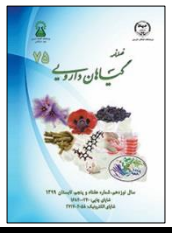
فصلنامه گیاهان دارویی ۱۳۹۹؛ ۱۹(۷۵): ۲۹۱-۳۰۴

فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: www.jmp.ir

پژوهشکده گیاهان دارویی
جهاد دانشگاهی



مقاله تحقیقاتی

تأثیر عصاره گیاه شوید کوهی بر بیان ژن پمپ افلاکس *oqxA* در سویه‌های بالینی مقاوم به آنتی‌بیوتیک کلبسیلا پنومونیه با استفاده از روش Real Time PCR

فائزه محمدپور بی‌شک[۱]، فاطمه اشرفی[۱،*]، سهیلا مرادی بیدهندی[۱]، امیر میرزایی[۲]، حسن نوربازرگان[۳،*]

[۱] گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

[۳] گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

گل‌واژگان:
شوید کوهی
کلبسیلا پنومنیه
پمپ افلاکس
ژن *oqxA*

چکیده

مقدمه: کلبسیلا پنومونیه به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی بویژه عفونت زخم‌ها پس از جراحی مطرح می‌باشد. یکی از مکانیسم‌های مقاومت این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها مخصوصاً سیپروفلوکساسین، وجود پمپ‌های افلاکس می‌باشد. **هدف:** بررسی تأثیر عصاره گیاه شوید کوهی (*Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn.) بر روی بیان ژن پمپ افلاکس *oqxA* در سویه‌های بالینی مقاوم به آنتی‌بیوتیک کلبسیلا پنومونیه می‌باشد. **روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، نمونه‌های بالینی از بیمارستان‌های شهر تهران جمع‌آوری شد و ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جداسازی شد و به دنبال آن سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین و حاوی ژن پمپ افلاکس *oqxA* با روش PCR شناسایی شد. در انتها، میزان بیان ژن پمپ افلاکس *oqxA* در سویه‌های تیمار شده با عصاره گیاه شوید کوهی با روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج:** در این مطالعه، تعداد ۵۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جداسازی شد و نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که ۷۰ درصد (۳۵ نمونه) مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند و ژن *oqxA* در ۴۳ درصد (۱۵ نمونه) از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم مشاهده شد. نتایج Real Time PCR نشان داد که بیان ژن *oqxA* در سویه‌های تیمار شده با عصاره کاهش بیان معنی‌داری داشتند. **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره گیاه شوید کوهی باعث مهار بیان پمپ افلاکس در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه می‌شود و با مطالعات بیشتر می‌توان از عصاره این گیاه به عنوان کاندید دارو استفاده نمود.

مخففها: MIC، حداقل غلظت مهارکننده رشد؛ MDR، مقاوم به چند دارو؛ CCCP، کرونیل سیانید کلروفنیل هیدرازین.

* نویسنده مسؤول: F_ashrafi@iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۲۰ تیر ۱۳۹۸؛ **تاریخ دریافت اصلاحات:** ۱۳ آذر ۱۳۹۸؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۶ آذر ۱۳۹۸

doi: 10.29252/jmp.19.75.291

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

۱. مقدمه

کلبسیلا پنومونیه، باکتری گرم منفی و عامل پنومونی، سپسیس، عفونت‌های دستگاه ادراری و یکی از مهم‌ترین عوامل شناسایی شده در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی است. قابلیت باکتری کلبسیلا پنومونیه در ایجاد بیماری به علت کاسته شدن دفاع میزبان در نتیجه اعمال جراحی پیچیده و طولانی و نیز مصرف داروهای متفاوت رو به ازدیاد می‌باشد و از آن جایی که باکتری کلبسیلا پنومونیه در افراد با ضعف سیستم ایمنی بیماری ایجاد می‌کند [۱]. بنابراین افزایش میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در این باکتری می تواند تهدید جدی به حساب آید [۲]. با توجه به اهمیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عفونت‌های بیمارستانی به عنوان یک مشکل جدی برای بخش سلامت کشور مطرح بوده است و بیماران را در بیمارستان‌های سراسر جهان تحت تأثیر قرار می‌دهد و سالانه قربانی‌های زیادی را به خود اختصاص داده است و هزینه‌های درمانی فراوانی بر کشور تحمیل می‌کند [۳]. در مطالعه‌ای در کشور چین طی سال های ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۲، میزان حساسیت به ایمی پنم در کلبسیلا ۹۴ تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است [۴]. با وجود این، در سال‌های اخیر، چندین گزارش از پیشرفت مقاومت به ایمی پنم در پاتوژن‌های گرم منفی وجود داشته است، اما در مورد نحوه انتشار و منبع این باکتری‌ها در عفونت‌های بیمارستانی اطلاعات زیادی وجود ندارد [۵]. تولید آنتی بیوتیک‌های جدید و استفاده بی‌رویه از آنها در درمان بیماری‌های باکتریایی باعث ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی با مکانیسم‌های متفاوت شده است [۶]. در حال حاضر، سیپروفلوکساسین شایع‌ترین فلوروکینولون برای تجویز دارویی است و در سال‌های اخیر، شیوع مقاومت به فلوروکینولون‌ها در باکتری‌های گرم منفی بویژه کلبسیلا پنومونیه به طور چشمگیری افزایش یافته است [۷]. در بین کینولون‌ها، سیپروفلوکساسین دارای بیشترین تأثیر به عنوان آنتی‌بیوتیک نسل دوم روی باکتری‌های گرم منفی و مثبت است و به این ترتیب، مقاومت نسبت به این عوامل باعث نگرانی‌هایی در انتخاب درمان مناسب می‌شود. مطالعات انجام شده در نقاط مختلف جهان نتایج متفاوتی از مقاومت به سیپروفلوکساسین را نشان داده‌اند؛ به طوری که در مطالعه Paterson و همکاران د بر روی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه ایزوله شده از بیماران مبتلا به باکتریمی، ۵/۵ درصد ایزوله‌های ایجادکننده باکتریمی، مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند [۸].

