DOI: 10.22122/jims.v39i647.14366 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و نهم/شماره‌ی ۶۴۷/هفته‌ی سوم دی ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۲۱ تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۱۰/۲۱

ردیابی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین با استفاده از روش Multiplex Polymerase Chain Reaction در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه

منار ناجی حمد[۱]، محبوبه نخعی مقدم[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کلبسیلا پنومونیه، پاتوژن فرصت‌طلب و یکی از عوامل شایع عفونت‌های بیمارستانی است که امروزه برخی از سویه‌های آن در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده و درمان عفونت را دشوار کرده‌اند. هدف از انجام پژوهش حاضر، استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه (Multiplex polymerase chain reaction یا Multiplex PCR) به منظور ردیابی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه بود.

روش‌ها: پس از جمع‌آوری نمونه‌های بالینی از بیمارستان‌های رضوی و قائم مشهد در سال ۱۳۹۹، جداسازی و شناسایی کلبسیلا پنومونیه با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی (پرایمر اختصاصی Kp16S rRNA) انجام شد. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای ۳۰ ایزوله‌ی شناسایی شده به روش دیسک دیفیوژن تعیین گردید. پس از طراحی پرایمر و Blast، ردیابی ژن‌های tet با روش PCR بهینه‌سازی شد. در نهایت، تکنیک Multiplex PCR با استفاده از سه جفت پرایمر و شاهد مثبت بهینه‌سازی شد.

یافته‌ها: بیشترین و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها به ترتیب شامل آمپی‌سیلین (۹۰/۰ درصد) و سفتریاکسون (۲۶/۷ درصد) بود و ۵۳/۳ درصد ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه از نظر فنوتیپی به تتراسایکلین مقاوم بودند. Multiplex PCR با دمای اتصال ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بهینه‌سازی شد. هم‌زمان با ردیابی ژن Kp16S rRNA، ژن‌های tetA و tetB به ترتیب در ۸۷/۵ و ۶۸/۷ درصد از ایزوله‌های مقاوم به تتراسایکلین ردیابی شدند. ۵۶/۲ درصد ایزوله‌ها به طور هم‌زمان هر دو ژن tetA و tetB را حمل می‌کردند و ۱۲/۵ درصد ایزوله‌ها حامل یکی از ژن‌های tetA و یا tetB بودند.

نتیجه‌گیری: تکنیک Multiplex PCR طراحی شده در مطالعه‌ی حاضر، روشی سریع، دقیق و حساس به منظور شناسایی کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌باشد که می‌تواند برای نمونه‌های بالینی و یا در تحقیقات اپیدمیولوژیک استفاده شود.

واژگان کلیدی: کلبسیلا پنومونیه؛ تتراسایکلین؛ واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه

ارجاع: ناجی حمد منار، نخعی مقدم محبوبه. **ردیابی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین با استفاده از روش Multiplex Polymerase Chain Reaction در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۴۷): ۸۲۰-۸۱۵.

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه (Klebsilla pneumoniae) پاتوژن فرصت‌طلب گرم منفی و یکی از عوامل شایع عفونت‌های بیمارستانی است (۱). گونه‌های کلبسیلا را می‌توان در آب، خاک، گیاهان، حیوانات و انسان (به طور معمول در روده) یافت. ورود این باکتری به سایر مناطق بدن، می‌تواند با ایجاد عفونت همراه باشد. از جمله این عفونت‌ها می‌توان به عفونت‌های دستگاه ادراری، ذات‌الریه، خون، عفونت محل زخم یا جراحی و منتژیت اشاره کرد (۲). آنتی‌بیوتیک‌هایی که به طور معمول برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرند، شامل پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، مونوباکتام‌ها، کاربا‌پنم‌ها و تتراسایکلین‌ها هستند (۳).

مقاومت ضد میکروبی همواره یک مشکل اساسی برای سلامت انسان مطرح بوده است و بیماران را در تمام مراکز درمانی جهان تحت تأثیر قرار می‌دهد (۴). تتراسایکلین، آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف است که رشد بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و منفی را مهار می‌کند (۵). مقاومت به تتراسایکلین، اولین بار در سال ۱۹۵۳ گزارش شد. مانند

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: محبوبه نخعی مقدم: دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

Email: mhboobe_nak@yahoo.com

آنتی‌بیوتیک‌های دیگر، مقاومت به تتراسایکلین می‌تواند از راه‌های مختلف و مکانیسم های متفاوتی همچون افلاکس، کاهش نفوذپذیری دارو، جهش در جایگاه هدف و تجزیه‌ی آنزیمی آنتی‌بیوتیک ها انجام شود. دو مکانیسم نخست در حال حاضر شایع‌تر می‌باشد (۶).

