Antimicrobial Susceptibility Pattern and Mutations of Outer Membrane Porin in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*

Maryam Bayramnezhad[1], Maryam Ghane[2], Elham Asadi[3]

1. M.Sc, Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran. ORCID ID: 0000-0002-6710-7086

2. Assistant professor, Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran., (Corresponding Author), Tel: +98-21-56358105, Email: ghane@iiau.ac.ir. ORCID ID: 0000-0003-0305-0241

3. Assistant professor, Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran. ORCID ID: 0000-0002-9208-4031

ABSTRACT

Background and Aim: *Klebsiella pneumoniae* is one of the most common causes of community-acquired and nosocomial infections and has acquired numerous resistance mechanisms over time. The aim of this study was to evaluate the antibiotic resistance pattern of clinical isolates of *K. pneumoniae* and investigate the mutations in Ompk35 porin as one of the most important mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics.

Materials and Methods: In this cross-sectional correlation study, 100 urinary isolates of *K. pneumoniae* from the patients admitted to Milad Hospital were evaluated. Antibiotic susceptibility testing was performed using disk diffusion method. Using PCR method, *ompK35* genes were detected, sequenced and the mutations were identified by use of Mega software (version 3.7.3). SPSS software version 20 and Chi-square test were used for data analysis.

Results: The highest resistance rate belonged to amikacin (74%) followed by levofloxacin (69%). Resistance rates to cefepime, gentamicin, ciprofloxacin, meropenem, and ceftriaxone were 62, 58, 53, 41, and 35%, respectively. The highest sensitivity rate belonged to imipenem (80%). Numerous mutations were observed in the Ompk35 porin encoding genes. Among the isolates, 70% harbored mutations in Ompk35 protein and two isolates had five mutations simultaneously. There was no significant relationship between resistance to the antibiotics and gender in our study (P>0.05).

Conclusion: Our findings indicated a high prevalence rate of antibiotic resistance and high frequency of porin mutations among *K. pneumoniae* isolates. Also, the presence of similar mutations in the isolates suggests that they may have a common origin.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Antimicrobial agents, Porin, Drug resistance

Received: Aug 19, 2021 **Accepted:** Aug 2, 2022

How to cite the article: Maryam Bayramnezhad, Maryam Ghane, Elham Asadi. Antimicrobial Susceptibility Pattern and Mutations of Outer Membrane Porin in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. SJKU 2022;27(4):13-26.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-07-08]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.13]

بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و جهش‌های پورین غشای خارجی در ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه*

مریم بایرام نژاد[۱]، مریم قانع[۲]، الهام اسدی[۳]

۱. کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران. کد ارکید: ۷۰۸۶-۶۷۱۰-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۲. استادیار، گروه زیست شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران، (نویسنده مسئول) تلفن ثابت: ۰۲۱-۵۶۳۵۸۱۰۵، پست الکترونیک: ghane@iiau.ac.ir، کد ارکید: ۰۲۴۱-۰۳۰۵-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۳. استادیار، گروه زیست شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران. کد ارکید: ۴۰۳۱-۹۲۰۸-۰۰۰۲-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: *کلبسیلا پنومونیه* یکی از شایع‌ترین علل عفونت‌های اکتسابی از جامعه و عفونت‌های بیمارستانی است و در طول زمان مکانیسم‌های مقاومتی متعددی را کسب کرده است. هدف از این مطالعه ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* و بررسی جهش در پورین Ompk35 به عنوان یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی همبستگی ۱۰۰ ایزوله ادراری *کلبسیلا پنومونیه* از بیماران بستری در بیمارستان میلاد مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن انجام شد. ژن‌های *ompK35* با روش PCR شناسایی و توالی‌یابی شدند و جهش‌ها با استفاده از نرم افزار Mega نسخه ۳.۷.۳ شناسایی شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و آزمون مجذورکای استفاده شد.

یافته‌ها: بالاترین میزان مقاومت نسبت به آمیکاسین (۷۴٪) و پس از آن لووفلوکساسین (۶۹٪) مشاهده شد. میزان مقاومت به سفپیم، جنتامیسین، سیپروفلوکساسین، مروپنم و سفتریاکسون به ترتیب ۶۲، ۵۸، ۵۳، ۴۱ و ۳۵ درصد بود. بیشترین حساسیت نسبت به ایمی‌پنم (۸۰٪) مشاهده شد. جهش‌های متعددی در ژن‌های رمز کننده پورین Ompk35 مشاهده شد. در بین ایزوله‌ها، ۷۰ درصد دارای جهش در پروتئین Ompk35 و دو ایزوله دارای پنج جهش به‌طور هم‌زمان بودند. بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه و جنسیت رابطه معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0.05$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما نشان دهنده شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی بالای جهش‌های پورین در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* است. همچنین وجود جهش‌های مشابه بین ایزوله‌ها نشان می‌دهد که ممکن است از یک منبع سرچشمه گرفته باشند.

