بررسی شیوع سه ژن NDM-1، oqxA و oqxB در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* (*Klebsilla pneumoniae*) جداشده از نمونه‌های ادراری

راضیه زاهدی نسب[۱]، سیده پریسا حسنین*[۲]، احمد راشکی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۳- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۲۹ مهر ۱۴۰۱، بازنگری: ۲۰ آبان ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۲۷ آبان ۱۴۰۱

چکیده

بتالاکتامازها و پمپ‌های ترشحی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *کلبسیلاپنومونیه* هستند. با توجه به شیوع بالای ژن‌های ایجاد کننده مقاومت و گسترش عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه عفونت ادراری ناشی از آن، هدف از این مطالعه بررسی میزان فراوانی ژن‌های NDM-1 ، oqxA و oqxB در ایزوله‌های *کلبسیلاپنومونیه* جدا شده از نمونه‌های ادراری با استفاده از روش PCR بود. استخراج DNA با استفاده از روش جوشاندن انجام شد. واکنش PCR با استفاده ار پرایمرهای طراحی شده بر روی DNA ۹۵ ایزوله *کلبسیلاپنومونیه* صورت پذیرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که فراوانی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های دخیل در مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی شامل oqxA، oqxB و NDM-1 به‌ترتیب ۷۵ ایزوله (۷۸/۹۴ درصد)، ۷۵ ایزوله (۷۸/۹۴ درصد) و ۸۴ ایزوله (۸۸/۴۲ درصد) ارزیابی شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که شیوع ژن‌های مرتبط با مقاومت به آنتی‌بیوتیک در این مطالعه نگران کننده است و مدیریت تجویز آنتی‌بیوتیک برای کنترل عفونت و جلوگیری از انتشار باکتری‌های مقاوم و شناسایی ایزوله‌های مقاوم به دارو با استفاده از روش‌های مولکولی مانند PCR ضروری است.

واژه‌های کلیدی: *کلبسیلاپنومونیه، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عفونت ادراری، NDM-1، oqxA، oqxB*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: p.hasanein@uoz.ac.ir

