

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

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

چکیده

خورشید جیردشتانی
فاطمه موسوی
لیلا اسدپور*گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد
رشت، رشت، ایران

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. هدف از مطالعه حاضر بررسی فراوانی کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتاماز AmpC در گیلان و بررسی اثر تیمول بر مهار این جدایه‌ها بود.

روش‌ها: تعداد ۶۰ جدایه کلبسیلا پنومونیه از آزمایشگاه‌های بالینی شهر رشت طی سال ۱۴۰۰ 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 میکروداپلوشن و اثر ضد افلاکسی تیمول به روش کارت ویل تعیین شد.

یافته‌ها: از بین جدایه‌های مورد بررسی تعداد ۴۶ جدایه (۷۶٪ درصد) دارای مقاومت چندگانه دارویی بودند. از ۲۲ جدایه‌ای که در بررسی فنوتیپی مولد AmpC شناسایی شدند به ترتیب در ۱۲ (۲۰ درصد) و ۷ (۱۱/۶۶ درصد) جدایه، ژن‌های CITM و DHAM شناسایی شدند و ۴ جدایه هم‌زمان 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، ایرانتلفن: +۹۸۹۱۱۳۳۸۳۸۶۰
ایمیل: l.asadpour@yahoo.com
asadpour@iaursht.ac.ir

مقدمه

در سال های اخیر، شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی به طور گسترده افزایش یافته و مقاومت در برابر سفالوسپورین های وسیع الطیف در اعضای انتروباکتریاسه در سراسر جهان گزارش شده است.^۱ تولید آنزیم هایی مثل آمپی سلیناز C (AmpC) و بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) یکی از مکانیسم های اصلی مقاومت در برابر سفالوسپورین های وسیع الطیف است. ESBL های موجود در باکتری های انتروباکتریاسه معمولا به کلاس A یا D بتالاکتامازهای طرح آمبلر تعلق دارند که باعث افزایش مقاومت در برابر سفالوسپورین های وسیع الطیف و مونوباکتام ها می شود. بتالاکتامازهای AmpC طبق طبقه بندی ساختاری آمبلر متعلق به کلاس C مولکولی هستند که با هیدرولیز سفالوسپورین های وسیع الطیف و سفامایسین ها مشخص می شوند. با این حال، سفیم و کارباپنم ها در برابر هیدرولیز توسط بتالاکتامازهای AmpC بسیار پایدار تر هستند.^{۲،۳} سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک به واسطه بتالاکتامازهای AmpC و بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) در میان جدایه های خانواده انتروباکتریاسه، عمدتاً در گونه های کلبسیلا پنومونیه و اشرشیاکلی پدید آمدند.^{۴،۵} ژن های کدکننده بتالاکتامازهای نوع AmpC، کروموزومی (cAmpC) یا با واسطه پلاسمید (pAmpC) بوده دارای ۶ خانواده اصلی، CIT، ACC، MOX، FOX، EBC و DHA می باشند و تاکنون بیش از ۲۰ بتالاکتاماز مختلف نوع AmpC با واسطه پلاسمید شناسایی شده اند. آنزیم AmpC نسبت به مهار با کلاولانیک اسید مقاوم است.^۳ بیشتر آنزیم های AmpC، سفالوسپوریناز هستند ولی تا حدی توانایی هیدرولیز بتالاکتام های نظیر پنی سیلین ها را نیز دارا می باشند. به طور معمول این ژن ها در حد کمی بیان می شوند، مگر این که باکتری های حمل کننده ژن در معرض بعضی از بتالاکتام های القاکننده مانند آموکسی سیلین و ای می پنم قرار گیرند که در این صورت بیان این ژن ها افزایش می یابد.^۶ نتایج مطالعات پیشین نشان دهنده افزایش شدید بروز بتالاکتاماز AmpC است. برخی از مطالعات نشان داده اند که بتالاکتامازهای AmpC در بیش از ۵۰ درصد از ایزوله های بالینی تولید می شوند.^۷ ارگانیسم های تولید کننده AmpC باعث افزایش نگرانی های بالینی شده اند زیرا به تمام داروهای بتالاکتام به جز کارباپنم ها، سفپروم و سفیم مقاومت نشان می دهند. برخلاف ESBL ها، آن ها می توانند سفامایسین ها را هیدرولیز کنند و مهارکننده های بتالاکتاماز قادر به مهار آن ها نیستند.^{۸،۹} در سال های اخیر شیوع کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سفوکسیتین در سراسر جهان افزایش یافته است. این امر نشان دهنده گسترش جدایه های تولید کننده بتالاکتاماز AmpC با واسطه پلاسمید است. تعداد محدودی از گزینه های درمان آنتی بیوتیکی در عفونت های ناشی از کلبسیلا پنومونیه تولید کننده

