مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال۶۳ ، شماره۲
خرداد-تیر ۹۹، صفحه ۲۴۳۵-۲۴۲۷

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 63, No.2, P: 2427-2435
May-July 2020

مقاله اصلی

بررسی شیوع سروتیپ‌های کپسولی K1 و K2 در بین سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* (*Klebsiella pneumoniae*)جدا شده از عفونت‌های مجاری ادراری و زخم‌ها

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۸- تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۲/۲۵

فاطمه کشاورزی [*۱]
فریبا لاهورپور [۲]
رضوان دوستی پور [۳]

[۱] *دانشیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران*
[۲] *استادیار باکتری شناسی پزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران*
[۳] *کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران*

* گروه زیست شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
Email: fkeshavarzi@iausdj.ac.ir

خلاصه

مقدمه: باکتری *کلبسیلا پنومونیه*(*Klebsiella pneumoniae*)، یک باکتری گرم منفی و یکی از علل عمده عفونت‌های بیمارستانی به ویژه عفونت‌های مرتبط با مجاری ادراری می‌باشد. هدف از این پژوهش تعیین سروتیپ‌های کپسول دار K1 و K2 در نمونه‌های جمع آوری شده از بیمارستان‌های شهر کرمانشاه است.

روش کار: مطالعه حاضر یک مطالعه مقطعی- توصیفی است. نمونه‌ها از بیمارانی با عفونت ادراری و یا زخم‌های ایجاد شده از سوختگی جمع آوری شد. سروتیپ نمونه‌ها با استفاده از روش مبتنی بر تکثیر زنجیره پلی مرازی (PCR) با پرایمرهای برای ژن‌های *magA* و *wzy* از خوشه ژنی CPS که به ترتیب برای بیوسنتز کپسول‌های پلی ساکاریدی K1 و K2 ضروری است، بعد از اثبات باکتری با روش فنوتیپیک، تعیین گردید.

نتایج: یافته‌ها نشان داد که از ۶۰ نمونه تایید شده در بررسی‌های فنوتیپیک با نسبت مساوی ۱ به ۱ از نمونه‌های ادرار و زخم، ۳۷ نمونه(۶۱/۶۷٪) متعلق به سروتیپ K1 و ۲۳ نمونه(۳۸/۳۳ ٪) متعلق به سروتیپ K2 بود. همچنین در میان نمونه‌های ادرار بیماران ،۲۲نمونه(۷۳/۳۳٪)سروتیپ K1 داشتند و در میان نمونه‌های متعلق به زخم‌های ایجاد شده ناشی از سوختگی ۲۱ نمونه (۷۰٪)سروتیپ K1 و۹ نمونه (۳۰٪) سروتیپ K2 را داشتند

نتیجه گیری: شیوع سروتیپ K1 در جمعیت مورد مطالعه در هر دو نمونه ادرار و سوختگی بیشتر بود.

