بررسی مولکولی ژن های مولد کولی باکتین *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از شیر خام با روش Multiplex-PCR به عنوان عامل ابتلا به سرطان کلورکتال

مرضیه ردائی الاملی[۱]، صدیقه مهرابیان[۲]، کیومرث امینی[۳*]، پریسا مبصری[۴]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران.
۴. دانش آموخته دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.
[*]نویسنده مسئول: *Dr_kumarss_amini@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۰۵

چکیده

کلبسیلا پنومونیه باکتری گرم منفی، غیر متحرک، دارای کپسول، تخمیر کننده لاکتوز، بی هوازی اختیاری و میله‌ای شکل است. آن از دیرباز به عنوان پاتوژن فرصت‌طلب مورد توجه قرار گرفته است و یک علت شایع عفونت‌های بیمارستانی است. خوشه ژنی *pks* آنزیم‌هایی را تولید می‌کند که مسئول تولید سنتز کولی‌باکتین هستند. کولی‌باکتین یک ژنوتوکسین است که باعث آسیب به DNA می‌شود و با افزایش ویرولانس مرتبط است. همچنین حدس زده می‌شود که کولی‌باکتین در توسعه سرطان کولورکتال نقش داشته باشد. در این مطالعه شیوع ژن‌های *pks*، *clbN* و *clbB* در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۲۲۰ نمونه از شیر خام به دست آمد. سپس تمام نمونه‌ها در محیط کشت ویولت رد بایل آگار و سپس بلاد آگار، مک کانکی آگار و شکلات آگار برای جداسازی باکتری‌ها کشت شدند. آزمایش‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژی برای تایید باکتری انجام شد. DNA از تمام جدایه ها با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی استخراج شد. سپس واکنش زنجیره ای پلیمراز چندگانه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. یافته‌ها نشان داد که ۶۰ مورد از *کلبسیلا پنومونیه* از ۲۲۰ نمونه (۲۷/۲۷ درصد) جداسازی شده با استفاده از تست‌های فنوتیپی استاندارد مورد تایید قرار گرفتند. آزمون PCR نشان داد که ۶ سویه (۱۰ درصد) دارای ژن‌های *clbB* و *clbN* بودند. *کلبسیلا پنومونیه* *pks* مثبت در نمونه‌های ما شایع بود. با توجه به اثرات پلیوتروپیک آن، کولی‌باکتین عمیقا بر فیزیولوژی سلولی اثر می‌گذارد، باعث ایجاد اختلالات DNA می‌شود که منجر به پیر شدن یا آپوپتوزیس می‌شود. به نظر می‌رسد شناسایی *کلبسیلا پنومونیه* *pks* مثبت در شیر بسیار ضروری برای جلوگیری از سرطان کلورکتال است.

کلید واژه ها: *کلبسیلا پنومونیه*، *clbB*، *clbN*، واکنش زنجیره ای پلیمراز چندگانه.

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه یک بیماری پاتولوژیک برجسته است که باعث ایجاد عفونت دستگاه تنفسی فوقانی، اسهال، پنومونی، عفونت مجاری ادراری (UTI) و سپتیسمی می‌شود (Fang et al., 2004; Azadpour et al., 2015). شیوع مقاومت به دارو در *کلبسیلا پنومونیه* افزایش یافته است که به دلیل آنزیم بتالاکتاماز طیف گسترده‌ای و ظهور *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به چند دارو (MDR) است (Drawz et al., 2014; Chander et al., 2013;). علاوه بر این، *کلبسیلا پنومونیه* دارای عوامل مختلف ویرولانس است که به بیماری پاتوژن آن کمک می‌کند از جمله زنجیر جانبی O لیپوپلی‌ساکارید (LPS) (اندوتوکسین)، پلی ساکارید کپسولی، ادهزین‌ها و سیدرفورها (Lery et al., 2014; Chander et al., 2013). لیپوپلی‌ساکارید شامل لیپید A، هسته و Oپلی‌ساکارید است. کپسول پلی‌ساکارید (CPS) عامل مهمی برای ویرولانس *کلبسیلا پنومونیه* است و به ۷۷ نوع سرولوژیک تقسیم می‌شود (Lin et al., 2011). لایه‌های کپسولی سطوح باکتری‌ها را در برمی‌گیرند و

از فاگوسیتوز باکتری‌ها جلوگیری می‌کنند. آنتی ژنهای کپسولی K1 و K2 مهمترین هستند (Lin et al., 2014). سرطان کولورکتال (CRC) چهارمین عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان است و پیشگیری و تشخیص زودهنگام آن یکی از ضروری‌ترین نیازهای بهداشت عمومی است. درکولون انسان توسط بیش از ۱۰۱۴ باکتری کولونیزه می‌شود که می‌تواند به حداقل ۱۰۰۰ گونه طبقه‌بندی شود، تشکیل آن چیزی به نام میکروبیوتا است، طبیعی است که فرض کنیم برخی از این باکتری‌ها با پاتوژنز CRC انسان مرتبط هستند (Arthur et al., 2012; Buc et al., 2013).

