مجله دنیای میکروب‌ها
سال دهم شماره اول (پیاپی ۳۰) بهار ۱۳۹۶
صفحات ۲۵-۱۸

Original Article

شناسایی مولکولی سروتیپ ها و ژن های بیماری زای کپسولی موجود در مجموعه ژنی *cps* *کلبسیلا نمونیه* جمع آوری شده از بیمارستان های تهران

مرضیه توکل*[1]، حسن ممتاز[2]

[1] دانشجوی دکتری، گروه میکروب شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، [2] استاد، گروه میکروب شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد.

چکیده

سابقه و هدف: *کلبسیلا نمونیه* یکی از عوامل بیماری زای مهم بالینی و ایجاد کننده تعدادی از عفونت های بیمارستانی به ویژه پنومونی، سپتی سمی و عفونت دستگاه ادراری است. مطالعه ویژگی های فنوتیپی و ژنوتیپی مرتبط با فاکتورهای بیماری زای موثر در ایجاد بیماری در *کلبسیلا نمونیه* جدا شده از موارد بالینی حائز اهمیت است. این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی سروتیپ ها و ژن های بیماری زای کپسولی موجود در مجموعه ژنی *cps* *کلبسیلا نمونیه* انجام شد.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۵۰ جدایه بالینی *کلبسیلا نمونیه* جمع آوری شده از بیماران بستری در بیمارستان های پیامبران و بقیه الله (عج) تهران انجام شد. از روش PCR چندگانه برای شناسایی تیپ های کپسولی K1، K2، K5، K54 و K57 و ردیابی ژن های بیماری زای *rmpA* و *wcaG* از مجموعه ژنی *cps* (کپسول پلی ساکاریدی) استفاده گردید.

یافته ها: در این مطالعه K54 (٦٨ درصد) بیشترین فراوانی سروتیپ کپسولی و K1 (٨ درصد) کمترین فراوانی را دارا بود. همچنین بیشترین فراوانی ژن بیماری زایی *rmpA* در سروتیپ کپسولی K5 (٦٠ درصد) و بیشترین فراوانی ژن *wcaG* در سروتیپ K54 (١٧/٦٤ درصد) مشاهده گردید.

نتیجه گیری: روش PCR چندگانه می تواند به عنوان یک روش سریع در شناسایی و تیپ بندی جدایه های باکتریایی ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *کلبسیلا نمونیه* ، فاکتورهای بیماری زا، سروتیپ کپسولی، Multiplex PCR.

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

مقدمه

کلبسیلا نمونیه (*Klebsiella pneumoniae*) یک باسیل گرم منفی، غیر متحرک و دارای کپسول پلی ساکاریدی است که بیماری های مختلفی مانند باکتریمی، پنومونی، عفونت دستگاه ادراری و تنفسی، مننژیت، اسهال، اندوفتالمیت، آبسه های چرکی در اندام های مختلف به ویژه آبسه های کبدی ایجاد می کند. میزان مرگ و میر ناشی از پنومونی کلبسیلایی حدود ۹۰ درصد گزارش شده است (۱). فاکتورهای حدت مهمی در بیماری زایی باکتری نقش دارند که مهم ترین آن ها کپسول پلی ساکاریدی (*cps*) می باشد. واحدهای تکراری این کپسول پلی ساکاریدی از ٤ تا ٦ قند و در اکثر موارد از اسید اورونیک تشکیل شده است. ۷۷ سروتیپ کپسولی در *کلبسیلا* شناخته شده است (۲). بیشتر سویه های *کلبسیلا نمونیه* دارای مارکر K هستند. مارکرهای K1 و K2 و همچنین K54 و K57 اهمیت بیشتری در ایجاد مقاومت به فاگوسیت ها و ایجاد آبسه های کبدی در مقایسه با سایر جدایه ها نشان می دهند (۳). بنابراین ژنوتایپینگ کپسولی سویه های *کلبسیلا نمونیه* اهمیت زیادی در شناسایی عفونت های بیمارستانی دارد. مجموعه ژن های

*) آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۶٤ پست الکترونیک: marziyeh.tavakol@yahoo.com

cps نقش مهمی در تولید واحدهای پلی ساکاریدی کپسول، تجمع و اتصال آن ها به یکدیگر و تولید کپسول دارا می باشند. کپسول باعث مقاومت باکتری به فاگوسیتوز و ایجاد بیماری زایی قوی می شود. سویه های تهاجمی *کلبسیلا نمونیه* با ایجاد کلنی های همراه چسبندگی زیاد در پلیت آشکار می شوند (٤). اهمیت سروتیپ های کپسولی *کلبسیلا نمونیه* در ایجاد بیماری و مقاومت فاگوسیتوزی قبل از شناخته شدن سروتیپ های K1 و K2 مشخص شده بود که در این زمان مهم ترین عوامل دخیل در بیماری زایی مربوط به ژن های *magA* و *rmpA* در سویه های بیماری زا بود. آنالیز جزایر بیماری زایی نشان می دهد که یک لوکوس ژنی به نام *rmpA* سبب افزایش حالت موکوئیدی در کلنی های تشکیل شده از سروتیپ های مختلف *کلبسیلا نمونیه* می شود (٥). این یافته ها هم چنین نشان دهنده نقش مهم *rmpA2* به عنوان یک trans-acting در بیوسنتز کپسول پلی ساکاریدی K2 می باشد (٦).

روش های مختلفی برای شناسایی سروتیپ های *کلبسیلا نمونیه* یا ژن های مربوط به آن وجود دارد که از این میان می توان به روش های Real time PCR، Most probable number PCR، Multiplex Real time PCR و Southern Blot اشاره نمود. ژن *rmpA* در بسیاری موارد به عنوان عامل بیماری زایی مهمی نقش داشته، در حالی که مطالعه کمتری بر روی ژن *wcaG* به عنوان یک عامل بیماری زا cps انجام گرفته است. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۱ در کشور تایوان صورت گرفت، ٦۳/۳ درصد از بیماران مبتلا به آبسه کبدی دارای سروتیپ کپسولی K1 بودند (۷).

مطالعه ای در سال ۲۰۱۳ در شهر تهران نشان داد که فراوانی سروتیپ کپسولی K2 (١٤/٦ درصد) نسبت به سروتیپ کپسولی K1 (۱۱/۲ درصد) در بین بیماران مبتلا به عفونت های ادراری با استفاده از روش PCR و تست کووالانگ بیشتر است (۸). ردیابی ژن *magA* در سال ۲۰۱٤ در شهر همدان نیز نشان داد که فراوانی این ژن، ۳/۸ درصد در بیماران مبتلا به عفونت ادراری، آبسه های کبدی و عفونت خونی می باشد (۹).

در سال ۲۰۱٤، مطابق پژوهش انجام گرفته در کشور عراق ٦/۱۸ درصد از نمونه های جمع آوری شده مربوط به سروتیپ کپسولی K1 و ۳۲/۵۵ درصد از نمونه ها متعلق به تیپ کپسولی K2 بوده است. در بین سروتیپ های کپسولی، ژن *rmpA* با فراوانی بیشتری نسبت به ژن *magA* ردیابی گردید (۱۰). با توجه به اهمیت بیماری زایی باکتری *کلبسیلا نمونیه* و هم چنین سروتیپ های مختلف کپسولی آن در ایجاد آبسه های کبدی، مغزی و دیگر آبسه های موضعی و نیز شیوع بالای آن، تشخیص دقیق، موثر و اختصاصی برای پیشگیری و درمان آبسه های ایجاد شده توسط این باکتری ضروری می باشد.