کلمات کلیدی: *کلبسیلا پنومونیه*، عوامل ضد میکروبی، پورین، مقاومت آنتی بیوتیکی

وصول مقاله:۱۴۰۰/۵/۲۸ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۱/۴/۲۵ پذیرش:۱۴۰۱/۵/۱۷

مقدمه

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-07-08]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.13]

در طول سه دهه گذشته، ما با افزایش وقوع انتروباکتریاسه‌های مقاوم به چند دارو مواجه بوده‌ایم. این باکتری‌ها به عنوان عوامل بیماری‌زای مقاوم، به طور مداوم در حال تکامل هستند و مشکلات جدی را در انتخاب درمان مناسب آنتی‌بیوتیکی در محیط بیمارستان ایجاد کرده‌اند. *کلبسیلا پنومونیه* یکی از شایع‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی است و حدود یک سوم عفونت‌های گرم منفی مانند عفونت‌های دستگاه ادراری، سیستیت، ذات الریه، عفونت‌های زخم جراحی، اندوکاردیت و سپتی سمی را تشکیل می‌دهد (۱). در گزارشی از چین، *کلبسیلا پنومونیه* عامل ۲۶/۹ درصد عفونت‌های بیمارستانی در بخش مراقبت‌های ویژه نوزادان اعلام شد (۲). همچنین در امریکا *کلبسیلا پنومونیه* به عنوان شایع‌ترین عامل پنومونی اکتسابی بیمارستانی محسوب می‌شود و ۳ تا ۸ درصد از کل عفونت‌های باکتریایی بیمارستانی را تشکیل می‌دهد (۳). در یک مطالعه متا آنالیزکه توسط Ghashghaee و همکاران (۲۰۱۸) در ایران صورت گرفت، میزان شیوع عفونت‌های بیمارستانی ۴/۵ درصد گزارش شد و در این میان *کلبسیلا پنومونیه*، درصد بالایی (۶/۶ درصد) از عفونت‌ها (عفونت ادراری، عفونت تنفسی و عفونت خون) را به خود اختصاص داده بود (۴). همچنین در مطالعه متا آنالیز دیگر در ایران (۲۰۲۰)، *کلبسیلا پنومونیه* عامل ۱۷/۵۴ درصد سپسیس در نوزادان گزارش شد (۵).

در حال حاضر، ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاومت بالایی در برابر آنتی بیوتیک‌های وسیع‌الطیف مانند آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، فلوروکینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها نشان می‌دهد. سویه‌های مقاوم به چند داروی *کلبسیلا پنومونیه* باعث مرگ و میر بالایی در بیماران با عفونت‌های شدید می‌شود و این مقاومت باعث ایجاد نگرانی برای انتخاب آنتی‌بیوتیک مؤثر در درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* شده است (۶).

آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام به طور معمول در سرتاسر جهان تجویز می‌شوند و شامل پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، مونوباکتام‌ها و کارباپنم‌ها می‌باشند. کارباپنم‌ها از جمله بتالاکتام‌های انتخابی و مؤثر در درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مانند *کلبسیلا پنومونیه* هستند. همچنین این آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان آخرین راه حل برای مدیریت مراقبت‌های بهداشتی مرتبط با عفونت‌های تهدید کننده زندگی محسوب می‌شوند (۷). متأسفانه مقاومت باکتریایی به کارباپنم‌ها رو به افزایش است و بخصوص با تولید بتالاکتامازها، پمپ‌های افلاکس و جهش‌هایی که بیان یا عملکرد پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین (penicillin binding protein) (PBPs) و پورین ها را تغییر می دهد، این مشکل پیچیده‌تر شده است (۶). یک ویژگی قابل توجه در مورد ایزوله‌های مقاوم به چند داروی *کلبسیلا پنومونیه*، عدم وجود پروتئین‌های غشای خارجی (Outer membrane protein) (Omp) یا پورین‌ها است. *کلبسیلا پنومونیه* دو پورین تریمریک کلاسیک با نام‌های OmpK35 و OmpK36 دارد که به ترتیب همولوگ‌های OmpF و OmpC *در اشرشیا کلی* هستند (۸).