AmpC در دسترس است. کارباپنم ها به عنوان گزینه درمانی برای مدیریت عفونت های ناشی از کلبسیلا پنومونیه ی تولیدکننده AmpC مورد استفاده قرار می گیرند با این حال، گزارش شده است که بتالاکتاماز AmpC می تواند مقدار MIC کارباپنم ها را افزایش دهد و نسبت به این دسته از آنتی بیوتیک ها مقاومت ایجاد کند.^{۱۰،۱۱} علاوه بر گسترش مقاومت های آنزیمی، میکرو ارگانیسم ها کانال های پروتئینی متعددی در غشا دارند که در انتقال تعداد زیادی از مواد غذایی و ترکیبات سمی نقش دارند. در میان این انتقال دهنده ها، پمپ های افلاکس نقش اساسی در خروج آنتی بیوتیک ها از داخل سلول داشته و این موارد را از درون سلول به محیط خارج پمپ می کنند. بنابراین باعث کاهش غلظت آنتی بیوتیک ها در باکتری ها می گردند.^{۱۲}

انواع زیادی از مولکول ها با پتانسیل فعالیت ضد میکروبی از متابولیسم ثانویه گیاهان تولید می شوند که به عنوان راهکارهای جدید برای مقابله با عفونت ها و باکتری های بیماری زا مورد توجه قرار گرفته اند. از جمله آن ها تیمول است که به عنوان ماده موثره اصلی در روغن و عصاره آویشن یافت می شود 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 ژن های بتالاکتاماز AmpC در جدایه های بالینی کلبسیلا پنومونیه در شهر رشت و بررسی اثر تیمول بر مهار این جدایه ها بود.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه و تعیین هویت باکتری ها

در این مطالعه ۶۰ جدایه کلبسیلا پنومونیه از نمونه های بالینی در بهار و تابستان سال ۱۴۰۰ از آزمایشگاه های تشخیص طبی شهر رشت جمع آوری شد و با انجام تست هایی مثل رنگ آمیزی گرم، بررسی منظره رشد بر روی محیط های آگار مک کانکی، EMB و TSI، تست حرکت، بررسی قابلیت تولید اوره آز، سیترا تا ز و اندول تشخیص باکتری مورد تایید قرار گرفت.^{۱۴}

شناسایی مولکولی جدایه های کلبسیلا پنومونیه

جهت شناسایی مولکولی و تایید تشخیص کلبسیلا پنومونیه از یک جفت پرایمر اختصاصی ژن phoE استفاده شد (طراحی شده توسط نرم افزار 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 میلی لیتری حل و به مدت ۲۰ ساعت گرمخانه گذاری شد. بعد میکروتیوپ ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس مایع رویی دور ریخته شد و رسوب در ۵۰۰ میکرولیتر آب

مقطر به حالت سوسپانسیون درآمد. برای لیز سلول‌ها سوسپانسیون حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای 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 ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی ۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۵۹ درجه ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۴۵ ثانیه بود. سپس یک مرحله ده دقیقه‌ای طولیل 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

به منظور 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 ۱۸-۲۴ ساعته باکتری با کدورت معادل نیم مک فارلند، بر روی محیط آگار مولر هیتون کشت چمنی داده شد. سپس

