

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره اتانلی گیاه *Artemisia Turcomanica* بر سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک کلبسیلا پنومونیه و تاثیر آن در بیان ژن‌های مقاوم به داروی *fimH* و *rmpA*

درسا صادق زاده^۱، الهام سیاسی^۲، حسین عباسپور^۳

۱. کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
۳. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: با افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و گسترش سویه‌های مقاوم باکتریایی، استفاده از عصاره‌های گیاهی برای درمان، گزارش شده است. هدف از این تحقیق، بررسی اثر ضد باکتریایی گیاه درمنه ترکمنی (*Artemisia turcomanica*) بر سویه‌های مقاوم کلبسیلا پنومونیه و تاثیر آن بر بیان ژن‌های مقاوم به داروی *fimH* و *rmpA* بود.

روش‌ها: از ۱۰۰ نمونه بالینی جمع‌آوری شده با تست‌های بیوشیمیایی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه جداسازی شدند و مقاومت آنتی‌بیوتیک آن‌ها با تست دیسک دیفیوژن بررسی شد. حضور ژن‌های *rmpA* و *fimH* با روش PCR مشخص شد. پس از عصاره‌گیری از گیاه درمنه ترکمنی، میزان اثر ضدباکتریایی آن در غلظت‌های مختلف بر سویه‌های مقاوم اندازه‌گیری شد. بیان ژن‌های *rmpA* و *fimH* با روش Real-Time PCR قبل و بعد از تیمار با عصاره گیاهی بررسی شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS آنالیز شدند.

نتایج: از تعداد ۱۰۰ ایزوله، ۳۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه شناسایی شد و از این ۳۰ سویه، ۱۰ ایزوله مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک جداسازی شدند. ژن‌های *fimH* و *rmpA* بترتیب در هشت و هفت سویه مقاوم، حضور داشتند. مقاوم‌ترین سویه‌ها در برابر عصاره گیاه درمنه ترکمنی، MIC برابر ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر داشتند. نتایج Real-Time PCR نشانگر کاهش معنادار در بیان ژن‌های *fimH* و *rmpA* بعد از تیمار با عصاره گیاهی بود ($P < 0.001$).

نتیجه‌گیری: بر اساس این نتایج، درمنه ترکمنی می‌تواند اثر ضد باکتریایی با کاهش بیان ژن‌های مقاوم به دارو در باکتری کلبسیلا پنومونیه داشته باشد. برای اثبات نتایج این تحقیق، مطالعات بیشتر نیاز است.

کلید واژه‌ها:

کلبسیلا پنومونیه، درمنه ترکمنی، اثر ضد میکروبی، بیان ژن، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه محفوظ است.

مقدمه

در سال های اخیر افزایش تعداد ایزوله های مقاوم به داروی کلبسیلا پنومونیه گزارش شده است و این موضوع می تواند سبب ایجاد مشکلاتی در درمان عفونت های این باکتری باشد (۱) و (۲). یکی از علل مهم در این خصوص، استفاده گسترده از آنتی بیوتیک های با طیف وسیع و درمان طولانی مدت در محیط های بیمارستانی برای درمان این عفونت ها است (۳). عوامل خطر عفونت کلبسیلا پنومونیه شامل متغیرهای پاتوژن (مانند فاکتورهای حدت همچون کپسول، دیواره سلولی، لیپوپلی ساکاریدها، فیمبریا و یک سری از ژن های مقاوم آنتی بیوتیکی)، متغیرهای ذاتی میزبان (مانند ژنتیک، سن و وضعیت ایمنی و بیماری های زمینه ای) و عوامل بیرونی (مانند مصرف آنتی بیوتیک، قرار گرفتن در معرض عوامل محیطی نامناسب، تغذیه و اعتیاد به سیگار و الکل) است (۴). کپسول پلی ساکارید ارگانسیم مهمترین عامل حدت است و از باکتری ها در برابر پاسخ ایمنی میزبان و همچنین آنتی بیوتیک ها محافظت می کند. همچنین برخی از کپسول ها دارای اثرات تعدیل کننده سیستم ایمنی هستند و از باکتری ها در برابر فاگوسیتوز محافظت می کند و اجازه نمی دهد که آنتی بادی های اپسونیز کننده توسط سلول های فاگوسیتی دفاعی میزبان (به عنوان مثال، ماکروفاژها و نوتروفیل ها) شناسایی شوند و منجر به افزایش پاسخ التهابی می شوند (۵). ژن *rmpA* که به عنوان URI^۱ نیز شناخته می شود، ژنی است که کد کننده پروتئینی می باشد که در ایجاد کپسول پلی ساکاریدی انتروباکتریاسه ها از جمله کلبسیلا پنومونیه و در نتیجه پاتوژنز این باکتری ها دخیل است. این ژن کد کننده آنزیم های مخاطی می باشد. ایزوله های حامل ژن *rmpA* در ایجاد فنوتیپ هایی با توانایی چسبندگی بالا^۲ و سویه های مرتبط با سندروم های مهاجم بالینی نقش دارند (۶) و (۷). عامل حدت مهم دیگر پیلی یا فیمبریا است که شناسایی گیرنده های مولکولی و تسهیل چسبندگی به سطوح بافتی خاص

در میزبان و توسعه عفونت را سبب می شود و در تولید بیوفیلیم های ناشی از این باکتری نیز نقش موثر دارد. کلبسیلا پنومونیه دو فاکتور چسبنده اصلی فیمبریا، فیمبریای نوع ۱ و نوع ۳ تولید می کند (۸). فیمبریای نوع ۱ دارای هماغلوتینین حساس به مانوز است، در حالی که فیمبریای نوع ۳ دارای هماغلوتینین مقاوم به مانوز است. فیمبریای نوع ۱ رایج ترین اندامک چسبنده در انتروباکتریاسه ها است. فیمبریای نوع ۱ و به ویژه زیر واحد چسبنده *fimH*، نقش مهمی در عفونت ادراری ناشی از کلبسیلا پنومونیه دارند (۹). ژن *fimH*، فیمبریا یا پیلی را در این باکتری کد می کند که این پیلی ها فاکتورهای حدت دخیل در چسبندگی برای این باکتری محسوب می شوند (۱۰). کارباپنم ها^۴ آنتی بیوتیک هایی هستند که برای درمان عفونت های شدید ناشی از انتروباکتریاسه های مقاوم به چند دارو همچون کلبسیلا پنومونیه استفاده می شوند. کلبسیلا پنومونیه دارای آنزیم هایی بنام کارباپنماز^۵ هستند که قادر به شکستن کارباپنم ها هستند و در نتیجه به این داروها مقاوم شده اند. بطور کلی پاتوژن ها از مکانیسم های متعددی برای ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی استفاده می کنند، از جمله تولید بتالاکتامان، از دست دادن پروتئین های حساس غشای خارجی، تغییر هدف، تشکیل بیوفیلیم، پمپ خروجی و اینتگرون (۱۱ و ۱۲). اخیراً به دلیل مقاومت و عوارض جانبی که میکروارگانسیم های پاتوژن در مواجهه با آنتی بیوتیک ها از خود نشان می دهند، در درمان های پزشکی به عصاره ها و ترکیبات گیاهی با ویژگی های بیولوژیکی توجه زیادی شده است (۱۳). عصاره های خام بخش های مختلف گیاهان دارویی، از جمله ریشه، ساقه، گل، میوه و شاخه ها به طور گسترده برای درمان برخی بیماری های انسانی مورد استفاده قرار می گیرند. از داروهای گیاهی برای درمان بیماری های عفونی، التهاب ها و آسیب های مختلف استفاده می شود. گیاهان دارویی حاوی چندین ماده شیمیایی گیاهی

