Original Article

Prevalence of *flmA*, *flmH*, *mrkA*, *ecpA*, and *mrkD* virulence genes affecting biofilm formation in clinical isolates of *K. pneumonia*

Shivaee A[1], Meskini M[2], Shahbazi Sh[2], Hasani D[3], Masjedian Jazi F[4], Zargar M[5*]

1- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.
2- Department of Bacteriology, Pasteur Institute of Iran, Teheran, I. R. Iran.
3- Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran.
4- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.
5- Department of Microbiology, Qom branch, Islamic Azad University, Qom, I. R. Iran.

Received: 2018/11/8 | Accepted: 2019/03/3

Abstract:

Background: *Klebsiella pneumoniae* is an opportunistic microorganism causing nosocomial infection all over the world. This study aimed to investigate the prevalence of biofilm formation in *K. pneumoniae* isolated from patients and its correlation with the virulence factors.

Materials and Methods: Biochemical tests were used for the identification of *K. pneumonia* isolated from patients referred to Motahari and Milad hospitals in Tehran, Iran, from October 2015 to June 2016. Kirby-bauer test was performed and biofilm formation was assessed phenotypically. Finally, virulence genes were detected by the PCR method.

Results: The highest resistance rate was against ceftazidime and cefotaxime (67%) and the least resistance rate was against imipenem and meropenem (39%). In addition, 81% of the isolates were biofilm producers according to the results of biofilm formation assay. Also, the results of PCR showed that all 57 biofilm producer isolates harbored *fimA*, *mrkA*, *ecpA*, and *fimD* virulence genes and 92% of these isolates harbored fimH virulence gene. Among non-biofilm producer isolates, 36% had *fimA* gene, 29% had *ecpA* gene, and none of these isolates carried *mrkA* and *fimH* genes.

Conclusion: It seems that antibacterial resistance has a significant association with biofilm formation in *K. pneumoniae* isolates. Therefore, understanding resistance pattern and mechanisms leading to biofilm formation can facilitate efficient treatment of infections caused by this bacterium.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Multidrug-resistant, biofilms, virulence factor

***Corresponding Author:**
Email: zmohsen2002@yahoo.com
Tel: 0098 912 153 9288
Fax: 0098 253 280 0282

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2019; Vol. 23, No 2, Pages 168-176

Please cite this article as: Shivaee A, Meskini M, Shahbazi Sh, Hasani D, Masjedian Jazi F, Zargar M. Prevalence of flmA, flmH, mrkA, ecpA, mrkD virulence genes affecting biofilm formation in clinical isolates of *K. pneumonia*. ***Feyz*** 2019; 23(2): 168-76.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-02-13]

شیوع ژن‌های ویرولانس *mrkD*، *ecpA*، *mrkA*، *fimH*، *fimA* مؤثر در تشکیل بیوفیلم در بین ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از نمونه‌های بالینی

علی شیوایی [۱]، مریم مسکینی [۲]، شهلا شهبازی [۲]، دنیا حسنی [۳]، فرامرز مسجدیان جزی [۴]، محسن زرگر [۵*]

خلاصه:

سابقه و هدف: *کلبسیلا پنومونیه* از باکتری‌های فرصت‌طلبی است که در سراسر جهان سبب عفونت‌های بیمارستانی می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی شیوع جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* تولیدکننده بیوفیلم و ارتباط آن با فاکتورهای بیماری‌زایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به‌دست آمده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های مطهری و میلاد تهران از مهرماه ۹۵ تا خردادماه ۹۶ با تست‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. میزان مقاومت ایزوله‌ها با روش کربی– بائر و توانایی تشکیل بیوفیلم با تست فنوتیپی مشخص شد. در نهایت، فاکتورهای ویرولانس با روش PCR شناسایی شدند.

نتایج: بیشترین مقاومت نسبت به سفتازیدیم و سفوتاکسیم (۶۷ درصد) و کمترین مقاومت به ایمی‌پنم و مروپنم (۳۹ درصد) گزارش شد. تست فنوتیپی بیوفیلم نشان داد که ۸۱ درصد از جدایه‌ها، تولیدکننده بیوفیلم بودند. همچنین نتایج PCR نشان داد که همه ۵۷ جدایه‌ی تولیدکننده بیوفیلم، دارای ژن‌های *fimA*، *mrkA*، *ecpA* و *fimD* بودند و ژن *fimH* در ۹۲ درصد از جدایه‌ها شناسایی شد. ۳۶ درصد از جدایه‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم نبودند، دارای ژن *fimA* و ۲۹ درصد دارای ژن *ecpA* بودند، ژن *mrkA* و *fim H* در هیچ‌یک از این جدایه‌ها یافت نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* با تولید بیوفیلم ارتباط معناداری دارد. لذا آگاهی از الگوی مقاومت و مکانیسم تشکیل بیوفیلم این ارگانیسم می‌تواند به درمان بهتر بیماران کمک شایانی کند.

واژگان کلیدی: *کلبسیلا پنومونیه*، MDR، بیوفیلم، فاکتورهای ویرولانس

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۲، خرداد-تیر ۹۸، صفحات ۱۷۶-۱۶۸

مقدمه

خانواده انتروباکتریاسه باکتری‌های گرم منفی، میله‌ای شکل، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری و غیر هاگزا می‌باشند. گونه‌های متحرک این خانواده تاژک‌های اطرافی دارند. این اجرام بیشتر در روده مهره‌داران به‌عنوان فلور طبیعی، فرصت‌طلب یا پاتوژن حضور دارند. برخی از گونه‌های این خانواده پاتوژن روده‌ای نبوده، بلکه میکروارگانیسم‌های فرصت‌طلبی هستند که قادرند در دستگاه‌های ادراری، تنفسی، گردش خون و اعصابِ میزبان‌های مختلف به خصوص در شرایط تضعیف سیستم ایمنی، عفونت‌زایی نمایند.