دیسک آنتی‌بیوتیک‌های (پادتن طب، ایران) ایمپینم (۱۰)، آمیکاسین (۱۰)، سفوکسیتین (۳۰)، آمپی‌سیلین (۱۰)، سفوتاکسیم (۳۰)، انروفلوکساسین (۵)، آزترونام (۳۰)، سفازولین (۳۰)، سفنازیدیم (۳۰)، جنتامایسین (۱۰)، مروینم (۱۰)، کلیستین (۱۰)، نالیدیکسیک اسید (۳۰)، آمپی‌سیلین-سلولباکتام (۲۰)، سیپروفلوکساسین (۵)، پپراسیلین-تازوباکتام (۱۱۰) به فاصله ۲ سانتی‌متر از همدیگر بر روی کشت‌های میکروبی قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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_{CITM}*، *bla_{DHAM}*، *bla_{FOXm}* به روش PCR انجام شد. جهت تکثیر این ژن‌ها از پرایمرهای اختصاصی که در جدول ۱ آمده است، استفاده شد.^{۱۴} 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	۴۱۳	CGACCTACCGCAACACCGACT CGA- CAGCACATAGCCGAGGGAC	<i>phoE</i> -F <i>phoE</i> -R
(۱۴)	۴۶۲	TGCCCAGAACTGACAGGCAAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	<i>blaCITM</i> -F <i>blaCITM</i> -R
(۱۴)	۱۹۰	AACATGGGGTATCAGGGAGATG CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	<i>blaFOXm</i> -F <i>blaFOXm</i> -R
(۱۴)	۴۰۵	AACTTTCACAGGTGTGCTGGG TCCGTACGCATACTGGCTTTGC	<i>blaDHAM</i> -F <i>blaDHAM</i> -R

از دیسک استفاده شد. برای این منظور ابتدا محیط کشت مولر هیتون آگار آماده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با کدورت ۰/۵ مک فارلند به صورت چمنی و پر روی محیط مولر هیتون آگار کشت شد. بعد از کشت، دیسکهای آغشته به ۱۰۰ میکروگرم تیمول به کشت منتقل شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد

بررسی اثر مهارتی 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. به منظور بررسی اثر ضد میکروبی تیمول بر جدایه‌های منتخب کلبسیلا پنومونیه از روش انتشار

حاوی CCCP^۱ 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 این تعداد ۴۶ جدایه (۷۶٪ درصد) دارای مقاومت چندگانه دارویی بودند. بیشترین میزان حساسیت جدایه‌ها به کلیستین (۸۳٪ درصد) و پس از آن نسبت به ایمی‌پنم (۶۰٪ درصد) بود. ۸۵ درصد جدایه‌ها به سفازولین و ۷۶ درصد آن‌ها به سفتازیدیم مقاوم بودند. همچنین بیش از ۵۰ درصد جدایه‌ها نسبت به بتالاکتام‌های ترکیبی مانند پیراسیلین-تازوباکتام و آمپی‌سیلین-سولباکتام مقاومت نشان دادند. نتایج درصد مقاومت و حساسیت و حساسیت 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٪)	۰ (۰٪)	۲۸ (۴۶٪)
جنتاماسین	۳۰ (۵۰٪)	۲ (۳٪)	۲۸ (۴۶٪)
ایمی‌پنم	۱۹ (۳۱٪)	۵ (۸٪)	۳۶ (۶۰٪)
سفتازیدیم	۴۶ (۷۶٪)	۶ (۱۰٪)	۸ (۱۳٪)
سفوناکسیم	۳۹ (۶۵٪)	۷ (۱۱٪)	۱۴ (۲۳٪)
آمپی‌سیلین	۳۶ (۶۰٪)	۵ (۸٪)	۱۹ (۳۱٪)
آزترونام	۴۵ (۷۵٪)	۵ (۸٪)	۱۰ (۱۶٪)
سیپروفلوکساسین	۴۲ (۷۰٪)	۴ (۶٪)	۱۶ (۲۶٪)
کلیستین	۳ (۵٪)	۷ (۱۱٪)	۵۰ (۸۳٪)
انزوفلوکساسین	۳۸ (۶۳٪)	۵ (۸٪)	۱۷ (۲۸٪)
نالیدیکسیک اسید	۴۱ (۶۸٪)	۴ (۶٪)	۱۵ (۲۵٪)
مروپنم	۳۵ (۵۸٪)	۷ (۱۱٪)	۱۸ (۳۰٪)
سفوکسیتین	۴۲ (۷۰٪)	۵ (۸٪)	۱۳ (۲۱٪)
سفازولین	۵۱ (۸۵٪)	۲ (۳٪)	۷ (۱۱٪)
پیراسیلین-تازوباکتام	۳۱ (۵۱٪)	۶ (۱۰٪)	۲۳ (۳۸٪)
آمپی‌سیلین-سولباکتام	۳۱ (۵۱٪)	۲ (۳٪)	۲۷ (۴۵٪)

