

The Inhibitory Effect of Artemisa quttensis Extract on norA Efflux Pump in Ciprofloxacin Resistant Staphylococcus aureus Strains Using Ethidium Bromide and Real-Time PCR Methods

Amir Mirzaie^{1*}, Ali Asghar Bagheri Kashtali¹, Hassan Noorbazargan², Seyed Ataollah Sadat Shandiz³

¹Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran.

²Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

³Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

*Corresponding Author: Amir Mirzaie, Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran.

Email: a.mirzaie@riau.ac.ir

Received: 4 Aug, 2016

Accepted: 19 Oct, 2016

Abstract

Background and Objectives: *norA* efflux pump is one of the mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* strains, and finding natural herbal compounds with the ability to inhibit efflux pumps is one of the recent challenges. The aim of this study was to determine the inhibitory effect of *Artemisa quttensis* extract on *norA* efflux pump gene expression in ciprofloxacin resistant *S. aureus* strains.

Methods: At first, *A. quttensis* ethanolic extract, was prepared by ethanol solvent. Then, existence of *norA* efflux pump was detected in 10 ciprofloxacin resistant clinical strains of *S. aureus* using polymerase chain reaction (PCR) method. Moreover, anti-efflux activity of the extract was determined using ethidium bromide method. Finally, after treatment of isolates with Sub-MIC concentration of the extract, *norA* gene expression level, was evaluated using real-time PCR method.

Results: The PCR results showed that all of the strains had *norA* efflux pump, and ethidium bromide method revealed that the *A. quttensis* extract had inhibitory effect on resistant strains that had *norA* efflux pump. Moreover, real-time PCR results showed that *norA* gene expression level was down-regulated by Sub-MIC concentrations of the extract in the ciprofloxacin resistant isolates.

Conclusion: Considering the anti-efflux pump effect of *A. quttensis* extract, it seems that this extract has the potential to be used as a native plant in pharmaceutical industries.

Keywords: *Artemisia quttensis*; *Staphylococcus aureus*; NorA efflux pump.

اثر مهارى عصاره گیاه *Artemisia quttensis* بر روى پمپ افلاکس *norA* سويه‌هاى مقاوم به سيپروفلوکوساسين استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش اتيديوم برومايد و Real Time PCR

امير ميرزاىي^{۱*}، على اصغر باقرى كشتلى^۱، حسن نوربازرگان^۲، سيد عطااله سادات شانديز^۳

چکیده

زمينه و هدف: یکی از مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک سيپروفلوکوساسين در سويه‌هاى استافیلوکوکوس اورئوس، وجود پمپ افلاکس *norA* می‌باشد و یافتن ترکیبات طبیعی گیاهی با قابلیت مهار پمپ‌هاى افلاکس نیز یکی از چالش‌هاى اخير است. هدف از این مطالعه، تعیین اثر مهارى عصاره گیاه درمنه از گونه *Artemisia quttensis* بر روى پمپ افلاکس *norA* در سويه‌هاى مقاوم به سيپروفلوکوساسين استافیلوکوکوس اورئوس بود.

روش بررسى: ابتدا عصاره گیاه *A. quttensis* با استفاده حلال اتانولى تهیه گردید. سپس با استفاده از روش PCR، وجود پمپ افلاکس *norA* در ۱۰ سويه بالینی مقاوم به سيپروفلوکوساسين استافیلوکوکوس اورئوس مشخص شد. همچنین، میزان تأثیر ضدپمپ افلاکسى عصاره به‌وسيله روش اتيديوم برومايد بررسى گردید. در نهایت، پس از تیمار سويه‌ها با غلظت زیر حد کشندگی (SubMIC) عصاره، میزان بیان ژن *norA* با روش Real Time PCR ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج PCR نشان داد تمامی سويه‌ها دارای پمپ افلاکس *norA* هستند و روش فنوتیپی اتيديوم برومايد مشخص کرد عصاره گیاه *A. quttensis* بر روى تمامی سويه‌هاى مقاوم دارای پمپ افلاکس *norA* اثر مهارى دارد. همچنین براساس نتایج Real Time PCR، در غلظت‌هاى زیر حد MIC عصاره، بیان ژن *norA* در سويه‌هاى مقاوم به سيپروفلوکوساسين کاهش داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثر ضدپمپ افلاکسى عصاره گیاه درمنه، به‌نظر می‌رسد این عصاره می‌تواند به‌عنوان گیاه بومی در کشور، پتانسیل استفاده در صنایع دارویی را داشته باشد.

کلید واژه‌ها: گیاه درمنه؛ استافیلوکوکوس اورئوس؛ پمپ افلاکس *NorA*.

^۱گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران.

^۲دانشکده فناوری‌هاى نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

^۳گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

امير ميرزاىي، گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

a.mirzaie@riau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۱۳

تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۲۶

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Mirzaie A, Bagheri Kashtali AA, Noorbazargan H, Sadat Shandiz SA. The inhibitory effect of *Artemisia quttensis* extract on *norA* efflux pump in ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* strains using ethidium bromide and Real-Time PCR methods. Qom Univ Med Sci J 2018;11(10):51-63. [Full Text in Persian]

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس، یکی از عوامل مهم عفونت‌زای بیمارستانی در سرتاسر جهان بوده و طیف وسیعی از بیماری‌های تهدیدکننده زندگی، از قبیل پنومونی، مننژیت و اندوکاردیت را ایجاد می‌کند (۱). قسمت قدامی بینی، منبع اولیه استافیلوکوکوس اورئوس در بین بزرگسال و کودکان است که به‌عنوان عامل اصلی عفونت‌های استافیلوکوکی محسوب می‌شود (۲). استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)، سویه خاصی از این باکتری بوده که به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است. مقاومت به متی‌سیلین به دلیل وجود ژن *mecA* می‌باشد. ژن *mecA* پروتئین متصل‌شونده به پنی‌سیلین با نام PBP2a را کد می‌کند که میل پیوندی پایینی برای آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام دارد (۳). سویه‌های MRSA تا به امروز به بسیاری از عوامل ضدباکتریایی مقاوم شده‌اند که این امر موجب محدودیت‌های درمان بیماری‌های ناشی از این باکتری شده است (۴،۵). داروهای فلوروکوئینولون مانند سیپروفلوکساسین یکی از داروهای مناسب و جایگزین برای درمان بیماری‌های ناشی از سویه‌های MRSA/استافیلوکوکوس اورئوس است (۶). با این وجود، در پی تجویز این دارو جهت درمان عفونت این باکتری‌ها، مقاومت به این آنتی‌بیوتیک نیز رخ داده، به‌طوری‌که در برخی از موارد، میزان مقاومت به ۱۰۰٪ رسیده است (۷).

مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس متفاوت است که یکی از مکانیسم‌ها ممانعت از تجمع دارو درون سلولی به‌وسیله سیستم‌های افلاکس می‌باشد. پمپ‌های افلاکس، مواد سمی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها را به محیط خارج پمپ می‌کنند (۸-۱۱). به‌طور کلی، پمپ‌های افلاکس باکتریایی براساس ترادف و شباهت اسیدهای آمینه، در پنج گروه اصلی قرار می‌گیرند (۱۲،۱۳). پمپ‌های افلاکس از نظر بالینی به‌طور مؤثری در ارتباط با گروه‌های RND (Resistant Nodulation Division) یا MFS (Major Facilitator Super Family) می‌باشند که با آزادسازی انرژی نیروی محرکه پروتون در خارج کردن آنتی‌بیوتیک نقش دارند (۱۴،۱۵). سیستم افلاکس MFS، یکی از سیستم‌های مهم افلاکس در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

است و پمپ افلاکس *norA* نیز یکی از پمپ‌های مهم این خانواده می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد *norA* می‌تواند ترکیبات مختلفی مانند فلوروکوئینولون‌های هیدروفوب، از قبیل سیپروفلوکساسین، اتیدیوم بروماید و ترکیبات چهارظرفیتی آمونیوم را به سمت بیرون پمپ کند (۱۶،۱۷). همچنین محققان نشان داده‌اند افزایش مقاومت به فلوروکوئینولون‌ها با افزایش بیان پمپ افلاکس *norA* ارتباط دارد (۱۸). از نقطه‌نظر درمانی، اولین داروی مناسب برای درمان باکتری‌های MRSA، آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین است و امروزه، بزرگترین چالش و نگرانی در بیمارستان‌ها، ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به‌وسیله باکتری‌های فرصت‌طلب استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد که به هر دو آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین و سیپروفلوکساسین مقاوم شده‌اند (۱۹،۲۰). امروزه، محققان در پی درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک با راه‌حلی غیر از آنتی‌بیوتیک هستند. یکی از این راهکارها، استفاده از عصاره‌های گیاهی است. گیاهان دارای ترکیبات ثانویه هستند که در سازش آن با شرایط محیطی رشد خود نقش به‌سزایی دارند. این ترکیبات ثانویه، ترکیبات دارویی فعالی هستند که در شرایط آزمایشگاهی می‌توان این ترکیبات را استخراج و به‌عنوان دارو جهت مطالعات ضدباکتریایی مورد استفاده قرار داد. Fujita و همکاران با بررسی اثر بایکائین مشتق‌شده از گیاه آویشن بر روی باکتری اشرشیاکلی نشان دادند این ترکیب باعث مهار پمپ *TetK* می‌شود. بیان *TetK* در باکتری اشرشیاکلی، مسئول بیرون راندن تتراسایکلین از سلول است (۲۱).

گیاه درمنه (*Artemisia*) از خانواده Asteraceae (*compositae*) می‌باشد و گونه‌های مختلف این جنس مانند *A. quttensis* در صنعت داروسازی، حتی در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی نیز کاربرد دارند (۲۲). تاکنون مطالعه‌ای در زمینه تأثیر عصاره گیاه *A. quttensis* بر روی بیان ژن پمپ افلاکس *norA* در سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس انجام نشده است. بنابراین، این مطالعه با هدف تعیین تأثیر عصاره گیاه *A. quttensis* بر روی بیان ژن پمپ افلاکس *norA* در ایزوله‌های بالینی مقاوم به سیپروفلوکساسین استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت.

روش بررسی

این مطالعه تجربی از فروردین ماه تا شهریورماه سال ۱۳۹۴ در دانشگاه آزاد اسلامی انجام شد. گیاه *A. quttensis* از مرکز ذخایر زیستی ایران (با شماره هرباریومی P ۱۰۰۶۶۰۸) تهیه گردید. مواد گیاهی جمع‌آوری شده پس از تمیز شدن، در سایه خشک و به وسیله آسیاب پودر شده و در شرایط بهینه و مناسب نگهداری شدند. برای تهیه عصاره اتانولی، میزان ۴۰ گرم از گیاه را به ۱۰۰ میلی‌لیتر از اتانول اضافه کرده و به مدت ۲ روز عمل همزدن و عصاره‌گیری انجام گرفت. عصاره به دست آمده به وسیله کاغذ صافی فیلتر شد و وارد دستگاه روتاری گردید.