4. carbapenems'

1. unconventional prefoldins RPB5 interactor
2. hyper Mosco viscos
3. carbapenem

مک کانکی آگار کشت داده شدند و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. بعد از تهیه لام و مشاهده باسیل‌های گرم منفی، تست‌های بیوشیمیایی معمول نظیر کشت در محیط‌های کشت SIM، MRVP، اوره آز و سیمون سیترات برای تأیید کلبسیلا پنومونیه انجام شد. سپس باکتری‌ها در محیط TSB و گلیسرول در ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام تست‌های بعدی ذخیره شدند.

تست حساسیت میکروبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها (آنتی‌بیوگرام): بعد از جداسازی باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه، تست آنتی‌بیوگرام انجام شد، به این ترتیب که مقداری از کلنی باکتری به وسیله آنس برداشته شد و در سرم فیزیولوژی استریل یا آب مقطر استریل شده حل شد و کدورتی معادل کدورت نیم مک فارلند تهیه شد. بعد از تهیه محلول یکنواخت، با سوپ استریل از محلول برداشته شد و روی سطح محیط کشت مولر هینتون به صورت متراکم کشت داده شد. بعد از کشت، دیسک‌های آنتی‌بیوگرام، روی محیط کشت قرار گرفت. نحوه قراردادن دیسک‌ها در محیط کشت مولر هینتون، به صورتی بود که دیسک‌ها به اندازه کافی از هم فاصله داشتند، بعد از قرار دادن دیسک‌ها، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. سپس قطره‌اله عدم رشد با خط کش اندازه‌گیری شد و با توجه به جدول همراه دیسک‌ها، گزارش تست آنتی‌بیوگرام برای هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها، به صورت حساس، نیمه حساس، مقاوم گزارش شد. تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های مورد بررسی نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفکسیم، سیپروفلوکساسین، سفپیم، سفوتاکسیم، جنتامایسین، ایمی‌پنم، سفتازیدیم، طبق دستورالعمل انستیتو استاندارد‌های آزمایشگاهی و بالینی (CSLI) انجام شد (۱۸). به عنوان سویه استاندارد کنترل مثبت، کلبسیلا پنومونیه ATCC 13884 استفاده شد.

مازند فلانونوئیدها^۱، آلکالوئیدها^۲، تانن‌ها^۳ و ترپنوئیدها^۴ هستند که دارای خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی هستند (۱۴). از جمله این گیاهان می‌توان به جنس *Artemisia*، سرده بزرگ گیاهان و درختچه‌های علفی و معطر از خانواده *Asteraceae* است اشاره نمود که در ایران با نام درمنه شناخته می‌شوند (۱۵). ۳۴ گونه از درمنه‌ها در ایران وجود دارد که یکی از آن‌ها *Artemisia turcomanica* یا درمنه ترکمنی است. *Artemisia turcomanica* گیاهی چند ساله است که اسانس آن دارای فعالیت ضد رشد و تکثیر باکتریایی است. این گیاه حاوی مقدار زیادی از فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و تانن است که برای التیام درد، سرفه، بهبود حساسیت و درمان مالاریا، ناراحتی معده و روده، سرماخوردگی، سرخک، دیابت، زردی پوست (یرقان)، اضطراب، ضربان قلب نامنظم و ضعف عضلانی و عفونت‌های باکتری و انگلی مانند کرم‌های گرد، کرم سنجاقی، کرم نواری، کرم قلاب‌دار و همچنین درمان سرطان‌ها استفاده می‌شود (۱۶ و ۱۷). بنابراین هدف از این تحقیق بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره *Artemisia turcomanica* بر روی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک کلبسیلا پنومونیه و بررسی تغییر بیان ژن‌های *fimH* و *rmpA* در باکتری‌های مقاوم به دارو، بعد از تیمار با عصاره گیاهی بود تا بتوان برای مقابله با سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک و درمان این گونه عفونت‌ها، از گیاهان دارویی که دارای عوارض جانبی کمتر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند و اثربخشی مناسب در درمان عفونت‌های میکروبی دارند، استفاده نمود.

روش‌ها

نمونه‌گیری: در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه کلینیکی از ادرار و خون، مشکوک به کلبسیلا پنومونیه از بیماران مراجعه‌کننده بیمارستان‌های شهر تهران در بازه زمانی پاییز و زمستان ۱۴۰۱، جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه تحقیقاتی میکرو بشناسی ارک تهران، روی محیط‌های EMB و

3.tannins
4.terpenoids

1.flavonoids
2.alkaloids

روش/ استخراج DNA: پس از جدا سازی سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک از این باکتری ها استخراج DNA ژنومی به روش فنل- کلروفرم انجام گرفت (۱۹). سپس صحت نمونه های استخراج شده با روش الکتروفورز روی ژل ۱٪ و بررسی جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ با دستگاه نانودراپ آمریکایی (Thermo-2000) ارزیابی شد.

انجام واکنش زنجیره ایی پلیمرز و بررسی نتایج واکنش PCR: به منظور بررسی وجود ژن های (*fimH* و *rmpA*) که علاوه بر حدت، با مقاومت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ها نیز مرتبط هستند، از تکثیر با روش واکنش زنجیره ایی پلیمرز (PCR) استفاده شد. توالی پرایمرها و مواد مورد استفاده و برنامه دمایی برنامه دستگاه PCR (مدل BioRad و کشور سازنده امریکا) برای تکثیر هر دو ژن بترتیب در جداول ۱ و ۲ و ۳ ارائه شده است. بعد از انجام تکثیر ژن ها، محصولات واکنش PCR را بر روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز نموده و سپس با دستگاه ژل داگ عکسبرداری شدند.

عصاره گیری از گیاه *Artemisia turcomanica*: برای تهیه عصاره گیاهی ابتدا گیاه *Artemisia turcomanica* با شماره هرباریومی IBRC P1006115 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی تهیه شد. سپس مقدار ۵۰ گرم پودر گیاه از ماده آسیاب شده به ارلن حاوی ۵۰۰ میلی لیتر اتانل ۷۰ درصد اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاه خیسانده شد. برای جلوگیری از تبخیر الکل، دهانه ارلن با پارافیلیم بسته شده و سپس مایع شفاف رویی جدا و رسوب ته ارلن دور ریخته شد. مایع رویی به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و مجدداً مایع رویی جداسازی و در دستگاه تقطیر در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا الکل اضافی جدا شود. عصاره باقی مانده با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر به عنوان محلول ذخیره تهیه و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه در ظروف تیره نگهداری گردید.