کلمات کلیدی: *کلبسیلا پنومونیه*، Colony-PCR، *magA*، *wzy*

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*) باکتری گرم منفی، که باعث ایجاد بیماری‌هایی با منشأ بیمارستانی از جمله پنومونی، عفونت مجاری ادراری، عفونت خونی و عفونت زخم می‌گردد (۱). شیوع عفونت‌ها توسط این باکتری را می‌توان به عنوان یک عفونت فرصت طلب به خصوص در افراد ناتوان و ضعیف در نظر داشت(۲). شیوع گونه‌های کلبسیلای مقاوم به چند دارو یکی از مسائل مهم می‌باشد که کنترل بیماری‌های عفونی مرتبط با این باکتری را در سال‌های اخیر مشکل کرده است (۳). در سال‌های اخیر شیوع گسترده‌ای از عفونت‌های با منشا بیمارستانی*کلبسیلا پنومونیه* که در شمار بیماری‌های جمعیتی شناخته شده است، در مناطقی از آسیا و خاورمیانه گزارش شده است (۳). بیشتر جدایه‌های پزشکی *کلبسیلا پنومونیه* توسط یک کمپلکس ضخیم از ساختار پلی ساکاریدی اسیدی شامل زیر واحدهای قندی ۴-۶ کپسوله سازی شده است. تا کنون پلی ساکاریدهای کپسولی در ۷۸ سروتیپ جداسازی، دسته بندی و شناسایی شده است که به عنوان آنتی ژن K نیز نام برده می‌شود. حضور این کپسول برای بیماری زایی *کلبسیلا پنومونیه* ضروری می‌باشد (۴-۱۰). کپسول باعث بازداری فاگوسیت شدن باکتری توسط ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها شده و از اتصال عوامل ضد میکروبی سرم به غشا کلبسیلا جلوگیری می‌کند. در این بین جدایه‌های سروتیپ K1 و K2 بیش‌ترین میزان و شدت بیماری را نسبت به دیگر جدایه‌های غیر کپسول‌دار از خود نشان می‌دهند (۸-۱۴). این مسئله نشان می‌دهد که فاگوسیت شدن *کلبسیلا پنومونیه* به صورت چند عاملی بوده و خود کپسول برخی از عوامل ایجاد بیماری را در بر دارد و تأکید می‌کند که سروتیپ‌های کپسول‌دار شیوع و بیماری زایی متعادلی را نسبت به دیگر سویه‌ها دارند (۱۴). ژن *magA* در خوشه CPS در باکتری *کلبسیلا پنومونیه* در سروتیپ K1 قرار دارد و به عنوان یک ژن بیماری زا شناسایی شده است. ژن *magA* با حفظ شدگی بالای ۹۸/۱٪ برای جدایه‌های بیمارانی با آبسه کبدی با عامل *کلبسیلا پنومونیه* گزارش شده است (۷). جهش در ژن *magA* باعث از بین رفتن کامل مقاومت در سرم و افزایش فعالیت فاگوسیتوزی ۱۰۵ برابری می‌گردد که در نمونه‌های بررسی شده در موش گزارش شده است (۸). در چندین مطالعه باکتری شناسی گزارش شده است که ژن *magA* در سروتیپ K1 عامل بیماری زایی این باکتری در بیماری‌هایی همچون آبسه کبدی است. همچنین در سروتیپ K2 ژن *rmpA* تولید اگزوپلی‌ساکاریدهایی را می‌کند که فاکتور بیماری‌زا بوده و در همین راستا ارتباط بین فسفریلاسیون تیروزین و بیماری‌زایی باکتری اثبات شده است(۱۵- ۱۶). علاوه بر این، درجه بیماری‌زایی ایجاد شده با سروتیپ‌های کپسول‌دار به میزان موناز موجود در Capsular (Polysaccharide Synthesis) CPS بستگی دارد. CPSهای دارای توالی‌های تکراری با ساختار قندی توسط گیرنده‌های ماکروفاژی شناسایی شده‌اند که وجود آنها افزایش ماکروفاژ و کشتن متعاقب باکتری را به همراه دارد (۱۵). CPSهای K2، تکرار توالی قندی را نداشته و لذا این ویژگی باعث کاهش فاگوسیتوز به واسطه گیرنده و شیوع بیشتر این سروتیپ را می‌شود (۱۶). *magA* و *rmpA2*به عنوان نشانگرهای بسیار خوب برای شناسایی سریع آبسه کبدی مورد استفاده واقع شده‌اند (۸). ژن *rmpA* و *rmpA2* متعلق به خانواده ژنی UhpA-LuxR از فاکتورهای رونویسی هستند. این خانواده شامل ژن‌های *rcsA* و *rcsB* نیز می‌باشد که به عنوان ژن‌های تنظیم کننده برای سنتز کپسول شناخته می‌شوند (۹). اثر متقابل پروتئین‌های RscA، RmpA و یا RmpA2 با پروتیئن RscB یک هترو دایمر را برای ایجاد اتصال ویژه به پروموتور CPS ایجاد می‌کند که آغازگر فرآیند رونویسی می‌باشد. این تنظیم از CPS توسط پروتئین RscA، RmpA یا RmpA2 با توجه به دما هماهنگی داشته و تولید CPS در حداکثر حالت خود زمانی که باکتری در سطح رشدی پایین است، صورت می‌گیرد (۱۰-۱۴). از آنجایی که بیوسنتز کپسول در *کلبسیلا پنومونیه* توسط یک سیستم تنظیم دو جزیی کنترل می‌شود عامل مشارکت ممکن است به منظور افزایش بیوسنتز

