

بررسی اثرات ضدپمپ افلاکسی عصاره گیاه بابونه (*Anthemis atropatana*) در سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سیپروفلوکساسین با استفاده از روش Real Time PCR

شیما عزتی^۱، امیر میرزایی^{۲*}، مسعود زندی^۳

- ۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران
 - ۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران
 - ۳- مربی، گروه زیست‌شناسی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران
- *آدرس مکاتبه: رودهن، مجتمع دانشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن، کدپستی: ۳۹۷۳۱۸۸۹۸۱
تلفن و نمابر: ۷۶۵۰۵۰۱۵ (۰۲۱)
پست الکترونیک: A.mirzaie@riau.ac.ir

تاریخ تصویب: ۹۶/۷/۱۰

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۱۹

چکیده

مقدمه: سویه‌های مقاوم به دارو استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند. به طوری که پمپ افلاکس **norB** در این باکتری نقش بسزایی در ایجاد مقاومت‌های دارویی دارد. هدف: هدف از این مطالعه بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره گیاه بومی بابونه (*Anthemis atropatana*) و اثرات ضدپمپ افلاکسی **norB** آن بر روی ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ابتدا عصاره گیاه بابونه با استفاده از روش ماسراسیون تهیه و ترکیبات فیتوشیمیایی آن با استفاده از روش GC/MS تعیین شد. به دنبال آن وجود پمپ افلاکس **norB** در ۵۰ سویه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به دارو به روش فنوتیپی کارت ویل و ژنوتیپی PCR بررسی شد. در انتها، پس از تیمار سویه‌ها با غلظت زیرحدکشندگی عصاره (SubMIC)، اثرات ضدپمپ افلاکسی **norB** آن با روش Real Time PCR ارزیابی شد. نتایج: آنالیز فیتوشیمیایی عصاره با استفاده از روش GC/MS نشان داد که بیشترین ترکیبات تشکیل‌دهنده عصاره مربوط به Dodecane (۹/۸٪) و Tridecane (۶/۴٪) می‌باشد. همچنین نتایج روش کارت ویل و PCR نشان داد که از میان ۵۰ سویه بالینی، ۱۰ سویه دارای پمپ افلاکس **norB** هستند. در نهایت به دنبال تیمار سویه‌ها با غلظت SubMIC عصاره، نتایج Real Time PCR کاهش بیان ژن پمپ افلاکس **norB** را در سویه‌ها نشان داد. نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، به نظر می‌رسد این گیاه می‌تواند به عنوان یک منبع طبیعی دارویی پتانسیل استفاده در صنایع دارویی را داشته باشد.

کل واژگان: گیاه بابونه، استافیلوکوکوس اورئوس، پمپ افلاکس **norB**، Real Time PCR



مقدمه

گیاهان دارویی از دیرباز در علم پزشکی جهت از بین بردن باکتری‌ها و بیماری‌های ناشی از آن مورد استفاده قرار می‌گرفتند و تحقیقات وسیعی برای یافتن ترکیبات موجود در گیاهان دارویی، فراورده‌ها و مواد دارویی گیاهی از زمان‌های قدیم انجام شده است. نکته حائز اهمیت این است که درصد کمی از گونه‌های گیاهی به عنوان منبع ترکیبات دارویی جهت درمان بیماری‌های میکروبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۱]. یکی از باکتری‌های بیماری‌زای بیمارستانی که به اغلب درمان‌ها مقاوم شده است، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* است. *استافیلوکوکوس اورئوس* یک باکتری گرم مثبت بیهوازی اختیاری بوده که به عنوان یکی از عوامل مهم ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی در نظر گرفته می‌شود [۲-۴]. سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاومت‌های چندگانه دارویی مشکلات عدیده‌ای را در درمان ایجاد کرده‌اند، به طوری که یکی از دلایل مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در این باکتری استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها است [۵، ۶]. سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین *استافیلوکوکوس اورئوس* از جمله مهم‌ترین سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌باشند که به تدریج به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها در حال مقاوم شدن هستند [۷]. آنتی‌بیوتیک‌های فلئوروکوئینولون مانند سیپروفلوکساسین یکی از داروهای مناسب و جایگزین برای درمان سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد [۸]. با این وجود، به دنبال تجویز سیپروفلوکساسین جهت درمان عفونت ناشی از این باکتری، مقاومت به این آنتی‌بیوتیک نیز رخ داده است، به طوری که در برخی از موارد میزان مقاومت به ۱۰۰ درصد رسیده است [۹].

به طور کلی مکانیسم‌های مختلفی جهت مقاوم شدن سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی‌بیوتیک وجود دارد که یکی از مکانیسم‌ها ممانعت از تجمع دارو درون سلول بوسیله سیستم‌های افلاکس می‌باشد [۱۰]. پمپ‌های افلاکس مواد سمی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها را به محیط خارج پمپ می‌کنند و دارا بودن پمپ‌های افلاکس یکی از توانایی‌های این باکتری برای مقاوم شدن به آنتی‌بیوتیک‌ها است [۱۱]. به طور کلی

