

# Effect of *Artemisia ciniformis* Extract on Expression of *NorA* Efflux Pump Gene in Ciprofloxacin Resistant *Staphylococcus aureus* by Real Time PCR

Zeynab Ghomi<sup>1</sup>, Farzaneh Tafvizi<sup>\*1</sup>, Vahid Naseh<sup>1</sup>, Iman Akbarzadeh<sup>2</sup>

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

2. Department of Chemical and Petrochemical Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran

doi [10.30699/ijmm.14.1.55](https://doi.org/10.30699/ijmm.14.1.55)



## ABSTRACT

**Background:** Activity of *norA* efflux pump is one of the antibiotic resistance mechanisms in ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus*. In this study, the effect of *Artemisia ciniformis* extract on reducing the expression of *norA* efflux pumps gene in ciprofloxacin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates was studied.

**Materials & Methods:** Ciprofloxacin resistant *S. aureus* isolates, were treated by different concentration of *A. ciniformis* extract. After extracting RNA and synthesizing cDNA, *norA* efflux pump expression was evaluated by Real Time PCR.

**Results:** There was significant decrease of *norA* efflux pump expression in ciprofloxacin-resistant *S. aureus* isolates treated by *A. ciniformis* extract ( $P < 0.05$ ). Also, a different expression of *norA* efflux pump gene was reported.

**Conclusion:** It seems *A. ciniformis* extract as a natural inhibitor, had potential for suppression of *norA* efflux pump activity.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, Ciprofloxacin, *norA*, Efflux Pump, *Artemisia ciniformis*

Received: 2019/10/2;

Accepted: 2020/01/07;

Published Online: 2020/03/14

## Corresponding Information:

Farzaneh Tafvizi, 1. Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran.

Email: [arzanehtafvizi54@gmail.com](mailto:arzanehtafvizi54@gmail.com)



Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Ghomi Z, Tafvizi F, Naseh V, Akbarzadeh I. Effect of *Artemisia ciniformis* Extract on Expression of *NorA* Efflux Pump Gene in Ciprofloxacin Resistant *Staphylococcus aureus* by Real Time PCR. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (1) :55-69

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

## Introduction

*Staphylococcus aureus* is a pathogenic bacterium of the Micrococcus family, which is a common pathogenic bacterium in hospital infections (1, 2). It causes a wide range of diseases including skin infections, pneumonia and endocarditis (3). One of the opportunistic pathogenic agents of nosocomial infections is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Resistance to antibacterial agents in MRSA strains has caused limitations in the treatment of diseases caused by this bacterium (4).

One of the most important mechanisms of antibiotic resistance in bacterial cells is the outflow pumps that cause antibiotic outflow from bacterial cells, which is

observed in many clinical pathogens (8). Output carriers of antibiotics are divided into five main families based on the amino acid sequence. These families include the major facilitator superfamily (MFS), the Resistance-nodulation-division (RND), the small multidrug resistance (SMR), the ATP-binding cassette enzyme-linked family, and multiple antibiotics, and the extrusion antibiotic family (9).

One of the important mechanisms of antibiotic resistance in *S. aureus* is the presence of efflux pumps. *NorA*, *norB* and *norC* efflux pumps are found in drug-resistant strains (19). Various studies have shown that *norA* is capable of pumping various compounds

including hydrophobic fluoroquinolones such as norfloxacin, ciprofloxacin and ethidium bromide (22). There is a direct relationship between increased expression of *norA* efflux pump and increased resistance to fluoroquinolones. Inhibition of these systems can be a promising strategy to enhance the effectiveness of antibiotics (14).

Many studies have shown that a wide range of plant extracts may act against bacterial resistant mechanisms (15). *Artemisia* belongs to the family asteraceae, a small plant that grows in temperate regions. It has 34 species in Iran and is highly regarded in Iranian and Chinese traditional medicine. It has numerous biological properties including antibacterial, antifungal, antioxidant and anti-inflammatory (16).

The aim of this study was to investigate the effect of *A. ciniformis* extract on expression Efflux pump *norA* in clinical isolates of ciprofloxacin-resistant *S. aureus*, a prospective study in Iran which was not studied before.

## Materials and Methods

This study was done using clinical samples collected in authors' previous study (18). Collecting clinical specimens, detecting ciprofloxacin-resistant *S. aureus* isolates, performing microbial susceptibility testing (antibiogram) by agar disk diffusion method, PCR detection of *norA* gene, and phenotypic evaluation of active efflux pump was as presented in previous study (18).

### Collecting and Extracting *A. ciniformis*

The *A. ciniformis* was prepared from the Iranian Biological Resource Center and kept in optimum condition. To do the extraction, 40 g of the plant was first weighed and 300 mL of 80% ethanol was added to the plant and kept in a shaker system for 24 h (90 rpm). After 24 h, it was filtered and placed in an incubator at 37°C to completely evaporate the alcohol.

### Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Plant Extract

MIC experiments were performed according to the dilution method in the microplate for the extract. MIC was performed three times by microdilution method on 96 well plates. The extract was poured into wells at concentrations of 15.6 to 1000 µg / mL and with

Mueller Hinton Broth (MHB) it reached to the concentration of 195 µL. All wells were added with 5 µL of microbial culture of isolates at half McFarland concentration. The MIC value was considered as the lowest inhibitory concentration of bacterial growth. It should be noted that wells containing non-extracted bacteria were considered as negative controls and wells containing standard bacteria *S. aureus* ATCC 25923 and extracts were considered as positive controls to determine MIC concentration.

### Extraction of RNA from *Staphylococcus aureus* Treated with subMIC Extract

Bacterial cell lysis and RNA extraction were performed using RNX solution (Sinagen) according to the protocol. The cDNA construct was performed according to the Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). The *gmk* gene (guanylate kinase) was used as the reference gene. The primers of the *gmk* and *norA* genes are presented in Table 1.

Real-time PCR reaction in the final volume of 25 µL was optimized as follows: 12.5 µL of SYBR™ (2X) Master Mix (Takara Company), 1 µL of 5 pmol primer (Takapoo Biol.), 9.5 µL of deionized water and 1 µL cDNA template (100 ng). Thermal program was performed as follows with Bioneer exicycler 96: Primary denaturation of DNA template was performed at 95°C for 10 min, and the second step alternately was performed during 40 cycles at 95°C for 20 seconds and at 61°C for 40 seconds and 72°C for 20 seconds.

### Data Analysis

Statistical calculations were performed using Graphpad Prims ver.6 software and the results were analyzed by one way ANOVA. The difference of target genes expression between control and treated samples was calculated by Tukey's HSD post-hoc test. Data were presented as mean ± standard deviation (SD) and P<0.05 was considered significant. Real time PCR data analysis was performed based on the comparison of the threshold cycle with the following formula:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{test sample}} - \Delta Ct_{\text{control sample}}$$

$$\text{Relative expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Table 1. Primers used in this study

primers	sequences	PCR products (bp)
norA-F	5'ATCGGTTTAGTAATACCAGTCTTGC3'	112
norA-R	5'GCGATATAATCATTTGAGATAACGC3'	
gmk-F	5'TATCAGGACCATCTGGAGTAGG3'	188
gmk-R	CATCAACTTCACCTTCACGC	

## Results

### MIC Results of *Artemisia ciniformis* Extract Against Ciprofloxacin-resistant Strains

According to the findings of the previous study, out of 250 clinical specimens, 50 isolates of *Staphylococcus aureus* were isolated and antibiotic susceptibility results showed that 68% of the samples (34 samples) were methicillin resistant and 24% of them (12 samples) were ciprofloxacin resistant and none of the samples were vancomycin resistant (18).