مکانیسم‌های اصلی مقاومت به تتراسایکلین از طریق کسب ژن tet شامل پمپ‌های انتشار به خارج، محافظت ریبوزومی و غیر فعال شدن آنزیمی است. متداول‌ترین ژن‌های مربوط به مقاومت تتراسایکلین، tetA و tetB هستند. در بررسی‌های بالینی، ژن tetB به دلیل واقع شدن روی عناصر ژنتیکی بسیار متحرک که به راحتی بین ژن‌های مختلف باکتریایی منتقل می‌شوند، به عنوان مهم‌ترین عامل تعیین‌کننده‌ی مقاومت تتراسایکلین با دامنه‌ی میزبان وسیع شناخته شده است. ژن tetA روی پلاسمیدهای Conjugative گروه‌های مختلف ناسازگاری قرار دارد (۷).

در سال‌های اخیر، تهدید ناشی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی توسط باکتری‌های بیماری‌زا در حال افزایش است. ظهور مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی متعدد در باکتری‌های بیماری‌زا، به یک تهدید قابل توجه برای سلامت عمومی تبدیل شده است (۴).

در بین روش‌های مختلفی که جهت بررسی ژن های موجود در نمونه‌های بالینی وجود دارد، روش‌های شناسایی سریع و با دقت بالا می‌تواند اهمیت داشته باشد. تکنیک واکنش زنجیره ای پلی‌مراز چندگانه (Multiplex polymerase chain reaction یا Multiplex PCR) که روشی برای تکثیر همزمان دو یا چند ژن توأم در یک فرایند PCR می‌باشد، علاوه بر سرعت بخشیدن به فرایندهای شناسایی و ارایه‌ی گزارش، با کاهش هزینه‌های مولکولی نیز همراه است.

هدف از انجام پژوهش حاضر، استفاده از تکنیک Multiplex PCR به منظور ردیابی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه بود.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی مقطعی- تجربی، باکتری‌های مشکوک به کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های مختلف بالینی بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان های رضوی و قائم مشهد، از مهر تا دی سال ۱۳۹۹ جمع‌آوری و در شرایط استریل و در کنار کیسه‌ی یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد منتقل گردید. پروپوزال تحقیق با کد اخلاق IR.IAU.MSHD.REC.1400.023 به تصویب دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد رسید. تمام باکتری‌ها با رضایت بیماران وارد تحقیق شدند و هزینه‌ای از بیماران در این رابطه اخذ نشد. نمونه‌ها شامل ادرار، زخم و تراشه بودند. پس از انتقال پلیت ها به آزمایشگاه، برای به دست آوردن کلنی تک، باکتری با استفاده از روش ایزوله روی محیط افتراقی MacConkey Agar (MAC) تلقیح و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس جهت شناسایی کلبسیلا پنومونیه، از آزمایش‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی مرسوم استفاده گردید. از کلبسیلا پنومونیه (PTCC 1792) خریداری شده از کلکسیون باکتریایی سازمان پژوهش‌های علمی- صنعتی ایران به عنوان سویه‌ی رفرنس استفاده شد.

مطابق استاندارد Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) آنتی‌بیوگرام صورت گرفت. سوسپانسیون باکتریایی با کدورت لوله‌ی 0.5 McFarland معادل‌سازی ($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ واحد تشکیل کلونی در میلی‌لیتر) و باکتری در سطح محیط Mueller-Hinton Agar (MHA) با روش یکنواخت تلقیح شد. پس از ۵ دقیقه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی با فواصل استاندارد روی سطح محیط جای‌گذاری گردید. پلیت‌ها در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. آزمایش‌ها سه بار تکرار گردید. دیسک‌ها شامل تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۲۵ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم/کلاوولانات (۱۰/۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) و کوتریموکسازول (۲۵ میکروگرم) بود.