CPS در پاسخ به شرایط مختلف محیطی دخیل باشد (۱۶-۱۵). مطالعات نشان می‌دهد که ژن *MagA* و *RmpA* یا *RmpA2* ابزار مولکولی بسیار مناسب برای تعیین بیماری زایی در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* است که آبسه کبدی را به همراه دارد. در بیشتر موارد گزارش شده از این بیماری سروتیپ‌های K1 و K2 بیشترین شیوع را به دلیل وجود ژن‌های بیماری‌زا *magA* و *rmpA* (*RmpA2*) داشته‌اند(۲۱- ۱۷). شناسایی و بررسی مولکولی این باکتری در بخش‌های مختلف بیمارستانی در بیماران مختلف با استفاده از تکنیک‌های مولکولی و تعیین رابطه این گونه با بیماری‌های ایجاد شده می‌تواند کمک شایانی در پیشگیری و درمان بیماری‌های عفونی ایجاد شده بنماید و به لحاظ جلوگیری در شیوع گسترده بیماری حائز اهمیت است. بر این اساس هدف از پژوهش جاری تعیین شیوع سروتیپ‌های کپسولی K1 و K2 در نمونه‌های جمع آوری شده از بیمارستان‌های امام خمینی و امام علی شهر کرمانشاه می‌باشد. از آنجا که طبق مطالعات گذشته رایج‌ترین محل شیوع این بیماری نواحی تنفسی، مجاری ادراری و زخم‌های سطحی اشخاص مبتلا شده می‌باشد، نمونه‌های مورد بررسی از ادرار و زخم بیماران جمع آوری شده و بعد از اثبات باکتری با روش فنوتیپیک، سروتیپ آنها با استفاده از تکنیک PCR با پرایمرهای برای ژن‌های *magA* و *wzy* از خوشه ژنی CPS که به ترتیب برای بیوسنتز کپسول‌های پلی ساکاریدی K1 و K2 ضروری است، تعیین می گردد(۲۲-۲۶).

روش کار

تهیه نمونه‌های باکتری

مطالعه حاضر بر روی نمونه‌های جمع آوری شده در فاصله زمانی ۴ ماه اول سال۹۵ انجام شده است. در این فاصله زمانی نمونه‌های بالینی (زخم و ادرار) تأیید شده توسط آزمایشگاه بیمارستان، از بیماران مختلف مراجعه کننده به بخش عفونی بیمارستان‌های امام خمینی و امام علی کرمانشاه بدون در نظر گرفتن سن، جنس و با داشتن سابقه بستری با کسب رضایت از بیماران از آزمایشگاه تحویل گرفته شده و به آزمایشگاه دانشگاه انتقال داده شد. روش نمونه گیری به صورت غیر احتمالی – داوطلبی بود و جهت برآورد حداقل حجم نمونه از فرمول برآورد نسبت($n = \frac{Z_{1-\frac{\alpha}{2}}^2 P(1-P)}{d^2}$ با d=0.6 , Z= 1.96 ,P=0.5,) استفاده شد.

کشت نمونه‌ها

در ابتدا کلیه نمونه بر روی هر دو محیط کشت‌های EMB، بلاد آگارکشت داده شدند تا گرم منفی بودن آنها تأیید شود و در ادامه بر روی آنها رنگ آمیزی گرام هم صورت گرفت.

انجام رنگ آمیزی و تست‌های افتراقی جهت تشخیص نوع باکتری

پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون بر روی نمونه‌های باکتریایی رشد یافته بعد از رنگ آمیزی گرام، تست‌های افتراقی شامل کاتالاز، سیترات، تحریک و تولید اندول، MR-VP، اوره آز، اکسیداز و کشت در محیط TSI انجام شد.

ذخیره سازی نمونه‌های مثبت ایزوله شده

برای نگهداری سویه‌ها از محیط LB Luria Bertani (Broth) استفاده شد. پس از تهیه محیط و ریختن ۸۰۰ لاندا از آن در ویال‌های ۱/۵ میکرولیتری به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در فشار ۱۵ پوند اتوکلاو شدند. سپس چند کلنی خالص از روی محیط جامد برداشته و در شرایط استریل به محیط مزبور تلقیح شده و کاملا حل شد و به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس به ویال-هایی که حاوی ۸۰۰ لاندا محیط LB حاوی باکتری رشد یافته، ۲۰۰ لاندا گلیسرول اضافه و مخلوط شد و بعد داخل کرایوتیوب‌های استریل چند پرل استریل قرار گرفت و پس از چند بار اینورت کردن مستقیما در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد قرار گرفت.

تهیه‌ی کشت فعال

محیط کشت LB که از قبل تهیه شده بود در دمای محیط قرار داده شد. سپس یک لوپ پر از کلنی باکتری کشت داده شده بر روی نوترینت آگار در مرحله قبل برداشته و داخل محیط مایع LB فرو برده شد و چند ثانیه در داخل محیط تکان داد شد تا کلنی از لوپ رها شود. سپس محیط LB که باکتری وارد آن

شـده در دمـای ۳۷ درجـه بـه مـدت ۲۴ سـاعت در انکوبـاتور شیکردار در دور rpm ۱۳۰ انکوبه شد.