هدف از این پژوهش، تشخیص و طبقه بندی سروتیپ های کپسولی *کلبسیلا نمونیه* با استفاده از روش Multiplex PCR و ردیابی ژن های *rmpA* و *wcaG* موجود در مجموعه ژنی cps باکتری *کلبسیلا نمونیه* بود.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه ها: در این مطالعه مقطعی-توصیفی تعداد ۵۰ جدایه *کلبسیلا نمونیه* از تیر ماه تا دی ماه سال ۱۳۹٤ از ۱۲٤ بیمار مبتلا به عفونت های دستگاه ادراری در بیمارستان های پیامبران و بقیه الله تهران جداسازی گردید. کشت باکتری بر روی محیط نوترینت براث (مرک، آلمان) و لاکتوز براث (مرک، آلمان) به مدت ٢٤ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس در گرمخانه انجام شد. سپس نمونه ها به محیط کشت مک کانکی آگار (مرک، آلمان) منتقل شده و تشخیص باکتری *کلبسیلا نمونیه* بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، میکروسکوپی و آزمون های بیوشیمیایی مختلف از جمله IMViC و TSI بر اساس روش های استاندارد آزمایشگاهی صورت گرفت (۱۱). جدایه های 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) (فرمنتاس، لیتوانی) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

ج) واکنش زنجیره ای پلی مراز: به منظور ردیابی ژن

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

سروتیپ کپسولی	پرایمر	توالی ('5'-3')	اندازه قطعه (bp)	منبع
K1	*MagAF1* *MagAR1*	GGTGCTCTTTACATCATTGC GCAATGGCCATTTGCGTTAG	۱۲۸۳	۱۲
K2	*K2wzy-F1* *K2wzy-R1*	GACCCGATATTCATACTTGACAGAG CCTGAAGTAAAATCGTAAATAGATGGC	٦٤١	۱۳
K5	*K5wzxF360* *K5wzxR639*	TGGTAGTGATGCTCGCGA CCTGAACCCACCCCAATC	۲۸۰	۱۳
K54	*wzxK54F* *wzxK54R*	CATTAGCTCAGTGGTTGGCT GCTTGACAAACACCATAGCAG	۸۸۱	۱
K57	*wzyK57F* *wzyK57R*	CTCAGGGCTAGAAGTGTCAT CACTAACCCAGAAAGTCGAG	۱۰۳۷	۱
rmpA	*rmpAF* *rmpAR*	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA CTTGCATGAGCCATCTTTCA	٥١٦	١٤
wcaG	*wcaGF* *wcaGR*	GGTTGGKTCAGCAATCGTA ACTATTCCGCCAACTTTTGC	١٦٩	١٥
16S-23S ITS	*K.pneumoniae Pf* *K.pneumoniae Pr1*	ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT TTCACTCTGAAGTTTTCTTGTGTTC	۱۳۰	١٦

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.

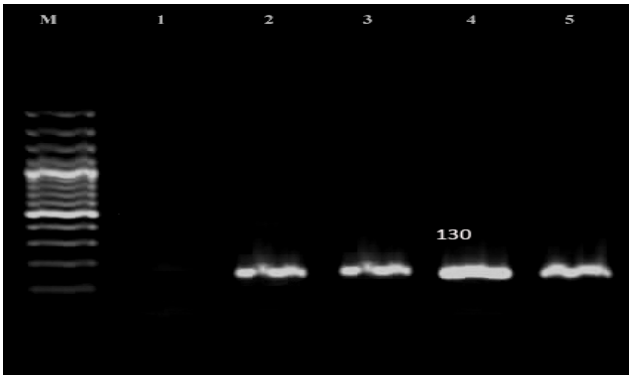
د) آنالیز آماری: داده های حاصل از نتایج به دست آمده در این مطالعه با نسخه شانزدهم نرم افزار آماری *SPSS* و آزمون های آماری مربع کای و دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد آنالیز قرار گرفتند.