داروهای ضد میکروبی برای رسیدن به پریپلاسم، ابتدا باید از سد غشای خارجی عبور کنند و در مورد بتالاکتام‌ها که معمولاً هیدروفیل و باردار هستند، به نظر می‌رسد کانال‌های پورین راه اصلی ورود به درون سلول باشند. مطالعات نشان داده که پورین‌های *کلبسیلا پنومونیه* نقش مهمی را در ورود بتالاکتام‌ها به ویژه مولکول‌های بزرگ‌تر مانند سفالوسپورین‌های نسل سوم برعهده دارند. همچنین گزارش شده که پورین‌های Ompk35 کانالی را در *کلبسیلا پنومونیه* ایجاد می‌کند که باعث عبور سفالوسپورین‌های نسل سوم، چهارم و کارباپنم‌ها می‌شود (۹). مطالعات نشان داده که حذف ژن *ompK35* باعث افزایش دو برابری میزان حداقل غلظت مهاری (Minimum inhibitory concentration) (MIC) آمپی‌سیلین و افزایش ۴ تا ۸

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-07-08]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.13]

برابری MIC سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم و افزایش ۸ برابری MIC سفتریاکسون می‌شود (۹)؛ بنابراین از دست دادن پورین‌ها و یا ایجاد جهش در آن‌ها می‌تواند در ورود آنتی‌بیوتیک به درون باکتری تداخل ایجاد نموده و باعث مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و بخصوص آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام شود (۹)درمان عفونت‌های ادراری معمولاً در ابتدا به صورت تجربی و بر اساس گزارش‌های موجود در زمینه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی پاتوژن‌های ادراری آغاز می‌شود؛ بنابراین ارائه مداوم الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های ادراری ضروری بوده و می‌تواند علاوه بر درمان عفونت‌های ادراری، از انتشار سویه‌های مقاوم نیز جلوگیری کند. با توجه به اهمیت *کلبسیلا پنومونیه* در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری، هدف از این مطالعه تعیین حساسیت ایزوله‌های ادراری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده در درمان عفونت ادراری بود. همچنین از آنجایی که بررسی مکانیسم‌های دخیل در ایجاد مقاومت می‌تواند در ارائه راهکارهای مؤثر برای مبارزه با این باکتری‌های مقاوم مؤثر باشد، در این مطالعه بر آن شدیم که برای اولین بار در ایران، جهش‌های موجود در پورین Ompk35 به عنوان یکی از مکانیسم‌های مقاومت به بتالاکتام‌ها را نیز بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها

شناسایی باکتری ها:

در این مطالعه مقطعی همبستگی تعداد ۱۰۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* که از بهمن ۱۳۹۷ تا آبان ۱۳۹۸ از نمونه‌های ادرار بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه (Intensive Care Unit) (ICU) بیمارستان میلاد تهران جمع آوری شده بود، مورد آزمایش قرار گرفت. برای تائید نمونه‌ها به عنوان *کلبسیلا پنومونیه* از آزمون‌های میکروبیولوژی و بیوشیمیایی استاندارد مانند رنگ‌آمیزی گرم و تست‌هایی نظیر ایندول، متیل رد، وژس- پروسکوئر، سیترات، اوره و حرکت استفاده شد (۱۰). سویه های گرم منفی و غیر متحرک که آزمایش متیل رد (رنگ زرد) و ایندول (عدم وجود حلقه قرمز) در آن‌ها منفی و آزمایش سیترات (رنگ آبی)، اوره آز (رنگ صورتی) و وژس- پروسکوئر (رنگ قرمز) در آن ها مثبت بود به عنوان *کلبسیلا پنومونیه* تایید شدند (۱۰).

تست حساسیت آنتی بیوتیکی:

سنجش حساسیت میکروبی، با روش انتشار از دیسک و مطابق با توصیه‌های موسسه استاندارد روش‌های آزمایشگاهی (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI) انجام شد (۱۱). آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده شامل آمیکاسین (µg ۳۰)، جنتامیسین (µg ۳۰)، ایمیپنم (µg ۱۰)، مروپنم (µg ۱۰)، سفپیم (µg ۳۰)، سیپروفلوکساسین (µg ۵)، سفتریاکسون (µg ۳۰) و لووفلوکساسین (µg ۵) (شرکت MAST، انگلستان) بودند. آزمون آنتی بیوگرام با استفاده از سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی و مقایسه کدورت آن با نیم مک فارلند انجام شد. در ابتدا سوسپانسیون تهیه شده با استفاده از سواب استریل بر روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار (Merk، آلمان) به صورت متراکم کشت داده شد. سپس دیسک‌ها بر روی سطح محیط کشت قرار داده شد و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرما گذاری شدند. سپس قطر هاله‌های عدم رشد با خط کش میلی متری اندازه‌گیری شد و نتایج با استفاده از جداول استاندارد CLSI (۲۰۱۸) تفسیر شد. *باکتری اشرشیاکلی* سویه استاندارد ATCC 25922 به عنوان سویه کنترل در آزمایش آنتی بیوگرام استفاده شد.

