مجله دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه
دوره ۱۱. شماره ۲. تابستان ۱۴۰۲

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ضدمیکروبی 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 زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

چکیده

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

روش‌ها: از ۱۰۰ نمونه بالینی جمع آوری 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 عصاره گیری از گیاه *درمنه ترکمنی*، میزان اثر ضدباکتریایی آن در غلظت‌های مختلف بر سویه‌های مقاوم اندازه گیری شد. بیان ژن‌های *rmpA* و *fimH* با روش Real-Time PCR قبل و بعد از تیمار با عصاره گیاهی بررسی شد. داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS انالیز شدند.

نتایج: از تعداد ۱۰۰ ایزوله ، ۳۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* شنا سایی شد و از این ۳۰ سویه، ۱۰ ایزوله مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک جداسازی شدند. ژن های *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 ژن های *fimH* و *rmpA* بعد از تیمار با عصاره گیاهی بود ($P<0.001$).

نتیجه‌گیری: بر اساس این نتایج، *درمنه ترکمنی* می تواند اثر ضد باکتریایی با کاهش بیان ژن های 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.

*آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی
آدرس پست الکترونیک: emi_biotech2006@yahoo.com

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 متغیر های پاتوژن (مانند فاکتور های حدت همچون کپسول، دیواره سلولی، لیپو پلی ساکاریدها، فیمبریا و یک سری از ژن‌های مقاوم آنتی‌بیوتیکی)، متغیرهای ذاتی میزبان (مانند ژنتیک، سن و وضعیت ایمنی و بیماری های زمینه ایی) و عوامل بیرونی (مانند مصرف آنتی‌بیوتیک، قرار گرفتن در معرض عوامل محیطی نامناسب، تغذیه و اعتیاد به سیگار و الکل) است (٤). کپسول پلی ساکارید ارگانیسم مهمترین عامل حدت است و از باکتری‌ها در برابر پاسخ ایمنی میزبان و همچنین آنتی‌بیوتیک‌ها محافظت می‌کند. همچنین برخی از کپسول‌ها دارای اثرات تعدیل کننده سیستم ایمنی هستند و از باکتری‌ها در برابر فاگوسیتوز محافظت می‌کند و اجازه نمی‌دهد که آنتی بادی های اپسونیز کننده توسط سلول‌های فاگوسیتی دفاعی میزبان (به عنوان مثال، ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها) شناسایی شوند و منجر به افزایش پاسخ التهابی می‌شوند (٥). ژن *rmpA* که به عنوان URI [1] نیز شناخته می شود، ژنی است که کد کننده پروتئینی می‌باشد که در ایجاد کپسول پلی ساکاریدی انتروباکتریاسه‌ها از جمله *کلبسیلا پنومونیه* و در نتیجه پاتوژنز این باکتری‌ها دخیل است. این ژن کد کننده آنزیم های مخاطی می باشد. ایزوله‌های حامل ژن *rmpA* در ایجاد فنوتیپ هایی با توانایی چسبندگی بالا[2] و سویه‌های مرتبط با سندروم‌های مهاجم بالینی نقش دارند (٦ و ٧). عامل حدت مهم دیگر پیلی یا فیمبریا است که شناسایی گیرنده‌های مولکولی و تسهیل چسبندگی به سطوح بافتی خاص در میزبان و توسعه عفونت را سبب می شود و در تولید بیوفیلم‌های ناشی از این باکتری نیز نقش موثر دارد. *کلبسیلا پنومونیه* دو فاکتور چسبنده اصلی فیمبریا، فیمبریای نوع ۱ و نوع ۳ تولید می‌کند (۸). فیمبریای نوع ۱ دارای هماگلوتینین حساس به مانوز است، در حالی که فیمبریای نوع ۳ دارای هماگلوتینین مقاوم به مانوز است. فیمبریای نوع ۱ رایج ترین اندامک چسبنده در انتروباکتریا سه 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 می‌کند که این پیلی ها فاکتور های حدت دخیل در چسبندگی برای این باکتری محسوب می شوند (۱۰). کاربا‌پنم‌ها[3] آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که برای درمان عفونت‌های شدید ناشی از انتروباکتریا سه‌های مقاوم به چند دارو همچون *کلبسیلا پنومونیه* استفاده می‌شوند. *کلبسیلا پنومونیه* دارای آنزیم‌هایی بنام کاربا‌پنماز [4] هستند که قادر به شکستن کاربا‌پنم‌ها هستند و در نتیجه به این داروها مقاوم شده اند. بطور کلی پاتوژن‌ها از مکانیسم‌های متعددی برای ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی استفاده می‌کنند، از جمله تولید بتالاکتاماز، از دست دادن پروتئین‌های حساس غشای خارجی، تغییر هدف، تشکیل بیوفیلم، پمپ خروجی و اینتگرون (۱۱ و ۱۲). اخیراً به دلیل مقاومت و عوارض جانبی که میکروارگانیسم‌های پاتوژن در مواجهه با آنتی‌بیوتیک‌ها از خود نشان می‌دهند، در درمان‌های پزشکی به عصاره‌ها و ترکیبات گیاهی با ویژگی‌های بیولوژیکی توجه زیادی شده است (۱۳). عصاره‌های خام بخش‌های مختلف گیاهان دارویی، از جمله ریشه، ساقه، گل، میوه و شاخه‌ها به طور گسترده برای درمان برخی بیماری‌های انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از داروهای گیاهی برای درمان بیماری‌های عفونی، التهاب‌ها و آسیب‌های مختلف استفاده می‌شود. گیاهان دارویی حاوی چندین ماده شیمیایی گیاهی