2 Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone

گرمخانه 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 برات میکرودايلوشن

کم‌ترین غلظت مهارکننده رشد تیمول به روش برات میکرودايلوشن 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 هیتون برات 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)^۱ 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 مدت ۲۴ 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.^{۱۰}

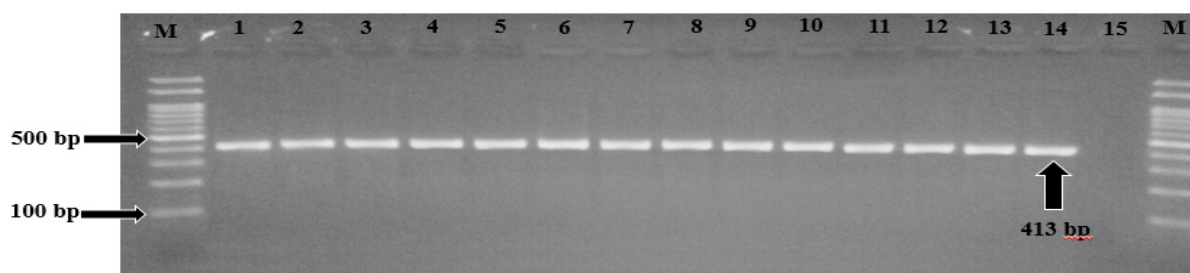
بررسی اثر ضد افلاکسی تیمول

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 مهارى تیمول بصورت یک خط از مرکز به سمت کنار (چرخ درشکه‌ای) کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ 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

1 Cartwheel Method

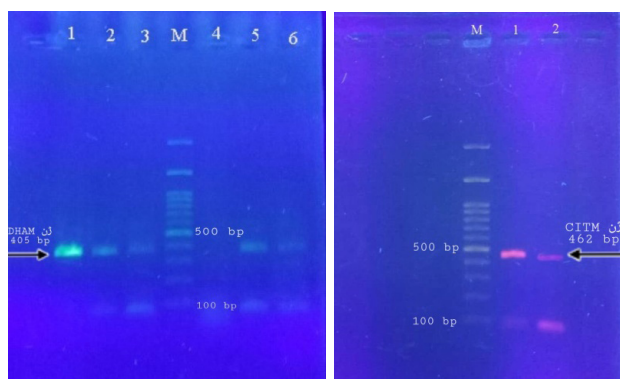
سفوتاکسیم و سفنازیدیم که از نظر تولید ESBL منفی بودند، مولد بالقوه AmpC در نظر گرفته شدند. تولید AmpC در ۲۲ جدایه (۳۶/۶۶ درصد) در روش استفاده از دیسک ترکیبی سفوکسیتین + EDTA، با ایجاد قطر هاله بزرگتر مساوی ۵ میلی متر در دیسک ترکیبی در مقایسه با آنتی بیوتیک تنها، تایید شد (شکل های ۲ و ۳).

از ۴۶ جدایه مقاوم به سفوتاکسیم و سفنازیدیم (۸۳/۳۳ درصد) جدایه در روش دیسک ترکیبی حاوی کلاوولانیک اسید با ایجاد قطر هاله بزرگتر مساوی ۵ میلی متر در دیسک ترکیبی در مقایسه با آنتی بیوتیک تنها، مولد ESBL در نظر گرفته شدند. همچنین در بررسی فنوتیپی، ۴۲ جدایه مقاوم به سفوکسین با قطر هاله کم تر از ۱۴ میلی متر و ۲۳ جدایه مقاوم به



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن *phoE* کلبسیلا پنومونیه بر روی ژل آگار ۱٪. طول قطعه تکثیر شده ۴۱۳ جفت باز می باشد. چاهک شماره ۱۵: کنترل منفی؛ M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی.

و DHAM با وزن تقریبی ۴۶۲ و ۴۰۵ جفت باز شناسایی شدند (شکل ۴). در هیچ کدام از جدایه های مورد بررسی ژن *blaFOX* شناسایی نشد و ۴ جدایه هم زمان واجد هر دو ژن CITM و DHAM بود. همچنین از بررسی حضور ژن های کدکننده آنزیم AmpC در جدایه های مولد ESBL، در ۲ جدایه، ژن CITM و در ۱ جدایه DHAM شناسایی شد.