به جز ClbM و ORFهای احتمالی، تمام پروتئین‌ها کدگذاری شده در خوشه ژن کولی‌باکتین مورد نیاز برای ترکیب فعال سنتز می‌شوند. ژن‌های *clb* هماهنگ بیان می‌شوند. بسیاری از وظایف متابولیک مهم باکتری‌ها به عنوان اپرون سازماندهی شده، که mRNA پلی‌سیسترونیک تولید می‌کنند. با استفاده از RT-PCR، حداقل هفت واحد رونویسی می‌توانند تعیین شوند. بزرگترین رونوشت شش ژن را شامل می‌شود - *clbI* تا *clbN* - و شامل حدود ۲۳/۳ کیلو باز می‌شود، در این پلی‌سیسترون ژن‌های کدکننده برای پپتید غیر-ریبوزومی سنتتاز (NRPS) و همچنین پلی‌کیتید سنتاز (PKSs) و پروتئین‌های هیبرید واقع شده‌اند. علاوه بر این، یک آمیداز (ClbL) و یک پمپ افلاکس اکستروژن چند دارویی و ترکیبات سمی (MATE) (ClbM) در این رونوشت کدگذاری می‌شود. این پروتئین‌ها تا کنون در سیستم PKS/NRPS یافت نشده است. این حقیقت که هر دوی آنها بر روی رونوشت اصلی خوشه ژن کولی‌باکتین با هم رونویسی می‌شوند ممکن است اهمیت نقش خاص پروتئین را در مسیر مونتاژ پپتید پلی‌کیتید فعال نشان می‌دهد، اگر چه عملکرد ClbM می‌تواند توسط پروتئین‌های دیگر تکمیل شود. دومین پلی‌سیسترون بزرگ از ۶/۲ کیلو باز، ژن‌های *clbC* تا *clbG* را پوشش می‌دهد. این ژن-ها بخش غیر معمول از خوشه PKS / NRPS تشکیل می‌دهند زیرا آنها پروتئین با ساختار غیر معمول کد می‌کنند. ClbC و ClbE فاقد دومین‌های اسیل ترنسفراز مورد انتظار که در PKS یافت می‌شود هستند و احتمالا توسط فعالیت مالونیل کوآنزیمآ ترنسفراز (ClbG) تکمیل می‌شوند. ژن‌های *clbD* و *clbF* آنزیم‌های تغییردهنده را کدگذاری می‌کنند که احتمالا بر روی به ترتیب سوبستراهای اسیل یک- ۳ هیدروکسی اسیل کوآنزیمآ دهیدروژناز و یک اسیل کوآنزیمآ دهیدروژناز عمل می‌کنند (Staunton and Weissman, 2001). مصرف شیر آلوده یکی از راه‌های انتقال باکتری به انسان و ایجاد عفونت‌های روده‌ای و در نهایت ایجاد سرطان از طریق التهاب موجود است. هدف از این مطالعه بررسی ژن‌های مولد کولی‌باکتین *clbB* و *clbN* *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از نمونه‌های شیر جداسازی شده از تانک نگهداری شیر در دامداری‌های صنعتی با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز چندگانه بود.

روش کار

در این مطالعه مقطعی توصیفی به صورت تصادفی از ۲۲۰ تانک نگهداری شیر خام در مراکز نگهداری شیر در سال ۱۳۹۵ در تهران نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌های شیر در دمای ۴ درجه سلسیوس و تحت شرایط استاندارد به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند، سپس شیر مطابق روش رایج میکروبیولوژی بعد از تهیه رقت در محیط ویولت رد بایل آگار مطابق استاندارد بر روی محیط‌های بلاد اگار، شکلات آگار و مکانکی آگار (شرکت Merck) کشت داده شدند. از محیط‌های کشت افتراقی اندول، اوره از، MRVP، TSI، SIM، سیترات (شرکت Merck) جهت انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی استفاده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. سپس کلنی‌های صورتی رنگ موکوئیدی در محیط‌های افتراقی مکانکی و ائوزین متیلن بلو که مشکوک به

کلبسیلا پنومونیه بودند جدا و مورد بررسی قرار گرفتند و سپس تست‌های تأییدی جهت تشخیص قطعی *کلبسیلا پنومونیه* انجام شد.