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

مانند فلاونوئیدها [1]، آلکالوئیدها [2]، تانن‌ها [3] و ترپنوئیدها [4] هستند که دارای خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی هستند (۱۴). از جمله این گیاهان می توان به جنس *Artemisia*، سرده بزرگ گیاهان و درختچه‌های علفی و معطر از خانواده *Asteraceae* است اشاره نمود که در ایران با نام درمنه شناخته می شوند (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 سرطان ها ا ستفاده 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 ژن های *fimH* و *rmpA* در باکتری های مقاوم به دارو، بعد از تیمار با عصاره گیاهی بود تا بتوان برای مقابله با سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک و درمان این گونه عفونت ها، از گیاهان دارویی که دارای عوارض جانبی کمتر نسبت به انتی بیوتیک ها هستند و اثربخشی مناسب در درمان عفونت های میکروبی دارند، استفاده نمود.

روش‌ها

نمونه گیری: در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه کلینیکی از ادرار و خون، مشکوک به *کلبسیلا پنومونیه* از بیماران مراجعه کننده بیمارستان‌های شهر تهران در بازه زمانی پاییز و زمستان ۱۴۰۱، جمع آوری شدند. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه تحقیقاتی میکرو بشناسی ارک تهران، روی محیطهای EMB و 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 انتی بیوتیک ها (آنتی بیوگرام) : بعد از جداسازی باکتری های *کلبسیلا پنومونیه*، تست انتی بیوگرام 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 سواپ استریل از محلول برداشته شد و روی سطح محیط کشت مولرهینتون به صورت متراکم کشت داده شد. بعد از کشت، دیسک‌های آنتی بیوگرام، روی محیط کشت قرار گرفت. نحوه قراردادن دیسک‌ها در محیط کشت مولرهینتون، 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 آنتی بیوگرام برای هریک 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 استاندارد های آزمایشگاهی و بالینی (CSLI) انجام شد (۱۸). به عنوان سویه استاندارد کنترل مثبت، *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 13884 استفاده شد.

1.flavonoids
2.alkaloids
3.tannins
4.terpenoids

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

انجام واکنش زنجیره ایی پلیمراز و بررســی نتایج واکنش PCR : به منظور بررســی وجود ژن‌های (*fimH* و *rmpA*) که علاوه بر حدت، با مقاومت باکتری نسـبت به انتی بیوتیک ها نیز مرتبط هســتند، از تکثیر با روش واکنش زنجیره ایی پلیمراز (PCR) اســتفاده شــد. توالی پرایمرها و مواد مورد اســتفاده و برنامه دمایی برنامه دســتگاه PCR (مدل BioRad و کشــور 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 اگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز نموده و سـپس با دستگاه ژل داک عکسبردای شدند.