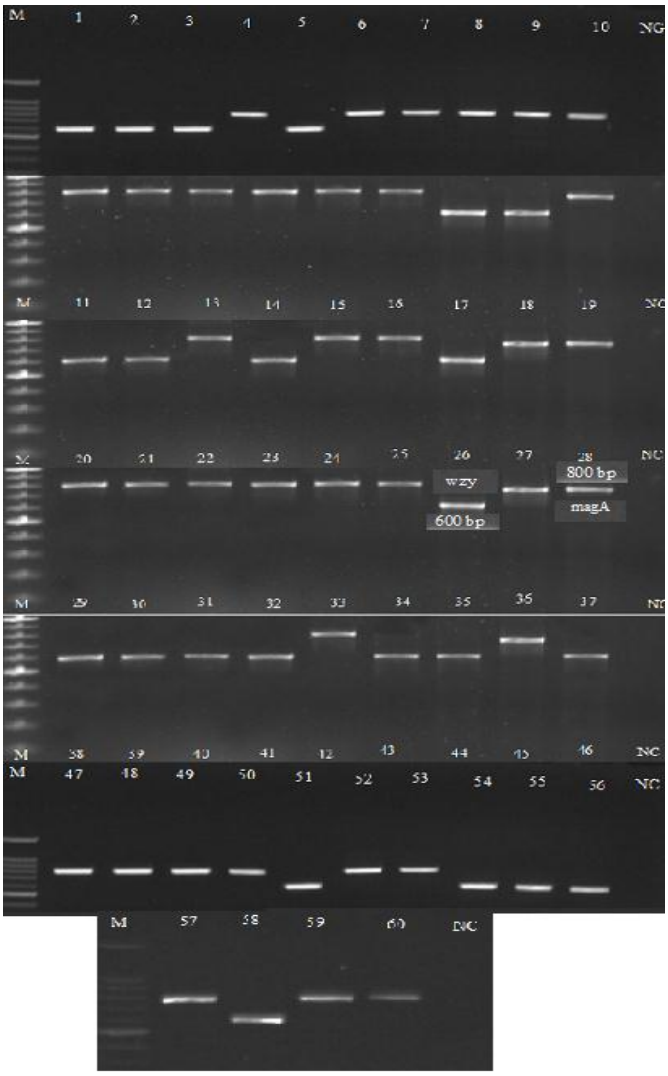
واکنشColony multiplexPCR برای شناسایی ژن‌های بیماری‌زایی *magA* و *rmpA2*

توالی پرایمرها عبارت بود از: *magAF*; GGTGCTCTTTACATCATTGC و *magA*R; GCAATGGCCATTTGCGTTAG و *rmpAF*: GACCCGATATTCATACTTGACAGAG و *rmpAR*; *CCTGAAGTAAAATCGTAAATAGATGGC* (۲۶).

پرایمرها برای ساخت به شرکت Bioneer کره جنوبی سفارش داده شد. Colony multiplexPCR در حجم نهایی ۲۰ لاندا با استفاده از کیت ACC Power PCR(Premix)(Bioneer)و بر اساس دستورالعمل کیت با استفاده از دستگاه ترموسایکلر شرکت BIO-RAD انجام شد. برای انجام colony PCR جهت تکثیر ژن‌های *rmpA(wzy)* و *magA*، چند کلونی رشد یافته بر روی محیط اختصاصی به داخل ماستر میکس پری میکس انتقال یافت و مخلوط به دست آمده بعد از مخلوط کردن کامل در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. ژن‌های هدف در ترموسایکلر با برنامه‌ای شامل واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۲ چرخه شامل واسرشت شدن (Denaturation) در ۹۴ درجه سانتی گراد، به مدت ۳۵ثانیه، اتصال (Annealing) در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۵ ثانیه و گسترش (Extention) در ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ۳۵ ثانیه، سپس گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه صورت گرفت. در این بررسی از سایز مارکر (bp)۱۰۰ جهت مشخص نمودن اندازه باندها استفاده گردید. پس از اتمام واکنش، محصولات PCRتوسط الکتروفورز ژل آگارز۱/۳٪ با ولتاژ ۷۵ میلی ولت اجرا شد و با استفاده از دستگاه UVItech از ژل تصویر برداری به عمل آمد.

