



شناسایی مولکولی سروتیپ‌ها و ژن‌های بیماری‌زای کپسولی موجود در مجموعه ژنی *cps* کلبسیلا نمونه جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های تهران

مرضیه توکل^{۱*}، حسن ممتاز^۲

^۱ دانشجوی دکتری، گروه میکروب‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ^۲ استاد، گروه میکروب‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد.

چکیده

سابقه و هدف: کلبسیلا نمونه یکی از عوامل بیماری‌زای مهم بالینی و ایجاد کننده تعدادی از عفونت‌های بیمارستانی به ویژه پنومونی، سپتی سمی و عفونت دستگاه ادراری است. مطالعه ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی مرتبط با فاکتورهای بیماری‌زای موثر در ایجاد بیماری در کلبسیلا نمونه جدا شده از موارد بالینی حائز اهمیت است. این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی سروتیپ‌ها و ژن‌های بیماری‌زای کپسولی موجود در مجموعه ژنی *cps* کلبسیلا نمونه انجام شد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۵۰ جدایه بالینی کلبسیلا نمونه جمع‌آوری شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های پیامبران و بقیه الله (عج) تهران انجام شد. از روش PCR چندگانه برای شناسایی تیپ‌های کپسولی K1، K2، K5، K54 و K57 و ردیابی ژن‌های بیماری‌زای *wcaG* و *rmpA* از مجموعه ژنی *cps* (کپسول پلی ساکاریدی) استفاده گردید. **یافته‌ها:** در این مطالعه K54 (۶۸ درصد) بیشترین فراوانی سروتیپ کپسولی و K1 (۸ درصد) کمترین فراوانی را دارا بود. همچنین بیشترین فراوانی ژن بیماری‌زای *rmpA* در سروتیپ کپسولی K5 (۶۰ درصد) و بیشترین فراوانی ژن *wcaG* در سروتیپ K54 (۱۷/۶۴ درصد) مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: روش PCR چندگانه می‌تواند به عنوان یک روش سریع در شناسایی و تیپ‌بندی جدایه‌های باکتریایی ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: کلبسیلا نمونه، فاکتورهای بیماری‌زا، سروتیپ کپسولی، Multiplex PCR.

دریافت مقاله: مرداد ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: مهر ماه ۹۵

مقدمه

بیماری‌زایی باکتری نقش دارند که مهم‌ترین آن‌ها کپسول پلی ساکاریدی (*cps*) می‌باشد. واحدهای تکراری این کپسول پلی ساکاریدی از ۴ تا ۶ قند و در اکثر موارد از اسید اورونیک تشکیل شده است. (۲). بیشتر سویه‌های کلبسیلا نمونه دارای مارکر K هستند. مارکرهای K1 و K2 و همچنین K54 و K57 اهمیت بیشتری در ایجاد مقاومت به فاگوسیت‌ها و ایجاد آبنه‌های کبدی در مقایسه با سایر جدایه‌ها نشان می‌دهند (۳). بنابراین ژنوتایپینگ کپسولی سویه‌های کلبسیلا نمونه اهمیت زیادی در شناسایی عفونت‌های بیمارستانی دارد. مجموعه ژن‌های

کلبسیلا نمونه (*Klebsiella pneumoniae*) یک باسیل گرم منفی، غیر متحرک و دارای کپسول پلی ساکاریدی است که بیماری‌های مختلفی مانند باکتری، پنومونی، عفونت دستگاه ادراری و تنفسی، مننژیت، اسهال، اندوفتالمیت، آبنه‌های چرکی در اندام‌های مختلف به ویژه آبنه‌های کبدی ایجاد می‌کند. میزان مرگ و میر ناشی از پنومونی کلبسیلابی حدود ۹۰ درصد گزارش شده است (۱). فاکتورهای حدت مهمی در

* آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروب‌شناسی.
تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۶۴ پست الکترونیک: marziyeh.tavakol@yahoo.com