تعیین حداقل غلظت مهارشده (MIC) نسبت به گیاه *Artemisia turcomanica*: ایزوله ها، جهت تست MIC

بررسی تغییرات بیان ژن های *fimH* و *rmpA*، در باکتری های کلبسیلا پنومونیه، قبل و بعد از تیمار با عصاره گیاهی از روش Real Time PCR با استفاده از SYBER green و ژن 16S rRNA house keeping (gene reference) انجام گرفت. بدین منظور پرایمر های ژن های *fimH* و *rmpA* و 16S rRNA طبق جدول ۱ و همان پرایمر های مورد استفاده برای PCR انجام

مورد مطالعه قرار گرفتند. آزمایش MIC بر اساس CLSI به روش رقیق سازی در میکروپلیت برای عصاره گیاه درمنه ترکمنی انجام شد. MIC بصورت سه بار تکرار با استفاده از روش میکرودیالوژن در پلیت های ۹۶ خانه ای انجام شد. عصاره اتانلی درمنه ترکمنی در غلظت های ۱۲/۵-۲۵-۵۰-۱۰۰ و ۲۰۰ به داخل چاهک ها ریخته و با محیط کشت مولر هینتون برات (MHB) تا حجم ۱۰۰ میکرو لیتر رسانده شد. به همه چاهک ها مقدار ۵۰ میکرو لیتر از کشت میکروبی سویه ها با غلظت نیم مک فارلند اضافه شد. مقدار MIC به عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری محسوب می شود. لازم به ذکر است که جهت تعیین غلظت MIC، از چاهک حاوی باکتری فاقد عصاره به عنوان کنترل منفی و از چاهک حاوی باکتری استاندارد کلبسیلا پنومونیه ATCC 13884 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA: برای بررسی اثر عصاره گیاه بر روی تغییرات بیان دو ژن (*fimH* و *rmpA*)، استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت سیناژن و بر اساس پروتکل آن، انجام گرفت. سپس از روی آن cDNA ساخته شد. برای این منظور از بافر 5x به میزان ۴ میکرو لیتر و آنزیم RNase (۴۰ Unit/μl) به میزان ۰/۵ میکرو لیتر و مخلوط dNTP (10mM) به میزان ۲ میکرو لیتر و $MgCl_2$ به میزان ۱،۵ میکرو لیتر و الگوی dT به میزان ۲ میکرو لیتر و آنزیم ریورس ترا سکرپیتاز به میزان ۱ میکرو لیتر و با افزودن آب دوبار تقطیر شده حجم واکنش به ۲۰ میکرو لیتر رسانده شد، سپس با برنامه دمایی ۹۴ درجه یک دقیقه و ۴۲ درجه سانتی گراد ۶۰ دقیقه و ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، سنتز cDNA انجام شد.

بررسی تغییرات بیان ژن های *fimH* و *rmpA*، در باکتری های کلبسیلا پنومونیه، قبل و بعد از تیمار با عصاره گیاهی از روش Real Time PCR با استفاده از SYBER green و ژن 16S rRNA house keeping (gene reference) انجام گرفت. بدین منظور پرایمر های ژن های *fimH* و *rmpA* و 16S rRNA طبق جدول ۱ و همان پرایمر های مورد استفاده برای PCR انجام

مورد مطالعه قرار گرفتند. آزمایش MIC بر اساس CLSI به روش رقیق سازی در میکروپلیت برای عصاره گیاه درمنه ترکمنی انجام شد. MIC بصورت سه بار تکرار با استفاده از روش میکرودیالوژن در پلیت های ۹۶ خانه ای انجام شد. عصاره اتانلی درمنه ترکمنی در غلظت های ۱۲/۵-۲۵-۵۰-۱۰۰ و ۲۰۰ به داخل چاهک ها ریخته و با محیط کشت مولر هینتون برات (MHB) تا حجم ۱۰۰ میکرو لیتر از کشت میکروبی سویه ها با غلظت نیم مک فارلند اضافه شد. مقدار MIC به عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری محسوب می شود. لازم به ذکر است که جهت تعیین غلظت MIC، از چاهک حاوی باکتری فاقد عصاره به عنوان کنترل منفی و از چاهک حاوی باکتری استاندارد کلبسیلا پنومونیه ATCC 13884 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

Relative expression: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ آنالیز شدند که فرمول محاسبه آن به شرح زیر بود:

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

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

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

آنالیز آماری: محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS 20 انجام گردید و نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفتند و تفاوت بیان ژن‌های هدف، بین نمونه‌های کنترل و تیمار شده با روش آماری Tukey's HSD post-hoc test محاسبه گردید. اطلاعات به صورت $mean \pm standard deviation (SD)$ نمایش داده شده‌اند و $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

پذیرفت. مواد مورد استفاده برای Real Time PCR شامل: مستر میکس با یونیزر ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمر فوروارد (Forward Primer) و پرایمر ریورس (Reverse Primer) هر یک به میزان ۱ میکرولیتر، cDNA (برای هر یک از ژن‌های) به میزان ۱ میکرولیتر و با میزان ۹/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر شده همراه DEPC (DiEthyl PyroCarbonate) حجم کل مواد واکنش به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد، سپس در برنامه دستگاه Real-time PCR light cyclor 96 (مدل Roche) و کشور سازنده (المان) که در جدول ۴ آورده شده است، قرار داده شدند. داده‌های خروجی Real-time PCR برای باکتری‌های تیمار شده و تیمار نشده، با استفاده از نرم افزار Rest2009 بر اساس فرمول

جدول ۱ - مشخصات پرایمر مورد استفاده برای ژن‌های موردنظر.

نام ژن	توالی پرایمر	طول قطعه تکثیر یافته bp
fimH	F: 5'-GCCAACGTCTACGTTAACCTG-3' R: 3'-ATGGAACCCACATCGACATT-5'	۱۸۰
rmpA	F: 5'-AGAGTATTGGTTGACTGCAGGATTT-3' R: 3'-AAACATCAAGCCATATCCATTGG-5'	۱۰۶
16sRNA	F: 5'-ATCAGAGCGCGGATCTTTGCCG-3' R: 3'-ATCAGAGCGCGGATCTTTGCCG-5'	۱۵۵

F پرایمر فوروارد (Forward) و R پرایمر ریورس (Reverse) را نشان می‌دهد.

جدول ۲ - مقادیر مواد مورد نیاز برای تکثیر ژن *fimH* و *rmpA*

نام مواد	حجم	غلظت	شرکت سازنده
پرایمر چپ Forward	۱	۱۰ پیکومول	ماکروژن
پرایمر راست Reverse	۱	۱۰ پیکومول	ماکروژن
بافر مستر میکس 1X	۱۰	۱،۵ میلی مول	آمپلیکون
نمونه DNA	۴	۲۰۰ نانوگرم	-
آب دو بار تقطیر شده	۴	-	-
حجم نهایی	۲۰	-	-

جدول ۳ - برنامه زمانی ترموسایکلر برای ژن‌های مورد مطالعه

مرحله	دما بر حسب سانتی گراد	زمان
۱. واسرشته شدن اولیه	۹۵	۵ دقیقه
۲. واسرشته شدن	۹۵	۳۰ ثانیه
۳. مرحله اتصال	۵۶	۶۰ ثانیه
۴. طولیل شدن	۷۲	۴۵ ثانیه
۵. طولیل شدن نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه

مراحل ۲ و ۳ و ۴ به تعداد ۳۰ سیکل تکرار شدند.