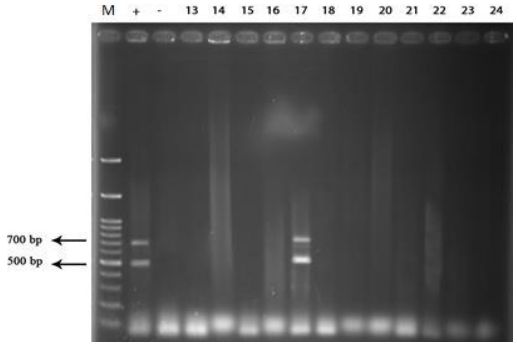
ابتدا DNA نمونه‌ها با استفاده از روش کیت استخراج DNA ژنومی (شرکت پیشگامان انتقال ژن ایران) استخراج گردید. به طور خلاصه به حدود ۵۰ میکرولیتر از نمونه شیر جدا شده، ۱۸۰ میکرولیتر بافر لیز کننده اضافه شد و ۲۰ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K به محلول افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت ۵۵ درجه سلسیوس انکوبه گردید. پس از اطمینان از لیز شدن کامل نمونه و به دست آمدن محلول یکنواخت، ۳۶۰ میکرولیتر بافر متصل شونده به محلول اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس انکوبه گشت. سپس۲۷۰ میکرولیتر الکل اتانول مطلق اضافه شد و کاملا ورتکس گردید و در نهایت محلول به روی ستون‌های فیلتردار مخصوص منتقل شد و به مدت ۱ دقیقه در ۸۰۰۰ xg سانتریفیوژ گردید. محلول خارج شده از ستون دور ریخته شد و دو بار شستشوی ستون با محلول شستشو انجام گرفت. پس از سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ xg به مدت ۱۰ دقیقه جهت خارج شدن کامل الکل از ستون و انتقال ستون به روی میکروتیوپ استریل جدید، ۱۰۰ میکرولیتر محلول حل کننده DNA روی ستون ریخته شد و ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. در نهایت پس از سانتریفیوژ در ۸۰۰۰ xg به مدت ۱ دقیقه، محلول DNAهای استخراج شده جهت استفاده در آزمایشات بعدی بلافاصله به فریزر با دمای منهای ۲۰ درجه سلسیوس انتقال یافتند. برای واکنش PCR از هر یک از پرایمرها ۱ میکرولیتر، DNA الگو ۳ میکرولیتر و Master mix (شرکت Fermentas کانادا) ۱۰ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. نمونه کنترل مثبت در واکنش PCR باکتری *کلبسیلا پنومونیه* ۱۰۸۴ بود. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (شرکت Eppendorf آلمان) تحت شرایط دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و پس از آن ۳۵ دوره در دناتوراسیون ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه برای *clbB* و اتصال پرایمر در ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه برای *clbN*، سپس گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. سپس آمپلیکون‌ها بر روی ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز شدند. برای تهیه ژل آگاروز یک درصد، ۱۰۰ گرم آگاروز در ۱۰۰ میلی لیتر بافر TBE ۰/۵ x حل شد و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد کاملا ذوب گردید تا محلول شفاف به دست آید. پس از انتقال ژل مایع تهیه شده در تانک مخصوص الکتروفورز افقی و بسته شدن ژل، ۵ میکرولیتر از محلول DNA تهیه شده با ۲ میکرولیتر DNA Loading Buffer (شرکت Fermentas کانادا) مخلوط شد و در یکی از چاهک‌های تشکیل شده بر روی ژل انتقال یافت. در چاهک مجاور نیز ۵ میکرولیتر از مارکر DNA Ladder۱۰۰ bp (شرکت Fermentas کانادا) ریخته شد و در نهایت جداسازی DNA با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز انجام گرفت. ژل تحت نور ماوراء بنفش در دستگاه ژل داکیومنت (شرکت Bio Rad) عکس‌برداری شد. جدول شماره ۱- پرایمرهای مورد استفاده در PCR برای شناسایی ژن های *clbB, clbN* را نشان می‌دهد (Chen et al., 2017). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام یافت. مقایسه آماری بین گروه‌ها با استفاده از آزمون‌های مجذور کای بررسی و p کمتر از پنج درصد معنی دار در نظر گرفته شد.

