AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences
نشریه دانشگاه علوم‌پزشکی البرز، تابستان ۱۴۰۳، دوره ۱۳، شماره ۳، صفحه‌های ۱۹۳-۱۸۲
مقاله تحقیقی

شناسایی جدایه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتاماز AmpC در گیلان و بررسی اثر مهاری تیمول بر آن

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۰/۲۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۰۵

خورشید جیردشتانی
فاطمه موسوی
لیلا اسدپور*

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، رشت، ایران

چکیده

مقدمه و اهداف: کلبسیلا پنومونیه پاتوژن فرصت‌طلبی است که در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی سهم عمده‌ای دارد. از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز توسط این باکتری‌ها می‌باشد. هـــدف از مطالعه حاضر بررسی فراوانی کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتاماز AmpC در گیلان و بررسی اثر تیمول بر مهار این جدایه‌ها بود.

روش‌ها: تعداد ٦٠ جدایه کلبسیلا پنومونیه از آزمایشگاه‌های بالینی شهر رشت طی سال ١٤٠٠ جداسازی و شناسایی گردید. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌ها تعیین و تولید بتالاکتاماز با استفاده از روش دیسک ترکیبی بررسی شد. فراوانی حضور ژن‌های کدکننده آنزیم AmpC شامل ژن‌های بتالاکتاماز DHAM، CITM، FOX در ایزوله‌ها با استفاده از روش PCR تعیین شد. اثر تیمول بر مهار رشد جدایه‌ها به روش انتشار و براث میکرودایلوشن و اثر ضد افلاکسی تیمول به روش کارت ویل تعیین شد.

یافته‌ها: از بین جدایه‌های مورد بررسی تعداد ٤٦ جدایه (٧٦/٦ درصد) دارای مقاومت چندگانه دارویی بودند. از ٢٢ جدایه‌ای که در بررسی فنوتیپی مولد AmpC شناسایی شدند به ترتیب در ١٢ (٢٠ درصد) و ٧ (١١/٦٦ درصد) جدایه، ژن‌های CITM و DHAM شناســـایی شـــدند و ٤ جدایه هم زمان واجد هر دو ژن CITM و DHAM بودند. تیمول بر همه جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه اثر مهار رشد و ضد افلاکسی نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر ضرورت دستیابی به یک گزینه درمانی موفق جهت جلوگیری از گسترش عفونت ناشی از کلبسیلا پنومونیه تولید کننده AmpC را مطرح می‌کند. با توجه به نتایج حاصل، استفاده از تیمول می‌تواند مبنایی برای توسعه درمان جدید علیه کلبسیلا پنومونیه مقاوم به دارو فراهم کند.

واژگان کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، بتالاکتاماز AmpC، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تیمول

* نویسنده مسئول:
گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، رشت، ایران
تلفن: ٩٨٩١١٣٣٨٣٨٦٠+
ایمیل: l.asadpour@yahoo.com
asadpour@iaursht.ac.ir

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2024-12-02]

[DOI: 10.61186/aums.13.3.182]

مقدمه

در سال‌های اخیر، شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی به طور گسترده افزایش یافته و مقاومت در برابر سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف در اعضای انتروباکتریاسه در سراسر جهان گزارش شده است[۱]. تولید آنزیم‌هایی مثل آمپی سلیناز C (AmpC) و بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) یکی از مکانیسم‌های اصلی مقاومت در برابر سفالوسپورین‌های وسیع الطیف است. ESBL های موجود در باکتری‌های انتروباکتریاسه معمولا به کلاس A یا D بتالاکتامازهای طرح آمبلر تعلق دارند که باعث افزایش مقاومت در برابر سفالوسپورین‌های وسیع الطیف و مونوباکتام‌ها می‌شود. بتالاکتامازهای AmpC طبق طبقه‌بندی ساختاری آمبلر متعلق به کلاس C مولکولی هستند که با هیدرولیز سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف و سفامایسین‌ها مشخص می‌شوند. با این حال، سفپیم و کاربا‌پنم‌ها در برابر هیدرولیز توسط بتالاکتامازهای AmpC بسیار پایدار تر هستند. [۲،۳] سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به واسطه بتالاکتامازهای AmpC و بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) در میان جدایه‌های خانواده انتروباکتریاسه، عمدتا در گونه‌های کلبسیلا پنومونیه و اشرشیاکلی پدید آمدند[۴،۵].

ژن‌های کدکننده بتالاکتامازهای نوع AmpC، کروموزومی (cAmpC) یا با واسطه پلاسمید (pAmpC) بوده دارای ٦ خانواده اصلی CIT، ACC، EBC، FOX، MOX و DHA می‌باشند و تاکنون بیش از ۲۰ بتالاکتاماز مختلف نوع AmpC با واسطه پلاسمید شناسایی شده‌اند. آنزیم AmpC نسبت به مهار با کلاولانیک اسید مقاوم است [۳]. بیشتر آنزیم‌های AmpC، سفالوسپورینار هستند ولی تا حدی توانایی هیدرولیز بتالاکتام‌هایی نظیر پنی‌سیلین‌ها را نیز دارا می‌باشند. به طور معمول این ژن‌ها در حد کمی بیان می‌شوند، مگر این که باکتری‌های حمل کننده ژن در معرض بعضی از بتالاکتام‌های القاکننده مانند آموکسی‌سیلین و ایمی‌پنم قرار گیرند که در این صورت بیان این ژن‌ها افزایش می‌یابد [٦]. نتایج مطالعات پیشین نشان‌دهنده افزایش شدید بروز بتالاکتاماز AmpC است. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که بتالاکتامازهای AmpC در بیش از ۵۰ درصد از ایزوله‌های بالینی تولید می‌شوند [۷]. ارگانیسم‌های تولید کننده AmpC باعث افزایش نگرانی‌های بالینی شده‌اند زیرا به تمام داروهای بتالاکتام به جز کاربا‌پنم‌ها، سفپیروم و سفپیم مقاومت نشان می‌دهند. برخلاف ESBLها، آن‌ها می‌توانند سفامایسین‌ها را هیدرولیز کنند و مهارکننده‌های بتالاکتاماز قادر به مهار آن‌ها نیستند. [۸،۹].