۶/۱۸ درصد از نمونه‌های جمع‌آوری شده مربوط به سروتیپ کپسولی K1 و ۳۲/۵۵ درصد از نمونه‌ها متعلق به تیپ کپسولی K2 بوده است. در بین سروتیپ‌های کپسولی، ژن *rmpA* با فراوانی بیشتری نسبت به ژن *maga* ردیابی گردید (۱۰). با توجه به اهمیت بیماری‌زایی باکتری کلبسیلا نمونیه و هم‌چنین سروتیپ‌های مختلف کپسولی آن در ایجاد آبسه‌های کبدی، مغزی و دیگر آبسه‌های موضعی و نیز شیوع بالای آن، تشخیص دقیق، موثر و اختصاصی برای پیشگیری و درمان آبسه‌های ایجاد شده توسط این باکتری ضروری می‌باشد.

هدف از این پژوهش، تشخیص و طبقه‌بندی سروتیپ‌های کپسولی کلبسیلا نمونیه با استفاده از روش Multiplex PCR و ردیابی ژن‌های *rmpA* و *wcaG* موجود در مجموعه ژنی cps باکتری کلبسیلا نمونیه بود.

مواد و روش‌ها

الف) جمع‌آوری نمونه‌ها: در این مطالعه مقطعی-توصیفی تعداد ۵۰ جدایه کلبسیلا نمونیه از تیر ماه تا دی ماه سال ۱۳۹۴ از ۱۲۴ بیمار مبتلا به عفونت‌های دستگاه ادراری در بیمارستان‌های پیامبران و بقیه‌الله تهران جداسازی گردید. کشت باکتری بر روی محیط نوترینت برات (مرک، آلمان) و لاکتوز برات (مرک، آلمان) به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس در گرمخانه انجام شد. سپس نمونه‌ها به محیط کشت مک‌کانکی آگار (مرک، آلمان) منتقل شده و تشخیص باکتری کلبسیلا نمونیه بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، میکروسکوپی و آزمون‌های بیوشیمیایی مختلف از جمله IMViC و TSI بر اساس روش‌های استاندارد آزمایشگاهی صورت گرفت (۱۱). جدایه‌های باکتریایی به محیط BHI (مرک، آلمان) واجد ۲۰ درصد گلیسرول منتقل و در فریزر با دمای ۷۰- درجه سلیسیوس نگهداری شدند.

ب) استخراج ژنوم: استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA (Genomic DNA Purification Kit) (فرمتاس، لیتوانی) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. *ج) واکنش زنجیره ای پلی‌مراز:* به منظور ردیابی ژن

cps نقش مهمی در تولید واحدهای پلی‌ساکاریدی کپسول، تجمع و اتصال آن‌ها به یکدیگر و تولید کپسول‌دارا می‌باشند. کپسول باعث مقاومت باکتری به فاگوسیتوز و ایجاد بیماری‌زایی قوی می‌شود. سویه‌های تهاجمی کلبسیلا نمونیه با ایجاد کلنی‌های همراه چسبندگی زیاد در پلیت‌آشکار می‌شوند (۴). اهمیت سروتیپ‌های کپسولی کلبسیلا نمونیه در ایجاد بیماری و مقاومت فاگوسیتوزی قبل از شناخته شدن سروتیپ‌های K1 و K2 مشخص شده بود که در این زمان مهم‌ترین عوامل دخیل در بیماری‌زایی مربوط به ژن‌های *maga* و *rmpA* در سویه‌های بیماری‌زا بود. آنالیز جزایر بیماری‌زایی نشان می‌دهد که یک لوکوس ژنی به نام *rmpA* سبب افزایش حالت موکوییدی در کلنی‌های تشکیل شده از سروتیپ‌های مختلف کلبسیلا نمونیه می‌شود (۵). این یافته‌ها هم‌چنین نشان‌دهنده نقش مهم *rmpA2* به عنوان یک *trans-acting* در بیوستنز کپسول پلی‌ساکاریدی K2 می‌باشد (۶).