جدول شماره ۱- پرایمرهای مورد استفاده در PCR برای شناسایی ژن های *clbB, clbN*

توالی الیگونوکلئوتید '3-'5	نام پرایمر	منبع
GATTTGGATACTGGCGATAACCG	*clbB*	Chen et al., 2017
CCATTTCCCGTT TGAGCACAC	*clbB*	Chen et al., 2017
GTTTTGCTCGCCAGATAGTCATTC	*clbN*	Chen et al., 2017
CAGTTCGGGTATGTGTGGAAGG	*clbN*	Chen et al., 2017

نتایج

در مطالعه حاضر از مجموع ۲۲۰ نمونه شیر جداسازی شده،۶۰ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* جداسازی گردید. نتایج به صورت اندول منفی، اوره از مثبت، MR منفی VP مثبت، TSI اسید/ اسید H_2S منفی، SIM منفی، سیترات مثبت بود. نتیجه بررسی‌های آزمایشگاهی الکتروفورز محصولات PCR با پرایمر نشان داد که ۶ سویه (۱۰ درصد) واجد ژن‌های *clbB* و *clbN* بودند (شکل ۱).



شکل۱- ستون M مارکر، ستون + کنترل مثبت، ستون - کنترل منفی، ستون ۱۳ تا ۲۴ جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* باندهای ۵۳۹ bp ژن *clbB* و ۷۲۵ bp ژن *clbN*

بحث

سیکلومودلین‌ها سموم باکتریایی هستند که با چرخه سلولی یوکاریوتی تداخل می‌کنند. تا سال ۲۰۰۶، سه نوع سیکلومودلین در *اشریشیا کلای* شناخته شده است: دو مورد قادر به مهار تکثیر (توکسین سیتولتال، CDT) ؛ و عامل مهارکننده چرخه Cif) و یکی قادر به تحریک تکثیر (عامل نکروتیزینگ سیتوتوکسیک CNF). در سال ۲۰۰۶، نوگارده و همکارانش در *اشریشیا کلای* منتژیت سویه IHE3034 یک سم به نام کولی‌باکتین شناسایی کردند. کولی‌باکتین ترکیب شیمیایی طبیعی و ژنوتوکسیک است که توسط سنتزهای پلی‌کیتید سنتاز، پپتید سنتاز غیرریبوزومی و آنزیم‌های هیبریدی که توسط یک جزیره ژنومی ۵۴ کیلو بازی تعیین شده به عنوان *pks* کدگذاری شده است. این سموم شکستن دو رشته DNA، اختلال کروموزومی و توقف چرخه سلولی در مرحله G2 / M را القا می کند. جالب توجه است که باکتری *اشریشیا کلای* از میکروبیوتای روده به عنوان باکتری کامنسال و در بیماری‌های عفونی مانند سپتیسمی، منتژیت نوزاد تازه متولد شده و عفونت ادراری جدا شده است. علاوه بر این، *اشریشیا کلای* تولید کننده کولی‌باکتین در سرطان کولورکتال بیش از حد نمایان می‌شود و تعداد تومورها را در مدل‌های موش CRC مختلف افزایش می‌دهد. بنابراین این توکسین می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر سلامت انسان داشته باشد. شناخته شده است که جزایر مرتبط با *pks* تولید ترکیبات متعدد می‌کنند. از این رو، فعالیت‌های دیگر نسبت به ژنوتوکسیدی تحقیق شده است. مطالعات بیولوژیک به وضوح نشان داده است که باکتری‌های تولیدکننده کولی‌باکتین دارای اثرات ضد-التهابی، آنتی‌بیوتیکی و ضددرد است. بنابراین، به جای تولید یک ترکیب، جزیره *pks* احتمالا چندین ترکیب تولید می‌کند (Faïs et al., 2018).

در مطالعه حاضر ۲۷/۲۷ درصد نمونه‌های شیر خام حاوی *کلبسیلا پنومونیه* بودند و در یافته های چراغی و همکاران هم از نمونه‌های بیوپسی ۲۷/۳ درصد این باکتری جداسازی شد (Cheraghi et al., 2016). در مطالعه دیگری از ۱۳۰ نمونه شیر مورد آزمایش، ۲۰ نمونه (۱۵/۳۸ درصد) آلوده به *کلبسیلا پنومونیه* بودند (کریمی و ممتاز، ۱۳۸۹). در مطالعه دیگری از ۱۰۰۰

نمونه شیر مورد آزمایش *کلبسیلا پنومونیه* در ۴/۸ درصد نمونه‌ها مشاهده شد. (دادخواه، ۱۳۸۹). در مطالعه دیگری از ۲۶ نمونه شیر گاوها که مورد بررسی قرار گرفتند ۸۱/۲۵ درصد به باکتری *کلبسیلا پنومونیه* آلوده بودند (سالکی و مرادی، ۱۳۹۱). علت اختلاف می‌تواند تفاوت در شرایط بهداشتی، تعداد نمونه‌ها و منبع نمونه‌ها (نمونه‌ها اخذ شده گاوهای مبتلا به اورام پستان) باشد.

