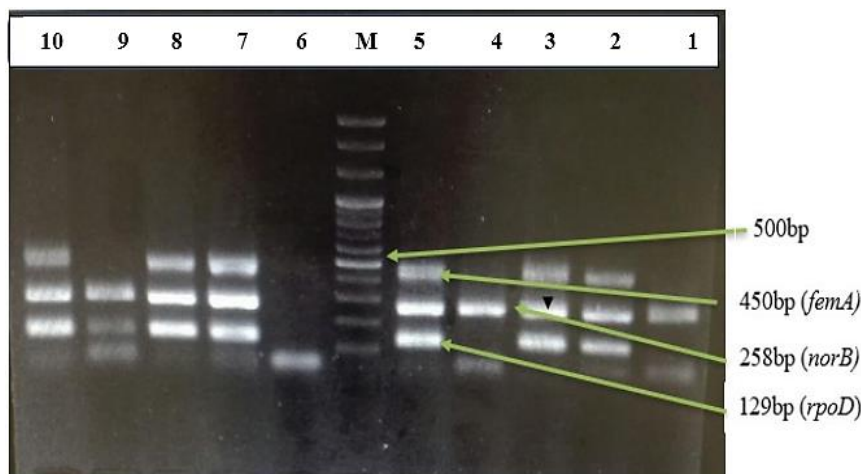
جدول ۳- شرایط دمایی و زمانی Real Time PCR ژن‌های *norB* و *rpoD*.

Table 3- Temperature and time conditions of Real-Time PCR of *norB* and *rpoD* genes.

Real-Time PCR Program	norB (258 bp), rpoD (115 bp)	
	Temperature	Time
40x	Denaturation	95°C
	Denaturation	95°C
	Annealing	54°C
	Extention	72°C
	Final Extension	72°C
		15'
		20"
		20"
		30"
		5'

## ۲-۶- نتایج

از میان ۲۴۰ نمونه جمع‌آوری شده از بخش‌های بستری بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های بیمارستان‌ها و درمانگاه‌های سطح شهر قم، تعداد ۸۲ جدایه با روش‌های بیوشیمیایی و کشت (گرم مثبت، کاتالاز مثبت، کواگولاز مثبت، DNase مثبت و دارای همولیز بتا) به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شد. بررسی ژن‌های *femA*، *norB* و *rpoD* به صورت هم‌زمان و با واکنش Multiplex PCR انجام شد. از میان ۸۲ جدایه بررسی شده، ۴۰ سویه حاوی هر سه ژن *femA*، *norB* و *rpoD* تشخیص داده شدند (شکل ۱).



شکل ۱- الکتروفورز محصول Multiplex PCR ژن‌های *femA*، *norB* و *rpoD* روی ژل آگارز.

Figure 1- Electrophoresis of multiplex PCR product of *femA*, *norB*, and *rpoD* genes on agarose gel.

ستون M مارکر 100 bp (شرکت سینا کلون)، ستون ۶ کنترل منفی (no DNA)، ستون ۵ کنترل مثبت (سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923)، ردیف‌های ۲، ۳، ۷، ۸ و ۱۰ ایزوله‌های بالینی مثبت، ردیف ۱، ۴ و ۹ ایزوله بالینی منفی می‌باشد.

نتایج ارزیابی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به روش دیسک دیفیوژن آگار و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ۴۰ جدایه مورد بررسی در جدول ۴ بیان شده است.

جدول ۴- میزان حساسیت به آنتی بیوتیک های مختلف در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی.

Table 4- The sensitivity to different antibiotics in the *Staphylococcus aureus* strains.