روش‌های مختلفی برای شناسایی سروتیپ‌های کلبسیلا نمونیه یا ژن‌های مربوط به آن وجود دارد که از این میان می‌توان به روش‌های Real time PCR، Most probable number PCR، Southern Blot اشاره نمود. ژن *rmpA* در بسیاری موارد به عنوان عامل بیماری‌زایی مهمی نقش داشته، در حالی که مطالعه کمتری بر روی ژن *wcaG* به عنوان یک عامل بیماری‌زا cps انجام گرفته است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ در کشور تایوان صورت گرفت، ۶۳/۳ درصد از بیماران مبتلا به آبسه کبدی دارای سروتیپ کپسولی K1 بودند (۷).

مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۳ در شهر تهران نشان داد که فراوانی سروتیپ کپسولی K2 (۱۴/۶ درصد) نسبت به سروتیپ کپسولی K1 (۱۱/۲ درصد) در بین بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری با استفاده از روش PCR و تست کووالانگ بیشتر است (۸). ردیابی ژن *maga* در سال ۲۰۱۴ در شهر همدان نیز نشان داد که فراوانی این ژن، ۳/۸ درصد در بیماران مبتلا به عفونت ادراری، آبسه‌های کبدی و عفونت خونی می‌باشد (۹).

در سال ۲۰۱۴، مطابق پژوهش انجام گرفته در کشور عراق

دنیای میکروبیوم، سال دهم، شماره اول بهار ۱۳۹۶. شناسایی مولکولی سروتیپ ها و ژن های بیماری زای کپسولی موجود در مجموعه ژنی cps کلبسیلا نمونیه ... مرضیه توکل و همکاران

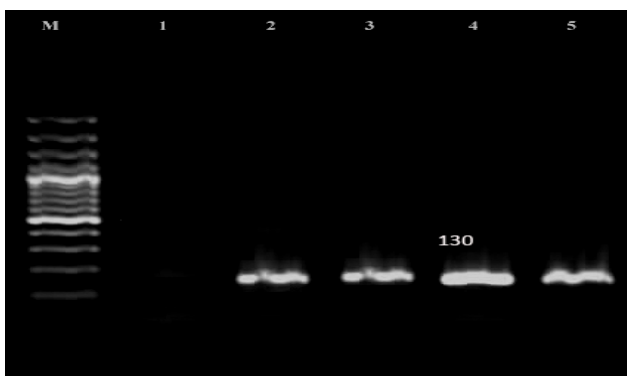
جدول ۱: توالی پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی مورد استفاده در مطالعه حاضر.

منبع	اندازه قطعه (bp)	توالی (5'-3')	پرایمر	سروتیپ کپسولی
۱۲	۱۲۸۳	GGTGCTCTTTACATCATTGC GCAATGGCCATTTCGTTAG	MagAF1 MagAR1	K1
۱۳	۶۴۱	GACCCGATATTCATACTTGACAGAG CCTGAAGTAAAATCGTAAATAGATGGC	K2wzy-F1 K2wzy-R1	K2
۱۳	۲۸۰	TGGTAGTGATGCTCGCGA CCTGAACCCACCCCAATC	K5wzx-F360 K5wzx-R639	K5
۱	۸۸۱	CATTAGCTCAGTGGTTGGCT GCTTGACAACACCATAGCAG	wzxK54F wzxK54R	K54
۱	۱۰۳۷	CTCAGGGCTAGAAAGTGCAT CACTAACCCAGAAAGTCGAG	wzyK57F wzyK57R	K57
۱۴	۵۱۶	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA CTTGCATGAGCCATCTTCA	rmpAF rmpAR	rmpA
۱۵	۱۶۹	GGTTGGKTCAGCAATCGTA ACTATCCGCCAACCTTTGC	wcaGF wcaGR	wcaG
۱۶	۱۳۰	ATTTGAAGAGGTTGCAACCGAT TTCACTCTGAAGTTTCTTGTTTC	K.pneumoniae Pf K.pneumoniae Pr1	16S-23S ITS

K2, K5, K54 و K57 و حضور ژن های cps کد کننده کپسول (wcaG و rmpA) از روش Multiplex PCR استفاده شد. ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن های مورد مطالعه در شکل های ۱ تا ۳ آورده شده است. جدول ۲ نشان دهنده فراوانی انواع سروتیپ های کپسولی ردیابی شده

جدول ۲: فراوانی انواع سروتیپ های کپسولی کلبسیلا نمونیه در جدایه های مورد مطالعه.

