Avicenna Journal of Clinical Medicine No 91, Volume 26, Issue 1, Spring 2019, Pages: 51-59

Original Article

doi: 10.21859/ajcm.26.1.51

Investigation of the Relationship between Antibiotic Resistance and Biofilm Production in *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Hamadan Hospitals, Iran

Maral Bayati[1], Reza Habibipour[2], Babak Asghari[3,*]

[1] *MSc in Microbiology, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Hamadan Branch, Islamic Azad University, Hamadan, Iran*
[2] *Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Hamadan Branch, Islamic Azad University, Hamadan, Iran*
[3] *Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*

**** Corresponding Author:*** *Babak Asghari, Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. Email: bab.asghari@gmail.com*

Received: 05.12.2018
Accepted: 13.04.2019

How to Cite this Article:
Bayati M, Habibipour R, Asghari B. Investigation of the Relationship between Antibiotic Resistance and Biofilm Production in *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Hamadan Hospitals, Iran. *Avicenna J Clin Med.* 2019; 26(1): 51-59. DOI: 10.21859/ajcm.26.1.51

Abstract

Background and Objective: The role of biofilm formation by bacteria has been considered as an important stage in the pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. This pathogen is one of the most important opportunistic pathogen agents of nosocomial infections, such as pneumonia, urinary tract infections, invasive infections, and surgical site infections. This study aimed to investigate the biofilm producer strains among different clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*.

Materials and Methods: This observational study was conducted on 230 clinical samples with bacterial infection. The selective culture media and biochemical tests were used for the identification of *Klebsiella pneumoniae* isolates. Crystal Violet assay and PCR were also used to characterize biofilm strains.

Results: Out of 230 samples collected from different specimens, 100 isolates (43.47%) of *Klebsiella pneumoniae* were identified by biochemical tests. Of these, 58 (58%) and 42 isolates (42%) were isolated from the male and female individuals, respectively. The phenotypic method showed 2, 27, 41, and 30 isolates as strong biofilm producers, medium biofilm producers, weak biofilm producers, and non-biofilm producers, respectively. The frequency of genes were reported as *wzm* (47%), *markA* (69%), *pgaAa* (65%), and *wbbm* (47%), respectively.

Conclusion: The *markA* gene plays an important role in biofilm formation and can identify different biofilms in *Klebsiella pneumoniae* strains. It is also possible to identify bacteria with weak, moderate, and strong biofilms.

Keywords: Biofilms, *Klebsiella pneumonia*, *mark A* Gene, Virulence Factor

www.SID.ir

Copyright © 2019 Avicenna Journal of Clinical Medicine

مقاله پژوهشی

doi: 10.21859/ajcm.26.1.51

بررسی ارتباط مقاومت آنتی‌بیوتیکی با تولید بیوفیلم در *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از بیمارستان‌های شهر همدان

مارال بیاتی[۱]، رضا حبیبی‌پور[۲]، بابک اصغری[۳،*]

[۱] کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران
[۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران
[۳] استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

* **نویسنده مسئول:** بابک اصغری، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.
ایمیل: bab.asghari@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۹/۱۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۱/۲۴

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

چکیده

سابقه و هدف: نقش بیوفیلم و تولید آن توسط *کلبسیلا پنومونیه* به‌عنوان یک مرحله مهم در بیماری‌زایی گزارش شده است. این پاتوژن یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌های وابسته به عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. در این راستا هدف از مطالعه حاضر، بررسی سویه‌های تولیدکننده بیوفیلم جداشده از جدایه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مشاهده‌ای، ۲۳۰ نمونه بالینی مختلف که دارای عفونت باکتریایی بودند مورد بررسی قرار گرفتند. به‌منظور جداسازی *کلبسیلا پنومونیه* از محیط کشت‌های انتخابی و آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده گردید. همچنین برای مشخص‌کردن سویه‌های تولیدکننده بیوفیلم از روش کریستال ویوله و روش مولکولی استفاده شد.

یافته‌ها: از کل نمونه‌های بالینی مختلف، ۱۰۰ ایزوله (۴۳/۴۷ درصد) *کلبسیلا پنومونیه* از طریق آزمون‌های افتراقی به‌دست آمد که از این میان، ۵۸ ایزوله (۵۸ درصد) از مردان و ۴۲ ایزوله (۴۲ درصد) از زنان جداسازی شد. نتایج حاصل از آزمون آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن بر روی نمونه‌ها نشان دادند که از میان هفت دیسک آنتی‌بیوتیکی به کار برده‌شده، بیشترین و کمترین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به‌ترتیب به سفتازیدیم (۷۴ درصد) و آمیکاسین (۴۸ درصد) تعلق دارد. بر مبنای نتایج، دو ایزوله (۲ درصد) دارای بیوفیلم قوی، ۲۷ ایزوله (۲۷ درصد) دارای بیوفیلم متوسط و ۴۱ ایزوله (۴۱ درصد) دارای بیوفیلم ضعیف بودند. ۳۰ ایزوله (۳۰ درصد) نیز قدرت تشکل بیوفیلم را نداشتند. فراوانی حضور ژن‌های تولیدکننده بیوفیلم در ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* بدین‌صورت گزارش گردید: ژن *wzm* (۴۷ درصد)، ژن *markA* (۶۹ درصد)، ژن *pgaA* (۶۵ درصد) و ژن *wbbm* (۴۷ درصد).

نتیجه‌گیری: ژن *markA* دارای نقش مهمی در تشکیل بیوفیلم بوده و قادر به شناسایی انواع بیوفیلم در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشد و می‌توان با استفاده از آن باکتری‌های دارای قدرت بیوفیلم ضعیف، متوسط و قوی را شناسایی کرد.

واژگان کلیدی: بیوفیلم، ژن *markA*، عوامل بیماری‌زا، *کلبسیلا پنومونیه*

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه یک باسیل گرم منفی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد. این میکروارگانیسم بخشی از میکروفلور طبیعی روده انسان را تشکیل می‌دهد و امروزه به‌عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب و یکی از مهم‌ترین باکتری‌های دخیل در عفونت‌های بیمارستانی مطرح می‌باشد و موجب بیماری‌های مختلفی مانند عفونت دستگاه ادراری، سپتی‌سمی، پنومونی و عفونت‌های داخل شکمی در بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان می‌شود [۱]. مقاومت ضدمیکروبی باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه به‌ویژه *کلبسیلا پنومونیه* همواره به‌عنوان یک مشکل جدی برای سلامت انسان مطرح بوده و بیماران را در بیمارستان‌های سراسر جهان تحت تأثیر قرار می‌دهد. از سوی دیگر، تغییر فلور میکروبی به وسیله

www.SID.ir

آنتی‌بیوتیک‌ها باعث تهاجم باکتری‌های فرصت‌طلب و قارچ‌ها می‌شود. قابلیت *کلبسیلا پنومونیه* در ایجاد بیماری به دلیل کاسته‌شدن دفاع میزبان در نتیجه اعمال جراحی پیچیده و طولانی و نیز مصرف داروهای متفاوت رو به ازدیاد می‌باشد. از آنجایی که *کلبسیلا پنومونیه* در افراد با ضعف سیستم ایمنی، بیماری ایجاد می‌کند؛ بنابراین افزایش میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در این باکتری می‌تواند تهدیدی جدی محسوب شود؛ بنابراین تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های بیماری‌زای شایع به‌منظور هدایت درمان‌های تجربی و اختصاصی علیه یک پاتوژن خاص از اهمیت به‌سزایی برخودار می‌باشد. از سوی دیگر، شیوع جهانی سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* دارای مقاومت چندگانه (MDR: Multidrug Resistance) تبدیل به یک خطر جدی شده است (به‌ویژه که این سویه‌های MDR نیز از عفونت‌های بیمارستانی گزارش شده‌اند) [۲،۳]. یکی از فاکتورهای مؤثر در بیماری‌زایی *کلبسیلا پنومونیه*، توانایی تشکیل بیوفیلم است که موجب افزایش مقاومت در برابر عوامل دفاعی میزبان و عوامل ضد میکروبی می‌شود. علاوه‌براین، باکتری *کلبسیلا پنومونیه* به واسطه داشتن فاکتورهای ویرولانس مختلف، از توانایی تولید طیف وسیعی از عفونت‌ها برخوردار می‌باشد [۴،۵]. تولید بیوفیلم و توانایی اتصال به بافت‌های میزبان در *کلبسیلا پنومونیه* توسط ژن‌های مختلفی مانند (*wbbm*، *pgaA*، *mrkA* و *wzm*) کدگذاری می‌شود. حضور این ژن‌ها در *کلبسیلا پنومونیه* منجر به تولید عفونت‌های شدیدتری در بیماران شود [۶،۷]. با توجه به موارد بیان‌شده، مطالعه حاضر با هدف تعیین ژن‌های (*wbbm*، *pgaA*، *mrkA* و *wzm*) دخیل در تولید بیوفیلم به روش فنوتیپی و PCR (Polymerase Chain Reaction) در ایزوله‌های *بالینی کلبسیلا پنومونیه* جداشده از بیمارستان‌های شهر همدان انجام شد.

مواد و روش‌ها

تعیین هویت و روش ارزیابی حساسیت ضد میکروبی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه

مطالعه مشاهده‌ای حاضر از ماه مهر سال ۱۳۹۶ تا فروردین سال ۱۳۹۷ در ارتباط با بیماران بستری‌شده در دو جنس زن و مرد در بیمارستان‌های سینا و بعثت همدان انجام شد. به‌منظور انجام این مطالعه، ابتدا نمونه‌های مختلف بالینی شامل: ادرار، زخم، خون و تراشه جمع‌آوری گردید. پس از انجام کشت بر روی محیط‌های بلاد آگار، مک‌کانکی آگار و EMB آگار (Eosin Methylene Blue) (Merk، آلمان)، نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. شایان ذکر است که از کلنی‌های رشدیافته مشکوک به *کلبسیلا پنومونیه* برای انجام آزمون‌های بیوشیمیایی افتراقی نظیر TSI (Triple Sugar Iron)، SIM (Sulphide Indole Motility)، اوره‌آز، سیمون سیترات و MR/VP (Methyl Red- Voges-Proskauer) استفاده شد. سپس، ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداسازی گشته و تعیین هویت شدند. علاوه‌براین، ارزیابی حساسیت ضد میکروبی ایزوله‌ها با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Merk، آلمان) با استفاده از دیسک‌های آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۳۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفپیم (۳۰ میکروگرم) و سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) تهیه‌شده از شرکت MAST انگلستان انجام شد. برای انجام این کار، محیط مولر هینتون آگار و سوسپانسیون میکروبی (کدورت معادل استاندارد نیم مک‌فارلند) تهیه گردید و توسط سوآپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار در سه جهت مختلف کشت داده شد و پس از ۱۵ دقیقه پخش‌کردن کامل سوسپانسیون میکروبی بر روی محیط مذکور، دیسک‌ها با فاصله لازم در کنار یکدیگر قرار گرفتند و پس از ۲۴ ساعت انکوبه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله‌های عدم رشدیافته توسط خط‌کش اندازه‌گیری گردید. در ادامه، با کمک جدول استاندارد موجود (CLSI: Clinical & Laboratory Standard Institute) (۲۰۱۷) [۸]، نتایج برای هر آنتی‌بیوتیک مطابق با دستورالعمل مربوطه به‌عنوان "حساس، نیمه‌حساس و مقاوم" ثبت شدند.

روش فنوتیپی پلیت میکروتیتر

در این مطالعه روش فنوتیپی پلیت میکروتیتر برای تعیین قدرت تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در این روش ۱۰۰ ایزوله موکوئیدی جمع‌آوری‌شده به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. سپس، تک‌کلنی‌ها از هر ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* به محیط TSB با ۲ درصد گلوکز منتقل گردیدند و جذب نوری معادل ۰/۱ درصد در طول موج ۶۳۰ نانومتر تنظیم شد. در ادامه، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به شش چاهک موازی در میکروپلیت ۹۶ چاهکی افزوده گردید و از محیط TSB به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محتوای چاهک‌ها به آرامی آسپیره گردیدند و با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر متانول خالص به چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه جهت اتصال باکتری‌ها به کف و جدار چاهک در دمای اتاق قرار داده شدند. در مرحله بعد پس از شستشو و حذف متانول، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱ درصد اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در ادامه به‌منظور حذف رنگ اضافه، پلیت به آرامی با آب مقطر شستو داده شد و پس از خشک‌شدن در مجاورت هوا، در هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق ریخته شد. در نهایت، رنگ آزادشده در هر چاهک در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر (ELISA Reader state fax2100) جذب هر چاهک خوانده شد [۹]. نمونه کنترل منفی در این روش، TSB

Archive of SID

www.SID.ir

حاوی ۱ درصد گلوکز بود. جهت اطمینان از صحت کار برای ایزوله‌های مورد مطالعه، جذب نوری هریک از ایزوله‌ها سه مرتبه مورد بررسی قرار گرفت. معیار تعیین میزان تولید بیوفیلم در جدول ۱ ارائه شده است [۱۰].

واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR)

برای انجام واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR)، ژنوم *کلبسیلا پنومونیه* به روش Boiling استخراج گردید. برای این منظور، پنج کلنی باکتری از کشت تازه تهیه‌شده بر روی محیط کشت BHI آگار (Brain Heart Infusion) در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گشت و با آب مقطر شست و شو داده شد. سپس، محلول رویی تخلیه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر محلول NaoH به میکروتیوپ اضافه شد و به‌خوبی ورتکس گردید. در ادامه، سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۹۶ درجه قرار داده شد و پس از خنک‌شدن ویال‌ها، ۵۰ میکرولیتر محلول تریس بیس به آن‌ها اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر محلول رویی که حاوی ژنوم باکتری بود به میکروتیوب‌های استریل منتقل شد. در این مرحله پس از استخراج، به‌منظور اطمینان از وجود DNA (Deoxyribonucleic Acid) توتال از دستگاه نانودراپ در دو طول موج ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر استفاده گردید.

ارزیابی ژنوتیپی به‌منظور شناسایی ژن‌های *markA*، *pgaA*، *wzm* و *wbbm* در ایزوله‌های مورد مطالعه از روش PCR با استفاده از زوج‌پرایمرهای نشان‌داده‌شده در جدول ۲ استفاده شد [۱۱].

در این مطالعه از مسترمیکس آماده شرکت آمپلیکون دانمارک استفاده شد. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، تکثیر و شناسایی ژن‌های مورد نظر صورت گرفت. شایان ذکر است که برای انجام واکنش‌های PCR، حجم نهایی هر واکنش ۲۰ میکرولیتر بود. حجم پرایمرها و DNA الگو که باید به مسترمیکس اضافه شود، در جدول ۳ ارائه شده است.

برنامه‌ریزی دستگاه ترموسایکلر و انجام گرادیانت

در این مرحله، گزینه گرادیانت از منوی دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad ،United States) انتخاب شد و دمای اتصال پرایمر، ۵۴ درجه سانتی‌گراد با دامنه دمایی ۲ تا ۶۴ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. شایان ذکر است دمایی که در آن شارپ ترین باند بدون وجود هیچ‌گونه باند غیراختصاصی وجود داشته باشد به‌عنوان Tm (Melting Temperature) مطلوب پرایمر در نظر گرفته می‌شود.

در ادامه، دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد. اتصال پرایمرها در دمای ۵۶ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. در نهایت، محصولات تکثیرشده بر روی ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۹۵ به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شدند و توسط سایبرگرین رنگ‌آمیزی گردیدند. در ادامه، توسط دستگاه Gel doc (UK ،Waraick shire ،Cleaver Scientific Ltd) تحت تأثیر اشعه UV (Ultraviolet) با طول موج ۲۳۰ نانومتر، باندهای مربوطه مشاهده و عکس‌برداری شدند. لازم به ذکر است که از باکتری *کلبسیلا پنومونیه* ATCC13883 که دارای ژن‌های مزبور می‌باشد به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در این مطالعه دمای آنیلینگ برای ژن *wbbm* ۶۰ درجه سانتی‌گراد، برای ژن *pgaA* ۵۸ درجه سانتی‌گراد، برای ژن *markA* ۵۸ درجه سانتی‌گراد و برای ژن *wzm* ۵۶ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.

جدول ۱: طبقه‌بندی توانایی تولید بیوفیلم به وسیله روش میکروتیتر پلیت

توانایی تشکیل بیوفیلم	محاسبه میزان تولید بیوفیلم	نتایج حاصل از میانگین حداکثر جذب نوری OD
قوی	OD>۴*ODC	OD>۰/۳۳۲
متوسط	۲*ODC<OD<=۴*ODC	۰/۱۶۶<OD<=۰/۳۳۲
ضعیف	ODC<OD<=۲*ODC	۰/۰۸۳<OD<=۰/۱۶۶
عدم اتصال	OD<=۰/۰۸۳	OD<=۰/۰۸۳

OD: چگالی نوری (کنترل منفی 3*SD)+(میانگین کنترل منفی ODC: OD)

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های *markA*، *pgaA*، *wzm* و *wbbm*

نام ژن	نام پرایمر	سکانس ژن	اندازه محصول PCR (bp)	منبع
markA	*mrkA-FW* *mrkA-RV*	ACGTCTCTAACTGCCAGGC TAGCCCTGTTGTTTGCTGGT	۱۱۴	۱۱
pgaA	*pgaA-FW* *pgaA-RV*	GCAGACGCTCTCCTATGTC GCCGAGAGCAGGGGAATC	۱۵۶	
wbbM	*wbbM-FW* *wbbM-RV*	ATGCGGGTGAGAACAAACCA AGCCGCTAACGACATCTGAC	۱۲۱	
wzm	*wzm-FW* *wzm-RV*	TGCCAGTTCGGCCACTAAC GACAACAATAACCGGGATGG	۱۲۹	

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳: مقادیر لازم از مواد مورد نیاز برای انجام PCR ژن‌های عامل بیوفیلم در *کلبسیلا پنومونیه*

مواد مورد نیاز	میکرولیتر
مسترمیکس	۱۰
پرایمر رفت	۱
پرایمر برگشت	۱
آب مقطر دیونیزه	۶
نمونه DNA	۲
حجم نهایی	۲۰

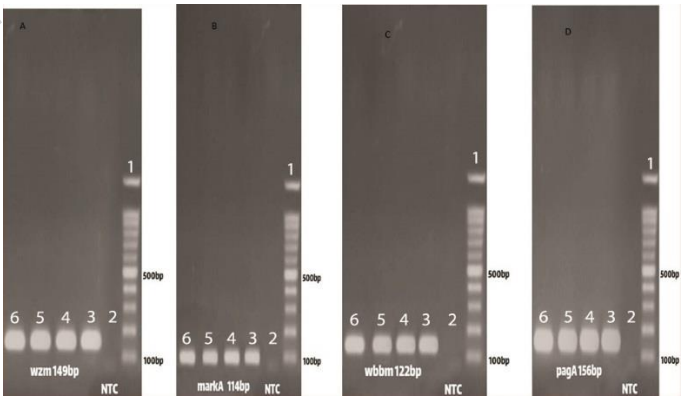
یافته‌ها

از میان ۲۳۰ نمونه بالینی مختلف، ۱۰۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* تشخیص داده شد که از این بین ۵۸ ایزوله (۵۸ درصد) از مردان و ۴۲ ایزوله (۴۲ درصد) از زنان جداسازی گردید. فراوانی *کلبسیلا پنومونیه* جمع‌آوری‌شده از نمونه‌های مختلف بالینی در شکل ۱ مشاهده می‌شود. همان‌طور که مشاهده می‌شود، ۲۴ ایزوله (۲۴ درصد) از عفونت ادراری، هشت ایزوله (۸ درصد) از کشت خون، چهار ایزوله (۴ درصد) از زخم، ۶۲ ایزوله (۶۲ درصد) از تراشه و یک ایزوله (۱ درصد) از آبسه جداسازی شدند. ذکر این نکته ضرورت دارد که تمامی ایزوله‌ها از نظر آزمون‌های تشخیصی بیوشیمیایی دارای الگوی یکسانی بودند. علاوه‌براین، تمامی آن‌ها از نظر آزمون اکسیداز، تولید گاز سولفید هیدروژن، آزمون اندول، حرکت منفی، اوره‌آز و سیترات مثبت بودند و می‌توانستند در محیط کشت مک‌کانکی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد کنند. از سوی دیگر، نتایج حاصل از آزمون آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن بر روی نمونه‌ها نشان داد که از میان هفت دیسک آنتی‌بیوتیکی به کار برده‌شده، بیشترین و کمترین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به‌ترتیب در سفتازیدیم (۷۴ درصد) و آمیکاسین (۴۸ درصد) وجود داشته است (جدول ۴).

نتایج حاصل از آزمون آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن در مورد نمونه‌ها نشان دادند که از میان هفت دیسک آنتی‌بیوتیکی به کار برده‌شده، بیشترین و کمترین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به‌ترتیب نسبت به سفتازیدیم (۷۴ درصد) و آمیکاسین (۴۸ درصد) بوده است. در بررسی نهایی ایزوله‌های مولد بیوفیلم به روش فنوتیپی، ۲ درصد از ایزوله‌ها توانایی اتصال قوی، ۲۷ درصد توانایی اتصال متوسط و ۴۱ درصد توانایی اتصال ضعیف داشتند. ۳۰ درصد از ایزوله‌ها نیز فاقد تشکیل بیوفیلم بودند. فراوانی حضور ژن‌های عامل بیوفیلم در ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* ژن *wzm* ۴۷ درصد، ژن *markA* ۶۹ درصد، ژن *pgaA* ۶۵ درصد و ژن *wbbm* ۴۷ درصد برآورد گردید (شکل ۱).

جدول ۴: فراوانی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جداشده *کلبسیلا پنومونیه* در نمونه‌های مختلف بالینی

نام آنتی‌بیوتیک	علامت اختصاری	حساس درصد	مقاوم درصد	بینابینی درصد
سفوکسیتین	FOX	۴۰	۶۰	۰
سیپروفلوکساسین	Cp	۲۰	۶۵	۱۵
سفتازیدیم	CAZ	۲۴	۷۴	۲
ایمی‌پنم	IPM	۲۵	۶۴	۱۱
جنتامایسین	GM	۳۹	۶۱	۰
آمیکاسین	AN	۴۸	۵۱	۱
سفپیم	FEP	۲۵	۷۱	۴



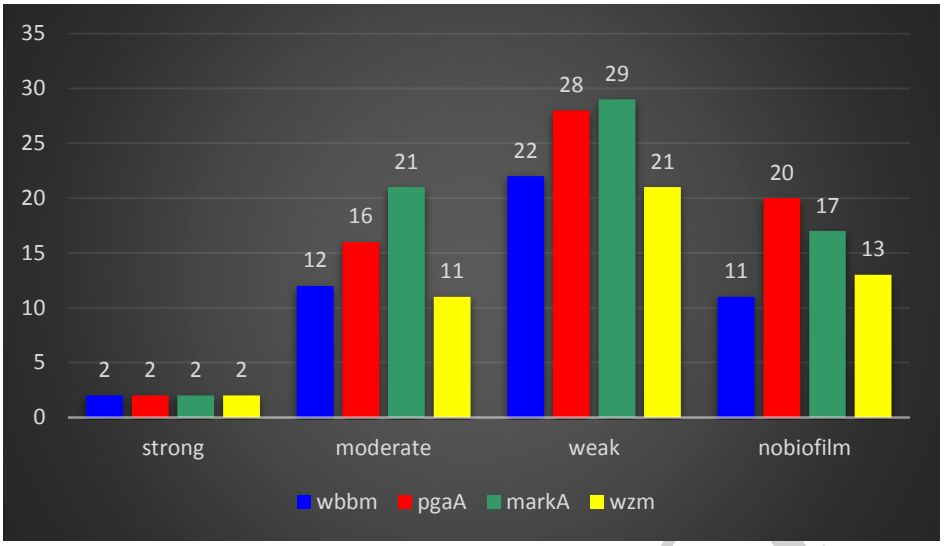
شکل ۱: نتایج حاصل از تکثیر ژن‌های مولد بیوفیلم *wzm* ۱۴۹ جفت باز (A)، *markA* ۱۱۴ جفت باز (B)، *wbbm* ۱۲۲ جفت باز (C) و *pgaA* ۱۵۶ جفت باز (D)

چاهک ۱= سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز؛ چاهک ۲= کنترل منفی؛ چاهک ۳= کنترل مثبت؛ چاهک ۴ تا ۶= ایزوله‌های بالینی

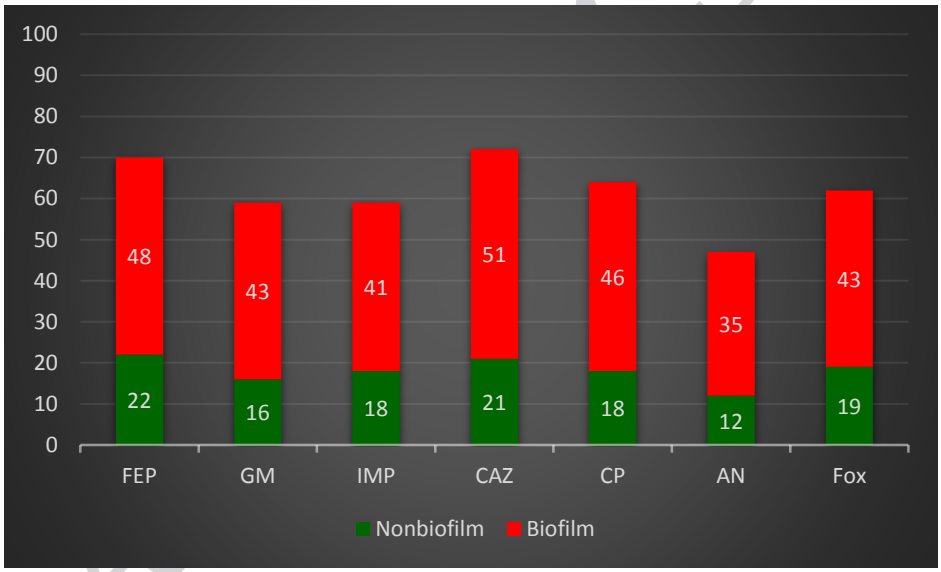
Archive of SID

www.SID.ir

در شکل ۲، مقایسه حضور ژن‌های *markA*، *pgaA*، *wzm* و *wbbm* در بین ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* تولیدکننده بیوفیلم و سویه‌هایی که بیوفیلم تولید نمی‌کنند، ارائه شده است. در شکل ۳ نیز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* تولیدکننده بیوفیلم و ایزوله‌هایی که بیوفیلم تولید نمی‌کنند، قابل‌مشاهده می‌باشد.



شکل ۲: مقایسه حضور ژن‌های *markA*، *pgaA*، *wzm* و *wbbm* در بین ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* تولیدکننده و غیرتولیدکننده بیوفیلم



شکل ۳: مقایسه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* تولیدکننده بیوفیلم و سویه‌هایی که بیوفیلم تولید نمی‌کنند (FEP: سفپیم؛ GM: جنتامایسین؛ IMP: ایمی‌پنم؛ CAZ: سفتازیدیم؛ CP: سیپروفلوکساسین؛ AN: آمیکاسین؛ FOX: سفوکسیتین)

بحث

ابزارهای پزشکی مانند کاتترها، شنت‌ها، سوندها و غیره در پزشکی نوین مورد استفاده قرار می‌گیرند. استفاده از این ابزارها عوارضی را برای انسان به همراه داشته است که بیشتر مرتبط با عفونت‌های میکروبی می‌باشد. مرگ و میر ناشی از عفونت‌های مرتبط با ابزارهای پزشکی به‌طور قابل‌توجهی رو به افزایش بوده و به‌عنوان یکی از مشکلات بیمارستانی محسوب می‌شود [۱۲،۱۳]. در این راستا، *کلبسیلا پنومونیه* به‌عنوان یکی از پاتوژن‌های فرصت‌طلب در بیمارستان‌ها مطرح بوده و اغلب عفونت‌های ناشی از این میکروارگانیزم در افرادی که دچار ضعف سیستم ایمنی هستند، مشاهده شده است. *کلبسیلا پنومونیه* دارای فاکتورهای ویرولانس مختلفی مانند فیمبریه، کپسول و سیستم‌های کسب آهن می‌باشد که تمامی این فاکتورها نقش مهمی در بیماری‌زایی *کلبسیلا پنومونیه* دارند [۱۴،۱۵]. علاوه‌براین، *کلبسیلا پنومونیه* می‌تواند با اتصال به ابزارهای پلاستیکی و تشکیل بیوفیلم در آن‌ها، مشکلاتی را در بیمارستان‌ها ایجاد کند. باید خاطرنشان ساخت که تشکیل بیوفیلم به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های بقا در میکروارگانیسم‌هایی مانند *سودوموناس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مطرح می‌باشد و موجب مزمن‌شدن عفونت‌های

www.SID.ir

ناشی از این میکروارگانیسم‌ها می‌شود [۱۶،۱۷].

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* منجر به شکست درمان در بیماران عفونی ناشی از این میکروارگانیسم می‌گردد. نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان دادند که آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم و آمیکاسین به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی بودند. شایان ذکر است که بیشترین ایزوله‌ها از بیماران مرد جدا شدند. در بررسی‌های صورت‌گرفته توسط توکل و همکاران (۱۳۹۳) در تهران نشان داده شد که در مطالعات انجام‌شده در مورد ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه*، مقاومت به آمیکاسین و سفتازیدیم دارای فراوانی بالایی بوده‌اند. ایزوله‌های این مطالعات، مقاومت چندگانه در *کلبسیلا پنومونیه* داشتند. این نتایج (مطالعه توکل و همکاران) همخوانی نزدیکی با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر داشتند [۱۸]. علاوه‌براین، در مطالعه کیانی و همکاران (۱۳۹۴) که در شهرکرد در ارتباط با *کلبسیلا پنومونیه* انجام شد، بیان گردید که بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مربوط به آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین می‌باشد [۱۹]. لازم به ذکر است که تنها ۲ درصد از ایزوله‌ها نسبت به جنتامایسین و ایمی‌پنم مقاوم بودند. در این مطالعه مشخص گردید که شیوع ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند نقش مهمی در ایجاد و انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی داشته باشد. در مطالعه حاضر مقاومت نسبت به گروه کارباپنم (ایمی‌پنم) دارای فراوانی بالایی بود که این مغایرت می‌تواند به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و کاربرد آن‌ها خارج از پروتکل‌های استاندارد جهانی باشد. در این راستا در مطالعه محمدی و همکاران (۱۳۹۵) در شهر سنندج، از ۶۷ نمونه بالینی مورد بررسی، بیشترین سویه *کلبسیلا پنومونیه* از نمونه‌های ادراری (۶۷/۱۶ درصد) و کمترین آن‌ها از نمونه‌های خون (۴/۴۷ درصد) جدا شده بودند. علاوه‌براین، بیشترین میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ایمی‌پنم (۷۳/۸۱ درصد) و جنتامایسین (۷۰/۹۱ درصد) و بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به تری‌متوپریم/سولفامتوکسازول (۵۳/۷۳ درصد) و سفتریاکسون (۴۹/۲۵ درصد) مشاهده شد [۲۰]. نتایج این مطالعه نشان از افزایش مقاومت سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تری‌متوپریم/سولفامتوکسازول و سفتریاکسون داشتند که شاید علت آن مصرف بی‌رویه این آنتی‌بیوتیک‌ها باشد.

بیوفیلم یکی از مهم‌ترین عواملی است که سبب می‌شود باکتری در برابر طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نسبی تا کامل پیدا کند. این ماده زمینه مقاومت‌های گسترده و چندگانه را فراهم آورده و شرایطی را ایجاد می‌کند که ارگانیسم بتواند قدرت بقای خود در محیط را افزایش دهد. نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که از ۱۰۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از نمونه‌های بالینی مختلف، دو ایزوله (۲ درصد) بیوفیلم قوی، ۲۷ ایزوله (۲۷ درصد) بیوفیلم متوسط و ۴۱ ایزوله (۴۱ درصد) بیوفیلم ضعیف داشتند و ۳۰ ایزوله (۳۰ درصد) فاقد قدرت تشکل بیوفیلم بودند. در این ارتباط، در مطالعه سیفی و همکاران در تهران نشان داده شد که از ۹۴ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از نمونه‌های بالینی مختلف، ۵۵ ایزوله (۵۲/۱ درصد) بیوفیلم متوسط و نه ایزوله (۸/۵ درصد) بیوفیلم ضعیف هستند و هفت ایزوله (۶/۴ درصد) فاقد تشکیل بیوفیلم می‌باشند [۲۱]. در این مطالعه دو ایزوله (۲ درصد) بیوفیلم قوی، ۲۷ ایزوله (۲۷ درصد) بیوفیلم متوسط و ۴۱ ایزوله (۴۱ درصد) بیوفیلم ضعیف داشتند و ۳۰ ایزوله (۳۰ درصد) فاقد قدرت تشکیل بیوفیلم بودند که این امر با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی اندکی داشت. در مطالعه سیفی و همکاران ایزوله‌های تولیدکننده بیوفیلم از نمونه‌های زخم و ادرار بیماران به‌دست آمدند؛ به‌طوری که بیشتر ایزوله‌ها دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تولیدکننده بیوفیلم بودند. بیوفیلم می‌تواند علاوه بر ایجاد زمینه مقاومت به آنتی‌بیوتیک، بیماری‌زایی باکتری را افزایش دهد. از سوی دیگر مشخص شد که در برخی از موارد ممکن است ارتباط معناداری بین حضور فاکتورهای بیماری‌زا و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی وجود داشته باشد. در این مطالعه که سویه‌های تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز با طیف گسترده مورد مطالعه قرار گرفت، نشان داده شد که بین حضور برخی از ژن‌های عامل مقاومت به بتالاکتام‌ها و التهاب‌های شدید در بیماران ارتباط معناداری وجود دارد [۲۲].

در مطالعه حاضر ژن‌های مختلف *wbbm*، *pgaA*، *mrkA* و *wzm* بررسی گردیدند و نتایج نشان دادند که از ۱۰۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از نمونه‌های بالینی مختلف از بیمارستان‌های شهر همدان، ۴۷ ایزوله (۴۷ درصد) دارای ژن *wzm*، ۶۹ ایزوله (۶۹ درصد) دارای ژن *mrkA*، ۶۵ ایزوله (۶۵ درصد) دارای ژن *pgaA* و ۴۶ ایزوله (۴۶ درصد) دارای ژن *wbbm* بوده‌اند. الگوی فراوانی این ژن‌ها با مطالعات مختلفی همخوانی دارد. در این راستا، در مطالعه صورت‌گرفته توسط ووتو و همکاران در مورد پمپ‌های افلاکسی و ژن‌های دخیل در کدشدن بیوفیلم مشخص گردید که ژن‌های *wzm*، *pgaA* و *wbbm* در بیش از ۵۰ درصد از ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* حضور داشتند [۲۳]. وجود قطعه مربوط به ژن *mrkA* و *pgaA* در ۶۹ و ۶۵ درصد از ایزوله‌ها بر روی ژل آگارز به‌صورت باندهایی در محدوده‌های ۱۱۴ و ۱۵۶ bp آشکار شد و با اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه ووتو و همکاران بیان گردید که ممکن است بین حضور بیوفیلم و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ارتباط وجود داشته باشد. در این مطالعه بیان شد که حضور ژن‌های *wzm*، *pgaA* و *wbbm* نقشی مؤثر و کلیدی در تولید بیوفیلم در *کلبسیلا پنومونیه* دارند. علاوه‌براین، در مطالعه‌ای که بر روی ایزوله‌های بالینی صورت گرفت، مشخص شد که حضور برخی از ژن‌های کلیدی مانند *wbbz* و *wzm* در کنار یکدیگر، علاوه بر اینکه بر تولید

Archive of SID

www.SID.ir

محصولات بیوفیلمی اثرگذار می‌باشد، می‌تواند تشکیل برخی از فاکتورهای بیماری‌زای دیگر از جمله آنتی‌ژن‌های سطحی را نیز کد و کنترل کند [۲۴]. با توجه به اینکه در مطالعه حاضر محدودیت در بررسی سایر آنتی‌ژن‌های سطحی وجود داشت، امکان تطبیق این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر وجود نداشت. از آنجایی که *کلبسیلا پنومونیه* از فاکتورها و ژن‌های مختلفی در تشکیل بیوفیلم استفاده می‌کند، در مطالعه حاضر ژن‌های مختلف *wbbm*، *pgaA*، *mrkA* و wzm مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج حاکی از تشکیل بیوفیلم ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* در بیماران بستری در بیمارستان بودند. لازم به ذکر است از آنجایی که تشکیل بیوفیلم در *کلبسیلا پنومونیه* سبب مهار عملکرد آنتی‌بیوتیک‌ها می‌گردد، *کلبسیلا پنومونیه‌های* تولیدکننده بیوفیلم، مشکلات زیادی را برای پزشکان و متخصصان بالینی ایجاد می‌نمایند.

باید خاطرنشان ساخت که متخصصان بالینی و پزشکان در درمان عفونت‌های مرتبط با ابزارهای پلاستیکی که ناشی از باکتری‌های مختلف مانند *سودوموناس*، *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* و *کلبسیلا پنومونیه* هستند، می‌توانند از آنتی‌بیوتیک‌ها همراه با مواد مهارکننده بیوفیلم (مانند Emodin، Phloretin، Carvacrol و غیره)، ضدعفونی‌کننده‌ها و شوینده‌های زخم که برای ضدعفونی‌کردن وسایل و زخم حاصل از کاتتر به کار می‌روند، استفاده نمایند.

نتیجه‌گیری

کلبسیلا پنومونیه به‌عنوان یکی از مهم‌ترین باکتری‌های عامل عفونت بیمارستانی، نقش بسیار مهمی در بروز و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارد. وجود برخی از فاکتورهای زمینه‌ای مانند تولید بیوفیلم می‌تواند نقش مؤثری در ظهور سویه‌های دارای مقاومت چندگانه داشته باشد. اگرچه در مطالعه حاضر ارتباط معناداری بین متغیرهای بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشاهده نشد؛ اما باید توجه داشت که یک باکتری به‌منظور حفظ قدرت بقای خود در برابر عوامل متعدد فیزیکی و شیمیایی، فاکتورهای ویرولانس مختلفی را کد می‌کند. حضور ژن‌های عامل کدکننده بیوفیلم یکی از این عوامل است که سبب ایجاد *کلبسیلا پنومونیه* دارای بیوفیلم می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان با شماره طرح ۱۷۱۳۰۵۰۷۹۶۲۰۰۳ می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از اساتید محترم گروه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد و دانشگاه علوم پزشکی همدان ابراز می‌دارند. شایان ذکر می‌باشد که هیچ‌گونه تعارض منافعی در انجام این مطالعه وجود نداشته است.

REFERENCES

1. Aires CP, Batista MJA, Pitondo-Silva A. Decrease of ceftriaxone susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* according to biofilm maturation. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017;**9**:126-7. PMID: 28552832 DOI: 10.1016/j.jgar.2017.05.001
2. Araújo BF, Ferreira ML, de Campos PA, Royer S, Gonçalves IR, da Fonseca Batistão DW, et al. Hypervirulence and biofilm production in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil. *J Med Microbiol*. 2018;**67**(4):523-8. PMID: 29509136 DOI: 10.1099/jmm.0.000711
3. Araújo F, Ribeiro C, Nero P, Branco JC. *Klebsiella pneumoniae* spinal epidural abscess treated conservatively: case report and review. *Acta Reumatol Port*. 2012;**37**(3):260-3. PMID: 23348115
4. Candan ED, Aksöz N. *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. *Acta Biochim Pol*. 2015;**62**(4):867-74. PMID: 26637376 DOI: 10.18388/abp.2015_1148
5. Bansal S, Harjai K, Chhibber S. Aeromonas punctata derived depolymerase improves susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* biofilm to gentamicin. *BMC Microbiol*. 2015;**15**:119. PMID: 26063052 DOI: 10.1186/s12866-015-0455-z
6. Cazzaniga G, Ottobelli M, Ionescu A, Garcia-Godoy F, Brambilla E. Surface properties of resin-based composite materials and biofilm formation: a review of the current literature. *Am J Dent*. 2015;**28**(6):311-20. PMID: 26846036
7. dos Santos WM, Matuoka JY, Secoli SR. Cost-effectiveness of the antimicrobial treatment for inpatients infected with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase: a systematic review protocol. *JBI Database System Rev Implement Rep*. 2018;**16**(2):336-44. PMID: 29419620 DOI: 10.11124/JBISRIR-2016-003332
8. Benthall G, Touzel RE, Hind CK, Titball RW, Sutton JM, Thomas RJ, et al. Evaluation of antibiotic efficacy against infections caused by planktonic or biofilm cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in Galleria mellonella. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;**46**(5):538-45. PMID: 26364845 DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.07.014
9. Geller BL, Li L, Martinez F, Sully E, Sturge CR, Daly SM, et al. Morpholino oligomers tested in vitro, in biofilm and in vivo against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2018;**73**(6):1611-9. PMID: 29506074 DOI: 10.1093/jac/dky058
10. Chen W, Li B, Li S, Ou YW, Ou Q. Effects of scutellaria baicalensis on activity and biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae*. *Chin Med Sci J*. 2016;**31**(3):180-4. PMID: 27733226
11. Vuotto C, Longo F, Pascolini C, Donelli G, Balice M, Libori M, et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J Appl Microbiol*. 2017;**123**(4):1003-18. PMID: 28731269 DOI: 10.1111/jam.13533
12. Chung PY. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*. 2016;**363**(20):1-6. DOI: 10.1093/femsle/fnw219
13. de Campos PA, Royer S, Batistao DW, Araújo BF, Queiroz LL, de Brito CS, et al. Multidrug resistance related to biofilm formation in Acinetobacter baumannii and *Klebsiella pneumoniae* clinical strains from different pulsotypes. *Curr Microbiol*. 2016;**72**(5):617-27. PMID: 26846651 DOI: 10.1007/s00284-016-0996-x
14. Swathi C, Chikala R, Ratnakar K, Sritharan V. A structural, epidemiological & genetic overview of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs). I*ndian J Med Res*. 2016;**144**(1):21-31. PMID: 27834322 DOI: 10.4103/0971-5916.193279
15. Elemam A, Rahimian J, Mandell W. Infection with panresistant *Klebsiella pneumoniae*: a report of 2 cases and a brief review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2009;**49**(2):271-

Archive of SID

www.SID.ir

4. PMID: 19527172 DOI: 10.1086/600042
16. Fu L, Huang M, Zhang X, Yang X, Liu Y, Zhang L, et al. Frequency of virulence factors in high biofilm formation blaKPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* strains from hospitals. *Microb Pathog*. 2018;**116**:168-72. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.01.030
17. Ta C, Arnason J. Mini review of phytochemicals and plant taxa with activity as microbial biofilm and quorum sensing inhibitors. *Molecules*. 2015;**21**(1):E29. PMID: 26712734 DOI: 10.3390/molecules21010029
18. Tavakol M, Momtaz H. Determination of antibiotic resistance profile in *Klebsiella pneumonia* strains isolated from urinary tract infections of patients hospitalized in Peyambaran hospital (Tehran-Iran). *Feyz*. 2017;**21**(1):74-82. [Persian]
19. Kiani-Abari P, Zamanzad B, Gholipour A, Noormohamadi Z. Determination and prevalence of antibiotic resistance in multi-drug resistant *Klebsiella pneumonia* in patients referred to the educational hospitals of Shahrekord in 2013. *J Shahrekord Uuniv Med Sci*. 2015;**17**(3):121-7. [Persian]
20. Mohammad S, Mohammadi B, Zandi S, Ramazanzadeh R, Rouhi S. Antibiotic sensitiviti in strains of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from clinical samples Besat hospitals of Sannandaj (2013-2014). *Zanko Med Sci*. 2016;**17**(52):1-9. [Persian]
21. Seifi K, Kazemian H, Heidari H, Rezagholizadeh F, Saee Y, Shirvani F, et al. Evaluation of biofilm formation among *Klebsiella pneumoniae* isolates and molecular characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur J Microbiol*. 2016;**9**(1):e30682. PMID: 27099694 DOI: 10.5812/jjm.30682
22. Ostria-Hernandez ML, Juárez-de la Rosa KC, Arzate-Barbosa P, Lara-Hernández A, Sakai F, Ibarra JA, et al. Nosocomial, multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from mexico city produce robust biofilms on abiotic surfaces but not on human lung cells. *Microb Drug Resist*. 2018;**24**(4):422-33. PMID: 28915364 DOI: 10.1089/mdr.2017.0073
23. Vuotto C, Longo F, Pascolini C, Donelli G, Balice MP, Libori MF, et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in Klebsiella pneumoniae urinary strains. *J Appl Microbiol*. 2017;**123**(4):1003-18. PMID: 28731269 DOI: 10.1111/jam.13533
24. Chhibber S, Gondil VS, Sharma S, Kumar M, Wangoo N, Sharma RK. A novel approach for combating *Klebsiella pneumoniae* biofilm using histidine functionalized silver nanoparticles. *Front Microbiol*. 2017;**8**:1104. PMID: 28670301 DOI: 10.3389/fmicb.2017.01104

Archive of SID

www.SID.ir