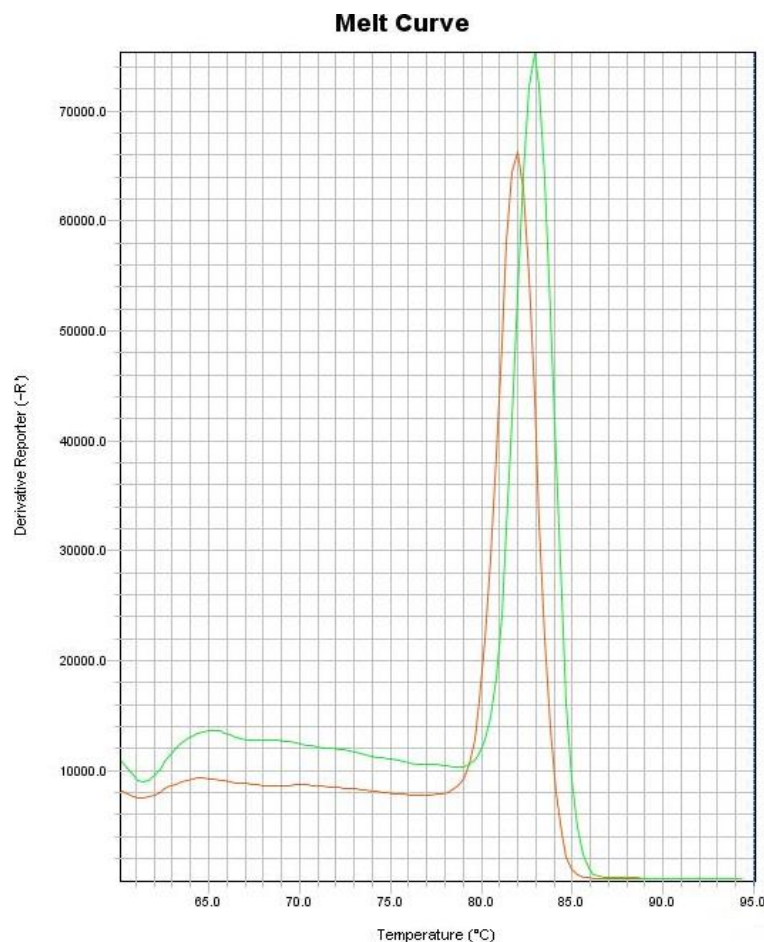
Ciprofloxacin-resistant *S. aureus* positive isolates were affected by concentrations of 15-1.6.6 µg / mL of the plant extract over a 24-hour period. The results showed that different strains had a range of MIC of 31.55-500 µg / mL (Table 2).

The graphs of the amplification of *norA* and *gmk* genes are shown in Figures 1 and 2. Specific amplification of the target gene fragments, primers not pairing, and no amplification of non-specific fragment for each gene were determined using the melting curve (1-2)The results showed that the expression of *norA* gene was significantly decreased compared to the

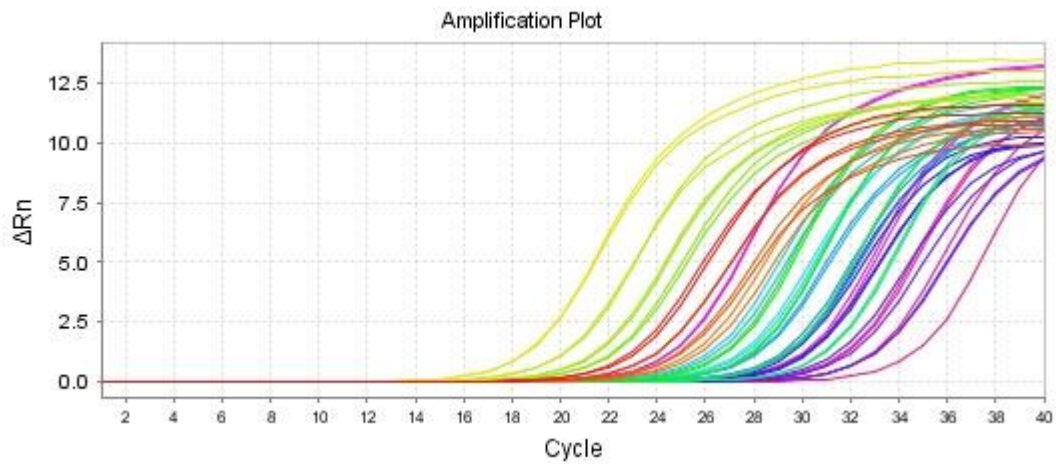
reference gene (*gmk*) after treatment with the plant extract. The highest decrease in *norA* gene expression was observed in isolate 6 and the lowest decrease in gene expression was observed in isolate 5. The results are shown in Figure 3.

**Table 2.** Determination of MIC of plant extract in different strains.

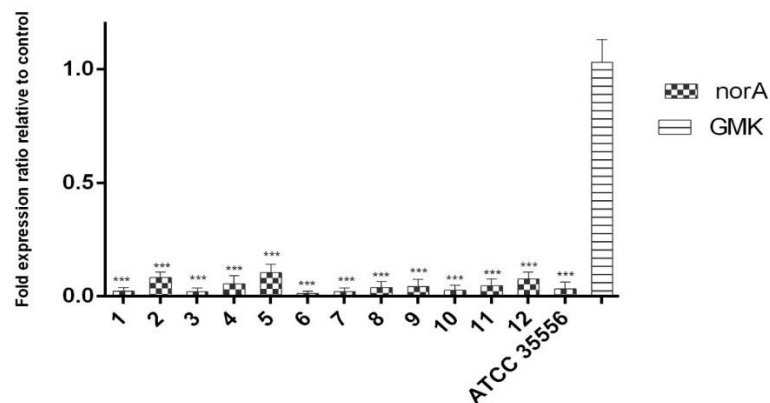
Isolate number	MIC (µg/mL)
1	62.5
2	125
3	31.2
4	250
5	500
6	15.6
7	62.5
8	31.2
9	125
10	500
11	31.25
12	250
ATCC 35556	500



**Figure 1.** Diagram of melting curves of *norA* genes and *gmk* genes.



**Figure 2.** Amplification plot of *norA* and *gmK* gene in bacterial cells treated with extract.



**Figure 3.** *NorA* gene expression in extract-treated strains.

## Discussion

Since ancient times, medicinal plants have been used clinically as important sources of secondary metabolites (terpenoids, phenolic compounds and alkaloids). These plants can directly or indirectly affect the activity of efflux pumps. Recently, the use of herbal compounds and plant extracts as an alternative to antibiotics has received much attention (26). The difference in the effect of plant extracts on bacteria depends on various factors. In general, plant compounds exert their antimicrobial activity through a variety of mechanisms (27).

Due to their antibacterial potential, the use of herbal extracts can be an effective, low cost and affordable method to reduce antibiotic resistance in a wide range of hospital opportunistic bacteria (28).