سروتیپ کپسولی	فراوانی (درصد)
K1	۴ (۸)
K2	۲۲ (۴۴)
K5	۳۰ (۶۰)
K54	۳۴ (۶۸)
K57	۱۰ (۲۰)



شکل ۱: نتایج الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن 16S-23S ITS در جدایه های کلبسیلا نمونیه. (M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون (۱) کنترل منفی، ستون های ۲ تا ۵) نمونه های مورد مطالعه دارای قطعه ۱۳۰ جفت بازی.

DNA 16S-23S ژنومی از پرایمرهای اختصاصی موجود در جدول ۱ استفاده شد. همچنین توالی پرایمرهای لازم به منظور شناسایی سروتیپ های کپسولی K1، K2، K5، K54 و K57 و توالی ژن های بیماری زای rmpA و wcaG از کلبسیلا نمونیه در جدول ۱ آورده شده است. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای F و R، ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۲/۵ میکرولیتر آب و ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده انجام شد. واکنش PCR در ۳۵ سیکل به ترتیب واسرشت شدن ۹۵ درجه سلیسیوس در ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۸ درجه سلیسیوس به مدت ۹۰ ثانیه، طویل سازی ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. سپس محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز و توسط دستگاه UV-ترانس لومیناتور (Uvitech, UK) مورد ارزیابی قرار گرفت.

د) آنالیز آماری: داده های حاصل از نتایج به دست آمده در این مطالعه با نسخه شانزدهم نرم افزار آماری SPSS و آزمون های آماری مربع کای و دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد آنالیز قرار گرفتند.

یافته ها

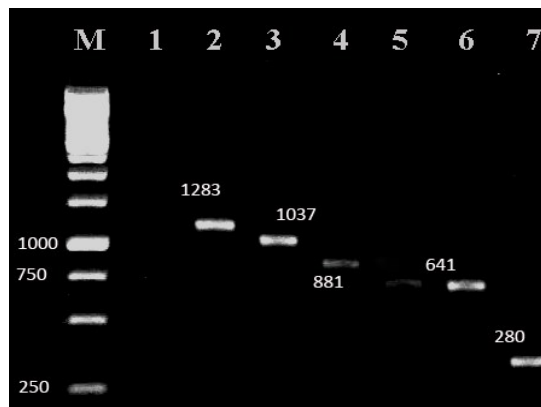
در این مطالعه به منظور شناسایی سروتیپ های کپسولی K1،

در ۵۰ جدایه باکتری می باشد. در این میان سروتیپ کپسولی K54 با فراوانی ۶۸ درصد به عنوان بیشترین سروتیپ کپسولی و سروتیپ کپسولی K1 با فراوانی ۸ درصد به عنوان کمترین مقدار در بین انواع سروتیپ های کپسولی مورد مطالعه گزارش شد. همچنین ردیابی ژن های *wcaG* و *rmpA* کد کننده cps در بین این سروتیپ های کپسولی در جدول ۳ آورده شده است. در مجموع بیشترین فراوانی ژن *rmpA* در سروتیپ K5 و بیشترین فراوانی ژن *wcaG* در سروتیپ K54 مشاهده گردید. آنالیز آماری اطلاعات مربوط به جداول یاد شده نشانگر وجود اختلاف آماری معنی دار بین سروتیپ های K2، K5، K54 با سروتیپ های K1 و K57 در جدایه های مورد مطالعه همچنین بین حضور ژن های *rmpA* و *wcaG* در سروتیپ های K2 و K5 با دیگر سروتیپ های ردیابی شده بود.

