

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

Maral Bayati¹, Reza Habibipour², 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

Abstract

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: 10.29252/ajcm.26.1.51

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 pneumoniae*, mark A Gene, Virulence Factor

بررسی ارتباط مقاومت آنتی‌بیوتیکی با تولید بیوفیلیم در کلبسیلا پنومونیه جداسده از بیمارستان‌های شهر همدان

مارال بیاتی^۱، رضا حبیبی پور^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 میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

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

چکیده

سابقه و هدف: نقش بیوفیلیم و تولید آن توسط کلبسیلا پنومونیه به عنوان 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 بیوفیلیم جداسده 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. به منظور جداسازی کلبسیلا پنومونیه از محیط کشت‌های انتخابی و آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده گردید. همچنین برای مشخص کردن سویه‌های تولیدکننده بیوفیلیم 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 به دست 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 برده شده، بیشترین و کمترین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به ترتیب به سفتازیدیم (۷۴ درصد) و آمیکاسین (۴۸ درصد) تعلق دارد. بر مبنای نتایج، دو ایزوله (۲ درصد) دارای بیوفیلیم قوی، ۲۷ ایزوله (۲۷ درصد) دارای بیوفیلیم متوسط و ۴۱ ایزوله (۴۱ درصد) دارای بیوفیلیم ضعیف بودند. ۳۰ ایزوله (۳۰ درصد) نیز قدرت تشکیل بیوفیلیم را نداشتند. فراوانی حضور ژن‌های تولیدکننده بیوفیلیم در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه بدین صورت 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 بیوفیلیم بوده و قادر به شناسایی انواع بیوفیلیم در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه می‌باشد و می‌توان با استفاده از آن باکتری‌های دارای قدرت بیوفیلیم ضعیف، متوسط و قوی را شناسایی کرد.

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

مقدمه

عفونت‌های داخل شکمی در بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان می‌شود [۱]. مقاومت ضد میکروبی باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه به‌ویژه کلبسیلا پنومونیه همواره به عنوان 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

کلبسیلا پنومونیه یک باسیل گرم منفی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد. این میکروارگانیسم بخشی از میکروفلور طبیعی روده انسان را تشکیل می‌دهد و امروزه به عنوان 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

هویت شدند. علاوه بر این، 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)، ایمپنم (۱۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفپیم (۳۰ میکروگرم) و سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) تهیه شده از شرکت MAST انگلستان انجام شد. برای انجام این کار، محیط مولر هینتون آگار و سوسپانسیون میکروبی (کدورت معادل استاندارد نیمه مک‌فارلند) تهیه گردید و توسط سوآپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار در سه جهت مختلف کشت داده شد و پس از ۱۵ دقیقه پخش کردن 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 رشد یافته 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 موکوتیدی جمع‌آوری شده به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. سپس، تک‌کلی‌ها 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 خشک شدن در مجاورت هوا، در هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق ریخته شد. در نهایت، رنگ آزاد شده 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

آنتی‌بیوتیک‌ها باعث تهاجم باکتری‌های فرصت‌طلب و قارچ‌ها می‌شود. قابلیت کلبسیلا پنومونیه در ایجاد بیماری به دلیل کاسته شدن 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 برخوردار 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. علاوه بر این، باکتری کلبسیلا پنومونیه به واسطه داشتن فاکتورهای ویرولاکس 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 (*wzm* و *mrkA*، *pgaA*، *wbbm*) کدگذاری می‌شود. حضور این ژن‌ها در کلبسیلا پنومونیه منجر به تولید عفونت‌های شدیدتری در بیماران شود [۶،۷]. با توجه به موارد بیان شده، مطالعه حاضر با هدف تعیین ژن‌های (*pgaA*، *wbbm*، *mrkA* و *wzm*) دخیل در تولید بیوفیلم به روش فنوتیپی و PCR (Polymerase Chain Reaction) در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه جدا شده 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 بستری شده 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 ترشه 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 کلی‌های رشد یافته مشکوک به کلبسیلا پنومونیه برای انجام آزمون‌های بیوشیمیایی افتراقی نظیر TSI (Triple Sugar Iron)، SIM (Sulphide Indole Motility)، اوره‌آز، سیمون سیرترات و MR/VP (Methyl Red- Voges-Proskauer) استفاده شد. سپس، ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جداسازی گشته و تعیین

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 شارپ‌ترین باند بدون وجود هیچ‌گونه باند غیراختصاصی وجود داشته باشد به‌عنوان (Melting Temperature) T_m 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 Cleaver Scientific, Warrick shire, UK) Gel doc (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.

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 بیوفیلیم در جدول ۱ ارائه شده است [۱۰].

واکنش زنجیره پلی‌مرز (PCR)

برای انجام واکنش زنجیره پلی‌مرز (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 میکروتیوب 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 *pgaA* *markA* و *wzm* و *wbbm* در ایزوله‌های مورد مطالعه از روش PCR با استفاده از زوج پرایمرهای نشان‌داده‌شده در جدول ۲ استفاده شد [۱۱].

در این مطالعه از مسترمیکس آماده شرکت آمپلیکون دانمارک استفاده شد. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی،

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

توانایی تشکیل بیوفیلیم	محاسبه میزان تولید بیوفیلیم	نتایج حاصل از میانگین حداکثر جذب نوری OD
قوی	$OD > 4 * ODC$	$OD > 0.332$
متوسط	$2 * ODC < OD \leq 4 * ODC$	$0.166 < OD \leq 0.332$
ضعیف	$OD < OD \leq 2 * ODC$	$0.083 < OD \leq 0.166$
عدم اتصال	$OD \leq 0.083$	$OD \leq 0.083$

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

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
<i>markA</i>	<i>mrkA-FW</i>	ACGTCTCTAACTGCCAGGC	۱۱۴	۱۱
	<i>mrkA-RV</i>	TAGCCCTGTTGTTTGCTGGT		
<i>pgaA</i>	<i>pgaA-FW</i>	GCAGACGCTCTCCTATGTC	۱۵۶	
	<i>pgaA-RV</i>	GCCGAGAGCAGGGGAATC		
<i>wbbM</i>	<i>wbbM-FW</i>	ATGCGGGTGAGAACAACCA	۱۲۱	
	<i>wbbM-RV</i>	AGCCGCTAACGACATCTGAC		
<i>wzm</i>	<i>wzm-FW</i>	TGCCAGTTCGGCCACTAAC	۱۲۹	
	<i>wzm-RV</i>	GACAACAATAACCGGGATGG		

جدول ۳: مقادیر لازم از مواد مورد نیاز برای انجام PCR ژن های عامل بیوفیلیم در کلبسیلا پنومونیه

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

یافته‌ها

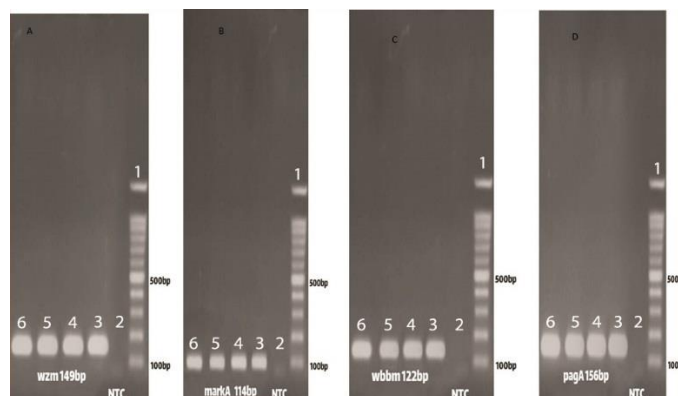
از میان ۲۳۰ نمونه بالینی مختلف، ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه تشخیص داده شد که از این بین ۵۸ ایزوله (۵۸ درصد) از مردان و ۴۲ ایزوله (۴۲ درصد) از زنان جداسازی گردید. فراوانی کلبسیلا پنومونیه جمع‌آوری شده از نمونه‌های مختلف بالینی در شکل ۱ مشاهده می‌شود. همان‌طور که مشاهده می‌شود، ۲۴ ایزوله (۲۴ درصد) از عفونت 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. علاوه بر این، 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 برده شده، بیشترین و کمترین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به ترتیب در سفنازیدیم (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 برده شده، بیشترین و کمترین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به ترتیب نسبت به سفنازیدیم (۷۴ درصد) و آمیکاسین (۴۸ درصد) بوده است. در بررسی نهایی ایزوله‌های مولد بیوفیلیم 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 بیوفیلیم بودند. فراوانی حضور ژن‌های عامل بیوفیلیم 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 جداسازی شده 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
سفنازیدیم	CAZ	۲۴	۷۴	۲
ایمی‌پنم	IPM	۲۵	۶۴	۱۱
جنتامایسین	GM	۳۹	۶۱	۰
آمیکاسین	AN	۴۸	۵۱	۱
سفپیپیم	FEP	۲۵	۷۱	۴

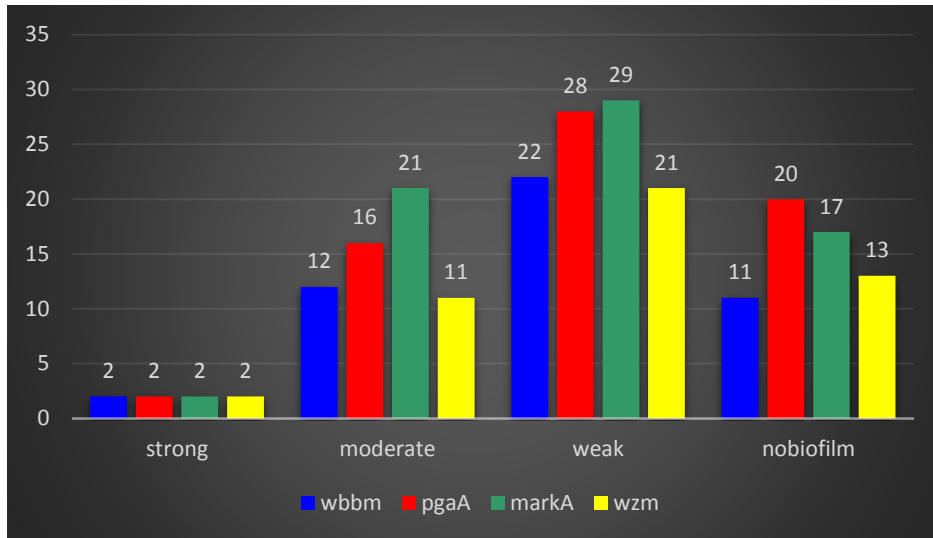


شکل ۱: نتایج حاصل از تکثیر ژن‌های مولد بیوفیلیم *wzm* ۱۴۹ جفت باز (A)، *markA* ۱۱۴ جفت باز (B)، *wbbm* ۱۲۲ جفت باز (C) و *pgaA* ۱۵۶ جفت باز (D)

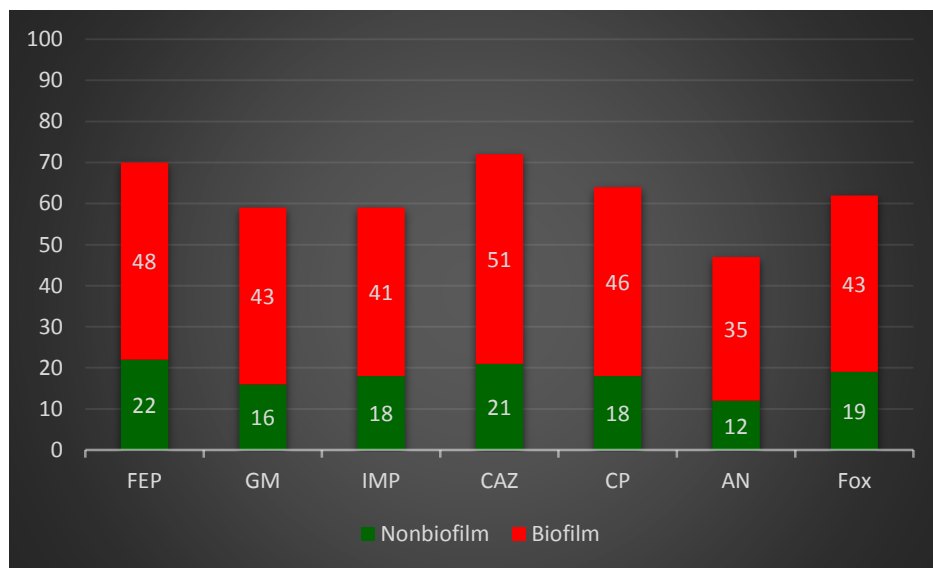
چاهک ۱= سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز؛ چاهک ۲= کنترل منفی؛ چاهک ۳= کنترل مثبت؛ چاهک ۴ تا ۶= ایزوله‌های بالینی

شکل ۳ نیز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بیوفیلم و ایزوله‌هایی که بیوفیلم تولید نمی‌کنند، قابل مشاهده می‌باشد.

در شکل ۲، مقایسه حضور ژن‌های *wzm* *pgaA* *markA* و *wbbm* در بین ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بیوفیلم و سویه‌هایی که بیوفیلم تولید نمی‌کنند، ارائه شده است. در



شکل ۲: مقایسه حضور ژن‌های *wzm*، *pgaA*، *markA* 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

هستند، مشاهده شده است. کلبسیلا پنومونیه دارای فاکتورهای ویروالانس مختلفی مانند فیمبریه، کپسول و سیستم‌های کسب آهن می‌باشد که تمامی این فاکتورها نقش مهمی در بیماری‌زایی کلبسیلا پنومونیه دارند [۱۴، ۱۵]. علاوه بر این، 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/پیدرمیدیس مطرح می‌باشد و موجب مزمن شدن عفونت‌های

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 قابل توجهی 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 میکروارگانیسم در افرادی که دچار ضعف سیستم ایمنی

ناشی از این میکروارگانسیم‌ها می‌شود [۱۶، ۱۷].

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه منجر به شکست درمان در بیماران عفونی ناشی از این میکروارگانسیم می‌گردد. نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان دادند که آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم 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 سفنازیدیم 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 ای‌پی‌نم 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 کارباینم (ای‌پی‌نم) 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 سمنان، 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 ای‌پی‌نم (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.

بیوفیلیم 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 ارگانسیم بتواند قدرت بقای خود در محیط را افزایش دهد. نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که از ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف، دو ایزوله (۲ درصد) بیوفیلیم قوی، ۲۷ ایزوله (۲۷ درصد) بیوفیلیم متوسط و ۴۱ ایزوله (۴۱ درصد)

بیوفیلیم ضعیف داشتند و ۳۰ ایزوله (۳۰ درصد) فاقد قدرت تشکیل بیوفیلیم بودند. در این ارتباط، در مطالعه سیفی و همکاران در تهران نشان داده شد که از ۹۴ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف، ۵۵ ایزوله (۵۲/۱ درصد) بیوفیلیم متوسط و نه ایزوله (۸/۵ درصد) بیوفیلیم ضعیف هستند و هفت ایزوله (۶/۴ درصد) فاقد تشکیل بیوفیلیم می‌باشند [۲۱]. در این مطالعه دو ایزوله (۲ درصد) بیوفیلیم قوی، ۲۷ ایزوله (۲۷ درصد) بیوفیلیم متوسط و ۴۱ ایزوله (۴۱ درصد) بیوفیلیم ضعیف داشتند و ۳۰ ایزوله (۳۰ درصد) فاقد قدرت تشکیل بیوفیلیم بودند که این امر با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی اندکی داشت. در مطالعه سیفی و همکاران ایزوله‌های تولیدکننده بیوفیلیم از نمونه‌های زخم و ادرار بیماران به‌دست آمدند؛ به‌طوری که بیشتر ایزوله‌ها دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تولیدکننده بیوفیلیم بودند. بیوفیلیم 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 *mrkA*، *pgaA*، *wbbm* و *wzm* بررسی گردیدند و نتایج نشان دادند که از ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جدا شده 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 بیوفیلیم مشخص گردید که ژن‌های *pgaA*، *wzm* 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 بیوفیلیم 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 بیوفیلیم در کلبسیلا پنومونیه دارند. علاوه‌براین، در مطالعه‌ای که بر روی ایزوله‌های بالینی صورت گرفت، مشخص شد که حضور برخی از ژن‌های کلیدی مانند *wzm* و *wbbz* در کنار یکدیگر، علاوه بر اینکه بر تولید

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 میکروبیولوژی دانشگاه آزاد و دانشگاه علوم پزشکی همدان ابراز می‌دارند. شایان ذکر می‌باشد که هیچ‌گونه تعارض منافی در انجام این مطالعه وجود نداشته است.

محصولات بیوفیلیمی 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 *wzm* و *mrkA* *pgaA* *wbbm* 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 Carvacrol, Phloretin, Emodin و غیره)، ضدعفونی‌کننده‌ها و شوینده‌های زخم که برای ضدعفونی کردن وسایل و زخم حاصل از کاتتر به کار می‌روند، استفاده نمایند.

REFERENCES

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- dos Santos WM, Matuoka JY, Secoli SR. Cost-effectiveness of the antimicrobial treatment for inpatients infected with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase: a systematic review protocol. *JBISIRIR-2016-003332*
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- de Campos PA, Royer S, Batistão 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
- Swathi C, Chikala R, Ratnakar K, Sritharan V. A structural, epidemiological & genetic overview of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs). *Indian J Med Res*. 2016;144(1):21-31. PMID: 27834322 DOI: 10.4103/0971-5916.193279
- 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-

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](https://doi.org/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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26712734/) DOI: [10.3390/molecules21010029](https://doi.org/10.3390/molecules21010029)
 18. Tavakol M, Momtaz H. Determination of antibiotic resistance profile in *Klebsiella pneumoniae* 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 pneumoniae* in patients referred to the educational hospitals of Shahrekord in 2013. *J Shahrekord Univ Med Sci.* 2015;**17**(3):121-7. [Persian]
 20. Mohammad S, Mohammadi B, Zandi S, Ramazanzadeh R, Rouhi S. Antibiotic sensitivity 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, Saeed 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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27099694/) DOI: [10.5812/jjm.30682](https://doi.org/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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28915364/) DOI: [10.1089/mdr.2017.0073](https://doi.org/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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28731269/) DOI: [10.1111/jam.13533](https://doi.org/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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28670301/) DOI: [10.3389/fmicb.2017.01104](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01104)