در سال‌های اخیر شیوع کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سفوکسیتین در سراسر جهان افزایش یافته است. این امر نشان‌دهنده گسترش جدایه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز AmpC با واسطه پلاسمید است. تعداد محدودی از گزینه‌های درمان آنتی‌بیوتیکی در عفونت‌های ناشی از کلبسیلا پنومونیه‌ی تولید کننده AmpC در دسترس است. کاربا‌پنم‌ها به عنوان گزینه درمانی برای مدیریت عفونت‌های ناشی از کلبسیلا پنومونیه‌ی تولیدکننده AmpC مورد استفاده قرار می‌گیرند با این حال، گزارش شده است که بتالاکتاماز AmpC می‌تواند مقدار MICکاربا‌پنم‌ها را افزایش دهد و نسبت به این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت ایجاد کند [۱۰،۱۱]. علاوه بر گسترش مقاومت‌های آنزیمی، میکرو ارگانیسم‌ها کانال‌های پروتئینی متعددی در غشا دارند که در انتقال تعداد زیادی از مواد غذایی و ترکیبات سمی نقش دارند. در میان این انتقال دهنده‌ها، پمپ‌های افلاکس نقش اساسی در خروج آنتی‌بیوتیک‌ها از داخل سلول داشته و این موارد را از درون سلول به محیط خارج پمپ می‌کنند. بنابراین باعث کاهش غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها می‌گردند [۱۲].

انواع زیادی از مولکول‌ها با پتانسیل فعالیت ضد میکروبی از متابولیسم ثانویه گیاهان تولید می‌شوند که بعنوان راهکارهای جدید برای مقابله با عفونت‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا مورد توجه قرار گرفته‌اند. از جمله آن‌ها تیمول است که به عنوان ماده موثره اصلی در روغن و عصاره آویشن یافت می‌شود و خواص ضد میکروبی، ضد قارچ و ضد باکتریایی آن اثبات شده است [۱۳].

بر این اساس هدف از مطالعه حاضر بررسی فنوتیپی و تعیین فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز AmpC در جدایه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه در شهرشت و بررسی اثر تیمول بر مهار این جدایه‌ها بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و تعیین هویت باکتری‌ها

در این مطالعه ٦۰ جدایه کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های بالینی در بهار و تابستان سال ۱٤۰۰ از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهر رشت جمع‌آوری شد و با انجام تست‌هایی مثل رنگ‌آمیزی گرم، بررسی منظره رشد بر روی محیط‌های آگار مک کانکی، EMB و TSI، تست حرکت، بررسی قابلیت تولید اوره آز، سیتراتاز و اندول تشخیص باکتری مورد تایید قرار گرفت [۱٤].

شناسایی مولکولی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه

جهت شناسایی مولکولی و تایید تشخیص کلبسیلا پنومونیه از یک جفت پرایمر اختصاصی ژن phoE استفاده شد (طراحی شده توسط نرم‌افزار Oligo۷). استخراج DNA با استفاده از روش جوشاندن انجام شد. به این ترتیب که یک کلنی از محیط برداشته و در محیط BHI براث درون میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری حل و به مدت ۲۰ ساعت گرمخانه گذاری شد. بعد میکروتیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس مایع رویی دور ریخته شد و رسوب در ۵۰۰ میکرولیتر آب

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2024-12-02]

[DOI: 10.61186/aums.13.3.182]

مقطر به حالت سوسپانسیون درآمد. برای لیز سلول‌ها سوسپانسیون حاصل به مدت ۵ دقیقه دردمای ۹۵ درجه قرار داده شد، پس از آن محلول در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی حاوی DNA استخراج شده بود. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس PCR (سیناژن، ایران)، پرایمرهای پیشرو و پیرو (۲۰ پیکومول) ۱ میکرولیتر، DNA الگو ۳ میکرولیتر، آب مقطر ۷/۵ میکرولیتر انجام گرفت. برنامه حرارتی ترموسایکلر به ترتیب شامل مراحل واسرشته شدن اولیه در ۹۴ درجه به مدت ٤ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی ۹٤ درجه ۱ دقیقه، ۵۹ درجه ٤۰ ثانیه و ۷۲ درجه ٤۵ ثانیه بود. سپس یک مرحله ده دقیقه‌ای طویل شدن نهایی اضافه گردید و محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های phoE در جدول ۱ آمده است.

سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

به‌منظور تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه، تست آنتی‌بیوگرام به روش انتشار از دیسک طبق دستور عمل CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) انجام گرفت. برای این منظور، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۱۸-۲٤ساعته باکتری با کدورت معادل نیم مک فارلند، بر روی محیط آگار مولر هینتون کشت چمنی داده شد. سپس دیسک آنتی‌بیوتیک‌های (پادتن طب، ایران) ایمی‌پنم (۱۰)، آمیکاسین (۱۰)، سفوکسیتین (۳۰)، آمپی‌سیلین (۱۰)، سفوتاکسیم (۳۰)، انروفلوکساسین (۵)، آزترونام (۳۰)، سفازولین (۳۰)، سفتازیدیم (۳۰)، جنتامایسین (۱۰)، مروپنم (۱۰)، کلیستین (۱۰)، نالیدیکسیک اسید (۳۰)، آمپی‌سیلین-سلولباکتام (۲۰)، سیپروفلوکساسین (۵)، پیپراسیلین -تازوباکتام (۱۱۰) به فاصله ۲ سانتی‌متر از همدیگر بر روی کشت‌های میکروبی قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتو ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد باکتری در اطراف هر دیسک بر اساس دستور عمل CLSI میزان مقاومت یا حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت مقاوم (R)، حساس (S) یا دارای حساسیت بینابینی (I) گزارش شدند. سپس جدایه‌هایی که به بیش از دو کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاوم بودند به عنوان سویه‌های با مقاومت آنتی‌بیوتیکی چند گانه تعیین گردید.

بررسی فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز AmpC

بررسی فراوانی ژن‌های bla_{FOXM}، bla_{DHAM} و bla_{CITM} به روش PCR انجام شد. جهت تکثیر این ژن‌ها از پرایمرهای اختصاصی که در جدول ۱ آمده است، استفاده شد [۱٤]. شرایط واکنش PCR همانند مرحله قبل و دمای اتصال پرایمرها ۵۳ درجه سانتیگراد بود. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و با تعیین توالی صحت آن تایید گردید.

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در انجام مطالعه

منبع	طول محصول (جفت باز)	توالی نوکلئوتیدی (۵`-۳`)	پرایمر
مطالعه حاضر	٤۱۳	CGACCTACCGCAACACCGACT CGA-CAGCACATAGCCGAGGGAC	phoE-F phoE-R
(۱٤)	٤٦۲	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	blaCITM-F blaCITM-R
(۱٤)	۱۹۰	AACATGGGGTATCAGGGAGATG CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	blaFOXM-F blaFOXM-R
(۱٤)	٤۰۵	AACTTTCACAGGTGTGCTGGG TCCGTACGCATACTGGCTTTGC	blaDHAM-F blaDHAM-R

بررسی اثر مهاری تیمول بر جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به روش انتشار از دیسک

در ادامه مطالعه ۱۰ جدایه کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتاماز AmpC و با الگوی مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی انتخاب شدند. به‌منظور بررسی اثر ضد میکروبی تیمول بر جدایه‌های منتخب کلبسیلا پنومونیه از روش انتشار از دیسک استفاده شد. برای این منظور ابتدا محیط کشت مولر هینتون آگار آماده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با کدروت ۰/۵ مک فارلند به صورت چمنی و پر روی محیط مولر هینتون آگار کشت شد. بعد از کشت، دیسکهای آغشته به ۱۰۰ میکروگرم تیمول به کشت منتقل شد و پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2024-12-02]
[DOI: 10.61186/aums.13.3.182]

گرماخانه نگهداری شد. سپس پلیت‌ها بررسی و با استفاده از خط کش قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری گردید. این آزمایش در ۳ تکرار انجام شد.