پمپ‌های افلاکس باکتریایی بر اساس ترادف و شباهت اسیدهای آمینه در پنج گروه اصلی قرار می‌گیرند [۱۲]. پمپ‌های افلاکس از نظر بالینی به طور مؤثری در ارتباط با گروه‌های *Nodulation Division (RND)* یا *Major Facilitator Super Family (MFS)* می‌باشند که با آزادسازی انرژی نیرو محرکه پروتون در خارج کردن آنتی‌بیوتیک نقش دارند [۱۳]. سیستم افلاکس *MFS* یکی از سیستم‌های مهم افلاکس در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد که پمپ افلاکس *norB* یکی از پمپ‌های مهم این خانواده است و مطالعات نشان می‌دهد که *norB* می‌تواند ترکیبات مختلفی مانند فلئوروکوئینولون‌های هیدروفوب (از قبیل نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین)، بیوساید‌ها، اتیدیوم بروماید و تتراسایکلین‌ها را به سمت بیرون پمپ کند [۱۴، ۱۵]. *Truong-Bolduc QC* و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که پمپ افلاکس *norB* نقش مهمی در مقاومت به سیپروفلوکساسین و بیماری‌زایی در مدل‌های موشی دارد، به طوری که افزایش بیان ژن *norB* نقش مهمی در ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها از قبیل سیپروفلوکساسین دارد [۱۶]. امروزه بسیاری از محققان در تلاش هستند از راهکارهای جایگزین جهت درمان این باکتری‌ها بخصوص مهار پمپ‌های افلاکس استفاده کنند، به طوری که عصاره‌های گیاهی یکی از انتخاب‌های محققین جهت بررسی اثرات ضدپمپ افلاکسی می‌باشد [۱۷]. به طور کلی، با مهار پمپ‌های افلاکس یا کاهش بیان آنها در باکتری‌ها می‌توان فرایند درمان را بهبود بخشید. مطالعات مختلفی در زمینه بررسی اثرات ضدپمپ افلاکسی عصاره‌های گیاهی در سویه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شده است. شریفی و همکارانش در سال ۱۳۹۵ با بررسی بر روی عصاره گیاه آویشن بیان داشتند که عصاره این گیاه بر روی پمپ افلاکس باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* خاصیت مهار دارد و پیشنهاد کردند که عصاره این گیاه را می‌توان به همراه آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین جهت اهداف درمانی به کار برد [۱۸]. در این مطالعه، ما برای اولین بار یکی از گیاهان بومی ایران به نام بابونه (*Anthemis atropatana*) را از نقطه نظر فیتوشیمیایی و بیولوژیکی مورد مطالعه قرار دادیم. جنس



گرفت. گاز حامل هلیوم ۹۹/۹۹ درصد و مقدار تزریق ۱ میکرولیتر و سرعت جریان گاز ۱۵ میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم شده بود. حجم ۱ میکرولیتر از عصاره گیاه به دستگاه GC/MS تزریق شد و سپس نتایج به دست آمده از دستگاه بر اساس اندیس کوآتس و مراجعه به فرهنگ طبیعی ترکیبات طبیعی مورد شناسایی قرار گرفت.

شناسایی ترکیبات گیاهی

تفسیر طیف‌های GC-MS با استفاده از دیتابیس‌های National Institute Standard and Technology (NIST) که بیش از ۶۲۰۰۰ الگو دارد، انجام شد. طیف‌های جرمی ناشناخته با طیف‌های شناخته شده موجود در کتابخانه NIST مقایسه شد. نام، وزن مولکولی و ساختار ترکیب مواد جداسازی شده، تأیید شد.

نمونه‌گیری، کشت و تشخیص ایزوله‌های باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس

در این مطالعه در فاصله حدوداً ۶ ماه در مجموع تعداد ۲۰۰ نمونه بالینی مختلف نظیر زخم، خلط، ادرار، مایع نخاعی و مایع مفصل از بیمارستان‌های مختلف شهر تهران به روش تصادفی جمع‌آوری شد. ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از آزمایش‌های کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم، کوآگولاز، تخمیر مانیتول و DNase تشخیص قطعی داده شدند. در نهایت از تمامی سویه‌ها در محیط نوترینت برات حاوی ۱۵ درصد گلیسرول کشت ذخیره تهیه و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جداسازی شده پس از شناسایی و تأیید سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، حساسیت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن بر اساس استاندارد CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) مورد بررسی قرار گرفت [۱۹]. حساسیت ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوکسیتین (۱۰ میکروگرم)،

Anthemis از خانواده آستراسه است که حدود ۱۳۰ گونه از جنس آن در کل جهان انتشار دارد. این جنس در ایران ۳۹ گونه دارد که *Anthemis atropatana* یکی از گیاهان این خانواده است. از نقطه نظر طب سنتی، این گیاه دارای اثرات ضد عفونی‌کنندگی، ترمیم‌کنندگی زخم‌ها و درمان عفونت‌های میکروبی است. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در زمینه شناسایی ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه بابونه و اثرات ضدپمپ افلاکسی آن انجام نشده است، هدف از این مطالعه بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره گیاه *Anthemis atropatana* و ارزیابی اثرات ضدپمپ افلاکسی norB آن در سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری

این مطالعه تجربی از فروردین تا شهریورماه ۱۳۹۵ با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی انجام گرفت. گیاه *A. atropatana* از مرکز ذخایر زیستی ایران با شماره هرباریومی P ۱۰۰۵۸۲۸ تهیه شد. مواد گیاهی جمع‌آوری شده پس از تمیز نمودن، در سایه خشک شده و توسط آسیاب پودر شد و در شرایط بهینه و مناسب نگهداری شد. برای تهیه عصاره اتانولی، میزان ۴۰ گرم از گیاه را به ۱۰۰ میلی‌لیتر از اتانول اضافه نموده و به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. عصاره به دست آمده توسط کاغذ صافی فیلتر شده و وارد دستگاه روتاری شد.

آنالیز GC/MS عصاره گیاه

آنالیز گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی (GC-MS) عصاره گیاه *A. atropatana* با دستگاه Agilent 6890 (ساخت کشور آمریکا) انجام گرفت. نوع ستون DB-5، طول ستون ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر بود و برای ردیابی از سامانه پونیزاسیون الکترونی با انرژی ۷۰ eV استفاده شد. برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ۵۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت افزایش دمای ۶ درجه سانتی‌گراد در دقیقه انجام



تشکیل شود. سپس با دور 1300rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و فاز بالایی (فاز آبی) را به لوله‌های جدید منتقل می‌کنیم. این مرحله دوبار تکرار شده و به منظور رسوب DNA، هم حجم فاز آبی اتانول سرد و خالص به همراه ۰/۱ میکرولیتر استات سدیم (IM) اضافه می‌کنیم و آن را به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم. بعد از آن، لوله مورد را سانتریفیوژ (۵ دقیقه ۱۳۰۰۰ دور) نموده و رسوب حاصله را پس از خشک کردن و حل کردن در بافر به عنوان DNA مورد استفاده قرار می‌دهیم و در نهایت برای تأیید صحت استخراج ژنوم از الکتروفورز ژل آگاروز ۱٪ استفاده شد.