۱. کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲. دانشجوی دکتری باکتری‌شناسی پزشکی، گروه میکروب‌شناسی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران

۳. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴. استادیار، گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۵. استادیار، گروه میکروب‌شناسی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**

گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

تلفن: ۰۹۱۲۱۵۳۹۲۸۸ **دورنویس:** ۰۲۵۳۲۸۰۰۲۸۲

پست الکترونیک: zmohsen2002@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۱۷ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۷/۱۲/۱۲

بعضی از اعضای این خانواده همچون: سالمونلا، شیگلا و تعدادی از سویه‌های اشرشیاکلی هم می‌توانند به صورت اوّلیه برای انسان و حیوانات، بیماری‌زا باشند. در بین اعضای این خانواده واریانت‌های غیرمتحرک، مانند کلبسیلا نیز به چشم می‌خورد [۱]. جنس کلبسیلا شامل: ۵ گونه و دارای ۲ زیرگونه است؛ اما برخی نیز برای این جنس ۷ گونه قائل هستند. در این میان *کلبسیلا پنومونیه* از نظر بالینی اهمیت فراوان دارد. در حالی‌که سایر گونه‌ها حدود ۱ درصد از موارد جدا شده بالینی را در جنس کلبسیلا شامل می‌شوند. بیوفیلم در واقع مجموعه متراکم و بسیار سازمان‌یافته از باکتری‌ها است که به یکدیگر و به سطوح (زنده یا غیرزنده) متصل شده، به‌وسیله یک ماتریکس خارج سلولی از مواد بیوپلیمری (EPS) که توسط خود باکتری‌ها تولید شده، احاطه شده است. EPS می‌تواند متشکل از انواع پلی‌ساکاریدها، نوکلئیک اسید، لیپیدها و پروتئین‌ها باشد و بخش اعظم بیوفیلم (۹۰-۵۰ درصد) را تشکیل می‌دهد [۲]. تشکیل بیوفیلم با اتصال باکتری‌ها به یک سطح آغاز می‌شود که معمولاً با واسطه فلاژل یا پیلی صورت می‌گیرد. این اتصال در ابتدا سست و برگشت‌پذیر است ولی در ادامه باکتری بیان فاکتورهای حرکتی (فلاژل و پیلی) را سرکوب نموده، به جای آن‌ها فاکتورهای اتصالی را بیان می‌کند، در نتیجه اتصال محکم و برگشت‌ناپذیر ایجاد می‌شود [۳]. پیلی در همه اعضای پاتوتایپ-

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-02-13]

های اشرشیاکلی حضور دارد و توسط اپران *ecp*RABCDE کد می‌شود، این پیلی در رابطه بین باکتری‌های درون بیوفیلم و اتصال سلولی نقش کلیدی دارد. همچنین پیلی تیپ ۱ که در تجمع درون-سلولی جدایه‌ها نقش دارد؛ حساس به مانوز بوده و توسط اپران *fim* کددهی می‌شود. این پیلی دارای یک زیرواحد اصلی به نام *fim*A و یک زیرواحد فرعی به نام *fim* H است [۴]. پیلی تیپ ۳ در بسیاری از باکتری‌های روده‌ای به‌خصوص *کلبسیلا پنومونیه* وجود دارد که در اتصال *کلبسیلا پنومونیه* به سلول‌های اپی‌تلیال تراکئال، سلول‌های توبولار کلیه، پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی، غشای پایه بافت ششی و تشکیل بیوفیلم نقش دارند. این نوع پیلی مقاوم به مانوز بوده و توسط اپران *mrk* کددهی می‌شود، کلاستر ژنی *mrk* روی کروموزوم یا پلاسمید باکتری واقع شده است که دارای زیرواحد اصلی *mrk*A و زیرواحد فرعی *mrk*D است [۵]. تولید بیوفیلم به‌خصوص در وسایل پزشکی و ارتباطش با افزایش انتقال افقی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی زنگ خطری برای کنترل این عفونت است. توانایی ایجاد بیوفیلم جدایه‌ها، منجر به افزایش مقاومت به مواد آنتی‌بیوتیکی به بیش از صد برابر می-شود. در نتیجه شکست درمانی، افزایش هزینه درمان و افزایش مرگ‌ومیر در بیماران را به‌همراه خواهد داشت. از جهت دیگر ارتباط سویه‌های تولیدکننده بیوفیلم و فاکتورهای ویرولانس آن‌ها می‌تواند راهی برای مقابله و ممانعت از تولید بیوفیلم و عفونت‌های بیمارستانی باشد. *کلبسیلا پنومونیه* می‌تواند منجر به عفونت‌های شدید بیمارستانی شود، عفونت‌های بیمارستانی ناشی از کلبسیلا بار سنگین اقتصادی را بر جامعه و زندگی فرد بیمار خواهد داشت و از این‌رو وجود برنامه‌های جدید برای کنترل این عفونت مورد نیاز است [۶]. اگرچه *کلبسیلا پنومونیه* یک باکتری فرصت‌طلب مهم است؛ اما در کشور عزیزمان ایران مطالعه جامعی مبنی بر شیوع جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* تولیدکننده بیوفیلم و بررسی ارتباطش با فاکتورهای ویرولانس آن انجام نشده است. بنابراین مطالعات زیادی برای بررسی ویژگی‌های جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* شایع بیمارستانی و فاکتورهای ویرولانس آن‌ها مورد نیاز است. از این‌رو هدف از این مطالعه بررسی ویژگی‌های جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف بر اساس مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ارتباط شیوع فاکتورهای ویرولانس با ایجاد مقاومت در محیط می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