تعیین MIC تیمول به روش براث میکرودایلوشن

کم‌ترین غلظت مهارکننده رشد تیمول به روش براث میکرودایلوشن انجام شد. جهت انجام این آزمایش از تیمول به صورت سری غلظت‌های متوالی شامل (۱۲۸ تا ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد. سپس از ۱۰ جدایه بالینی منتخب کلبسیلا پنومونیه که دارای مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی بودند کشت تازه با کدورتی معادل با استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد و رقت یک دهم از آن تهیه گردید. سپس از سوسپانسیون میکروبی حاصل، ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. این آزمایش در ۲ تکرار انجام شد.

بررسی فنوتیپی پمپ افلاکس در جدایه‌ها

به منظور بررسی فنوتیپی وجود پمپ افلاکس در جدایه‌ها از روش آگار حاوی اتیدیوم بروماید (روش کارت ویل)[1] استفاده شد. جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه روی پلیت‌های نوترینت آگار حاوی غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر اتیدیوم بروماید بصورت یک خط از مرکز به سمت کنار (چرخ درشکه‌ای) کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور قرار داده شد. سپس میزان فلورسنت ناشی از حضور اتیدیوم بروماید توسط دستگاه UV-VIS ۱۲۸۰ بررسی شد. از کشت باکتری در محیط فاقد تیمول به عنوان کنترل استفاده شد. خط کشتهایی که خاصیت فلورسنت نداشتند دارای فعالیت پمپ افلاکس در نظر گرفته شدند. این آزمایش در ۲ تکرار انجام شد [۱۵].

بررسی اثر ضد افلاکسی تیمول

به منظور بررسی فعالیت ضد پمپ افلاکسی تیمول از تکنیک آگار حاوی اتیدیوم بروماید (روش کارت ویل) استفاده شد. جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه روی پلیت‌های نوترینت آگار حاوی غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر اتیدیوم بروماید و غلظت‌های تحت مهاری تیمول بصورت یک خط از مرکز به سمت کنار (چرخ درشکه‌ای) کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور قرار داده شد. سپس میزان فلورسنت ناشی از حضور اتیدیوم بروماید توسط دستگاه UV-VIS ۱۲۸۰ بررسی شد. خط کشتهایی که خاصیت فلورسنت نداشتند دارای فعالیت پمپ افلاکس در نظر گرفته شدند. از محیط کشت حاوی CCCP[2] بعنوان کنترل مثبت و از کشت باکتری در محیط فاقد تیمول به عنوان کنترل منفی استفاده شد. این آزمایش در ۲ تکرار انجام شد

یافته‌ها

در این بررسی با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی، تعداد ۶۰ جدایه‌ی کلبسیلا پنومونیه شناسایی و به روش مولکولی و با تکثیر ژن phoE تایید شد (شکل ۱). از ایـــن تعداد ۴۶ جدایه (۷۶/۶ درصد) دارای مقاومت چندگانه دارویی بودند. بیشترین میزان حساسیت جدایه‌ها به کلیستین (۸۳/۳ درصد) و پس از آن نسبت به ایمی‌پنم (۶۰ درصد) بود. ۸۵ درصد جدایه‌ها به سفازولین و ۷۶/۶ درصد آن‌ها به سفتازیدیم مقاوم بودند. همچنین بیش از ۵۰ درصد جدایه‌ها نسبت به بتالاکتام‌های ترکیبی مانند پیپراسیلین- تازوباکتام و آمپی‌سیلین-سولباکتام مقاومت نشان دادند. نتایج درصد مقاومت و حساسیت و حساست متوسط جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲. نتایج تست آنتی بیوگرام جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه

آنتی‌بیوتیک	ایزوله‌های مقاوم	ایزوله‌های نیمه‌حساس	ایزوله‌های حساس
آمیکاسین	۳۲ (٪ ۵۳/۳)	۰ (٪ ۰)	۲۸ (٪ ۴۶/۶)
جنتامایسین	۳۰ (٪ ۵۰)	۲ (٪ ۳/۳)	۲۸ (٪ ۴۶/۶)
ایمی پنم	۱۹ (٪ ۳۱/۶)	۵ (٪ ۸/۳)	۳۶ (٪ ۶۰)
سفتازیدیم	۴۶ (٪ ۷۶/۶)	۶ (٪ ۱۰)	۸ (٪ ۱۳/۳)
سفوتاکسیم	۳۹ (٪ ۶۵)	۷ (٪ ۱۱/۶)	۱۴ (٪ ۲۳/۳)
آمپی‌سیلین	۳۶ (٪ ۶۰)	۵ (٪ ۸/۳)	۱۹ (٪ ۳۱/۶)
آزترونام	۴۵ (٪ ۷۵)	۵ (٪ ۸/۳)	۱۰ (٪ ۱۶/۶)
سیپروفلوکساسین	۴۲ (٪ ۷۰)	۴ (٪ ۶/۶)	۱۶ (٪ ۲۶/۶)
کلیستین	۳ (٪ ۵)	۷ (٪ ۱۱/۶)	۵۰ (٪ ۸۳/۳)
انروفلوکساسین	۳۸ (٪ ۶۳/۳)	۵ (٪ ۸/۳)	۱۷ (٪ ۲۸/۳)
نالیدیکسیک اسید	۴۱ (٪ ۶۸/۳)	۴ (٪ ۶/۶)	۱۵ (٪ ۲۵)
مروپنم	۳۵ (٪ ۵۸/۳)	۷ (٪ ۱۱/۶)	۱۸ (٪ ۳۰)
سفوکسیتین	۴۲ (٪ ۷۰)	۵ (٪ ۳/۸)	۱۳ (٪ ۲۱/۶)
سفازولین	۵۱ (٪ ۸۵)	۲ (٪ ۳/۳)	۷ (٪ ۱۱/۶)
پیپراسیلین-تازوباکتام	۳۱ (٪ ۵۱/۶)	۶ (٪ ۱۰)	۲۳ (٪ ۳۸/۳)
آمپی‌سیلین-سولباکتام	۳۱ (٪ ۵۱/۶)	۲ (٪ ۳/۳)	۲۷ (٪ ۴۵)