Antibiotic (Disc)	Number of Isolates (%)		
	Sensitive	Intermediate	Resistant
Ciprofloxacin	13 (32.5)	1 (2.5)	26 (65)
Ofloxacin	12 (30)	-	28 (70)
Norfloxacin	12 (30)	1 (2.5)	27 (67.5)
Levofloxacin	11 (27.5)	-	29 (72.5)
Polymyxin B	-	-	40 (100)

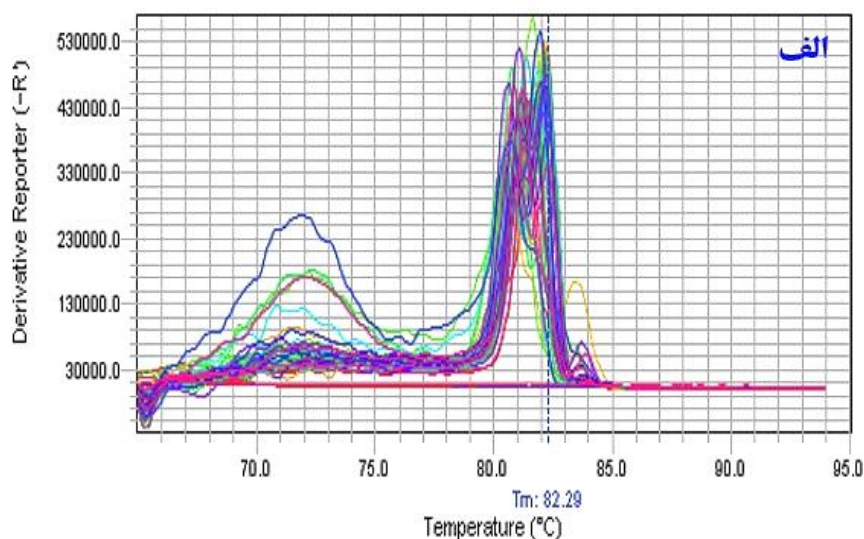
حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی بیوتیکی ۲۶ جدایه مقاوم به دیسک آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در جدول ۵ بیان شده است.

جدول ۵- حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس.

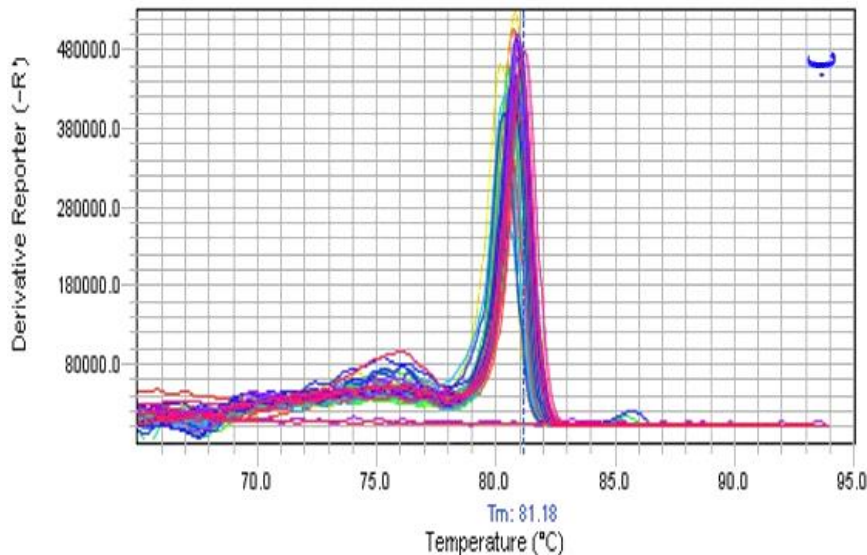
Table 5- The minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin antibiotic in *Staphylococcus aureus* isolates.