این مطالعه توصیفی- مقطعی بر روی ۲۴۳ جدایه انتروباکتریاسه از نمونه‌های بالینی مختلف از بیمارستان‌های تهران (مطهری و میلاد)، به مدت شش‌ماه در بین سال‌های ۹۶-۱۳۹۵ جمع‌آوری شده بودند، انجام شد. تعداد ۱۰۶ نمونه ادراری، ۹۰ نمونه سوختگی، ۲۵ نمونه خلط و ۲۲ نمونه خون بود. از همه نمونه‌های جمع‌آوری شده ۷۰ جدایه کلبسیلا بودند که با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی TSI، SIM، MR-VP، سیمون سیترات و لیزین دکربوکسیلاز به‌عنوان گونه‌ی *کلبسیلا پنومونیه* شناسایی شدند.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

پس از تعیین هویّت هر یک از ایزوله‌ها، برای تعیین الگوی حساسیت و یا مقاومت آنتی‌بیوتیکی مطابق دستورالعمل CLSI ۲۰۱۶، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوکسیتین (۳۰ µg)، مروپنم (۱۰ µg)، ایمیپنم (۱۰µg)، سفوتاکسیم (۳۰ µg)، سفتازیدیم (۳۰ µg)، سفپیم (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۱۰µg) و آمیکاسین (۱۰µg) انتخاب و از شرکت Mast Co انگلستان خریداری شدند. برای تعیین حساسیت ایزوله‌ها نسبت به آنتی-بیوتیک، از انتشار دیسک به روش کربی- بائر استفاده شد. به این منظور سوسپانسیونی از ایزوله‌ها با کدورت نیم مک فارلند تهیه شد [۷]. به‌وسیله سوآپ از سوسپانسیون بر روی محیط جامد مولرهینتون آگار به‌صورت چمنی کشت داده شد، سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بر روی محیط جامد قرار داده شد، سپس پلیت‌ها به-مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. در مرحله بعدی با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد و مقایسه آن با جدول CLSI۲۰۱۶، ایزوله‌های مورد نظر تحت عناوین حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش شدند. *اشرشیاکلی* ATCC 25922 و *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 700603 به‌عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده شد. جدایه‌هایی که به حداقل سه خانواده از کلاس آنتی‌بیوتیک‌های رایج از خود مقاومت نشان دادند، به‌عنوان جدایه‌های دارای مقاومت چندگانه (MDR) شناخته شدند [۸].

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

۵ جفت پرایمر برای تشخیص ژن‌های *mrk*A، *fim*H، *fim*A، *mrk*D و *ecp*A از مقالات استخراج شد که توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ آمده است. برای انجام PCR، ابتدا DNA باکتری به‌روش boiling استخراج شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵µl با مقادیر زیر آماده شد: ۱۲/۵µl از PCR Master Mix x۲ (شرکت Amplicon)، ۱µl از پرایمر Forward، ۱ µl از پرایمر Reverse، ۲ µl از DNA الگو ۸/۵ µl آب مقطر دیونیزه استریل.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-02-13]

به‌منظور دقت و صحت انجام تست، کنترل‌های مثبت و منفی برای هر ژن لحاظ شد. سپس برنامه حرارتی زمانی زیر برای تکثیر قطعات به‌کار برده‌شد: دمای جداسازی اوّلیه ۹۵°C به‌مدت ۵ دقیقه، دمای جداسازی ۹۵ °C به‌مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال برای هر ژن با توجه به جدول شماره ۱ و به‌مدت ۶۰ ثانیه، دمای طویل-سازی ۷۲ °C به‌مدت ۶۰ ثانیه و دمای طویل‌سازی نهایی ۷۲ °C به‌مدت ۵ دقیقه بود. تعداد سیکل‌های انتخابی برای انجام واکنش PCR ۳۰ سیکل بود. همچنین برای آشکارسازی محصول PCR از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد و برای شناسایی طول قطعات از مارکر bp ۱۰۰۰ استفاده شد.

جدول شماره ۱- توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرها

ژن	توالی پرایمر ('۵'-۳)	دمای اتصال ° C	سایز محصول (bp)	رفرنس
mrk A	F- CGG TAA AGT TAC CGA CGT ATC TTG TAC TG R- GCT GTT AAC CAC ACC GGT GGT AAC	63	496	[۵]
mrk D	F- CTG AC G CTT TTT ATT GGC TTA ATG GCG R- GCA GAA TTT CC G GTC TTT TCG TTT AGT AG	63	757	[۹]
fim H	F- CGCCTGGTCCTTTGCCTGCA R- CTGCACGTTGCCGGCGGTAA	59	817	[۱۰]
*ecp*A	F- AATGGTTCACCGGGACATCATGTCC R- AAGGATGAAATATCGCCGACATCC	58	759	[۱۰]
*fim*A	F- CGG AC G GTA CGC TGT ATT TT R- GCT TCG GCG TTG TCT TTA TC	58	436	[۴]

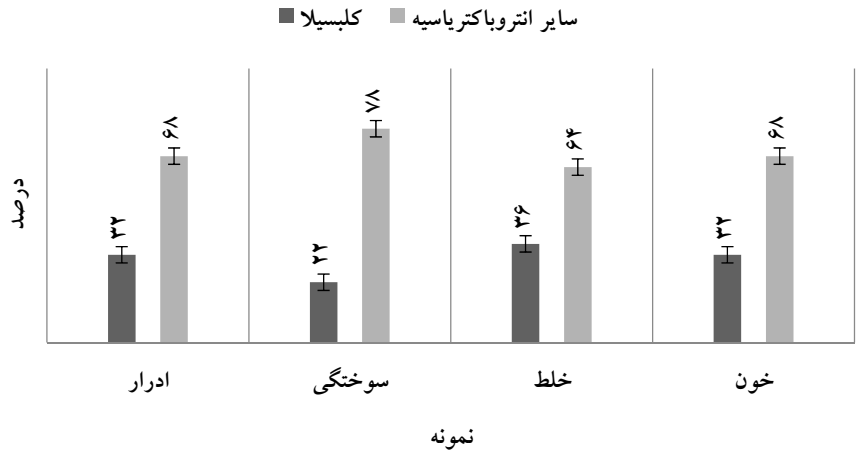
سنجش میزان تولید بیوفیلم به‌وسیله اندازه‌گیری جذب نوری MPT