یافته ها

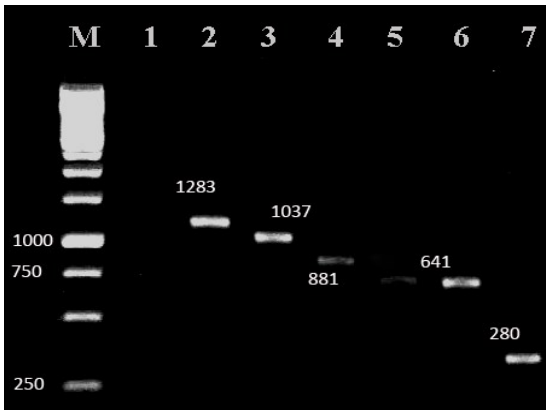
در این مطالعه به منظور شناسایی سروتیپ های کپسولی K1، K2، K5، K54 و K57 و حضور ژن های *cps* کد کننده کپسول (*rmpA* و *wcaG*) از روش Multiplex PCR استفاده شد. ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن های مورد مطالعه در شکل های ۱ تا ۳ آورده شده است. جدول ۲ نشان دهنده فراوانی انواع سروتیپ های کپسولی ردیابی شده

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

سروتیپ کپسولی	فراوانی (درصد)
K1	٤ (٨)
K2	٢٢ (٤٤)
K5	٣٠ (٦٠)
K54	٣٤ (٦٨)
K57	١٠ (٢٠)



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.



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 ٦٤١ 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 *rmpA* و *wcaG* از مجموعه ژنی *cps* در بین سروتیپ های کپسولی *کلبسیلا نمونیه*. M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱) کنترل منفی، ستون های ۲ تا ٤) نمونه های مورد مطالعه دارای قطعه ٥١٦ جفت بازی مربوط به ژن *rmpG* و قطعه ١٦٩ جفت بازی مربوط به ژن *wcaG*.

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

سروتیپ کپسولی	فراوانی *rmpA* (درصد)	فراوانی *wcaG* (درصد)
K1	(٥٠) ٢	(٠) ٠
K2	(٥٤/٥٤) ١٢	(٩/٠٩) ٢
K5	(٦٠) ١٨	(٠) ٠
K54	(٤٧/٠٥) ١٦	(١٧/٦٤) ٦
K57	(٠) ٠	(٠) ٠

در ٥٠ جدایه باکتری می باشد. در این میان سروتیپ کپسولی K54 با فراوانی ٦٨ درصد به عنوان بیشترین سروتیپ کپسولی و سروتیپ کپسولی K1 با فراوانی ٨ درصد به عنوان کمترین مقدار در بین انواع سروتیپ های کپسولی مورد مطالعه گزارش شد. همچنین ردیابی ژن های *rmpA* و *wcaG* 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 بیوسنتز کپسول پلی ساکاریدی در *کلبسیلا نمونیه* می باشد. در این حالت ایجاد کلنی های موکوئیدی به دلیل وجود ژن های کد شونده کروموزومی *rcs* و مقاومت در برابر عوامل فاگوسیتوزی و سایر عوامل باکتری کشی سرم در ارتباط با وجود ژن های کد شونده ی پلاسمیدی *rpmA* است (١٥).

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

آزمون های 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 گزارش های صورت گرفته نشان داده شده است که ژن *rmpA* در موارد زیادی به عنوان عامل بیماری زا نقش دارد (۱۵). در حالی که مطالعه زیادی بر روی ژن *wcaG* به عنوان یک عامل حدت *cps* صورت نگرفته است. ژن *wcaG* سبب کد کردن آنزیم ها با فعالیت اپی مرازی و دهیدراتازی می شود. فعالیت این آنزیم ها سبب تبدیل D-GDP-مانوز به D-GDP-فوکوز می شود. ردیابی ژن *wcaG* در بین سروتیپ های کپسولی جدایه ها در این مطالعه و فراوانی پایین آن می تواند حاکی از این موضوع باشد که احتمالا این ژن نقش کمتری را به عنوان یک فاکتور بیماری زا در ایجاد بیماری داشته باشد. حضور ژن های *cps* در اکثر جدایه های باکتریایی به این مفهوم است که وجود این ژن ها ارتباط مستقیمی با کد شدن کپسول پلی ساکاریدی داشته و با این وجود بیوسنتز کپسول پلی ساکاریدی باعث کاهش اتصال پپتیدهای ضد میکروبی به سطوح و در نتیجه افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری می گردد (۱۷).