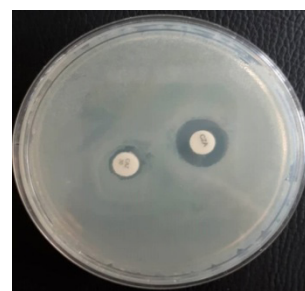


شکل ۴. الکتروفورز محصول PCR ژن های بتالاکتاماز AmpC. سمت راست: ستون DNA M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون های ۱ و ۲ محصول PCR ژن CITM. سمت چپ: ستون DNA M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون های ۱-۳ و ۵ و ۶ محصول PCR ژن *blaDHAM*.

نتایج حاصل از بررسی اثر مهارتی تیمول بر رشد و افلاکس جدایه ها در روش انتشار از دیسک تیمول بر رشد همه جدایه های مورد بررسی اثر مهارتی نشان داد. قطر هاله عدم رشد در جدایه های مورد مطالعه بین ۱۳-۳۶ میلی متر متغیر بود (شکل ۵). در روش پراث میکروداپلوشن،

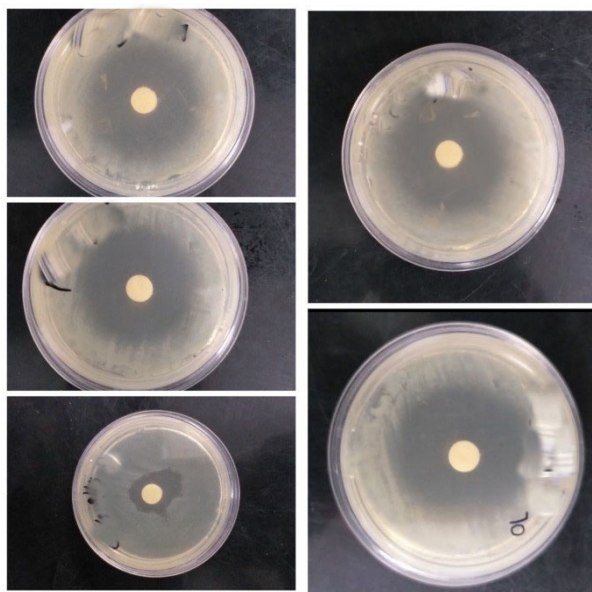


شکل ۲. نتایج شناسایی فنوتیپی جدایه های کلبسیلا پنومونیه مولد AmpC. تفاوت قطر هاله عدم رشد بزرگتر مساوی ۵ میلی متر بین دیسک سفوکسیتین و سفوکسیتین + EDTA



شکل ۳. نتایج شناسایی فنوتیپی جدایه های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL. تفاوت قطر هاله عدم رشد بزرگتر مساوی ۵ میلی متر بین دیسک سفنازیدیم و سفنازیدیم + کلاوولانیک اسید

در بررسی فراوانی حضور ژن های کدکننده آنزیم AmpC شامل ژن های بتالاکتاماز DHAM، CITM، FOXM در جدایه ها در واکنش PCR، از ۲۲ جدایه ای که در بررسی فنوتیپی مولد AmpC شناسایی شدند به ترتیب در ۱۲ (۲۰ درصد) و ۷ (۱/۶۶ درصد) جدایه ها، ژن های CITM



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

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 هیتون گردید بعنوان MBC در نظر گرفته شد. مقادیر MIC و MBC تیمول در جدایه های مورد مطالعه به ترتیب بین ۱۶ تا ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر و ۱۶ تا ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر متغیر بود (جدول ۳). همچنین نتایج تست کارت ویل نشان دهنده اثر ضد افلاکسی غلظت های تحت مهارتی تیمول در جدایه های مورد مطالعه بود. تیمول در غلظت های ۴ تا ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر سبب مهار فعالیت پمپ افلاکس در جدایه های مورد مطالعه گردید (شکل ۶ و جدول ۳).