به منظور شناسایی ایزوله‌های مولد بتالاکتاماز طیف وسیع (Extended Spectrum Beta-Lactamase یا ESBL) با روش فنوتیپی، سوسپانسیون باکتریایی بر روی MHA به طور یکنواخت تلقیح شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفتازیدیم و سفتازیدیم/کلاوولانات با استفاده از پنس استریل روی محیط قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری، قطر هاله‌ی عدم رشد با استفاده از خط کش میلی‌متری اندازه گیری گردید. در صورتی که قطر هاله‌ی دیسک حاوی سفتازیدیم/کلاوولانات نسبت به دیسک حاوی سفتازیدیم بزرگ تر یا مساوی ۵ میلی‌متر بود، ایزوله‌ی کلینیکی ESBL در نظر گرفته شد (۸).

DNA ایزوله‌های مقاوم به تتراسایکلین با استفاده از کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم منفی (شرکت سیناکلون، ایران) استخراج گردید. جهت تأیید و شناسایی مولکولی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه، از پرایمر اختصاصی Kp16S rRNA (۹) و باکتری کلبسیلا پنومونیه PTCC 1792 نیز به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. برای ردیابی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین، از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده در تحقیق استفاده شد. بدین منظور، ابتدا توالی ژن‌های tetA و tetB از پایگاه National Center for Biotechnology Information (NCBI) دریافت و سپس پرایمرهای مناسب برای ژن‌های هدف در نرم‌افزار AlleleID طراحی گردید. پرایمرها جهت بررسی اختصاصیت، در سایت NCBI، Blast و برای ساخت به شرکت سیناکلون سفارش داده شد.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای استفاده شده در پژوهش

نام پرایمر	توالی بالادست (۵'→۳')	توالی پایین دست (۵'→۳')	طول محصول PCR (جفت بازی)
kp16S rRNA	ATTTGAAGAGGTTGCAACGAT	TTCACTCTGAAGTTTTCTTGTGTTC	۱۳۰
tetA	GGCAGGCAGAGCAAGTAGAG	CAGGCAGGTGGATGAGGAAC	۱۷۴
tetB	CTACTTCGGTATCTGTATTATCAC	GCATCGCTGGATTACTTATTG	۳۴۰

PCR :Polymerase chain reaction

جدول ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر را نشان می‌دهد. PCR با استفاده از دو میکرولیتر DNA الگو، یک میکرولیتر از هر پرایمر و مسترمیکس 2X در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و دستگاه ترموسایکلر (Kyratec، کره‌ی جنوبی) انجام شد. شرایط بهینه برای PCR ژن‌ها شامل مرحله‌ی واسرشت اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه شامل واسرشت به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، اتصال ۵۳ درجه‌ی سانتی‌گراد (Kp 16s rRNA)، ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد (tetA)، ۵۶ درجه‌ی سانتی گراد (tetB) به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله‌ی طویل شدن در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه بود.

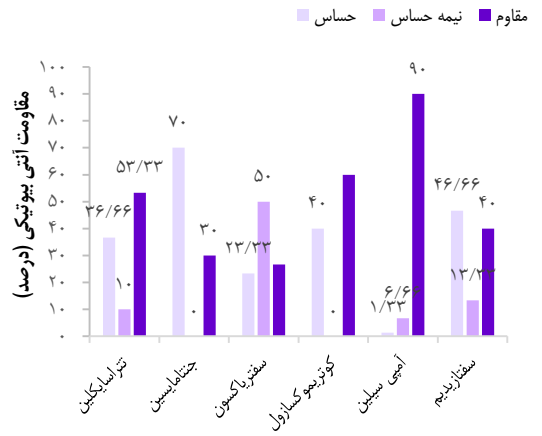
در نهایت، ۳ ژن به صورت هم‌زمان در غالب یک برنامه‌ی PCR و تحت عنوان Multiplex PCR ردیابی شدند. مواد واکنش شامل ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس و ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. شرایط دمایی- زمانی، مشابه با PCR منوپلکس بود، فقط دمای اتصال پس از چند بار تکرار آزمایش، ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به دست آمد. از ایزوله‌ی کلبسیلا پنومونیه حامل ژن‌های tetA و tetB به عنوان شاهد منفی استفاده گردید.

محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی Weaver Green همراه با نشانگر مولکولی به مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز شدند.