برای سنجش میزان بیوفیلم از روش میکروتیتر پلیت و رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله ۰/۱ درصد استفاده شد [۱۱]. ابتدا هر یک از سویه‌ها در لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط TSB کشت داده و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. در مرحله بعدی، به‌منظور یکسان‌سازی کدورت سوسپانسیون‌های میکروبی، رقیق‌سازی در محیط TSB تازه انجام شد (تهیه سوسپانسیون با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند). سپس میزان ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی در هر یک از چاهک‌های میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ریخته و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه قرار داده شد. سپس محلول رویی خارج و چاهک‌ها به آرامی ۳ مرتبه توسط ۲۰۰ میکرولیتر از سرم فیزیولوژی شسته شد. میکروپلیت به صورت وارونه در دمای ۶۵ درجه قرار داده شد تا خشک شود. جهت فیکس بهتر بیوفیلم، از اتانول ۹۶ درصد به میزان ۱۰۰ میکرولیتر استفاده شد. پس از ۱۵ دقیقه الکل خارج و میکروپلیت در هوا خشک شد. به تمام خانه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۱/۵ درصد اضافه کرده، پس از ۲۰ دقیقه پلیت با آب شستشو شد تا رنگ اضافی از چاهک‌ها خارج شود. ۱۵۰ میکرولیتر از استیک اسید ۳۳ درصد به چاهک‌ها اضافه شد تا رنگ‌های باند شده به بیوفیلم به سطح میکروپلیت آزاد شوند. به‌منظور سنجش میزان تولید بیوفیلم، جذب نوری (OD) چاهک‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. اگر OD کمتر از ۰/۱ باشد، نشان از تشکیل بیوفیلم ضعیف، اگر OD ۰/۱-۱ باشد، نشان از تشکیل بیوفیلم متوسط و اگر OD بیشتر از ۱ باشد، نشان از تشکیل قوی است. همچنین از سویه‌ی *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 به‌عنوان کنترل مثبت برای سنجش بیوفیلم استفاده شد. [۱۲]. کلیه تحلیل‌ها و نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۵ انجام و استخراج شده است. برای بررسی ارتباط بین نوع ژن‌ها و تولید کردن بیوفیلم از آزمون دقیق فیشر استفاده شد.

نتایج

تعداد ۲۴۳ جدایه انتروباکتریاسه از بیمارستان‌های مطهری و میلاد از مهرماه ۹۵ تا خردادماه ۹۶ در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. طیف سنی افراد مراجعه‌کننده بین ۴۵-۱۵ سال متغیر بود. همچنین از نظر جنسیتی ۶۵ درصد از مراجعه‌کنندگان را زنان و ۳۵ درصد را مردان تشکیل می‌دادند. از ۱۰۶ نمونه ادراری ۳۴ نمونه *کلبسیلا پنومونیه*، از ۹۰ نمونه سوختگی ۲۰ نمونه *کلبسیلا پنومونیه*، از ۲۵ نمونه خلط ۹ نمونه *کلبسیلا پنومونیه* و از ۲۲ نمونه خون ۷ نمونه *کلبسیلا پنومونیه* بود. درصد جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* و سایر انتروباکتریاسیه‌های شناسایی شده در نمونه‌های جمع‌آوری شده در نمودار شماره ۱ گزارش شده است.

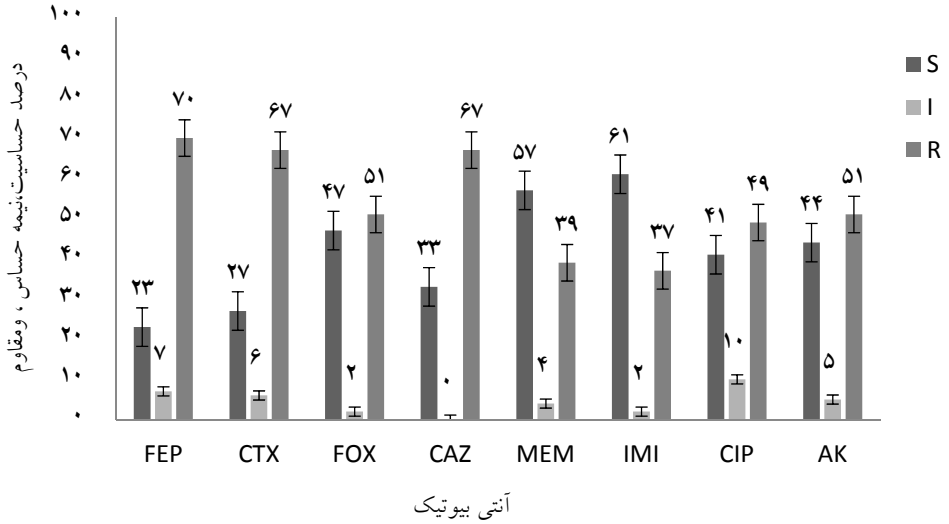
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-02-13]



نمودار شماره ۱- درصد جدایه‌های کلبسیلا و سایر انتروباکتریاسیه در نمونه‌های بالینی جمع‌آوری شده

نتایج آنتی‌بیوگرام

نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام به روش کربی- بائر بر روی ۷۰ جدایه کلبسیلا پنومونیه نشان داد که ۶۲ جدایه به‌عنوان جدایه-های دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه (MDR) شناسایی شدند. از این میان بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم (۷۰ درصد)، سفوتاکسیم (۶۷ درصد) و سفتازیدیم (۶۷ درصد)، همچنین بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمیپنم (۶۱ درصد)، مروپنم (۵۷ درصد) و سفوکسیتین (۴۷ درصد) بود. نمودار شماره ۲ درصد حساسیت، نیمه حساسیت و مقاومت هریک از ایزوله‌ها را به تفکیک آنتی‌بیوتیک نشان می‌دهد.