The results of our study showed that *A. ciniformis* extract was able to significantly reduce *norA* gene expression in ciprofloxacin resistant strains. It should be noted that different expression of *norA* gene was observed in the resistant strains and in the more

resistant strains a higher relative expression of the *norA* gene was observed.

Flavonoid sarothrin extracted from *Alkann orientalis* leaves and flowers inhibited *norA* efflux pump activity and inhibited the growth of *Mycobacterium smegmatis* and *S. aureus* (28).

The results of the study by Kalia *et al.* showed that capsaicin decreased the MIC of ciprofloxacin for *S. aureus* SA-1199B (*norA* overproducing), SA-1199 (wild-type). Increased susceptibility of *S. aureus* to ciprofloxacin was observed. This study showed that capsaicin not only decreased the efflux pump activity but also decreased the attack of *Staphylococcus* on macrophages (29).

Studies have shown that the extract and compounds of Olympicin A, 5,7-dihydroxy-6-(2-methylbutanoyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)-4-phenyl-2H-chromen-2-one, Karavilagenin C and Ailanthoidiol, Boeravinone B from aerial parts of *Hypericum olympicum L.*, flowers of *Mesua ferrea L.*, aerial parts of *Momordica balsamina L.*, root of *Zanthoxylum capense* and *Boerhavia diffusa*

inhibited and decreased activity of *norA* efflux pump. In other words, they had an Efflux pump inhibitor (EPI) (30-34).

This study was in line with other studies showing that *A. ciniformis* reduced *norA* gene expression in efflux pumps in *S. aureus*. Decreased *norA* gene expression leads to poor performance of these pumps and prevents overflow of antibiotics and other disinfectants and pharmaceuticals. Therefore, this plant can be used as an appropriate antibacterial drug and, on the other hand, it is recommended with

regard to its antiviral resistance, other efflux studies and antiviral antibiotic resistance.

### **Acknowledgment**

The authors would like to acknowledge the laboratory of Islamic Azad University.

### **Conflict of Interest**

Authors declared no conflict of interests.



## اثر عصاره *Artemisia ciniformis* بر بیان ژن پمپ افلاکس *norA* در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین توسط Real Time PCR

زینب قمی<sup>۱</sup>، فرزانه تفویضی<sup>۱\*</sup>، وحید ناصح<sup>۱</sup>، ایمان اکبرزاده<sup>۲</sup>

۱. گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

۲. دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** فعالیت پمپ افلاکس *norA* یکی از مکانیسم‌های ایجاد مقاومت در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین است. در این مطالعه، اثر عصاره *Artemisia ciniformis* در کاهش بیان ژن پمپ افلاکس *norA* در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین بررسی شد.

**مواد و روش کار:** ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین، تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره *A. ciniformis* قرار گرفتند. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، بیان ژن افلاکس *norA* توسط Real Time PCR بررسی شد.

**یافته‌ها:** کاهش معنی‌داری در بیان ژن *norA* در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین در اثر تیمار با عصاره دیده شد. همچنین بیان متفاوتی از ژن *norA* در ایزوله‌های مختلف مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد عصاره *A. ciniformis* به عنوان مهارکننده طبیعی، قادر به مهار و کاهش فعالیت پمپ افلاکس *norA* است.

**کلید واژه‌ها:** استافیلوکوکوس اورئوس، سیپروفلوکساسین، پمپ افلاکس، *norA*، *Artemisia ciniformis*

کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۱۰

پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۷

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۱۲/۲۴

### موضوع:

میکروبیولوژی مولکولی

### نویسنده مسئول:

فرزانه تفویضی، گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

ایمیل:

farzanehtafvizi54@gmail.com

### مقدمه

از مکانیسم‌های مهم و اصلی ایجاد کننده مقاومت باکتریایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌توان به غیر فعال کردن دارو با استفاده از آنزیم‌ها، اصلاح هدف، تغییر در دسترسی به هدف از طریق خروج دارو، کاهش جذب و ممانعت از تجمع دارو در درون سلول به وسیله سیستم‌های افلاکس اشاره کرد (۷،۶).

یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در سلول باکتری، پمپ‌های خروجی هستند که سبب خروج آنتی‌بیوتیک‌ها از سلول‌های باکتریایی می‌شوند که در بسیاری از پاتوژن‌های بالینی مشاهده می‌شود (۸). حامل‌های خروجی آنتی‌بیوتیک‌ها براساس توالی آمینواسیدها به پنج خانواده اصلی تقسیم می‌شوند. این خانواده‌ها شامل the major facilitator the Resistance-nodulation-division superfamily (MFS)

استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، باکتری پاتوژن از خانواده میکروکوکاسه است که یک باکتری بیماری‌زای شایع در عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌رود (۲،۱). این باکتری سبب بروز طیف وسیعی از بیماری‌های مختلف از جمله عفونت‌های پوستی، پنومونی و اندوکاردیت می‌شود (۳). یکی از عوامل فرصت طلب بیماری‌زای بیمارستانی، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) است. ایجاد مقاومت به عوامل ضد باکتریایی در سویه‌های MRSA، موجب بروز محدودیت‌هایی در درمان بیماری‌های ناشی از این باکتری شده است (۴). یکی از داروهای مناسب و جایگزین برای درمان بیماری‌های ناشی از سویه‌های MRSA استافیلوکوکوس اورئوس، داروی سیپروفلوکساسین است (۵).

جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین، انجام آزمایش تست حساسیت میکروبی (آنتی بیوگرام) به روش دیسک دیفیوژن آگار، شناسایی ژن *norA* توسط PCR و بررسی فنوتیپی وجود پمپ افلاکس فعال در مطالعه قبلی نویسندگان، آرایه شده است (۱۸).

در مطالعه حاضر از روش Real Time PCR برای بررسی اثر عصاره گیاه بر روی بیان ژن *norA*، به شرح ذیل استفاده شد.

### جمع‌آوری گیاه *A. ciniformis* و عصاره‌گیری

گیاه *A. ciniformis* از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران با کدبایریمی IBRC1000652 تهیه شد و در شرایط بهینه و مناسب نگهداری شد. برای تهیه عصاره، ابتدا میزان ۴۰ گرم از گیاه وزن شد و ۳۰۰ میلی‌لیتر از الکل اتانول ۸۰ درصد به گیاه اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه شیکر با دور ۹۰rpm قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت از کاغذ صافی و فیلتر سر سرنگ برای فیلتر کردن استفاده شد و در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد تا الکل آن به‌طور کامل تبخیر شود.

### تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) Minimum Inhibitory Concentration عصاره گیاه

آزمایش MIC به روش رقیق‌سازی در میکروپلیت برای عصاره انجام شد. MIC به‌صورت سه بار تکرار با استفاده از روش میکروآیلوشن در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. عصاره در غلظت‌های ۱۵/۶  $\mu\text{g/mL}$  تا ۱۰۰۰ به داخل چاهک‌ها ریخته شد و با محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) تا حجم ۱۹۵ میکرولیتر رسانده شد. به همه چاهک‌ها، ۵ میکرولیتر از کشت میکروبی ایزوله‌ها با غلظت نیم مک‌فارلند اضافه شد. مقدار MIC به‌عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری محسوب می‌شود. لازم به ذکر است که جهت تعیین غلظت MIC، از چاهک حاوی باکتری فاقد عصاره به‌عنوان کنترل منفی و از چاهک حاوی باکتری استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 و عصاره به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

### استخراج RNA از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تیمار شده با غلظت subMIC عصاره

لیز سلول‌های باکتریایی با استفاده از محلول RNX (سینازن) انجام شد. محتویات ویال کاملاً مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. به ازای هر ۱ میلی‌لیتر از محلول RNX، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به مخلوط اضافه شد. به مدت ۱۵ ثانیه با

the ATP- (RND)، the small multidrug resistance (SMR)، binding cassette enzyme-linked و خانواده آنتی‌بیوتیک اکستروژن هستند (۹).