به طور کلی مکانیسم‌های مختلفی جهت مقاوم شدن سویه‌های کلبسیلا پنومونیه به سیپروفلوکساسین وجود دارد که یکی از مکانیسم‌ها ممانعت از تجمع دارو درون سلول بوسیله سیستم‌های افلاکس می‌باشد [۹]. پمپ‌های افلاکس مواد سمی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها را به محیط خارج پمپ می‌کنند و دارا بودن پمپ‌های افلاکس یکی از توانایی‌های این باکتری برای مقاوم شدن به آنتی‌بیوتیک‌ها است [۱۰]. به طور کلی پمپ‌های افلاکس باکتریایی بر اساس ترادف و شباهت اسیدهای آمینه در پنج گروه اصلی قرار می‌گیرند و پمپ‌های افلاکس از نظر بالینی به طور مؤثری در ارتباط با گروه‌های پمپ افلاکس Nodulation Division (RND) می‌باشند که با آزادسازی انرژی نیرو محرکه پروتون در خارج کردن آنتی‌بیوتیک نقش دارند [۱۱]. از میان پمپ‌های دفعی متعلق به خانواده RND می‌توان به پمپ افلاکس *oqxA* اشاره کرد که وجود آن در کلبسیلا پنومونیه گزارش شده است [۱۲]. این پمپ‌ها عامل ایجاد مقاومت در برابر فلوروکینولون‌ها و بیوسایدهایی از قبیل تریکلوسان، کلروهگزیدین و اتیدیوم بروماید هستند [۱۳]. همچنین افزایش تحمل در برابر SDS (سدیم دودسیل سولفات) که در بسیاری از موادشیمیایی خانگی مثل شامپو و خمیردندان وجود دارد، در سویه‌های حاوی پمپ افلاکس *oqxA* گزارش شده است [۱۴]. این پمپ افلاکس، از پمپ‌های

اصلی ایجاد کننده مقاومت ذاتی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه علیه فلوروکینولون‌ها بویژه سیپروفلوکساسین است [۱۵]. این پمپ علاوه بر مقاومت به کینولون‌ها سبب مقاومت به کلرامفنیکل، تتراسایکلین تری‌متوپریم، بتالاکتام‌ها و ماکرولیدها هم می‌شود [۱۶]. در نتیجه فلوروکینولون‌ها که به نظر می‌آید انتخابی مناسب در درمان عفونت‌های ناشی از کلبسیلا پنومونیه باشد اما در گزارش‌های بسیاری، افزایش مقاومت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های فوق گزارش شده است [۱۷]. این مسئله مشکلات جدی در درمان انسان‌ها به وجود آورده و انتخاب‌های درمانی را محدود کرده است. یکی از روش‌های تشخیص فعالیت پمپ‌های مختلف در باکتری‌ها استفاده از مهارکننده‌ها است، به این صورت که در حضور مهارکننده، فعالیت پمپ متوقف می‌شود و درنتیجه باعث کاهش MIC آنتی‌بیوتیک مدنظر در باکتری مورد مطالعه می‌شود [۱۸]. تاکنون از مواد شیمیایی مانند کرونیل سیانید کلروفنیل هیدرازین (CCCP) جهت مهار پمپ افلاکس استفاده می‌کردند که بر روی فسفوریلاسیون اکسیداتیو و شیب گرادیانتی نیرو محرکه پروتون غشا اثر گذاشته و باعث مهار پمپ افلاکسی شود [۱۹]. همچنین اخیراً عصاره‌های گیاهی یکی از انتخاب‌های محققین جهت بررسی اثرات ضدپمپ افلاکسی می‌باشد [۲۰].

در این مطالعه، برای اولین بار، شوید کوهی با نام علمی (*Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn.) به عنوان عامل مهارکننده پمپ افلاکس مورد مطالعه قرار گرفت. این گیاه جزء خانواده *Apiaceae* می‌باشد و از خواص دارویی این گیاه می‌توان به درمان سرماخوردگی و سینه پهلو، مرهم زخم‌ها، آرامش اعصاب، درمان ناراحتی معده و باد شکم اشاره کرد [۲۱]. با توجه به اثرات درمانی این گیاه، هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضدپمپ افلاکسی عصاره گیاه شوید کوهی بر روی ایزوله‌های بالینی مقاوم به آنتی‌بیوتیک کلبسیلا پنومونیه می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. جمع‌آوری و تشخیص سویه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه

در این مطالعه تجربی، ابتدا تعداد ۲۰۰ نمونه بالینی شامل ادرار، تراشه، خون و زخم از بخش‌های مختلف بیمارستان‌های شهر تهران جمع‌آوری شد. نمونه‌های بالینی بر روی دو محیط پایه بلاد آگار و مک کانگی آگار کشت داده شده و پس از رشد مجدداً پاساژ داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، توسط آزمایش‌های میکروب‌شناسی و بیوشیمیایی، ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی و تشخیص قرار گرفتند. بعد از تهیه لام و مشاهده باسیل‌های گرم منفی، آزمون‌های بیوشیمیایی معمول نظیر کشت در محیط لیزین دکربوکسیلاز، SIM، TSI، MRVP، اوره، سیترات و تست اکسیداز برای تأیید کلبسیلا پنومونیه انجام شد. سپس باکتری‌ها در محیط TSB و گلیسرول در ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام مراحل بعدی مطالعه ذخیره شدند.

۲.۲. بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها

پس از شناسایی و تأیید سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه*، به منظور شناسایی سویه‌های مقاوم به چند دارو (multidrug resistant) حساسیت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن بر اساس استاندارد (Clinical and Laboratory Standards Institute) CLSI مورد بررسی قرار گرفت، به طوری که اندازه قطر هاله‌های عدم رشد با میلی‌متر اندازه‌گیری شده و با اندازه‌های استاندارد مرجع CLSI مقایسه شد و سویه‌ها به ۲ دسته مقاوم و حساس طبقه‌بندی شدند [۲۲]. حساسیت ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفتازیدیم (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۱۰

میکروگرم)، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول (۱۰ میکروگرم)، آموکسی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم) و ایمی پنم (۲ میکروگرم) (MAST, UK) در محیط کشت Muller Hinton agar (مرک، آلمان) بررسی شد.

۳.۲. استخراج DNA و بررسی وجود ژن پمپ افلاکس oqxA

استخراج DNA به روش فنل – کلروفرم انجام شد. به طور خلاصه، به رسوب تهیه شده از کشت سویه مدنظر، به ترتیب ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز (Tris-Hcl, pH7.4; EDTA 50 mM، ۱۳ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات (SDS 25%)، ۳ میکرولیتر پروتئیناز K (20 mg/ml) اضافه نموده و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. به دنبال آن ۶۰۰ میکرولیتر محلول فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵ تهیه شده) افزوده شده تا یک فاز شیری رنگ یکنواخت تشکیل شود. سپس با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و فاز بالایی (فاز آبی) آن به لوله‌های جدید انتقال داده شد. این مرحله دوبار تکرار شده و به منظور رسوب DNA، هم حجم فاز آبی اتانول سرد و خالص به همراه ۰/۱ میکرولیتر استات سدیم (1M) اضافه نموده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از آن، نمونه را سانتریفیوژ (۵ دقیقه ۱۳۰۰۰ دور) نموده و رسوب حاصله را پس از خشک کردن و حل کردن در بافر به عنوان DNA مورد استفاده قرار داده شد و درنهایت برای تأیید صحت استخراج ژنوم از الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد استفاده شد [۲۳].

به منظور شناسایی مولکولی سویه‌های باکتریایی حاوی ژن *oqxA* از PCR استفاده شد. واکنش PCR توسیط ترموسایکلر TECHNE در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل ۱۸/۴ میکرولیتر آب دیونیزه، ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10 X PCR، یک میکرولیتر بافر 50 mM MgCl2، یک میکرولیتر از 10 mM dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمرهای رفت 5 GGCAAGAGCCAAAACGCAGG 3 و برگشت 5GGGGCGTCATTTGGTG- 3 دارای غلظت 20 pmol، ۰/۱ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase و یک میکرولیتر از DNA مورد نظر انجام شد. واکنش PCR در ۳۰ سیکل به صورت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۳ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام ش PCR در ژل آگارز ۱درصد بافر (EDTA، اسیدبوریک) در ولتاژ ۹۵ برای "۴۵ الکتروفورز شدند و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و با دستگاه gel doc بررسی شدند. اندازه قطعات تکثیر شده با کمک ladder100bp (شرکت سیناکلون) مقایسه و مشخص شدند. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از توالی‌های به دست آمده از پایگاه NCBI و با استفاده از نرم‌افزارهای Generunner و Oligo7 طراحی شدند و در انتها پرایمرهای طراحی شده با اطلاعات توالی نوکلئوتیدی موجود در blast Gene Bank مقایسه و تأیید شد.

۴.۲. جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری

گیاه شوید کوهی از مرکز ذخایر زیستی ایران با کد هرباریومی IBRC P1006139 تهیه و در شرایط بهینه و مناسب نگهداری شد. برای تهیه عصاره به روش ماسراسیون یا خیساندن، ابتدا میزان ۴۰ گرم از گیاه را وزن کرده و ۳۰۰ میلی‌لیتر از اتانول ۸۰ درصد را به گیاه اضافه نموده و به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه شیکر با دور RPM ۹۰ قرار داده شد. بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت از کاغذ صافی و فیلتر سر سرنگ برای فیلتر کردن استفاده شد و در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا الکل آن به طور کامل

تبخیر شود [۲۴]. عصاره سنتز شده داخل شیشه ساعت اضافه و پس از خشک شدن وزن خشک عصاره با وزن کردن به دست آمد. پس از تعیین وزن خشک عصاره در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت یا سرم فیزیولوژی حل شد و بدین‌صورت استوک مورد استفاده در این مطالعه با غلظت ۱۰۰۰ mg/ml آماده و برای آزمون‌های بعدی از این استوک غلظت‌های مورد نیاز تهیه شد.

۵.۲. تعیین حداقل غلظت مهاری *Minimum Inhibitory Concentration* (*MIC*) عصاره گیاه

آزمایش MIC بر اساس روش رقیق‌سازی در میکروپلیت (micro dilution method) عصاره برروی سویه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه انجام و عصاره در غلظت‌های ۱۵/۶ mg/ml تا ۱۰۰۰ به داخل چاهک‌ها ریخته و با محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) تا حجم ۱۹۵ میکرولیتر رسانده شد. همه چاهک‌ها با مقدار ۵ میکرولیتر از کشت میکروبی سویه‌ها با غلظت نیم مک فارلند اضافه شد. مقدار MIC به عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری محسوب می‌شود. لازم به ذکر است که جهت تعیین غلظت MIC، از چاهک حاوی باکتری فاقد عصاره به عنوان کنترل منفی و از چاهک حاوی باکتری استاندارد کلبسیلا پنومونیه ATCC 25923 و عصاره به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. به منظور حذف اثرات کدورت ناشی از عصاره، چاهک‌های حاوی محیط کشت به اضافه غلظت‌های مختلف عصاره (برای تست MIC استفاده شده است) در نظر گرفته شد [۲۵].

۶.۲. بررسی اثرات ضدپمپ افلاکسی عصاره

به منظور بررسی اثرات ضدپمپ افلاکسی عصاره گیاه شوید کوهی، از روش Real Time PCR استفاده شد. در ابتدا، جهت استخراج RNA، ابتدا سویه‌های حاوی پمپ افلاکس *oqxA* با غلظت‌های زیر حد کشندگی (SubMIC) عصاره به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. به دنبال آن، استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج بر طبق دستورالعمل انجام گرفت. به طور خلاصه ابتدا سلول‌های باکتریایی با استفاده از محلول RNX (سیناژن) سپس جهت جداسازی RNA مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط اضافه شد. نمونه‌ها در دور RPM 15000 به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای $^{\circ}C$ ۴ سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ سه فاز، آبی در بالای ویال، آلی در پایین و فاز میانی ایجاد شد. مولکول RNA در فاز آبی بالایی و پروتئین و DNA در فازهای میانی و پایینی وجود دارند، به همین دلیل برای جلوگیری از آلودگی با پروتئین و DNA، فاز شفاف بالایی به آرامی به ویال جدید منتقل شد. هم حجم فاز رویی انتقال یافته، ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد و بعد از خوب مخلوط کردن، به مدت ۱۵ دقیقه در یخ انکوبه شد. نمونه‌ها در دور RPM ۱۵۰۰۰ مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ^{o}C ۴ سانتریفیوژ شد. فاز رویی دور ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به آن اضافه شو مخلوط جهت کنده شدن رسوب از ته ویال، به مدت چند ثانیه ورتکس شد. نمونه‌ها به مدت ۸ دقیقه در دور RPM ۷۵۰۰ در دمای ^{o}C ۴ سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله پس از خشک شدن در ۳۰ میکرولیتر آب حاوی DEPC حل شده و جهت سنتز cDNA مورد استفاده گرفت.

در ادامه، سنتز cDNA با استفاده از کیت Quanti Tect Reverse Transcription kit (کیاژن، امریکا) انجام گرفت. ابتدا ۱۰ میکرولیتر RNA به همراه ۲ میکرولیتر پرایمر رندوم هگزامر، ۴ میکرولیتر بافر آنزیم RT، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر آنزیم مهارکننده RNase (۲۰ واحد)، ۱ میکرولیتر آنزیم M-MuLV RT (۲۰۰ واحد) به همراه آب مقطر دوبار تقطیر تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر اضافه شد. سپس مخلوط واکنش در دستگاه ترموسایکلر منتقل شد و به مدت ۵ دقیقه

در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. cDNA سنتز شده به عنوان الگو برای مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفت. در انتها، غلظت cDNA های استخراج شده توسط نانودراپ تعیین غلظت شدند. به منظور بررسی ارزیابی بیان ژن *oqxA* پمپ افلاکس از روش Real Time PCR کمی (qRT-PCR) با استفاده مسترمیکس حاوی سایبرگرین (Applied Biosystem، انگلستان) انجام گرفت. مواد مورد استفاده در حجم ۲۰ میکرولیتر مسترمیکس شامل ۲ میکرولیتر از cDNA، ۱۰ پیکومول از پرایمرهای رفت و برگشت، ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس حاوی سایبر گرین بود که در دستگاه ABI step one امریکا انجام گرفت برنامه دمایی مورد استفاده در qPCR شامل ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه، ۱ دقیقه دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود که در ۴۰ سیکل انجام شد. همچنین ژن *gmk* (گوانیلات کیناز) به عنوان کنترل داخلی (Housekeeping) مورد استفاده قرار گرفت [۲۴]. در انتها بیان نسبی ژن *oqxA* توسط روش $\Delta\Delta C_T$ محاسبه شد. لازم به ذکر است پرایمرهای مورد استفاده در این قسمت *oqxA* F 5/- GGCAAGAGCCAAAACGCAGG -3' و R-5'- GGGGCGTCATTTGGTG -3' *oqxA* و همچنین GMK F5'- TATCAGGACCATCTGGAGTAGG -3' و GMK-R 5'- CATCAACTTCACCTTCACGC-3' بود. برای ژن *oqxA* از ژن کنترل *gmk* برای مقایسه با میزان بیان ژن هدف برای هر ایزوله استفاده شد. سپس برای محاسبه میزان بیان ژنی و رسم نمودارهای مربوطه از نرم‌افزار Rest استفاده شد، بدین‌صورت که CT ها با نرم‌افزار مشخص و مقدار بیان ژن هدف محاسبه شد. آنالیز میزان بیان با اندازه‌گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* (ATCC 25923) انجام گرفت.

۲.۷. تجزیه و تحلیل آماری

محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد و داده‌های Real Time PCR با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و تفاوت بیان ژن‌های هدف، بین نمونه‌های کنترل و تیمار شده با روش آماری Tukey's HSD post-hoc test محاسبه شد. برای تحلیل داده‌های آنتی‌بیوگرام و MIC از آمار توصیفی (فراوانی، درصد، میانگین) استفاده شد و در بخش استنباطی ارتباط بین متغیرهای بررسی شده از طریق آزمون‌های ضریب بررسی نظیر t تست استفاده شد و $P < ۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

آنالیز داده‌های Real Time PCR بر اساس مقایسه چرخه آستانه انجام شد. در این مطالعه، اختلاف چرخه‌های آستانه به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سلول‌های تیمار شده با عصاره) و نمونه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده با عصاره) محاسبه و با استفاده از فرمول ΔΔCt، نسبت ژن‌های هدف به ژن مرجع (*gmk*) از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. که فرمول محاسبه آن به شرح زیر است:

$\Delta Ct = Ct\ target - Ct\ reference$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\ test\ sample - \Delta Ct\ control\ sample$

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

۳. نتایج

۱.۳. جداسازی و تشخیص سویه‌های کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های بالینی

در این مطالعه طی ۶ ماه، در مجموع ۲۰۰ نمونه بالینی ادرار، زخم و خون از بیمارستان‌های شهر تهران جمع‌آوری شد. با استفاده از تست‌های میکروبی رنگ‌آمیزی گرم، محیط

کشت EMB، SIM، TSI، اکسیداز و تست MRVP، ۵۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جداسازی شدند.

۲.۳. *تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی*

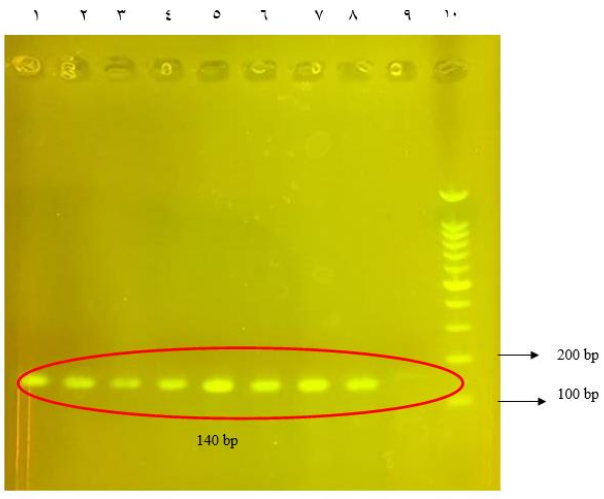
در این مطالعه ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۹۰ درصد)، جنتامایسین (۸۰ درصد)، سیپروفلوکساسین (۸۰ درصد)، تتراسایکلین و تری متوپریم (به ترتیب ۸۰ و ۷۰ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به ایمی پنم (۵۵ درصد حساس) بودند. همچنین تعداد ۱۵ سویه از میان ۵۰ سویه (۳۰ درصد) دارای مقاومت همزمان به چند دارو (MDR) بودند. میزان مقاومت سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها در جدول ۱ آمده است.

۳.۳. *نتایج تکثیر ژن oqxA*

به منظور بررسی وجود ژن پمپ افلاکس *oqxA* در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده و مقاوم به چند دارو و سیپروفلوکساسین، از پرایمرهای اختصاصی این ژن استفاده شد و وجود باند ۱۴۰ bp در ژل الکتروفورز مشاهده شد. از میان سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین تعداد ۱۵ نمونه (۴۳ درصد) دارای ژن *oqxA* بودند (شکل ۱).

جدول ۱. میزان مقاومت و حساسیت سویه‌های کلبسیلا پنومونیه به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف.

آنتی‌بیوتیک	سویه‌های مقاوم		سویه‌های حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
سفتازیدیم	۳۵	۷۰	۱۵	۳۰
سیپروفلوکساسین	۴۰	۸۰	۱۰	۲۰
تتراسایکلین	۴۰	۸۰	۱۰	۲۰
ایمی‌پنم	۲۵	۵۵	۲۵	۵۰
تری‌متوپریم	۳۵	۷۰	۱۵	۳۰
آمیکاسین	۲۹	۵۸	۲۱	۴۲
آمپی‌سیلین	۴۵	۹۰	۵	۱۰
جنتامایسین	۴۰	۸۰	۱۰	۲۰
کلرامفنیکل	۳۸	۷۶	۱۲	۲۴
کلیندامایسین	۳۵	۷۰	۱۵	۳۰



شکل ۱. نتایج تکثیر ژن *oqxA* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین. شماره ۱ تا ۸: نمونه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۹: کنترل منفی، ۱۰: مارکر DNA 100 bp

۴.۳. نتایج MIC عصاره گیاه شوید کوهی علیه سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین

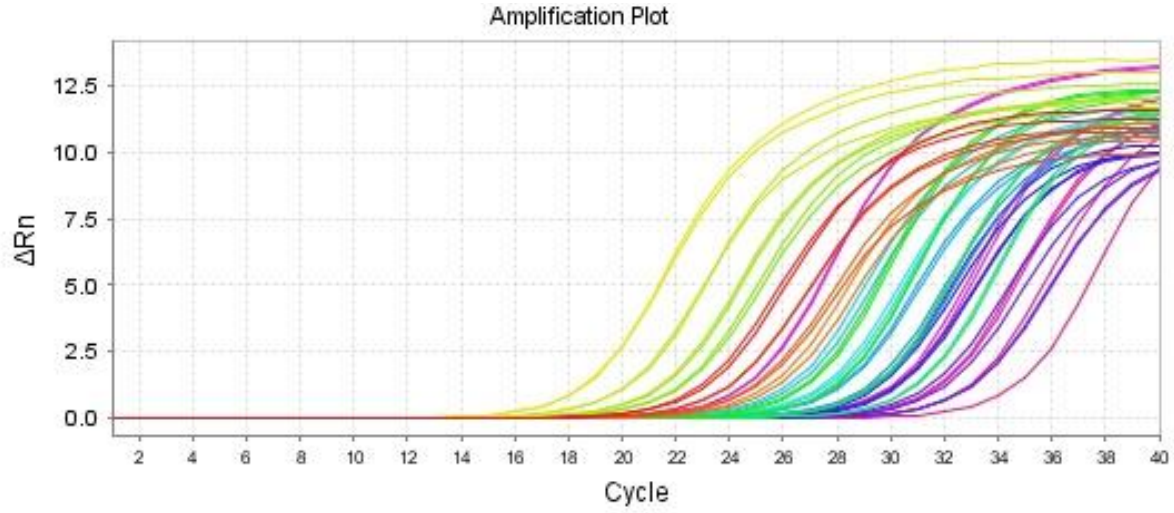
سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین کلبسیلا پنومونیه مثبت تحت تأثیر غلظت‌های ۱۵/۶–۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره گیاه در مدت زمان ۲۴ ساعت قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سویه‌های مختلف دارای محدوده‌ای از MIC ۵۰۰ mg/ml– ۳۱/۲۵ بودند و همچنین غلظت‌های زیر حد مهارکنندگی (sub-MIC) عصاره نیز تعیین شد، به طوری که غلظت subMIC یک غلظت پایین‌تر از MIC در نظر گرفته شد (جدول ۲).

۵.۳. بررسی بیان ژن oqxA در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین در غلظت‌های subMIC از عصاره

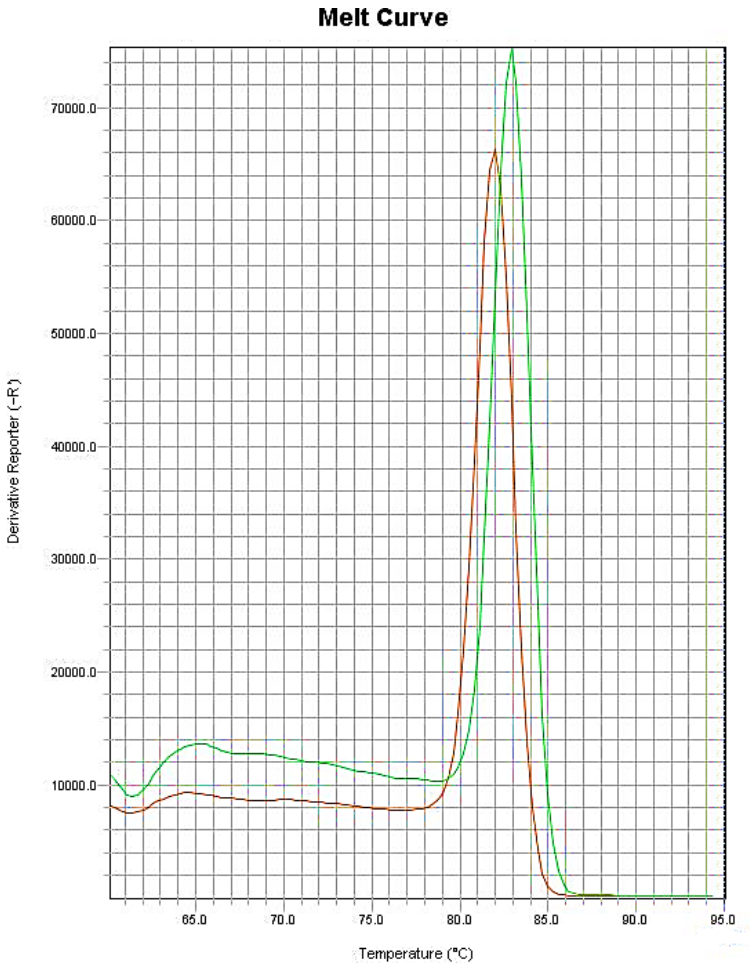
بیان نسبی ژن *oqxA*، پس از تیمار ایزوله‌های مقاوم به دارو با غلظت‌های subMIC، توسط روش Real Time PCR مورد مطالعه قرار گرفت. پس از سنتز cDNA واکنش Real Time PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *oqxA* صورت گرفت. نمودار حاصل از تکثیر ژن‌های مورد نظر در شکل ۲ نشان داده شده است. تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت شدن پرایمرها و عدم تکثیر قطعات غیراختصاصی برای هر ژن با استفاده از منحنی ذوب تعیین شد (شکل ۳). در این مطالعه میزان بیان ژن *oqxA* در سویه‌های تیمار شده با غلظت sub-MIC عصاره گیاه به طور معناداری کاهش یافته بود (شکل ۴). همچنین ارتباط معنی‌داری بین میزان MIC سویه‌ها و کاهش بیان ژن *oqxA* وجود نداشت ($P < ۰/۰۵$).

جدول ۲. نتایج MIC عصاره گیاهی در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه

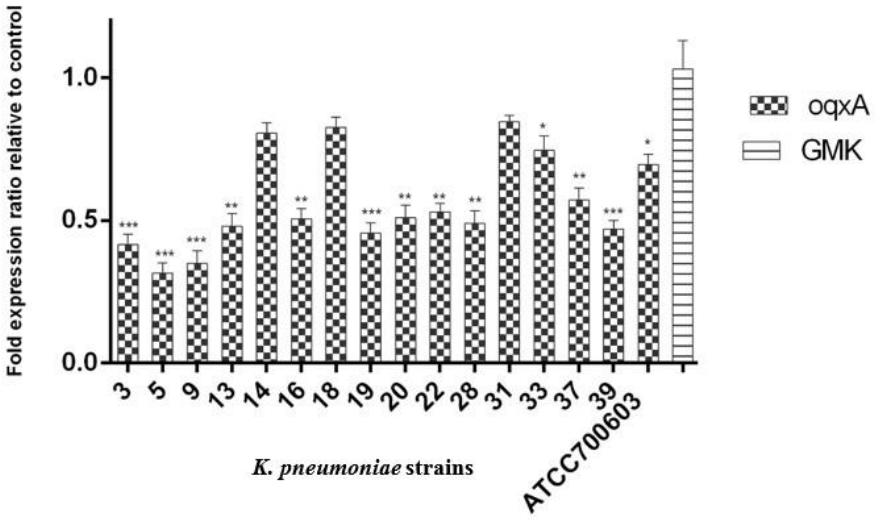
شماره سویه	MIC (mg/ml)	Sub-MIC (mg/ml)
۳	۶۲/۵ ± ۰/۰	۳۱/۲۵ ± ۰/۰
۵	۳۱/۲۵ ± ۰/۰	۱۵/۶۲ ± ۰/۰
۹	۳۱/۲۵ ± ۰/۰	۱۵/۶۲ ± ۰/۰
۱۳	۱۲۵ ± ۰/۰	۶۲/۵ ± ۰/۰
۱۴	۵۰۰ ± ۰/۰	۲۵۰ ± ۰/۰
۱۶	۲۵۰ ± ۰/۰	۱۲۵ ± ۰/۰
۱۸	۵۰۰ ± ۰/۰	۲۵۰ ± ۰/۰
۱۹	۶۲/۵ ± ۰/۰	۳۱/۲۵ ± ۰/۰
۲۰	۱۲۵ ± ۰/۰	۶۲/۵ ± ۰/۰
۲۲	۱۲۵ ± ۰/۰	۶۲/۵ ± ۰/۰
۲۸	۶۲/۵ ± ۰/۰	۳۱/۲۵ ± ۰/۰
۳۱	۲۵۰ ± ۰/۰	۱۲۵ ± ۰/۰
۳۳	۲۵۰ ± ۰/۰	۱۲۵ ± ۰/۰
۳۷	۱۲۵ ± ۰/۰	۶۲/۵ ± ۰/۰
۳۹	۶۲/۵ ± ۰/۰	۳۱/۲۵ ± ۰/۰
ATCC700603	۲۵۰ ± ۰/۰	۱۲۵ ± ۰/۰