جدول ۴ - برنامه دستگاه Real-time PCR

مرحله	دما بر حسب سانتی گراد	زمان
۱. واسرشته شدن اولیه	۹۵	۱۰ دقیقه
۲. واسرشته شدن	۹۵	۲۰ ثانیه
۳. مرحله اتصال	۶۱	۴۰ ثانیه
۴. طولیل شدن	۷۲	۳۰ ثانیه
۵. طولیل شدن نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه

مراحل ۲ و ۳ و ۴ به تعداد ۴۰ سیکل تکرار شدند.

نتایج

نتایج نمونه ها: از مجموع ۱۰۰ سویه نمونه کلینیکی، ۳۰ ایزوله با استفاده از تست‌های تشخیصی افتراقی کلبسیلا پنومونیه تشخیص داده شد (جدول ۵).

نتایج تست آنتی بیوگرام: نتایج تست آنتی بیوگرام انجام شده در جدول ۶ نشان داده شده است. بیشترین مقاومت به ترتیب به سفنازیدیم (۵۰ درصد)، سفوتاکسیم (۴۴ درصد) و سفکسیم (۳۳ درصد) مشاهده شد و بیشترین حساسیت به ایمی‌پنم (۹۳ درصد) و سیپروفلوکساسین (۷۳ درصد) گزارش شد. در این مطالعه از میان ۳۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه تشخیص داده شده، ۱۰ ایزوله با مقاومت به حداقل ۲ آنتی‌بیوتیک، برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند.

نتایج واکنش زنجیره ایی پلیمرز برای حضور ژن های fimH و rmpA: بررسی حضور ژن های *fimH* و *rmpA* در ۱۰ ایزوله از کلبسیلا پنومونیه که همزمان به چند آنتی بیوتیک مقاومت داشتند، با استفاده از تکنیک PCR انجام شد و نشان داده شد که از این باکتری ها، ۷ ایزوله (۷۰ درصد) دارای ژن *rmpA* (با باند ۱۰۶ جفت بازی) و ۸ سویه (۸۰ درصد) دارای ژن *fimH* (با باند ۱۸۰ جفت بازی) بودند که بر روی ژل الکتروفورز به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده اند. **نتایج اثر ضد میکروبی عصاره گیاهی:** جهت بررسی خواص

ضدباکتریایی عصاره گیاه درمنه ترکمنی، سلول های باکتریایی با عصاره اتانلی تهیه شده با غلظت های (۱۲/۵ - ۲۵ - ۵۰ - ۱۰۰ - ۲۰۰) تیمار شدند. MIC به دست آمده برای نمونه‌ها بطور میانگین ۹۷/۵ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد که بیشترین MIC استفاده شده در برابر سویه‌های شماره ۴ و ۱۹ بود.

تغییرات بیان ژن های fimH و rmpA در جدایه های تیمار شده با غلظت sub-MIC عصاره گیاه درمنه ترکمنی: نمودار تکثیر و منحنی ذوب ژن های *fimH* و *rmpA* در شکل ۳ نشان داده شده است. این مطالعه با محاسبه Fold-Change انجام گرفت و بر اساس فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه تغییرات بیان ژن در نرم افزار REST2009 صورت پذیرفت. عدد Fold-Change نسبت به ژن مرجع بطور معناداری محاسبه گردید. همچنین بررسی تغییرات بیان ژن های *fimH* و *rmpA* در جدایه های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو تحت تیمار با غلظت sub-MIC عصاره گیاه درمنه ترکمنی با استفاده از تست Real-Time PCR انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت sub-MIC عصاره گیاه، سبب کاهش معنادار بیان ژن *rmpA* در هفت سویه مورد بررسی و کاهش بیان *fimH* در هشت سویه مورد بررسی، نسبت به گروه کنترل گردیده است ($P < 0.001$). همچنین بیشترین میزان کاهش بیان هر دو ژن در سویه شماره ۱۹ مشاهده شد.

جدول ۵- نتایج تست افتراقی کلبسیلا پنومونیه

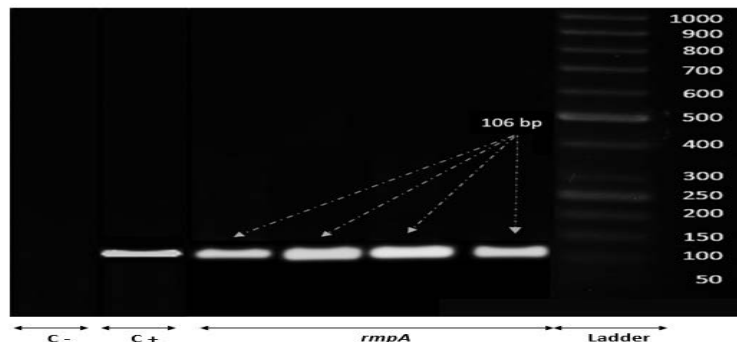
تست افتراقی	پاسخ تست
رنگ امیزی گرم	گرم منفی (صورتی)
TSI	A/A (زرد/زرد، تولید CO ₂ ، عدم تولید H ₂ S)

---/--/-(عدم تولید اندول/حرکت/تولید H2S)	SIM
+/-	MR/VP
مثبت (بنفش)	LIA برای تست لیزین
مثبت (بنفش پر رنگ)	اوره آز
مثبت (آبی)	سیمون سیترات

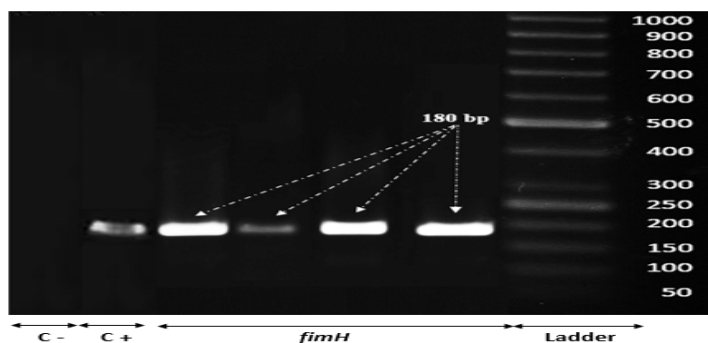
پاسخ مثبت انجام واکنش و پاسخ منفی عدم انجام واکنش را نشان داده است