عصــاره گیری از گیاه Artemisia turcomanica : برای تهیه عصــاره گیاهی ابتدا گیاه *Artemisia turcomanica* با شــماره هرباریومی IBRC P1006115 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی تهیه شد. سپس مقدار ۵۰ گرم پودر گیاه از ماده آسیاب شده به ارلن حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانل ۷۰ درصــد اضــافه و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاه خیسانده شد. برای جلوگیری از تبخیر الکل، دهانه ارلن با پارافیلم بســته شــده و ســپس مایع شفاف رویی جدا و ر سوب ته ارلن دور ریخته شد. مایع رویی به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ rpm ســانتریفیوژ و مجدداً مایع رویی جداســازی و در دســتگاه تقطیر در د مای ۴۲ در جه سانتی‌گراد قرار داده شد تا الکل اضافی جدا شود. عصاره باقی مانده با غلــــــظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به عنوان محلول ذخیره تهیه و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه در ظروف تیره نگهداری گردید.

تعیین حداقل غلظت مهاری رشــد (MIC) نســبت به گیاه Artemisia turcomanica : ایزولــه هــا، جهت تســت MIC (Minimum Inhibitory Concentration) مورد مطــالعــه قرار گرفتند. آزمایش MIC بر ا ساس CLSI به روش رقیق سازی در میکروپلیت برای عصــاره گیاه *درمنه ترکمنی* انجام شــد. MIC بـصورت سه بار تکرار با ا ستفاده از روش میکرودایلو شن در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. عـصاره اتانلی *درمنه ترکمنی* در غلظت‌های µg/ml ۱۲/۵–۲۵–۵۰–۱۰۰ و ۲۰۰ به داخل چاهک‌ها ریخته و با محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) تا حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسـانده شـد. به همه چاهک‌ها مقدار ۵۰ میکرولیتر از کشــت میکروبی ســویه‌ها با غلظت نیم مک فارلند اضــافه شــد. مقدار MIC به عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشــد باکتری محسوب می‌شود. لازم به ذکر است که جهت تعیین غلظت MIC، از چاهک حاوی باکتری فاقد عصــاره به عنوان کنترل منفی و از چاهک حاوی باکتری استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 13884 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

ا ستخراج RNA و ساخت cDNA : برای بررسـی اثر عصــاره گیاه بر روی تغییرات بیان دو ژن (*fimH* و *rmpA*)، اســتخراج RNA با ا ستفاده از کیت ا ستخراج RNA شرکت سیناژن و بر اســاس پروتکل آن، انجام گرفت. ســپس از روی آن cDNA ساخته شد. برای این منظور از بافر 5x به میزان ٤ میکرولیتر و آنزیم RNase (٤٠Unit/µl) به میزان ۰/۵ میکرولیتر و مخلوط (dNTP (10mM به میزان ۲ میکرولیتر و $MgCl_2$ به میزان ۱,۵ میکرولیتر و الگوی dT به میزان ۲ میکرولیتر و انزیم ریورس ترا سکریپتاز به میزان ۱ میکرولیتر و با افزودن آب دوبار تقطیر شده حجم واکنش به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد، سپس با برنامه دمایی ۹٤ درجه یک دقیقه و ٤۲ درجه ســانتی گراد ٦۰ دقیقه و ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، سنتز cDNA انجام شد. بررســی تغییرات بیان ژن های *fimH* و *rmpA*، در باکتری های *کلبسیلا پنومونیه*، قبل و بعد از تیمار با عـصاره گیاهی از روش Real Time PCR با اســتفاده 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 اســتفاده برای PCR انجام

پذیرفت. مواد مورد استفاده برای Real Time PCR شامل: مستر میکس بایونیر ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمر فوروارد (Forward Primer) و پرایمر ریورس (Reverse Primer) هر یک به میزان ۱ میکرولیتر، cDNA (برای هر یک از ژن های) به میزان ۱ میکرولیتر و با میزان ۹/۵ میکرولیتر اب دو بار تقطر شده همراه DEPC (DiEthyl PyroCarbonate) حجم کل مواد واکنش به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد، سپس در برنامه دستگاه Real-time PCR light cycler 96 (مدل Roche و کشور سازنده المان) که در جدول ٤ اورده شده است، قرار داده شدند. داده‌های خروجی Real-time PCR برای باکتری های تیمار شده و تیمار نشده ، با استفاده از نرم افزار Rest2009 بر اساس فرمول Relative expression: 2 –ΔΔCt آنالیز شدند که فرمول محاسبه آن به شرح زیر بود:

Ct target-Ct reference=ΔCt

ΔΔCt=ΔCt test sample - ΔCt Control sample

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±standard deviation (SD) نمایش داده شده‌اند و P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول۱ - 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'	۱۰٦
16sRNA	F: 5'- ATCAGAGCGCGGATCTTTGCCG-3' R: 3'- ATCAGAGCGCGGATCTTTGCCG-5'	۱۵۵

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

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
پرایمرراست 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. طویل شدن	۷۲	۴۵ ثانیه
۵. طویل 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. طویل شدن	۷۲	۳۰ ثانیه
۵. طویل 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 انتی بیوگرام: نتایج تست آنتی بیوگرام انجام شده در جدول ٦ نشان داده شده است. بیشترین مقاومت به ترتیب به سفتازیدیم (۵۰ در صد)، سفوتاکسیم (٤٤ در صد) و سفکسیم (۳۳ در صد) مشاهده شد و بیشترین حساسیت به ایمی‌پنم (۹۳ در صد) و سیپروفلوکساسین (۷۳ در صد) گزارش شد. در این مطالعه از میان ۳۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* تشخیص داده شده، ۱۰ ایزوله با مقاومت به حداقل ۳ آنتی‌بیوتیک، برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند.

نتایج واکنش زنجیره ایی پلیمراز برای حضور ژن های fimH و rmpA: بررسی حضور ژن های *rmpA* و *fimH*، 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 ۱۰٦ 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 µg/ml -۲۵-۵۰ -۱۰۰ و ۲۰۰) تیمار شدند. MIC به دست آمده برای نمونه‌ها بطور میانگین ۹۷/۵ میکروگرم بر میلی لیتر بدست امد که بیشترین MIC استفاده شده در برابر سویه‌های شماره ٤ و ۱۹ بود.

تغییرات بیان ژن‌های fimH و rmpA در جدایه‌های تیمار شده با غلظت sub-MIC عصاره گیاه درمنه ترکمنی: نمودار تکثیر و منحنی ذوب ژن‌های *rmpA* و *fimH* 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 *rmpA* و *fimH* 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*

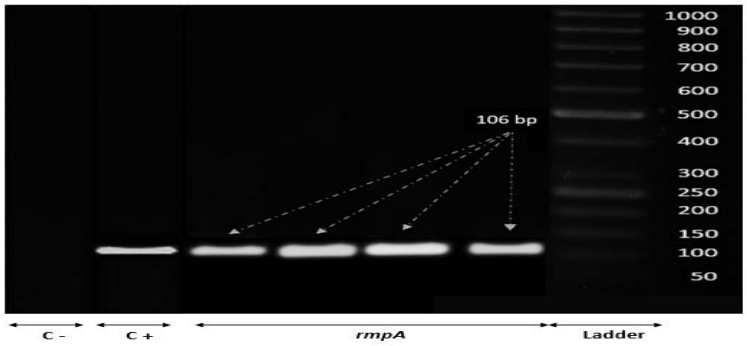
تست افتراقی	پاسخ تست
رنگ امیزی گرم	گرم منفی (صورتی)
TSI	A/A (زرد/زرد، تولید CO2، عدم تولید H2S)

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

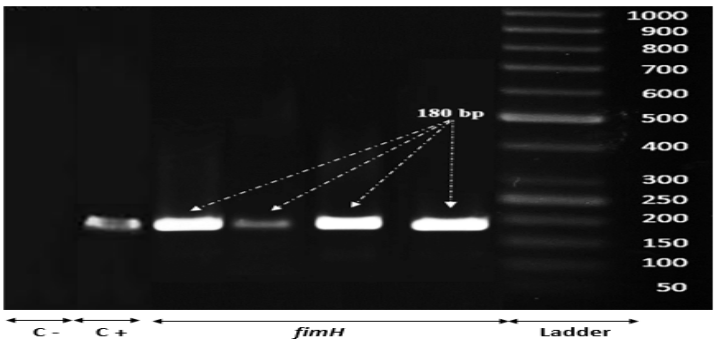
پاسخ مثبت انجام واکنش و پاسخ منفی عدم انجام واکنش را نشان داده است