Isolate Number	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	Isolate Number	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
11	32	61	128
12	16	62	256
13	32	63	168
14	16	64	256
15	128	65	64
20	128	68	128
21	64	69	64
24	128	70	256
30	16	71	256
31	128	72	128
32	32	73	64
40	256	74	32
41	128	75	16

سنجش کمی بیان ژن *norB* در سویه های مقاوم به فلوروکینولون ها با تکنیک real-time RT-PCR انجام شد. ژن *rpoD* به عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شد و میزان بیان ژن *norB* نسبت به ژن مرجع اندازه گیری شد. منحني ذوب به دست آمده برای هر یک از ژن های *norB* و *rpoD* نشان دهنده اختصاصیت واکنش real-time PCR است (شکل ۲). نتایج به دست آمده نشان داد میزان بیان ژن *norB* در حضور آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین به طور میانگین حدود ۶۰ برابر نسبت به غیاب آنتی بیوتیک افزایش داشت (شکل ۳).

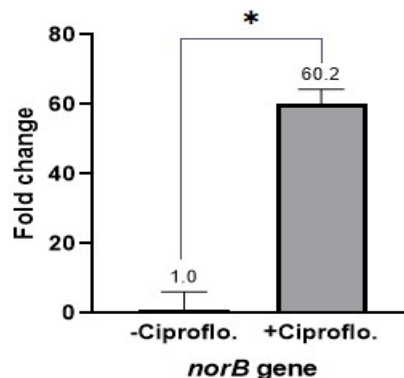






شکل ۲- منحنی‌های ذوب واکنش real-time PCR (الف: ژن *norB* و ب) ژن *rpoD*.  
Figure 2- Melting curves of real-time PCR reaction; a) *norB* gene and b) *rpoD* gene.

در این منحنی‌ها قله اضافی مشاهده نشد که نشان‌دهنده اختصاصیت واکنش است.



شکل ۳- تغییرات بیان ژن *norB* در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین در غیاب سیپروفلوکساسین و در حضور سیپروفلوکساسین.

Figure 3- Changes in *norB* gene expression in *Staphylococcus aureus* isolates resistant to ciprofloxacin in the absence of ciprofloxacin and the presence of ciprofloxacin.

نماد \* نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف بین دو گروه ( $P=0.000001$ ) است.

### ۳- نتیجه‌گیری

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط مساعد می‌تواند در تمام نقاط بدن انسان عفونت‌های شدید و خطرناک ایجاد نماید. استافیلوکوکوس اورئوس عوامل حدت‌زایی را ترشح می‌کند که در استقرار و بیماری‌زایی این باکتری در میزبان‌ها نقش دارند [19]. از آنجایی‌که این باکتری دارای ژنومی انعطاف‌پذیر است، سویه‌های بیماری‌زا و مقاوم به داروی آن گسترش یافته است [20]. یکی از مشکلات عمده در درمان و پیشگیری از عفونت‌های ایجادشده توسط استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از قبیل بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها و فلوروکینولون‌ها است که این مساله موجب گسترش عفونت‌های ناشی از این باکتری و هم‌چنین بروز مشکلاتی از قبیل افزایش مرگ‌ومیر، افزایش جراحات وارده به بیماران بستری‌شده، افزایش هزینه‌های درمان به دلیل نیاز به آنتی‌بیوتیک‌های گران‌قیمت، افزایش مدت زمان بستری بیماران در بیمارستان‌ها و افزایش هزینه‌های بیمه‌های درمانی شده است. این مساله پزشکان را جهت درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس با محدودیت‌های بسیاری مواجه کرده است [1]. از همین رو در این مطالعه میزان مقاومت سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس

جدا شده از بیماران را نسبت به آنتی بیوتیک‌های فلوروکینولونی بررسی شده و نقش ژن *norB* را به‌عنوان یکی از ژن‌های دخیل در مقاومت ارزیابی شد. در مطالعه حاضر در مجموع از میان ۲۴۰ سویه مشکوک جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های رایج بیوشیمیایی و روش‌های مولکولی بررسی شدند. بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و کشت شامل کاتالاز، کوآگولاز، کشت در محیط مانیٹول‌سالت‌آگار، بررسی همولیز در محیط بلاد آگار و بررسی خاصیت DNase، از ۲۴۰ سویه مشکوک تعداد ۸۲ جدایه به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شدند. از آنجایی که این سویه‌های مشکوک توسط آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و بیمارستانی، به‌عنوان استافیلوکوک گزارش شده بودند، نتیجه به‌دست‌آمده نشان داد که اغلب آزمایشگاه‌ها این نمونه‌ها را تنها تا سطح گونه شناسایی کرده و به‌عنوان جنس استافیلوکوکوس اورئوس گزارش می‌کنند. در نتیجه به نظر می‌رسد برای انتخاب روش درمانی موثرتر نیاز است که آزمایشگاه‌ها، تست‌های بیوشیمیایی تشخیصی استافیلوکوکوس اورئوس را تا سطح سویه ادامه دهند. هم‌چنین علاوه بر روش‌های متداول آزمایشگاهی باید از تکنیک‌های دقیق‌تری مانند روش‌های مولکولی جهت تشخیص و یا تایید سویه‌های مشکوک استفاده شود. تشخیص سریع استافیلوکوکوس اورئوس در روند بهبود بیماری و کاهش هزینه‌ها تاثیر قابل توجهی دارد [21]. استافیلوکوکوس اورئوس مجموعه‌ای از ژن‌های بسیار حفاظت‌شده‌ای را حمل می‌کند که می‌توان از این ژن‌ها برای تشخیص سریع این پاتوژن استفاده کرد. در تعداد زیادی از مطالعات مولکولی ژن محافظت شده *femA* به‌عنوان ژن شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس بکار گرفته شده است [22]، [23]. پروتئین حاصل از این ژن جزء پروتئین‌های سیتوپلاسمی ضروری در بیوسنتز دیواره سلولی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به‌خصوص در سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین است [24]. تمامی ۸۲ جدایه تایید شده توسط تست‌های بیوشیمیایی، با استفاده از روش Multiplex PCR بررسی شدند. از این میان تعداد ۴۰ جدایه (۴۸/۷۸٪) حاوی هر سه ژن *femA*، *norB* و *rpoD* تشخیص داده شدند. با این که ژن *femA* در تحقیقات متعدد به‌عنوان یک ژن حفاظت شده در شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ اما نتایج برخی تحقیقات نشان می‌دهد که ژن *femA* قادر به شناسایی درصد بالایی از استافیلوکوکوس اورئوس‌ها نیست. چیکالا و همکاران [14] شناسایی ژن‌های مربوط به تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس (*femA*، *mecA*)، *femA*، *nuc*، *16srRNA* و *femA-1*) را بررسی کرده و پس از مقایسه این ژن‌ها بیان داشتند که به علت ناهمگنی ژن *femA*، مفید بودن این ژن به‌عنوان یک نشانگر اختصاصی برای گونه استافیلوکوکوس اورئوس دارای محدودیت‌هایی است. الگوی درمانی عفونت استافیلوکوکوس اورئوس ممکن است از یک منطقه به منطقه دیگر متفاوت باشد و این کاملاً به الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن ناحیه، فعالیت‌های مربوط به کنترل عفونت وابسته است؛ لذا جهت درمان مناسب و کنترل عفونت ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس شناخت الگوی مقاومتی آن الزامی است [25]، [26]. هم‌چنین نتایج تحقیقات متعدد نشان می‌دهد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولونی در حال افزایش است و یکی از سیستم‌های مقاومت به این نوع آنتی‌بیوتیک‌ها، مکانیسم پمپ افلاکس است [27]. به همین علت الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به ۴ نوع آنتی‌بیوتیک خانواده فلوروکینولونی بررسی شد. یافته‌های به‌دست‌آمده در الگوی آنتی‌بیوگرام نشان داد که تمامی ایزوله‌های به‌دست‌آمده در این تحقیق نسبت به پلی میکسین B مقاوم هستند (۱۰۰٪) که بیشترین درصد مقاومت را در بین آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده به خود اختصاص داد. هم‌چنین کمترین میزان مقاومت با ۲۶ نمونه (۶۵٪) مربوط به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین تعیین شد. در مطالعه نیتا و همکاران که در سال ۲۰۱۳ در هند انجام شد نیز بیشترین مقاومت‌ها نسبت به پی‌سیلین (۸۹/۲٪) و کمترین آن ونکومايسين و لینزولید (۰٪) بود و در میان فلوروکینون‌ها نیز بیشترین مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین (۵۷/۶٪)، اوفلوکساسین (۵۱/۲٪) و لووفلوکساسین (۳۰/۴٪) گزارش شد که مشابه نتایج این تحقیق است [28]. باین حال میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین تعیین شده در این تحقیق کمتر از میزان مقاومت گزارش شده توسط رضازاده و همکاران [29] (۸۵/۷٪) و رحیمی و همکاران [27] (۹۵٪) است. مقاومت به سیپروفلوکساسین در این تحقیق نسبت به مطالعه علی قلی و همکاران [30] (۳۸٪)، شیئو و همکاران [31] (۲۹٪)، سلطان دلال و همکاران [32] (۳٪) و پیرمردیان و همکاران [33] (۴/۷۶٪) افزایش نشان می‌دهد. تحقیقات نشان داده‌اند که افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در توسعه انواع مقاوم به چند دارو و گردش مقاومت بین گونه‌های باکتریایی نقش داشته است [26]. همان‌طور که در این تحقیق و هم‌چنین سایر مطالعات دیده می‌شود، استافیلوکوکوس اورئوس توانسته است به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان مقاوم شود [34]–[36].