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

پس از حصول اطمینان از شناسایی و تأیید سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، حساسیت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن براساس استاندارد CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) مورد بررسی قرار گرفت (۲۳). حساسیت جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوکستین (۱۰ میکروگرم)، وانکومايسين (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، پنی‌سیلین (۱۰ واحد)، اریترومايسين (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) سنجیده شد. لازم به ذکر است جهت تشخیص مقاومت به متی‌سیلین (MRSA)، از دیسک آنتی‌بیوتیکی سفوکستین استفاده گردید. در تمامی آزمایش‌ها، از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۳۳۵۹۱ 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 و

از *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* ATCC ۱۲۲۲۸ به عنوان کنترل منفی استفاده شد. استخراج DNA به روش دستی (فنل-کلروفرم) انجام گرفت. در ادامه، به رسوب تهیه‌شده از کشت باکتری‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، به ترتیب از بافر لیز {*Tris-HCl*, pH7.4, EDTA 50mM, SDS 25% (سدیم دودسیل سولفات)} و پروتئیناز K (۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد جهت لیز باکتری‌ها اضافه شد. در نهایت، از محلول فنل - کلروفرم - ایزو آمیل الکل و اتانول سرد جهت استخراج DNA استفاده گردید، سپس از رسوب DNA حاصله پس از خشک و حل شدن در بافر به عنوان DNA استفاده شد. در نهایت، برای تأیید صحت استخراج ژنوم، الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ به کار برده شد (۲۴). برای شناسایی ژن‌های *mecA* و *nora* واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده به عنوان الگو، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر جلوبر، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر برگشتی (۱۰ پیکومول)، ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس (سیناژن، ایران) و ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر ۲ بار تقطیر انجام گرفت.

در ادامه، واکنش PCR برای ژن *mecA* با استفاده از پرایمرهای جلوبر 3' TCCAGATTACAACCTCACCAGG 5' و برگشتی 3' CCACTTCATATCTTGTAACG 5' با چرخه دمایی واسرشتگی اولیه (Initial denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و واسرشتگی (Denaturation) در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو (Annealing) در دمای ۶۰ درجه به مدت ۵۰ ثانیه، طولی شدن رشته الگو (Extension) در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵۰ ثانیه و طولی شدن نهایی (Final extension) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد (۲۴).

جهت تکثیر ژن *nora* از پرایمر *nora-F* شامل توالی 3' ATCGGTTTAGTAATACCAGTCTTGC 5' و پرایمر *nora-R* شامل توالی

3' GCGATATAATCATTTGAGATAACGC 5' استفاده گردید (۲۳). برنامه دمایی چرخه‌های PCR برای ژن *nora* شامل: واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه و واسرشتگی (Denaturation) در

به‌عنوان مهارکننده پمپ افلاکس به غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد (پمپ افلاکس فعال زمانی تشخیص داده می‌شود که MIC اتیدیوم بروماید به همراه CCCP از MIC اتیدیوم بروماید، به تنهایی کمتر باشد). در یکی از چاهک‌ها، از CCCP به همراه باکتری استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۵۳ مقاوم به سیروفلوکساسین (به‌منظور تشخیص اینکه خود CCCP کشنده نیست)، به‌عنوان کنترل منفی و از چاهک حاوی باکتری استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۵۳، CCCP و اتیدیوم بروماید به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۲۶).

جهت استخراج RNA، سویه‌های مقاوم به سیروفلوکساسین به‌مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت مولر هیتون براث در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در مجاورت غلظت sub MIC از عصاره گیاه کشت داده شدند، سپس استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA (کیژن امریکا) برطبق دستورالعمل انجام گرفت. در ادامه، سنتز cDNA با استفاده از کیت Quanti Tect Reverse Transcription kit (کیژن امریکا) انجام شد. در انتها، غلظت cDNAهای استخراج به‌وسیله نانودراپ، تعیین غلظت شدند. جهت بررسی ارزیابی بیان ژن پمپ افلاکس *nora*، روش

Real Time PCR کمی (qRT-PCR) با استفاده مستر میکس حاوی سایبرگرین (Applied Biosystem، انگلستان) به کار برده شد. مواد مورد استفاده در حجم ۲۰ میکرولیتر مستر میکس شامل: ۲ میکرولیتر از cDNA، ۱۰ پیکومول از پرایمرهای جلوبر و برگشتی و ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس حاوی سایبرگرین بود که در دستگاه Bioneer کره انجام گرفت. برنامه دمایی مورد استفاده در qPCR نیز شامل: ۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه بود که در ۴۰ سیکل انجام شد. همچنین ژن *gmk* (گوانیلات کیناز) به‌عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. در پایان، بیان نسبی ژن *nora* به‌وسیله روش $\Delta\Delta CT$ محاسبه گردید. پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون واریانس یک‌طرفه تحلیل شدند و سطح معنی‌داری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

دمای ۹۵ درجه به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو (Annealing) در دمای ۶۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن رشته الگو (Extension) در دمای ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و طویل شدن نهایی (Final Extension) به مدت ۴ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بود (۲۵).

بعد از تعیین سویه‌های مقاوم به سیروفلوکساسین، این سویه‌ها جهت تست MIC (Minimum Inhibitory Concentration) مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایش MIC براساس CLSI به روش رقیق‌سازی در میکروپلیت برای سیروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید انجام شد. آزمایش MIC به‌صورت ۳ بار تکرار با استفاده از روش میکرودايلوشن در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام گرفت، سپس محلول اتیدیوم بروماید را به داخل چاهک A ریخته و با محیط کشت مولر هیتون براث (MHB) به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانیده شد. به چاهک‌های بعدی تا H، مقدار ۵۰ میکرولیتر محیط MHB اضافه گردید و از چاهک اول به ترتیب ۵۰ میکرولیتر به چاهک‌ها تا H افزوده شد تا رقت‌سازی متوالی انجام گیرد (۲۵۰-۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر). به همه چاهک‌ها، مقدار ۵۰ میکرولیتر از کشت میکروبی سویه‌های مقاوم به سیروفلوکساسین با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند اضافه شد. مقدار MIC به‌عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری محسوب می‌شود. لازم به ذکر است جهت تعیین غلظت MIC سیروفلوکساسین، از غلظت ۱۲۸-۰/۵ میکروگرم بر میکرولیتر و از چاهک حاوی باکتری استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۳ فاقد سیروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید به‌عنوان کنترل منفی و از چاهک حاوی باکتری استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۳، سیروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۲۶). همچنین جهت تعیین غلظت MIC عصاره در سویه‌های مقاوم، از غلظت‌های ۵۰۰-۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید.