واکنش PCR برای ژن پمپ افلاکس *norB*

واکنش PCR به منظور وجود ژن پمپ افلاکس *norB* در ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین/استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت، به طوری که واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده به عنوان الگو، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر رفت، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول)، ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس (سیناژن، ایران)، ۱۰/۵ میکرولیتر آب از مقطر دو بار تقطیر انجام گرفت. جهت تکثیر ژن *norB* واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (سیناژن، ایران)، ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده به عنوان الگو، ۵ پیکومول از پرایمر رفت و برگشت، ۱۰/۵ میکرولیتر آب از مقطر دو بار تقطیر انجام گرفت. در ادامه واکنش PCR برای ژن *norB* با استفاده از پرایمرهای رفت $5' \text{AGCGGTTGTCTATCTTTCC} 3'$ و برگشت $3' \text{GCAGGTGGTCTTGCTGATAA} 5'$ با برنامه دمایی واسرشتگی اولیه (Initial denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و واسرشتگی (Denaturation) در دمای ۹۵ درجه به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو (Annealing) در دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طولیل شدن رشته الگو (Extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و طولیل شدن نهایی (Final

سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، پنی‌سیلین (۱۰ واحد)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، تری‌متوپریم (۲۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۱۵ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، ونکومایسین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، آموکسی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم) و کلیندامایسین (۲ میکروگرم) (MAST, UK) در محیط کشت Muller Hinton agar (مرک، آلمان) بررسی شد. لازم به ذکر است در تمامی انجام آزمایش‌ها، از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 به عنوان کنترل مثبت مقاوم به سیپروفلوکساسین (حاوی ژن *norB*) استفاده شد.

بررسی فنوتیپی وجود پمپ افلاکس *norB* با روش کارت ویل

به منظور بررسی فنوتیپی وجود پمپ افلاکس در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس، از روش آگار حاوی اتیدیوم بروماید (روش کارت ویل) استفاده شد. در ابتدا سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین/استافیلوکوکوس اورئوس روی پلیت‌های نوترینت آگار حاوی غلظت‌های متفاوت اتیدیوم بروماید (از ۰/۲۵ تا ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر) به صورت یک خط از مرکز محیط کشت به سمت کنار کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در نهایت میزان فلورسنت هر ایزوله با استفاده از دستگاه ژل داگ اندازه‌گیری شد. سویه‌هایی که خاصیت فلورسنت ندارند، دارای پمپ افلاکس بودند [۲۰].

استخراج DNA

استخراج DNA به روش دستی (فنل کلروفرم) انجام شد. به طور خلاصه، به رسوب تهیه شده از کشت باکتری‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، به ترتیب ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز (Tris-Hcl, pH7.4; EDTA 50mM)، ۱۳ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات (SDS 25%)، ۳ میکرولیتر پروتئیناز K (20mg/ml) اضافه نموده و آن را در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار می‌دهیم. به دنبال آن ۶۰۰ میکرولیتر محلول فنل-کلروفرم - ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۵:۲۴:۱ تهیه شده) می‌افزاییم تا یک فاز شیری رنگ یکنواخت



گردد بود که در ۴۰ سیکل انجام شد. همچنین ژن *gmk* (گوانیلات کیناز) به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت [۲۲]. در انتها بیان نسبی ژن *norB* توسط روش $\Delta\Delta Ct$ محاسبه شد. لازم به ذکر است پرایمرهای مورد استفاده در این قسمت $norB$ F 5'-GCTACACCATCAACAGATACAGCAA-3' و $norB$ GMK R-5'-ACTCAATGCGACGCCAAA-3' و همچنین $norB$ GMK-3' F5'-TATCAGGACCATCTGGAGTAGG-3' و $norB$ GMK-3' R5'-CATCAACTTCACCTTCACGC-3' بود.

تجزیه و تحلیل آماری

محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد و داده‌های Real Time PCR با آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت $P < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر قرار گرفته شد.

نتایج

آنالیز ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره گیاه

A. atropatana

آنالیز کروماتوگرام GC-MS عصاره گیاه *A. atropatana* ۲۰ پیک را نشان داد که نشان‌دهنده وجود ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در گیاه می‌باشد (شکل شماره ۱). با مقایسه طیف‌ها با اطلاعات کتابخانه NIST، ۲۰ ترکیب شیمیایی شناسایی شد (جدول شماره ۱). از میان ترکیبات - شناسایی شده بیشترین میزان آن مربوط بود به Dodecane (۹/۸ درصد) و Tridecane (۶/۴ درصد) و همچنین کمترین آن مربوط به Octadecane, 6-methyl (۰/۲ درصد) بود. در میان ترکیبات شناسایی شده به نظرمی‌رسد ترکیبات دارای - گروه‌های عاملی و دارای ساختمان‌های حلقوی می‌توانند خاصیت ضد باکتریایی و ضد پمپ افلاکسی داشته باشند.

جداسازی و تشخیص سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس

از نمونه‌های بالینی

در این مطالعه طی ۶ ماه، در مجموع ۲۰۰ نمونه بالینی

(extension) به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در طی ۳۰ سیکل انجام شد [۲۱].