باکتری‌ها از جمله استافیلوکوکوس اورئوس از طریق مکانیسم‌های مختلف شامل تغییر در مسیرهای متابولیک، تولید آنزیم‌های غیرفعال‌کننده عوامل ضد میکروبی، تغییر محل‌های اثر آنتی‌بیوتیک‌ها و سیستم‌های افلاکس می‌توانند به عوامل ضد میکروبی مقاوم شوند [37]–[39].

در تحقیق حاضر پس از شناسایی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با استفاده از تکنیک آنتی‌بیوگرام، MIC این سویه‌ها برای آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین تعیین شده و *sub MIC* آن‌ها مشخص شد. سپس برای بررسی نقش احتمالی ژن *norB* و ارتباط بیان آن با مقاومت نسبت به فلوروکینولون‌ها، میزان بیان این ژن برای سویه‌های مقاوم قبل از مواجهه با سیپروفلوکساسین و بعد از مواجهه با آن با تکنیک Real-Time PCR



ارزیابی شد. نتایج به دست آمده نشان داد میزان بیان ژن *norB* به طور میانگین پس از مواجهه سویه‌ها با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین ۶۰ برابر افزایش داشته است. دینگ و همکاران [40] در تحقیقی مشابه نقش پمپ‌های افلاکس را در استافیلوکوکوس اورئوس MW2 در غیاب و در حضور آنتی‌بیوتیک با استفاده از روش Real-Time PCR بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد میزان بیان این ژن در حضور آنتی‌بیوتیک ۱۷۱ برابر افزایش داشته است. بررسی‌ها نشان می‌دهد مقاومت نسبت به کینولون‌ها بر اثر موتاسیون‌های کروموزومی ایجاد می‌شود که ممکن است موجب بیان بیش از حد پمپ‌های افلاکس *norA*، *norB* و *norC*، *tet38* شود. سیستم‌های افلاکس به ویژه پمپ افلاکس *norA*، *norB* و *norC* سبب دفع آنتی‌بیوتیک و کاهش غلظت درون سلولی می‌شود که نتیجه آن، کاهش نفوذپذیری غشا نسبت به ترکیبات دارویی است. این پمپ‌ها نقش بسزایی در مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به سیپروفلوکساسین ایفا می‌کنند [6]، [9]، [10]. *NorB* مقاومت را به برخی از سوبستراهای *NorA* مانند فلوروکینولون‌های هیدروفیلیک (نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین)، بایوسیدها و زیست‌کش‌ها (تترانیل فسفونیوم و ستریمید) و رنگ اتدیوم بر مایند القا می‌کند و هم چنین باعث القای مقاومت *NorA* به برخی از ترکیبات غیر سوبسترای خود مانند فلوروکینولون‌های هیدروفوبیک و اسپارفلوکساسین و تراسایکلین می‌شود [40]، [41].