نتایج

نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون PCR بر پایه تکثیر نواحی ژنی *magA* برای سروتیپ K1 و *wzy*(*RmpA*) برای سروتیپ K2 برای تکثیر قطعات به ترتیب ۸۰۰ بازی و ۶۰۰ بازی صحت عملکرد و دقت بالای آغازگرهای طراحی شده برای شناسایی سروتیپ‌ها را نشان داد(شکل ۱). نتایج نشان داد که از ۶۰ نمونه تأیید شده در بررسی‌های فنوتیپیک با نسبت مساوی ۱ به ۱ از نمونه‌های ادرار و زخم، ۳۷ نمونه(۶۱/۶۷٪) متعلق به سروتیپ K1 و ۲۳ نمونه(۳۸/۳۳٪) متعلق به سروتیپ K2 بود(شکل ۱). همچنین در میان نمونه‌های ادرار بیماران،۲۲نمونه (۷۳/۳۳ ٪) سروتیپ K1 داشتند و در میان نمونه‌های متعلق به زخم‌های ایجاد شده ناشی از سوختگی ۲۱ نمونه(۷۰٪) سروتیپ K1 و۹ نمونه(۳۰٪) سروتیپ K2 را داشتند(جداول ۱و ۲).



شکل ۱- تصویر الگوهای باندی به دست آمده از محصولات PCR بر پایه تکثیر نواحی ژنی *magA* برای سروتیپ K1 و *wzy* (*RmpA*) برای سروتیپ K2 برای تکثیر قطعات به ترتیب ۸۰۰ بازی و ۶۰۰ بازی برای هر ۶۰ نمونه.

جدول ۱- فراوانی سروتیپ‌های کپسولی K1 و K2 در ۶۰ سویه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های ادرار و زخم بیماران

سروتیپ کپسولی	درصد(فراوانی)
K1	(۳۷)۶۱/۶۷
K2	(۳۸/۳۳)۲۳
مجموع	۱۰۰

جدول ۲- فراوانی سروتیپ‌های کپسول دار K1 و K2 در ایزوله جدا شده از نمونه‌های ادرار و زخم بیماران

نوع نمونه	فراوانی سروتیپ کپسولی K1	فراوانی سروتیپ کپسولی K2
نمونه‌های ادرار	(۰/۷۴)۲۲	(۰/۲۶)۸
نمونه‌های زخم	(۰/۷)۲۱	(۰/۳)۹

بحث

سویه‌های توالی یابی شده *کلبسیلا پنومونیه* دارای ۸ ژن *galF*، اسید *PPC*، wzi، wza، wzb، wzc، gnd و *ugd* می‌باشد که حفظ شدگی بالایی را در خوشه ژنی CPS نشان می‌دهند (۲۴). نواحی سیس افزایش دهنده رونویسی در بالادست بسیاری از توالی‌های ژن‌های ساختاری پلی ساکاریدها و جود دارد همچنین نواحی انتی ترمیناتور یا ضد خاتمه رونویسی در خوشه CPS قرار دارند که در بالا دست ژن *wzi* مستقر می‌باشند. ژن‌های *wza*، *wzb* و *wzc* یک مسیر ساختاری جابه جایی را برای CPSهای سطحی سلول به همراه دارند. ناحیه نام برده شده به نام ناحیه ۱ باعث کد شدن پپتیدهای مورد نیاز برای جا به جایی پلی ساکاریدها برای خروج از پری پلاسم و غشای خارج سلولی می‌شود. ناحیه موجود در ادامه این ژن‌ها مختص یک سروتیپ بوده و برای بیوسنتز و پلیمریزاسیون واحدهای تکراری الیگوساکاریدی پاسخ گو است (۲۴). CPSدر *کلبسیلا پنومونیه* یک دفاع غیر اختصاصی را در برابر مکانیسم دفاعی میزبان همانند یک فرآیند آبشاری و پشت سر هم دارد که نقش بسیار حیاتی را در سیستم دفاع اولیه میزبان در برابر هجوم پاتوژن‌ها ایفا می‌کند (۲۵). در مطالعات انجام شده در شرایط *Invitro* نشان داده شده است که CPS باعث بازداری از اجزا مشارکت C3 در سطح باکتری می‌شود و از تشکیل کمپلکس حمله به غشا باکتری جلوگیری به عمل می‌آورد (۲۳). سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* باعث بیان مقادیر بسیار اندکی از CPS می‌شود که می‌تواند باعث افزایش فعالیت اجزا با افزایش C3 شده و از ایجاد شرایط کشتن به واسطه فاگوسیتوزیس جلوگیری به عمل آورد (۱۳).

ژن *magA* در خوشه CPS در باکتری *کلبسیلا پنومونیه* در سروتیپ K1 قرار دارد که به عنوان ژنی با توانایی بالای بیماری زائی باکتری شناسایی شده است (۷). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که *magA* یک ابزار مولکولی بسیار مناسب برای تعیین بیماری زایی در سویه‌های از *کلبسیلا پنومونیه* است، که آبسه کبدی را به همراه دارد. *magA* و *rmpA* به عنوان نشانگرهای بسیار خوب در مطالعات پیشین برای شناسایی سریع آبسه کبدی بکار رفته‌اند(۸).