جدول ۶- درصد مقاومت و حساسیت سویه‌های جدا شده به آنتی‌بیوتیک‌ها

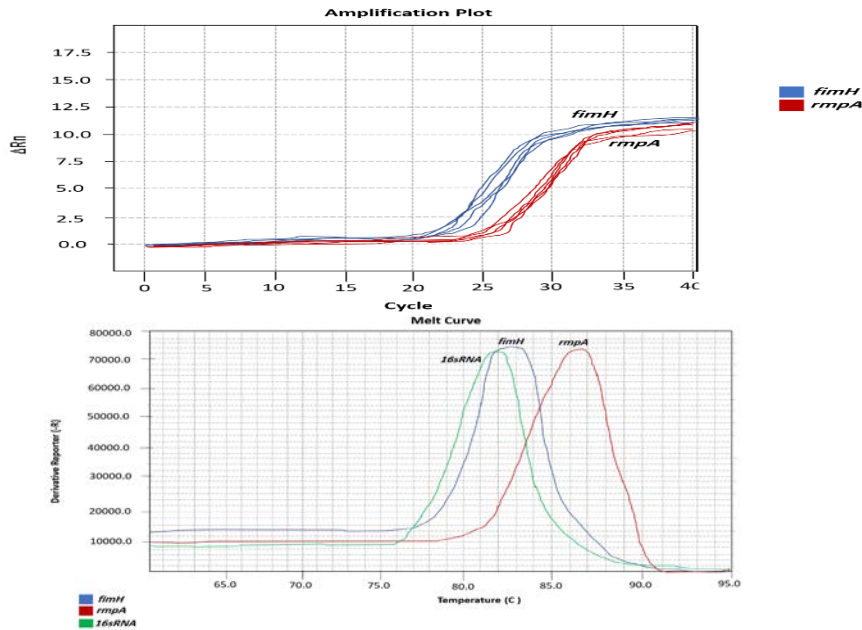
مجموع درصد	مقاوم		نیمه حساس		حساس		آنتی‌بیوتیک
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۱۰۰	۳۳	۱۰	۱۰	۳	۵۷	۱۷	سفکسیم
۱۰۰	۲۰	۶	۷	۲	۷۳	۲۲	سیپروفلوکساسین
۱۰۰	۱۷	۵	۲۰	۶	۶۳	۱۹	جنتامایسین
۱۰۰	۲۴	۷	۱۰	۳	۶۶	۲۰	سفپیم
۱۰۰	۰	۰	۷	۲	۹۳	۲۸	ایمی‌پنم
۱۰۰	۵۰	۱۵	۰	۰	۵۰	۱۵	سفتازیدیم
۱۰۰	۴۴	۱۳	۳	۱	۵۳	۱۶	سفتو تاکسیم



شکل ۱. تکثیر ژن *rmpA* با واکنش PCR. چاهک ۲ تا ۵: باند ۱۰۶ جفت بازی نشان دهنده حضور ژن *rmpA* است. چاهک ۱: مارکر مولکولی ۵۰ جفت بازی. چاهک ۶: بعنوان کنترل مثبت و چاهک ۷: بعنوان کنترل منفی بود.



شکل ۲. تکثیر ژن *fimH* با واکنش PCR. چاهک ۲ تا ۵: باند ۱۸۰ جفت بازی نشان دهنده حضور ژن *fimH* است. چاهک ۱: مارکر مولکولی ۵۰ جفت بازی. چاهک ۶: بعنوان کنترل مثبت و چاهک ۷: بعنوان کنترل منفی بود.



شکل ۳. منحنی تکثیر (شکل الف) و دمای ذوب (شکل ب) ژن‌های *fimH* و *rmpA* را نشان می‌دهد

بحث

گیاهان توانایی شگفت‌انگیزی در تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه مانند آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، ترپنوئیدها، ساپونین‌ها، استروئیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، کینون‌ها و کومارین‌ها دارند. این مولکول‌های زیستی منبع مواد ضد میکروبی گیاهی بوده و برخی از این محصولات طبیعی در درمان عفونت‌های باکتریایی بسیار کارآمد هستند (۲۴). یکی از گیاهان دارای خواص دارویی، جنس *Artemisia* می‌باشد. بیش از ۲۰۰۰ گونه از جنس *Artemisia* در سرتاسر جهان وجود دارد که در میان ۲۰۰۰ گونه، ۳۴ گونه در ایران وجود دارد که یکی از این گونه‌ها *Artemisia turcomanica* است که آن متعلق به خانواده آستراسه (*Asteraceae*) می‌باشد و دارای محتوای بالای فلاونوئید، ترپنوئید و همچنین ماده شیمیایی به نام تانن است که در درمان بیماری‌ها نقش بسزایی دارند. گونه‌های *Artemisia* اغلب برای بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند و دارای خواص درمانی از جمله ضد مالاریای، ضد ویروسی، ضد سرطانی، ضد اکسیدانی و ضد باکتری است. تعیین کیفی متابولیت‌های ثانویه مختلف مانند فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، ساپونین‌ها و پلی‌ساکاریدهای گونه‌های مختلف *Artemisia turcomanica* (درمنه ترکمنی) شناسایی شده‌اند که برخی از

عفونت بیمارستانی به عفونتی گفته می‌شود که بیمار در زمان بستری و در دوره‌ی کمون دچار آن گردد. میزان شیوع عفونت‌های بیمارستانی حتی در مجهزترین بیمارستان‌ها بسیار بالا می‌باشد. سویه‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده بالینی معمولاً قادر به ایجاد عفونت بیمارستانی هستند. شناسایی عوامل حدت باکتریایی خاص به توسعه روش‌های تشخیص مولکولی سریع و درمان‌های دارویی موثر در مقابل باکتری‌های ایجادکننده عفونت بیمارستانی کمک می‌کند (۷ و ۲۰). ژن‌های مختلفی، فاکتورهای بیماری‌زایی کلبسیلا پنومونیه، را کد می‌نمایند، از جمله ژن‌های آدهسین‌ها (*fimH*) و کپسول‌ها (*rmpA*) (۲۰). مقاومت ضد میکروبی در باکتری‌های گرم منفی، از جمله کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو، در حال حاضر یک چالش بزرگ در زمینه بیماری‌های عفونی است. درمان‌های ترکیبی از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، در این خصوص بکار گرفته شده است ولی این گونه درمان‌ها دارای عوارض جانبی می‌باشند. بنابراین ترکیباتی که بتوانند در برابر باکتری‌های مقاوم به دارو اثر ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای با سمیت کمتر برای بدن، ایجاد کنند، از اهمیت بسزایی برخوردار هستند (۲۲-۳۶).