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد میزان مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین که از جمله آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده، در حال افزایش است و مهم‌ترین مکانیسم آن می‌تواند افزایش تولید پمپ افلاکس *norB* باشد.

## تشکر و قدردانی

به این وسیله از همکاری و مساعدت مجموعه آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا تشکر می‌شود.

## تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافی توسط نویسندگان اظهار نشده است.

## منابع

- [1] Klevens, R. M., Morrison, M. A., Nadle, J., Petit, S., Gershman, K., Ray, S., ... & Fridkin, S. K. (2007). Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Journal of the american medical association*, 298(15), 1763–1771. DOI:10.1001/jama.298.15.1763
- [2] Sethi, S. (2002). Bacterial pneumonia: Managing a deadly complication of influenza in older adults with comorbid disease. *Geriatrics*, 57(3), 56–61.
- [3] Moreillon, P., Que, Y. A., & Bayer, A. S. (2002). Pathogenesis of streptococcal and staphylococcal endocarditis. *Infectious disease clinics of north america*, 16(2), 297–318. DOI:10.1016/S0891-5520(01)00009-5
- [4] Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N. C., Corrente, M., Parisi, A., ... & Celano, G. V. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International journal of food microbiology*, 115(3), 290–296. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.049
- [5] Witte, W., Strommenger, B., Cuny, C., Heuck, D., & Nuebel, U. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Panton-Valentine leucocidin gene in Germany in 2005 and 2006. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(6), 1258–1263. DOI:10.1093/jac/dkm384
- [6] Nikaido, H. (1998). Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current opinion in microbiology*, 1(5), 516–523. DOI:10.1016/S1369-5274(98)80083-0
- [7] Acar, J. F., & Goldstein, F. W. (1997). Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clinical infectious diseases*, 24(1), S67–S73. DOI:10.1093/clinids/24.supplement\_1.s67
- [8] Marangon, F. B., Miller, D., Muallem, M. S., Romano, A. C., & Alfonso, E. C. (2004). Ciprofloxacin and levofloxacin resistance among methicillin-sensitive staphylococcus aureus isolates from keratitis and conjunctivitis. *American journal of ophthalmology*, 137(3), 453–458. DOI:10.1016/j.ajo.2003.10.026
- [9] Coskun-Ari, F. F., & Bosgelmez-Tinaz, G. (2008). *GrlA* and *gyrA* mutations and antimicrobial susceptibility in clinical isolates of ciprofloxacin-methicillin-resistant staphylococcus aureus. *European journal of medical research*, 13(8), 366–370.
- [10] Ito, H., Yoshida, H., Bogaki-Shonai, M., Niga, T., Hattori, H., & Nakamura, S. (1994). Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase *gyrA* and *gyrB* genes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38(9), 2014–2023. DOI:10.1128/AAC.38.9.2014
- [11] Ouellette, M., Légaré, D., & Papadopoulou, B. (1994). Microbial multidrug-resistance ABC transporters. *Trends in microbiology*, 2(10), 407–411.