اولین گزارش از حضور *pks* در *کلبسیلا پنومونیه* توسط پوتز و همکاران منتشر شد. در سال ۲۰۰۹ از ۱۴۱ نمونه جدا شده، پنج مورد (۳/۵ درصد) برای *pks* مثبت بودند (Putze et al., 2009). در سال ۲۰۱۴، لای و همکارانش حضور جزیره در ۲۵/۶ درصد از ۲۰۷ گونه‌ی *کلبسیلا پنومونیه* مورد آزمایش قرار گرفته را مشاهده کردند (Lai et al., 2014). در مطالعه حاضر ۱۰ درصد واجد ژن‌های *clbB* و *clbN* بودند. تفاوت در مطالعه حاضر با مطالعه لای به دلیل تفاوت تعداد نمونه‌ها (۲۰۷ نمونه)، مناطق جغرافیایی و منبع نمونه-ها (نمونه‌های آبسه‌های کبدی) می‌تواند باشد. سروتیپ بسیار ویرولانت K1 شایع ترین در تایوان است (Fung et al., 2000)، اما هشتم در اروپا رتبه بندی شده است (Thompson et al., 1993) و بیشتر سویه‌های K1 (۶۶ درصد) در مطالعه انجام شده توسط لای و همکاران به نظر می‌رسید مثبت برای *pks* بودند (Lai et al., 2014). بیان بیش از حد *pks* در سوسپانسیون K1 توسط غربالگری مجموعه جدایه‌های ۴۰۰ تایی *کلبسیلا پنومونیه* نشان داد که ۷۸/۸ درصد سویه‌های K1، *pks* مثبت بودند (Chen et al., 2017).

در مطالعه لان شیوع خوشه ژن *pks*، *clbB* و *clbN* در میان جدایه‌های خونی *کلبسیلا پنومونیه* ۲۶/۸ درصد بود. تفاوت در مطالعه حاضر با مطالعه لان به دلیل تفاوت تعداد سویه‌ها (۱۹۰ نمونه)، منشاء سویه‌های *کلبسیلا* (نمونه‌های بیوپسی)، سال مورد بررسی (۲۰۱۶ تا ۲۰۱۸) و مناطق جغرافیایی می‌تواند باشد. تا به امروز، تعداد کمی گزارش های اپیدمی در مورد ظهور *کلبسیلا پنومونیه* *pks* مثبت در سرزمین اصلی چین وجود دارد (Lan et al., 2019). در دو مطالعه قبلی انجام شده در تایوان، میزان *pks* مثبت در میان *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از نواحی مختلف بدن ۲۵/۶ درصد و ۱۶/۷ درصد، به ترتیب گزارش شده است (Faïs et al., 2018 ،Chen et al., 2017). در *اشریشیا کلای*، شیوع ژن *pks* بالا بود، از ۳۱/۵ درصد تا ۵۸ درصد گزارش شده است که به طور قابل توجهی با باکتریمی همراه است. نتایج lan نشان داد که میزان *pks* مثبت در بین جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* از خون جمع آوری شده بالاتر از میزان کلی *pks* مثبت در تایوان و کمتر از آن در *اشریشیا کلای* بود (Lan et al., 2019).

خوشه‌ی ژن *pks* کدکننده آنزیم‌هایی است که مسئول سنتز کولی‌باکتین هستند، یک ژنوتوکسین که نشان داده شده است باعث آسیب DNA میزبان می‌شود، بنابراین ممکن است به سایر نهادهای بیماری کمک کند و ویرولانس را در *اشریشیا کلای* و *کلبسیلا پنومونیه* افزایش دهد. با این حال، اطلاعات در مورد شیوع و عوامل میکروبیولوژیکی مرتبط با جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* *pks* مثبت محدود هستند. مطالعه چن نشان داد که شیوع خوشه ژنی کولی‌باکتین *pks* در میان جدایه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* از بیمارستان‌های چندگانه در مناطق مختلف تایوان ۱۶/۷ درصد بود. نتیجه چن مطابق با شیوع بالای *pks* درمیان *کلبسیلا پنومونیه* توسط مطالعه لای از یک بیمارستان در تایوان بود. از آنجا که سویه‌های باکتریایی در مطالعه چن از سال ۲۰۱۲ بوده است و مطالعه لای و همکاران جدایه‌های مورد استفاده از سال ۲۰۰۲ بوده است، نتایج وی نشان دهنده پایداری خوشه ژن *pks* در جدایه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* در تایوان است

(Chen et al., 2017). تفاوت در تعداد نمونه‌ها (۴۰۰ مورد) ، منبع نمونه‌ها (نمونه‌های غذایی در مقایسه با نمونه‌های بالینی) و فاصله جغرافیایی می‌تواند علت تفاوت در مطالعه حاضر با مطالعه چن باشد.