در پژوهش جاری از بیشتر بیماران نمونه گیری شده با زخم ناشی از سوختگی و یا عفونت ادراری سروتیپ K1 *کلبسیلا پنومونیه* جداسازی شد. ژن‌های *magA* و*rmpA2* دو کد کننده پروتئین‌های سطحی دخیل در ایجاد بیماری هستند که برای شناسایی سروتیپ‌ها در این تحقیق از آنها استفاده شد (۱۶-۱۸). در این بررسی از ۶۰ نمونه تایید شده ۶۱/۶۷٪ متعلق به سروتیپ K1 و ۳۸/۳۳٪ متعلق به سروتیپ K2 بود(شکل ۱). همچنین در میان نمونه‌های ادرار و زخم سوختگی بیماران بترتیب،۷۳/۳۳ و ۷۰٪ سروتیپ K1 داشتند(جداول ۱و ۲).

Yeh به مطالعه عوامل بیماری زایی *کلبسیلا پنومونیه* بر پایه تکثیر نواحی ژن‌های *rmpA* و *magA* درسنگاپور و تایوان پرداخت. مطالعه او و همکارانش بر روی ۷۳ نمونه ایزوله، شیوع سروتیپ‌هایK1 به میزان ۴۶/۶٪ و K2 به میزان ۲۰/۵٪ را نشان داد و اهمیت ژن‌های *magA* و *rmpA* را به عنوان فاکتورهای کلیدی در شناسایی سروتیپ‌های کلبسیلا در مطالعات جمعیتی مشخص کرد (۷). نتایج این مطالعه تا حدودی با بررسی های انجام شده در مطالعه حاضر هم خوانی دارد. در بررسی گیرچینسکی[1] و همکارانش در یک بررسی جمعیتی ۱۴۷ نفری بر روی جدایه‌های کلبسیلا به عنوان یکی از باکتری‌های مهم و دخیل در ایجاد عفونت‌های با منشأ بیمارستانی با استفاده از تکنیک PCR، نشان دادند که ۶۹٪ افراد دارای سروتیپ K1 و ۳۱٪ باقی سروتیپ K2 را داشتند و سروتیپ K1 شیوع بسیار بالاتری را از خود نشان داد. او خاطر نشان کرده که ژن‌های موجود در خوشه ژنی CPS در بین سویه‌ها می‌تواند به عنوان یک ابزار مفید و کارا در شناسایی سروتیپ‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی مورد استفاده قرار گیرد(۱۹). نتایج مطالعه گیرچینسکی بررسی ما را تأیید می‌کند. بسیاری از مطالعات پیشین برای شناسایی مولکولی سروتیپ‌ها از ژن‌هایی نظیر*wzi*، *wcaG*، *wzc* و orf-10 استفاده نموده‌اند. در مطالعاتی که

[1] Gierczynski

توسط فیض آبادی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در تهران جهت شناسایی سروتیپ‌های K1 و K2 بر روی ۸۹ فرد بر پایه ژن‌های دیگری دخیل در خوشه ژنی CPS یعنی *wzc* و *Orf10* انجام شد، مشخص شد از بین کل جمعیت مورد مطالعه، ۱۶٪ سروتیپ K1 و ۱۱٪ سروتیپ K2 داشتند(۲۰). نتایج این مطالعه با درصدهای به دست آمده از این تحقیق هماهنگ نیست ولی شیوع بیشتر سروتیپ K1 را تأیید می‌کند، لازم به ذکر است ژن مورد بررسی هم متفاوت است. در بررسی‌های صورت گرفته توسط زمانی و همکاران در سال ۲۰۱۳ جهت شناسایی *کلبسیلا پنومونیه با تکثیر ژن magA* در جدایه‌های بالینی از بیمارستان‌های همدان در طول ۱۲ ماه، در بین ۱۰۵ نمونه جمع آوری شده ۹۵٪ نمونه‌ها به عنوان *کلبسیلا پنومونیه* شناسایی شده و ژن *magA* نیز در ۳۰٪ نمونه‌ها شناسایی گردید (۲۱). در مطالعات ژنوتیپی و فنوتیپی و همچنین الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های پزشکی *کلبسیلا پنومونیه* توسط خامصی پور و تاجبخش بر روی ۹۰ جدایه گرفته شده از بیمارستان‌های شهرکرد با تکثیر ژن‌های *magA* و *rmpA* نشان داده شد که ۱۴/۴۴ درصد نمونه‌ها مرتبط با سروتیپ K1 و ۱۶/۶۶ درصد مرتبط با سروتیپ کپسول دار K2 است (۲۳). این نتایج با نتایج مطالعه حاضر مغایر می‌باشد.