تکثیر ژن *ompk35*:

برای تهیه DNA ژنومی، یک کلنی منفرد از هر یک از سویه‌های جدا شده در ۵ میلی لیتر محیط کشت لوریا برتانی براث (مرک، آلمان) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-07-08]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.13]

صورت شبانه کشت داده شد، سپس استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (فرمنتاز، لیتوانی) و بر اساس دستور کار شرکت سازنده کیت صورت گرفت. برای بررسی ژن *ompk35* واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction) (PCR) انجام شد. PCR با استفاده از پرایمرهای F-ATGATGAAGCGCAATATTCTGGCAGTG G و R-TCGGCTTTGTCGCCATTGCCGTCA انجام شد (12). واکنش PCR با استفاده از ۲ میکرولیتر بافر10X PCR، ۲ میکرولیتر محلول dNTP (mM ۰/۲)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱/۵ mM) ۰/۵ میکرولیتر از پرایمرهای مورد استفاده (۳۰ pmol/µl)، ۵ میکرولیتر DNA ژنومی (۵۰ نانو گرم)، ۵ U/µl آنزیم Taq پلیمراز (آمپلیکون، دانمارک) و آب مقطر دو بار تقطیر تا حجم ۲۵ میکرو لیتر انجام شد. PCR با یک سیکل ۶ دقیقه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای واسرشت اولیه آغاز شد و با ۳۵ سیکل تکثیری شامل ۵۰ ثانیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ ثانیه در دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی گراد و ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد ادامه پیدا کرد. در نهایت این واکنش با یک سیکل ده دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به اتمام رسید. در ادامه، محصولات PCR این جدایه‌ها در ژل آگارز (سیگما آلدریچ، آمریکا) یک درصد الکتروفورز شد و با استفاده از کیت تخلیصDNA (سیناژن، ایران)، باند مورد نظر خالص و برای توالی‌یابی به شرکت میکروژن کره ارسال شد.

آنالیز توالی‌یابی *ompk35*:

برای آنالیز توالی‌ها، ابتدا توالی ژن *ompk35* سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* HS1542 (KX528043.1) از سایت NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)گرفته شد. سپس توالی ژن‌های *ompK35* حاصل از ایزوله‌ها، با ژن *ompk35* سویه استاندارد مذکور با استفاده از نرم افزار مگا (نسخه 3.3.7) هم‌ردیف شد و از نظر جهش ژنی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت (۱۳). همچنین توالی‌های مذکور وارد نرم افزار BioEdit (نسخه 7.2) و DNASTAR (نسخه ۱۶) شد و بعد از ترجمه توالی به اسید آمینه، تغییرات اسید آمینه‌ها نیز ثبت گردید.

آنالیز آماری:

آنالیز آماری با استفاده از SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. ارتباط بین مقاومت به هریک از آنتی‌بیوتیک‌ها و جنسیت با استفاده از آزمون کای اسکوئر انجام شد. $P<0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در بین ایزوله‌های مورد مطالعه، ۴۵ (۴۵ درصد) ایزوله از مردان و ۵۵ (۵۵ درصد) ایزوله از زنان جدا شده بود و میانگین سن بیماران ۱۸±۵۱/۹ سال بود. نتایج بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مورد مطالعه نشان داد که بالاترین میزان مقاومت نسبت به آمیکاسین (۷۴ درصد) و پس از آن لووفلوکساسین (۶۹ درصد) و بیشترین میزان حساسیت نسبت به ایمی‌پنم (۸۰ درصد) وجود داشت (جدول ۱). ارتباط معنی داری بین مقاومت به هریک از آنتی بیوتیک‌ها و جنسیت مشاهده نشد ($P>0.05$)(جدول ۲).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-07-08]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.13]

جدول ۱. نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جدا شده.