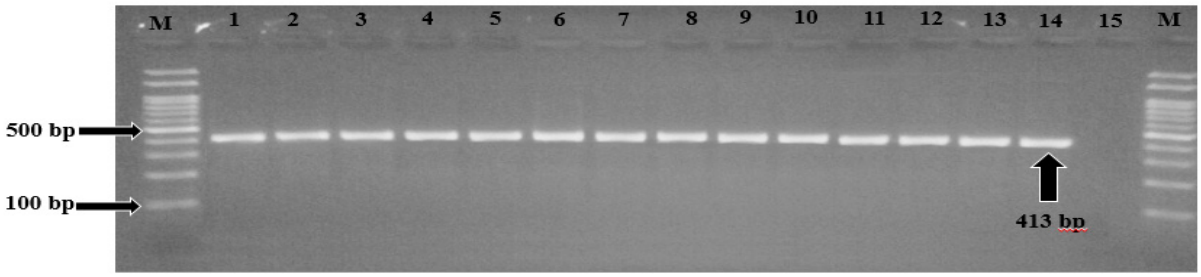
1 Cartwheel Method

2 Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2024-12-02]

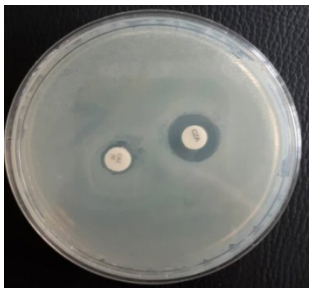
[DOI: 10.61186/aums.13.3.182]

از ٤٦ جدایه مقاوم به سفوتاکسیم و سفتازیدیم ۲۳ (۸۳/۳۳ درصد) جدایه در روش دیسک ترکیبی حاوی کلاوولانیک اسید با ایجاد قطر هاله بزرگتر مساوی ۵ میلی‌متر در دیسک ترکیبی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک تنها، مولد ESBL در نظر گرفته شدند. همچنین در بررسی فنوتیپی، ٤۲ جدایه مقاوم به سفوکسین با قطر هاله کم تر از ١٤ میلی‌متر و ۲۳ جدایه مقاوم به سفوتاکسیم و سفتازیدیم که از نظر تولید ESBL منفی بودند، مولد بالقوه AmpC در نظر گرفته شدند. تولید AmpC در ۲۲ جدایه (۳٦/٦٦ درصد) در روش استفاده از دیسک ترکیبی سفوکسیتین+ EDTA، با ایجاد قطر هاله بزرگتر مساوی ۵ میلی‌متر در دیسک ترکیبی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک تنها، تایید شد (شکل‌های ۲ و ۳).



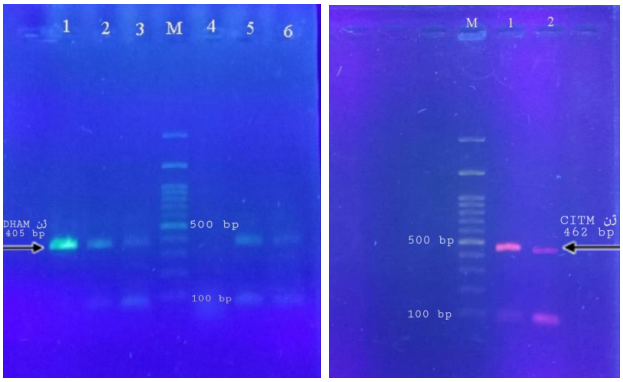
شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن phoE کلبسیلا پنومونیه بر روی ژل آگار۱٪. طول قطعه تکثیر شده ٤۱۳ جفت باز می‌باشد. چاهک شماره ۱۵: کنترل منفی؛ M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی.

شکل ۲. نتایج شناسایی فنوتیپی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد AmpC. تفاوت قطر هاله عدم رشد بزرگتر مساوی ۵ میلی‌متر بین دیسک سفوکسیتین و سفوکسیتین +EDTA



شکل ۳. نتایج شناسایی فنوتیپی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL. تفاوت قطر هاله عدم رشد بزرگتر مساوی ۵ میلی‌متر بین دیسک سفتازیدیم و سفتازیدیم + کلاوولانیک اسید

در بررسی فراوانی حضور ژن‌های کدکننده آنزیم AmpC شامل ژن‌های بتالاکتاماز FOXM، CITM، DHAM در جدایه‌ها در واکنش PCR، از ۲۲ جدایه‌ای که در بررسی فنوتیپی مولد AmpC شناسایی شدند به ترتیب در ۱۲ (۲۰ درصد) و ۷ (۱۱/٦٦درصد) جدایه‌ها، ژن‌های CITM و DHAM با وزن تقریبی ٤٦۲ و ٤۰۵ جفت باز شناسایی شدند (شکل ٤). در هیچ کدام از جدایه‌های مورد بررسی ژن blaFOXM شناسایی نشد و ٤ جدایه هم زمان واجد هر دو ژن CITM و DHAM بود. همچنین از بررسی حضور ژن‌های کدکننده آنزیم AmpC در جدایه‌های مولد ESBL، در ۲ جدایه، ژن CITM و در ۱ جدایه DHAM شناسایی شد.



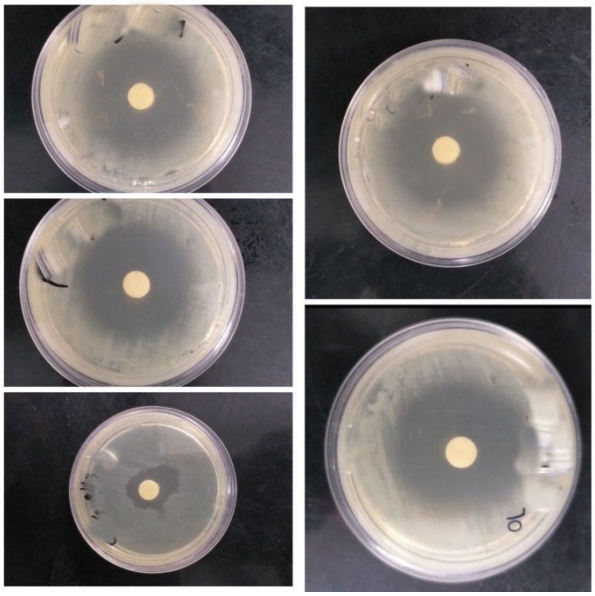
شکل ٤. الکتروفورز محصول PCR ژن‌های بتالاکتاماز AmpC. سمت راست: ستون M: DNA مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون‌های ۱ و ۲ محصول PCR ژن blaCITM. سمت چپ: ستون M: DNA مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون‌های ۱ –۳ و ۵ و ٦ محصول PCR ژن blaDHAM.