نتیجه گیری

شیوع سروتیپ K1 در هر دو نمونه ادرار و سوختگی در جمعیت مورد مطالعه، بالاتر بود. به علاوه نتایج آزمایش دقت و هزینه پایین‌تر تکنیک colony PCR را در انجام این آزمایش و آزمایشات مشابه نشان داد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از نتایج پایان نامه کارشناسی ارشد دانشجوی دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد سنندج سرکار خانم رضوان دوستی پور است. نویسندگان این مقاله از همکاری صمیمانه مدیریت بیمارستان‌های امام خمینی و امام علی کرمانشاه و پرسنل آزمایشگاه بیمارستان تشکر و قدردانی دارند.

References

1. Vali L, Dashti AA, Jadaon MM, El-Shazly S. The emergence of plasmid mediated quinolone resistance qnrA2 in extended spectrum β-lactamase producing Klebsiella pneumoniae in the Middle East. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015 Dec 1;23(1):34.
2. Turton JF, Englender H, Gabriel SN, Turton SE, Kaufmann ME, Pitt TL. Genetically similar isolates of Klebsiella pneumoniae serotype K1 causing liver abscesses in three continents. Journal of medical microbiology. 2007 May 1;56(5):593-7.
3. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, Grimont P. Virulent clones of Klebsiella pneumoniae: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. PloS one. 2009 Mar 25;4(3):e4982.
4. Lau HY, Clegg S, Moore TA. Identification of Klebsiella pneumoniae genes uniquely expressed in a strain virulent using a murine model of bacterial pneumonia. Microbial pathogenesis. 2007 Apr 1;42(4):148-55.
5. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of Klebsiella pneumoniae nosocomial isolates. Journal of clinical microbiology. 2005 Aug 1;43(8):4178-82.
6. Pan YJ, Lin TL, Chen YH, Hsu CR, Hsieh PF, Wu MC, Wang JT. Capsular types of Klebsiella pneumoniae revisited by wzc sequencing. PloS one. 2013 Dec 9;8(12):e80670.
7. Yeh KM, Lin JC, Yin FY, Fung CP, Hung HC, Siu LK, Chang FY. Revisiting the importance of virulence determinant magA and its surrounding genes in Klebsiella pneumoniae causing pyogenic liver abscesses: exact role in serotype K1 capsule formation. The Journal of infectious diseases. 2010 Apr 15;201(8):1259-67.
8. Chuang YP, Fang CT, Lai SY, Chang SC, Wang JT. Genetic determinants of capsular serotype K1 of Klebsiella pneumoniae causing primary pyogenic liver abscess. The Journal of infectious diseases. 2006 Mar 1;193(5):645-54.
9. Cryz SJ, Mortimer PM, Mansfield V, Germanier R. Seroepidemiology of Klebsiella bacteremic isolates and implications for vaccine development. Journal of Clinical Microbiology. 1986 Apr 1;23(4):687-90.
10. Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. A novel virulence gene in Klebsiella pneumoniae strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. The Journal of experimental medicine. 2004 Mar 1;199(5):697-705.