آنتی بیوتیک‌ها	حساس تعداد (٪)	نیمه حساس تعداد (٪)	مقاوم تعداد (٪)
جنتامیسین	۳۳ (۳۳)	۹ (۹)	۵۸ (۵۸)
آمیکاسین	۲۲ (۲۲)	۴ (۴)	۷۴ (۷۴)
ایمی پنم	۸۰ (۸۰)	۳ (۳)	۱۷ (۱۷)
مروپنم	۵۰ (۵۰)	۹ (۹)	۴۱ (۴۱)
سفپسم	۲۸ (۲۸)	۱۰ (۱۰)	۶۲ (۶۲)
سیپروفلوکساسین	۲۶ (۲۶)	۲۱ (۲۱)	۵۳ (۵۳)
سفتریاکسون	۵۵ (۵۵)	۱۰ (۱۰)	۳۵ (۳۵)
لووفلوکساسین	۲۸ (۲۸)	۳ (۳)	۶۹ (۶۹)

جدول ۲. ارتباط بین مقاومت به هریک از آنتی بیوتیک‌ها و جنسیت. مقدار *P* کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

آنتی بیوتیک ها	جنسیت	مقاومت، تعداد (درصد)	مقدار *P*
جنتامیسین	مرد	۲۳ (۳۹/۶۵)	۰/۱۴۵
	زن	۳۵ (۶۰/۳۵)	
آمیکاسین	مرد	۳۲ (۴۳/۲۴)	۰/۸۴
	زن	۴۲ (۵۶/۷۶)	
ایمی پنم	مرد	۷ (۴۱/۱۷)	۰/۱۲۰
	زن	۱۰ (۵۸/۸۳)	
مروپنم	مرد	۱۸ (۴۳/۹)	۰/۱۶۴
	زن	۲۳ (۵۶/۱)	
سفپسم	مرد	۲۷ (۴۳/۵۴)	۰/۱۱۸
	زن	۳۵ (۵۶/۴۶)	
سیپروفلوکساسین	مرد	۲۳ (۴۳/۳۹)	۰/۱۱۵
	زن	۳۰ (۵۶/۶۱)	
سفتریاکسون	مرد	۱۵ (۴۲/۸۵)	۰/۲۰۱
	زن	۲۰ (۵۷/۱۵)	
لووفلوکساسین	مرد	۳۹ (۵۶/۵۲)	۰/۲۹۵
	زن	۳۰ (۴۳/۴۸)	

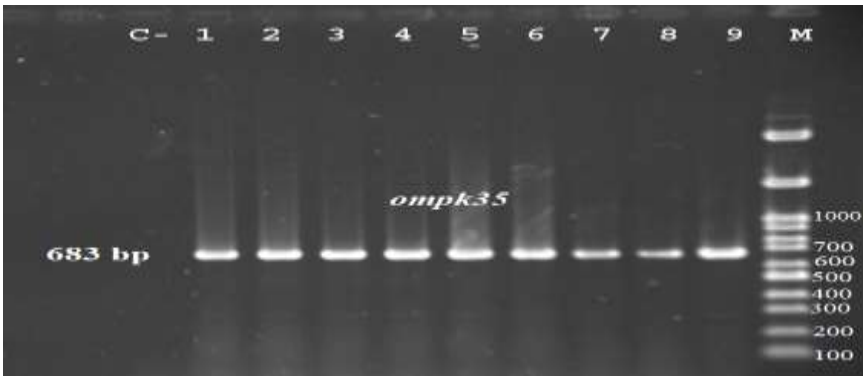
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-07-08]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.13]

نتایج تکثیر ژن *ompK35*:

ژن *ompK35* مربوط به ۱۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* که به بتالاکتام‌ها (حداقل به یک کارباپنم و یک سفالوسپورین) مقاوم بودند با استفاده از روش PCR تکثیر یافت و نتایج الکتروفورز حاکی از تکثیر درست و دقیق ژن مذکور بود.

ژن مذکور در تمام ایزوله‌های مورد آزمایش مشاهده شد و در بین ایزوله‌ها از نظر طول توالی نوکلئوتیدی تفاوتی دیده نشد و اندازه ژن *ompK35* در تمام ایزوله‌ها ۶۸۳ جفت باز بود (شکل ۱).