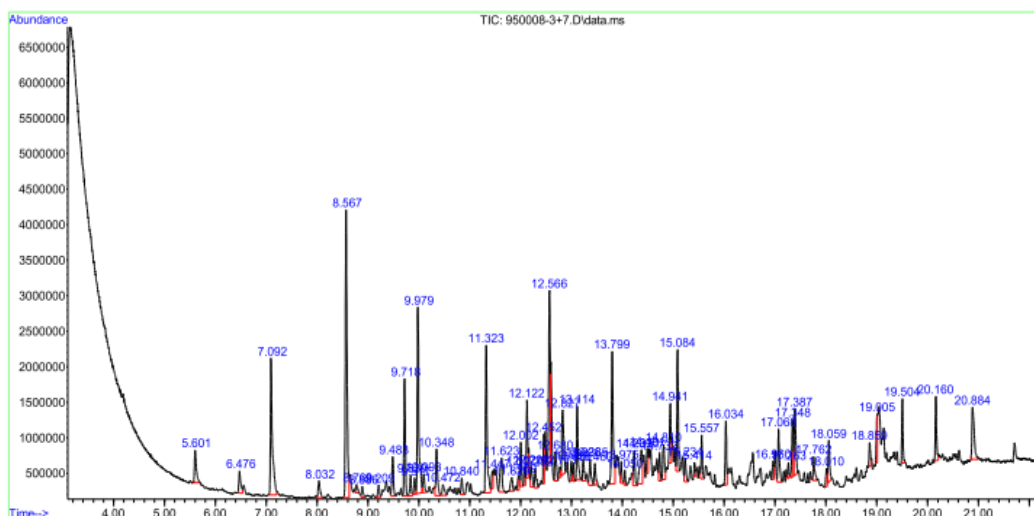
تعیین حداقل غلظت مهار (MIC) برای عصاره

به دنبال تعیین سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، این سویه‌ها جهت تست MIC (Minimum Inhibitory Concentration) عصاره مورد مطالعه قرار گرفتند. آزمایش MIC بر اساس استاندارد CLSI به روش رقیق‌سازی در میکروپلیت انجام گرفت. تست MIC به صورت سه بار تکرار با استفاده از روش میکرودايلوشن در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. به طوری که میزان MIC عصاره در غلظت‌های $4000-62/5 \mu\text{g/ml}$ انجام شد [۱۸].

استخراج RNA، سنتز cDNA و آنالیز بیان ژن *norB* توسط روش Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

جهت استخراج RNA، ابتدا سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با غلظت‌های زیر حدکشدگی (SubMIC) عصاره به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت مولر هیتون براث در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. به دنبال آن، استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA (کیژن، امریکا) بر طبق دستورالعمل انجام گرفت. در ادامه، سنتز cDNA با استفاده از کیت Quanti Tect Reverse Transcription kit (کیژن، امریکا) انجام گرفت. در انتها، غلظت cDNA های استخراج توسط نانودراپ تعیین غلظت شدند. به منظور بررسی ارزیابی بیان ژن پمپ افلاکس *norB* از روش Real Time PCR کمی (qRT-PCR) با استفاده مستر میکس حاوی سایبرگرین (Applied Biosystem، انگلستان) انجام گرفت. مواد مورد استفاده در حجم ۲۰ میکرولیتر مستر میکس شامل ۲ میکرولیتر از cDNA، ۱۰ پیکومول از پرایمرهای رفت و برگشت، ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس حاوی سایبر گرین بود که در دستگاه Bioneer کره انجام گرفت برنامه دمایی مورد استفاده در qPCR شامل ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه، ۱ دقیقه دمای ۶۰ درجه سانتی





شکل شماره ۱- کروماتوگرام عصاره گیاه *A. atropatana*. پیک‌های موجود در کروماتوگرام تعداد ترکیبات موجود در گیاه را نشان می‌دهد.

جدول شماره ۱- آنالیز کروماتوگرام GC-MS عصاره گیاه *A. atropatana*

No.	Compound identified	Molecular formula	MW	RT (min)	Peak area (%)	Structure
1	Decane	C ₁₀ H ₂₂	142	5.601	1.243	
2	Decane, 2,4,6-trimethyl	C ₁₃ H ₂₈	184	6.476	0.851	
3	Undecane	C ₁₁ H ₂₄	156	7.092	5.565	
4	Silane, cyclohexyldimethoxymethyl	C ₉ H ₂₀ O ₂ Si	188	8.032	0.713	
5	Dodecane	C ₁₂ H ₂₆	170	8.567	9.831	
6	Octadecane, 6-methyl	C ₁₉ H ₄₀	268	8.769	0.299	
7	Tetradecane, 2,6,10-trimethyl	C ₁₇ H ₃₆	240	8.886	0.355	
8	Dodecane, 2,6,11-trimethyl	C ₁₅ H ₃₂	212	9.718	3.310	
9	Tridecane	C ₁₃ H ₂₈	184	9.979	6.486	



ادامه جدول شماره ۱-

No.	Compound identified	Molecular formula	MW	RT (min)	Peak area (%)	Structure
10	Heptadecane, 2,6,10,15-tetramethyl	C ₂₁ H ₄₄	296	10.348	1.633	
11	Tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	198	11.323	4.792	
12	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	C ₁₄ H ₂₂ O	206	12.827	2.594	
13	Hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	226	13.799	4.545	
14	Octadecane, 3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)	C ₂₆ H ₅₄	366	14.050	0.360	
15	Heptacosane	C ₂₇ H ₅₆	380	14.491	0.686	
16	tert-Hexadecanethiol	C ₁₆ H ₃₄ S	258	15.414	0.352	
17	Octadecane	C ₁₈ H ₃₈	254	16.034	1.804	
18	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	276	17.387	2.254	
19	Hexadecanoic acid, ethyl ester	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	18.010	0.492	
20	Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	296	19.005	0.914	

نتایج آزمایش دیسک دیفیوژن

در این مطالعه، ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۹۸ درصد)،

ادرار، پوست، زخم و خون از آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های شهر تهران جمع‌آوری شد. در ابتدا با استفاده از تست‌های میکروبی رنگ‌آمیزی گرم، محیط مانیتول سالت‌آگار، محیط بردپارکر، تست کاتالاز، تست کواگولاز، تست DNase، ۵۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شد.