انتشار داروها از باکتری‌های گرم مثبت عمدتاً توسط یک کانال اختصاصی غشای سیتوپلاسمی از خانواده‌های SMR، MFS یا ABC انجام می‌شود (۱۰). از میان باکتری‌های گرم منفی، پمپ‌های انتشار چندگانه رایج هستند که متعلق به خانواده‌های RND و SMR هستند (۱۱). آنالیز انتقال‌دهنده‌های آنتی‌بیوتیک در حال حاضر به‌طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته است (۱۲). با این حال، جالب است بدانید که برخی از مهم‌ترین پمپ‌های انتشار MDR پروتئین *norA* حاصل از *S. aureus* است؛ احتمالاً این پمپ بیشترین پمپ مورد مطالعه در باکتری‌های گرم مثبت پاتوژن است و ممکن است مسئول حداقل ۱۰٪ از مقاومت ضد باکتری در MRSA باشد (۱۳). مهار این سیستم‌ها می‌تواند یک راهکار نویدبخش برای تقویت اثر بخشی آنتی‌بیوتیک‌ها باشد (۱۴).

بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که طیف گسترده‌ای از عصاره‌های گیاهی ممکن است در مقابل مکانیسم‌های مقاوم به باکتری عمل کنند (۱۵).

جنس *Artemisia* (درمنه) متعلق به خانواده *asteraceae* گیاه بوته‌ای کوچکی است که در مناطق معتدل می‌روید و در غرب آمریکا، آفریقای جنوبی و آمریکای جنوبی پراکنده است. این جنس در ایران ۳۴ گونه دارد. این گیاه پایا در مناطق مختلفی از ایران می‌روید و در طب سنتی ایران و چین مورد توجه فراوانی است. اغلب گونه‌های این گیاه برای درمان ورم معده استفاده می‌شوند. علاوه بر آن دارای خواص بیولوژیکی متعددی چون خواص ضد باکتریایی، ضدقارچی، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی هستند (۱۶). *Artemisia ciniformis* در اکتبر ۲۰۱۱ از روستای Baam پس از گرمان آباد در اصفهان، استان خراسان، در شمال شرقی ایران جمع‌آوری شد (۱۷).

هدف از این مطالعه، بررسی اثر عصاره گیاه *A. ciniformis* بر بیان پمپ افلاکس *norA* در ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین است که تاکنون مطالعه‌ای درباره آن در ایران صورت نگرفته است.

### مواد و روش‌ها

این مطالعه در راستای مطالعه قبلی و از نمونه‌های بالینی جمع‌آوری شده در مطالعه‌ای که توسط نویسندگان انجام شده بود، استفاده شد (۱۸). چگونگی جمع‌آوری نمونه‌های بالینی، تشخیص

بلافاصله میکروتیوب‌ها به یخ انتقال یافت و مواد زیر به هر تیوب اضافه شد. ساخت مولکول‌های DNA مکمل باکیت Revert AidTM First strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) لیتوانی انجام گرفت که در آن مخلوط واکنش حاوی ۵ میکرولیتر بافر واکنش ۵x، یک میکروگرم RNA، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، یک میکرولیتر مخلوط داکسی نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ میلی مولار)، یک میکرولیتر مهارکننده آنزیم RNase (۴۰ واحد در میکرولیتر)، یک میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس و آب مقطر دو بار تقطیر (تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) بود. برنامه دمایی - زمانی به صورت ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه (برای اتصال آغازگر)، ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه (ساخت cDNA)، ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه (غیر فعال شدن رونوشت بردار معکوس) و ۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. انکوباسیون مخلوط واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سلسیوس در دستگاه ترمو سایکلر انجام شد. جهت غیر فعال سازی آنزیم RT در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. در نهایت محصول واکنش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. جهت بررسی بیان ژن‌های *nora* از روش SYBER green استفاده شد. ژن *gmk* (گوانیلات کیناز) به عنوان ژن *house keeping* استفاده شد. بدین منظور پرایمرهای ژن‌های *gmk* و *nora* در جدول ۱ ارایه شده است (۱۸):

واکنش Real time PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به شرح ذیل بهینه سازی شد: ۱۲/۵ میکرولیتر از SYBR TM (2X) Master Mix (Takara Company)، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۵ pmol (شرکت تکاپو زیست)، ۹/۵ میکرولیتر از آب دیونیزه و ۱ میکرولیتر cDNA الگو (۱۰۰ ng). برنامه حرارتی به شرح ذیل با دستگاه Bioneer exicycler 96 انجام شد: واسرشت سازی اولیه DNA الگو با دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم به صورت متناوب در طول ۴۰ چرخه با دمای ۹۵ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و ۶۱ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه انجام شد.

### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار Graphpad Prims ver.6 انجام شد و نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت بیان ژن‌های هدف، بین نمونه‌های کنترل و تیمار شده با روش آماری Tukey's HSD post-

تکان شدید مخلوط همگن شد (در این مرحله نباید از ورتکس استفاده شود). محلول شیری رنگ حاصل شد که نشانه دناتور شدن پروتئین‌ها است. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه روی یخ انکوبه شدند. نمونه‌ها در دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴°C سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، سه فاز آبی در بالای ویال، آلی در پایین و فاز میانی ایجاد شد. مولکول RNA در فاز آبی بالایی و پروتئین و DNA در فازهای میانی و پایینی (به ترتیب) وجود دارند، به همین دلیل برای جلوگیری از آلودگی با پروتئین و DNA، فاز شفاف بالایی به آرامی به ویال جدید منتقل شد. هم‌حجم فاز رویی انتقال یافته، ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد و بعد از خوب مخلوط کردن، به مدت ۱۵ دقیقه در یخ انکوبه شد (در این مرحله می‌توان برای به دست آوردن محصول RNA بیشتر، نمونه را مدت بیشتری در این مرحله نگه داشت). نمونه‌ها در دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد. فاز رویی دور ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به آن اضافه شد و مخلوط جهت جداسدن رسوب از ته ویال، به مدت چند ثانیه ورتکس شد. نمونه‌ها به مدت ۸ دقیقه در دور ۷۵۰۰ rpm در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و با وارونه کردن ویال اجازه داده شد تا رسوب در دمای اتاق به مدت چند دقیقه خشک شود. لازم به ذکر است که خشک شدن کامل رسوب، موجب کاهش حلالیت آن در مرحله بعد می‌شود. رسوب در آب تیمار شده با DEPC (۰/۱ درصد) حل شد. برای کمک به حل شدن رسوب، ویال‌ها در حمام آب با دمای ۵۵°C-۶۰ به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. ویال‌های حاوی RNA در ۸۰°C- نگهداری شدند. به منظور عدم آلودگی ناشی از وجود DNA سلول در ادامه کار، قبل از سنتز cDNA، از آنزیم DNase استفاده شد.