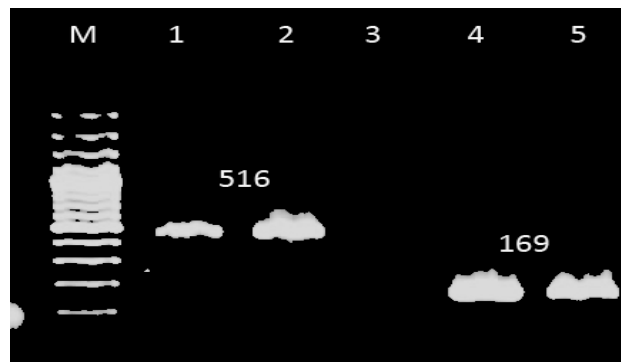
بحث

کلبسیلا نمونیه یکی از باکتری های بیماری زای ایجاد کننده پنومونی دستگاه ادراری و عفونت های چرکی می باشد. ژنوتایپینگ نواحی ژنی cps براساس PCR اولین بار برای شناسایی تیپ های کپسولی کلبسیلا نمونیه صورت گرفت. حضور ژن های cps در ارتباط با بیوستتزی کپسول پلی ساکارییدی در کلبسیلا نمونیه می باشد. در این حالت ایجاد کلنی های موکوئیدی به دلیل وجود ژن های کد شونده کروموزومی *rscs* و مقاومت در برابر عوامل فاگوسیتوزی و سایر عوامل باکتری کشی سرم در ارتباط با وجود ژن های کد شونده ی پلاسمیدی *rpma* است (۱۵).

سویه های کلبسیلا نمونیه در محیط کشت حاوی آگار سبب ایجاد کلنی های بزرگ چسبناک می شوند. چسبندگی زیاد در این سویه ها به دلیل حضور چندین ژن از جمله *magA* و *rmpA* می باشد. ژن *rmpA* در سروتیپ های کپسولی K1 و K2 یافت می شود. این ژن علاوه بر این سویه ها، در حدود ۲/۳ از سروتیپ های کپسولی غیر از K1 و K2 شناسایی شده است. این ژن اولین بار در یک پلاسمید ۱۸۰ کیلو جفت بازی متعلق به سویه K2 گزارش گردید و به عنوان کنترل مثبت در



شکل ۲: نتایج الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی سروتیپ های کپسولی در جدایه های کلبسیلا نمونیه. (M) مارکر ۱ کیلو جفت بازی، ستون (۱) کنترل منفی، ستون های ۲ تا ۷) نمونه های مورد مطالعه دارای قطعه ۱۲۸۳ جفت بازی مربوط به سروتیپ K1، قطعه ۱۰۳۷ جفت بازی مربوط به سروتیپ K57، قطعه ۸۸۱ جفت بازی مربوط به سروتیپ K54، قطعه ۶۴۱ جفت بازی مربوط به سروتیپ K2 و قطعه ۲۸۰ جفت بازی مربوط به سروتیپ K5.



شکل ۳: نتایج الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن های *wcaG* و *rmpA* از مجموعه ژنی cps در بین سروتیپ های کپسولی کلبسیلا نمونیه. (M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون (۱) کنترل منفی، ستون های ۲ تا ۴) نمونه های مورد مطالعه دارای قطعه ۵۱۶ جفت بازی مربوط به ژن *rmpG* و قطعه ۱۶۹ جفت بازی مربوط به ژن *wcaG*.

جدول ۳: فراوانی ژن های *wcaG* و *rmpA* از مجموعه ژنی cps در بین سروتیپ های کپسولی کلبسیلا نمونیه.

سروتیپ کپسولی	فراوانی <i>wcaG</i> (درصد)	فراوانی <i>rmpA</i> (درصد)
K1	۰	۲ (۵۰)
K2	۲ (۹/۰۹)	۱۲ (۵۴/۵۴)
K5	۰	۱۸ (۶۰)
K54	۶ (۱۷/۶۴)	۱۶ (۴۷/۰۵)
K57	۰	۰

در تحقیقی که توسط فیض آبادی (Feizabadi) و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از روش PCR انجام شد، سروتیپ‌های کپسولی K1 و K2 در جدایه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به آبسه‌های کبدی شناسایی شد. در این مطالعه ژن‌های *orf10* و *wzc* از مجموعه ژن‌های cps که در سنتز کپسول نقش دارند، ردیابی شد (۸).

ژن‌های *wzy* دارای فعالیت پلی‌مرازی و *wzx* دارای عملکرد فیلیپازی بوده و در انتقال واحد‌های تکراری الیگوساکاریدی به فضای پری پلاسمی نقش دارد. این دو ژن از لحاظ ساختاری، شباهت اندکی داشته و به همین دلیل مربوط به دو سروتیپ اختصاصی مجزا می‌باشند (۱۷).