سروتیپ های کپسولی K1 و K2 ایجاد کننده بیماری های مهمی از قبیل باکتریمی، عفونت دستگاه تنفسی، مننژیت، آبسه های کبدی و AML (Acut myeloid leukaemia) می باشند (۱۵). نقش ژن *magA* در ایجاد آبسه های کبدی اولین بار در سویه های بیماری زا در کشور تایوان مشخص گردید (٦ و ۱۸). این موضوع دلیل بر ایجاد آبسه های کبدی توسط سروتیپ کپسولی K1 می باشد. طبق نتایج به دست آمده در این بررسی تنها در ٤ درصد از جدایه ها، این سروتیپ ردیابی گردید. این مطلب نشان می دهد که هیچ گونه علایم بالینی مبنی بر آبسه چرکی در بیماران مورد مطالعه وجود ندارد. ژن *magA* هم چنین در ایجاد فنوتیپ های دارای چسبندگی زیاد و همچنین مقاومت به فاکتور های سرمی و فاگوسیتوز اهمیت دارد (۱۸).

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

ژن های *wzy* دارای فعالیت پلی مرازی و *wzx* دارای عملکرد فیلیپازی بوده و در انتقال واحد های 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 می باشند (۱۷).

همچنین در سال ۲۰۰۹، دوود (Doud) و همکاران سروتیپ K2 را از بیماران دارای آبسه های کبدی با ردیابی ژن *k2A* شناسایی کردند. یافته های آنها نشان داد که سروتیپ K2 عنوان دومین سویه غالب جدا شده از جدایه های مبتلا به آبسه های کبدی می باشد (۱۹). در پژوهشی دیگر که در سال ۲۰۰۸ توسط تورتون (Turton) و همکاران با استفاده از روش Multiplex PCR با ردیابی ژن های *magA*، *orf10* و *wzx* صورت گرفت، سروتیپ های K1، K2 و K5 در جدایه های مبتلا به آبسه های کبدی تشخیص داده شدند (۱۳). این موضوع می تواند دلیل بر نقش مهم این ژن ها در کد کردن کپسول پلی ساکاریدی (*cps*) باکتری باشد. بیان ژن *wcaG* در ارتباط با بیوسنتز تیپ های کپسولی K1 و K54 می باشد.

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

روش های متداولی مانند آزمون تورم کپسولی(Quellung) و

ایمونوالکتروفورزیس برای شناسایی سروتیپ های مختلف باکتری *کلبسیلا نمونیه* به کار می روند که به دلیل قیمت بالا و زمان طولانی آماده سازی آنتی سرم کمتر مورد استفاده قرار می گیرند (۲۰). یکی از دلایل تفاوت در نتایج مطالعه حاضر با مطالعات مشابه یاد شده، تفاوت در نوع نمونه مورد بررسی است. در مطالعه حاضر جدایه های باکتری از عفونت های دستگاه ادراری جدا شده در حالی که بیشتر مطالعات قبلی روی نمونه های مربوط به آبسه های کبدی انجام شده است.

نتیجه گیری

در روش PCR، تشخیص سریع با حساسیت بالا این امکان را نسبت به روش های سنتی در تشخیص حساس و دقیق این عامل بیماری زا و تیپ بندی آن فراهم آورده است. نتایج این تحقیق نشان داد که روش PCR چندگانه می تواند به عنوان یک روش سریع در شناسایی و تیپ بندی جدایه های باکتریایی ایجاد کننده عفونت های 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.

References

1. 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.
2. 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.
3. 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* isolatescarrying plasmid-mediated quinolone resistance determinants. Int J Antimicrob Agents. 2011; 37(4): 352-355.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Zamani A, Yousefi Mashouf R, Ebrahimzadeh NamvarA, 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-Zeppegno 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.

Journal of Microbial World
Volume 10, No. 1, April 2017

Original Article

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

Marziyeh Tavakol[1], **Hassan Momtaz**[2]

[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. pneumonia* isolates.

Material & Methods: This cross-sectional study was carried out on 50 *K. pneumonia* 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 pneumonia*, 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.