- [12] Del Giudice, P., Bes, M., Hubiche, T., Roudiàre, L., Blanc, V., Lina, G., ... & Etienne, J. (2011). Clinical manifestations and outcome of skin infections caused by the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST80-IV. *Journal of the european academy of dermatology and venereology*, 25(2), 164–169. DOI:10.1111/j.1468-3083.2010.03731.x
- [13] Davoodi, N. R., Siadat, S. D., Vaziri, F., Yousefi, J. V., Harzandi, N., Rafi, A., ... & Bahrmand, A. R. (2015). Identification of *staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNs) as well as detection of methicillin resistance and Panton-Valentine Leucocidin by multiplex PCR. *Journal of pure and applied microbiology*, 9(1), 467–471.
- [14] Chikkala, R., George, N. O., Ratnakar, K. S., Iyer, R. N., & Sritharan, V. (2012). Heterogeneity in femA in the Indian isolates of *Staphylococcus aureus* limits its usefulness as a species specific marker. *Advances in infectious diseases*, 2(03), 82–88.
- [15] Al-Talib, H., Yean, C. Y., Al-Khateeb, A., Hasan, H., & Ravichandran, M. (2014). Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a newly developed dry reagent-based polymerase chain reaction assay. *Journal of microbiology, immunology and infection*, 47(6), 484–490. DOI:10.1016/j.jmii.2013.06.004
- [16] Al-Talib, H., Yean, C. Y., Al-Khateeb, A., Hassan, H., Singh, K. K. B., Al-Jashamy, K., & Ravichandran, M. (2009). A pentaplex PCR assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and panton-valentine leucocidin. *BMC microbiology*, 9, 1–8. DOI:10.1186/1471-2180-9-113
- [17] Theis, T., Skurray, R. A., & Brown, M. H. (2007). Identification of suitable internal controls to study expression of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance system by quantitative real-time PCR. *Journal of microbiological methods*, 70(2), 355–362. DOI:10.1016/j.mimet.2007.05.011
- [18] Bremser, W. G., & Barsky, N. P. (2004). Utilizing the balanced scorecard for R&D performance measurement. *R and d management*, 34(3), 229–238. DOI:10.1111/j.1467-9310.2004.00335.x
- [19] Dinges, M. M., Orwin, P. M., & Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*, 13(1), 16–34. DOI:10.1128/CMR.13.1.16-34.2000
- [20] Holden, M. T. G., Feil, E. J., Lindsay, J. A., Peacock, S. J., Day, N. P. J., Enright, M. C., ... & Parkhill, J. (2004). Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the evolution of virulence and drug resistance. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 101(26), 9786–9791. DOI:10.1073/pnas.0402521101
- [21] Vannuffel, P., Laterre, P. F., Bouyer, M., Gigi, J., Vandercam, B., Reynaert, M., & Gala, J. L. (1998). Rapid and specific molecular identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in endotracheal aspirates from mechanically ventilated patients. *Journal of clinical microbiology*, 36(8), 2366–2368. DOI:10.1128/jcm.36.8.2366-2368.1998
- [22] Mehrotra, M., Wang, G., & Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of clinical microbiology*, 38(3), 1032–1035. DOI:10.1128/jcm.38.3.1032-1035.2000
- [23] Abimanyu, N., Krishnan, A., Murugesan, S., Gurumurthy, S., Krishnan, P., & others. (2013). Use of triplex PCR for rapid detection of PVL and differentiation of MRSA from methicillin resistant coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical and diagnostic research (JCDR)*, 7(2), 215. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3592277/>
- [24] Johnson, S., Krüger, D., & Labischinski, H. (1995). FemA of *Staphylococcus aureus*: Isolation and immunodetection. *FEMS microbiology letters*, 132(3), 221–228. DOI:10.1016/0378-1097(95)00314-U
- [25] Espinal, M. A., Laszlo, A., Simonsen, L., Boulahbal, F., Kim, S. J., Reniero, A., ... & Raviglione, M. C. (2001). Global trends in resistance to antituberculosis drugs. *New england journal of medicine*, 344(17), 1294–1303. DOI:10.1056/nejm200104263441706
- [26] Ferber, D. (2002). Antibiotic resistance: Livestock feed ban preserves drugs' power. *Science*, 295(5552), 27–28. DOI:10.1126/science.295.5552.27a
- [27] Rahimi, F., Bouzari, M., Katouli, M., & Pourshafie, M. R. (2013). Antibiotic resistance pattern of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* isolates in Tehran, Iran. *Jundishapur journal of microbiology*, 6(2), 144–149. DOI:10.5812/jjm.4896
- [28] Gade, N. D., & Qazi, M. S. (2013). Fluoroquinolone therapy in *Staphylococcus aureus* infections: where do we stand? *Journal of laboratory physicians*, 5(02), 109–112. DOI:10.4103/0974-2727.119862
- [29] Rezazadeh, M., Yousefi Mashouf, R., Sarmadyan, H., & Ghaznavi-Rad, E. (2013). Antibiotic profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with multiple-drug resistances isolated from nosocomial infections in Vali-Asr Hospital of Arak. *Journal of arak university of medical sciences*, 16(2), 29–37.
- [30] Aligholi, M., Emaneini, M., Hashemi, F. B., Shasavan, S., Jebelameli, F., & Kazemi, B. (2006). Determination of antimicrobial resistance pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. *Tehran university medical journal*, 64(9), 26–32. (In Persian). <http://diglib.tums.ac.ir/pub/index.asp>
- [31] Shittu, A. O., Okon, K., Adesida, S., Oyedara, O., Witte, W., Strommenger, B., ... Nübel, U. (2011). Antibiotic resistance and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in Nigeria. *BMC microbiology*, 11, 1–8. DOI:10.1186/1471-2180-11-92
- [32] Soltan Dallal, M. M., Agha Amiri, S., Eshraghian, M., Sabour Yaraghi, A. A., Faramarzi, T., Mahdavi, V., Saberpour, F., Fazeli Fard, P., & Peymane Abedi, T. (2008). Prevalence and antibiotic resistance pattern of *staphylococcus aureus* strains isolated from food stuff. *Journal of advances in medical and biomedical research*, 16(4), 63. (In Persian). <https://www.magiran.com/paper/590777/>
- [33] Pirmoradian, M., Pourbabaei, A., Sangi, M. G., & Kalhor, N. (2013). A clinical trial of contamination of surgical instruments with *Staphylococcus aureus* during long time orthopedic surgeries. *Qom university of medical sciences journal*, 7(3), Pe62–Pe70. (In Persian). <http://journal.muq.ac.ir>