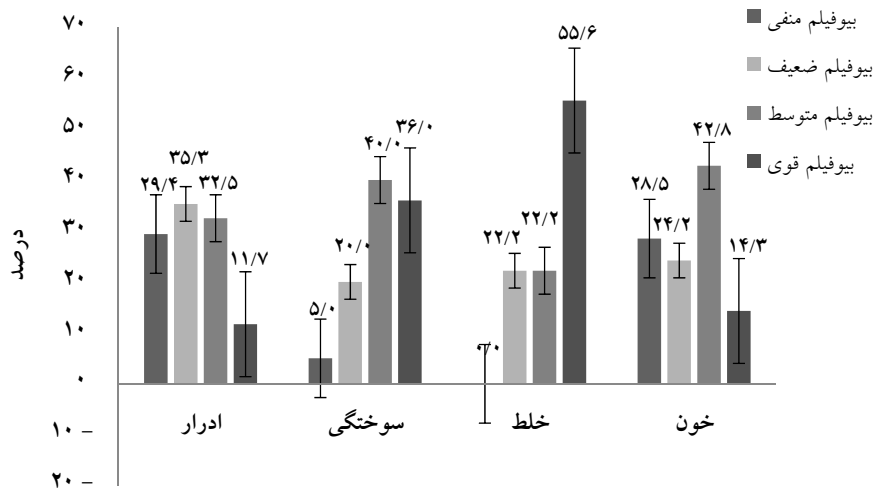
نمودار شماره ۲- درصد حساسیت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه*

*FEP: cefepime, CTX: cefotaxime, FOX: cefoxitin, CAZ: ceftazidime, MEM: meropenem, IMI: imipenem, CIP: ciprofloxacin, AK: amikacin S: Sensitive I: Intermediate R: Resistant

نتایج تست بیوفیلم

از ۷۰ جدایه *کلبسیلا پنومونیه*، ۵۷ جدایه قادر به تشکیل بیوفیلم بودند. بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم قوی مربوط به نمونه-های خلط و سپس سوختگی، بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم متوسط مربوط به نمونه‌های خون و سوختگی، بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم ضعیف و همچنین عدم تشکیل بیوفیلم مربوط به نمونه‌های ادرار و خون بود. جزئیات بیشتر در نمودار شماره ۳ آمده است.

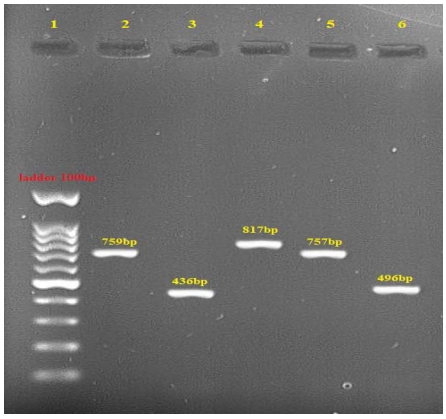
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-02-13]



نمودار شماره ۳- توزیع میزان تشکیل بیوفیلم در نمونه‌های بالینی جمع‌آوری شده

فراوانی ژن‌های کدکننده فاکتورهای ویرولانس به‌روش PCR

از بین ۷۰ جدایه *کلبسیلا پنومونیه*، ۶۰ جدایه دارای ژن *ecpA*، ۶۱ جدایه دارای ژن *fimA*، ۵۷ جدایه دارای ژن *mrkA* بودند؛ لازم‌به‌ذکر است که همه جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلم، دارای سه ژن *ecpA*، *fimA* و *mrkA* بودند. اما در میان سویه-های تولیدکننده‌ی بیوفیلم ۵۲ جدایه دارای ژن *fimH* بودند و ۵ جدایه فاقد این ژن بودند. همچنین در میان سویه‌های تولیدکننده‌ی بیوفیلم ۵۰ جدایه دارای ژن *mrkD* بودند که از بین آن‌ها ۷ جدایه فاقد این ژن بودند. تمامی سویه‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم نبودند، فاقد دو ژن *fimH* و *mrkD* بودند. ژل الکتروفورز مربوط به ژن‌های کدکننده فاکتورهای ویرولانس در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.



شکل شماره ۱- شناسایی ژن‌های *mrkA*، *fimH*، *fimA* ، *mrkD* و *ecpA* در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* با استفاده از روش PCR: چاهک شماره ۱: ladder 100bp، شماره ۲: ژن espA، شماره۳: *fimA* ، شماره ۴: *fimH*، شماره ۵: *mrkD* و چاهک شماره ۶ *mrkA* می‌باشند.

نتایج آنالیز آماری

کلیه تحلیل‌ها و نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۵ انجام شد. برای بررسی ارتباط بین نوع ژن‌ها و تولید کردن بیوفیلم از آزمون دقیق فیشر استفاده شد که نتایج آن در جدول شماره ۲ آمده است.

جدول شماره ۲- نتایج آزمون فیشر برای بررسی ارتباط بین ژن‌های مورد مطالعه و تولید بیوفیلم

		biofilm		کل	نتایج
		بیوفیلم تولید می‌کند (درصد)	بیوفیلم تولید نمی‌کند (درصد)		
mrkA	مثبت	۵۷(۱۰۰)	۰	۵۷(۱۰۰)	$P<$۰۰۱/۰
	منفی	۰	۱۳(۱۰۰)	۱۳(۱۰۰)	
mrkD	مثبت	۵۱(۱۰۰)	۰	۵۱(۱۰۰)	$P<$۰/۰۰۱
	منفی	۶(۶/۳۱)	۱۳(۴/۶۸)	۱۹(۱۰۰)	
fimH	مثبت	۵۳(۱۰۰)	۰	۵۳(۱۰۰)	$P<$۰/۰۰۱
	منفی	۳(۸/۱۸)	۱۳(۳/۸۱)	۱۶(۱۰۰)	
fimA	مثبت	۵۷ (۹/۹۱)	۵(۱/۸)	۶۲(۱۰۰)	$P<$۰/۰۰۱
	منفی	۰	۸(۱۰۰)	۸(۱۰۰)	
ecpA	مثبت	۵۷ (۰/۹۵)	۳(۵)	۶۰(۱۰۰)	$P<$۰/۰۰۱
	منفی	۰	۱۰(۱۰۰)	۱۰(۱۰۰)	