مقدمه

کلبسیلاپنومونیه یک باکتری گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که به‌عنوان فلور نرمال در دستگاه گوارش یافت می‌گردد (۱). از بین گونه‌های مختلف این باکتری، *کلبسیلاپنومونیه* شایع‌ترین و مهم‌ترین گونه می‌باشد. این گونه یکی از مهم‌ترین علل عفونت‌های بیمارستانی (۲) به‌خصوص عفونت ادراری است (۳). عفونت دستگاه ادراری شایع‌ترین عفونت ثانویه در انسان است. باکتری‌های روده بزرگ، از جمله *کلبسیلاپنومونیه* عامل اصلی عفونت‌های دستگاه ادراری هستند. وقوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشکل اصلی در درمان عفونت‌ها است. بتالاکتامازها و پمپ‌های افلاکس مکانیسم‌های دفاعی اصلی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *کلبسیلاپنومونیه* را تشکیل می‌دهند (۴). مقاومت آنتی‌بیوتیکی، توانایی یک میکروارگانیسم برای توقف اثر یک آنتی‌بیوتیک و یک علت عمده شکست در درمان بیماری‌های عفونی است که سبب افزایش شیوع بیماری، مرگ‌ومیر و هزینه‌های درمان است (۵). بتالاکتامازها، به‌ویژه در باکتری‌های گرم منفی، نمونه عالی از تکامل مکانیسم مقاومت هستند (۶). در دهه‌های گذشته استفاده بیش از حد و نادرست از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام امکان تکامل و انتشار بتالاکتامازهایی مانند NDM* را فراهم کرده است اولین NDM، NDM-1 برای اولین بار در یک سویه *کلبسیلاپنومونیه* جدا شده از بیمار سوئدی هندی‌تبار که به دلیل عفونت ادراری در دهلی نو هند بستری شده بود شناخته شد. ژن کدکننده آنزیم NDM-1 بر روی کروموزوم باکتریایی شناخته شده است با این حال، عناصر متحرک مانند پلاسمیدها نقش عمده‌ای در گسترش این ژن دارند (۷). NDM-1 آنزیمی با دو یون روی در جایگاه فعال خود است که پیوند آمیدی حلقه بتالاکتام را می‌شکند و در برابر کلاس‌های اصلی بتالاکتام مقاومت ایجاد می‌کند (۸). یون‌های روی با فعال کردن یک مولکول آب شروع به هیدرولیز می‌کنند و منجر به تشکیل پروتون و یون هیدروکسید فعال می‌شوند که این یون هیدروکسید به گروه کربونیل بتالاکتام حمله می‌کند که منجر به هیدرولیز آن می‌شود (۷). علاوه بر آنزیم NDM-1، پمپ افلاکس OqxAB به‌عنوان مکانیسم مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *کلبسیلاپنومونیه* نقش مهمی دارد (۹). پمپ‌های افلاکس از دیگر عوامل اصلی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها هستند که به‌طور مؤثری در هنگام درمان عفونت‌های باکتریایی فعالیت می‌کنند. پمپ‌های افلاکس پمپ‌های پروتئینی هستند که مواد سمی تقریباً تمام کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی را از درون سلول به فضای خارج سلولی منتقل می‌کنند (۱۰). OqxAB (پمپ دفعی کینولون/الاکیندوکس) در ابتدا بر روی پلاسمید pOLA52 در سویه اشرشیاکلی شناسایی شد (۱۱). وزن مولکولی ۵۲ کیلو دالتون دارد و قابل انتقال به سایر باکتری‌ها می‌باشد (۱۲). oqxAB، پمپ افلاکس غالب موجود در *کلبسیلاپنومونیه* است که در برابر چندین آنتی‌بیوتیک از جمله کینوکسالین، کینولون‌ها، فلوروکینولون‌ها، کلرامفنیکل، تری‌متوپریم، نیتروفورنتوئین و تیجسیکلین مقاومت ایجاد می‌کند (۱۳). پمپ افلاکس oqxAB به خانواده RND† تعلق دارد (۱۴). این پمپ از دو ژن oqxA و oqxB تشکیل شده است که هم روی کروموزوم و هم روی پلاسمید قرار دارند و قابل انتقال به باکتری‌های دیگر می‌باشد (۱۵). بیان پمپ توسط RarA به‌عنوان یک فعال‌کننده و OqxR به‌عنوان یک مهارکننده تنظیم می‌شود (۱۶). بنابراین هدف از

*New-delhi-methallo-B-lactamase

†Resistant Nodulation Division

انجام مطالعه بررسی فراوانی ژن‌های NDM-1 ، oqxA و oqxB در ایزوله‌های *کلبسیلاپنومونیه* جدا شده از نمونه‌های ادراری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: ۹۵ ایزوله *کلبسیلاپنومونیه* که قبلاً از نمونه‌های ادراری جدا شده‌اند و در دمای ۸۰- نگهداری شده بودند در محیط مک‌کانکی آگار (Merk، آلمان) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت و برای استخراج DNA استفاده شد.

استخراج DNA و انجام PCR: ابتدا ایزوله‌های کلبسیلاپنومونیه در لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت *LB به مدت ۱۸- ۱۶ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. از باکتری‌های رشد یافته DNA ژنومیک به روش جوشاندن استخراج گردید. بدین صورت که ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی باکتری را به مدت ۱دقیقه با دور rpm ۱۴۰۰۰سانتریفیوژ گردید. بعد از دور ریختن مایع رویی رسوب حاصل دو بار با ۱۰۰۰میکرولیتر بافر PBS1x شستشو داده شد. در این مرحله به رسوب، ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد داخل ترمومیکسر (اپندورف، آلمان) قرار گرفت. مجدداً به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۴۰۰۰سانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاوی DNA به تیوب استریل منتقل و برای آزمایشات بعدی در۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. کیفیت DNA استخراج شده و غلظت با استفاده از دو روش الکتروفورز نمونه‌های DNA ژنومیک بر روی ژل آگارز ۱ درصد و اندازه‌گیری جذب نوری آنها در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. بر اساس توالی پرایمرهای ذکر شده در جدول ۱ میزان فراوانی ژن‌های NDM-1، oqxA و oqxB با استفاده از واکنش PCR انجام پذیرفت.