حال، تمام عصاره‌های گیاهان دارای فعالیت متوسط یا بدون فعالیت در برابر باکتری‌های گرم منفی هستند (۲۸). بر این اساس، در تحقیق حاضر به بررسی نتایج تاثیر عصاره گونه درمنه به عنوان درمان عفونت‌های میکروبی پرداخته شد که این گونه نیز همچون سایر گونه‌ها در مطالعات قبلی، اثربخشی موثر را نشان داد. در مطالعه دیگر در سال ۲۰۱۳، برگ‌های سه کلون *A. annua* در شرایط آزمایشگاهی استخراج و دو ترکیب فعال زیستی، آرمیزینین و یک پیش‌ساز، از آن گیاه جدا شدند و مشخص شد که این ترکیبات در مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مؤثر هستند. فعالیت ضد میکروبی آن‌ها شبیه به آنتی‌بیوتیک ضد باکتری *استرپتومایسین* بود. نتایج انان نشان داد که رشد میکروب‌های آزمایش شده در حداقل غلظت بازدارندگی ۰/۰۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مهار می‌شود. ان مطالعه نشان داد که گیاهچه‌های *A. annua*، می‌توانند با فعالیت ضد میکروبی در برابر باکتری‌ها استفاده شوند (۲۹) که نتایج پژوهش حاضر نیز با آن تحقیق همخوانی داشت. مطالعه Donato و همکاران در سال ۲۰۱۵ برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی اسانس درمنه *آنوا* جمع آوری شده در توسکانی و سه ترکیب رایج آن (کتون درمنه، ۱۸- سینئول و کافور) بود. اسانس و ترکیبات برای فعالیت در برابر *اشریشیا کلی O157*، *سالمونلا انتریتیدیس*، *سالمونلا تیفی*، *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *لیستریا مونوسیژنوز* مورد آزمایش قرار گرفتند، که همگی در عفونت‌های ناشی از غذا اهمیت زیادی داشتند. فعالیت ضد باکتریایی با استفاده از روش انتشار دیسک و روش میکرودیوشن براث مورد آزمایش قرار گرفت. میکروارگانسیم‌های آزمایش شده همگی به اسانس *A. annua* و به تمام اجزای آن حساس بودند (۳۰). در تحقیق حاضر نیز نتایج نشان داد عصاره درمنه ترکمنی همچون درمنه *آنوا* می‌تواند اثر ضد باکتریایی داشته باشد. مطالعه نقش و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داده است که فعالیت ضدباکتریایی اسانس گل بیابانی درمنه در برابر برخی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی موثر است. در ان مطالعه اسانس گل بیابانی درمنه از رشد

آن‌ها در صنعت غذایی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفته اند. علاوه بر این، عصاره گونه‌های *Artemisia turcomanica* به عنوان آفت کش طبیعی و همچنین در درمان چند بیماری انسانی مورد استفاده می‌باشند (۲۷-۲۵). در این مطالعه از عصاره گیاه *Artemisia turcomanica* (درمنه ترکمنی) به دلیل خواص ویژه در برابر سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *کلبسیلا پنومونیه*، استفاده شد و اثر عصاره اتانلی این گیاه بر تغییر بیان ژن‌های حدت *fimH* و *rmpA* *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به دارو پس از تیمار با عصاره گیاهی بررسی گردید.

در مطالعه حاضر برای اولین بار تاثیر عصاره درمنه ترکمنی بر روی باکتری *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به چند دارو بررسی گردید، به این ترتیب که، از بین ۱۰۰ ایزوله باکتری جمع آوری شده، ۳۰ ایزوله به‌عنوان *کلبسیلا پنومونیه* تشخیص داده شد و از این ۳۰ سویه، ۱۰ ایزوله که مقاوم به حداقل سه آنتی‌بیوتیک بودند انتخاب شدند. همچنین جهت بررسی حضور ژن‌های مورد مطالعه (*fimH* و *rmpA*) از تکنیک PCR استفاده شد و حضور ژن *rmpA* در هفت سویه مقاوم و حضور *fimH* در هشت سویه مقاوم یافت شد. همچنین مقاوم‌ترین سویه‌ها در برابر عصاره گیاه درمنه ترکمنی، سویه‌های شماره ۴ و ۱۹ با MIC برابر ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر انتخاب شدند. غلظت‌های مختلف عصاره اتانلی درمنه ترکمنی بکار گرفته شده، باعث مهار رشد باکتری‌های *کلبسیلا پنومونیه* گردید. همچنین بررسی تغییر بیان ژن‌های *rmpA* و *fimH* در سویه‌های تیمار شده با عصاره گیاهی با استفاده از تکنیک Real-Time PCR بررسی شد که نتایج حاکی از کاهش معنادار در بیان هر دو ژن مورد مطالعه بود.

فعالیت‌های ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی، متانولی و هگزانی از درمنه *ابسینتیوم*، درمنه *آنوا* و درمنه *ولگاریس* در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ مورد بررسی قرار گرفته است. عصاره‌های گیاهی بر روی پنج باکتری گرم مثبت، دو باکتری گرم منفی و یک سویه قارچی آزمایش شدند. نتایج نشان داد که عصاره الکلی درمنه در برابر میکروارگانسیم‌های آزمایش شده مؤثرتر بوده است. با این

پرداختند. ان مطالعه نشان داد که عصاره درمنه ترکمنی می تواند اثر مهاری بر رشد سلول سرطانی و همچنین اثر ضدباکتریایی در برابر باکتری *E. coli* داشته باشد (۳۴). در تحقیق حاضر نیز همچون تحقیق فتحی و همکارانش، اثرات ضد باکتریایی درمنه ترکمنی در برابر باکتری کلبسیلا پنومونیه نشان داده شده است. مطالعه باغینی و همکاران در سال ۲۰۱۸ بررسی سطوح بیان ژن های دخیل در تشکیل بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس* های مقاوم به متی سیلین (ATCC 33591) MRSA در تیمار با ترکیبی از درمنه آوشری و درمنه لیوریانا بود. بر اساس نتایج آنان، استفاده از ترکیب دو عصاره اتانولی تأثیر معنی داری بر بیان ژن های دخیل در تشکیل بیوفیلم در این باکتری ها داشتند (۳۵). در تحقیق حاضر نیز نشان داده شد که تیمار با عصاره درمنه ترکمنی می تواند سبب کاهش معنی دار در بیان ژن های حدت باکتری کلبسیلا پنومونیه مقاوم به دارو گردد. در مطالعه قمی و همکاران نیز در سال ۲۰۲۰ اثر عصاره درمنه در کاهش بیان ژن پمپ های جریان *norA* در جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به سیپروفلوکساسین مورد بررسی قرار گرفت. جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به سیپروفلوکساسین با غلظت های مختلف عصاره *A. ciniformis* تیمار شدند. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، بیان ژن مقاوم این باکتری با Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. کاهش معنی داری در بیان ژن مقاوم به دارو در جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به سیپروفلوکساسین تیمار شده با عصاره *A. ciniformis* مشاهده شد (۳۶). نتایج مطالعه حاضر نیز چنین نشان داد که عصاره درمنه ترکمنی با اثرات ضد باکتریایی می تواند سبب کاهش معنی دار در بیان ژن های حدت باکتری کلبسیلا پنومونیه مقاوم به دارو باشد.