یافته‌ها

ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه، اکسیداز منفی و لاکتوز مثبت بودند. ایزوله‌ها سیترات مثبت، Methyl red منفی، Voges-Proskauer (VP) مثبت و اندول منفی، بی‌حرکت و H2S منفی بودند و اغلب توانایی تولید گاز داشتند. در مطالعه‌ی حاضر، اغلب سویه‌های کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های ادراری جدا شدند.

شکل ۱ الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها را نشان می‌دهد. بیشترین و کم ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب به آمپی‌سیلین و سفتریاکسون اختصاص داشت. بیشترین و کم‌ترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله ها نیز به ترتیب مربوط به جنتامایسین و آمپی‌سیلین بود. ۵۳/۳ درصد (۱۶ ایزوله) ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه به تتراسایکلین مقاوم بودند. ۲۱ ایزوله (۷۰/۰ درصد) مقاوم به چند دارو (Multiple drug resistance یا MDR) بودند.



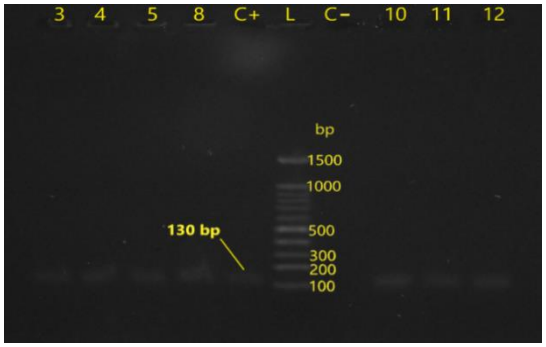
شکل ۱. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه در پژوهش حاضر

۱۲ ایزوله (۴۰/۰ درصد) با روش فنوتیپی به عنوان ایزوله‌های مولد ESBL تعیین شدند. ۱۱ ایزوله (۹۱/۷ درصد) ESBL مثبت در میان ایزوله‌های MDR بودند که نشان دهنده‌ی شیوع بالای ایزوله‌های ESBL مثبت در میان ایزوله‌های MDR بود.

نتایج به دست آمده از الکتروفورز محصولات PCR که با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن Kp16S rRNA بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد، در شکل ۲ نشان داده شده است. تمامی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه که با روش بیوشیمیایی شناسایی شده بودند، مانند سویه‌ی استاندارد کلبسیلا پنومونیه (شاهد مثبت)، در ناحیه‌ی ۱۳۰ جفت بازی تشکیل باند دادند.

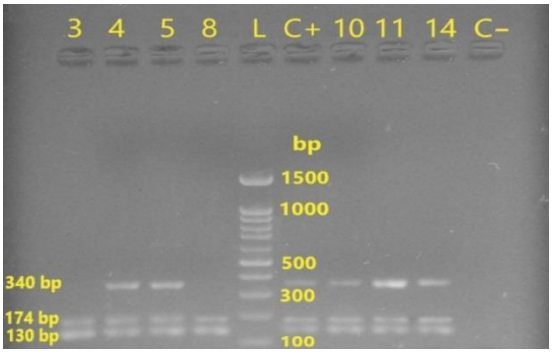
محصولات PCR ژن‌های tetA و tetB نیز به ترتیب در ناحیه‌ی ۱۷۴ و ۳۴۰ جفت بازی باند را نشان دادند. در میان ایزوله‌های مقاوم به تتراسایکلین، ۱۴ ایزوله (۸۷/۵ درصد) ژن tetA و ۱۱ ایزوله

(۶۸/۷ درصد) ژن tetB داشتند.



شکل ۲. ژل الکتروفورز محصولات Polymerase chain reaction (PCR) ژن Kp16S rRNA ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه (-C: شاهد منفی، +C: شاهد مثبت، L: نشانگر استاندارد)

نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات Multiplex PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در شکل ۳ نشان داده شده است. ۱۰۰ درصد ایزوله‌هایی که با روش‌های بیوشیمیایی به عنوان کلبسیلا پنومونیه شناسایی شده بودند، حامل ژن Kp16S rRNA بودند. همچنین، هم‌زمان با ردیابی ژن Kp16S rRNA، ژن‌های tetA و tetB به ترتیب در ۸۷/۵ و ۶۸/۷ درصد از ایزوله‌های کلبسیلای مقاوم به تتراسایکلین ردیابی شدند. از طرف دیگر، ۹ ایزوله (۵۶/۲ درصد) به طور هم‌زمان هر دو ژن tetA و tetB را حمل می‌کردند و ۲ ایزوله (۱۲/۵ درصد) فقط حامل ژن tetA و ۲ ایزوله (۱۲/۵ درصد) فقط حامل ژن tetB بودند.