برای تعیین فنوتیپی وجود پمپ افلاکس فعال، ابتدا غلظت MIC اتیدیوم بروماید مشخص شد، سپس غلظت ۰/۵ مک‌فارلند از کشت باکتری به داخل چاهک‌های حاوی غلظت‌های اتیدیوم بروماید اضافه گردید. در پی آن، ترکیب

CCCP (Carbonyl Cyanide 3-chloro Phenylhydrazine)،

.....

جدول شماره ۱: پرایمرهای مورد استفاده در qRT-PCR.

Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)	Ref.
norA-F	ATCGGTTTAGTAATACCAGTCTTGC	۱۱۲	۲۲
norA-R	GCGATATAATCATTGAGATAACGC	۱۱۲	
Gmk-F	TATCAGGACCATCTGGAGTAGG	۱۲۲	۲۲
Gmk-R	CATCAACTTCACCTTCACGC	۱۲۲	

یافته‌ها

کواگولاز جداسازی شد. طبق نتایج آنتی‌بیوگرام، ۳۴ ایزوله از ۵۰ ایزوله مورد بررسی (۶۸٪)، به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین مقاوم بودند و به‌عنوان سویه‌های MRSA در نظر گرفته شدند. در این مطالعه، ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد تعداد ۱۰ سویه (۲۰٪) به سیپروفلوکساسین مقاوم بوده‌اند (جدول شماره ۲).

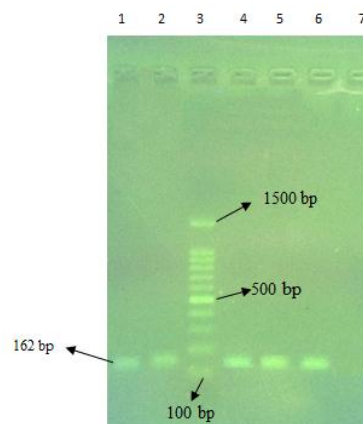
در این مطالعه، ۲۵۰ نمونه از آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های شهر تهران طی سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۳ جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از ادرار، خون، پوست و زخم جداسازی شدند. ۵۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از تست‌های میکروبی رنگ‌آمیزی گرم، محیط مانیتول سالت آگار، محیط بردپارکر، تست کاتالاز، تست

جدول شماره ۲: میزان مقاومت و حساسیت سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

آنتی‌بیوتیک	مقاوم		متوسط		حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
متی‌سیلین (سفوکستین)	۳۴	۶۸	۰	۰	۱۶	۳۲
سیپروفلوکساسین	۱۰	۲۰	۱	۲	۳۹	۷۸
پنی‌سیلین	۴۹	۹۸	۰	۰	۱	۲
اریترومایسین	۲۸	۵۶	۹	۱۸	۱۳	۲۶
تری‌متوپریم	۴۳	۸۶	۳	۶	۴	۸
آمی‌کاسین	۲۱	۴۲	۳	۶	۴	۸
آمی‌سیلین	۴۵	۹۰	۰	۰	۵	۱۰
جتاما‌یسین	۲۰	۴۰	۳	۶	۲۷	۵۴
آموکسی‌سیلین	۴۳	۸۶	۰	۰	۷	۱۴
کلرامفنیکل	۴	۸	۷	۱۴	۳۹	۷۸
کلیندامایسین	۲۳	۴۶	۶	۱۲	۲۱	۴۲
کلیستین	۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۱۰۰

نتایج نشان داد توزیع ژن *mecA* در نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۶۸٪ نمونه‌ها (۳۴ نمونه) وجود داشته است.

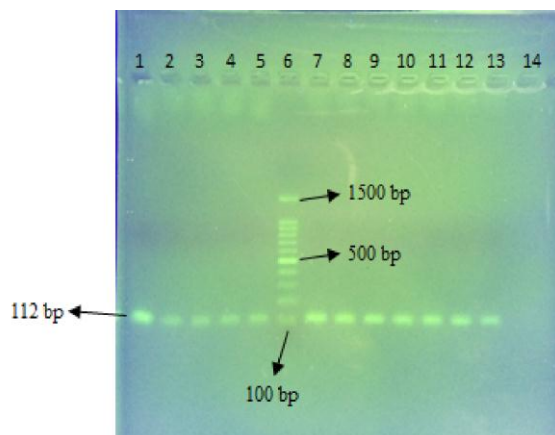
برای بررسی مولکولی وجود ژن مقاومت به متی‌سیلین، از تکثیر ژن *mecA* استفاده شد و با توجه به طراحی پرایمرها، انتظار باند ۱۶۲ جفت باز وجود داشت (شکل شماره ۱).

شکل شماره ۱: نتایج تکثیر ژن *mecA* در سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین.

شماره ۱ تا ۴، ۵: نمونه‌های مقاوم به متی‌سیلین، ۶: کنترل منفی، ۷: کنترل مثبت، ۳: مارکر + DNA 100bp.

ژن *norA* در تمامی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین نیز دیده شد (۱۰ نمونه) و ارتباط معنی‌داری بین وجود ژن‌های *norA* و *mecA* در بین سویه‌ها وجود داشت ($p < 0.05$).

به‌منظور بررسی وجود ژن پمپ افلاکس *norA* در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده، از پرایمرهای اختصاصی این ژن استفاده شد و انتظار وجود باند ۱۱۲ جفت باز وجود داشت که شکل آن در ژل الکتروفورز مشاهده می‌شود (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲: نتایج تکثیر ژن *norA* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین.

شماره ۵-۱ و ۱۲-۷: نمونه‌های مقاوم به فلوکساسین، ۱۳: کنترل مثبت، ۱۴: کنترل منفی، ۶: مارکر DNA 100 bp.

سیپروفلوکساسین و اتیدیوم بروماید کاهش یافت که نشان‌دهنده فعال بودن پمپ افلاکس در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین بود، همچنین سویه‌های مختلف مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای غلظت‌های MIC مختلف نسبت به عصاره بودند که ممکن است به دلیل مقاومت‌های نسبی مختلف این سویه‌ها باشد (جدول شماره ۴).

سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین استافیلوکوکوس اورئوس مثبت، تحت تأثیر غلظت‌های ۳۱/۲۵-۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاه در مدت زمان ۲۴ ساعت قرار گرفتند. طبق نتایج، سویه‌های مختلف دارای محدوده‌ای از MIC در غلظت ۱۲۵-۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند (جدول شماره ۳). MIC سیپروفلوکساسین در سویه‌ها از محدوده ۱۵/۶۲-۲۵۰ بود و در مجاورت مهارکننده پمپ افلاکس CCCP، میزان MIC

جدول شماره ۳. تعیین MIC سیپروفلوکساسین، اتیدیوم بروماید و ترکیب آنها در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین

میزان MIC (µg/mL)		شماره سویه	
سیپروفلوکساسین + CCCP	اتیدیوم بروماید + CCCP	اتیدیوم بروماید	سیپروفلوکساسین
۶۲/۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۱۲۵
۷/۸۱	۳/۹	۷/۸۱	۱۵/۶۲
۳۱/۲۵	۷/۸۱	۷/۸۱	۳۱/۲۵
۳۱/۲۵	۳/۹	۱۵/۶	۶۲/۵
۶۲/۵	۱۵/۶۲	۶۲/۵	۱۲۵
۶۲/۵	۳۱/۲۵	۱۲۵	۲۵۰
۱۵/۶۲	۷/۸	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵
۱۵/۶۲	۱/۹۵	۷/۸۱	۳۱/۲۵
۳/۹	۳/۹	۷/۸۱	۱۵/۶۲
۱۵/۶	۷/۸۱	۱۵/۶۲	۶۲/۵
۳۱/۲۵	۷/۸۱	۳۱/۲۵	۶۲/۵
ATCC 25923			

جدول شماره ۴: تعیین MIC عصاره گیاه *A. quttensis* در سویه‌های مختلف باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به سیپروفلوکساسین

MIC (µg/ml)	شماره سویه
۱۲۵	۷
۶۲/۵	۱۶
۶۲/۵	۲۲
۶۲/۵	۲۶
۶۲/۵	۳۱
۶۲/۵	۳۲
۲۵۰	۳۵
۶۲/۵	۳۹
۶۲/۵	۴۳
۶۲/۵	۴۹
۵۰۰	ATCC 35556
۱۲۵	ATCC 12228

همچنین بیان ژن *norA* در سویه‌های تیمار شده با غلظت SubMIC عصاره، کاهش یافته بود که نسبت به ژن *gmk*، رابطه معنی‌داری داشت (جدول شماره ۵).

نتایج Real Time PCR نشان داد سویه‌های مختلف با میزان مقاومت مختلف، بیان متفاوتی از ژن *norA* دارند و سویه‌های مقاوم‌تر دارای بیان بیشتری از ژن *norA* هستند که از نظر آماری، تفاوت معنی‌داری در مقایسه با بیان ژن *gmk* دیده شد ($p < 0.05$).

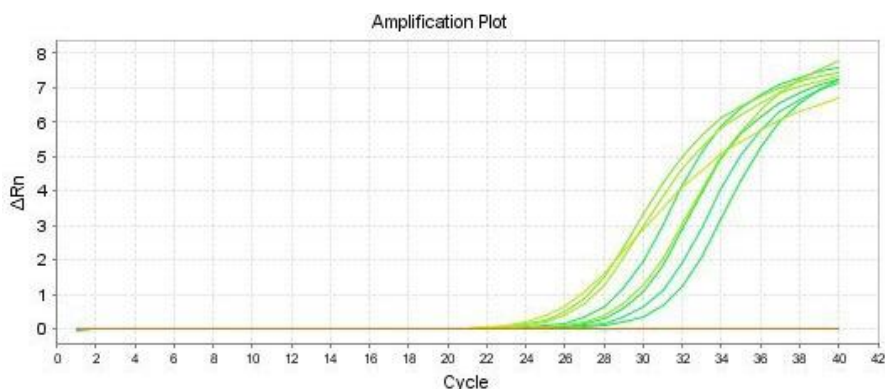
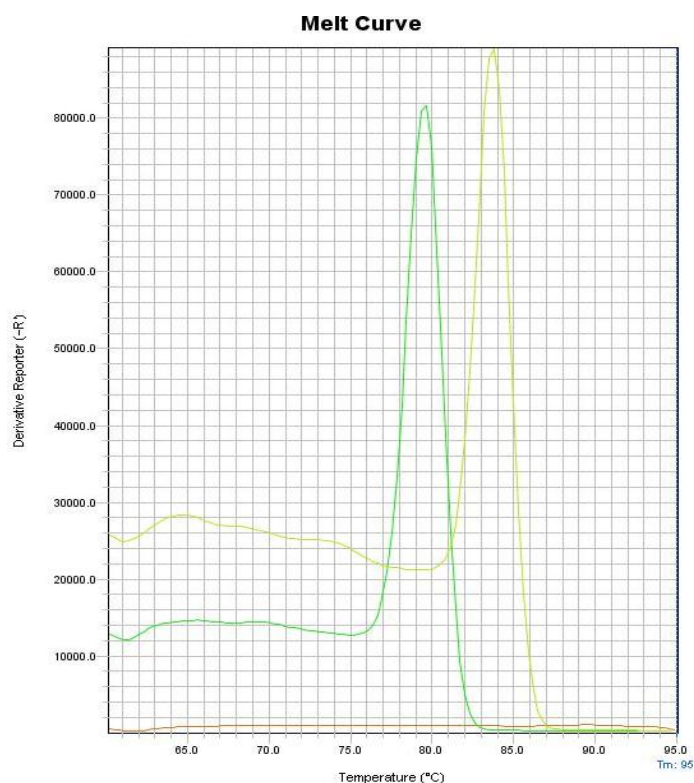
جدول شماره ۵: نتایج بیان ژن *norA* در سویه‌های مختلف مقاوم به سیپروفلوکساسین، تحت تیمار عصاره