11. Ofek IT, Kabha KI, Athamna AB, Frankel G, Wozniak DJ, Hasty DL, Ohman DE. Genetic exchange of determinants for capsular polysaccharide biosynthesis between Klebsiella pneumoniae strains expressing serotypes K2 and K21a. Infection and immunity. 1993 Oct 1;61(10):4208-16.
12. Kabha K, Nissimov L, Athamna A, Keisari Y, Parolis H, Parolis LA, Grue RM, Schlepper-Schafer J, Ezekowitz AR, Ohman DE. Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in Klebsiella pneumoniae. Infection and immunity. 1995 Mar 1;63(3):847-52.
13. Cortés G, Borrell N, de Astorza B, Gómez C, Sauleda J, Albertí S. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of Klebsiella pneumoniae in a murine model of pneumonia. Infection and immunity. 2002 May 1;70(5):2583-90.
14. Izquierdo L, Coderch N, Piqué N, Bedini E, Corsaro MM, Merino S, Fresno S, Tomás JM, Regué M. The Klebsiella pneumoniae wabG gene: role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence. Journal of bacteriology. 2003 Dec 15;185(24):7213-21.
15. Lai YC, Peng HL, Chang HY. RmpA2, an activator of capsule biosynthesis in Klebsiella pneumoniae CG43, regulates K2 cps gene expression at the transcriptional level. Journal of bacteriology. 2003 Feb 1;185(3):788-800.
16. Podschun R, Sievers D, Fischer A, Ullmann U. Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis, and serum resistance of Klebsiella isolates causing human urinary tract infections. Journal of infectious diseases. 1993 Dec 1;168(6):1415-21.
17. Struve C, Bojer M, Nielsen EM, Hansen DS, Krogfelt KA. Investigation of the putative virulence gene magA in a worldwide collection of 495 Klebsiella isolates: magA is restricted to the gene cluster of Klebsiella pneumoniae capsule serotype K1. Journal of medical microbiology. 2005 Nov;54(Pt 11):1111-3.
18. Yeh KM, Kurup A, Siu LK, Koh YL, Fung CP, Lin JC, Chen TL, Chang FY, Koh TH. Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for Klebsiella pneumoniae liver abscess in Singapore and Taiwan. Journal of clinical microbiology. 2007 Feb 1;45(2):466-71.
19. Gierczynski R, Jagielski MA, Rastawicki WA, Kaluzewski S. Multiplex-PCR assay for identification of Klebsiella pneumoniae isolates carrying the cps loci for K1 and K2 capsule biosynthesis. Polish Journal of Microbiology. 2007;56(3):153.
20. Feizabadi MM, Raji N, Delfani S. Identification of Klebsiella pneumoniae K1 and K2 capsular types by PCR and quellung test. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013 Nov 1;6(9).
21. Feizabadi MM, Raji N, Delfani S. Identification of Klebsiella pneumoniae K1 and K2 capsular types by PCR and quellung test. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013 Nov 1;6(9).
22. Onori R, Gaiarsa S, Comandatore F, Pongolini S, Brisse S, Colombo A, Cassani G, Marone P, Grossi P, Minoja G, Bandi C. Tracking nosocomial Klebsiella pneumoniae infections and outbreaks by whole-genome analysis: small-scale Italian scenario within a single hospital. Journal of clinical microbiology. 2015 Sep 1;53(9):2861-8.
23. Khamesipour F, Tajbakhsh E. Analyzed the genotypic and phenotypic antibiotic resistance patterns of Klebsiella pneumoniae isolated from clinical samples in Iran.
24. Rahn A, Drummelsmith J, Whitfield C. Conserved organization in the cps gene clusters for expression of Escherichia coli group 1 K antigens: relationship to the colanic acid biosynthesis locus and the cps genes from Klebsiella pneumoniae. Journal of bacteriology. 1999 Apr 1;181(7):2307-13.
25. Nypaver CM, Thornton MM, Yin SM, Bracho DO, Nelson PW, Jones AE, Bortz DM, Younger JG. Dynamics of Human Complement–Mediated Killing of Klebsiella pneumoniae. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2010 Nov;43(5):585-90.
26. · 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 microbiology letters. 2008 Jul 1;284(2):247-52.

Original Article

Prevalence of K1 and K2 capsular serotypes among *Klebsiella pneumonia* strains isolated from urinary tract and wound infections

Received: 07/02/2018 - Accepted: 14/05/2020

Fatemeh Keshavarzi[1*]
Fariba Lahoorpour[2]
Rezvan Doustipour [3]

[1]*Associate Professor of Molecular Genetics, Department of Biology, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran*
[2]*Assistant Professor of Bacteriology, Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran*
[3]*MSc of Microbiology, Department of Biology, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran*

* Department of Biology, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

Email: fkeshavarzi@iausdj.ac.ir

Abstract

Introduction: *Klebsiella pneumonia*, a gram-negative bacterium, is one of the leading causes of nosocomial infections, especially in the urinary tract. The current study aimed to determine K1 and K2 capsule serotypes in samples collected from hospitals in Kermanshah.

Materials and Methods: This study was descriptive cross-sectional research. The samples were collected from patients with urinary tract infections or wounds caused by burns between the first 4 months of 2016. The serotype of samples was determined using the polymerase chain reaction (PCR) method with primers for magA and wzy genes which belong to the CPS gene cluster and are necessary for the biosynthesis of K1 and K2 capsular polysaccharides, respectively, after approving bacteria by the phenotypic method.

Results: The findings showed that out of 60 samples approved in phenotypic studies with a 1: 1 ratio of urine and wound samples, 37 (61.67%) samples belonged to K1 and 23 (38.33%) samples to K2 serotype. Moreover, among the urine samples of patients, 22 (73.33%) samples had K1 serotype. On the other hand, out of the samples belonging to wounds caused by burns, 21(70%) and 9(30%) samples had K1 and K2 serotype, respectively.

Conclusion: As evidenced by the obtained results, the prevalence of K1 serotype was higher in both urine and burn samples in the study population.

Key words: *Klebsiella pneumonia*, Colony PCR, *magA*, *wzy*
Acknowledgement: There is no conflict of interest.