- [34] Nimmo, G. R., Bell, J. M., Mitchell, D., Gosbell, I. B., Pearman, J. W., & Turnidge, J. D. (2003). Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* in Australian teaching hospitals, 1989-1999. *Microbial drug resistance*, 9(2), 155–160.
- [35] Picot, S., Rakotomalala, R. S., Farny, K., Simac, C., & Michault, A. (2010). Evolution de la résistance aux antibiotiques de 1997 à 2005 à la Réunion. *Medecine et maladies infectieuses*, 40(11), 617–624. DOI:10.1016/j.medmal.2010.04.001
- [36] Poole, K. (2000). Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(9), 2233–2241. DOI:10.1128/AAC.44.9.2233-2241.2000
- [37] Hancock, R. E. W. (1997). The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in microbiology*, 5(1), 37–42. DOI:10.1016/S0966-842X(97)81773-8
- [38] Hooper, D. C. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clinical infectious diseases*, 31(SUPPL. 2), S24–S28. DOI:10.1086/314056
- [39] Thomson, K. S., & Smith Moland, E. (2000). Version 2000: The new  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes and infection*, 2(10), 1225–1235. DOI:10.1016/S1286-4579(00)01276-4
- [40] Ding, Y., Onodera, Y., Lee, J. C., & Hooper, D. C. (2008). NorB, an efflux pump in *Staphylococcus aureus* strain MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses. *Journal of bacteriology*, 190(21), 7123–7129. DOI:10.1128/JB.00655-08
- [41] Truong-Bolduc, Q. C., Dunman, P. M., Strahilevitz, J., Projan, S. J., & Hooper, D. C. (2005). MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 187(7), 2395–2405. DOI:10.1128/JB.187.7.2395-2405.2005