به منظور ساخت cDNA از روی RNA استخراج شده، پس از تعیین مقدار و غلظت RNA حاصل از باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به سیپروفلوکساسین مجاور شده با غلظت‌های زیر حد MIC عصاره توسط دستگاه نانودراپ، مطابق با کیت ساخت (Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit) استفاده شد.

انتقال نمونه RNA (1000 ng) به همراه ۱ μL بافر ۱x، ۱ μL آنزیم DNase و آب تا حجم ۱۰ μL به یک میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتر استریل و عاری از RNase اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. به منظور غیر فعال سازی فعالیت آنزیم DNase، ۱ μL از EDTA اضافه شد و انکوباسیون در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.



### یافته‌ها

#### نتایج MIC عصاره گیاه *Artemisia ciniformis* علیه

#### سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین

با توجه به یافته‌های مطالعه قبلی، از میان ۲۵۰ نمونه بالینی، تعداد ۵۰ ایزوله / استافیلوکوکوس / اورئوس جدا سازی شد و نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که ۶۸ درصد از نمونه‌ها (۳۴ نمونه) مقاوم به متی‌سیلین و از میان اینها ۲۴ درصد (۱۲ نمونه) مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. هیچکدام از نمونه‌ها مقاوم به ونکومايسين نبودند (۱۸).

ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین / استافیلوکوکوس / اورئوس مثبت تحت تاثیر غلظت‌های ۱۵-۱۰۰۰/۶  $\mu\text{g/mL}$  از عصاره گیاه در مدت زمان ۲۴ ساعت قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سویه‌های مختلف دارای محدوده ای از  $\mu\text{g/mL}$  MIC ۵۰۰-۳۱/۲۵ بودند (جدول ۲).

hoc test محاسبه شد. اطلاعات به صورت  $\text{mean} \pm \text{standard deviation}$  (SD) نمایش داده شده‌اند و  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد. آنالیز داده‌های Real Time PCR بر اساس مقایسه چرخه آستانه انجام شد. در این مطالعه، اختلاف چرخه‌های آستانه به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سلول‌های تیمار شده با عصاره) و نمونه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده با عصاره) محاسبه و با استفاده از فرمول  $\Delta\Delta\text{Ct}$ ، نسبت ژن هدف به ژن مرجع ( $\text{gmk}$ ) از طریق  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  محاسبه شد. که فرمول محاسبه آن به شرح زیر است:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct target} - \text{Ct reference}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct test sample} - \Delta\text{Ct control sample}$$

$$\text{Relative expression: } 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

جدول ۱. توزیع فراوانی MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) ایمی پنم و سیپروفلوکساسین ایزوله‌های اسپیتوباکتر بومانی بر اساس تعداد و درصد

نام پرایمر	توالی پرایمر	سایز قطعات (bp)
norA-F	5'ATCGGTTTAGTAATACCAGTCTTGC3'	۱۱۲
norA-R	5'GCGATATAATCATTGAGATAACGC3'	
gmk-F	5'TATCAGGACCATCTGGAGTAGG3'	۱۸۸
gmk-R	CATCAACTTCACCTTCACGC	

جدول ۲. تعیین MIC عصاره گیاه در سویه‌های مختلف.

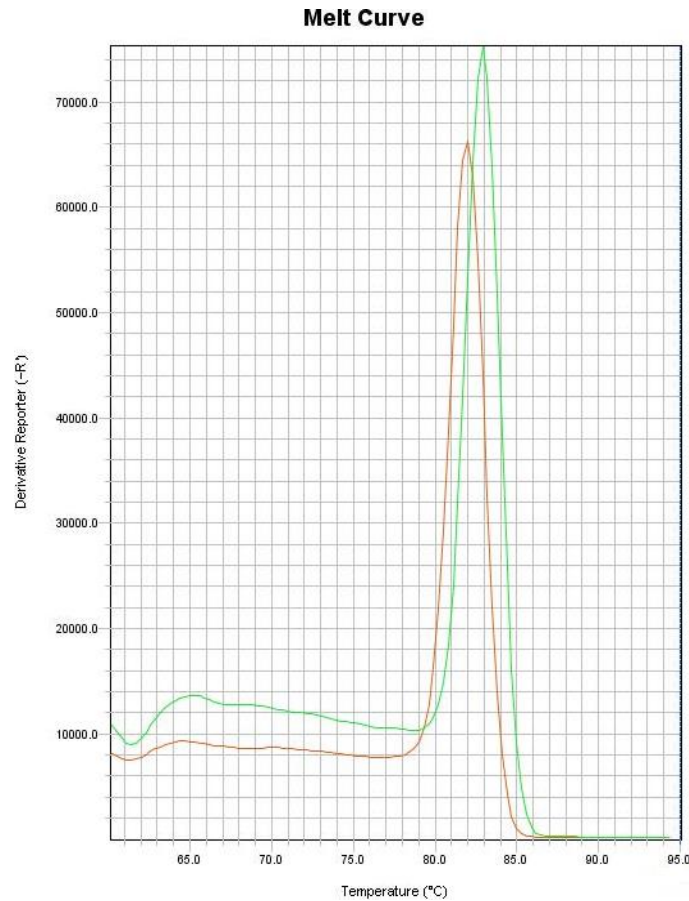
شماره ایزوله	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )
۱	۶۲/۵
۲	۱۲۵
۳	۳۱/۲
۴	۲۵۰
۵	۵۰۰
۶	۱۵/۶
۷	۶۲/۵
۸	۳۱/۲
۹	۱۲۵
۱۰	۵۰۰
۱۱	۳۱/۲۵
۱۲	۲۵۰
ATCC 35556	۵۰۰

#### بررسی بیان ژن *norA* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین در غلظت‌های subMIC از عصاره

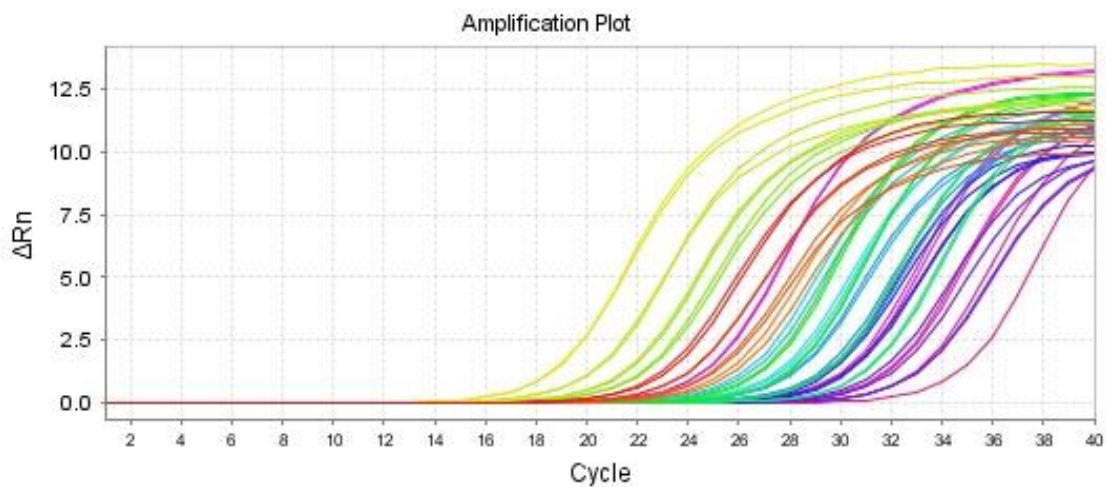
بیان نسبی ژن *norA* در ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین توسط روش Real Time PCR مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از سنتز cDNA واکنش Real Time PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *norA* و *gmk* صورت گرفت. نمودار حاصل از تکثیر ژن‌های مورد نظر در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت شدن پرایمرها و عدم تکثیر قطعات غیر اختصاصی برای هر ژن با استفاده از منحنی ذوب تعیین شد (۱-۲). ژن *norA* دارای نمودار ذوب دمای ۸۳/۹۱ و ژن *gmk* دارای نمودار منحنی ذوب ۸۲/۳۳ بود.