شکل ۳. الکتروفورز محصولات Multiplex polymerase chain reaction (Multiplex PCR) ژن‌های Kp 16S rRNA (۱۳۰ جفت بازی)، tetA (۱۷۴ جفت بازی) و tetB (۳۴۰ جفت بازی) برای ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه (-C: شاهد منفی، +C: شاهد مثبت، L: نشانگر استاندارد)

بحث

ظهور و انتشار جهانی ژن‌های مقاومت ضد میکروبی در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه، خطری جدی برای سلامت جامعه است. در پژوهش حاضر، مقاومت به تتراسایکلین، جنتامایسین، سفتریاکسون، کوتریموکسازول، آمپی‌سیلین و سفتازیدیم به ترتیب ۵۳/۳، ۳۰/۰، ۲۶/۷، ۶۰/۰، ۹۰/۰ و ۴۰ درصد گزارش شد که ۲۱ ایزوله (۷۰/۰ درصد) MDR بودند. در میان ایزوله‌های مقاوم به تتراسایکلین، ۱۴ ایزوله (۸۷/۵ درصد) ژن tetA و ۱۱ ایزوله (۷۵/۰ درصد) ژن tetB را داشتند.

در مطالعه‌ی Ding و همکاران در چین بر روی نمونه‌های بالینی بیماران مبتلا به عفونت تنفسی، طبق نتایج PCR، ۵۷/۴ درصد نمونه‌ها آلودگی به کلبسیلا پنومونیه داشتند. ۵۱/۴ درصد ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه، MDR بودند و شیوع ایزوله‌های ESBL مثبت در میان ایزوله‌های MDR، ۹۴/۷ درصد بود (۱۰). در مقایسه با تحقیق حاضر، فراوانی ایزوله‌های MDR کمتر بودند. همچنین، شیوع ایزوله‌های ESBL مثبت در میان ایزوله‌های MDR در هر دو پژوهش مشابه بود.

نتایج PCR مربوط به ردیابی tetA و tetB در ۲۹ ایزوله‌ی ادراری کلبسیلا پنومونیه در مطالعه‌ی پاک‌نژاد و همکاران در زرین‌شهر نشان داد که ۷۵/۹ درصد از ایزوله‌ها حامل ژن tetA و ۴۸/۳ درصد از آن‌ها واجد ژن tetB بودند (۱۱). بیشتر بودن فراوانی ژن‌های tetA و tetB در بررسی حاضر نسبت به تحقیق پاک‌نژاد و همکاران (۱۱)، می‌تواند به دلیل اختلاف در جامعه‌ی مورد بررسی و انتقال و کسب ژن‌های مذکور باشد.

نتایج پژوهش Shu و همکاران نشان داد که ۱۰۰ درصد ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه گرفته شده از نمونه‌های تنفسی و روده‌ای بیماران بستری در بیمارستان‌های چین، به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم مقاوم بودند. آن‌ها ژن tetA را در میان ایزوله‌های مقاوم به کاربانپنم‌ها ردیابی کردند که ۵۵/۲ درصد ایزوله‌های مقاوم به کاربانپنم‌ها حامل ژن tetA بودند (۱۲). در مطالعه‌ی Yu و همکاران، وجود ژن‌های حدت rmpA، rmpA2، iutA و iroN در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه مقاوم در برابر کاربانپنم‌ها با استفاده از روش Multiplex PCR به عنوان یک راه تشخیصی سریع به طور هم‌زمان بررسی شد (۱۳). تاج‌الدینی و همکاران، حضور ژن‌های blaPER، blaGES و blaVEB در ایزوله‌های بالینی شیگلا سونئی را با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و روش Multiplex PCR بررسی کردند (۱۴). در تحقیق Compain و همکاران در فرانسه، ۶۵ ایزوله‌ی بالینی کلبسیلا پنومونیه به روش Multiplex PCR و با هدف قرار دادن هفت فاکتور ویرولانس و ژن اختصاصی wzi برای سروتیپ‌های کپسولی K1 و K2 بررسی گردید. آن‌ها دریافتند که این سنجش برای نظارت بر سویه‌های بسیار بدخیم در حال ظهور مفید است. تکنیک

Multiplex PCR امکان تشخیص سریع، قابل تکرار و حساسیت ژن های ویرولانس را در زمان کمتر فراهم می‌کند و می‌تواند در بررسی‌های اپیدمیولوژیک عفونت‌های تهاجمی ناشی از کلبسیلا پنومونیه ارزشمند باشد (۱۵). نتایج پژوهش Compain و همکاران (۱۵) با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر همخوانی داشت.

با طراحی Multiplex PCR در تحقیق حاضر، می‌توان ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه‌ی مقاوم به تتراسایکلین را سریع‌تر شناسایی نمود. با استفاده از این روش، علاوه بر کاهش هزینه ها، می‌توان با صرف وقت کمتر، بیماران و ناقلان عفونت را به مراتب بهتر نسبت به روش سنتی در جامعه شناسایی کرد. با توجه به شناسایی تمامی ایزوله‌های مثبت و عدم وجود نمونه‌ی منفی کاذب در نتایج پژوهش حاضر، حساسیت روش برای شناسایی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به تتراسایکلین، ۱۰۰ درصد گزارش گردید، اما به دلیل محدودیت هزینه و زمان، استخراج DNA از تمامی باکتری‌های حساس به تتراسایکلین صورت نگرفت و اختصاصیت تکنیک تعیین نشد. پیشنهاد می‌شود برای کاهش هزینه‌ها، استخراج DNA با روش جوشاندن انجام و اختصاصیت نیز تعیین گردد.

نتیجه‌گیری

مطالعات زیادی به شناسایی کلبسیلا پنومونیه، یکی از عوامل شایع عفونت به ویژه عفونت‌های ادراری پرداخته‌اند، اما در تحقیق حاضر روشی بر پایه PCR به منظور شناسایی هم‌زمان باکتری و مقاومت به تتراسایکلین پیشنهاد گردید که سریع، قابل اعتماد (حساسیت ۱۰۰ درصد) و با هزینه‌ی مناسب می‌باشد و می‌تواند برای شناسایی روتین نمونه‌های بالینی به کار گرفته شود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد با شماره‌ی ۱۶۲۳۳۸۹۰۵، مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد می‌باشد که با حمایت مالی معاونت پژوهشی این دانشگاه به انجام رسید. بدین وسیله از زحمات کارکنان آزمایشگاه میکروبیولوژی بیمارستان‌های رضوی و قائم (آزمایشگاه کلینیک ویژه) مشهد و آقای احسان یوسفی که در انجام آزمایش‌ها کمک فراوانی نمودند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. Klebsiella pneumoniae: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev 2017; 41(3): 252-75.
2. Effah CY, Sun T, Liu S, Wu Y. Klebsiella pneumoniae: An increasing threat to public health. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2020; 19(1): 1.
3. Sathyavathy K, Madhusudhan BK. Review on clinical diseases caused by Klebsiella. J Pharm Res Int 2020; 32(21): 12-9.
4. Talebi Bezmin Abadi A, Rizvanov AA, Haertle T, Blatt NL. World Health Organization Report: Current crisis of antibiotic resistance. BioNanoScience 2019; 9(4): 778-88.
5. Markley JL, Wencewicz TA. Tetracycline-inactivating enzymes. Front Microbiol 2018; 9: 1058.
6. Canton R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. Curr Opin Microbiol 2006; 9(5): 466-75.
7. Tuckman M, Petersen PJ, Howe AY, Orlowski M, Mullen S, Chan K, et al. Occurrence of tetracycline resistance genes among Escherichia coli isolates from the phase 3 clinical trials for tigecycline. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(9): 3205-11.
8. Bubpamala J, Khuntayaporn P, Thirapanmethee K, Montakantikul P, Santanirand P, Chomnawang MT. Phenotypic and genotypic characterizations of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in Thailand. Infect Drug Resist 2018; 11: 2151-7.
9. MohammadAlipour Z, Asadpour L, Ranji N. Fluoroquinolone resistance and mutation in gyrA gene in clinical isolates of Klebsiella pnemoniae. Iran J Med Microbiol 2016; 10(5): 31-7. [In Persian].
10. Ding L, Yang Z, Lu J, Ma L, Liu Y, Wu X, et al. Characterization of phenotypic and genotypic traits of klebsiella pneumoniae from lung cancer patients with respiratory infection. Infect Drug Resist 2020; 13: 237-45.
11. Paknejad Z, Momtaz H, Tajbakhsh E. Determination of antibiotic resistance pattern in different serotypes of Klebsiella pneumoniae strains isolated from hospital infections in Zarinshahr. Applied Biology 2018; 8(29): 21-30. [In Persian].
12. Shu LB, Lu Q, Sun RH, Lin LQ, Sun QL, Hu J, et al. Prevalence and phenotypic characterization of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae strains recovered from sputum and fecal samples of ICU patients in Zhejiang Province, China. Infect Drug Resist 2019; 12: 11-8.
13. Yu F, Lv J, Niu S, Du H, Tang YW, Pitout JDD, et al. Multiplex PCR analysis for rapid detection of Klebsiella pneumoniae carbapenem-resistant (Sequence Type 258 [ST258] and ST11) and hypervirulent (ST23, ST65, ST86, and ST375) strains. J Clin Microbiol 2018; 56(9.(
14. Tajoadini M, Kheyrkhah B, Amini K. Detection of blaPER, blaGES and blaVEB genes in Shigella sonnei isolates from patients with diarrhea and determination of antibiotic susceptibility pattern. J Ardabil Univers Med Sci 2018; 18(1): 52-61. [In Persian].
15. Compain F, Babosan A, Brisse S, Genel N, Audo J, Ailloud F, et al. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of Klebsiella pneumoniae. J Clin Microbiol 2014; 52(12): 4377-80.

DOI: *10.22122/jims.v39i647.14366* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 39, No. 647, 3rd Week, January 2022**

Received: 30.07.2021 Accepted: 13.10.2021 Published: 19.01.2022

Detection of Tetracycline-Resistant Genes by Multiplex Polymerase Chain Reaction in Clinical Isolates of Klebsiella Pneumonia

Manar Naji-Hamad[1], Mahboobeh Nakhaei-Moghadam[2]

Original Article

Abstract

Background: Klebsiella pneumoniae (K. pneumonia) is an opportunistic pathogen and one of the most common causes of nosocomial infections, some of which are now resistant to antibiotics and make infection difficult to treat. The main purpose of this study was to use multiplex polymerase chain reaction (PCR) to detect tetracycline-resistance genes in clinical isolates of K. pneumonia.

Methods: After collecting clinical samples from hospitals in Mashhad City, Iran, in 2021, K. pneumoniae was isolated and identified by biochemical and molecular methods (Kp16S rRNA specific primer). Antibiotic-resistance pattern was determined for 30 isolates by disk diffusion method. After designing primer and its blast, detection of tet genes was optimized by PCR. Finally, multiplex PCR was set up using three pairs of primers and positive control.

Findings: The highest and lowest antibiotic resistance of the isolates was for ampicillin (90%) and ceftriaxone (26.66%), respectively, and 53.33% of Klebsiella isolates were phenotypically resistant to tetracycline. Multiplex PCR was set up by annealing temperature of 55°C. Simultaneously with detection of Kp16S rRNA gene, tetA and tetB genes were detected in 87.5% and 68.75% of tetracycline-resistant Klebsiella isolates, respectively. 56.25% of the isolates carried both tetA and tetB genes, simultaneously, and 12.5% of the isolates transferred one of the tetA or tetB genes.

Conclusion: The results show that the multiplex PCR technique designed in this study is a fast, accurate, and sensitive method for identifying antibiotic-resistant K. pneumoniae that can be used for clinical samples or in epidemiological studies.

Keywords: Klebsiella pneumonia; Tetracycline; Multiplex polymerase chain reaction

Citation: Naji-Hamad M, Nakhaei-Moghadam M. **Detection of Tetracycline-Resistant Genes by Multiplex Polymerase Chain Reaction in Clinical Isolates of Klebsiella Pneumonia.** J Isfahan Med Sch 2022; 39(647): 815-20.

1- Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2– Associate Professor, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
Corresponding Author: Mahboobeh Nakhaei-Moghadam, Associate Professor, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran; Email: mhboobe_nak@yahoo.com