تجزیه و تحلیل ویژگی‌های بالینی نشان داد که جدایه-های *pks* مثبت بیشتر در عفونت‌های اکتسابی از جامعه وارد شدند. این بدان معنی است که جدایه‌های *pks* مثبت ممکن است نقش مهمی در عفونت اکتسابی از جامعه مانند hvKP ایفا کنند، که معمولا به عنوان علت عفونت‌های اکتسابی از جامعه در افراد جوان، به خصوص آبسه‌های کبدی پیوژنیک (PLA) گزارش شده است (Guo et al., 2017; Shon and Russo 2012). اطلاعات به دست آمده از داده‌های آزمایشگاهی کاهش قابل توجه میزان لنفوسیت‌ها در میان جدایه‌های *pks* مثبت بود. در مقایسه با جدایه-های *pks* منفی میزان لنفوسیت‌های جدایه‌های *pks* مثبت به طور معنی داری پایین‌تر بود. کشف مشابهی که تولید کولی‌باکتین توسط *اشریشیا کلای* عامل لنفوپنی عمیق در سپسیس مدل موشی است توسط Ingrid و همکارانش نوشته شده است (Johnson et al., 2008). بنابراین حدس لان و همکاران بود که کولی‌باکتین تولید شده از *کلبسیلا پنومونیه pk* مثبت ممکن است سمیت ژنوتوکسیتی برای لنفوسیت‌ها همانند *اشریشیا کلای* داشته باشد.

در یافته های چراغی و همکاران ۳۰ *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از ۱۱۰ بیوپسی (۲۷/۳ درصد) از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال نشان داد که در آن همه آزمایش‌های بیوشیمیایی و میکروبی از جمله رنگ آمیزی گرم منفی این باکتری‌ها را تأیید کرد. همچنین فراوانی *clbN* ۲۳/۲۳ درصد مثبت بود، فراوانی ژن‌های *clbB* ۲۰ درصد مثبت در *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده بود و فراوانی ۱۳/۳۳ درصد برای هر دو ژن *clbB* و *clbN* مثبت بود (Cheraghi et al., 2016) تفاوت در مطالعه حاضر با مطالعه چراغی به دلیل کیفیت DNA نمونه‌ها (جداسازی با روش جوشاندن)، منبع ایزوله‌ها (نمونه‌های شیر در مقایسه با نمونه‌های بیوپسی) و تعداد ایزوله‌ها (۳۰ مورد) است. مطالعات بر روی ساختار ژنتیکی PKS و توزیع ژنتیکی بین دیگر باکتری‌های *انتروباکتریاسه* انجام شده و گزارش شده که اعضای دیگر *انتروباکتریاسه* مانند *انتروباکتر آئروژینوزا*، *سیتروباکتر کروزئی*، *کلبسیلا پنومونیه* علاوه بر *اشریشیا کلای* وجود دارد (Putze et al., 2009). نتایج مطالعه وی نشان داد که از میان ۱۵۶۵ نمونه جدا شده، ۹/۵ درصد مربوط به *اشریشیا کلای* بود، ۳/۵ درصد با *کلبسیلا پنومونیه*، ۲۷/۳ درصد با *انتروباکتر آئروژینوزا* و ۱۰۰ درصد *سیتروباکتر کروزئی*، که همه آنها *clbB* و *clbN* مثبت بودند. پس این نتیجه نشان داد که فراوانی این ژن‌ها در *اشریشیا کلای* بیش از دیگر جدایه‌های *انتروباکتریاسه* است (Cheraghi et al., 2016). از محدودیت‌های این مطالعه تعداد کم نمونه‌ها و عدم بررسی ژن‌های دیگر *pks* می‌باشد. پیشنهاد می‌شود ژن‌های دیگر *pks* مانند *clbA* و *clbQ* و ارتباط مقاومت آنتی‌بیوتیکی با ژن‌های *pks*، ارتباط ژن‌های ویرولانس مانند *p-rmpA* و *wcaG* با ژن‌های *pks*، ارتباط ژن‌های مرتبط با کپسول باکتری مانند K1 و K2 با ژن‌های *pks* در مطالعات بعدی بررسی گردند.