بیشترین کاهش بیان ژن *norA* در ایزوله ۶ (۰/۰۰۸) و کمترین کاهش بیان ژن در ایزوله ۵ (۰/۱۰۹) دیده شد (جدول ۳). نتایج در شکل ۳ نمایش داده شده است.

نتایج نشان داد که بیان ژن *norA* نسبت به ژن مرجع (*gmk*) پس از تیمار با عصاره گیاه کاهش معنی‌دار و چشمگیری نشان داد. البته میزان کاهش بیان متفاوتی در سویه‌های مختلف دیده شد.



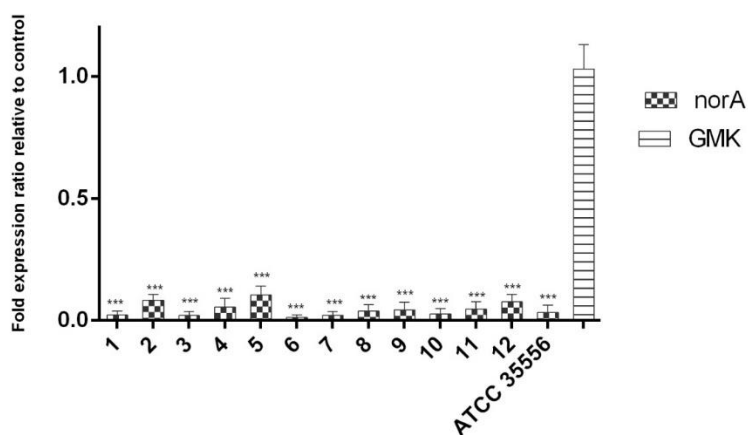
شکل ۱. نمودار منحنی ذوب ژن‌های *norA* و *gmk*.



شکل ۲. نمودار تکثیر ژن‌های *norA* و *gmk* در باکتری‌های تیمار شده با عصاره.

جدول ۳. نتایج بیان ژن *norA* در سویه‌های مختلف مقاوم به سیپروفلوکساسین.

شماره سویه	تیمار نشده با عصاره		تیمار شده با عصاره		تغییر بیان ژن <i>ica</i>	میزان بیان ژن <i>GMK</i>
	میانگین <i>GMK</i> ct	میانگین <i>ica</i> ct	میانگین <i>GMK</i> ct	میانگین <i>ica</i> ct		
۱	۱۸/۸	۲۰/۸	۱۹/۷	۲۶/۷	-۰/۰۲۳	↓ ۱
۲	۱۹/۵	۱۹/۶۵	۲۰/۲	۲۳/۶	-۰/۰۸۵	↓ ۱
۳	۱۹	۲۰/۴	۲۰/۳	۲۶/۹۵	-۰/۰۱۴	↓ ۱
۴	۱۸/۹	۲۰/۵۵	۱۹/۶	۲۵/۲۵	-۰/۰۵۱	↓ ۱
۵	۱۹/۲	۱۸/۶۵	۱۹/۸	۲۲/۳	-۰/۱۰۹	↓ ۱
۶	۱۹/۷	۱۹/۷۵	۲۰/۴	۲۷/۲	-۰/۰۰۸	↓ ۱
۷	۱۹/۳	۲۰/۰۵	۲۰/۱	۲۵/۸	-۰/۰۲۵	↓ ۱
۸	۱۹/۸	۱۹/۶	۲۰/۴	۲۴/۷۵	-۰/۰۳۷	↓ ۱
۹	۱۹/۸	۱۹/۶	۲۰/۴	۲۴/۷۵	-۰/۰۳۷	↓ ۱
۱۰	۱۸/۵	۱۸/۹۵	۲۰/۲	۲۴/۹	-۰/۰۲۱	↓ ۱
۱۱	۱۹/۱	۱۹/۹	۲۰/۱	۲۵/۷	-۰/۰۳۴	↓ ۱
۱۲	۱۹/۲	۲۱/۲۱	۱۹/۷	۲۷/۳۲	-۰/۰۷۸	↓ ۱
ATCC 35556	۱۹/۴	۲۲/۵	۱۹/۵	۲۷/۹	-۰/۰۲۲	↓ ۱



شکل ۳. بیان ژن *norA* در سویه‌های تیمار شده با عصاره.

### بحث

افلاکس *norA*، *norB* و *norC* در سویه‌های مقاوم به دارو یافت می‌شوند (۱۹).

یکی از مکانیسم‌های مهم مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، وجود پمپ‌های افلاکس است. پمپ‌های

گیاهان به‌عنوان یک جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها مورد توجه بسیار قرار گرفته است (۲۶).

از این‌رو در این تحقیق از گیاه *A. ciniformis* استفاده شد تا نقش آن در کاهش بیان ژن *norA* که یکی از ژن‌های مهم در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به سیپروفلوکساسین است، مورد بررسی قرار گیرد.

نتایج مطالعه ما نشان داد که عصاره گیاه *A. ciniformis* قادر به کاهش بیان چشمگیر ژن *norA* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین است. لازم به ذکر است بیان متفاوتی از ژن *norA* در سویه‌های مقاوم دیده شد و در سویه‌های مقاوم‌تر کاهش بیان نسبی بیشتری از ژن *norA* مشاهده شد.

تفاوت در تاثیر عصاره‌های گیاهی بر باکتری‌ها به عوامل مختلف وابسته است که از آن میان می‌توان به منطقه جغرافیایی، روش، رقم و سن گیاه، روش خشک کردن، روش استخراج ترکیبات موثر، نوع حلال، غلظت عصاره و نوع محیط کشت اشاره نمود. به‌طور کلی ترکیبات گیاهی خاصیت ضد میکروبی خود را از طریق سازوکارهایی چون تجزیه دیواره سلولی، افزایش اسیدیته سیتوزولی، آسیب به غشای سلولی، نشت محتویات سلول به خارج، اختلال در نقل و انتقال پروتون و اختلال در فعالیت آنزیم‌های حیاتی نظیر ATPase و جلوگیری از متابولیسم باکتری اعمال می‌کنند (۲۷).