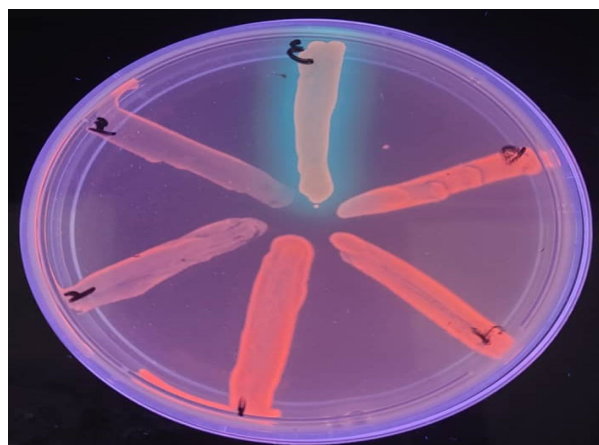
جدول ۳. نتایج بررسی اثر ضد میکروبی تیمول بر جدایه های کلبسیلا پنومونیه

شماره باکتری	قطر هاله عدم رشد (mm)	MIC (میکروگرم بر میلی لیتر)	MBC (میکروگرم بر میلی لیتر)	مهار افلاکس (میکروگرم بر میلی لیتر)
۱	۳۱	۱۶	۳۲	۴
۲	۲۰	۳۲	۳۲	۸
۳	۳۶	۱۶	۱۶	۸
۴	۳۱	۳۲	۳۲	۱۶
۵	۳۴	۱۶	۳۲	۴
۶	۲۵	۱۶	۳۲	۴
۷	۲۰	۳۲	۶۴	۱۶
۸	۱۳	۶۴	۱۲۸	۳۲
۹	۳۱	۱۶	۳۲	۸
۱۰	۳۲	۱۶	۳۲	۴

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 ۲۰۰۷ در شهر تهران انجام دادند، به ترتیب ۳۱ و ۳۲ درصد جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم و سفوتاکسیم مقاوم بودند ۱۸. در مطالعه‌ای که توسط نجار پیرایه و همکاران در تهران بر روی ۸۵ نمونه بالینی کلبسیلا پنومونیه انجام گرفت میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم و سفیپیم ۵/۵۶ گزارش شد ۱۹. مقایسه میزان مقاومت در این مطالعات نشان می‌دهد که به مرور زمان، میزان مقاومت به سفالوسپورین‌ها در باکتری‌ها افزایش یافته است. در مطالعه حاضر، ۷۰ درصد از جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه، مقاوم به سفوکسیتین بودند. همه جدایه‌های مقاوم به سفوکسیتین، تولیدکننده 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 غیر آنزیمی مثل اصلاح پورین یا سایر مکانیسم‌های آنزیمی مثل تولید ESBLs و متالو بتالاکتاماز هم نقش دارند ۲۰.

در مطالعه‌ای که هاگمن و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در کشور غنا بر روی ۴۰۰ جدایه باکتری انجام دادند، ۵۰ نمونه مقاوم به سفوکسیتین بودند. از این میان، ۵ جدایه (۱۰٪) تولیدکننده بتالاکتاماز AmpC بودند به عبارت دیگر ۵ (۱/۳٪) ایزوله از ۴۰۰ ایزوله تولید بتالاکتاماز AmpC کرده‌اند ۲۱. در مطالعات محققان ایرانی نیز نتایج متفاوتی به دست آمده است. در پژوهشی که توسط سلطان دلال و همکاران صورت گرفته است، ۱۳ جدایه مقاوم که مولد AmpC بودند، شناسایی شدند که از آن میان ۱۰/۲٪ درصد واجد ژن CITM بتالاکتاماز نوع AmpC بودند ولی ژن blaFOXm را در هیچ ایزوله‌ای شناسایی نکردند ۲۲.

در مطالعه قناتی و همکاران، از ۱۰۲ جدایه کلبسیلا پنومونیه ۱۹/۶ درصد از جدایه‌ها به عنوان تولیدکننده AmpC و ۴۳/۱ درصد از جدایه‌های مقاوم به سفوکسیتین دارای حداقل یکی از ژن‌های AmpC از جمله CITM (۲۲/۵ درصد)، EBCM (۲۱/۵ درصد)، DHAM (۷/۸ درصد)، و FOXm (۰/۹۸ درصد) بودند. همسو با نتایج پژوهش حاضر، ۵/۸ درصد از جدایه‌ها همزمان دارای دو ژن AmpC بودند ۲۳. فراوانی ژن‌های تولیدکننده AmpC نیز در طول زمان در جدایه‌های گزارش شده



شکل ۶- بررسی اثر ضد افلاکسی تیمول در باکتری‌های مورد مطالعه. در محیط کشت حاوی ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمول، میزان فلورسنت در خط کشت نشانه تجمع اتیدوم 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 کدکننده 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 ۱۷، ۲۴.