با توجه به نتایج مشاهده می‌شود که بین تولید بیوفیلم با هر یک از ژن‌های (*mrkA,mrkD,fimH,fimA,ecpA*) از نظر آماری ارتباط معناداری وجود دارد ($P<$۰/۰۵). به این معنی که حضور هر یک از ژن‌ها در تولید بیوفیلم اثرگذار می‌باشد. برای بررسی ارتباط بین مقاومت چندگانه با تولید بیوفیلم نیز از آزمون دقیق فیشر استفاده شد که نتایج آن در جدول شماره ۳ آمده است.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-02-13]

جدول شماره ۳- نتایج آزمون فیشر برای بررسی ارتباط بین مقاومت چندگانه با تولید بیوفیلم

		Biofilm		کل	نتیجه
		بیوفیلم تولید می‌کند (درصد)	بیوفیلم تولید نمی‌کند (درصد)		
MDR	مثبت	۵۳(۵/۸۵)	۹(۱۴/۵)	۶۲(۱۰۰)	P=۰/۰۳۴
	منفی	۴(۵۰)	۴(۵۰)	۸(۱۰۰)	

نتایج آزمون دقیق فیشر نشان داد که مقاومت چندگانه MDR با تولید کردن بیوفیلم از نظر آماری معنادار می‌باشد (P<۰/۰۵).

بحث

کلبسیلا پنومونیه شایع‌ترین عامل پنومونی باکتریایی کسب‌شده از اجتماع در بین باکتری‌های گرم منفی است. فاکتورهای ویرولانس متنوعی در شدت عفونت *کلبسیلا پنومونیه* نقش دارند که از جمله آن‌ها می‌توان به پلی‌ساکارید کپسولی، پیلی‌تیپ ۱ و پیلی‌تیپ ۳، فاکتورهای مرتبط با کلونیزاسیون و تشکیل بیوفیلم اشاره کرد. توانایی ایجاد بیوفیلم جدایه‌ها، منجر به افزایش مقاومت به مواد آنتی‌بیوتیکی می‌شود. در نتیجه شکست درمانی، افزایش هزینه درمان و افزایش مرگ‌ومیر در بیماران را به همراه خواهد داشت [۱۳،۶]. در مطالعه حاضر بیشترین نمونه جمع‌آوری شده، به‌ترتیب از ادرار، سوختگی، خلط و خون بود که با نمونه‌های به‌دست‌آمده از ادرار، سوختگی، خلط و خون در مقالات مختلفی، ازجمله: langstraat و همکاران در سال ۲۰۰۱، Jagnow و همکاران در سال ۲۰۰۳، Ma-lc و همکاران در سال ۲۰۰۵ تطابق داشت [۱۶-۱۴]. از مجموع ۷۰ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* ۶۲ جدایه به‌عنوان جدایه‌های دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه (MDR) شناسایی شدند. از این میان بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم (۷۰ درصد)، سفوتاکسیم (۶۷ درصد) و سفتازیدیم (۶۷ درصد)، همچنین بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمیپنم (۶۱ درصد)، مروپنم (۵۷ درصد) و سفوکسیتین (۴۷ درصد) بود. جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلم بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را از خود نشان دادند، در حالی که جدایه‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم نبودند، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها بیشترین حساسیت را از خود نشان دادند؛ اما در مطالعات دیگر مانند مطالعه Cernohorská و همکاران در سال ۲۰۰۴ مشاهده شد که حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلم *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم، سفتازیدیم، مروپنم، سیپروفلوکساسین و آمیکاسین کاهش می‌یابد [۱۷] که با نتایج مطالعه ما مطابقت نداشت که این می‌تواند به‌علت انتخاب نمونه‌های مختلف در دو مطالعه باشد. نتایج مطالعه Singla و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داد که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و آمیکاسین در جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلم *کلبسیلا پنومونیه* افزایش خواهد یافت [۱۸]. همچنین Bellifa و همکاران بیان کردند که مقاومت جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلم *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سفوتاکسیم و سیپروفلوکساسین، ۱۲-۱۰ بار بیشتر از جدایه‌هایی که تولید بیوفیلم نمی‌کنند، از خود مقاومت نشان می‌دهند [۱۹]. Subramanian و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که ۸۰ درصد جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلم از ۱۰۰ نمونه ادراری با علائم عفونت ادراری به‌ترتیب ۸۳ درصد، ۹۳ درصد، ۷۳ درصد و ۸۰ درصد به نالیدیسیک اسید، آمپی‌سیلین، سفوتاکسیم و کوتریماکسازول مقاوم بودند که نتایج آنان در مقایسه با جدایه‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم نبودند از درصد بالاتری برخوردار بود [۲۰]. با بررسی نتایج این مطالعه با سایر مطالعات می‌توان نشان داد که جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلم دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالاتری نسبت به جدایه‌های غیر تولیدکننده بیوفیلم هستند. شاید تفاوت میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در بین مطالعات گذشته به‌دلیل تفاوت در غلظت اوّلیه باکتری و یا بیان فاکتورهای اتصالی اوّلیه باکتری در تولید بیوفیلم و یا منبع نمونه‌ها باشد. در این مطالعه از بین ۷۰ جدایه *کلبسیلا پنومونیه*، ۵۶ جدایه قادر به تولید بیوفیلم بودند و تنها ۱۴ جدایه توانایی تشکیل بیوفیلم را نداشتند. Yang و همکاران در سال ۲۰۰۸ با مطالعات آزمایشگاهی نشان دادند که حدود ۸۰ درصد از جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از نمونه‌های ادراری، زخم، خلط و خون قادر به تشکیل بیوفیلم هستند [۲۱]. همچنین Niveditha و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که حدود ۶۳ درصد از جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از ادرار افراد مبتلا به عفونت ادراری قادر به تولید بیوفیلم هستند [۲۲] که این نتایج، تأییدکننده‌ی نتایج به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر می‌باشد. در این مطالعه نشان داده شد که جدایه‌های به‌دست‌آمده از نمونه‌های سوختگی و خلط دارای قدرت تشکیل بیوفیلم قوی‌تری نسبت به جدایه‌های به‌دست‌آمده از نمونه‌های خون و ادرار بودند، این مشاهده با مطالعه‌ی Naparstek در سال ۲۰۱۴ مطابقت داشت، در بررسی ایشان