استفاده از عصاره‌های گیاهی بعلاوه پتانسیل ضد باکتریایی که دارند، می‌تواند یک روش موثر، کم‌هزینه و قابل دسترس جهت کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در طیف وسیعی از باکتری‌های فرصت طلب بیمارستانی باشد. بنابراین یافتن گیاه طبی اثرگذار در این امر به عنوان یک راهکار جدید و موثر در کاهش فعالیت پمپ‌های افلاکس *norA* و به‌دنبال آن کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در روشی وابسته به طب سنتی و کم‌هزینه می‌تواند مفید واقع شود (۲۸).

مطالعات مختلفی در زمینه بررسی تاثیر ترکیبات خاص بر روی بیان ژن‌های پمپ‌های افلاکس انجام شده است.

فلاینونید *sarothrin* استخراج شده از برگ و گل *orientalis* *Alkann* سبب مهار فعالیت پمپ افلاکس *norA* و مانع از رشد *Mycobacterium smegmatis* و *S. aureus* شد (۲۸).

*kalia* و همکارانش در سال ۲۰۱۲، به بررسی تعیین نقش *capsaicin* (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) به عنوان مهارکننده پمپ *norA* در *S. aureus SA-1199B* (overproducing) ، SA-1199 (wild-type) و SA-K1758 (*norA*)

بر اساس ترادف و شباهت اسیدهای آمینه، پنج گروه اصلی برای پمپ‌های افلاکس باکتریایی در نظر گرفته می‌شود. این گروه‌ها عبارتند از خانواده Major Resistance-Nodulation Division (RND)، Small Multidrug Resistance Facilitator Super Family (MFS)، Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE)، (SMR)، ATP Binding Cassette (۲۰). پمپ‌های افلاکس از نظر بالینی مرتبط با گروه‌های RND یا MFS هستند که با آزادسازی انرژی نیرو محرکه پروتون در خارج کردن آنتی‌بیوتیک نقش دارند (۲۱). یکی از سیستم‌های مهم افلاکس در *استافیلوکوکوس اورئوس* سیستم افلاکس MFS است. پمپ افلاکس *norA* یکی از پمپ‌های مهم این خانواده است. مطالعات مختلف نشان داده است که *norA* قادر است ترکیبات مختلفی مانند فلئوروکینولون‌های هیدروفوب از قبیل نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین، اتیدیوم بروماید را به خارج سلول پمپ کند (۲۲). هم چنین اثبات شده است که سلول باکتری دارای یک بیان پایه‌ای و پایدار از ژن *norA* است که مسول ایجاد مقاومت به ترکیبات آنتی‌بیوتیکی است. ارتباط مستقیمی بین افزایش بیان پمپ افلاکس *norA* و افزایش مقاومت به فلئوروکینولون‌ها وجود دارد.

ثابت شده است که ایجاد جهش در ژن *norA* می‌تواند سبب بروز بیان دائمی و فعال شدن این پمپ شود. به‌طوری‌که این جهش‌ها قادرند با اعمال تغییر در ساختار دوم mRNA، سبب افزایش نیمه عمر آن و همچنین کاهش حساسیت به آنزیم RNases شوند (۲۳).

نشان داده شده است که پمپ افلاکس *norA* در ایجاد مقاومت به سیپروفلوکساسین در سویه بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* نقش اساسی دارد و بررسی حضور این ژن می‌تواند در پیشنهاد و الگوی درمانی حائز اهمیت باشد (۲۴، ۲۵).

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در حذف عامل میکروبی بسیار مفید هستند. اما در سال‌های اخیر مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در حال افزایش است. از سوی دیگر خود آنتی‌بیوتیک علاوه بر اثر کشندگی بر روی باکتری‌های مهاجم بر روی فلور نرمال بدن و سلول‌ها، تاثیر منفی داشته و می‌تواند در انسان‌ها منجر به عوارض جانبی شوند. از این‌رو محققان در سال‌های اخیر در پی یک جایگزین مناسب برای اینگونه آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. از زمان‌های قدیم گیاهان دارویی به‌عنوان منابع مهم متابولیت‌های ثانویه (ترپنوئید، ترکیبات فنولیک و آلکالوئیدها) مورد استفاده‌های بالینی داشتند و می‌توانند به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم بر فعالیت پمپ‌های افلاکس اثر بگذارند. اخیراً استفاده از ترکیبات گیاهی و عصاره‌های حاصل از

نتایج این مطالعه هم همراستا با مطالعات دیگر بیانگر این بود که گیاه *A. ciniformis* سبب کاهش بیان ژن *norA* پمپ‌های افلاکس در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* شد. کاهش بیان ژن *norA*، باعث عملکرد ضعیف این پمپ‌ها شده و از تراوش زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر مواد ضد عفونی‌کننده و دارویی جلوگیری می‌شود. بنابراین قابلیت استفاده به‌عنوان داروی مناسب آنتی‌باکتریال دارد و از طرفی با توجه به اهمیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مطالعه سایر پمپ‌های افلاکس و مقایسه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی پیشنهاد می‌شود.

### سپاسگزاری

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند و دکتر بازرگان تشکر و قدردانی می‌گردد.

### تعارض در منافع

در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافی نداشته‌اند.

### منابع مالی

منابع مالی این تحقیق توسط، نویسندگان تامین شده است.

knockout) و تاثیر آن در حمله به cell line J774 ماکروفاژ توسط *S. aureus* پرداختند. ساختار سه بعدی NorA با استفاده از *in silico* پیش‌بینی شد و مطالعات داکینگ capsaicin نشان داد که capsaicin سبب کاهش MIC سیپروفلوکساسین در *S. aureus* SA-1199B، SA-1199 می‌شود. بطوریکه سبب افزایش حساسیت *S. aureus* به سیپروفلوکساسین شد. ممانعت از ethidium bromide توسط efflux NorA-overproducing *S. aureus* SA-1199B نقش capsaicin را به عنوان مهارکننده پمپ NorA efflux تایید کرد. این مطالعه برای اولین بار نشان داده است که capsaicin نه تنها سبب کاهش فعالیت پمپ افلاکس می‌شود بلکه سبب کاهش حمله استافیلوکوک‌ها به ماکروفاژها نیز می‌شود (۲۹).

مطالعات نشان داد که عصاره و ترکیبات Olympicin A، 5,7-dihydroxy-6-(2-methylbutanoyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)-4-phenyl-2H-chromen-2-one و Karavilagenin C، Boeravinone B، Ailanthoidiol حاصل از اندام‌های هوایی *Hypericum olympicum L.* گل‌های *Mesua ferrea L.* اندام‌های هوایی *Momordica balsamina L.* ریشه *Zanthoxylum capense* و *Boerhavia diffusa* سبب مهار و کاهش فعالیت پمپ افلاکس *norA* شدند. به عبارتی نقش مهارکننده پمپ افلاکس (EPI) Efflux pump inhibitor داشتند (۳۰-۳۴).