نتایج حاصل از بررسی اثر مهاری تیمول بر رشد و افلاکس جدایه‌ها

در روش انتشار از دیسک تیمول بر رشد همه جدایه‌های مورد بررسی اثر مهاری نشان داد. قطر هاله عدم رشد در جدایه‌های مورد مطالعه بین ۱۳–۳٦ میلی‌متر متغیر بود (شکل ۵). در روش براث میکرودایلوشن،

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2024-12-02]
[DOI: 10.61186/aums.13.3.182]

چاهک حاوی کم‌ترین غلظت از تیمول که بدلیل ممانعت از رشد باکتری شفاف بود بعنوان غلظت MIC و کم‌ترین غلظت از تیمول که مانع تشکیل کلنی در سطح آگار مولر هینتون گردید بعنوان MBC در نظر گرفته شد. مقادیر MIC و MBC تیمول در جدایه‌های مورد مطالعه به ترتیب بین ١٦ تا ٦٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ١٦ تا ١٢٨ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود (جدول ٣). همچنین نتایج تست کارت ویل نشان‌دهنده اثر ضد افلاکسی غلظت‌های تحت مهاری تیمول در جدایه‌های مورد مطالعه بود. تیمول در غلظت‌های ٤ تا ٣٢ میکروگرم بر میلی‌لیتر سبب مهار فعالیت پمپ افلاکس در جدایه‌های مورد مطالعه گردید (شکل ٦ و جدول ٣).



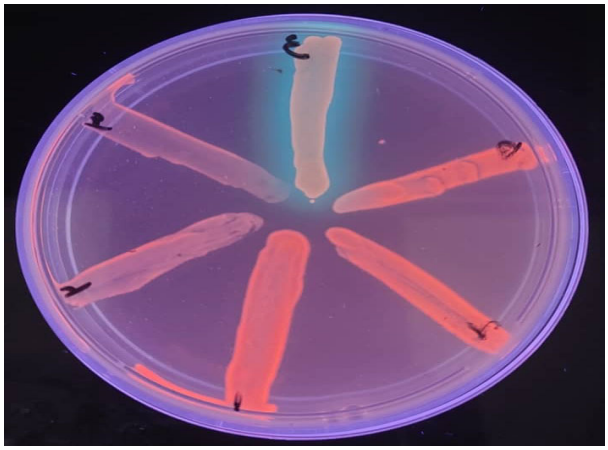
شکل ۵. هاله عدم رشد جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه در غلظت ۱۰۰ میکروگرم از تیمول

جدول ۳. نتایج بررسی اثر ضد میکروبی تیمول بر جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه

شماره باکتری	قطرهاله عدم رشد (mm)	MIC (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	MBC (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	مهار افلاکس (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
١	٣١	١٦	٣٢	٤
٢	٢٠	٣٢	٣٢	٨
٣	٣٦	١٦	١٦	٨
٤	٣١	٣٢	٣٢	١٦
٥	٣٤	١٦	٣٢	٤
٦	٢٥	١٦	٣٢	٤
٧	٢٠	٣٢	٦٤	١٦
٨	١٣	٦٤	١٢٨	٣٢
٩	٣١	١٦	٣٢	٨
١٠	٣٢	١٦	٣٢	٤

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2024-12-02]

[DOI: 10.61186/aums.13.3.182]



شکل٦- بررسی اثر ضد افلاکسی تیمول در باکتری‌های مورد مطالعه. در محیط کشت حاوی ٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمول، میزان فلورسنت در خط کشت نشانه تجمع اتیدیوم بروماید در سلول باکتری و میزان مهار فعالیت پمپ افلاکس است.

بحث و نتیجه‌گیری

مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به عنوان یک معضل در درمان بیماری‌های عفونی، سلامت جامعه را به خطر می‌اندازند. در دهه گذشته، با وجود تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید، انواع جدیدی از آنزیم‌های بتالاکتامازی AmpC ظاهر شده‌اند که ژن کد کننده آن‌ها می‌توانند از طریق پدیده کانجوگاسیون و ترانسفورماسیون پلاسمید یا کروموزوم به باکتریهای دیگر منتقل شده و باعث افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، کاهش اثر دارو و در نتیجه باعث ایجاد عفونت‌های جدی شوند [۱۶،۱۷].

در ایـــن تحقیق، جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه بیش‌ترین حساسیت را به آنتی‌بیوتیک‌های کلیسیتین و پس از آن ایمی‌پنم داشتند. در این مطالعه مقاومت به سفالوسپورین‌ها از جمله سفتازیدیم، سفوتاکسیم به ترتیب، ٦/٧٦ درصد و ٦٥ درصد بود. همچنین در مطالعه حاضر ٢٢ جدایه (٦٦/٣٦ درصد) از نظر فنوتیپی مولد AmpC و ٢٣ (٣٨/٣٣ درصد) جدایه مولد ESBL شناسایی شد. در بررسی فراوانی حضور ژن‌های کدکننده آنزیم AmpC شامل ژن‌های بتالاکتاماز FOXM، CITM، DHAM در جدایه‌ها در واکنش PCR، از ٢٢ جدایه‌ای که در بررسی فنوتیپی مولد AmpC شناسایی شدند، به ترتیب در ١٢ (٢٠ درصد) و ٧ (١١/٦٦درصد) جدایه‌ها، ژن‌های CITM و DHAM شناسایی شدند. در هیچ کدام از جدایه‌های مورد بررسی ژن FOXM شناسایی نشد و ٤ جدایه هم زمان واجد هر دو ژن CITM و DHAM بود. علت اصلی مقاومت به سفالوسپورین‌ها، بتالاکتامازهای با طیف وسیع و AmpC بتالاکتامازها می‌باشند که در میان نمونه‌های مقاوم به سفالوسپورین‌ها در مطالعه حاضر نیز مشاهده می‌شود و در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است. از جمله مطالعات انجام شده در ایران در زمینه مقاومت به سفالوسپورین‌ها، در تحقیقی که شاهچراغی و همکاران در سال ٢٠٠٧ در شهر تهران انجام دادند، به ترتیب ٣١ و ٣٢ درصد جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم و سفوتاکسیم مقاوم بودند ١٨. در مطالعه‌ای که توسط نجار پیرایه و همکاران در تهران بر روی ٨٥ نمونه بالینی کلبسیلا پنومونیه انجام گرفت میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم و سفپیم ٥/٥٦ گزارش شد [١٩]. مقایسه میزان مقاومت در این مطالعات نشان می‌دهد که به مرور زمان، میزان مقاومت به سفالوسپورین‌ها در باکتری‌ها افزایش یافته است. در مطالعه حاضر، ٧٠ درصد از جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه، مقاوم به سفوکسیتین بودند. همه جدایه‌های مقاوم به سفوکسیتین، تولید کننده بتالاکتاماز AmpC نبودند. این را می‌توان با این واقعیت توجیه کرد که علاوه بر نقش بتالاکتاماز AmpC در کاهش حساسیت به سفوکسیتین سایر مکانیسم‌ها از جمله یک مکانیسم غیرآنزیمی مثل اصلاح پورین یا سایر مکانیسم‌های آنزیمی مثل تولید ESBLs و متالو بتالاکتاماز هم نقش دارند [٢٠].