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-02-13]

نشان داده شده است که جدایه‌های به‌دست‌آمده از نمونه‌های بالینی مانند: نمونه‌ی مجرای تنفسی، مغز استخوان و بافت‌های عفونی مانند: نمونه‌های حاصل از سوختگی نسبت به نمونه‌های ادرار و خون دارای توانایی تشکیل بیوفیلم بیشتری هستند [۲۳]. در مطالعه ما، جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلم مقاومت بالایی نسبت به آنتی-بیوتیک‌های سفالسپورین از خود نشان دادند. ۵۳ سویه از ۵۷ سویه‌ای که قادر به تولید بیوفیلم بودند (۸۹/۴۷ درصد)، دارای مقاومت چندگانه (MDR) نسبت به مواد آنتی‌بیوتیکی هستند. همچنین آنالیز آماری انجام‌شده بر روی این نتایج معنادار بودن ارتباط بین وجود بیوفیلم و مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک-ها را نشان می‌دهد ($P<۰/۰۵$). Campos و همکاران در سال ۲۰۱۵ از نیویورک گزارش دادند که جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلم قوی در مقایسه با جدایه‌های تولیدکننده‌ی بیوفیلم ضعیف، مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و تایجی سیکلین از خود نشان می‌دهند که نتایج مطالعه ما با نتایج آنان هم‌سو بود [۶]. در برخی دیگر از مطالعات نیز نشان داده‌اند که بین تشکیل بیوفیلم و جدایه‌های دارای مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌ها ارتباط معنی-داری وجود دارد [۲۴،۲۱]. نتایج PCR حاصل از این مطالعه نشان داد که همه ۵۷ جدایه‌ی تولیدکننده بیوفیلم، دارای ژن‌های *fim*A، *mrk*A، *ecp*A و *fim*D بودند و ژن *fim*H در ۹۲ درصد از جدایه‌ها شناسایی شد. همچنین ۳۶ درصد از جدایه‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم نبودند، دارای ژن *fimA* و ۲۹ درصد دارای ژن *ecp*A بودند، اما ژن *mrk*A و *fim* H در هیچ‌یک از این جدایه-ها یافت نشد. همچنین نتایج آزمون دقیق فیشر نشان داد که حضور ژن‌های *mrk*A، *fim*H، *fim*A، *mrk*D و *ecp*A با تولید بیوفیلم از نظر آماری معنادار می‌باشد ($P<۰/۰۵$). در مطالعه‌ای که توسط Alcántar-Curiel و همکارانش انجام شد، نشان دادند که در بین ۶۹ جدایه *کلبسیلا پنومونیه*، ۵۵ جدایه قادر به تولید بیوفیلم بودند و تمامی جدایه‌ها دارای ژن *mrk*A، ۵۷ درصد دارای ژن *mrk*D و ۹۶ درصد از ۶۹ جدایه دارای ژن *ecp* بودند [۴]. همان‌طور که ذکر شد در مطالعه حاضر، تمامی سویه‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم بودند، ژن *mrk*A داشتند که این نتایج هم‌راستا با نتایج تحقیق مذکور می‌باشد. در مطالعه‌ی دیگری که توسط Córdova و همکارانش در سال ۲۰۱۴ انجام شد، بیان کردند که از ۵۰ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* به‌دست‌آمده از نمونه‌های بالینی مختلف، ۱۰۰ درصد جدایه‌ها قادر به تولید بیوفیلم بودند و به‌ترتیب ۱۰۰ درصد، ۸۴ درصد و ۹۸ درصد از جدایه‌ها، دارای ژن‌های فاکتور کلونیزاسیون *ecp*A، *mrk*A و *fim*H هستند [۲۵]. همان‌طور که مشخص است نتایج تحقیق حاضر، با نتایج به‌دست آمده از مطالعه‌ی آنان بسیار نزدیک به هم می‌باشد که می‌تواند تأییدکننده‌ی نتایج حاصل از این مطالعه باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج نشان داده شده در این تحقیق و سایر مطالعات قبلی انجام‌شده در این زمینه، می‌توان نتیجه گرفت که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفالسپورین با طیف گسترده در بین جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* رو به افزایش است. یکی از دلایل این مقاومت روزافزون می‌تواند تشکیل بیوفیلم باشد. تشکیل بیوفیلم در جدایه‌ها موجب عدم دسترسی آنتی‌بیوتیک به باکتری می‌شود. در نتیجه افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی موجب طولانی‌تر و مشکل‌تر شدن درمان عفونت می‌شود و علاوه بر این هزینه اقتصادی زیادی را بر بیمار و جامعه تحمیل می‌کند. همچنین به‌نظر می‌رسد افزایش تولید بیوفیلم با پیدایش مقاومت به چند دارو ارتباط دارد که این خود گویای اهمیت بررسی وجود بیوفیلم در سویه‌های مقاوم را آشکار می‌سازد. از این رو پیشنهاد می‌شود در ایران برای آگاهی از الگوی مقاومت و مکانیسم تشکیل بیوفیلم این ارگانیسم مطالعه بیشتری صورت گیرد. همچنین استراتژی‌هایی برای ممانعت و کنترل شیوع و نظارت مناسب بر باکتری‌های ایجادکننده عفونت-های بیمارستانی به‌منظور ریشه‌کنی تشکیل بیوفیلم، و در نتیجه درمان مناسب و کاهش هزینه‌های بیمارستانی صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود واجب می‌دانند از تمام استادان و بزرگوارانی که بدون هیچ چشم‌داشتی ما را در عرصه‌ی تحقیقات یاری رساندند، تشکر و قدردانی کنند.