نتایج PCR ژن *norB* در سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین

به منظور بررسی وجود ژن پمپ افلاکس *norB* در سویه-های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده، از پرایمرهای اختصاصی این ژن استفاده شد و انتظار وجود باند ۱۱۷ جفت باز وجود داشت که شکل آن در ژل الکتروفورز مشاهده شد (شکل شماره ۲). ژن *norB* در تمامی سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین دیده شد (۱۰ نمونه) و ارتباط معناداری بین وجود ژن *norB* و مقاومت به سیپروفلوکساسین در بین سویه ها وجود داشت ($P < 0/05$).

نتایج MIC عصاره علیه سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین

سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین *استافیلوکوکوس اورئوس* تحت تأثیر غلظت های $4000-62/5 \mu\text{g/ml}$ از عصاره گیاه در مدت زمان ۲۴ ساعت قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سویه های مختلف دارای محدوده ای از $125-500 \mu\text{g/ml}$ MIC بودند (جدول شماره ۳) و ارتباط معناداری بین میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین و میزان MIC وجود نداشت ($P > 0/05$).

آمی سیلین (۹۰ درصد)، آموکسی سیلین و تری متوپریم (۸۶ درصد)، سفوکسیتین (۶۸ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک ونکومایسین (۱۰۰ درصد حساس) و سیپروفلوکساسین (۷۸ درصد حساس) بودند. در مجموع میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های جداسازی شده از نمونه های ارادر و زخم بیشتر از سایر سویه ها بود. همچنین مقاومت به ونکومایسین در هیچ یک از سویه ها مشاهده نشده بود. میزان مقاومت سویه ها به آنتی بیوتیک ها در جدول شماره ۲ آمده است.

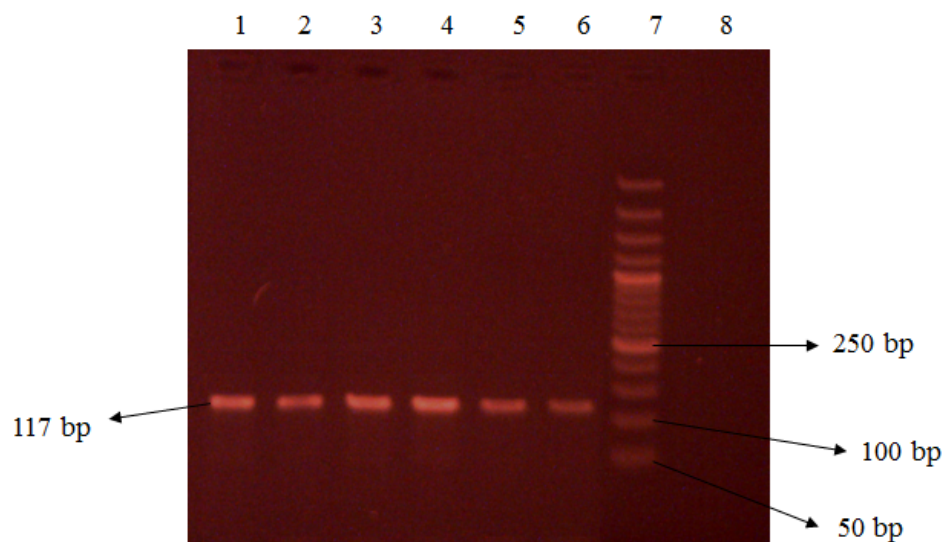
بررسی وجود پمپ افلاکس توسط تست کارت ویل

در این مطالعه ۲۰ درصد از سویه ها (۱۰ سویه) مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند و این تعداد سویه ها جهت بررسی وجود پمپ افلاکس *norB* توسط تست روش کارت ویل مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج تست کارت ویل نشان داد که تمامی سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای پمپ افلاکس *norB* هستند، به طوری که سویه های دارای پمپ افلاکس، اتیدیوم بروماید را به سمت بیرون پمپ می کنند ولی سویه های فاقد پمپ افلاکس این توانایی را ندارند و اتیدیوم بروماید در داخل سلول وارد می شود و از خود خاصیت فلوروسنت دارند.

جدول شماره ۲- میزان مقاومت و حساسیت سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی بیوتیک های مختلف

سویه های حساس		سویه های متوسط		سویه های مقاوم		آنتی بیوتیک
درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۳۲	۱۶	۰	۰	۶۸	۳۴	متی سیلین (سفوکسیتین)
۱۰۰	۵۰	۰	۰	۰	۰	ونکومایسین
۷۸	۳۹	۲	۱	۲۰	۱۰	سیپروفلوکساسین
۲	۱	۰	۰	۹۸	۴۹	پنی سیلین
۲۶	۱۳	۱۸	۹	۵۶	۲۸	اریترومایسین
۸	۴	۶	۳	۸۶	۴۳	تری متوپریم
۸	۴	۶	۳	۴۲	۲۱	آمیکاسین
۱۰	۵	۰	۰	۹۰	۴۵	آمی سیلین
۵۴	۲۷	۶	۳	۴۰	۲۰	جتنامایسین
۱۴	۷	۰	۰	۸۶	۴۳	آموکسی سیلین
۷۸	۳۹	۱۴	۷	۸	۴	کلرامفنیکل
۴۲	۲۱	۱۲	۶	۴۶	۲۳	کلیندامایسین





شکل شماره ۲- الکتروفورز محصول PCR ژن *norB* در سویه‌های مختلف. ستون ۱ تا ۵: نمونه‌های مثبت، ستون ۶: کنترل مثبت، ۷: مارکر DNA (50bp)، ۸: کنترل منفی