همچنین در سال ۲۰۰۹، دوود (Doud) و همکاران سروتیپ K2 را از بیماران دارای آبسه‌های کبدی با ردیابی ژن *k2A* شناسایی کردند. یافته‌های آنها نشان داد که سروتیپ K2 عنوان دومین سویه غالب جدا شده از جدایه‌های مبتلا به آبسه‌های کبدی می‌باشد (۱۹). در پژوهشی دیگر که در سال ۲۰۰۸ توسط تورتن (Turton) و همکاران با استفاده از روش Multiplex PCR با ردیابی ژن‌های *orf10*، *magA* و *wzx* صورت گرفت، سروتیپ‌های K1، K2 و K5 در جدایه‌های مبتلا به آبسه‌های کبدی تشخیص داده شدند (۱۳). این موضوع می‌تواند دلیل بر نقش مهم این ژن‌ها در کد کردن کپسول پلی‌ساکاریدی (*eps*) باکتری باشد. بیان ژن *wcaG* در ارتباط با بیوستنژ تیپ‌های کپسولی K1 و K54 می‌باشد.

در این مطالعه ژن *wcaG* در هیچ کدام از سروتیپ‌های K1 مشاهده نگردید. در پژوهشی مشابه با مطالعه حاضر در سال ۲۰۱۰، فراوانی سروتیپ‌های کپسولی K1، K2، K5، K54، K57 و K20 و ردیابی ژن‌های *mpA* و *wcaG* روی جدایه‌های کلبسیلا نمونیه صورت گرفت (۱۵). این نتایج نشان دهنده فراوانی بالای تیپ‌های کپسولی K5 و K54 در مقایسه با سایر تیپ‌های کپسولی بود. اما برخلاف نتایج به دست آمده در این بررسی، سروتیپ K2 بیشترین نوع از سروتیپ‌های کپسولی را به خود اختصاص داد.

روش‌های متداولی مانند آزمون تورم کپسولی (Quellung) و

آزمون‌های تشخیصی فنوتیپ موکوئیدی در نظر گرفته شد. آنالیز ساختار ژنی *rmpA* نشان دهنده وجود ناحیه C-ترمینال به همراه یک ساختار مارپیچ تاب مارپیچ (helix turn helix) در ناحیه *ntrC* و *fixJ* است (۱۵).

در بسیاری از گزارش‌های صورت گرفته نشان داده شده است که ژن *rmpA* در موارد زیادی به عنوان عامل بیماری‌زا نقش دارد (۱۵). در حالی که مطالعه زیادی بر روی ژن *wcaG* به عنوان یک عامل حدت *eps* صورت نگرفته است. ژن *wcaG* سبب کد کردن آنزیم‌ها با فعالیت پلی‌مرازی و دهیدراتازی می‌شود. فعالیت این آنزیم‌ها سبب تبدیل GDP-D-مانوز به GDP-D-فوکوز می‌شود. ردیابی ژن *wcaG* در بین سروتیپ‌های کپسولی جدایه‌ها در این مطالعه و فراوانی پایین آن می‌تواند حاکی از این موضوع باشد که احتمالاً این ژن نقش کمتری را به عنوان یک فاکتور بیماری‌زا در ایجاد بیماری داشته باشد. حضور ژن‌های *eps* در اکثر جدایه‌های باکتریایی به این مفهوم است که وجود این ژن‌ها ارتباط مستقیمی با کد شدن کپسول پلی‌ساکاریدی داشته و با این وجود بیوستنژ کپسول پلی‌ساکاریدی باعث کاهش اتصال پپتیدهای ضد میکروبی به سطوح و در نتیجه افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری می‌گردد (۱۷).