در مطالعه‌ای که هاکمن و همکارانش در سال ٢٠١٣ در کشور غنا بر روی ٤٠٠ جدایه باکتری انجام دادند، ٥٠ نمونه مقاوم به سفوکسیتین بودند. از این میان، ٥ جدایه (١٠ ٪) تولیدکننده بتالاکتاماز AmpC بودند به عبارت دیگر ٥ (١/٣ ٪) ایزوله از ٤٠٠ ایزوله تولید بتالاکتاماز AmpC کرده‌اند [٢١]. در مطالعات محققان ایرانی نیز نتایج متفاوتی به دست آمده است. در پژوهشی که توسط سلطان دلال و همکاران صورت گرفته است، ١٣ جدایه مقاوم که مولد AmpC بودند، شناسایی شدند که از آن میان ١٠/٢ ٪ درصد واجد ژن CITM بتالاکتاماز نوع AmpC بودند ولی ژن blaFOXM را در هیچ ایزوله‌ای شناسایی نکردند [٢٢].

در مطالعه قنواتی و همکاران، از ١٠٢ جدایه کلبسیلا پنومونیه ١٩/٦ درصد از جدایه‌ها به عنوان تولید کننده AmpC و ٤٣/١ درصد از جدایه‌های مقاوم به سفوکسیتین دارای حداقل یکی از ژن‌های AmpC از جمله CITM (٢٢/٥ درصد)، EBCM (٢١/٥ درصد)، DHAM (٧/٨ درصد)، و FOXM (٠/٩٨درصد) بودند. همسو با نتایج پژوهش حاضر، ٥/٨ درصد از جدایه‌ها همزمان دارای دو ژن AmpC بودند [٢٣]. فراوانی ژن‌های تولید کننده AmpC نیز در طول زمان در جدایه‌های گزارش شده

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2024-12-02]

[DOI: 10.61186/aums.13.3.182]

از مناطق مختلف در ایران نیز روند افزایشی داشته است. طبق مطالعه عظیمی و همکاران در سال ۲۰۱۳ در ایـــران، شیوع بتالاکتاماز AmpC در بین جدایه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه ۱/٦ درصد گزارش شد [۲٤]. جاپنی‌نژاد و همکاران نیز در سال ۲۰۱٤ نشان دادند که ۱۹ درصد از جدایه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه دارای ژن AmpC هستند. از این تعداد، ٤۲/۲ درصد دارای ژن CITM و ۳٦/۸ درصد درای ژن MOX و ۵/۲ درصد به ترتیب حامل ژن DHAM بودند [۲۵].

در مطالعه جدیدتری (۲۰۲۰) جهانتابی و همکاران، ۷۸ جدایه کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی قرار دادند که از بین جدایه‌های مقاوم به سفوتاکسیم/ سفتازیدیم ۸٦/۹ درصد جدایه‌ها تولید کننده ESBL و ۱۷/۳ درصد تولید کننده pAmpC بودند و فراوانی بالایی از ژن CTX-M در ایـــن جدایه‌ها گزارش گردید [۲٦]. در مطالعه کاظمیان و همکاران در سال ۲۰۱۹، از ۹۰ جدایه کلبسیلا پنومونیه ٤۰ درصد تولید کننده ESBL و ۲۰ درصد تولید کننده AmpC بودند [۲۷]. در کشور کره، سانگ و همکاران نشان دادند که DHA-۱ (٦٦/٦ درصد) و پس از آن CMY-۲ (۲۰ درصد) شایع‌ترین نوع بتالاکتاماز AmpC بودند [۲۸]. در مطالعه لی و همکاران در چین، ۹٦/۷ درصد و ۳/۳ درصد از جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به ترتیب دارای ژن‌های DHA-۱ و CMY-۲ بودند [۲۹]. ایـــن میزان شیوع گزارش شده کمتر از یـــافته‌های مطالعه حاضر است. به نظر می‌رسد استفاده گسترده و مکرر از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف بویژه استفاده گسترده از سفالوسپورین‌ها منجر به پیدایش جدایه‌های مقاوم گردیده است.

در مطالعه حاضر از بررسی حضور ژن‌های کدکننده آنزیم AmpC در جدایه‌های مولد ESBL، به ترتیب در ۲ و ۱ جدایه، ژن‌های CITM و DHAM شناسایی شد. در مطالعات پیشین نیز حضور ژن‌های کد کننده AmpC جدایه‌های مولد ESBL گزارش گردید. در مطالعه سلیمیان ریزی و همکاران در سال ۲۰۲۰، از بین ۳۳٦ سویه مولد ESBL، ٦۷/٤ درصد مقاوم به سفوکسیتین بودند و ۳۰ درصد جدایه‌های مقاوم به سفوکسیتین به طور همزمان فنوتیپ مولد ESBL و AmpC را نشان دادند و CMY (۳۸ درصد) شایع‌ترین ژنوتیپ AmpC با واسطه پلاسمید بود و پس از آن FOX (۲۹ درصد) و فراوانی ٦ DHA درصد بود [۳۰].

در مجموع در سال‌های اخیر شیوع کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سفوکسیتین در سراسر جهان افزایش یافته است که نشان‌دهنده گسترش جدایه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز AmpC با واسطه پلاسمید است. همچنین فراوانی قابل توجه سویه‌های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده ESBL در ایران گزارش شده است. به نظر می‌رسد شیوع باکتری‌های گرم منفی مولد ESBL در کشور در حال افزایش است. از آنجا که در سال‌های اخیر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌ها افزایش پیدا کرده است، نیاز به منابع و راهکارهای جدید برای مقابله با عفونت‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا احساس می‌شود. در این مطالعه بیش از ۷۰ درصد جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه دارای فنوتیپ MDR بودند. با توجه به اهمیت پمپ‌های افلاکس به عنوان یکی از اصلی ترین مکانیسم‌های مقاومت چند دارویی، در این مطالعه، بررسی اثر تیمول بر مهار رشد و پمپ افلاکس در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتاماز و با مقاومت چندگانه دارویی بررسی گردید. تیمول بر همه جدایه‌های MDR مورد مطالعه اثر مهاری نشان داد. میانگین قطر هاله عدم رشد جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه ۲۷/۳ میلی‌متر بود. کم‌ترین غلظت مهار کننده رشد (MIC) تیمول در جدایه‌های مورد بررسی بین ۱٦ تا ٦٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود.

اگرچه مشخص نیست که ترکیبات گیاهی چگونه مقاومت آنتی‌بیوتیکی را در باکتری کاهش می‌دهند، اما چندین مکانیسم‌های بالقوه در این زمینه پیشنهاد می‌شود. از آنجایی که اسانس‌های گیاهی و اجزای آنها ماهیتی آبگریز دارند، در درجه اول غشای پلاسمایی باکتری حاوی لیپید را هدف قرار می‌دهند و غشا را نفوذپذیرتر می‌کنند. این تغییر در نفوذپذیری غشای پلاسمایی باکتری که توسط مولکول‌های گیاهی ایجاد می‌شود، می‌تواند باعث افزایش جذب آنتی‌بیوتیک‌ها توسط سلول‌های باکتریایی شود. توضیح قابل قبول دیگر این است که مولکول‌های گیاه پس از ورود به سلول باکتری، پمپ‌های خروجی را که مسئول کاهش غلظت آنتی‌بیوتیک در سلول هستند، مهار می‌کنند [۳۱].