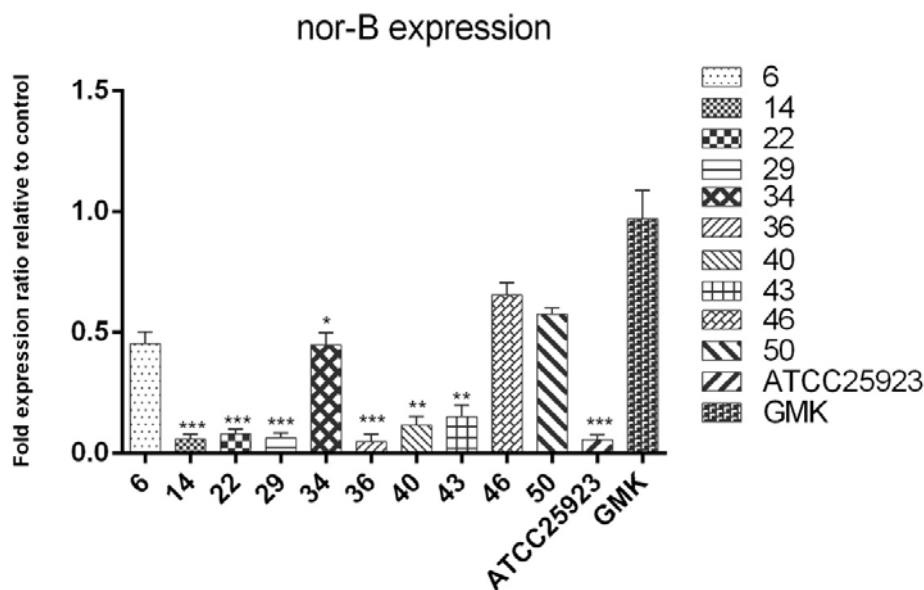
جدول شماره ۳- تعیین MIC عصاره گیاه در سویه‌های مختلف

شماره سویه	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
۶	۲۵۰
۱۴	۶۲/۵
۲۲	۵۰۰
۲۹	۳۱/۲۵
۳۴	۱۲۵
۳۶	۱۲۵
۴۰	۲۵۰
۴۳	۶۲/۵
۴۶	۲۵۰
۵۰	۱۲۵
ATCC 25923	۵۰۰

غلظت subMIC خود، تغییر بیان ژن *norB* را به همراه داشتند و از نظر آماری تفاوت معناداری بین بیان ژن *norB* با بیان ژن *gmk* وجود داشت ($P < 0/05$). در واقع پس از تیمار سویه‌ها با عصاره، میزان بیان ژن پمپ افلاکس *norB* کاهش یافته بود که نشان‌دهنده مهار پمپ افلاکس *norB* می‌باشد. نتایج حاصل از تغییر بیان ژن *norB* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین در نمودار شماره ۱ آمده است.

بررسی بیان ژن *norB* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین در غلظت‌های subMIC از عصاره در این مطالعه، بیان نسبی ژن پمپ افلاکس *norB* در ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین توسط روش qRT-PCR مورد مطالعه قرار گرفتند. تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت شدن آغازگرها و عدم تکثیر قطعات غیراختصاصی برای هر ژن با استفاده از منحنی ذوب تعیین شد. نتایج نشان داد که سویه‌های مختلف تحت تأثیر عصاره





نمودار شماره ۱- نمودار بیان ژن *norB* در سویه‌های مختلف مقاوم به سیپروفلوکساسین. اعداد محور عمودی میزان بیان ژن را نشان می‌دهند (Fold expression) و اعداد محور افقی شماره سویه‌ها را نشان می‌دهد. به صورت چند برابر شدن بیان در مقایسه با ژن کنترل (GMK) بیان شده است. ($P < 0.05$)*. ($n=3$, $P < 0.001$ ***, $P < 0.01$ **).

بحث

مشاهده می‌شود که به نظر می‌رسد به دلیل داشتن ساختار حلقوی و گروه‌های عاملی بیشترین سهم اثرات ضد میکروبی و ضد پمپ افلاکسی را به خود اختصاص می‌دهند. مطالعات مختلفی در زمینه بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی گونه‌های مختلف جنس *Anthemis* به انجام رسیده است. Grace MH و همکارانش در سال ۲۰۰۲ ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره گیاه *Anthemis melampodina* را با روش GC/MS مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب santolinatrien (۲۷/۳۳٪) و Farnesol (۱۶/۵٪) بیشترین ماده تشکیل‌دهنده عصاره این گیاه می‌باشد [۲۴]. Riccobono L و همکارانش در سال ۲۰۱۷ ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه *Anthemis arvensis* L. subsp. *Arvensis* را با روش GC/MS مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب Torreyol (۸۵/۴٪) بیشترین ترکیب تشکیل‌دهنده عصاره این گیاه می‌باشد [۲۵]. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد یکی از دلایل اختلاف در نوع ترکیبات شناسایی شده، نوع منطقه جغرافیایی، محل رشد و نوع کشت آن گونه گیاهی می

از نقطه نظر طب سنتی، استفاده از عصاره‌های گیاهی از زمان‌های قدیم جهت درمان بیماری‌های میکروبی توصیه شده است [۲۳]. در این مطالعه برای اولین بار عصاره گیاه بومی بابونه (*A. atropatana*) جهت مطالعات فیتوشیمیایی و میکروبی مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه پس از عصاره‌گیری با روش ماسراسیون، ترکیبات تشکیل‌دهنده عصاره این گیاه توسط روش GC/MS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین ترکیبات تشکیل‌دهنده عصاره این گیاه مربوط به Dodecane (۹/۸٪) و Tridecane (۶/۴٪) می‌باشد. Dodecane یک هیدروکربن آلکانی است که فرمول شیمیایی آن $C_{12}H_{26}$ است و به صورت مایعی شفاف و بی‌رنگ است. Tridecane نیز یک هیدروکربن آلکانی است که فرمول شیمیایی آن $C_{13}H_{28}$ است و به صورت خالص ماده‌ای بی‌رنگ است. در بین ترکیبات تشکیل‌دهنده عصاره این گیاه، ترکیباتی مانند 7,9-Di-Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl) و tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione



بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد پس از تیمار سویه‌ها با غلظت Sub MIC عصاره، بیان ژن *norB* در مقایسه با ژن *gmk* به عنوان ژن مرجع کاهش بیان معناداری داشتند که نشان دهنده اثرات چشم‌گیر ضدپمپ افلاکسی عصاره می‌باشد. لازم به ذکر است میزان مهارکنندگی پمپ افلاکس توسط عصاره در سویه‌های مختلف متفاوت بود به این ترتیب که برخی از سویه‌ها نسبت به عصاره کاهش بیشتری در میزان بیان ژن *norB* داشتند و در واقع عصاره فعالیت پمپ افلاکس بیشتری داشت. به نظر می‌رسد ترکیبات دارای ساختار حلقوی و گروه‌های عاملی موجود در عصاره این گیاه دارای فعالیت ضدپمپ افلاکسی می‌باشند. مطالعات مختلفی در جهت بررسی تأثیر ترکیبات طبیعی ضدپمپ افلاکسی و اثر آن در بیان ژن‌های پمپ افلاکس در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به انجام رسیده است. Pourmand و همکارانش در سال ۲۰۱۴، وجود ژن پمپ افلاکس *norA* و بیان آن را در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با روش Real Time PCR مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که ژن *norA* در تمامی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین وجود دارد و بیان ژن آن در مجاورت بیوساید هگزاهیدروکوئینولون افزایش می‌یابد [۲۲]. در مطالعه دیگری، Roy SK و همکارانش در سال ۲۰۱۳ اثرات ضدپمپ افلاکسی ترکیب گیاهی کومارین را بروی ایزوله‌های باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که اثر ضدپمپ افلاکسی کومارین وابسته به غلظت است و میزان MIC سویه‌ها در مجاورت با کومارین به اندازه ۲ برابر کاهش می‌یابد که این کاهش MIC به معنی مهار پمپ افلاکس می‌باشد [۲۶]. Kalia NP و همکارانش در سال ۲۰۱۲، اثر ضدپمپ افلاکسی ترکیب *capsaicin* را بروی سویه‌های بیماری‌زای *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که این ترکیب نه تنها توانایی چشم‌گیری در مهار پمپ افلاکس دارد، بلکه میزان بیماری‌زایی این باکتری را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۷].

به صورت کلی، با مقایسه نتایج مطالعه ما و سایر محققان می‌توان به این نتیجه رسید که ترکیبات طبیعی مخصوصاً گیاهی توانایی بالقوه برای مهار پمپ‌های افلاکس دارند و پیشنهاد می‌

باشد. یکی از محدودیت‌های این مطالعه دسترسی به انواع گیاهان بابونه با شرایط اقلیمی مختلف در سراسر دنیا بود که می‌توان به نوع ترکیبات شیمیایی گیاهان بومی کشور خود و سایر کشورها پرداخت.

یکی دیگر از اهداف این مطالعه بررسی اثرات ضدپمپ افلاکسی عصاره گیاه بابونه در سویه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به سیپروفلوکساسین بود. همان‌طور که اشاره شد پمپ‌های افلاکس در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از مهم‌ترین دلایل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* پمپ افلاکس *norB* در مقاومت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین که یک انتخاب درمانی برای سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین می‌باشد، نقش قابل توجهی دارد [۱۶]. بیان زیاد، تخریب و حذف یک پمپ افلاکس ممکن است در میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در این باکتری تأثیرگذار است. با تخلیص پروتئین‌های پمپ افلاکس و بررسی آزمایشگاهی اثر مهار ترکیبات مختلف می‌تواند دقیقاً اثرات ضدپمپ افلاکسی را نشان دهد. امروزه محققان در تلاش برای یافتن ترکیبات با منشأ طبیعی برای مهار پمپ‌های افلاکس در باکتری‌ها هستند به طوری که عصاره‌های گیاهی یکی از انتخاب‌های طبیعی برای مهار پمپ‌های افلاکس می‌باشد [۱۷].

در این مطالعه ابتدا سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای پمپ افلاکس *norB* توسط روش فنوتیپی کارت ویل و ژنتیکی PCR تعیین هویت شدند. در روش کارت ویل، سویه‌های دارای پمپ افلاکس *norB* سوسترای مورد استفاده یعنی اتیدیوم بروماید را به سمت بیرون پمپ می‌کنند ولی سویه‌های فاقد پمپ افلاکس *norB* توانایی پمپ کردن اتیدیوم بروماید را به سمت بیرون نداشتند و به صورت فلورسنت مشاهده می‌شوند. همچنین با استفاده از روش مولکولی PCR، سویه‌های واجد پمپ افلاکس *norB* مورد تأیید قرار گرفتند. در مرحله بعدی پس از تیمار سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با غلظت SubMIC عصاره گیاه مدنظر، به منظور بررسی اثرات ضدپمپ افلاکسی عصاره، بیان ژن پمپ افلاکس *norB* توسط روش Real Time PCR هم مورد



ترکیب مهارکننده پمپ افلاکس و درنهایت به عنوان یک مکمل دارویی امیدبخش به مراکز دارویی پیشنهاد شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان می‌باشد که از فروردین تا تیرماه ۱۳۹۵ انجام گرفت. بدین‌وسیله از تلاش همکاران بخصوص جناب آقای آرین رحیمی و تمام کسانی که در انجام این پروژه همکاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

شود که عصاره گیاه بابونه به همراه آنتی‌بیوتیک‌های درمانی دیگر جهت درمان عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به دارو مورد مطالعه قرار گیرند.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به اثرات ضدپمپ افلاکسی عصاره گیاه بابونه (*Anthemis atropatana*) پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتر در مورد خواص زیستی ترکیبات این گیاه انجام گیرد تا اهمیت پزشکی این گیاه بیشتر مشخص شود و به عنوان یک