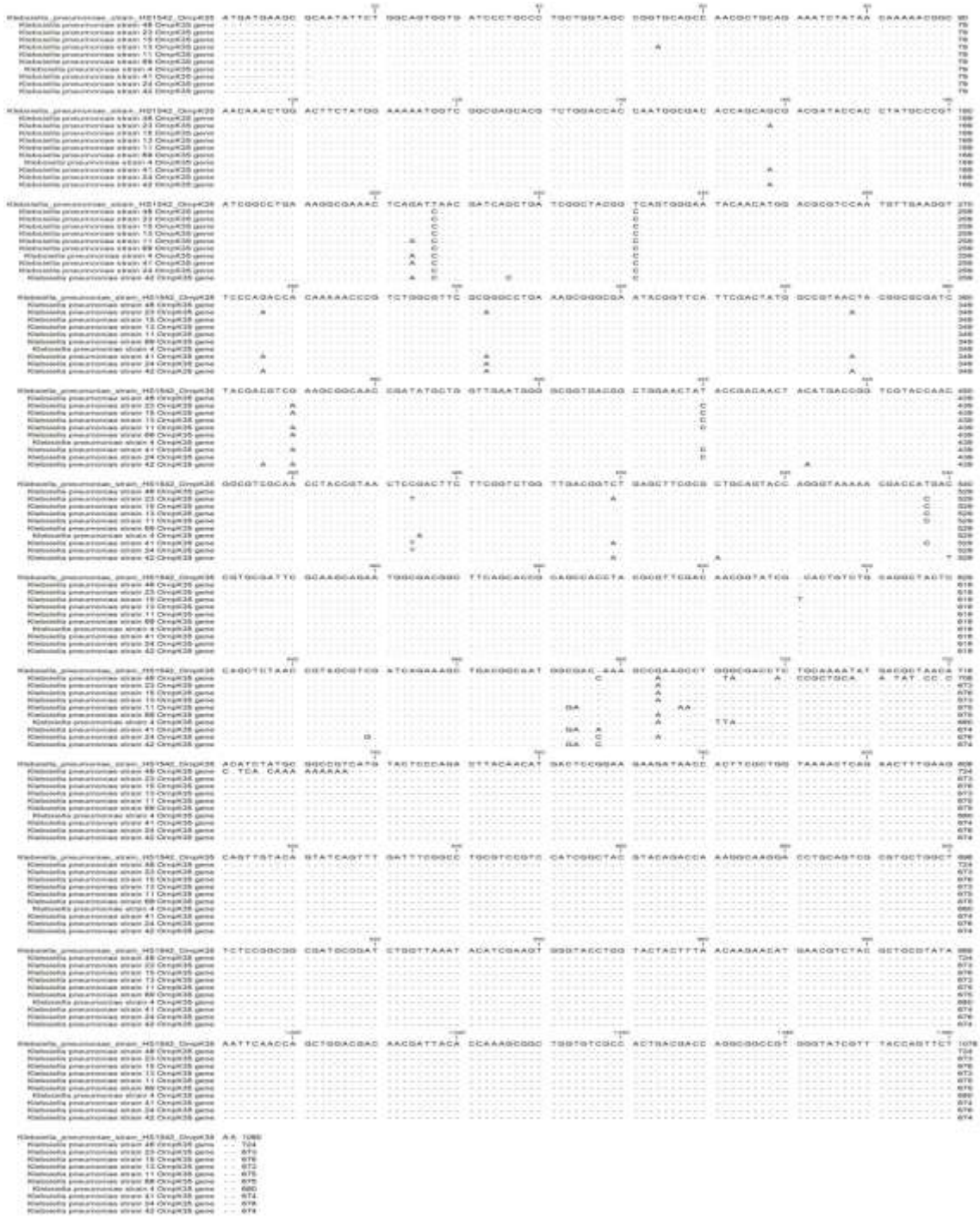


شکل ۱. نتایج الکتروفورز محصول PCR ژن *ompK35* . چاهک -C: کنترل منفی، چاهک ۱ تا ۸ محصول PCR متعلق به ژن *ompK35*، چاهک ۹: کنترل مثبت (*کلبسیلا پنومونیه* سویهATCC13883)، چاهک M: لدر ۱۰۰ جفت بازی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-07-08]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.13]

شکل ۲. توالی نوکلئوتیدی هم ردیف شده ژن *ompK35* مربوط به ده ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* با سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* HS1542 (KX528043.1).