## Referance

1. Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical microbiology reviews*. 1997;10(3):505-20. [DOI:10.1128/CMR.10.3.505]
2. Corredor Arias LF, Espinal L, Samara J, Moncayo Ortiz JJ, Santacruz Ibarra JJ, Álvarez Aldana A. Relationship between super antigenicity, antimicrobial resistance and origin of *Staphylococcus aureus* isolated. *Colombia Médica*. 2016;47(1):15-20. [DOI:10.25100/cm.v47i1.1818]
3. Hefzy EM, Hassan GM, Abd El Reheem F. Detection of Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage among Egyptian health care workers. *Surgical infections*. 2016 1;17(3):369-75. [DOI:10.1089/sur.2015.192] [PMID]
4. Petrović-Jeremić L, Kuljić-Kapulica N, Ristanović E, Jošić D, Lepšanović Z. Prevalence of Pantone-Valentine leukocidin genes in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the District of Pomoravlje. *Vojnosanitetski pregled*. 2016;73(3):256-60. [DOI:10.2298/VSP140715003P]
5. Firsov AA, Smirnova MV, Strukova EN, Vostrov SN, Portnoy YA, Zinner SH. Enrichment of resistant *Staphylococcus aureus* at ciprofloxacin concentrations simulated within the mutant selection window: bolus versus continuous infusion. *International journal of antimicrobial agents*. 2008 1;32(6):488-93. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2008.06.031] [PMID]
6. S. Maisnier-Patin and D. I. Andersson; WHO Regional Committee for Europe. European strategic action plan on antibiotic resistance. *Res. Microbiol*. 2004, 155,360-369; Copenhagen. 2011. [DOI:10.1016/j.resmic.2004.01.019] [PMID]
7. American Academy of Microbiology. Antibiotic resistance: an ecological perspective on an old problem. Washington DC.2009.
8. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced drug delivery reviews*. 2005;57(10):1486-513. [DOI:10.1016/j.addr.2005.04.004] [PMID]
9. Stavri M, Piddock LJ, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of antimicrobial*

- chemotherapy. 2007;59(6):1247-60. [DOI:10.1093/jac/dkl460] [PMID]
10. Tegos GP, Masago K, Aziz F, Higginbotham A, Stermitz FR, Hamblin MR. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008 1;52(9):3202-9. [DOI:10.1128/AAC.00006-08] [PMID] [PMCID]
  11. De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K, Iglewski BH, Storey DG. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(6):1761-70. [DOI:10.1128/AAC.45.6.1761-1770.2001] [PMID] [PMCID]
  12. Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 2001;3(2):255-64.
  13. Sierra JM, Ruiz J, Jimenez De Anta MT, Vila J. Prevalence of two different genes encoding NorA in 23 clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000;46(1):145-6. [DOI:10.1093/jac/46.1.145] [PMID]
  14. 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. *Microbial pathogenesis*. 2016;97:34-7. [DOI:10.1016/j.micpath.2016.05.017] [PMID]
  15. Simoes M, Bennett RN, Rosa EA. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural product reports*. 2009;26(6):746-57. [DOI:10.1039/b821648g] [PMID]
  16. Schelz Z, Hohmann J and Molnar J. *Ethnomedicine: A Source of Complementary Therapeutics*. ed. D. Chattopadhyay. Research Signpost. 1st edn. 2010; 6:179-201.
  17. Sibanda T, Okoh AI. The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. *African Journal of Biotechnology*. 2007;6(25).
  18. Zahmatkesh H, Alsadat M, Laripoor M, Mirzaie A, Ashrafi F. Prevalence of norA and norB efflux pump genes in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and their contribution in ciprofloxacin resistance. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2016;10(5):20-30.
  19. Stutz K, Stephan R, Tasara T. SpA, ClfA, and FnbA genetic variations lead to *Staphylococcus aureus* test-negative phenotypes in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(2):638-46. [DOI:10.1128/JCM.01148-10] [PMID] [PMCID]
  20. 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*. *International journal of antimicrobial agents*. 2012;40(3):204-9. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2012.04.014] [PMID]
  21. Paulsen IT, Lewis K. Microbial multidrug efflux. *Horizon Scientific*. 2002; 3(2): 143-144.
  22. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*. 2009;69(12):1555-623. [DOI:10.2165/11317030-000000000-00000] [PMID] [PMCID]
  23. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced drug delivery reviews*. 2005;57(10):1486-513. [DOI:10.1016/j.addr.2005.04.004] [PMID]
  24. Zahmatkesh H, Alsadat M, Laripoor M, Mirzaie A, Ashrafi F. Prevalence of norA and norB efflux pump genes in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and their contribution in ciprofloxacin resistance. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2016;10(5):20-30. Iranian.
  25. KAZEMI SS, NEMATI MF, MIRZAIE A, ASHRAFI F. Antibiotic resistance assessment, and genotypic and phenotypic detection of norA efflux pump in methicillin and ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Pump in Methicillin and Ciprofloxacin *Staphylococcus Aureus* Strains. *Journal of Microbial World*. 2017; 9(4): 286-296. Iranian.
  26. Seukep AJ, Kuete V, Nahar L, Sarker SD, Guo M. Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Available online 5 November 2019. in press [DOI:10.1016/j.jpha.2019.11.002]
  27. Holler JG, Christensen SB, Slotved HC, Rasmussen HB, Gúzman A, Olsen CE, et al. Novel inhibitory activity of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by a kaempferol rhamnoside isolated from *Persea lingue* Nees. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67(5):1138-44. [DOI:10.1093/jac/dks005] [PMID]
  28. Bame JR, Graf TN, Junio HA, Bussey III RO, Jarmusch SA, El-Elimat T, et al. Sarothrin from *Alkanna orientalis* is an antimicrobial agent and efflux pump inhibitor. *Planta Med*. 2013;79(5):327-9. doi: 10.1055/s-0032-1328259. [DOI:10.1055/s-0032-1328259] [PMID] [PMCID]
  29. 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*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(10):2401-8. [DOI:10.1093/jac/dks232] [PMID]

30. Shiu WK, Malkinson JP, Rahman MM, Curry J, Stapleton P, Gunaratnam M, et al. A new plant-derived antibacterial is an inhibitor of efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *International journal of antimicrobial agents*. 2013;42(6):513-8. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2013.08.007] [PMID]
31. Roy S, Kumari N, Pahwa S, Agrahari U, Bhutani K, Jachak S, Newman D. NorA efflux pump inhibitory activity of coumarins from *Mesua ferrea*. *Fitoterapia*. 2013; 90:140-150. [DOI:10.1016/j.fitote.2013.07.015] [PMID]
32. Ramalhete C, Spengler G, Martins A, Martins M, Viveiros M, Mulhovo S, Ferreira M, Amaral L. Inhibition of efflux pumps in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* resistant strains by triterpenoids from *Momordica balsamina*. *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 37:70-74. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2010.09.011] [PMID]
33. Cabral V, Luo X, Junqueira E, Costa S, Mulhovo S, Duarte A, Couto I, Viveiros M, Ferreira M. Enhancing activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus*: *Zanthoxylum capense* constituents and derivatives. *Phytomedicine*. 2015; 22:469-476. [DOI:10.1016/j.phymed.2015.02.003] [PMID]
34. Singh S, Kalia NP, Joshi P, Kumar A, Sharma PR, Kumar A, Bharate SB, Khan IA. Boeravinone B, A Novel Dual Inhibitor of NorA Bacterial Efflux Pump of *Staphylococcus aureus* and Human P-Glycoprotein, Reduces the Biofilm Formation and Intracellular Invasion of Bacteria. *Front Microbiol*. 2017;8:1868. [DOI:10.3389/fmicb.2017.01868] [PMID] [PMCID]