در این تحقیق، جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه بیش‌ترین حساسیت را به آنتی‌بیوتیک‌های کلبسیتین و پس از آن ایمی‌پنم داشتند. در این مطالعه مقاومت به سفالوسپورین‌ها از جمله سفنازیدیم، سفوتاکسیم به ترتیب، ۶/۷۶ درصد و ۶۵ درصد بود. همچنین در مطالعه حاضر ۲۲ جدایه (۳۶/۳۶ درصد) از نظر فنوتیپی مولد AmpC و ۲۳ (۳۸/۳۳ 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 ۲۲ جدایه‌ای که در بررسی فنوتیپی مولد AmpC شناسایی شدند، به ترتیب در ۱۲ (۲۰ درصد) و ۷ (۱۱/۶۶ درصد) جدایه‌ها، ژن‌های CITM و DHAM شناسایی شدند. در هیچ کدام از جدایه‌های مورد بررسی ژن FOXm شناسایی نشد و ۴ جدایه هم زمان واجد هر دو ژن CITM و DHAM بود. علت اصلی مقاومت به سفالوسپورین‌ها،

فراوانی قابل توجه سویه های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده ESBL در ایران گزارش شده است. به نظر می رسد شیوع باکتری های گرم منفی مولد ESBL در کشور در حال افزایش است. از آنجا که در سال های اخیر مقاومت به آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت ها افزایش پیدا کرده است، نیاز به منابع و راهکارهای جدید برای مقابله با عفونت ها و باکتری های بیماری زا احساس می شود. در این مطالعه بیش از ۷۰ درصد جدایه های کلبسیلا پنومونیه دارای فنوتیپ MDR بودند. با توجه به اهمیت پمپ های افلاکس به عنوان یکی از اصلی ترین مکانیسم های مقاومت چند دارویی، در این مطالعه، بررسی اثر تیمول بر مهار رشد و پمپ افلاکس در جدایه های کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتاماز و با مقاومت چندگانه دارویی بررسی گردید. تیمول بر همه جدایه های MDR مورد مطالعه اثر مهارتی نشان داد. میانگین قطر هاله عدم رشد جدایه های کلبسیلا پنومونیه ۲۷/۳ میلی متر بود. کم ترین غلظت مهار کننده رشد (MIC) تیمول در جدایه های مورد بررسی بین ۱۶ تا ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر متغیر بود.

اگرچه مشخص نیست که ترکیبات گیاهی چگونه مقاومت آنتی بیوتیکی را در باکتری کاهش می دهند، اما چندین مکانیسم های بالقوه در این زمینه پیشنهاد می شود. از آنجایی که اسانس های گیاهی و اجزای آنها ماهیتی آبگریز دارند، در درجه اول غشای پلاسمایی باکتری حاوی لیپید را هدف قرار می دهند و غشا را نفوذپذیرتر می کنند. این تغییر در نفوذپذیری غشای پلاسمایی باکتری که توسط مولکول های گیاهی ایجاد می شود، می تواند باعث افزایش جذب آنتی بیوتیک ها توسط سلول های باکتریایی شود. توضیح قابل قبول دیگر این است که مولکول های گیاه پس از ورود به سلول باکتری، پمپ های خروجی را که مسئول کاهش غلظت آنتی بیوتیک در سلول هستند، مهار می کنند.^{۳۱}

در مطالعه حاضر نتایج تست کارت ویل نشان دهنده اثر ضد افلاکسی غلظت های تحت مهارتی تیمول در جدایه های مورد مطالعه بود. با این خاصیت، تیمول می تواند با جلوگیری از افلاکس آنتی بیوتیک ها و سایر مواد ضد میکروبی از باکتری ها، سبب تجمع این مواد در سلول باکتری و کاهش غلظت موثر آن ها در درمان بیماری های عفونی گردد. خاصیت ضد افلاکسی تیمول در مطالعات دیگر نیز نشان داده شده است. در مطالعه شریفی و محمدزاده (۱۳۹۴) اثر اسانس آویشن دانی بر روی مهار پمپ NorA باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تایید شد.^{۳۲} نتایج مطالعه باریوسا و همکاران (۲۰۲۱) نیز نشان داد که کارواکرول و تیمول