در مطالعه حاضر نتایج تست کارت ویل نشان‌دهنده اثر ضد افلاکسی غلظت‌های تحت مهاری تیمول در جدایه‌های مورد مطالعه بود. با این خاصیت، تیمول می‌تواند با جلوگیری از افلاکس آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر مواد ضد میکروبی از باکتری‌ها، سبب تجمع این مواد در سلول باکتری و کاهش غلظت موثر آن‌ها در درمان بیماری‌های عفونی گردد. خاصیت ضد افلاکسی تیمول در مطالعات دیگر نیز نشان داده شده است. در مطالعه شریفی و محمدزاده (۱۳۹٤) اثر اسانس آویشن دنایی بر روی مهار پمپ NorA باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تایید شد [۳۲]. نتایج مطالعه باربوسا و همکاران (۲۰۲۱) نیز نشان داد که کارواکرول و تیمول

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2024-12-02]

[DOI: 10.61186/aums.13.3.182]

فعالیت ضد باکتریایی متوسطی داشته و قادر به کاهش MIC آنتی‌بیوتیک نورفلوکساسین و EtBr در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حامل پمپ افلاکس NorA بودند [۳۳].

نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر مقاومت به سفالوسپورین‌ها به واسطه پلاسمید حاوی ژن‌های تولید کننده AmpC را در بین جدایه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه در گیلان تایید می‌کند. ظهور و گسترش چنین ارگانیسم‌های قابل انتقالی در مراکز پزشکی لزوم کنترل موثر عفونت ناشی از این باکتری‌ها، انجام اقدامات برای جلوگیری از گسترش بیشتر این ارگانیسم‌های مقاوم و ضرورت دستیابی به یک گزینه درمانی موفق را مطرح می‌کند. استفاده از تیمول می‌تواند مبنایی برای توسعه درمان جدید علیه کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو فراهم کند. با توجه به اثر ضد افلاکسی، استفاده از تیمول در ترکیب با سایر مواد ضد میکروبی می‌تواند سبب افزایش اثرگذاری آن‌ها گردد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت نهایت تشکر را دارند

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌کنند که در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

حمایت مالی

در اجرای این پژوهش هیچ نوع حمایت مالی دریافت نشده است.

مشارکت نویسندگان

خورشید جیردشتانی و فاطمه موسوی در اجرای طرح و لیلا اسدپور در ایده، آنالیز داده‌ها و نگارش مقاله مشارکت داشته‌اند.

References

1. Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. Drug Resist Update 2006;9:142–56.
2. RH-P Dhillon, Clark J. ESBLs: a clear and present danger? Crit Care Res Pract. 2012;2012:625170.
3. Meini S, Tascini C, Cei M, Sozio E, Rossolini GM. AmpC β-lactamase-producing Enterobacterales: what a clinician should know. Infection 2019;47:363–75.
4. Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Bottger EC, Hombach M. Practical approach for reliable detection of AmpC beta-lactamase producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2011;49(8):2798–803.
5. Sarojamma V, Ramakrishna V. Prevalence of ESBL-producing Klebsiella pneumoniae isolates in tertiary care hospital. ISRN Microbiol. 2011:318348.
6. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(3): 969-76.
7. Doddaiah, V., Anjaneya, D.: Prevalence of ESBL, AmpC and carbapenemase among Gram negative bacilli isolated from clinical specimens. Am J Life Sci. 2014; 2: 76–81.
8. Rodriguez-Bano J, Gutierrez-Gutierrez B, Machuca I, Pascual A. Treatment of Infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-,AmpC-, and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Rev. 2018;31(2).
9. Younas S, Ejaz H, Zafar A, Ejaz A, Saleem R, Javed H. AmpC betalactamases in Klebsiella pneumoniae: An emerging threat to the paediatric patients. J Pak Med Assoc. 2018;68(6):893–7.
10. Fallah F, Hakemi Vala M, Hashemi A, Shams S. Emergence of Novel Plasmid-mediated Beta-lactamase in Klebsiella pneumonia. Qom University of Medical Sciences Journal 2012 Dec 10;6(4):104-16.
11. Maleki A, Khosravi A, Ghafourian S, Pakzad I, Hosseini S, Ramazanzadeh R, et al. High prevalence of AmpC β-lactamases in clinical isolates of Escherichia coli in Ilam, Iran. Osong Public Health Res Perspect 2015;6:201–4.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2024-12-02]

[DOI: 10.61186/aums.13.3.182]