شکل ۲. نمودار تکثیر ژن‌های *oqxA* و ژن *gmk* در سلول‌های باکتریایی تیمار شده با عصاره



شکل ۳. نمودار منحنی ذوب ژن‌های *oqxA* در دمای ۸۳/۹۱ (رنگ سبز) و ژن *gmk* در دمای ۸۲/۳۳ (رنگ قرمز).



شکل ۴. میزان بیان ژن *oqxA* در سویه‌های تیمار شده با عصاره. همانطور که مشاهده می‌شود سویه‌های مختلف دارای میزان بیان متفاوتی هستند و بیان ژن *oqxA* نسبت به ژن مرجع (*gmk*) کاهش یافته است (اعداد محور عمودی میزان بیان ژن را نشان می‌دهند (Fold expression) و اعداد محور افقی شماره سویه‌ها را نشان می‌دهد. به صورت چند برابر شدن بیان در مقایسه با ژن کنترل (*gmk*) بیان شده است. (*: P <۰/۰۵، **: P <۰/۰۱، *** P <۰/۰۰۱ :n=3).

۴. بحث

به طور کلی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه عامل عمده شکست درمان است [۲۶]. اگرچه مقاومت دارویی در باکتری‌ها، یک صفت ذاتی است اما در بسیاری از موارد نیز این پدیده در اثر فشار آنتی‌بیوتیکی ایجاد شده و بوسیله ارگانیسم‌ها کسب می‌شود [۲۷]. غشاء پیچیده باکتری‌های گرم منفی شامل کانال‌های پروتئینی متنوعی می‌باشد که در انتقال تعداد زیادی از مواد غذایی و ترکیبات سمی نقش دارند [۲۸]. در میان این انتقال دهنده‌ها، پمپ‌های افلاکس وابسته به انرژی وجود دارند و نقش مهمی در هموستازی سلول و دفع ترکیبات سمی دارند که مواد سمی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها را از درون سلول به محیط خارج پمپ می‌کنند، بنابراین باعث کاهش تجمع داخل سلولی آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند [۲۹]. پمپ افلاکس *oqxAB* از جمله مهم‌ترین پمپ‌های ترشحی هستند که باعث مقاومت کلبسیلا پنومونیه به فلوروکینولون‌ها می‌شوند، به طوری که، افزایش بیان یک این پمپ افلاکس باعث ممانعت از ایجاد تجمع داخل سلولی در حد آستانه مورد نیاز برای فعالیت آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود [۳۰]. امروزه محققان در حال جستجوی راه حل‌های جدید برای درمان باکتری‌های مقاوم به دارو هستند که یکی از این راه حل‌ها، استفاده از عصاره‌های گیاهی است [۳۱]. در این مطالعه ما برای اولین بار از عصاره گیاه شوید کوهی جهت از بین بردن سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سیپروفلوکساسین که دارای پمپ افلاکس *oqxA* بودند، استفاده شده است. در این مطالعه ابتدا سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سیپروفلوکساسین دارای پمپ افلاکس *oqxA* توسط روش PCR تعیین هویت شدند. در مرحله بعدی پس از تیمار سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با غلظت SubMIC عصاره گیاه مدنظر، به منظور بررسی اثرات ضدپمپ افلاکسی عصاره، بیان ژن پمپ افلاکس *oqxA* توسط روش Real-Time PCR هم مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد پس از تیمار سویه‌ها با غلظت Sub MIC عصاره، بیان ژن *oqxA* در مقایسه با ژن *gmk* به عنوان ژن مرجع کاهش بیان معنی‌داری داشتند که نشان‌دهنده اثرات چشم‌گیر ضدپمپ افلاکسی عصاره می‌باشد. تاکنون مطالعات مختلفی در جهت بررسی وجود ژن‌های *oqxA* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین کلبسیلا پنومونیه و همچنین بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره مختلف در سویه‌های باکتریایی بالینی به انجام رسیده است. علی هاشمی و همکاران وجود پمپ افلاکس *oqxA* را در ۱۰۰ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان شیوع ژن پمپ افلاکس *oqxA* ۵۰ درصد بود و میزان بیان ژن *oqxA* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین ۲/۳ برابر بیشتر از سویه‌های حساس به سیپروفلوکساسین بود [۳۲]. شهبازی و همکاران، میزان وجود ژن پمپ افلاکس *oqxA* را در سویه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان شیوع ژن پمپ افلامس *oqxA* در ۱۰۰ سویه بالینی کلبسیلا پنومونیه به میزان ۴۶ درصد می‌باشد [۳۳]. Mohammad Bokaeian و همکارانش در سال ۲۰۱۴ اثرات ضدمیکروبی عصاره برگ گیاه *Withania somnifera* را بر روی ایزوله‌های بالینی مقاوم به دارو کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره برگ این گیاه در غلظت‌های ppm ۲۵۰ و ppm ۶۳ خاصیت مهارکنندگی دارد. نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که عصاره گیاه شویدکوهی در غلظت‌های ۵۰۰ - ۳۱/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر علیه سویه‌های مقاوم به دارو کلبسیلا پنومونیه دارای خاصیت مهارکنندگی بوده و در اثر تیمار سویه‌ها با غلظت زیرحد مهارکنندگی عصاره بیان ژن پمپ افلامس *oqxA* کاهش معناداری نسبت به ژن مرجع داشتند [۳۴].

نقطه تشابه تمامی مطالعات صورت گرفته با مطالعه ما، میزان مشابه شیوع ژن پمپ افلاکس *oqxA* در سویه‌های بالینی مقاوم به دارو کلبسیلا پنومونیه می‌باشد که در بیشتر مطالعات شیوع بین ۴۰ تا ۵۰ درصدی را گزارش داده‌اند. همچنین بیشتر مطالعات، اثرات ضدمیکروبی و ضدافلاکسی عصاره گیاهان مختلف را نشان می‌دهد و یکی از دلایل اختلاف غلظت MIC عصاره‌های مختلف، می‌تواند به دلیل الگوی متفاوت مقاومت میکروبی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه، شرایط جغرافیایی متفاوت رشد گیاه مدنظر و همچنین ترکیبات ثانویه متفاوت در عصاره گیاه باشد.

۵. نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه بیانگر این است که عصاره گیاه شوید کوهی روی بیان ژن پمپ افلاکس *oqxA* در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه تأثیر داشته و باعث کاهش بیان این ژن می‌شود. کاهش بیان ژن *oqxA* باعث عملکرد ضعیف این پمپ‌ها شده و از تراوش زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها جلوگیری می‌شود. بنابراین می‌توان در آینده با مطالعات بیشتر از این عصاره به عنوان کاندید داروی مناسب آنتی‌باکتریال استفاده کرد و از طرفی با توجه به اهمیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مطالعه سایر پمپ‌های افلاکس، مقایسه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و ارتباط بیان پمپ‌های افلاکس پیشنهاد می‌شود.

مشارکت نویسندگان

فائزه محمدپور بی‌شک، انجام کار تحقیقاتی و آزمایشگاهی، فاطمه اشرفی، سوپروایزر، طراحی پروژه تحقیقاتی، سهیلا مرادی بیدهندی، نوشتن مقاله و ویرایش آن، امیر میرزایی، نوشتن مقاله، حسن نوربازرگان، طراحی پروژه تحقیقاتی و انجام کارهای آزمایشگاهی.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

از همکاری خانم دکتر عقیق دولت آبادی در انجام پروژه قدردانی می‌شود.

منابع

1. Vargas JM, Moreno Mochi MP, Nuñez JM, Cáceres M, Mochi S, Del Campo Moreno R and Jure MA. Virulence factors and clinical patterns of multiple-clone hypermucoviscous KPC-2 producing K. pneumoniae. *Heliyon*. 2019; 5(6): e01829.

2. Taminato M, Fram D, Pereira RRF, Sesso R, Belasco AGS, Pignatari AC and Barbosa DA. Infection related to Klebsiella pneumoniae producing carbapenemase in renal transplant patients. *Rev. Bras. Enferm.* 2019; 72(3): 760-6.

3. Ding X, Yu Y, Chen M, Wang C, Kang Y and Lou J. Causative agents and outcome of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients: community-acquired versus nosocomial infections. *BMC. Infect. Dis*. 2019; 19(1): 463.

4. Meng X, Yang J, Duan J, Liu S, Huang X, Wen X and Huang X. Assessing Molecular Epidemiology of Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae (CR-KP) with MLST and MALDI-TOF in Central China. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 2271.

5. Delarampour A, Ghalehnoo ZR, Khademi F, Delarampour M, Vaez H. Molecular detection of carbapenem-resistant genes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Ann. Ig*. 2019; 31(4): 349-55.

6. Vock I and Tschudin-Sutter S. Persisting intrahospital transmission of multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae and challenges for infection control. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2019; 11: 1-6.

7. Lautenbach E, Metlay JP, Bilker WB, Edelstein PH and Fishman NO. Association between fluoroquinolone resistance and mortality in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* infections: The Role of Inadequate Empirical Antimicrobial Therapy. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 41: 423-9.

8. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A and et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in Klebsiella pneumoniae isolates causing bacteremia. *Clin. Infect. Dis*. 2000; 30(3): 473-8.

9. Gupta V and Datta P. Next-generation strategy for treating drug resistant bacteria: Antibiotic hybrids. *Indian. J. Med. Res*. 2019; 149(2): 97-106.

10. Shi X, Chen M, Yu Z, Bell JM, Wang H, Forrester I, Villarreal H, Jakana J, Du D, Luisi BF, Ludtke SJ and Wang Z. In situ structure and assembly of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC. *Nat. Commun*. 2019;10(1): 2635.

11. Ogawa W, Onishi M, Ni R, Tsuchiya T and Kuroda T. Functional study of the novel multidrug efflux pump KexD from *Klebsiella pneumoniae*. *Gene*. 2012; 498(2): 177-82.

12. Szabo O, Kocsis B, Szabo N, Kristof K and Szabo D. Contribution of OqxAB Efflux Pump in Selection of Fluoroquinolone-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol*. 2018; 28(3): 1-5 4271638.

13. Zheng JX, Lin ZW, Sun X, Lin WH, Chen Z, Wu Y, Qi GB, Deng QW, Qu D and Yu ZJ. Overexpression of OqxAB and MacAB efflux pumps contributes to eravacycline resistance and heteroresistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae. Emerg. Microbes. Infect.* 2018; 7(1): 139.

14. Rodríguez-Martínez JM, Díaz de Alba P, Briales A, Machuca J, Lossa M, Fernández-Cuenca F, Rodríguez Baño J, Martínez-Martínez L and Pascual Á. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum-β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; 68(1): 68-73.

15. Yuan J, Xu X, Guo Q, Zhao X, Ye X, Guo Y and Wang M. Prevalence of the oqxAB gene complex in *Klebsiella pneumoniae* and Escherichia coli clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother*. 2012; 67(7): 1655-9.

16. Zhong X, Xu H, Chen D, Zhou H, Hu X and Cheng G. First emergence of acrAB and oqxAB mediated tigecycline resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* pre-dating the use of tigecycline in a Chinese hospital. *PLoS One*. 2014; 9(12): e115185.

17. Agyepong N, Govinden U, Owusu-Ofori A, Amoako DG, Allam M, Janice J, Pedersen T, Sundsfjord A and Essack S. Genomic characterization of multidrug-resistant ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Ghanaian teaching hospital. *Int. J. Infect. Dis.* 2019; 85: 117-23.

18. Vera-Leiva A, Carrasco-Anabalón S, Lima CA, Villagra N, Domínguez M, Bello-Toledo H and González-Rocha G. The efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β-naphthylamide (PAβN) increases resistance to carbapenems in Chilean clinical isolates of KPC-producing Klebsiella pneumoniae. *J. Glob. Antimicrob. Resist*. 2018; 12: 73-6.

19. Abuzaid A, Hamouda A and Amyes SG. Klebsiella pneumoniae susceptibility to biocides and its association with cepA, qacΔE and qacE efflux pump genes and antibiotic resistance. *J. Hosp. Infect*. 2012; 81(2): 87-91.

20. Tankeo SB, Lacmata ST, Noumedem JA, Dzoyem JP, Kuiate JR and Kuete V. Antibacterial and antibiotic-potentiation activities of some Cameroonian food plants against multi-drug resistant gram-negative bacteria. *Chin. J. Integr. Med*. 2014; 20(7): 546-54.

21. Nickavar B and Kamalinejad Mohandesi M. Comparison of the components of the essential oils from leaves and fruits of *Grammosciadium platycarpum. Chem. Nat. Com*. 2006; 42, 6: 686-8.

22. Rawat D, Nair D. Extended-spectrum β-lactamases in Gram Negative Bacteria. Journal of global infectious diseases. 2010 Sep; 2(3): 263.

23. Cheng HR and Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. Bio. *Lett*. 2006; 28(1): 55-9.

24. Olajuyigbe O, Ashafa A. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Cosmos bipinnatus* Cav. Leaves from South Africa. *Iran. J. Pharm. Res*. 2014; Fall; 13(4): 1417-23.

25. Bagheri Farahani Z, Mirzaie A, Ashrafi F, Rahimpour Hesari M, Chitgar A, Noorbazargan H and Rahimi A. Phytochemical composition and biological activities of Artemisia quettensis Podlech ethanolic extract. *Nat. Prod. Res*. 2017; 31(21): 2554-8.

26. Alemayehu T, Ali M, Mitiku E and Hailemariam M. The burden of antimicrobial resistance at tertiary care hospital, southern

Ethiopia: a three years' retrospective study. *BMC. Infect. Dis*. 2019; 19(1): 585.

27. Crémieux AC, Dinh A, Nordmann P, Mouton W, Tattevin P, Ghout I, Jayol A, Aimer O, Gatin L, Verdier MC, Saleh-Mghir A and Laurent F. Efficacy of colistin alone and in various combinations for the treatment of experimental osteomyelitis due to carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother*. 2019; pii: dkz257.

28. Xu Q, Jiang J, Zhu Z, Xu T, Sheng ZK, Ye M, Xu X and Wang M. Efflux Pumps AcrAB and OqxAB Contribute to Nitrofurantoin Resistance in an Uropathogenic Klebsiella pneumoniae Isolate. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2019; pii: S0924-8579 (19): 30145-1.

29. Li J, Zhang H, Ning J, Sajid A, Cheng G, Yuan Z and Hao H. The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 2019; 8: 44.

30. Dolatabadi A, Noorbazargan H, Khayam N, et al. Ecofriendly Biomolecule-Capped Bifidobacterium bifidum-Manufactured Silver Nanoparticles and Efflux Pump Genes Expression Alteration in Klebsiella pneumoniae [published online ahead of print, 2020 Jul 7]. *Microb Drug Resist*. 2020; 10: 1-11.

31. Rajeshkumar S, Menon S, Venkat Kumar S, Tambuwala MM, Bakshi HA, Mehta M, Satija S, Gupta G, Chellappan DK, Thangavelu L and Dua K. Antibacterial and antioxidant potential of biosynthesized copper nanoparticles mediated through Cissus arnotiana plant extract. *J. Photochem. Photobiol. B*. 2019; 197: 111531.

32. Hashemi A, Fallah F, Taherpour A, Goudarzi H, Erfanimanesh S and Taki E. Evaluation of genetic pattern and determination of oqxA gene expression levels among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* strains. *J. Mazandaran. Univ. Med. Sci*. 2014; 24(119): 48-61.

33. Shahbazi S, Zargar M and Soleimani dorjagh M. Determination of existence of oqxAB genes in Klebsiella pneumoniae isolated from urinary tract infections and their antibiotic resistance pattern in Qom. *NCMBJ*. 2017; 7(28): 105-13.

34. Bokaeian M and Saeidi S. Evolution of antimicrobial activity of leaf extract of Withania somnifera against antibiotic resistanct *Staphylococcus aureus*. Zahedan. *J. Res. Med. Sci*. 2015; 17(7):-. doi: 10.17795/zjrms1016.

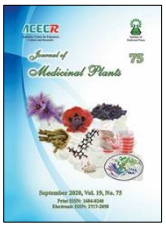
How to cite this article: Mohammad pour Bishak F, Ashrafi F, Moradi Bidhendi S, Mirzaie A, Noorbazargan H. The impact of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn. extract on *oqxA* efflux pump gene expression in antibiotic resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* using real time PCR. ***Journal of Medicinal Plants*** 2020; 19(75): 291-304.
doi: 10.29252/jmp.19.75.291

J. Med. Plants 2020; 19(75): 291-304

Institute of Medicinal Plants

Journal of Medicinal Plants

Journal homepage: www.jmp.ir



Research Article

The impact of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn. extract on *oqxA* efflux pump gene expression in antibiotic resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* using real time PCR

Faezeh Mohammadpour Bishak[1], Fatemeh Ashrafi[1,*], Soheila Moradi Bidhendi[1], Amir Mirzaie[2], Hassan Noorbazargan[3,*]

[1] *Department of Biology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[2] *Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran*
[3]*Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

ARTICLE INFO

Keywords:
Grammosciadium platycarpum Boiss. & Hausskn.
Klebsiella pneumoniae
oqxA efflux pump

ABSTRACT

Background: *Klebsiella pneumoniae* is one of the most important causes of nosocomial infections, especially wound infection after surgery. One of the mechanisms of antibiotic resistance in *K. pneumoniae* strains, especially ciprofloxacin, is the presence of efflux pump. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the anti-efflux activity of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn. extract on the expression of *oqxA* efflux pump in *K. pneumoniae* strains which were resistant to antibiotics. **Methods:** In this experimental study, clinical specimens were collected from hospitals in Tehran and the *K. pneumoniae* strains were isolated. Subsequently, ciprofloxacin-resistant strains containing the *oqxA* efflux gene were detected using PCR. Finally, the gene expression of *oqxA* efflux pump in the strains treated with *G. platycarpum* extract was investigated using Real Time PCR. **Results:** In this study, 50 *K. pneumoniae* strains were isolated from clinical specimens and the results of antibiotic susceptibility showed that 70% (35 strains) of isolates were resistant to ciprofloxacin and *oqxA* gene was observed in 43% (15 strains) of ciprofloxacin resistant *K. pneumoniae* strains. Moreover, Real Time PCR results showed that the expression of *oqxA* gene in the strains which are treated with extract, down-regulated significantly. **Conclusion:** The results of this study showed that the *G. platycarpum* extract can inhibits the expression of the *oqxA* efflux pump in *K. pneumoniae* strains, and with further studies, the *G. platycarpum* extract can be used as a candidate for the drug design.

Abbreviations: MIC, Minimum Inhibitory Concenrtration; OD, Optical density; MDR, multidrug resistant; CCCP, Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone.

* Corresponding author: F_ashrafi@iau.ac.ir

doi: 10.29252/jmp.19.75.291
Received 11 July 2019; Received in revised form 4 December 2019; Accepted 7 December 2019

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)