از مناطق مختلف در ایران نیز روند افزایشی داشته است. طبق مطالعه عظیمی و همکاران در سال ۲۰۱۳ در ایران، شیوع بتالاکتاماز AmpC در بین جدایه های بالینی کلبسیلا پنومونیه ۱/۶ درصد گزارش شد.^{۲۴} جاپنی نژاد و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که ۱۹ درصد از جدایه های بالینی کلبسیلا پنومونیه دارای ژن AmpC هستند. از این تعداد، ۴۲/۲ درصد دارای ژن CITM و ۳۷/۸ درصد دارای 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 جدایه های مقاوم به سفوتاکسیم/سفتازیدیم ۸۶/۹ درصد جدایه ها تولید کننده ESBL و ۱۷/۳ درصد تولید کننده pAmpC بودند و فراوانی بالای از ژن CTX-M در این جدایه ها گزارش گردید.^{۲۶} در مطالعه کاظمیان و همکاران در سال ۲۰۱۹، از ۹۰ جدایه کلبسیلا پنومونیه ۴۰ درصد تولید کننده ESBL و ۲۰ درصد تولید کننده AmpC بودند.^{۲۷} در کشور کره، سانگ و همکاران نشان دادند که DHA-۱ (۶۶/۶ درصد) و پس از آن CMY-۲ (۲۰ درصد) شایع ترین نوع بتالاکتاماز AmpC بودند.^{۲۸} در مطالعه لی و همکاران در چین، ۹۶/۷ درصد و ۳/۳ درصد از جدایه های کلبسیلا پنومونیه به ترتیب دارای ژن های DHA-۱ و CMY-۲ بودند.^{۲۹} این میزان شیوع گزارش شده کمتر از یافته های مطالعه حاضر است. به نظر می رسد استفاده گسترده و مکرر از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف بویژه استفاده گسترده از سفالوسپورین ها منجر به پیدایش جدایه های مقاوم گردیده است.

در مطالعه حاضر از بررسی حضور ژن های کدکننده آنزیم AmpC در جدایه های مولد ESBL، به ترتیب در ۲ و ۱ جدایه، ژن های CITM و DHAM شناسایی شد. در مطالعات پیشین نیز حضور ژن های کدکننده AmpC جدایه های مولد ESBL گزارش گردید. در مطالعه سلیمیان ریزی و همکاران در سال ۲۰۲۰، از بین ۳۳۶ سویه مولد ESBL، ۶/۴ درصد مقاوم به سفوکسیتین بودند و ۳۰ درصد جدایه های مقاوم به سفوکسیتین به طور همزمان فنوتیپ مولد ESBL و AmpC را نشان دادند و CMY (۳۸ درصد) شایع ترین ژنوتیپ AmpC با واسطه پلاسمید بود و پس از آن FOX (۲۹ درصد) و فراوانی ۶ DHA درصد بود.^{۳۰}

در مجموع در سال های اخیر شیوع کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سفوکسیتین در سراسر جهان افزایش یافته است که نشان دهنده گسترش جدایه های تولید کننده بتالاکتاماز AmpC با واسطه پلاسمید است. همچنین

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 منافی وجود ندارد.

حمایت مالی

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

مشارکت نویسندگان

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

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 پلاسמיד حاوی ژن‌های تولید کننده AmpC را در بین جدایه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه در گیلان تایید می‌کند. ظهور و گسترش چنین ارگانسیم‌های قابل انتقالی در مراکز پزشکی لزوم کنترل موثر عفونت ناشی از این باکتری‌ها، انجام اقدامات برای جلوگیری از گسترش بیشتر این ارگانسیم‌های 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.

References

- Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. Drug Resist Update 2006;9:142–56.
- RH-P Dhillon, Clark J. ESBLs: a clear and present danger? Crit Care Res Pract. 2012;2012:625170.
- 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.
- 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.
- Sarojamma V, Ramakrishna V. Prevalence of ESBL-producing Klebsiella pneumoniae isolates in tertiary care hospital. ISRN Microbiol. 2011;318348.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(3): 969–76.
- 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.
- 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).
- 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.
- 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.
- 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.

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 Moraes 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, Chegane 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 *Experimental 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, Mollaaghamirzaie H, Rastegarlar 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-Sarollahil, 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, Sepahi AA, Kafil HS. Prevalence of AmpC and Extended-Spectrum Beta-Lactamase Genes in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolates. *Iranian*

- 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 Moraes 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.

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 disk 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: l.asadpour@yahoo.com
asadpour@iaursht.ac.ir