نتایج این مطالعه در مقایسه با نتایج مطالعات گذشته که در خصوص مصرف آنتی بیوتیک ها و مقاومت ایجاد شده در باکتری های گرم منفی و گرم مثبت، ناشی از استفاده بی رویه از داروها، صورت گرفته اند، نشان داده است که عصاره گیاه درمنه ترکمنی می تواند بصورت ترکیبی موثر در درمان عفونت های باکتریایی

استافیلوکوکوس اورئوس، *انتروکوکوس فکالیس* و *اشریشیا کلی* جلوگیری کرد. آنان قطر منطقه مهار اسانس گل بیابانی درمنه را در محدوده ۸،۳ تا ۴۵ میلی متر گزارش نمودند که نشانگر افزایش قطر منطقه بازدارندگی با میزان بالای غلظت اسانس بود. نتایج ان مطالعه نشان داد که اسانس گل بیابانی درمنه دارای فعالیت بازدارنده در برابر باکتری های بیماری زا به ویژه باکتری های گرم مثبت است و این اسانس گیاهی می تواند به عنوان یک ترکیب دارویی مفید مطرح باشد (۳۱). نتایج تحقیق حاضر نیز همانند تاثیر موثر گل بیابانی درمنه در مطالعه نقش و همکاران، اثر ضد باکتریایی عصاره درمنه ترکمنی را بر باکتری های کلبسیلا پنومونیه تایید نمود. مطالعه صفری و همکاران در سال ۲۰۱۹ بررسی اثر هم افزایی اسانس های ضدباکتریایی درمنه کوئنسیس و آنتی بیوتیک ایمی پنم بر *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه های بالینی و مقایسه آن با آنتی بیوتیک های معمولی بود. نتایج آنان نشان داده است که اسانس گیاهان با آنتی بیوتیک در برخی موارد منجر به اثر هم افزایی می شود و نشان دهنده تأثیر هم افزایی گیاه درمنه کوئنسیس با آنتی بیوتیک ها در خواص ضد میکروبی بود (۳۲). در تحقیق حاضر نیز عصاره درمنه ترکمنی اثربخشی موثری را در برابر باکتری کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو نشان داد. در مطالعه Juteau و همکاران در سال ۲۰۲۲ نشان داده شد اسانس اندام های هوایی درمنه شامل کافور، ژرماکین D، ترانس پینوکاروئول، بتا-سلین، بتا کاربوفیلین و درمنه کتون است که این ترکیبات از نظر فعالیت ضد میکروبی غربالگری شدند. اسانس به طور قابل توجهی از رشد باکتری های گرم مثبت جلوگیری کرد. ان اسانس دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بود که بعنوان دلیل اثرات ضد میکروبی برای ان گیاه گزارش شد (۳۳). در مطالعه حاضر نیز عصاره درمنه ترکمنی با فعالیت ضد میکروبی موثر در برابر کلبسیلا پنومونیه مقاوم به دارو گزارش شده است. مطالعه فتحی و همکاران در سال ۲۰۲۰ به بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد سرطانی عصاره درمنه ترکمنی بر رده سلولی سرطان معده (AGS) و تأثیر آن بر بیان ژن های *سیکلین DI* و *سیکلین E*

تشکر و قدردانی

از کلیه مسئولان و اعضای محترم گروه ژنتیک دانشگاه آزاد واحد تهران شمال و آزمایشگاه ارک تهران، که در مراحل اجرای این پروژه همکاری و بذل توجه فرمودند سپاسگزاری می‌گردد. مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک (خانم درسا صادق زاده) بود.

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

مشارکت نویسندگان:

- (۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه، یا جمع آوری داده‌ها، یا تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها: درسا صادق زاده
- (۲) تهیه پیش نویس مقاله یا بازبینی آن جهت تدوین محتوای اندیشمندانه: الهام سیاسی
- (۳) تایید نهایی دستنوشته پیش از ارسال به مجله: حسین عباسپور

به جای آنتی‌بیوتیک‌ها بکار گرفته شود و مزیت این روش این است که از ایجاد سویه‌های باکتری‌های مقاوم به دارو جلوگیری می‌گردد. برای تایید نتایج تحقیق حاضر بررسی‌های بیشتر با تعداد نمونه باکتری فراوان تر و انواع مختلف از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مقاوم به دارو، توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر برای بار اول به بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره اتانلی درمنه ترکمنی علیه سویه‌های بالینی مقاوم به دارو کلبسیلا پنومونیه پرداخته شده است و نتایج نشان داده که غلظت‌های بالاتر این گیاه می‌تواند باعث القای اثر ضدباکتریایی در سویه‌های مورد مطالعه شده و کاهش بیان ژن‌های حدت *fimH* و *rmpA* را در این باکتری سبب گردد. بنابراین چنین نتیجه می‌شود که عصاره گیاه مذکور بر روی بیان ژن‌های ویروالانس باکتریایی تاثیرگذار بوده و باعث اثر معنادار پس از تیمار با این عصاره بر روی بیان ژن‌های مقاوم در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه می‌گردد. بررسی مکانیسم دقیق این اثر ضدباکتریایی، تحقیقات وسیع تر و با تعداد نمونه بیشتر نیاز دارد.

References

1. Davoudabadi S, Goudarzi M, Hashemi A. Detection of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Iran. *BioMed Research International*. 2023; 2023: 1-7.
2. Venkataraman R, Divatia JV, Ramakrishnan N, Chawla R, Amin P, Gopal P, et al. Multicenter observational study to evaluate epidemiology and resistance patterns of common intensive care unit-infections. *Indian Journal of Critical Care Medicine: Peer-reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine*. 2018;22(1): 20.
3. Heidary M, Nasiri MJ, Dabiri H, Tarashi S. Prevalence of drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Iran: a review article. *Iranian journal of public health*. 2018;47(3): 317.
4. Liu C, Guo J. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hypermucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China: antimicrobial resistance patterns, molecular epidemiology and risk factor. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2019;18(1): 1-11.
5. Rønning TG, Aas CG, Støen R, Bergh K, Afset JE, Holte MS, et al. Investigation of an outbreak caused by antibiotic-susceptible *Klebsiella oxytoca* in a neonatal intensive care unit in Norway. *Acta Paediatrica*. 2019;108(1): 76-82.
6. Shanthini T, Manohar P, Hua X, Leptihn S, Nachimuthu R. Detection of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Clinical Samples in Tamil Nadu. *BMJ*. 2023; 2: 19.23286158.
7. Dan B, Dai H, Zhou D, Tong H, Zhu M. Relationship Between Drug Resistance Characteristics and Biofilm Formation in *Klebsiella Pneumoniae* Strains. *Infect Drug Res*. 2023; 16: 985-998.
8. Binzhi Dan, Heping Dai, Dangui Zhou, Hongfang Tong, Mei Zhu. Relationship Between Drug Resistance Characteristics and Biofilm Formation in *Klebsiella Pneumoniae* Strains. *Infection and Drug Resistance* 2023: 16 985-998.
9. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infection and immunity*. 2008;76(9): 4055-65.
10. Holubova J, Stanek O, Juhasz A, Hamidou Soumana I, Makovicky P, Sebo P. The Fim and FhaB adhesins play a crucial role in nasal cavity infection and *Bordetella pertussis* transmission in a novel mouse catarrhal infection model. *PLoS Pathogens*. 2022;18(4): e1010402.
11. Li B, Webster TJ. Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections. *Journal of Orthopaedic Research®*. 2018;36(1): 22-32.
12. Karampatakis T, Tsergouli K, Behzadi P. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Factors, Molecular Epidemiology and Latest Updates in Treatment Options. *Antibiotics*. 2023; 12: 234.
13. Kokoska L, Polesny Z, Rada V, Nepovim A, Vanek T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology*. 2002;82(1): 51-3.
14. Kalem IK, Bhat Z, Kumar S, Desai A. *Terminalia arjuna*: A novel natural preservative for improved lipid oxidative stability and storage quality of muscle foods. *Food Science and Human Wellness*. 2017;6(4): 167-75.
15. Wan X, Song Z, Niu Y, Cheng K, Zhang J, Ahmad H, et al. Evaluation of enzymatically

treated *Artemisia annua* L. on growth performance, meat quality, and oxidative stability of breast and thigh muscles in broilers. *Poultry Science*. 2017;96(4): 844-50.

16. Elfawal MA, Towler MJ, Reich NG, Weathers PJ, Rich SM. Dried whole-plant *Artemisia annua* slows evolution of malaria drug resistance and overcomes resistance to artemisinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(3): 821-6.

17. Nikbakht M, Sharifi S, Emami S, Khodaie L. Chemical composition and antiproliferative activity of *Artemisia persica* Boiss. and *Artemisia turcomanica* Gand. essential oils. *Research in pharmaceutical sciences*. 2014;9(2): 155.

18. Turbett SE, Pierce VM. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29rd. Pennsylvania: Wayne Press. 2019; pp: 110-31.

19. Wright MH, Adelskov J, Greene AC. Bacterial DNA Extraction Using Individual Enzymes and Phenol/Chloroform Separation. *J Mic Bio Edu*. 2017; 18(2): 1-3.

20. Booq RY, Abutarboush MH, Alolayan MA, Huraysi AA, Alotaibi AN, Alturki MI, et al. Identification and Characterization of Plasmids and Genes from Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Makkah Province, Saudi Arabia. *Antibiotics*. 2022; 11(1627): 1-14.

21. de Cássia Andrade Melo R, de Barros EMR, Loureiro NG, de Melo HRL, Maciel MAV, Souza Lopes AC. Presence of fimH, mrkD, and irp2 virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. *Current microbiology*. 2014;69(6): 824-31.

22. Stojowska-Swędryńska K, Łupkowska A, Kuczyńska-Wiśnik D, Laskowska E. Antibiotic Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(1): 449.

23. Li Y, Li J, Hu T, Hu J, Song N, Zhang Y, et al. Five-year change of prevalence and risk factors for infection and mortality of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection in a tertiary hospital in North China. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2020;9(1): 1-14.

24. Mujeeb F, Bajpai P, Pathak N. Phytochemical evaluation, antimicrobial activity, and determination of bioactive components from leaves of *Aegle marmelos*. *BioMed research international*. 2014; 2014.

25. Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. The *Artemisia* L. genus: a review of bioactive essential oils. *Molecules*. 2012;17(3): 2542-66.

26. Bora KS, Sharma A. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. *Pharmaceutical Biology*. 2011;49(1): 101-9.

27. Ahameethunisa AR, Hopper W. Antibacterial activity of *Artemisia nilagirica* leaf extracts against clinical and phytopathogenic bacteria. *BMC complementary and alternative medicine*. 2010;10(1):1-6.

28. Poiată A, Tuchiluş C, Ivănescu B, Ionescu A, Lazăr M. Antibacterial activity of some *Artemisia* species extract. *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*. 2009;113(3):911-4.

29. Appalasaamy S, Lo KY, Ch'ng SJ, Nornadia K, Othman AS, Chan L-K. Antimicrobial activity of artemisinin and precursor derived from in vitro

plantlets of *Artemisia annua* L. BioMed research international. 2014; 2014.

30. Donato R, Santomauro F, Bilia AR, Flamini G, Sacco C. Antibacterial activity of Tuscan *Artemisia annua* essential oil and its major components against some foodborne pathogens. LWT-Food Science and Technology. 2015;64(2): 1251-4.

31. Naghsh A, Mohammadi Sichani M, Amjad L. Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Artemisia deserti* Flowers Against Some Pathogenic Bacteria. Qom University of Medical Sciences Journal. 2015;8(5): 57-64.

32. Saffari E, Khalili MAN, MehrAbadi JF. The antibacterial activity of *Artemisia quettensis* essential oil and its synergy with imipenem. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences. 2019;41(5): 80-8.

33. Juteau F, Masotti V, Bessiere JM, Dherbomez M, Viano J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. Fitoterapia. 2002;73(6): 532-5.

34. Fathi N, Tafvizi F, Mirzaie A. Antibacterial and anti-cancer activities of *Artemisia turcomanica* extract on gastric cancer cell line (AGS) and its interaction on cyclin D1 and cyckin E genes. Journal of Medicinal Plants. 2020;19(74): 163-76.

35. Baghini GS, Sepahi AA, Tabatabaei RR, Tahvildari K. The combined effects of ethanolic extract of *Artemisia aucheri* and *Artemisia oliveriana* on biofilm genes expression of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Iranian Journal of Microbiology. 2018;10(6): 417.

36. 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. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2020;14(1): 55-69.

Study on antimicrobial effect of *Artemisia Turcomanica* ethanolic extract into *Klebsiella pneumoniae* antibiotic-resistant strains and Its effect on *rmpA* and *fimH* drug-resistance genes expression

Dorsa Sadeghzadeh ¹, Elham Siasi ^{*2}, Hossein Abbaspour ³

1. MSc degree, Department of Microbial biotechnology, School of science, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

2. Association Professor, Department of Microbiology, School of science, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

3. Association Professor, Department of Biology, School of science, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

Corresponding author: Department of Microbiology, School of science, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

Abstract

Background & Aim: By antibiotic resistance growing and improvement of resistant bacteria strains, was reported using of plant extracts considering. The aim of this study was to identification the antibacterial effect of *Artemisia turcomanica* on *Klebsiella pneumoniae* resistant strains and its effect of *fimH* and *rmpA* drug resistance genes expression.

Methods: From 100 clinical samples were collected, *Klebsiella pneumoniae* strains were detected by biochemical tests and their antibiotic resistance was identified by disk diffusion test. The presence of *fimH* and *rmpA* genes was found using PCR technique. After of *Artemisia turcomanica* extraction, its antibacterial effect was evaluated of different concentrations against resistance strains. Expression of *fimH* and *rmpA* genes with the Real-Time PCR method, before and after of treatment with herbal extract was investigated. Data by SPSS software was analyzed.

Results: Among the 100 isolates, 30 isolates were identified as *Klebsiella pneumoniae* and from these 30 isolates, 10 isolates with resistance to several antibiotics were selected. The *fimH* and *rmpA* genes in eight and seven resistant strains, respectively, were existed. The most resistant strains against the *Artemisia turcomanica* extract were found with MIC equal to 200 µg/ml. The Real-Time PCR results shown a significant decrease in the *fimH* and *rmpA* genes expression after of herbal extract treatment (P<0.001).

Conclusion: According of these results, Turkmen herb could be given antibacterial effect with decrease of resistance genes expression in *Klebsiella pneumoniae*. For confirming of these results, requests more research.

Keywords:

Artemisia turkmanica, Klebsiella pneumoniae, antimicrobial effect, gene expression, antibiotic resistanc

How to Cite this Article: Sadeghzadeh D, Siasi E, Siasi H. Study on antimicrobial effect of *Artemisia Turcomanica* ethanolic extract into *Klebsiella pneumoniae* antibiotic-resistant strains and Its effect on *rmpA* and *fimH* drug-resistance genes expression . Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2023;11(2):56-70.