نتیجه گیری کلی

میکروبیوتای دستگاه گوارش در ایجاد بیماری کولیت اولسراتیو نقش دارند که یکی از مهمترین آنها باکتری *کلبسیلا پنومونیه* واجد ژن *pks* است. میزان بار میکروبی در فصول گرم سال بیشتر از فصول سرد است بنابراین باید تمهیدات لازم در مراحل مختلف اعم از تولید، انتقال و نگهداری شیر اندیشیده شود و التهاب طولانی مدت روده و بیماری هایی مانند آن می توانند شخص را به سرعت در معرض ابتلا به سرطان قرار دهند بنابراین این بیماری‌ها نیازمند کنترل و پیگیری موثر بیش از پیش می‌باشند. وجود جزیره ژنی *pks* در

باکتری های مختلف نشان از بیماری‌زایی آن ها دارد تحقیق حاضر از این جهت حائز اهمیت می‌باشد که به نحوه ی مصرف شیر در بین عوام و اهمیت پاستوریزاسیون و در نتیجه جلوگیری افزایش ابتلا به سرطان کلورکتال پرداخته است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کادر محترم آزمایشگاه پژوهشی پاسارگاد که در انجام بخش های عملی این تحقیق یاری‌رسان بودند کمال تشکر را دارند.

منابع

۱. کریمی، سپیده.، ممتاز، حسن. (۱۳۸۹). تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از اورام پستان گاو در گاوداری‌های شهرستان شهرکرد. مجله نوید نو، دوره ۲۲، شماره ۶۹، صفحه ۱۴-۱.

۲. سالکی، خلیل، مرادی، حسین. (۱۳۹۱). بررسی عوامل باکتریایی ورم پستان گاو در گاوداری های شهرستان ایلام. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دوره ۲۰، شماره ۴، صفحه ۹۵-۸۸.

۳. دادخواه، محمدعلی. (۱۳۸۹) بررسی میزان شیوع بیماری تورم پستان ناشی از باکتری های خانواده *آنتروباکتریاسه* (کلی فرم ها) و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی آن ها در گاوداری های سنتی شهرستان سراب، شانزدهمین کنگره دامپزشکی ایران. تهران، ۹-۷ اردیبهشت ۸۹.

4. Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T-J., et al. 2012. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. Science. 338: 120–3.

5. Azadpour, M., Nowroozi, J., Goudarzi, G.R., Mahmoudvand, H. 2015. Presence of *qacE_1* and *cepA* genes and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Iran. Trop. Biomed. 32:109–115.

6. Buc, E., Dubois, D., Sauvanet, P., Raisch, J., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., et al. 2013. High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. PLoS ONE. 8:e56964.

7. Chander, A., Shrestha, C.D. 2013. Prevalence of extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* urinary isolates in a tertiary care hospital in Kathmandu, Nepal. BMC Research Notes. 6: 487.

8. Chen, Y.T., Lai, Y.C., Tan, M.C., Hsieh, L.Y., Wang, J.T., Shiau, Y.R., et al. 2017. Prevalence and characteristics of pks genotoxin gene cluster-positive clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan. Sci. Rep. 7: 43120.

9. Cheraghi, A., Mohammad Ganji, Sh., Najmi, B. 2016. Analysis of clbN and clbB genes in isolated *Klebsiella pneumonia* of biopsies from patients with colorectal cancer. IJML. 3: 163-169.

10. Drawz, S.M., Papp-Wallace, K.M., Bonomo, R.A. 2014. New B-lactamase inhibitors: a therapeutic renaissance in an MDR world. Antimicrob Agents Chemother. 58: 1835–46.

11. Fang, C.T., Chuang, Y.P., Shun, C.T., Chang, S.C., Wang, J. T. 2004. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. J Exp Med. 199: 697–705.

12. Faïs, T., Delmas, J., Barnich, N., Bonnet, R., Dalmasso, G. 2018. Colibactin: More Than a New Bacterial Toxin. Toxins. 10: 151.

13. Fung, C.P., Hu, B.S., Chang, F.Y., Lee, S.C., Kuo, B.I., Ho, M., et al. 2000. A 5-year study of the seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae*: high prevalence of capsular serotype K1 in Taiwan and implication for

vaccine efficacy. J. Infect. Dis. 181: 2075–2079.