توالی‌یابی ژن *ompk35*:

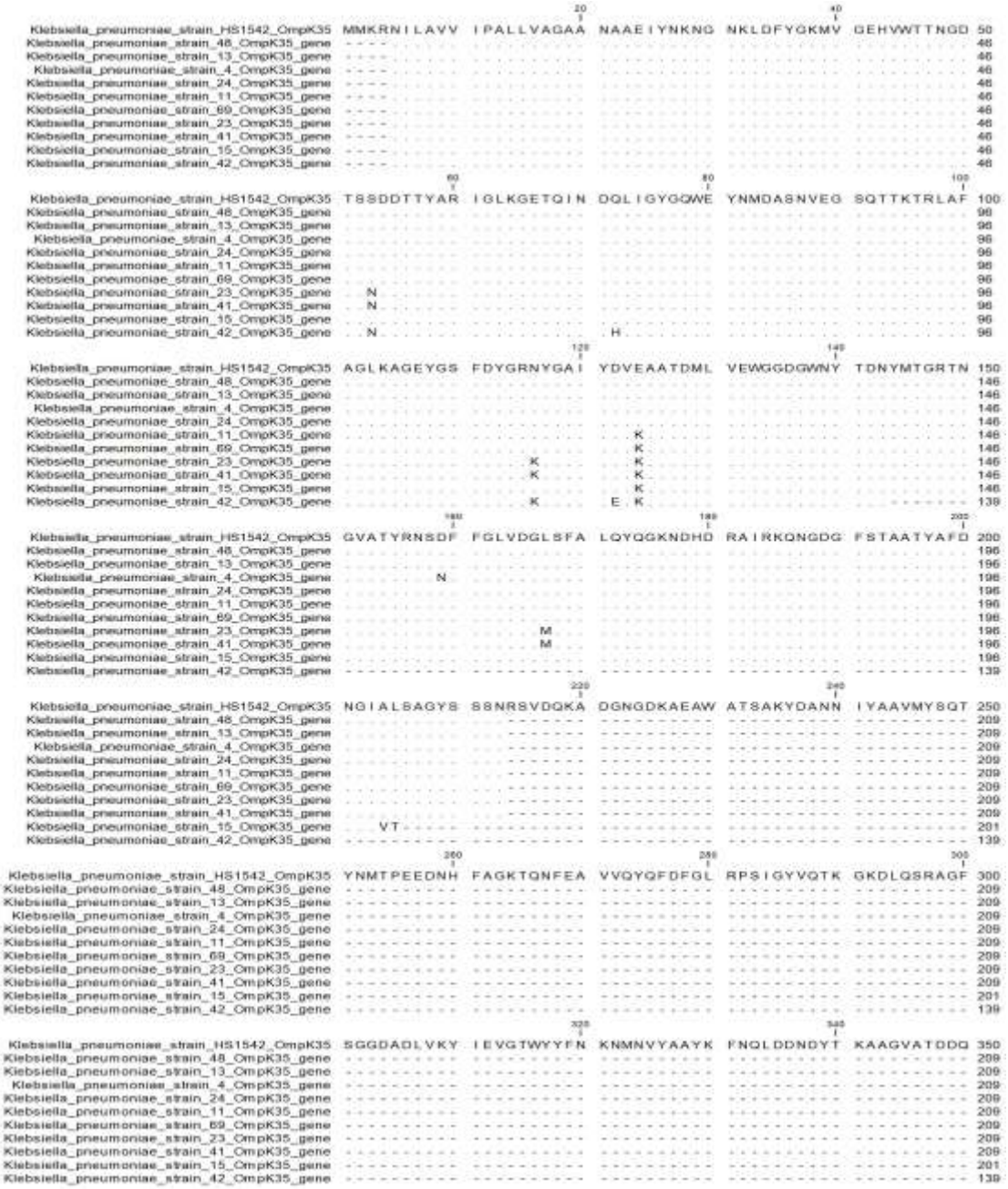
در مجموع ژن *ompK35* مربوط به ۱۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* توالی‌یابی شد. توالی‌های به دست آمده از ژن *ompK35* به همراه ژن سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* HS1542 (KX528043.1) وارد نرم افزار مگا (نسخه 3.7.3) شد و از نظر جهش نسبت به سویه استاندارد مورد مقایسه و آنالیز قرار گرفت. نتایج نشان داد که همه ایزوله‌های مورد مطالعه، دارای جهش‌های نقطه‌ای در ژن

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-07-08]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.13]

*ompk35*بودند (شکل ۲). همچنین تغییرات ایجاد شده در حد پروتئین نیز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). بیشترین تغییر اسید آمینه در ایزوله‌های شماره ۴۱ و ۴۲ (هریک ۵ جهش) و پس از آن ایزوله شماره ۲۳ (۴ جهش) مشاهده شد. همچنین در بین ایزوله‌های مورد مطالعه، فراوان‌ترین جهش مربوط به اسید آمینه ۱۲۴ بود. این جهش که منجر به تغییر اسید آمینه آلانین به والین شده بود در ۶۰ درصد ایزوله‌ها مشاهده شد. در میان ایزوله‌ها، ۳ ایزوله (شماره ۱۳، ۲۴ و ۴۸) هیچ تغییری در اسید آمینه نداشتند. (جدول ۳).