References:

[1] Hennequin C, Robin F, Cabrolier N, Bonnet R, Forestier C. Characterization of a DHA-1-producing Klebsiella pneumoniae strain involved in an outbreak and role of the AmpR regulator in virulence. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2012; 56(1): 288-94.

[2] Huang TW, Lam I, Chang HY, Tsai SF, Palsson BO, Charusanti P. Capsule deletion via a λ-Red knockout system perturbs biofilm formation and fimbriae expression in Klebsiella pneumoniae MGH 78578. ***BMC Res Notes*** 2014; 7(1): 13.

[3] Hansen DS, Skov R, Benedi J, Sperling V, Kolmos HJ. Klebsiella typing: pulsed field gel

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-02-13]

electrophoresis (PFGE) in comparison with O: K□serotyping. ***Clin Microbiol Infect*** 2002; 8(7): 397-404.
[4] Gerlach GF, Clegg S, Allen BL. Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of Klebsiella pneumoniae. ***J Bacteriol*** 1989; 171(3): 1262-70.
[5] Gillespie S, Hawkey PM. Principles and practice of clinical bacteriology: John Wiley & Sons; 2006.
[6] Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. ***Clin Microbiol Rev*** 1998; 11(4): 589-603.
[7] Mathai D, Rhomberg PR, Biedenbach DJ, Jones RN. Evaluation of the in vitro activity of six broad-spectrum β-lactam antimicrobial agents tested against recent clinical isolates from India: a survey of ten medical center laboratories. ***Diag Microbiol Infect Dis*** 2002; 44(4): 367-77.
[8] Akinyemi KO, Oladapo O, Okwara CE, Ibe CC, Fasure KA. Screening of crude extracts of six medicinal plants used in South-West Nigerian unorthodox medicine for anti-methicillin resistant Staphylococcus aureus activity. ***BMC Complementary Alternative Med*** 2005; 5(1): 6.
[9] Poole K. Resistance to β-lactam antibiotics. ***Cell Mol Life Sci*** 2004; 61(17): 2200-23.
[10] Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology: Elsevier Health Sciences; 2015.
[11] Habibipour R, Haghgou LM. Study on hydro-alcoholic extract effect of pomegranate peel on pseudomonas aeruginosa biofilm formation. ***Avicenna J Clin Med*** 2015; 22(3): 195-202.
[12] Reid G, Charbonneau-Smith R, Lam D, Kang YS, Lacerte M, Hayes K. Bacterial biofilm formation in the urinary bladder of spinal cord injured patients. ***Spinal Cord*** 1992; 30(10): 711.
[13] Alcántar-Curiel MD, Blackburn D, Saldaña Z, Gayosso-Vázquez C, Iovine N, De la Cruz MA, et al. Multi-functional analysis of Klebsiella pneumoniae fimbrial types in adherence and biofilm formation. ***Virulence*** 2013; 4(2): 129-38.
[14] Mammina C, Di Carlo P, Cipolla D, Giuffre M, Casuccio A, Di Gaetano V, et al. Surveillance of multidrug-resistant gram-negative bacilli in a neonatal intensive care unit: prominent role of cross transmission. ***Am J Infection Control*** 2007; 35(4): 222-30.
[15] Singla S, Harjai K, Chhibber S. Susceptibility of different phases of biofilm of Klebsiella pneumoniae to three different antibiotics. ***J Antibiotics*** 2013; 66(2): 61.
[16] Sahly H, Podschun R. Clinical, bacteriological, and serological aspects of Klebsiella infections and their spondylarthropathic sequelae. ***Clin Diag Lab Immunol*** 1997; 4(4): 393.
[17] Subramanian P, Shanmugam N, Sivaraman U, Kumar S, Selvaraj S. Antiobiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. ***Australas Med J*** 2012; 5(7): 344.
[18] 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.
[19] Hausler WJ, Sussman M, Topley WWC, Wilson SGS. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Bacterial Infections: Arnold; 1998.
[20] Nicolau Korres AM, Aquije GMdFV, Buss DS, Ventura JA, Fernandes PMB, Fernandes AAR. Comparison of biofilm and attachment mechanisms of a phytopathological and clinical isolate of Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae. ***Sci World J*** 2013; 2013.
[21] Yang D, Zhang Z. Biofilm-forming Klebsiella pneumoniae strains have greater likelihood of producing extended-spectrum β-lactamases. ***J Hospital Infect*** 2008; 68(4): 369-71.
[22] Wenzel RP. The mortality of hospital-acquired bloodstream infections: need for a new vital statistic? ***Int J Epidemiol*** 1988; 17(1): 225-7.
[23] Černohorská L, Votava M. Determination of minimal regrowth concentration (MRC) in clinical isolates of various biofilm-forming bacteria. ***Folia Microbiologica*** 2004; 49(1): 75-8.
[24] Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NC. β-Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. ***Curr Opin Microbiol*** 2005; 8(5): 525-33.
[25] Cruz-Córdova A, Esteban-Kenel V, Espinosa-Mazariego K, Ochoa SA, Moreno Espinosa S, de la Garza Elhain A, et al. Pathogenic determinants of clinical Klebsiella pneumoniae strains associated with their persistence in the hospital environment. ***Boletín Médico del Hospital Infantil de México*** 2014; 71(1): 15-24.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-02-13]