12. dos Santos Barbosa CR, Scherf JR, de Freitas TS, de Menezes IR, Pereira RL, Dos Santos JF, de Jesus SS, Lopes TP, de Sousa Silveira Z, de Morais Oliveira-Tintino CD, Júnior JP. Effect of carvacrol and thymol on NorA efflux pump inhibition in multidrug-resistant (MDR) Staphylococcus aureus strains. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 2021 Aug;53(4):489-98.
13. Miladi H, Zmantar T, Chaabouni Y, Fedhila K, Bakhrouf A, Mahdouani K, Chaieb K. Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. Microbial pathogenesis 2016 Oct 1;99:95-100.
14. Akya A, Elahi A, Chegene Lorestani R, Hamzavi Y. Antibiotic resistance and phenotypic and genotypic detection of ampc beta-lactamases among klebsiella pneumoniae isolates from Kermanshah medical centers.Qom Univ Med Sci J 2019;12(11):40-49. [In Persian].
15. Martins M, Viveiros M, Couto I, Costa SS, Pacheco T, Fanning S, Pages JM, Amaral L. Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method. In vivo. 2011 Mar 1;25(2):171-8.
16. Eslami M, Najar Peerayeh S. Phenotypic and molecular detection of TEM, PER, and VEB betalactamases in clinical strains of Escherichia coli. J Arak Univ Med Sci. 2012; 15(1): 1-9. [In Persian].
17. Xiang-Qun Liu and Yong-rui Lium Detection and genotype analysis of AmpC β-lactamase in Klebsiella pneumoniae from tertiary hospitals Exprimental and therapeutic Medicine 12: 480-484, 2016.
18. Shahcheraghi F, Moezi H, Feizabadi MM.Distribution of TEM and SHV beta-lactamase genes among Klebsiella pneumoniae strains isolated from patients in Tehran. Med Sci Monit. 2007; 13(11): BR 247-250.
19. Najar-Peerayeh S, Derakhshan S, Fallah F, Bakhshi B, Alebouyeh M. Prevalence of Extended-Spectrum β-Lactamases Among Klebsiella pneumoniae Isolated from Intensive Care Unit Patients in a Tertiary Hospital. Arch Clin Infect Dis.2019; 14(1):e69199. doi: 10.5812/archcid69199.
20. Helmy MM, Wasfi R. Phenotypic and molecular characterization of plasmid mediated AmpC beta-lactamases among Escherichia coli, Klebsiella spp., and Proteus mirabilis isolated from urinary tract infections in Egyptian hospitals. Biomed Res Int. 2014:171548.
21. Hackman HK, Osei-Adjei G, Gordon A, Laryea E, Quaye S, Anison L, Charles A Brown and Kingsley Twum-Danso. Phenotypic Characterization of AmpC beta-lactamase among Cefoxitin Resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae Isolates in Accra, Ghana. J Biolo, Agric Health 2013;3 (16):102-6.
22. Soltandallal M, Sabbaghi A, Mollaaghamirzaeie H, Rastegarlari A, Eshraghian M, Fallahmehrabadi J, Rajabi Z. Prevalence of AmpC and SHV beta-lactamases in clinical isolates of Escherichia coli from Tehran hospitals. Jundishapur J Microbiol. 2013; 28(3): 269-276. [In Persian]
23. Ghanavati, R., Darban-Sarolhalil, D., Navab-Moghadm, F., Kazemian, H., Irajian, GH and Razavi SH : First report of coexistnc of AmpC Beta-lactamase gnes in Klebsiella pneumoniae strains isolated from burn patients. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 2017;64 (4):455–462.
24. Azimi, L., Erajiyan, G., Talebi, M.: Phenotypic and molecular characterization of plasmid mediated AmpC among clinical isolates of Klebsiella pneumoniae isolated from different hospitals in Tehran. J Clin Diagn Res 2015;9, DC01.
25. Japoni-Nejad, A., Ghaznavi-Rad, E., van Belkum, A.: Characterization of plasmid-mediated AmpC and carbapenemases among Iranain nosocomial isolates of Klebsiella pneumoniae using phenotyping and genotyping methods. Osong Public Health Res Perspect 2014;5: 333–338.
26. Jahantabi A, Hosseini F, Asgharzadeh M, Sepehi AA, Kafil HS. Prevalence of AmpC and Extended-Spectrum Beta-Lactamase Genes in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli Isolates. Iranian

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2024-12-02]

[DOI: 10.61186/aums.13.3.182]

Red Crescent Medical Journal 2020 Feb 27;22(2).

27. Kazemian H, Heidari H, Ghanavati R, Ghafourian S, Yazdani F, Sadeghifard N, Valadbeigi H, Maleki A, Pakzad I. Phenotypic and Genotypic Characterization of ESBL-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli Isolates. Medical Principles Practice 2019;28:547–551.
28. Song W, Kim JS, Kim HS, Yong D, Jeong SH, Park MJ, et al. Increasing trend in the prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal ampC gene at a Korean University Hospital from 2002 to 2004. Diagn Microbiol Infect Dis.2006;55(3):219–24.
29. Li Y, Li Q, Du Y, Jiang X, Tang J, Wang J, et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in a Chinese University Hospital from 2003 to 2005: first report of CMY-2-Type AmpC betalactamase resistance in China. J Clin Microbiol. 2008;46(4):1317–21.
30. Salimiyan Rizi K, Mosavat A, Youssefi M, Amel Jamehdar S, Ghazvini K, Safdari H, Amini Y, Farsiani H. High prevalence of blaCMY AmpC beta-lactamase in ESBL co-producing Escherichia coli and Klebsiella spp. clinical isolates in the northeast of Iran, Journal of Global Antimicrobial Resistance. 2020; 22:477-482.
31. Da Silva NB, de Lucena Rangel M, Almeida BB, de Castro RD, Valença AM, Cavalcanti AL. Antifungal Activity of the Essential Oil of Cymbopogon citratus (DC) Stapf. An in vitro study. Journal of Oral Research 2017 Dec 22;6(12):319-23.
32. Mohammadzadeh A, Sharifi A. Bacterial biofilm and its inhibition mechanisms relying on anti-biofilm properties of plant compounds. Experimental animal Biology 2016 Aug 22;5(1):71-81.
33. dos Santos Barbosa CR, Scherf JR, de Freitas TS, de Menezes IR, Pereira RL, Dos Santos JF, de Jesus SS, Lopes TP, de Sousa Silveira Z, de Morais Oliveira-Tintino CD, Júnior JP. Effect of carvacrol and thymol on NorA efflux pump inhibition in multidrug-resistant (MDR) Staphylococcus aureus strains. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 2021 Aug;53(4):489-98.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2024-12-02]

[DOI: 10.61186/aums.13.3.182]

AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences
Alborz University of Medical Sciences Journal, Summer 2024, Vol. 13, No 3: 182-193 *Original Article*

Identification of AmpC beta-lactamase producing clinical isolates of Klebsiella pneumoniae in Guilan and investigation of inhibitory effect of thymol on

Received: 13 Jan 2023 ; Accepted: 27 Jul 2023

Khorshid Jirdashtani
Fatemeh Mousavi
Leila Asadpour*

Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Abstract

Introduction and objectives: Klebsiella pneumoniae is an opportunistic pathogen that plays a major role in the development of nosocomial infections. One of the most important mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics is the production of beta-lactamase enzymes by this bacterium. The aim of this study was to determine the frequency of AmpC beta-lactamase producing clinical isolates of K. pneumoniae in Guilan and investigating the inhibitory effect thymol on these isolates.

Methods: Sixty isolates of K. pneumoniae were isolated and identified from clinical laboratories in Rasht during 2022. The pattern of antibiotic susceptibility in isolates was determined and beta-lactamase production was investigated using combined disk method. The presence of AmpC encoding genes including FOX, CITM and DHAM beta-lactamase genes in isolates was determined by PCR. The growth inhibitory effect of thymol on these isolates was determined using disck diffusion and broth microdilution and the efflux inhibitory effect was determined by Cartwheel methods.

Results: Among tested isolates 46 (76.6%) showed multi drug resistant phenotype. Of the 22 phenotypically AmpC-producing isolates, CITM and DHAM genes were detected in 12 (20%) and 7 (11.66%) isolates respectively and 4 isolates had both CITM and DHAM genes at the same time. Thymol, showed growth and efflux inhibitory effects against all tested K. pneumoniae isolates.

Conclusion: The results of the present study suggest the necessity of finding a successful treatment option to prevent the spread of infections caused by AmpC producing K. pneumoniae. According to the results, the use of thymol can provide a basis for the development of a new treatment against multi-drug resistant Klebsiella pneumoniae.

Keywords: Klebsiella pneumoniae, AmpC beta-lactamase, Antibiotic resistance, Thymol

* Corresponding Author:
Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
Tel: +989113383860
Email: 1.asadpour@yahoo.com
asadpour@iaursht.ac.ir

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2024-12-02]

[DOI: 10.61186/aums.13.3.182]