سروتیپ‌های کپسولی K1 و K2 ایجاد کننده بیماری‌های مهمی از قبیل باکتری، عفونت دستگاه تنفسی، مننژیت، آبسه‌های کبدی و AML (Acute myeloid leukaemia) می‌باشند (۱۵). نقش ژن *magA* در ایجاد آبسه‌های کبدی اولین بار در سویه‌های بیماری‌زا در کشور تایوان مشخص گردید (۶) و (۱۸). این موضوع دلیل بر ایجاد آبسه‌های کبدی توسط سروتیپ کپسولی K1 می‌باشد. طبق نتایج به دست آمده در این بررسی تنها در ۴ درصد از جدایه‌ها، این سروتیپ ردیابی گردید. این مطلب نشان می‌دهد که هیچ‌گونه علائم بالینی مبنی بر آبسه چرکی در بیماران مورد مطالعه وجود ندارد. ژن *magA* هم‌چنین در ایجاد فنوتیپ‌های دارای چسبندگی زیاد و همچنین مقاومت به فاکتورهای سرمی و فاگوسیتوز اهمیت دارد (۱۸).

نسبت به روش‌های سنتی در تشخیص حساس و دقیق این عامل بیماری‌زا و تیپ‌بندی آن فراهم آورده است. نتایج این تحقیق نشان داد که روش PCR چندگانه می‌تواند به عنوان یک روش سریع در شناسایی و تیپ‌بندی جدایه‌های باکتریایی ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کارشناس محترم مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد جناب آقای مهندس محمد ربیعی به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

ایمونوالکتروفورزیس برای شناسایی سروتیپ‌های مختلف باکتری کلبسیلا نمونه به کار می‌روند که به دلیل قیمت بالا و زمان طولانی آماده‌سازی آنتی‌سرم کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۰). یکی از دلایل تفاوت در نتایج مطالعه حاضر با مطالعات مشابه یاد شده، تفاوت در نوع نمونه مورد بررسی است. در مطالعه حاضر جدایه‌های باکتری از عفونت‌های دستگاه ادراری جدا شده در حالی که بیشتر مطالعات قبلی روی نمونه‌های مربوط به آبسه‌های کبدی انجام شده است.

نتیجه‌گیری

در روش PCR، تشخیص سریع با حساسیت بالا این امکان را

References

- Green VL, Verma A, Owens RJ, Phillips SE, Carr SB. Structure of New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1). *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2011; 67 (Pt 10): 1160-1164.
- García-Sureda L, Juan C, Doménech-Sánchez A, Albertí S. Role of *Klebsiella pneumoniae* LamB Porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(4): 1803-1805.
- Luo Y, Yang J, Zhang Y, Ye L, Wang L, Guo L. Prevalence of β -lactamases and *16S rRNA* methylase genes amongst clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance determinants. *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 37(4): 352-355.
- Dubey D, Raza FS, Sawhney A, Pandey A. *Klebsiella pneumoniae* renal abscess syndrome: A rare case with metastatic involvement of lungs, eye, and brain. *Case Rep Infect Dis*. 2013; 2013: 685346.
- Ghorashi Z, Nezami N, Hoseinpour-Feizi H, Ghorashi S, Tabrizi JS. Arthritis, osteomyelitis, septicemia and meningitis caused by *Klebsiella* in a low-birth-weight newborn: a casereport. *J Med Case Rep*. 2011; 5: 241.
- Rahn A, Whitfield C. Transcriptional organization and regulation of the *Escherichia coli* K30 group 1 capsule biosynthesis (*cps*) gene cluster. *Mol Microbiol*. 2003; 47(4): 1045-1060.
- Hsu CR, Lin TL, Chen YC, Chou HC, Wang JT. The role of *Klebsiella pneumoniae* *rmpA* in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. *Microbiol*. 2011; 157(Pt 12): 3446-3457.
- Feizabadi MM, Raji N, Delfani S. Identification of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 capsular types by PCR and quellung test. *Jundishapur J Microbiol*. 2013; 6(9): e7585.
- Zamani A, Yousefi Mashouf R, Ebrahimzadeh Namvar A, Alikhani MY. Detection of *magA*