14. Guo, Y., Wang, S., Zhan, L., et al. 2017. Microbiological and clinical characteristics of Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* isolates associated with invasive infections in China. *Front* Cell Infect Microbiol. 7: 24.

15. Johnson, J.R., Johnston, B., Kuskowski, M.A., Nougayrede, J.P., Oswald, E. 2008. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli pks* genomic island. J. Clin. Microbiol. 46: 3906–3911.

16. Lan, Y., Zhou, M., Jian, Z., Yan, Q., Wang, S., Liu, W. 2019. Prevalence of pks gene cluster and characteristics of *Klebsiella pneumoniae*-induced bloodstream infections. J Clin Lab Anal. e22838.

17. Lai, Y.C., Lin, A.C., Chiang M.K., Dai, Y.H., Hsu, C.C., Lu, M.C., et al. 2014. Genotoxic *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. PLoS ONE. 9: e96292.

18. Lery, L.M., Frangeul, L., Tomas, A., Passet, V., Almeida, A.S., Bialek-Davenet, S. 2014. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor. BMC Biology. 12: 41.

19. Lin, J.C., Koh, T.H., Lee, N., Fung, C.P., Chang, F.Y., Tsai, Y.K. 2014. Genotypes and virulence in serotype K2 *Klebsiella pneumoniae* from liver abscess and noninfectious carriers in Hong Kong, Singapore and Taiwan. Gut Pathogens. 6: 21.

20. Lin, Y.C., Lu, M.C., Tang, H.L., Liu, H.C., Chen, C.H., Liu, K.S. 2011. Assessment of hypermucoviscosity as a virulence factor for experimental *Klebsiella pneumoniae* infections: comparative virulence analysis with hypermucoviscosity-negative strain. BMC Microbiology. 11: 50.

21. Putze, J., Hennequin, C., Nougayrède, J.P., Zhang, W., Homburg, S., Karch, H., et al. 2009. Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family *Enterobacteriaceae*. Infect. Immun. 77: 4696–4703.

22. Shon, A.S., Russo, T.A. 2012. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: the next superbug? Future Microbiol. 7: 669-671.

23. Staunton, J. & Weissman, K.J. 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. Nat Prod Rep. 18: 380–416.

24. Thompson, W., Romance, L., Bialkowska-Hobrazanska, H., Rennie, R.P., Ashton, F, Nicolle, L.E. 1993. *Klebsiella pneumoniae* infection on a rehabilitation unit: comparison of epidemiologic typing methods. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 14: 203–210.

Molecular analysis of the genes encoding colibactin production in *Klebsiella pneumoniae* isolated from raw milk by Multiplex-PCR as an agent for colorectal cancer

Radaei Alamoli M[1], Mehrabian S[1], Amini K[2*], Mobasseri P[1]

1. Department of Microbiology, Faculty of Biology Science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

***Corresponding author:** *Dr_kumarss_amini@yahoo.com*

Received: 26 June 2019 Accepted: 27 September 2019

Abstract

Klebsiella pneumoniae is a Gram-negative, non-motile, encapsulated, lactose-fermenting, facultatively anaerobic, rod-shaped bacterium. It has traditionally been considered an opportunistic pathogen and is a common cause of nosocomial infections. The *pks* gene cluster encodes enzymes responsible for the synthesis of colibactin. Colibactin is a genotoxin that has been shown to induce DNA damage and contribute to increased virulence. Colibactin is also strongly suspected of being involved in the development of colorectal cancer. The present study investigated the prevalence of *pks*, *clbN*, and *clbB* genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates. In this study, 220 samples were obtained from raw milk. Then, all samples were cultured in the violet red bile agar and then cultured in blood agar, MacConkey agar, and chocolate agar for bacterial isolation. Biochemical and microbiological tests were performed for confirmation of the bacteria. DNA was extracted from all isolates using a genomic DNA extraction kit. Then multiplex polymerase chain reaction (M-PCR) method was performed using specific primers. It was found that 60 *K. pneumonia* isolates out of 220 samples (27.27%) were confirmed by standard phenotypic tests. The PCR test indicated that 6 (10%) strains carried *clbN* and *clbB* genes. The *pks* positive *K. pneumoniae* was more prevalent in our samples. Owing to its pleiotropic effects, colibactin profoundly influences cellular physiology, inducing DNA breaks that lead to senescence or apoptosis. It seems that the identification of the *pks* positive *K. pneumoniae* in milk is essential to prevent colorectal cancer.

Keywords: *Klebsiella pneumonia*, *clbB*, *clbN*, Multiplex-PCR.