میزان بیان ژن <i>gmk</i>	تغییر بیان ژن <i>norA</i>	تیمار نشده با عصاره		تیمار شده با عصاره		شماره سویه
		میانگین <i>norA</i> ct	میانگین <i>gmk</i> ct	میانگین <i>norA</i> ct	میانگین <i>gmk</i> ct	
۱	۰/۱۲۹±۰/۷۲	۲۲/۲۵±۰/۳۶	۲۰/۱±۰/۶۶	۱۸/۹±۰/۲۹	۱۹/۶±۰/۳۷	۷
۱	۰/۰۲۳±۰/۴۶	۲۶/۷±۰/۶۲	۱۹/۷±۰/۷۹	۲۰/۸±۰/۱۳	۱۸/۸±۰/۶۹	۱۶
۱	۰/۰۸۵±۰/۲۸	۲۳/۶±۰/۷۷	۲۰/۲±۰/۵۶	۱۹/۶۵±۰/۷۸	۱۹/۵±۰/۴۱	۲۲
۱	۰/۰۰۸±۰/۴۱	۲۷/۲±۰/۸۴	۲۰/۴±۰/۱۹	۱۹/۷۵±۰/۹۲	۱۹/۷±۰/۱۳	۲۶
۱	۰/۰۱۴±۰/۲۹	۲۶/۹۵±۰/۷۹	۲۰/۳±۰/۴۹	۲۰/۴±۰/۴۱	۱۹±۰/۶۳	۳۱
۱	۰/۰۲۵±۰/۳۳	۲۵/۸±۰/۱۲	۲۰/۱±۰/۵۵	۲۰/۰۵±۰/۵۳	۱۹/۳±۰/۸۲	۳۲
۱	۰/۰۵۱±۰/۳۳	۲۵/۲۵±۰/۵۶	۱۹/۶±۰/۸۷	۲۰/۵۵±۰/۱۹	۱۹/۳±۰/۱۴	۳۵
۱	۰/۱۰۹±۰/۶۶	۲۲/۳±۰/۸۷	۱۹/۸±۰/۵۶	۱۸/۶۵±۰/۵۲	۱۹/۲±۰/۹۸	۳۹
۱	۰/۰۲۱±۰/۱۵	۲۴/۹±۰/۴۶	۲۰/۲±۰/۴۲	۱۸/۹۵±۰/۷۴	۱۸/۵±۰/۹۱	۴۳
۱	۰/۰۳۷±۰/۹۸	۲۴/۷۵±۰/۲۹	۲۰/۴±۰/۸۷	۱۹/۶±۰/۹۲	۱۹/۸±۰/۴۶	۴۹
۱	۰/۰۳۲±۰/۸۲	۲۷/۹±۰/۷۹	۱۹/۵±۰/۲۹	۲۲/۵۵±۰/۷۲	۱۹/۴±۰/۳۳	ATCC 3556
۱	۰/۱۲۹±۰/۷۲	۲۲/۲۵±۰/۳۶	۲۰/۱±۰/۶۶	۱۸/۹±۰/۲۹	۱۸/۷±۰/۷۳	ATCC 12228

اعداد چند برابر شدن بیان (Fold change) ژن *norA* را نسبت ژن *gmk* نشان می‌دهد.

استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس ATCC ۱۲۲۸ که فاقد ژن *norA* می‌باشد این عصاره تأثیر خاصی بر روی بیان ژن خانه‌دار *gmk* نداشت، ولی در سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۳ دارای ژن *norA*، عصاره توانست در غلظت MIC خود بیان این ژن را کاهش دهد که با کاهش بیان ژن در سویه‌های بالینی جداسازی شده همخوانی داشت (شکل شماره ۴-۳).

میزان بیان پایه ژن خانه‌دار (*House keeping*) *gmk* تحت تأثیر عصاره، تغییر آنچنانی نکرد، ولی میزان ct ژن *norA* بعد از تأثیر عصاره افزایش یافت که نشان‌دهنده کاهش بیان ژن *norA* می‌باشد. باید توجه کرد در غلظت‌های MIC مختلف که در جدول شماره ۴ آمده است، میزان بیان ژن *norA* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین کاهش یافته است. در سویه

شکل شماره ۳: نمودار حاصل از تکثیر ژن‌های *norA* و *gmk*شکل شماره ۴: الگوی منحنی ذوب ژن *gmk* و ژن *norA*

محور عمودی، نشان‌دهنده مشتق فلورسنت به مشتق زمان و محور افقی، نشان‌دهنده درجه سانتیگراد است.

بحث

یکی از این ترکیبات، عصاره‌های گیاهی هستند که برای مهار کردن پمپ‌های افلاکس در باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۷-۳۰).

در این مطالعه، از عصاره گیاه *A. quttensis* جهت مهار عملکرد و بیان ژن *norA* با استفاده از روش فنوتیپی اتیدیوم بروماید به همراه عصاره و روش مولکولی Real Time PCR استفاده شد. در روش اتیدیوم بروماید، زمانی که اتیدیوم بروماید به همراه عصاره گیاهی استفاده می‌شود، میزان MIC آن ۴-۲ برابر کاهش می‌یابد که این موضوع، نشان‌دهنده عمل ضدپمپ افلاکسی عصاره گیاه مورد نظر است.

مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سولین و متعاقب آن به سیپروفلوکساسین ناشی از پمپ افلاکس است. یکی از پمپ‌های افلاکس مؤثر در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین، پمپ *norA* بوده که این پمپ باعث بیرون‌راندن ترکیبات ضد میکروبی از عرض غشای سلولی می‌شود. با مهار کردن پمپ‌ها یا کاهش بیان آنها با استفاده از ترکیبات مهاری می‌توان فرآیند درمان با آنتی‌بیوتیک را بهبود بخشید. ترکیبات مهاری به صورت رقابتی به پمپ *norA* متصل شده و فرآیند انتقال را مختل می‌کنند.