جدول۱- توالی پرایمرهای طراحی شده

نام پرایمر	توالی پرایمر(۳′-۵′)	طول
OqxA – F	TAACGGTCGCATTGAAGC	۱۸
OqxA – R	GA GACGAGGTTGGTATGGAC	۲۰
OqxB – F	ACGACTCGCTGTATATGC	۱۸
OqxB – R	GCGTTAATGGAGATCAGGAA	۲۰
NDM-1 – F	TGGCAGCACACTTCCTATCTC	۲۱
NDM-1 – R	GGCAAGCTGGTTCGACAA	۱۸

بدین منظور ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده با ۸ میکرولیتر میکس‌ماستر مخلوط و واکنش PCR طبق شرایط برنامه دمایی برای هر سه ژن در ۳۰ سیکل انجام شد. سپس محصولات PCR در ژل آگاروز ۲ درصد قرار گرفته و با ولتاژ ۷۵ به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز شدند و سپس با دستگاه gel doc (اپندورف، آلمان) بررسی شدند. اندازه قطعات تکثیر شده با کمک مارکر ۱۰۰bP تولید شرکت سیناکلون مقایسه و مشخص شد. برای تحلیل داده‌های آماری در این مطالعه از نرم‌افزار Excell استفاده شد.

* Luria-Bertani broth

جدول ۳ - شرایط چرخه دمایی انجام واکنش PCR ژن‌های oqxA، oqxB و NDM-1

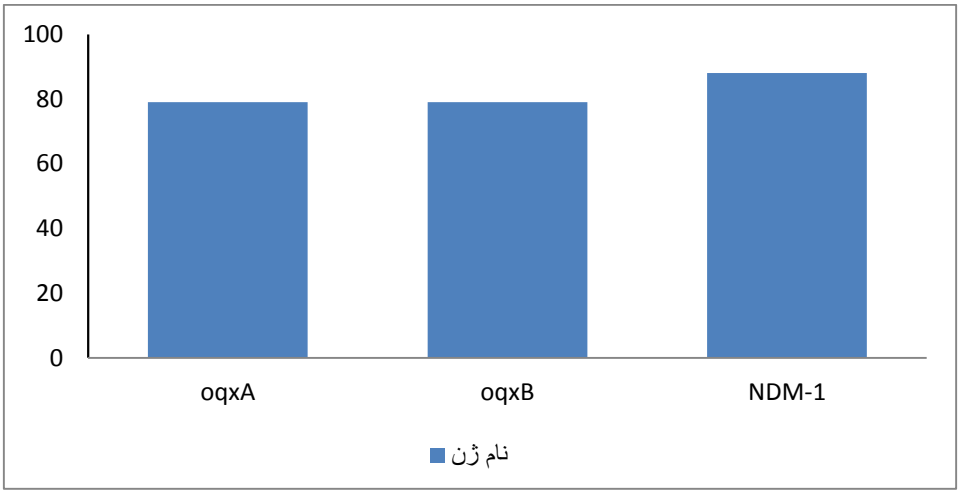
مراحل	دما (درجه)	زمان(ثانیه)	تعداد سیکل
Intital Denaturing	۹۴° C	۵Min	۱
Denaturing	۹۴° C	۱Min	۳۰
Annealing	oqxA ۵۴° C oqxB۵۵/۵° C NDM-1 ۵۷/ ۹ ° C	۳۵s	۳۰
Extension	۷۲° C	۲۵s	۳۰
Final Extension	۷۲° C	۱۰Min	۱