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

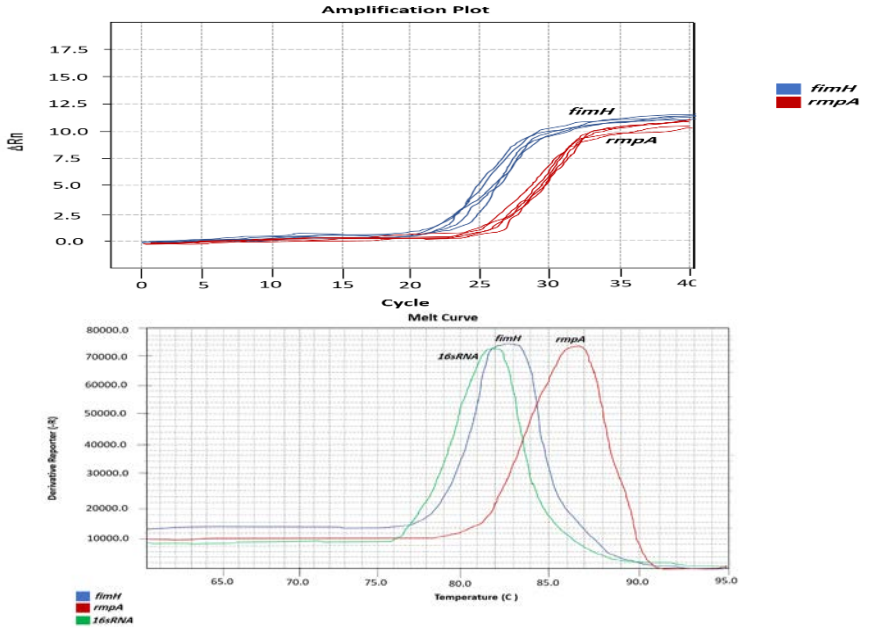
آنتی‌بیوتیک	حساس		نیمه حساس		مقاوم		مجموع
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	درصد
سفکسیم	۱۷	۵۷	۳	۱۰	۱۰	۳۳	۱۰۰
سیپروفلوکساسین	۲۲	۷۳	۲	۷	٦	۲۰	۱۰۰
جنتامایسین	۱۹	٦۳	٦	۲۰	۵	۱۷	۱۰۰
سفپیم	۲۰	٦٦	۳	۱۰	۷	۲٤	۱۰۰
ایمی‌پنم	۲۸	۹۳	۲	۷	۰	۰	۱۰۰
سفتازیدیم	۱۵	۵۰	۰	۰	۱۵	۵۰	۱۰۰
سفوتاکسیم	۱٦	۵۳	۱	۳	۱۳	٤٤	۱۰۰



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 *rmpA* و *fimH* را نشان می‌دهد

بحث

عفونت بیمارستانی به عفونتی گفته می‌شود که بیمار در زمان بستری و در دوره‌ی کمون دچار آن گردد. میزان شیوع عفونت‌های بیمارستانی حتی در مجهز ترین بیمارستان ها بسیار بالا می باشد. 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 باکتری های ایجاد کننده عفونت بیمارستانی کمک می‌کند (۷ و ۲۰). ژن‌های مختلفی، فاکتورهای بیماریزایی *کلبسیلا پنومونیه*، را کد می نمایند، از جمله ژن های 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 آنتی بیوتیک های مختلف، در این خصوص بکار گرفته شده است ولی این گونه درمان ها دارای عوارض جانبی می باشند. بنابراین ترکیباتی که بتوانند در برابر باکتری های مقاوم به دارو اثر ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای با سمیت کمتر برای بدن، ایجاد کنند، از اهمیت بسزایی برخوردار هستند (۳۶-۲۲).

گیاهان توانایی شگفت انگیزی در تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت های 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 *آرتمیزیا* 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 متابولیت های ثانویه مختلف مانند فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، ساپونین‌ها و پلی ساکاریدهای گونه‌های مختلف *Artemisia turcomanica* (درمنه ترکمنی) شناسایی شده‌اند که برخی از

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 می باشند (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 (*rmpA* و *fimH*) 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 ٤ و ١٩ با MIC برابر ٢٠٠ 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 آنوآ* 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 میکروارگانیسم‌های آزمایش شده مؤثرتر بوده است. با این 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 گونه ها 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، آرتمیزینین و یک پیش‌ساز، از ان 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 می شود. ان مطالعه نشان داد که گیاهچه‌های *A. annua* ، می‌توانند با فعالیت ضد میکروبی در برابر باکتری ها استفاده شوند (۲۹) که نتایج پژوهش حاضر نیز با ان 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، ۱،۸- سینئول و کافور) بود. اسانس و ترکیبات برای فعالیت در برابر *اشریشیا کلی O157*، *سالمونلا انتریتیدیس*، *سالمونلا تیفی*، *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *لیستریا مونوسیتوژنز* 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 میکرودیلوشن براث مورد آزمایش قرار گرفت. میکروارگانیسم‌های آزمایش‌شده 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 می تواند 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