بروماید و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین می‌توان جهت بررسی میزان فعالیت پمپ افلاکس *nora* باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده کرد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. در مطالعه حاضر پس از تأثیر عصاره گیاه مورد نظر و بررسی اثرات ضدپمپ افلاکس، بیان ژن *nora* به وسیله روش Real Time PCR هم در سویه‌های تیمار شده و هم در سویه‌های تیمار نشده، مشخص گردید به‌طور کلی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای بیان متفاوتی از ژن *nora* هستند و سویه‌های مقاوم‌تر دارای بیان نسبی بیشتری از ژن *nora* می‌باشند. پس از تیمار سویه‌ها با غلظت Sub MIC عصاره، بیان ژن *nora* در مقایسه با ژن *gmk*، کاهش بیان معنی‌داری داشت که نشان‌دهنده اثر ضدپمپ افلاکسی عصاره بود. مطالعات مختلفی در جهت بررسی بیان ژن‌های پمپ افلاکس *nora* به انجام رسیده است. Pourmand و همکاران، وجود ژن پمپ افلاکس *nora* و بیان آن را در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با روش Real Time PCR مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد ژن *nora* در تمامی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین وجود دارد و بیان ژن آن در مجاورت بیوساید هگزایدروکوئینولون افزایش می‌یابد (۳۵). در مطالعه دیگری Saiful و همکاران پمپ افلاکس *nora* را در سویه‌های MRSA مورد مطالعه قرار دادند که از ۱۹ سویه MRSA جداسازی شده، ۱۶ سویه دارای ژن *nora* بود و تمامی این سویه‌ها، پمپ‌های افلاکس فعال داشتند. Huet و همکاران، تعداد ۹ سویه MRSA مقاوم به سیپروفلوکساسین را از نظر وجود و بیان پمپ‌های افلاکس بررسی کردند. در این مطالعه ابتدا این ژن‌ها با استفاده از روش PCR تشخیص داده شدند، سپس بیان آنها در مجاورت غلظت‌های پایین بیوسایدها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد پمپ‌های افلاکس *nora* در تمامی سویه‌ها وجود داشته و بیان آنها در مجاورت بیوسایدها افزایش می‌یابد (۳۶).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد عصاره گیاه *A. quttensis* می‌تواند به‌عنوان یک مهارکننده پمپ افلاکس در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* عمل کند.

مطالعات مختلفی در زمینه بررسی اثرات ضدپمپ افلاکسی عصاره و ترکیبات گیاهی انجام گرفته است. Chovanová و همکاران با بررسی فعالیت ضدپمپ افلاکسی اسانس گیاهی ۳ گونه *Salvia* در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند هر سه گونه دارای فعالیت سینرژسمی با آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین می‌باشند (۳۱). *Kalia* و همکاران در مطالعه خود، از ماده کپسایسین به‌عنوان ماده مهارکننده پمپ افلاکس *nora* در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده کردند. آنها به‌منظور بررسی خاصیت مهارکنندگی پمپ افلاکس، با استفاده از کاهش معنی‌دار MIC اتیدیوم بروماید و کپسایسین نشان دادند ترکیب فوق باعث کاهش ۲-۴ برابری MIC اتیدیوم بروماید در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌شود (۳۲).

در مطالعه حاضر و سایر مطالعات، با توجه به کاهش میزان MIC سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین به‌وسیله عصاره *A. quttensis* می‌توان نتیجه گرفت احتمالاً ترکیبات تشکیل‌دهنده این عصاره می‌تواند در سطح مولکولی به‌عنوان رپرسور پروموتور ژن *nora* عمل کرده و بیان آن را کاهش دهد که در نهایت، کارایی پمپ افلاکس *nora* در این سویه‌ها کاهش یافته و در اثر استفاده توأمان عصاره و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین می‌توان درمان موفق‌تری داشت.

Ponnusamy و همکاران با استفاده از ترکیب Indirubin که از گیاه *Wrightia tinctoria* جداسازی شده بود، خاصیت ضدپمپ افلاکسی ترکیب موردنظر را به همراه سیپروفلوکساسین مورد بررسی قرار دادند، نتایج این مطالعه نشان داد عصاره گیاه مدنظر همانند سایر مهارکننده‌های پمپ افلاکس می‌تواند ۴ برابر، MIC آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین را کاهش دهد (۳۳). Smith و همکاران نیز از ترکیب فنولی توتارول که از درخت سرو منشأ گرفته بود، به‌منظور مهار پمپ افلاکس *nora* در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده کردند، همچنین آنها جهت بررسی خاصیت ضدپمپ افلاکسی، روش کاهش MIC اتیدیوم بروماید و آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون در ترکیب با MIC/4 توتارول را به کار بردند که نتایج نشان داد ماده توتارول دارای فعالیت ضدپمپ افلاکسی *nora* می‌باشد (۳۴). مطالعات انجام‌شده در این زمینه نشان می‌دهند از روش تعیین MIC اتیدیوم

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تلاش همکاران دانشگاه آزاد اسلامی، به خصوص جناب آقای سهیل صالحی، آرین رحیمی و تمام کسانی که در انجام این پروژه همکاری کرده‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

بنابراین، پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در مورد خواص زیستی ترکیبات این گیاه انجام گیرد تا اهمیت پزشکی این گیاه بیشتر مشخص گردد و به‌عنوان یک ترکیب مهارکننده پمپ افلاکس امیدبخش به مراکز دارویی معرفی شود.

References:

- Phillips CJ, Wells NA, Martinello M, Smith S, Woodman RJ, Gordon DL. Optimizing the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with elevated vancomycin minimum inhibitory concentrations within the susceptible range. *Infect Drug Resist* 2016;9:87-92.
- Liu Y, Zhang J, Ji Y. PCR-based approaches for the detection of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Open Microbiol J* 2016;10:45-56.
- Sganga G, Tascini C, Sozio E, Carlini M, Chirletti P, Cortese F, et al. Focus on the prophylaxis, epidemiology and therapy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* surgical site infections and a position paper on associated risk factors: The perspective of an Italian group of surgeons. *World J Emerg Surg* 2016;11:26.
- Andrade-Figueiredo M, Leal-Balbino TC. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: High prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. *BMC Microbiol* 2016;16:115.
- Jeremić LP, Kapulica NK, Ristanović E, Josić D, Lepsanović Z. Prevalence of Panton-valentine leukocidin genes in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the District of Pomoravlje. *Vojnosanit Pregl* 2016;73(3):256-60.
- Zarei Koosha R, Mahmoodzadeh Hosseini H, Mehdizadeh Aghdam E, Ghorbani Tajandareh S, Imani Fooladi AA. Distribution of *tsst-1* and *mecA* Genes in *Staphylococcus aureus* isolated From Clinical Specimens. *Jundishapur J Microbiol* 2016;12;9(3):e29057.
- Mustapha M, Bukar-Kolo YM, Geidam YA, Gulani IA. Phenotypic and genotypic detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hunting dogs in Maiduguri metropolitan, Borno State, Nigeria. *Vet World* 2016;9(5):501-6.
- Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med* 2007;39(3):162-76.
- Li X-Z, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 2009;69(12):1555-623.
- Kosmidis C, Schindler BD, Jacinto PL, Patel D, Bains K, Seo SM, et al. Expression of multidrug resistance efflux pump genes in clinical and environmental isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2012;40(3):204-9.
- Lewis K, Paulsen IT. *Microbial multidrug efflux*. New York: Garland Science Pub; 2003.
- Blanco P, Hernando-Amado S, Antonio J, Reales-Calderon JA, Corona F, Lira F, et al, Alcalde-Rico. Bacterial multidrug efflux pumps: Much More than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms* 2016;4(1):14-21.
- Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* 2013;4(3):223-29.
- De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, 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):1761-70.

15. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, Ubukata K, Konno M. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus norA* gene, which confers resistance to quinolones. *J Bacteriol* 1990;172(12):6942-49.
16. Noguchi N, Okada H, Narui K, Sasatsu M. Comparison of the nucleotide sequence and expression of *norA* genes and microbial susceptibility in 21 strains of *Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist* 2004;10(3):197-203.
17. Sierra JM, Ruiz J, de Anta MTJ, Vila J. Prevalence of two different genes encoding NorA in 23 clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2000;46(1):145-6.
18. Santos Costa S, Viveiros M, Rosato AE, Melo-Cristino J, Couto I. Impact of efflux in the development of multidrug resistance phenotypes in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 2015;15:232.
19. Ding Y, Onodera Y, Lee JC, Hooper DC. NorB, an efflux pump in *Staphylococcus aureus* strain MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses. *J Bacteriol* 2008;190(21):7123-9.
20. Jo A, Ahn J. Phenotypic and genotypic characterization of multiple antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to subinhibitory levels of oxacillin and levofloxacin. *BMC Microbiol* 2016;16:170.
21. Fujita M, Shiota S, Kuroda T, Hatano T, Yoshida T, Mizushima T, et al. Remarkable synergies between baicalein and Tetracycline, and baicalein and β -Lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 2005;49(4):391-6.
22. Poiatã A, Tuchiluş C, Ivănescu B, Ionescu A, Lazăr MI. Antibacterial activity of some *Artemisia* species extract. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2009;113(3):911-4.
23. Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 16th. informational supplement. Wayne, Pa. M100-S16 2006;26(3):1-8.
24. Costa SS, Falcão C, Viveiros M, Machado D, Martins M, Melo-Cristino J, et al. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 2011;11:241.
25. Corredor A, Luligo E, Moncayo O, Santacruz I, Álvarez A. Relationship between super antigenicity, antimicrobial resistance and origin of *Staphylococcus aureus* isolated. *Colomb Med (Cali)* 2016;47(1):15-20.
26. Costa SS, Viveiros M, Amaral L, Couto I. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: An update. *Open Microbiol J* 2013;7:59-71.
27. Zamani A, Sadeghian S, Ghaderkhani J, Alikhani MY, Najafimosleh M, Taghi Goodarzi M, et al. Detection of methicillin-resistance (*mec-A*) gene in *Staphylococcus aureus* strains by PCR and determination of antibiotic susceptibility. *Annal Microbiol* 2007;57:273-6.
28. Moradi N, Javadpour S, Karmostaji A. Reduced sensitivity of *Staphylococcus aureus* to vancomycin. *Med J Hormozgan Univ* 2011;15(3):169-77. [Full Text in Prsian]
29. Motallebi M, Jabalameli F, Asadollahi K, Taherikalani M, Emaneini M. Spreading of genes encoding enterotoxins, haemolysins, adhesin and biofilm among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains with staphylococcal cassette chromosome *mec* type IIIA isolated from burn patients. *Microb Pathog* 2016;97:34-7.
30. Hammer K, Carson C, Riley T. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999;86(6):985-90.
31. Chovanová R, Mezovská J, Vaverková Š, Mikulášová M. The inhibition the Tet (K) efflux pump of tetracycline resistant *Staphylococcus epidermidis* by essential oils from three *Salvia* species. *Lett Appl Microbiol* 2015;61(1):58-62.
32. Kalia NP, Mahajan P, Mehra R, Nargotra A, Sharma JP, Koul S, et al. Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2012;67(10):2401-8.
33. Ponnusamy K, Ramasamy M, Savarimuthu I, Paulraj MG. Indirubin potentiates ciprofloxacin activity in the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *Scand J Infect Dis* 2010;42(6-7):500-5.

34. Smith EC, Kaatz GW, Seo SM, Warehamb N, Williamson EM, Gibbons S. The phenolic diterpenetotarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(12):4480–83.
35. Pourmand MR, Yousefi M, Salami SA, Amini M. Evaluation of expression of NorA efflux pump in ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* against hexahydroquinoline derivative by Real-Time PCR. *Acta Med Iran* 2014;52(6):424-9.
36. Huet AA, Raygada JL, Mendiratta K, Seo SM, Kaatz GW. Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple in vitro exposures to biocides and dyes. *Microbiology* 2008;154(Pt 10):3144-53.