نتایج

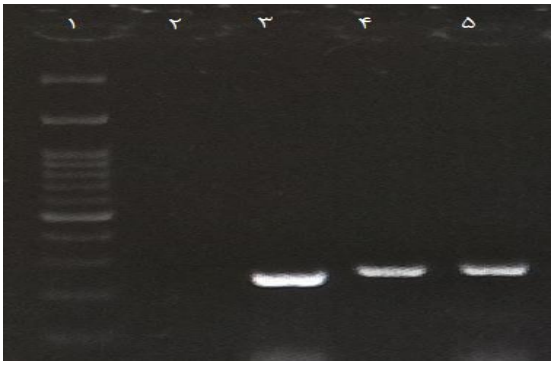
با انجام PCR روی DNA های استخراج شده از ۹۵ ایزوله مورد بررسی به‌ترتیب ۸۴ ایزوله (۸۸/۴۲)، ۷۵ ایزوله (۷۸/۹۴) و ۷۵ ایزوله (۷۸/۹۴) حاوی ژن NDM-1، oqxA و oqxB بودند. نتایج حاصل از PCR ژن‌های NDM-1، oqxA و oqxB در جدول ۵ نشان داده شده است. این مطالعه نشان داد که در بین ایزوله‌های مورد بررسی ژن کدکننده آنزیم NDM-1 بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده است. شکل ۱، فراوانی هر یک از ژن‌ها را در بین ۹۵ نمونه ایزوله *کلبسیلاپنومونیه* و شکل ۲ تصویر ژل الکتروفورز ۲ درصد محصولات PCR را نشان می‌دهد.

جدول ۵ - درصد فراوانی ژن‌های مورد مطالعه

ژن	اندازه توالی	فراوانی	تعداد نمونه
NDM-1	۲۷۳	۸۸/۴۲	۹۵
oqxA	۲۴۹	۷۸/۹۴	۹۵
oqxB	۲۶۵	۷۸/۹۴	۹۵



شکل۱ - درصد فراوانی ژن‌های مورد مطالعه



شکل۲- تصویر ژل آگارز۲ درصد محصولPCR برای ژن‌هایoqxA، oqxB و NDM-1 . چاهک اول Ladder، چاهک دوم کنترل منفی (آب مقطربدون DNA)، چاهک سوم باند مربوط به ژن oqxA، چاهک چهارم باند مربوط به ژن oqxB و چاهک پنجم باند مربوط به ژن کدکننده آنزیم NDM-1

بحث و نتیجه‌گیری

متاسفانه در دهه‌های اخیر، استفاده نادرست و بیش از اندازه آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین عوامل اجتماعی و اقتصادی، گسترش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را تسریع کرده و درمان دارویی را بی‌اثر کرده است. در حال حاضر، سالانه حداقل ۷۰۰۰۰۰ نفر در سراسر جهان به دلیل مقاومت ضد میکروبی جان خود را از دست می‌دهند. بدون درمان‌های جدید و بهتر، سازمان بهداشت جهانی(WHO) پیش‌بینی می‌کند این تعداد تا سال ۲۰۵۰ به ۱۰ میلیون نفر افزایش یابد و این نشان‌دهنده یک نگرانی بهداشتی و اهمیت این موضوع می‌باشد (۱۷). *کلبسیلاپنومونیه* معمولاً بیماران بستری در بیمارستان را درگیر می‌کند و باعث عفونت‌های خارج روده‌ای مانند عفونت دستگاه ادراری، عفونت خون (سپتی‌سمی) و ذات الریه می‌شود (۱۸). مخازن اصلی برای انتقال *کلبسیلاپنومونیه* دستگاه گوارش و دست پرسنل بیمارستان است. به دلیل انتشار سریع در محیط بیمارستان، این باکتری تمایل به ایجاد بیماری‌های بیمارستانی دارد (۲). باکتری‌های گرم‌منفی تولیدکننده NDM-1 می‌توانند به هر آنتی‌بیوتیک بتالاکتام، از جمله کاربا‌پنم که یکی از آخرین خطوط درمان آنتی‌بیوتیکی علیه باکتری‌های مقاوم به چند دارو است، مقاوم باشند (۱۹). گسترش جهانی ژن blaNDM-1در میان پاتوژن‌های باکتریایی مقاوم به چند دارو تهدیدی برای انسان است که همه بیماران سراسر جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد هنوز هیچ واکسنی برای جلوگیری از عفونت‌های تولید شده توسط باکتری‌های دارای کارباپنماز وجود ندارد بنابراین، بررسی فنوتیپ و ژنوتیپ الگوی مقاوم NDM-1 در سراسر جهان ضروری است (۲۰). پمپ افلاکس oqxAB از دو ژن oqxA و oqxB تشکیل شده است که هم روی کروموزوم و هم روی پلاسمید قرار دارند و قابل انتقال به باکتری‌های دیگر می‌باشد. این پمپ‌ها عامل ایجاد مقاومت در برابر فلوروکینولون‌ها و بیوسایدهایی از قبیل تریکلوسان، کلروهگزیدین و اتیدیوم بروماید هستند (۱۵). نتایج این مطالعه نشان داد که ژن NDM-1 با ۸۸/۴۲ درصد بیشترین فراوانی را در بین ایزوله‌های *کلبسیلاپنومونیه* دارد و فراوانی ژنی برای ژن‌های oqxA و oqxB ۷۸/۹۴ درصد مشاهده گردید. همسو با نتایج مطالعه حاضر در مطالعه‌ای Thapa و همکاران در سال ۲۰۲۱ در نپال بر روی ۵۸ ایزوله *کلبسیلاپنومونیه*، شیوع ژنNDM-1 bla ۸۰ درصد گزارش شد (۲۱). در مطالعه‌ای که طالب‌زاده و همکاران در سال ۲۰۲۱ بر روی ۵۰ ایزوله *کلبسیلاپنومونیه* مقاوم به سفالوسپورین‌ها انجام

دادند، فراوانی ژن‌های oqxA و oqxB به‌ترتیب ۷۲ و ۶۸ درصد گزارش شد (۲۲). در مطالعه‌ای که توسط لطیفی و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر روی ۱۵۱ ایزوله *کلبسیلاپنومونیه* صورت گرفت نتایج PCR نشان داد که ژن blaNDM-1، ۹۶/۶ درصد ایزوله‌ها را تشکیل می‌دهد (۲۳). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Shinu و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر روی ۷۴ ایزوله *کلبسیلاپنومونیه* انجام گرفت، نتایج PCR نشان داد که ۵۸ (۸۴/۰۶ درصد) و ۶۲ (۸۹/۸۶ درصد) ایزوله‌های *کلبسیلاپنومونیه* به ترتیب دارای ژن‌های oqxA و oqxB بودند (۲۴). در مطالعه‌ای که توسط زمردی و همکاران در سال ۱۳۹۸بر روی ۱۰۰سویه *کلبسیلاپنومونیه* انجام شد، شیوع ژن‌های oqxA و oqxB در بین سویه‌های مقاوم به‌ترتیب ۶۹/۷۶ و ۷۲/۱ درصد ارزیابی شد (۴)، که نتایج این مطالعه با مطالعه‌ی حاضر همخوانی دارد. در مطالعه‌ای که توسط Politi و همکاران در سال ۲۰۱۹ بر روی ۴۸۰ ایزوله *کلبسیلاپنومونیه* انجام گرفت، نتایج PCR وجود ژن blaNDM-1 را در ۳۴۱ (۷۱ درصد) ایزوله *کلبسیلاپنومونیه* تأیید کرد (۲۷). علاوه بر آن یافته‌های مطالعه حاضر بیشتر از نتایج به دست آمده از مطالعات دهنمکی و همکاران و رشید و همکاران در سال ۲۰۲۰ در ایران و پاکستان که به‌ترتیب روی ۱۰۰ و ۷۰ ایزوله *کلبسیلاپنومونیه* انجام شد می‌باشد (۲۵، ۲۶). علت تفاوت مطالعه حاضر با مطالعه‌های دیگر می‌تواند استفاده از روش‌های مختلف و تفاوت میزان مقاومت در نقاط مختلف جهان باشد. نتایج این مطالعه با مطالعه حاضر تقریباً همخوانی دارد. نتایج مطالعه حاضر حاکی از شیوع بالای باکتری‌های مقاوم در جامعه است لذا شناسایی سویه‌های مقاوم *کلبسیلاپنومونیه* در آزمایشگاه‌ها جهت تجویز آنتی‌بیوتیک‌های مناسب و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها به افزایش سرعت در شروع درمان و در نتیجه به بهبود سریع‌تر بیماران کمک می‌کند، همچنین محدود کردن تجویز آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند سفالوسپورین‌ها و کاربانم‌ها در جلوگیری از انتشار سویه‌های مقاوم ضروری است. تشخیص دقیق ژن‌های مقاومت با روش‌های مولکولی مانند واکنش زنجیره پلی‌مراز برای کنترل انتشار سویه‌های مقاوم ضروری است.

منبع مالی

تحقیقات منجر به این نتایج بودجه‌ای را از دانشگاه زابل بر اساس توافق‌نامه گرنت شماره IR-UOZ-GR- 9452 دریافت کرده است.

References

1- Ranjbaran M, Zolfaghari M, Japoni-Nejad A, Amouzandeh-Nobaveh A, Abtahi H, Nejad M, *et al.* Molecular investigation of integrons in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from urinary tract infections. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2013; 23(105): 20-7. [In Persion]

2- Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*. 1998; 11(4): 589-603.

3- Izadi G, Zandi H, Dehghan Benadkoki A, Emadi S. Al Sadat. Vakili, M,and Astani, A. Investigation of the frequency of quinolone resistance plasmid genes qepA and aac (6')-Ib-cr in Klebsiella Pneumoniae isolates from patients with urinary tract infections in Yazd. *Journal of Isfahan Medical School*. 2017; 35(454): 1579-86.[In Persion]

4- Zomorrodi A, Zargar M, Noroozi J. Evaluation of antibiotic resistance associated with ophthalmic oqxAB pumps in Klebsiella pneumoniae causing urinary tract infection. *Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch*. 2019; 29(2): 163-70. [In Persion]

5- Mahluji F, Farzaneh F, Khurshidi A, Zibai

M. Investigating the abundance of class I integrons in Klebsiella pneumoniae strains with multidrug resistance isolated from clinical samples by polymerase chain reaction. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*. 2016; 21(3): 68-78. [In Persion]

6- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995; 39(6): 1211-33.

7- Oloni M. New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM) plasmid predictions. 2020.

8- Abdullahi SA, Arzai AH, Yusuf I, Adamu SM, Adamu S, Koki YA, *et al.* Molecular detection of New Delhi metallo beta lactamase 1 (NDM-1) producing bacterial isolates in Kano-Northwestern Nigeria. *Annual Research & Review in Biology*. 2017:1-6.

9- Razavi S, Mirnejad R, Babapour E. Involvement of AcrAB and OqxAB efflux pumps in antimicrobial resistance of clinical isolates of Klebsiella pneumonia. *Journal of Applied Biotechnology Reports.* 2020; 7(4): 251-7.[In Persion]

10- Kumar S, Varela MF. Biochemistry of bacterial multidrug efflux pumps. *International Journal of Molecular Sciences.* 2012; 13(4): 4484-95.

11- Hansen LH, Johannesen E, Burmølle M, Sørensen AH, Sørensen SJ. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquindox in Escherichia coli. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004; 48(9): 3332-7.

12- Hansen LH, Jensen LB, Sørensen HI, Sørensen SJ. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in Escherichia coli and selected enteric bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007; 60(1): 145-7.

13- Li J, Zhang H, Ning J, Sajid A, Cheng G, Yuan Z, Hao H. The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrobial Resistance & Infection Control.* 2019; 8(1) :1-3.

14- Jacoby GA. Plasmid-mediated quinolone resistance, in Antimicrobial Drug Resistance. 2017; 265-268.

15- Hashemi A, Fallah F, Taherpour A, Goudarzi H, Erfanimanesh S, Taki E. Evaluation of genetic pattern and determination of oqxA gene expression levels among clinical isolates of Klebsiella pneumoniae strains. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2014; 24(119): 48-61. [In Persion]

16- Bialek-Davenet S, Lavigne JP, Guyot K, Mayer N, Tournebize R, Brisse S, *et al.* Differential contribution of AcrAB and OqxAB efflux pumps to multidrug resistance and virulence in Klebsiella pneumoniae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015; 70(1): 81-8.

17- Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens*. 2021; 10(10): 1310.

18- Martin RM, Cao J, Brisse S, Passet V, Wu W, Zhao L, *et al.* Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of Klebsiella pneumoniae. *Msphere*. 2016;1(5): e00261-16.

19- Armin S, Fallah F, Azimi L, Kafil HS, Ghazvini K, Hasanzadeh S, *et al.* Warning: spread of NDM-1 in two border towns of Iran. *Cellular and Molecular Biology*. 2018; 64(10): 125-9. [In Persion]

20- Fallah, F, Taherpour A, Hashemi A. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1). *Archives of Clinical Infectious Diseases.* 2011; 6(4): 171-7. [In Persion]

21- Thapa S, Adhikari N, Shah AK, Lamichhane I, Dhungel B, Shrestha UT, *et al.* Detection of NDM-1 and VIM genes in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae isolates from a tertiary health-care center in Kathmandu, Nepal. *Chemotherapy*. 2021; 66(5-6): 1-1.

22- Talebzadeh H, Mellali H, Solgi H. Association of fluoroquinolone resistance and ESBL production in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST11 and ST893 in Iran. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2022. [In Persion]

23- Latifi B, Tajbakhsh S, Askari A, Yousefi F. Phenotypic and genotypic characterization of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae clinical isolates in Bushehr province, Iran. *Gene Reports.* 2020; 21: 100932. [In Persion]

24- Shinu P, Bareja R, Nair AB, Mishra V, Hussain S, Venugopala KN, *et al.* Monitoring of Non-β-Lactam Antibiotic Resistance-Associated Genes in ESBL Producing Enterobacterales Isolates. *Antibiotics*. 2020; 9(12): 884.

25- Dehnamaki M, Ghane M, Babaeekhou L. Detection of OqxAB and QepA efflux pumps and their association with antibiotic resistance in Klebsiella pneumoniae isolated from urinary tract infection. *International Journal of Infection*. 2020; 7(4). [In Persion]

26- Rashid, F, Masood R, Faiz M. Prevalence of New Delhi Metallo Beta-Lactamase (NDM) Producing Gram-Negative Bacteria from Different Tertiary Care Hospitals in Lahore, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 2020; 52(3): 1209 [In Persion]

27- Politi L, Gartzonika K, Spanakis N, Zarkotou O, Poulou A, Skoura L, *et al.* Emergence of NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae in Greece: evidence of a widespread clonal outbreak. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019; 74(8): 2197-2202.

Prevalence of three NDM-1, oqxA and oqxB genes in *Klebsilla pneumoniae* isolates isolated from urine samples

Razieh Zahedi-Nesab[1], Seyedeh Parisa Hasanin[2*], Ahmad Rashki[3]

1- MSC student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran.
3- Associate professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: October 21, 2022; Revise: November 11, 2022; Accept: November 18, 2022

Summary

Beta-lactamases and secretory pumps are the most important factors causing antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* bacteria due to the high prevalence of genes causing resistance and the spread of hospital infections, especially urinary tract infections caused by them, in In this study, *Klebsiella pneumoniae* isolates, isolated from urine samples were examined for the frequency of NDM-1, oqxA and oqxB genes using PCR technique. DNA extraction was extracted by boiling method. PCR was done on 95 isolates of *Klebsiella pneumoniae* using the primers designed in this study. The showed that the prevalence of genes encoding antibiotic resistance including oqxA, oqxB and NDM-1 genes in 75 isolates (% 78.94), 75 isolates (78.94%) and 84 isolates (88.42%) respectively were evaluated. Prevalence of antibiotic resistance genes in this study is worrying and management of antibiotic prescription is necessary to control infection and prevent the spread of resistant bacteria and identify drug resistant isolates using molecular methods such as PCR.

Key words: *Klebsiella pneumoniae, antibiotic resistance, urinary tract infection, NDM-1, oqxA, oqxB*