- gene in *Klebsiella* spp. isolated from clinical samples. Iran J Basic Med Sci. 2013; 16: 173-176.
10. Abdul-Razzaq MS, Al-Khafaji JKT, Al-Maamory EHK. Molecular characterization of capsular polysaccharide genes of *Klebsiella pneumoniae* in Iraq. Int J Curr Microbiol App Sci. 2014; 3(7): 224-234.
 11. Cappuccino JG, Sherman N. Microbiology: A laboratory manual. Fifth edition, California, Benjamin/cammings Science; 1998.
 12. Mustafa OA, Yusuf D. Investigation of some antibiotic susceptibility plasmid profiles and ESBL characteristic of *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary system infection. World Appl Sci J. 2009; 6(5): 630-636.
 13. Turton JF, Baklan H, Siu LK, Kaufmann ME, Pitt TL. Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella* sp. and comparison of isolates within these serotypes. FEMS Microbiol Lett. 2008; 284(2): 247-252.
 14. Nadasy KA, Domiati-Saad R, Tribble MA. Invasive *Klebsiella pneumoniae* syndrome in North America. Clin Infect Dis. 2007; 45(3): 25-28.
 15. Turton JF, Perry C, Elgohari S, Hampton CV. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. J Med Microbiol. 2010; 59(Pt 5): 541-547.
 16. Liu Y, Liu C, Zheng W, Zhang X, Yu J, Gao Q, Hou Y, Huang X. PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S-23S internal transcribed spacer. Int J Food Microbiol. 2008; 125(3): 230-235.
 17. Chung DR, Lee HR, Lee SS, Kim SW, Chang HH, Jung SI, Oh MD, Ko KS, Kang CI, Peck KR, Song JH. Evidence for clonal dissemination of the serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* strain causing invasive liver abscesses in Korea. J Clin Microbiol. 2008; 46(12): 4061-4063.
 18. Evrard B, Balestrino D, Dosgilbert A, Bouya-Gachancard JL, Charbonnel N, Forestier C, Tridon A. Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 2010; 78(1): 210-219.
 19. Doud MS, Grimes-Zeppeigno R, Molina E, Miller N, Balachandar D, Schneper L, Poppiti R, Mathee K. A k2A-positive *Klebsiella pneumoniae* causes liver and brain abscess in a Saint Kitt's man. Int J Med Sci. 2009; 6(6): 301-304.
 20. Ferreira S, Toleman M, Ramalheira E, Da Silva GJ, Walsh T, Mendo S. First description of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates carrying both *qnrA* and *qnrB* genes in Portugal. Int J Antimicrob Agents. 2010; 35(6): 584-586.



Molecular characterization of serotypes and capsular virulence genes in *cps* gen group of *Klebsiella pneumoniae* isolated from Tehran hospitals

Marziyeh Tavakol¹, Hassan Momtaz²

¹ Ph.D. Student, Department of Microbiology, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

² Professor, Department of Microbiology, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Klebsiella pneumoniae* is one of the important clinical pathogens and responsible for some nosocomial infections; especially pneumonia, septicemia, and urinary tract infection (UTI). Study of the genotypic and phenotypic characteristics of virulence factors associated with pathogenicity of *K. pneumoniae* clinical isolates is of great importance. The aim of the present study was the molecular identification of serotypes and capsular virulence genes in *cps* gene group of *K. pneumoniae* isolates.

Material & Methods: This cross-sectional study was carried out on 50 *K. pneumoniae* clinical isolates collected from patients admitted to the Payambaran and Baqiyatallah hospitals located in Tehran. Multiplex PCR was used for identification of K1, K2, K5, K54, K57 capsular types, and detection of *rmpA* and *wcaG* virulence factors from capsular polysaccharide genes group.

Results: In this study, K54 (68%) was the most frequent capsular serotype, while K1 (8%) had the lowest frequency. The highest frequency of virulence gene *rmpA* was observed in capsular serotype K5 (60%), and the highest frequency of *wcaG* gene was observed in serotype K54 (17.64%).

Conclusion: Multiplex PCR method can be used as a rapid tool to characterize and type the bacterial isolates causing nosocomial infections.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Virulence factors, Capsular serotype, Multiplex PCR.

Correspondence to: Marziyeh Tavakol

Tel: +98 3833361064

E-mail: marziyeh.tavakol@yahoo.com

Journal of Microbial World 2017, 10(1): 18-25.