استافیلوکوکوس اورئوس، *انتروکوکوس فکالیس* و *اشریشیا کلی* جلوگیری کرد. آنان قطر منطقه مهار اسانس گل بیابانی درمنه را در محدوده ۸,۳ تا ٤٥ میلی‌متر 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 باکتری‌های بیماری‌زا به ویژه باکتری‌های گرم مثبت است و این اسانس گیاهی می‌تواند 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 اسانس‌های ضدباکتریایی *درمنه کوئتنسیس* و آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم بر *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از نمونه‌های بالینی و مقایسه آن با آنتی‌بیوتیک‌های معمولی بود. نتایج آنان نشان داده است که اسانس گیاهان با آنتی‌بیوتیک در برخی موارد منجر به اثر هم افزایی می‌شود و نشان دهنده تأثیر هم افزایی گیاه *درمنه کوئتنسیس* با انتی بیوتیک ها در خواص ضدمیکروبی 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 اندام‌های هوایی درمنه شامل کافور ، ژرماکرین D ، ترانس پینوکاروئول، بتا–سلین، بتا کاریوفیلن و درمنه کتون است که این ترکیبات از نظر فعالیت ضد میکروبی غربالگری شدند. اسانس به طور قابل توجهی از رشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری کرد. ان اسانس دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود که بعنوان دلیل اثرات ضد میکروبی برای ان گیاه گزارش شد (۳۳). در مطالعه حاضر نیز عصاره درمنه ترکمنی با فعالیت ضدمیکروبی 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 ژن‌های *سیکلین D1* و *سیکلین E* 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 (۳٤). 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 ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس های* مقاوم به متی سیلین MRSA (ATCC 33591) در تیمار با ترکیبی از *درمنه آوشری* و *درمنه الیوریانا* بود. بر اساس نتایج آنان، استفاده از ترکیب دو عصاره اتانولی تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن‌های 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 پمپ‌های جریان norA در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به سیپروفلوکساسین مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به سیپروفلوکساسین با غلظت‌های 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 معنی‌داری در بیان ژن مقاوم به دارو در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به سیپروفلوکساسین تیمار شده با عصاره *A. ciniformis* مشاهده شد (۳٦). نتایج مطالعه حاضر نیز چنین نشان داد که عصاره درمنه ترکمنی با اثرات ضد باکتریایی می‌تواند 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 آنتی‌بیوتیک‌ها 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* می‌تواند بصورت ترکیبی موثر در درمان عفونت های باکتریایی

به جای آنتی‌بیوتیک‌ها بکار گرفته شود و مزیت این روش این است که از ایجاد سویه های باکتری های مقاوم به دارو جلوگیری می گردد. برای تایید نتایج تحقیق حاضر بررسی های بیشتر با تعداد نمونه باکتری فراوان تر و انواع مختلف از باکتری های گرم منفی و گرم مثبت مقاوم به دارو، توصیه می شود.

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 می شود که عصاره گیاه مذکور بر روی بیان ژن های ویرولانس باکتریایی تاثیرگذار بوده و باعث اثر معنادار پس از تیمار با این عصاره بر روی بیان ژن های مقاوم در سویه های *کلبسیلا پنومونیه* می گردد. بررسی مکانیسم دقیق این اثر ضدباکتریایی، تحقیقات وسیع تر و با تعداد نمونه بیشتر نیاز دارد.

تشکر و قدردانی

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

تضاد منافع

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

مشارکت نویسندگان:

(۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه، یا جمع آوری داده ها، یا تجزیه و تحلیل و تفسیر داده ها : 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

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 antiprolifrative 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-Swędrzyńska 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. Appalasamy 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.

Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences
2023, Volume 11, No. 2: 56-70.

Original article

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

Keywords:

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

Abstract

Background & Aim*:* By antibiotic resistance growing and improvement of resistant bacteria strains, was reported useing 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.

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.

distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite.