Paramedical Sciences and Military Health

Original Article

Volume 17, Number 3, 2022

Investigating the Resistance of Klebsiella Pneumoniae Clinical Isolates Producing Carbapenemase and ESBL Enzymes to Colistin and Fosfomycin Antibiotics

Mohammad Hosein Torabnejad[1], Jalal Ahmadi[2] , Alireza Dadashi[3]*

[1] *Department of Laboratory Sciences, Faculty of Paramedicine, Aja University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

[2] *Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Yazd University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

[3] *Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Aja University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Abstract

Introduction: A Klebsiella pneumoniae bacterium, which is the most important species of the Klebsiella genus, mainly causes hospital infections. Moreover, it has a high resistance to most of the available antibiotics, which has caused concern among doctors all over the world. Therefore, the amount of antibiotic resistance and the effect of these antibiotics on Klebsiella pneumoniae isolates producing carbapenemase and ESBL enzymes with multi-drug resistance are investigated in this research.

Methods and Materials: Different strains of Klebsiella pneumoniae bacteria were identified and isolated from different clinical samples during 4 months (September 1400 to late December 1400) from hospitals and laboratories in Tehran. After determining the identity using biochemical tests, the isolates were investigated and re-identified by molecular method. Antibiotic resistance was determined by disk diffusion method. Then, the production of ESBL and carbapenemase were performed using the respective discs and checking the diameter of the inhibition zone. The ELISA test was repeated three times in order to investigate the creation of biofilm in strains with multiple resistances. Molecular testing was used again to identify fosA3, mcr1 and mcr2 genes. At the end, the results were evaluated using the software.

Results: Out of 127 samples, 112 (88٪) isolates were of Klebsiella genus, and 80 (63٪) samples of Klebsiella pneumoniae were isolated using molecular tests.61 (76٪) samples had multidrug resistance. The lowest resistance was reported to amikacin (AN), gentamicin (GM) and meropenem (MEN) with 0, 1 and 3 resistant samples, respectively. Furthermore, the highest resistance to ampicillin (AM), piperacillin (PIP) and chloramphenicol (CL) were reported with 79, 66 and 67 resistant samples, respectively. By examining the diameter of the inhibition zone, among 80 Klebsiella pneumoniae strains, 51 (63.75٪) were beta-lactamase-producing isolates and 29 (36.25٪) were carbapenemase-producing isolates.Out of 61 (76٪) samples with multiple resistance, 56 samples formed biofilm.The results of molecular tests for ESBL genes showed only the expression of mcr2 and the amplification of carbapenemase genes was only expressed for mcr2 and fosA3.

Discussion and Conclusion: The frequency of Klebsiella pneumoniae isolates that produce biofilm, ESBL and carbapenemase with the expression of mcr-2 and fosA genes are increasing in hospitals.

Keywords: Carbapenem, ESBL, Nosocomial infections, Colistin, Fosfomycin, Klebsiella pneumonia

*(**Corresponding Author**) Alireza Dadashi, Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Aja University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email: drdadashialireza@gmail.com

مجله علوم پیراپزشکی و بهداشت نظامی
سال هفدهم، شماره سوم، ۱۴۰۱

مقاله تحقیقاتی

بررسی میزان مقاومت ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه تولید کننده آنزیم‌های کارباپنماز و ESBL به آنتی بیوتیک‌های کولیستین و فسفومایسین

محمد حسین تراب نژاد[۱]، جلال احمدی[۲]،علیرضا داداشی[۳*]

[۱] گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران
[۲] گروه میکروب پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی یزد، یزد، ایران
[۳] گروه عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: باکتری کلبسیلا پنومونیه مهم‌ترین گونه جنس کلبسیلا است و اغلب عفونت‌های بیمارستانی را ایجاد می‌کند و دارای مقاومت بسیار زیاد به اکثر داروهای موجود می‌باشد که همین امر موجب ایجاد نگرانی در سراسر دنیا گردیده است. از این رو در این تحقیق به بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی و اثر این آنتی بیوتیک‌ها بر ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده آنزیم‌های کارباپنماز و ESBL با مقاومت چند دارویی پرداخته می‌شود.

مواد و روش ها: سویه‌های مختلف باکتری کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های مختلف بالینی طی ٤ ماه (شهریور ماه ١٤٠٠ تا اواخر آذر ماه ١٤٠٠) از بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های نقاط مختلف شهر تهران شناسایی و جداسازی گردید و بعد از تعیین هویت با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی، جدایه‌ها با روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفته و دوباره تعیین هویت شدند. مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن انجام گردید. سپس تولید ESBL و کارباپنماز با استفاده از دیسک‌های مربوطه و بررسی قطر هاله عدم رشد انجام گردید . جهت بررسی تشکیل بیوفیلم در سویه‌هایی با مقاومت چند گانه، سه بار تست الیزا تکرار گردید. جهت شناسایی ژن‌های fosA3 و mcr1 و mcr2 دوباره از تست مولکولی استفاده شد. در پایان نتایج با استفاده از نرم افزار مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: از میان ۱۲۷ سویه کلبسیلا، ۱۱۲ (۸۸ درصد) سویه از باکتری‌ها جنس کلبسیلا بودند و از این میزان با استفاده از تست‌های مولکولی ۸۰ (٦٣ درصد) نمونه کلبسیلا پنومونیه جداسازی گردید. ٦١ (٧٦ درصد) نمونه دارای مقاومت چند دارویی بودند. کمترین مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک‌های آمیکاسین (AN)، جنتامایسین(GM) و مروپنم (MEN) با ۰، ۱ و ۳ نمونه مقاوم گزارش شد. همچنین، بیشترین مقاومت به ترتیب نسبت به آمپی سیلین(AM)، پیپراسیلین (PIP) و کلرامفنیکل) (CL با ٧٩، ٦٦ و ٦٧ نمونه مقاوم گزارش شدند. از طریق بررسی قطر هاله عدم رشد از میان ۸۰ سویه کلبسیلا پنومونیه، ۵۱ (٦٣٪،٧٥) ایزوله تولید کننده بتالاکتاماز و ۲۹ (٣٦٪،٢٥) ایزوله تولیدکننده کارباپنماز بودند. از ٦١ (٧٦٪) نمونه کلبسیلا دارای مقاومت چند گانه ، ٥٦ نمونه تشکیل بیوفیلم داده بودند. نتایج تست‌های مولکولی جهت ژن‌های ESBL فقط بیان mcr2 وجود داشت و تکثیر ژن‌های کارباپنماز فقط برای mcr2 و fosA3 بیان شده بود .

بحث و نتیجه گیری: فراوانی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه که تولید کننده بیوفیلم، ESBL و کارباپنماز هستند با بیان ژن های mcr2 و fosA در بیمارستان ها در حال افزایش می باشند.

کلمات کلیدی: کارباپنم ، ESBL ، عفونت‌های بیمارستانی، کولیستین، فسفومایسین،کلبسیلا پنومونیه

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه، شایع‌ترین پاتوژن انسانی باسیل گرم منفی، غیرمتحرک، دارای کپسول پلی‌ساکاریدی و عضو خانواده انتروباکتریاسیه می‌باشد، به عنوان عوامل بیماری زا فرصت‌طلب، گونه‌های کلبسیلا در درجه اول افراد دارای نقص ایمنی که در بیمارستان بستری هستند و از بیماری‌های زمینه‌ای مانند: دیابت

* (نویسنده مسئول) علیرضا داداشی، گروه عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران ، ایران.
آدرس الکترونیکی: drdadashialireza@gmail.com

ملیتوس[1] یا انسداد مزمن ریوی رنج می‌برند، آلوده می‌سازند (٤).
مسئله مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های پاتوژن به یک معضل بزرگ در امر درمان تبدیل شده که در طول ۵ دهه گذشته افزایش مقاومت در *کلبسیلا پنومونیه* بسیار زیاد بوده است. ابتدا مقاومت به آنتی بیوتیک‌های خاصی مثل آمپی سیلین، تری متوپریم و تتراسیکلین گزارش شده؛ اما در حال حاضر دامنه مقاومت خیلی گسترده گردیده است وسویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مطرح که در ادامه متن به آن‌ها اشاره می‌شود افزایش یافته است (۲).
این آنتی بیوتیک‌ها عبارتند از: آمینوگلیکوزیدها، فلوئوروکوئینولون‌ها، تری متوپریم- سولفومتاکسازول و سفالوسپورین‌ها که دلیل آن تولید آنزیم β لاکتامازهای هیدرولیز کننده (ESBL[2]) می‌باشد (۷).
مقاومت آن‌ها به آنتی بیوتیک‌های بتا لاکتام قبل از این‌که پنی سیلین به طور گسترده‌ای برای درمان عفونت‌ها استفاده شود، ظهور وسیع داشته که این مقاومت در برابر بعضی از بتا لاکتام ها ذاتی است. متاسفانه مقاومت به کولیستین و فسفومایسین نیز در این جنس دیده می‌شود و روز به روز در حال افزایش است که باعث نگرانی بسیاری از پزشکان در سطح جهان گردیده است(۲).
در نتیجه هدف از انجام این مطالعه ، تعیین خصوصیات و بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی و توانایی بیوفیلم زایی در کلبسیلا پنومونیه به عنوان یک عامل بیماری زای فرصت طلب و عفونت زای بیمارستانی است (۲۲،۱۱).

مواد و روش‌ها

۱- جمع‌آوری نمونه

مطالعه حاضر از نوع مقطعی - توصیفی و تحلیلی است که در سال ۱٤۰۰ انجام گرفت. جامعه آماری در این مطالعه شامل ۸۰ نمونه کلینیکی سویه کلبسیلا پتومونیه گرفته شده از بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های شهر تهران بود.

تعیین هویت با تست‌های بیوشیمیایی

سویه‌های باکتریایی مورد بررسی از خلط، ادرار و سیستم تنفسی فوقانی بیماران مراجعه کننده و بستری در بخش‌های مختلف جداسازی شد. به‌طوری‌که به‌وسیله سواپ‌های استریل نمونه برداری شده و سپس سواب آغشته به باکتری در لوله‌ای استریل نگهداری می‌شود.
جهت تعیین هویت ابتدا سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* روی محیط‌های agar MacConkey و EMB کشت داده شده و سپس بررسی فنوتیپی به‌وسیله تست‌های بیوشیمیایی شامل: TSI،Citrate، MR-VP، SIM, Lactose و Urea صورت گرفت.

۲- تعیین هویت با تست مولکولی(PCR[3])

جهت تایید ژنوتیپی ایزوله‌ها، ژن مشخصه گونه کلبسیلا پنومونیه، (جدول ۱) B rpo، به‌وسیله (PCR) ردیابی شد. از کلبسلا پنومونیه ۱۳۸۸ ATCC[4] به عنوان کنترل مثبت و از DNA اشرشیا کلی ATCC۳۵۲۱۸ به عنوان کنترل منفی استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد.

۳- آنتی بیوگرام

به منظور تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی آزمایش آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط کشت مولر هینتون اگار به منظور آزمایش حساسیت ضد میکروبی استفاده شد .

۱۳ آنتی بیوتیک شامل :

آمیکاسین ۳۰ µg (AN) و سیپروفلوکساسین ۵ µg (CP)، سفپیم ۳۰ µg (CPM)، سفوکسیتین ۳۰ µg (FOX)، آزترونام ۳۰ µg (ATM)، جنتامایسین ۱۰ µg (GM)، تتراسیکلین ۳۰ µg (TE)، کوتریموکسازول ۲۵ µg (SXT)، کوآموکسی‌کلاو ۳۰ µg (AX)، سفتازیدیم ۳۰ µg (CAZ)، سفوتاکسیم ۳۰ µg (CTX)، ایمی‌پنم ۱۰ µg (IPM)، پیپراسیلین-تازوباکتام (۱۰/۱۰۰) برای آنتی بیوگرام استفاده گردید.
پلیت‌ها را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کرده و بعد از ۱۸ تا ۲٤ ساعت زیر نور چراغ بررسی نموده تا قطر هاله‌ی عدم رشد را به‌توان با خط‌کش اندازه‌گیری نمود. طبق دستورالعمل CLSI[5]، قطر هاله‌های عدم رشد حاصل از انتی‌بیوگرام اندازه‌گیری می‌شود وسویه‌ها درسه گروه حساس، نیمه حساس و مقاوم بر

1- Diabetes mellitus
2- Extended-spectrum beta-lactamases
3- polymerase chain reaction
4- American Type Culture Collection
5- The Clinical and Laboratory Standards Institute

جدول ۱- پرایمرهای اختصاصی کلبسیلا پنومونیه (۲۱)

Primer name	Sequence	Target gene	Product size (bp)
K.penomoniae	(F) : CAACGGTGTGGTTACTGACG (R) : TCTACGAAGTGGCCGTTTTC	rpo B	۱۰۸

اساس نحوه واکنش در مقابل هر دارو طبقه بندی می‌گردید.

تعیین سویه‌های دارای بتالاکتاماز (ESBLs)

جهت تعیین سویه‌های دارای بتالاکتاماز بر روی محیط کشت مولر هینتون اگار از دیسک‌های سفتازیدیم CAZ 30 µg +کلاولانیک اسید ۱۰ µg و دیسک‌های سفوتاکسیم ۳۰ µg CTX +کلاولانیک اسید ۱۰ µg و جهت بررسی صحت آزمایش از دیسک‌های سفتازیدیم و سفوتاکسیم به عنوان شاهد استفاده شد . انکوباسیون به مدت ۲٤ ساعت در۳۷ درجه سانتی‌گراد، از طریق بررسی قطر هاله عدم رشد به اندازه ≤ ۵ mm نسبت به سفتازیدیم و سفوتاکسیم و ترکیب آن‌ها با کلاولانیک اسید ، نشان‌دهنده تولید ESBL است .

٤- تعیین حضورآنزیم کارباپنماز

برای تعیین حضورآنزیم کارباپنماز (carbapenem) بر روی محیط کشت مولر هینتون اگار از دیسک مروپنم ۱۰ µg MER + فنیل برونیک اسید ۱۰ µl و جهت بررسی صحت آزمایش از دیسک مروپنم ۱۰ µg MER به تنهایی استفاده می‌شود . انکوباسیون به مدت ۲٤ ساعت در۳۷ درجه سانتی‌گراد و بررسی تولید ESBL وکارباپنماز از طریق افزایش قطر هاله عدم رشد به اندازه ≤ ۵ mm در دو حالت مذکور می‌باشد.

۵- بررسی تشکیل بیوفیلم در سویه‌های با مقاومت چندگانه

باکتری در محیط Tryptic Soy Broth (TSB) ۲٤ ساعت انکوبه شده و ۲۰۰ میکرولیتر با کدورت برابر نیم مک فارلند /cfu (ml) ۱/۵ × ۱۰^۸ به چاهک‌های microtiter plate assay اضافه می‌شود و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۸ساعت قرار می‌گیرد. سپس چاهک‌ها با Phosphate-buffered saline (PBS) شستشو شد و رنگ کریستال ویوله اضافه می‌شود. شستشوی این رنگ با اتانل ۹۵ درصد انجام می‌شود. در انتها میزان تشکیل بیوفیلم با استفاده از دستگاه الیزا ریدر با ٤۹۰OD انجام می‌گیرد. این آزمایش برای هر سویه سه بار تکرار گردید.

پس از تجزیه و تحلیل نمونه ها توسط دستگاه طبق جدول (۳-۱) محاسبه می‌شود.

٦- تست مولکولی Polymerase chain reaction (PCR)

جهت شناسایی ژن‌های fosA 3 و mcr-1 و mcr-2

استخراج ژن به روش Boiling

استخراج DNA با روش جوشاندن (Boiling) بدین ترتیب انجام خواهد شد که ابتدا یک لوپ پر از باکتری ایزوله شده را داخل میکروتیوپ حاوی محیط TSB برده و یک شب در انکوباتور شیکردار و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌کنیم. سپس میکروتیوپ را سانتریفیوژ نموده و رسوب آن را به میکروتیوپ حاوی آب مقطر استریل برده، میکروتیوپ حاوی باکتری و آب مقطر را در داخل حمام آب گرم به مدت ۱۰ دقیقه می‌جوشانیم و پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با rpm ۱۲۰۰۰ مایع رویی داخل میکروتیوپ (که در حقیقت DNA باکتری ما می‌باشد) در داخل میکروتیوپ استریل دیگر ریخته و سپس DNA مورد نظر را در فریزر نگهداری می‌نماییم تا جهت انجام PCR در مراحل بعدی بتوانیم از آن استفاده نماییم(۲۵،۲٤).

جدول ۲ - طبقه بندی توانایی تشکیل بیوفیلم به وسیله روش میکروتیتر پلیت(۸)

توانایی تشکیل بیوفیلم	محاسبه میزان Cut-off	میانگین حداکثر جذب نوری (OD)
قوی	OD>ODc ۴*	OD>۰/۳۳۲۹۶
متوسط	ODc* ۴ ≤۲ *ODc <OD	۰/۱۶۶۴۸ <OD≤۰/۳۳۲۹۶
ضعیف	۲* ODc≤ODc<OD	۰/۰۸۳۳۲۴ <OD≤۰/۱۶۶۴۸
عدم تشکیل	۰/۰۸۳۲۴ ≤OD	OD≤۰/۰۸۳۲۴

جدول۳. توالی پرایم‌های مورد استفاده برای تعیین ژن‌های مقاومت به کولیستین و فسفومایسین (۱۰،۱۵،۱۶)

Primer name	Sequence	(Product size (bp
fosA3	F: CCTGGCATTTTATCAGCAGT R: CGGTTATCTTTCCATACCTCAG	۲۷۱
Mcr-1	F: CGGTCAGTCCGTTTGTTC R: TGCTTAATCAGTGAGGCACC	۴۰۰
Mcr-2	F: TGGTACAGCCCCTTTATT R: GCTTGAGATTGGGTTATGA	۲۹۷

شناسایی نمونه‌های حاوی ژن fosA3 □ mcr-1 □ mcr-2:

PCR با پرایمرهای اختصاصی انجام خواهد شد که در جدول ۳ به آن ها اشاره شده است (۱۵،۱۰).

۷- جامعه آماری، روش نمونه‌گیری و حجم نمونه (در صورت وجود و امکان):

جهت برآورد حجم نمونه از فرمول برآورد نسبت استفاده می‌شود. تعیین حجم نمونه، با توجه به میزان شیوع نمونه‌های *کلبسیلا پنومونی* هاست، با استفاده از فرمول تعیین حجم نمونه که در زیر آمده است، در این فرمول P میزان شیوع، Z فاصله اطمینان (۹۵٪) و d مقدار خطای (در اینجا ۵٪) قابل قبول است.

$$N = \frac{Z^2 p(1-P)}{d^2}$$

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.0525)}{(0.05)^2} = 80$$

۸- روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها:

نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار بررسی می‌شود وبا استفاده از تست‌های ANOVA و T-test و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ از نظر آماری مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

یافته‌ها

۱- جمع‌آوری نمونه

با توجه به جامعه آماری در این مطالعه که شامل ۸۰ نمونه کلینیکی سویه کلبسیلا پتومونیه بود، تعداد ۱۲۷ نمونه جداسازی گردید که بعد از تست‌های تعیین هویت بیوشیمیایی تعداد ۱۱۲ نمونه از خانواده کلبسیلا بود که بعد از انجام تست‌های مولکولی ۸۰ سویه مثبت کلبسیلا پنومونیه جداسازی گردید.

تعیین هویت با تست‌های بیوشیمیایی

سویه‌های باکتریایی مورد بررسی از خلط، ادرار و سیستم تنفسی فوقانی بیماران مراجعه کننده و بستری در بخش‌های مختلف جداسازی می‌شود. به‌طوری‌که به‌وسیله سواپ‌های استریل نمونه برداری شده و سپس سواب آغشته به باکتری در لوله‌ای استریل نگهداری می‌شود.

سپس جهت تعیین هویت ابتدا سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* روی محیط‌های agar MacConkey و EMB کشت داده شده و سپس بررسی فنوتیپی به‌وسیله تست‌های بیوشیمیایی شامل: TSI، Citrate، MR-VP، SIM, Lactose و Urea صورت می‌گردد.

بیماران از نظر سن و جنس در جدول ٤ نشان داده شده اند. تعداد بیماران مرد ۵۳ نفر (٦٦/۲۵٪) و بیماران زن ۲۷ نفر (۳۳/۷۵٪) می‌باشد. همچنین به ترتیب طیف‌های سنی ۳۱ تا ٤۰ سال (۲٦٪) و ۲۱ تا ۳۰ سال (۲۱٪) بیشترین تعداد بیماران دچار پنومونی ناشی از کلبسیلا پنومونیه و به ترتیب ۱ تا ۱۰ سال (۰٪) و ۵۱ تا

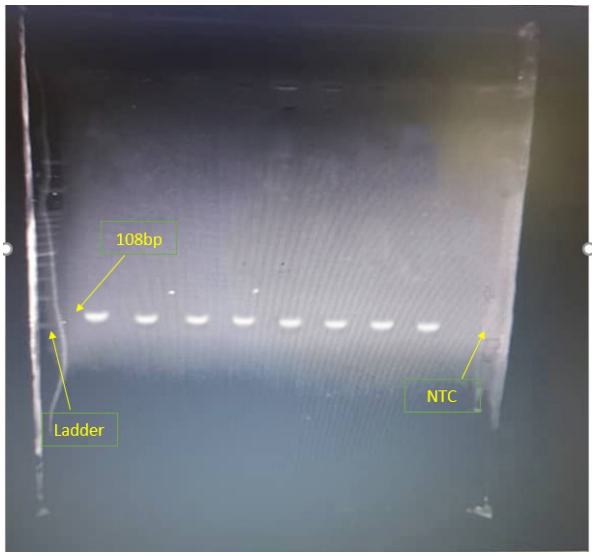
جدول ٤- فراوانی سن و جنس بیماران در این مطالعه

فاکتور میزبانی		تعداد (درصد)
جنس	مرد	۵۳ (۲۵.٪ /۶۶)
	زن	۲۷ (٪ ۳۳/۷۵)
طیف سنی	۱ سال تا ۱۰ سال	۰
	۱۱ تا ۲۰ سال	۸ (۱۰٪)
	۲۱ تا ۳۰ سال	۱۷ (۲۱/۲۵٪)
	۳۱ تا ۴۰ سال	۲۱ (۰ /۰۲۶/۲۵)
	۴۱ تا ۵۰ سال	۱۳ (۱۶/۱۲۵٪)
	۵۱ تا ۶۰ سال	۶ (۷/ ۵۰٪)
	۶۱ تا ۷۰ سال	۸ (۱۰٪)
	۷۰< سال	۷ (٪ ۸/۷۵)
جمع کل		۸۰

۶۰ سال (۷٪) کمترین مبتلایان را داشتند.

نتایج تست‌های مولکولی

یافته ها نشان داد که از میان ۱۲۷ نمونه، ۸۰ نمونه (۶۳ درصد) از نظر بیان ژن rpo B مثبت بودند که تایید سویه‌های باکتریایی به عنوان کلبسیلا پنومونیه بود.



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز rpo B

جدول ۵- درصد حساسیت ایزوله ها بر اساس تفسیر CLS

آنتی بیوتیک	درصد حساسیت ایزوله ها بر اساس تفسیر CLSI		
	حساس	نیمه حساس	مقاوم
سیپروفلوکساسین (CP)	۴۲	۳۳	۵
جنتامایسین(GM)	۷۶	۳	۱
فسفومایسین (FOS)	۳۸	۲۸	۱۳
سفتازیدیم (CAZ)	۴۱	۱۱	۲۸
کلرامفنیکل) (CL	۰	۱۳	۶۷
پیپراسیلین (PIP)	۳	۱۱	۶۶
کاربنی سیلین (CB)	۵۲	۷	۲۱
سولفامتاکسازول(SXT)	۷۱	۵	۴
سفوتاکسیم(CTX)	۳۶	۱۴	۳۰
آمپی سیلین(AM)	۱	۰	۷۹
مروپنم (MEN)	۴۷	۳۰	۳
آمیکاسین (AN)	۷۱	۹	۰

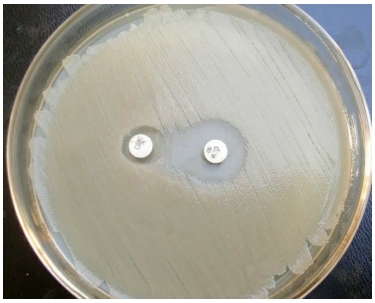
۲- نتایج مربوط به حساسیت آنتی بیوگرام دیسک دیفیوژن

تست حساسیت آنتی بیوتیکی با آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین (AM)، سولفامتاکسازول (SXT)، سفتازیدیم (CAZ)، سفوتاکسیم(CTX)، جنتامایسین (GM)، فسفومایسین (FOS)، آمیکاسین (AN)، مروپنم (MEN)، کلرامفنیکل (CL)، پیپراسیلین (PIP)، کاربنی سیلین (CB)، سیپروفلوکساسین (CP) انجام گردید که نتایج نشان داد که تعداد ۶۱ نمونه (۷۶ درصد) از نمونه‌ها دارای مقاومت چند دارویی بودند.

کمترین مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین (AN)، جنتامایسین (GM) و مروپنم (MEN) با ۱/۰ و ۳ نمونه مقاوم گزارش شد. همچنین، بیشترین مقاومت به ترتیب نسبت به آمپی سیلین (AM)، پیپراسیلین (PIP) و کلرامفنیکل (CL) با ۶۶/۷۹ و ۶۷ نمونه مقاوم گزارش شدند.

۳- نتایج تعیین سویه‌های دارای بتالاکتاماز (ESBLs)

جهت تعیین سویه‌های دارای بتالاکتاماز بر روی محیط کشت مولر هینتون اگار از دیسک‌های سفتازیدیم CAZ ۳۰ µg + کلاولانیک اسید ۱۰ µg و دیسک‌های سفوتاکسیم CTX ۳۰ µg + کلاولانیک اسید ۱۰ µg پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در۳۷ درجه سانتی‌گراد، از طریق بررسی قطر هاله عدم رشد از میان ۸۰ سویه کلبسیلا پنومونیه، ۵۱ (۶۳/۷۵ ٪) ایزوله بتالاکتاماز مثبت شدند.



شکل۲- تست بتالاکتامازهای ESBL

۴- آزمایش فنوتیپی تعیین آنزیم‌های کارباپنماز

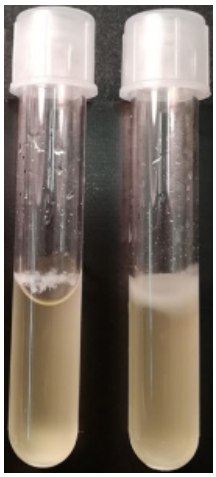
برای تعیین حضور آنزیم کارباپنماز بر روی محیط کشت مولر هینتون اگار از دیسک مروپنم MER ۱۰ µg + فنیل برونیک اسید ۱۰ µl پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در۳۷ درجه

ســـانتی‌گراد و بررسی تولید کارباپنماز از طریق افزایش قطر هاله عدم رشـــد از میان ۸۰ سویه کلبسیلا پنومونیه، ۲۹ (۳۶/۲۵ ٪) ایزوله کارباپنماز مثبت شدند.

شکل ۳- تست آنزیم‌های کارباپنماز

۵- آزمایش فنوتیپی تشکیل بیوفیلم

بعد از کشت در محیط TSB و اضافه شدن به microtiter plate assay اضافه می‌شـــود و بعد از شستوشـــو بـــا بافر PBS رنگ کریستال ویوله اضافه گردید که شستشوی این رنگ با اتانل ۹۵ ٪ انجام شد. میزان تشـــکیل بیوفیلم از ٦١ نمونه کلبسیلا دارای مقاومت چند گانه با اســـتفاده از دستگاه الیزا ریدر با ٤٩٠OD ، ٥٦ نمونه بود که به شرح زیر می‌باشد.



شکل ٤- تست بیوفیلم

جدول ٦- تعداد نمونه‌های تشکیل دهنده بیوفیلم

تعداد نمونه	قوی	متوسط	ضعیف	عدم تشکیل
۵۶	۴۸	۶	۲	۰

جدول ۷- تشکیل بیوفیلم ٥٦ ایزوله بالینی

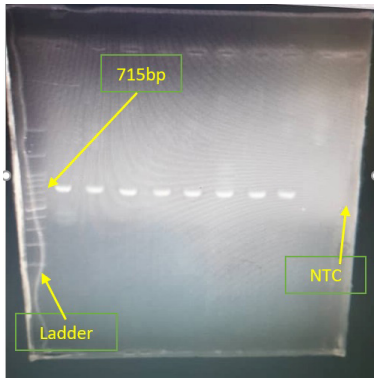
شماره سویه	مقدار عددی بدست آمده از دستگاه الیزا (OD)	میزان توانایی تشکیل بیوفیلم	شماره سویه	مقدار عددی بدست آمده از دستگاه الیزا (OD)	میزان توانایی تشکیل بیوفیلم
۱	۰/۳۷۸	Strong	۲۹	۰/۴۳۵	Strong
۲	۰/۶۹۳	Strong	۳۰	۰/ ۷۸۳	Strong
۳	۰/۳۰۲	Intermediate	۳۱	۰/۱۸۷	Intermediate
۴	۰/۹۴۸	Strong	۳۲	۰/۶۹۸	Strong
۵	۰/۶۳۵	Strong	۳۳	۰/ ۴۹۸	Strong
۶	۰/۷۳۸	Strong	۳۴	۰/۵۷۶	Strong
۷	۰/۵۳۴	Strong	۳۵	۰/۶۳۴	Strong
۸	۰/۹۳۲	Strong	۳۶	۰/۵۲۳	Strong
۹	۰/۸۹۷	Strong	۳۷	۰/۲۹۹	Intermediate
۱۰	۰/۷۲۵	Strong	۳۸	۰/۹۶۷	Strong
۱۱	۰/۶۴۲	Strong	۳۹	۰/۹۵۳	Strong
۱۲	۰/۹۲۱	Strong	۴۰	۰/۹۷۳	Strong
۱۳	۰/۱۴۵	Weak	۴۱	۰/۹۸۲	Strong
۱۴	۰/۲۶۷	Intermediate	۴۲	۰/۷۲۳	Strong
۱۵	۰/۵۶۳	Strong	۴۳	۰/۶۵۲	Strong
۱۶	۰/۵۹۲	Strong	۴۴	۰/۵۶۲	Strong
۱۷	۰/۶۷۳	Strong	۴۵	۰/۴۷۶	Strong
۱۸	۰/۴۷۳	Strong	۴۶	۰/۴۸۷	Strong
۱۹	۰/۳۵۲	Strong	۴۷	۰/۵۴۳	Strong
۲۰	۰/۷۳۴	Strong	۴۸	۰/ ۱۳۷	Weak
۲۱	۰/۵۷۳	Strong	۴۹	۰/۸۵۶	Strong
۲۲	۰/۱۹۸	Intermediate	۵۰	۰/۷۶۲	Strong
۲۳	۰/۸۷۲	Strong	۵۱	۰/۶۱۵	Strong
۲۴	۰/۴۵۳	Strong	۵۲	۰/۹۵۶	Strong
۲۵	۰/۵۸۷	Strong	۵۳	۰/۸۴۶	Strong
۲۶	۰/۷۴۶	Strong	۵۴	۰/۸۳۵	Strong
۲۷	۰/۵۶۴	Strong	۵۵	۰/۸۷۲	Strong
۲۸	۰/۸۷۳	Strong	۵۶	۰/۳۲۰	Intermediate

نتایج تست PCR برای تعیین ژن‌های ESBL و کارباپنماز

نتایج PCR تکثیر ژن‌های ESBL به شرح زیر می‌باشد:

جدول ۸- تعداد نمونه‌های PCR مثبت برای ژن ESBL

Primer name	Number of isolate
FosA3	۰
Mcr-1	۰
Mcr-2	۸

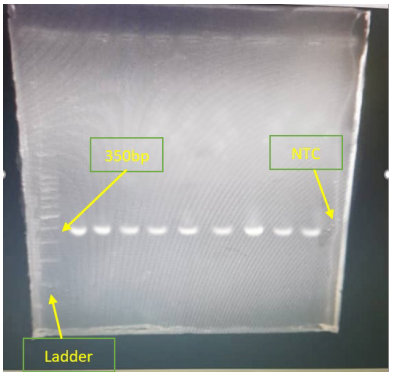


شکل ۵- الکتروفورز ژن mcr-2 (۷۱۵ bp)

نتایج PCR تکثیر ژن‌های کارباپنماز به شرح زیر می‌باشد:

جدول ۹- تعداد نمونه‌های PCR مثبت برای ژن کارباپنماز

Primer name	Number of isolate
FosA3	۹
Mcr-1	۰
Mcr-2	٤



شکل ۶- الکتروفورز ژن FosA3 (۳۵۰ bp)

بحث و نتیجه گیری

در سال‌های اخیر به دلیل افزایش تعداد عفونت‌های شدید، مقاومت آنتی بیوتیکی و دشـــواری رو به رشد در ایجاد درمان‌های مؤثر، کلبســـیلا پنومونیه توجه جهانی را به عنوان یک میکروارگانیسم عفونی به خود جلب کرده است. کلبسیلا پنومونیه اکنون دومین عامل شایع در باکتری‌های گرم منفی و یک عامل اصلی بیماری در عفونت بیمارســـتانی به ویژه در بیماران دارای اختلال سیستم ایمنی است. باکتری کلبسیلا پنومونیه دارای نرخ مرگ و میر بالا، به ویژه هنگامی که نوع آن هایپر ویرولانس است، می‌باشد.

بطور کلی امروزه بتالاکتامازهای با طیف گســـترده (ESBLs) و انتروباکتریاســـه‌های مقاوم به کرباپنم (CRE) از جمله: ***E. coli*** و *Klebsiella pneumoniae*، یک مشکل درمانی جدی با میزان مرگ و میر بالا در بیمارســـتان‌ها می‌باشند. در این موارد، درمان ها به طور کلی به وسیله تتراسایکلین یا کولیستین انجام می‌شود. اگرچه فسفوماســـین آنتـــی بیوتیک با مصـــرف طولانی مدت، همچنین دارای پتانسیل درمانی در برابر این گونه‌های باکتریایی را دارد. فسفوماســـین بـــه صورت خوراکی بـــرای عفونت‌های دستگاه ادراری ساده ایجاد شده توسط انتروباکتریاسه‌های تولید کننـــده ESBL یا CRE بصـــورت خوراکی و تزریقی اســـتفاده می‌شود (۱٤).

در ایـــن مطالعه ما بـــه عوامل موثر در مقاومت بـــه کارباپنماز و ESBL به‌خصوص کولستین و فسفومایسین پرداختیم. مقاومت به کولیســـتین در باکتری‌های گرم منفی به کاهش میل اتصال به غشای خارجی LPS نســـبت داده می‌شود. سیستم‌های دو جزء (TCS) شـــامل PhoPQ و PmrAB به عنوان سیستم نظارتی، بار منفی لیپید A را کاهش داده به دنبال اتصال کولســـتین را به LPS کاهـــش می‌دهند. به تازگی، یک مقاومت قابـــل انتقال از طریق پلاسمید با عنوان مقاومت متحرک کولیستین (mcr) گزارش شده است که با عنوان mcr-1 شناخته می‌شود که رایج‌ترین نوع mcr اســـت. mcr-1 یک فســـفاتیدیل اتانول آمین ترانسفراز است که این عامـــل را به لیپید A، یکی از اجزای LPS، متصل می‌کند که منجر به کاهش میل اتصالی کولیستین به هدف خود می‌گردد. ژن mcr-2 نوعی نادر از mcr اســـت. مکان‌های ژن mcr-1 و mcr-2 در پلاسمید مزدوج قرار دارند که ممکن است انتقال بین سویه‌ها و گونه‌های باکتریایی را تســـریع کند و منجر به بی اثر ســـازی رژیم درمانی شوند. گزارش‌های مربوط به نقش ژن‌های mcr-1 و mcr-2 حاکی از افزایش مقاومت سویه‌های E.coli و کلبسیلا پنومونیه هستند. تشـــکیل بیوفیلم و تولید بتا-لاکتامازها به طور هم افزایی برای انتشـــار گسترده سویه‌های مقاوم به چند دارو از باســـیل‌های گرم منفی کمک می‌کنند. آن‌ها منجر به مزمن بودن، پایداری و عـــود عفونت‌ها که باعث مرگ و میر بالا می‌شـــود، می‌گردند (۱۵).

در مطالعه حاضر تعداد ۱۲۷ سویه کلبسیلا جمع آوری گردید که ۱۱۲ (۸۸ درصد) ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه بود.
همان‌طور که در این جدول نشـــان داده شـــده است ، ۵۳٪ این بیماران مـــرد و ۲۷٪ آن‌ها زن بودند. بیماران مورد مطالعه دارای محدوده ســـنی ۲۱ تا ۷۰ سال مبتلا به پنومونیه ناشی از کلبسیلا پنومونیه را تشـــکیل می‌دادند. بوســـیله روش دیســـک فیوژن، حساســـیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها مورد بررســـی قرار گرفت. دیسک‌های مورد استفاده شامل: سفتازیدیم (CAZ)، سفوتاکسیم (CTX)، جنتامایســـین (GM)، فسفومایسین (FOS)، کلرامفنیکل (CL)، کربنســـیلین (CB)، آمپیســـیلین (A) ، سولفامتاکســـازول (SXT)، سیپروفلوکساســـین (CP)، پیپراسیلین (PIP)، آمیکاسین (AN)، مروپنم (MEN) می‌شدند. نتایج این تست نشان داد ۶۱ (۷۶ درصـــد) نمونه دارای مقاومت چند دارویی بودند. کمترین مقاومت به ترتیب نســـبت به آنتی بیوتیک‌های آمیکاسین (AN)، جنتامایســـین (GM)و مروپنم (MEN) با ۰، ۱ و ۳ نمونه مقاوم گزارش شد. همچنین، بیشترین مقاومت به ترتیب نسبت به آمپی ســـیلین (AM)، پیپراسیلین (PIP) و کلرامفنیکل) (CL با ۷۹، ۶۶ و ۶۷ نمونه مقاوم گزارش شدند.
در مطالعه‌ایی Caspar و همکاران (۲۰۱۷) ۲۰۰ ایزوله باسیلوس گرم منفی، نشان دادند کلبسیلا پنومونیه گونه (۸۵ از ۲۰۰) غالب از ۱۴ گونه شناســـایی شـــده بود. به‌طوری‌کـــه ۵۶ مورد (۶۵٪) مقاومت به کاربانم، ۱۶ مورد (۱۸٪) مقاوم به سفالوســـپورین و حساس به کربانم بودند. ۱۳ مورد نیز (۱۵٪) به جز آمپی سیلین نسبت به همه آنتی بیوتیک ها حساس بودند (۱۷).
در ادامـــه برای تعیین ایزوله‌های مثبـــت از نظر آنزیم ESBL، از دیســـک‌های آنتی بیوتیکی سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفوتاکسیم + کلاولانیک اسید، ســـفتازیدیم + کلاولانیک اسید استفاده شد. نتایج این تســـت نشان داد که ۵۱ ایزوله دارای افزایش هاله عدم رشد نسبت به ســـفتازیدیم و سفوتاکسیم در ترکیب هر کدام از آن‌ها با کلاولانیک اســـید بیشتر از ۵ میلی متر در مقایسه با آن‌ها به تنهایی بود و ایـــن به معنای مثبت بودن آن ها بود. به عبارتی دیگـــر ۶۳٪ از ایزوله‌ها، از نظر بیـــان آنزیم ESBL مثبت بودند. β–لاکتامازهای با طیف گسترده (ESBLs) گروه از β–لاکتامازها هســـتند که به سرعت در حال تکامل هستند و توانایی هیدرولیز سفالوســـپورین ها و آزتروئنام‌های نسل سوم را دارند، اما توسط اسید کلاوولانیک مهار می‌شوند.
در مطالعه مشـــابه ، Caspar و همـــکاران (۲۰۱۷) انجام دادند، نوعی از کلبســـیلا پنومونیـــه تولید کننـــده β– لاکتاماز با طیف گســـترده ایی را گزارش دادند که دارای سطح بالایی از مقاومت در برابر کولیســـتین بود. این سویه دارای ژن پلاسمیدی mcr-1و ژن mgrB غیرفعال بود که با مقاومت به کولیســـتین همراه است (۱۸).
همچنین نتایج بررســـی وجود آنزیم کاباپنمازها در ایزوله نشان داد که ۲۹ ایزوله یا ۳۶٪ آن‌ها از نظر کاباپنمازها مثبت می‌باشند. کاباپنمازها نشان متنوع ترین عضو خانواده β–لاکتامازها با طیف وسیع است که نسبت به سایر آنزیم‌های هیدرولیز کننده β–لاکتام منحصر به فرد اســـت. اگرچـــه به عنوان کاربانمازها شـــناخته می‌شود، بســـیاری از این آنزیم ها تقریباً همه β–لاکتام‌های قابل هیدرولیز را تشـــخیص می‌دهند و در برابر اکثر مهار کننده‌های β–لاکتام تجاری مقاوم هستند.
در مطالعه مشابه، Ahmad khan و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که از میان ۲۶۰ ایزوله کلبســـیلا پنومونیه، ۳۱ نفر (۱۲٪) در برابر سفالوســـپورین ها، ۱۰۰٪ مقاومت نشـــان داده اند. از ۳۱ ایزوله کلبســـیلا پنومونیه، ۱۵ مورد (۴۸٪) برای کاربانماز مثبت بودند. کلیه ایزوله‌های مقاوم در برابر کاربانم نسبت به کلستین حساس بودند. در تضـــاد با نتایج مطالعه حاضر، آن ها نشـــان دادند که ایزوله ها به ترتیب در برابر آمیکاســـین (۴۲٪) و جنتامایســـین (۵۱٪) مقاومت نشان داده اند (۱۹).
بر اساس نتایج بدست آمده، نشان داده شد که ۶۱ ایزوله کلبسیلا پنومونیه دارای مقاومت چندگانه هستند. آزمایش تشکیل بیوفیلم نشان داد که از میان ۶۱ ایزوله ی کلبسیلا پنومونیه دارای مقاومت چندگانه، ۴۸ نمونه دارای توانایی قوی تشکیل بیوفیلم هستند و ۶ نمونه دارای توانایی متوســـط و ۲ نمونه دارای توانایی ضعیف می‌باشـــند .این نتایج نشـــان می‌دهد که مقاومت چندگانه مانند ایزوله‌هـــای تولید کننـــده کاربانماز و ESBL بـــا افزایش تولید بیوفیلـــم در ارتباط اســـت. به طوری که کاهش میزان تشـــکیل بیوفیلم می‌تواند با کاهش مقاومت دارویی همراه باشد.
موافـــق با نتایج مطالعـــه حاضر، Suzana و همـــکاران (۲۰۱۵) فعالیـــت آنتـــی بیوفیلیمی پپتیدهای مصنوعـــی DJK-5، DJK-6 و ۱۰۱۸ در برابر ایزوله‌های کلبســـیلا پنومونیـــه تولید کننده کاربانماز بررســـی نمود و نشـــان داد که پپتید DJK-6 قادر به تقویت، حداقل ۱۶ برابری، توانایی مروپنم در ریشـــه کن کردن بیوفیلم‌های از پیش شکل گرفته بود. او استفاده از پپتید DJK-6 به منظور تقویت فعالیت β–لاکتام هـــا، از جمله مروپنم، بیانگر

یک استراتژی امیدوارکننده برای درمان عفونت‌های ناشی از جدا شده KpC است (۲۰).

موافق با نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر، Elliott و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه خود نشـــان دادند که از میان ۹۶ جدایه بالینی تولید کننده KPC از گونه های متعدد جمع آوری شـــده در یک مرکـــز درمانی، ۸۸ درصد دارای حساســـیت به فسفوماسیســـن هســـتند. fosA در ۸۰٪ ایزوله ها شناسایی شدند و ایزوله های fosA مثبت با میزان MIC بالاتر همراه بودند. همچنین او نشـــان داد که مهار fosA با افزایش معنی داری در قطر هاله عدم رشـــد نســـبت به نمونه‌هایی که fosA منفی بودند، همراه اســـت. نتایج مطالعه او نشـــان داد که fosA می‌تواند عامـــل تاثیر گذاری در مقاومت نسبت به فسفومایسین باشد (۷۳). در مطالعه ایی مشابه Jayol و همکاران (۲۰۱۶) ایزوله بالینی کلبســـیلا پنومونیه تولید کننده (ESBL)، دارای مقاومت نسبت به کولیستین می‌باشد. این ایزوله از یک ژن (ESBL) blaCTX-M-15 برخوردار بود. تغییر ژنتیکـــی در ژن mgrB کروموزومی منجر به غیرفعال شـــدن ژن mgrB و در نتیجه مقاومت به کولیســـتین شـــد. موافق با نتایج مطالعه حاضر او نیز وجود ارتباطی بین مقاومت به کولیســـتین و مقاومت بسیار گسترده‌ای را به سفالوسپورین را نشان داد (۷٤). Quan و همکاران (۲۰۱۷) نیز بطور مشابه در مطالعه خود عنوان کردند که از میان ۵۷۱ ایزوله کلبســـیلا پنومونیه، تنها از نظر بیان ژن mcr-1 مثبت بودند. بـــا ا این وجود مثبت بودن بیان mcr-1 مثبت با مقاومت در برابر کولیستین همراه بود (۲۳).

مطالعه حاضر به بررســـی میزان ابتلا به کلبسیلا پنومونیه دارای ژن‌های مقاومت fosA، mcr-1 و mcr-2 و توانایی ایجاد بیوفیلم در آن ها انجام شـــد که همزمان به بررســـی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه دارای آنزیم ESBL و کاربانماز و بررسی میزان فراوانی ژن‌های mcr-1، mcr-2 و FosA در آن ایزوله ها و توانایی ایجاد بیوفیلم توسط آنها پرداخته شد.

نتایج این مطالعه نشـــان داد که از میان جدایه‌های مورد بررسی، ۵۱ مورد یا ٦۳٪ آن ها دارای بیان ESBL هســـتند و همچنین ۲۹ ایزوله یا ۳٦٪ ایزوله تولید کننده کاربانماز بودند. این داده نشان می‌دهـــد که بیش از نیمی از ایزوله ها دارای بیان ESBL و کمتر از یک ســـوم آن ها دارای بیان کاربانماز بودند. بنابراین فراوانی ژن‌های ESBL بیش از آنزیم‌های کاربانماز بود.

مشـــخص گردید که از ٦۱ ایزوله ی کلبســـیلا پنومونیه دارای مقاومت چندگانه، به ترتیـــب ٤۸، ٦ و ۲ ایزوله دارای توانایی قوی، متوسط و ضعیف تولید بیوفیلم هستند.

نتایج بررسی‌های ژنی نیز نشان داد که این ژن ها دارای فراوانی کم در ایزوله‌های مورد بررســـی بودند. این داده ها حاکی از آن است که در میان ایزوله‌های ESBL، احتمال مقاومت به کولستین بیشـــتر اســـت و همچنین، در میان ایزوله‌های دارای کاربانماز، احتمال مقاومت نسبت به فسفومایسین بیشتر می‌باشد.

یافتـــه های ایـــن مطالعه نشـــان داد که ایزوله‌هـــای تولید کننده کاربانماز و ESBL می‌تواند بـــا افزایش مقاومت چند دارویی، تولید ESBL و کاربانماز (مقاومت آنتی بیوتیکی در مقابل طیف گسترده بتالاکتام ها) همراه باشد. این داده ها نشان از نیاز فوری به کنترل عفونت و کنترل آنتی بیوتیکی برای جلوگیری از شیوع بیشتر این میکروارگانیسم ها دارد.

در مطالعه حاضر وجود بیان ژن‌های mcr-1، mcr-2 و fosA در ایزوله‌های تولید کننده ESBL و کاربانماز می‌تواند نگران کننده باشـــد، زیرا بیان این ژن ها می‌توانـــد موجب ایجاد مقاومت در مقابل خط‌های درمانی نهایی مانند کولستین و فسفومایسن شود و پروسه‌های درمانی را برای ایزوله کلبسیلا پنومونیه تولید کننده ESBL و کاربانماز دشوارتر سازد.

در نهایـــت این مطالعه نشـــان می‌دهد که فراوانـــی ایزوله‌های کلبســـیلا پنومونیه تولید کننـــده ESBL و کاربانماز، ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده ESBL و کاربانماز با بیان ژن‌های mcr-1، mcr-2 و fosA و ایزوله‌هـــای کلبســـیلا پنومونیه تولید کننده ESBL و کاربانماز دارای توانایی تشکیل بیوفیلم در حال افزایش می‌باشـــند. با توجه به شیوع سویه‌های کلبسیلا پنومونیه به عنوان پاتوژن فرصت طلب و خطرناک بیمارستانی بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وســـیله از تمام دوســـتانی که ما را در مراحل مختلف این پژوهش یاری کردند کمال تشکر و قدرانی را داریم.

تعارض منافع و سهم نویسندگان

بین نویسندگان تعارض در منافع گزاش نشده است.

References

1. Bialek-Davenet S, Lavigne JP, Guyot K, Mayer N, Tournebize R, Brisse S, Leflon-Guibout V, Nicolas-Chanoine MH. 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.
2. Brisse S, Passet V, Grimont PA. Description of Klebsiella quasipneumoniae sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, Klebsiella quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae subsp. nov. and Klebsiella quasipneumoniae subsp. similipneumoniae subsp. nov., and demonstration that Klebsiella singaporensis is a junior heterotypic synonym of Klebsiella variicola. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2014; 64(Pt_9):3146-52.
3. Castañeda-García A, Blázquez J, Rodríguez-Rojas A. Molecular mechanisms and clinical impact of acquired and intrinsic fosfomycin resistance. Antibiotics. 2013; 2(2):217-36.
4. Chander Y, Ramakrishnan MA, Jindal N, Hanson K, Goyal SM. Differentiation of Klebsiella pneumoniae and K. oxytoca by multiplex polymerase chain reaction. International Journal of Applied Research inVeterinary Medicine. 2011; 9(2):138.
5. Caspar Y, Maillet M, Pavese P, Francony G, Brion JP, Mallaret MR, Bonnet R, Robin F, Beyrouthy R, Maurin M. mcr-1 colistin resistance in ESBL-producing Klebsiella pneumoniae, France. Emerging infectious diseases. 2017; 23(5):874.

   6. Du H, Chen L, Tang YW, Kreiswirth BN. Emergence of the mcr-1 colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. The Lancet infectious diseases. 2016; 16(3):287-8.
7. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, Jenney A, Connor TR, Hsu LY, Severin J, Brisse S. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in Klebsiella pneumoniae, an urgent threat to public health. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015; 112(27):E3574-81.
8. Murphy CN, Clegg S. Klebsiella pneumoniae and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. Future microbiology. 2012; 7(8):991-1002.
9. Ito R, Mustapha MM, Tomich AD, Callaghan JD, McElheny CL, Mettus RT, Shanks RM, Sluis-Cremer N, Doi Y. Widespread fosfomycin resistance in Gram-negative bacteria attributable to the chromosomal fosA gene. MBio. 2017; 8(4):e00749-17.
10. Khan MA, Faiz A. Frequency of carbapenemase producing Klebsiella pneumoniae in Makkah, Saudi Arabia. Journal of Microbiology and Infectious Diseases. 2016; 6(3):121-7.
11. Man-Kupisinska A, Swierzko AS, Maciejewska A, Hoc M, Rozalski A, Siwinska M, Lugowski C, Cedzynski M, Lukasiewicz J. Interaction of mannose-binding lectin with lipopolysaccharide outer core region and its biological consequences. Frontiers in Immunology. 2018; 9:1498.
12. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, Jenney A, Connor TR, Hsu LY, Severin J, Brisse S. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in Klebsiella pneumoniae, an urgent threat to public health. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015; 112(27):E3574-81.
13. Hu Y, Liu Y, Coates A. Azidothymidine produces synergistic activity in combination with colistin against antibiotic-resistant Enterobacteriaceae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2019; 63(1):e01630-18.

    14. 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. J Mazandaran Univ Med Sci. 2014; 24 (119) :48-6.
15. Quan J, Li X, Chen Y, Jiang Y, Zhou Z, Zhang H, Sun L, Ruan Z, Feng Y, Akova M, Yu Y. Prevalence of mcr-1 in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae recovered from bloodstream infections in China: a multicentre longitudinal study. The Lancet Infectious Diseases. 2017; 17(4):400-10.
16. Ribeiro SM, De La Fuente-Núñez C, Baquir B, Faria-Junior C, Franco OL, Hancock RE. Antibiofilm peptides increase the susceptibility of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae clinical isolates to β-lactam antibiotics. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2015; 59(7):3906-12.
17. Stoesser N, Mathers AJ, Moore CE, Day NP, Crook DW. Colistin resistance gene mcr-1 and pHNSHP45 plasmid in human isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. The Lancet infectious diseases. 2016; 16(3):285-6.
18. Shallouf, M.A., 2018. Identification and characterisation of cephalosporins and carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae isolates from Misrata, Libya.
19. Sanchez GV, Master RN, Clark RB, Fyyaz M, Duvvuri P, Ekta G, Bordon J. Klebsiella pneumoniae antimicrobial drug resistance, United States, 1998–2010. Emerging infectious diseases. 2013; 19(1):133.

    20. Pourali Sheshblouki G, Mardaneh J, Hosseinzadeh Z. Klebsiella pneumoniae Infections in Hospitalized Patients: Characterization of Antibiotic Cross-resistance and Detection of Cefepime Susceptible-dose Dependent (SDD) Strains. J Fasa Univ Med Sci. 2016; 6 (1) :52-59.
21. Pourali Sheshblouki G, Mardaneh J. Characterization of blaCTX gene and Cross-resistance in Klebsiella pneumoniae Isolated from Hospitalized Patients. J Birjand Univ Med Sci. 2016; 23 (1) :56-66.
22. Vuotto C, Longo F, Balice M, Donelli G, Varaldo P. Antibiotic resistance related to biofilm formation in Klebsiella pneumoniae. Pathogens. 2014; 3(3):743-58.
23. Vuotto C, Longo F, Balice M, Donelli G, Varaldo P. Antibiotic resistance related to biofilm formation in Klebsiella pneumoniae. Pathogens. 2014; 3(3):743-58.