منابع

- Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn. Rev.* 2012; 6 (11): 1-5.
- Geisinger E and Isberg RR. Interplay Between Antibiotic Resistance and Virulence During Disease Promoted by Multidrug-Resistant Bacteria. *J. Infect. Dis.* 2017; 15: 215 (suppl_1): S9-S17.
- Belbase A, Pant ND, Nepal K, Neupane B and et al. Antibiotic resistance and biofilm production among the strains of *Staphylococcus aureus* isolated from pus/wound swab samples in a tertiary care hospital in Nepal. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2017; 23: 16 (1): 15.
- Jokinen E, Laine J, Huttunen R, Rahikka P and et al. Comparison of outcome and clinical characteristics of bacteremia caused by methicillin-resistant, penicillin-resistant and penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Infect. Dis. (Lond).* 2017; 28: 1-8
- Bhattacharya S, Bir R and Majumdar T. Evaluation of Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus* and their Association with Biofilm Production in a Tertiary Care Hospital, Tripura, Northeast India. *J. Clin. Diagn. Res.* 2015; 9 (9): DC01-4.
- Eissa IH, Mohammad H, Qassem OA, Younis W and et al. Diphenylurea derivatives for combating methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Med. Chem.* 2017; 21; 130: 73-85.
- Wang XL, Li L, Li SM, Huang JY and et al. Phenotypic and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in slaughterhouse pig-related workers and control workers in Guangdong Province, China. *Epidemiol. Infect.* 2017; 29: 1-9.
- Osman KM, Amer AM, Badr JM, Helmy NM, Elhelw RA, Orabi A and et al. Antimicrobial Resistance, Biofilm Formation and *mecA* Characterization of Methicillin-Susceptible *S. aureus* and Non-*S. aureus* of Beef Meat Origin in Egypt. *Frontiers in microbiology. Front. Microbiol.* 2016; 29; 7: 222.
- Mustapha M, Bukar-Kolo YM, Geidam YA and 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.
- Alibert S, N'gompaza Diarra J, Hernandez J, Stutzmann and et al. Multidrug efflux pumps and their role in antibiotic and antiseptic resistance: a pharmacodynamic perspective. *Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol.* 2017; 13 (3): 301-309.
- Paulsen IT and Lewis K. Microbial multidrug efflux: Horizon Scientific. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2001; 3 (2): 143-4.



12. Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann. Med.* 2007; 39 (3): 162-76.
13. Li X-Z and Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 2009; 69 (12): 1555-623.
14. Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* 2013; 4 (3): 223-9.
15. Kwak YG, Truong-Bolduc QC, Bin Kim H, Song KH and et al. Association of norB overexpression and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; 68 (12): 2766-72.
16. Truong-Bolduc QC, Hsing LC, Villet R, Bolduc GR and et al. Reduced aeration affects the expression of the NorB efflux pump of *Staphylococcus aureus* by posttranslational modification of MgrA. *J. Bacteriol.* 2012; 194 (7): 1823-34.
17. Kakarla P, Floyd J, Mukherjee M, Devireddy AR and et al. Inhibition of the multidrug efflux pump LmrS from *Staphylococcus aureus* by cumin spice *Cuminum cyminum*. *Arch. Microbiol.* 2017; 199 (3): 465-474.
18. Sharifi A, Mohammadzadeh A, Mahmoodi P and Sasanian N. Inhibitory effect of *Thymus daenensis* essential oil on *Staphylococcus aureus* norA efflux pump. *J. ZUMS.* 2016; 24 (105) :67-77
19. Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. CLSI, Wayne, Pa. M100-S16, 26, no. 3. 2012.
20. Martins M, Viveiros M, Couto I, Costa SS and et al. Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method. *In Vivo.* 2011; 25 (2): 171-8.
21. Patel D, Kosmidis C, Seo SM and Kaatz GW. Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2010; 54 (12): 5070-3.
22. Pourmand MR, Yousefi M, Salami SA and 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.
23. Tagboto S and Townson S. Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. *Adv. Parasitol.* 2001; 50: 199-295.
24. Grace MH. Chemical composition and biological activity of the volatiles of *Anthemis melampodina* and *Pluchea dioscoridis*. *Phytother. Res.* 2002; 16 (2): 183-5.
25. Riccobono L, Maggio A, Bruno M, Spadaro V and et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of some species of *Anthemis* sect. *Anthemis* (Asteraceae) from Sicily. *Nat. Prod. Res.* 2017; 3: 1-9.
26. Roy SK, Kumari N, Pahwa S, Agrahari UC, et al. NorA efflux pump inhibitory activity of coumarins from *Mesua ferrea*. *Fitoterapia* 2013; 90: 140-50.
27. Kalia NP, Mahajan P, Mehra R, Nargotra A and 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.



Evaluation of Anti-efflux Activity of *Anthemis atropatana* Extract against Ciprofloxacin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates

Ezati Sh (M.Sc.)¹, Mirzaie A (Ph.D.)^{2*}, Zandi M (B.Sc.)¹

1- Department of Biology, Hamadan Branch, Islamic Azad University, Hamadan, Iran

2- Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

*Corresponding author: Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, PO Box: 189, Roudehen, Iran

Tel & Fax: +98-21-76505015-24

E-mail: A.mirzaie@riau.ac.ir

Abstract

Background: Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* isolates are the main nosocomial infection agent and the norB efflux pump plays an important role in antibiotic resistance.

Objective: The aim of this study was to investigate the chemical composition of *Anthemis atropatana* extract and analysis of its anti-efflux activity on ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* strains.

Methods: In this experimental study, the *A. atropatana* extract was prepared by maceration technique and its phytochemical composition was analyzed by GC/MS method. Subsequently, norB efflux pump was detected in 50 clinical isolates of *S. aureus* using cartwheel and PCR methods. Finally, after treatment of strains with SubMIC concentration of extract, its anti-efflux activity was evaluated via Real Time PCR.

Results: GC-MS analysis of *A. atropatana* extract was shown the most frequent component was belonged to Dodecane (9.8%) and Tridecane (6.4%). Moreover, the cartwheel and PCR methods was showed that out of 50 isolates, 10 isolates had norB efflux pump. In addition to, after treatment of strains with subMIC concentration of *A. atropatana* extract, the Real Time PCR results was indicated that the *norB* gene expression was down-regulated.

Conclusion: Based on the results obtained in this study, it seems that the extract has potential uses for pharmaceutical industries.

Keywords: *Anthemis atropatana*, *Staphylococcus aureus*, norB efflux pump, Real Time PCR