شکل ۳. توالی اسید آمینه ژن *ompK35* مربوط به ده ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* و سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* HS1542 (KX528043.1).



[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-07-08]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.13]

جدول ۳. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تغییرات آمینواسیدی Ompk35 در ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه*. R، مقاوم؛ I، نیمه حساس و S، حساس.

سویه‌ها	الگوی مقاومت به بتالاکتام‌ها				جهش‌های Ompk35
	ایمی پنم	مروپنم	سفپیم	سفتریاکسون	
Kp4	S	R	R	S	159 D → N
Kp11	R	R	R	S	124 E → K
Kp13	R	R	S	R	–
Kp15	R	S	R	S	124 E → K 204 A → V 205 L → T
Kp23	R	R	R	S	53 S → N 116 N→ K 124 E→ K 167 L→ M
Kp24	R	S	R	R	-
Kp41	R	R	R	R	53 S→ N 116 N→ K 124 E→ K 220 E→ K 167 L→ M
Kp42	R	R	R	R	49 S→ N 68 Q→ H 116 N→ K 122 D → E 124 E → K
Kp48	S	R	R	R	-
Kp69	R	R	R	S	124 E → K

بحث

کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد عفونت بیمارستانی مطرح است و مقاومت بالایی در برابر بتالاکتام‌های با طیف گسترده، فلوروکینولون‌ها، آمینوگلیکوزیدها و حتی آخرین راه حل «کارباپنم‌ها» نشان می‌دهد؛ که این مسئله در حال حاضر به یک نگرانی فزاینده در سراسر جهان تبدیل شده است (۱۴). آگاهی از الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی مکانیسم‌های دخیل در ایجاد مقاومت می‌تواند به مدیریت صحیح جهت کنترل عفونت کمک کند.

نتایج نشان داد که سویه‌های جدا شده مقاومت بالایی به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش دارند. متأسفانه میزان مقاومت به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در طی سال‌های اخیر روند افزایشی داشته است. به عنوان مثال در این مطالعه ۷۴ درصد ایزوله‌ها به آمیکاسین مقاوم بودند در حالی که در مطالعات انجام شده در سال ۲۰۱۴، ۲۶ درصد (۱۵)؛ در سال ۲۰۱۶، ۳۵ درصد (۱۶) و در سال‌های ۲۰۱۹ و ۲۰۲۰، ۷۰ درصد (۱۷, ۱۸) ایزوله‌ها به آمیکاسین مقاوم بودند. همچنین میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در این مطالعه ۵۳ درصد بود که نسبت به مطالعات گذشته در سال‌های اخیر روند افزایشی داشته است. به طوری که در سال ۲۰۱۶، ۳۳ درصد (۱۶)؛ در سال ۲۰۱۹، ۴۷ درصد (۱۹) و در سال ۲۰۲۰، ۴۹ درصد (۲۰) ایزوله‌ها به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. سفالوسپورین‌ها از جمله داروهای مؤثر برای درمان عفونت‌های ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* معرفی شده‌اند؛ با این وجود در ایزوله‌های مورد مطالعه مقاومت بالایی به سفالوسپورین‌ها مشاهده شد. در مطالعه حاضر ۶۲ درصد ایزوله‌ها نسبت به سفپیم مقاومت

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-07-08]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.13]

نشان دادند؛ در حالی که در سال ۲۰۱۴، ۸ درصد (۱۵) و در سال ۲۰۱۹، ۵۷ درصد ایزوله‌ها به این آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند (۲۱). این روند افزایشی بسیار نگران کننده بوده و از دلایل آن می توان به مصرف بی رویه و بدون نظارت آنتی بیوتیک ها و نیز کسب مکانیسم‌های متعدد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری *کلبسیلا پنومونیه* اشاره نمود (۲۲). میزان مقاومت به ایمیپنم و مروپنم در بین ایزوله‌های مورد مطالعه به ترتیب ۱۷ و ۴۱ درصد بود. شکری و ربانی (۲۰۱۶) با مطالعه بر روی نمونه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه*، میزان مقاومت به ایمیپنم، مروپنم، ارتاپنم و دوری‌پنم را به ترتیب ۵۸، ۶۴، ۶۹ و ۶۴ درصد گزارش نمودند (۲۳). در مطالعه‌ای که بر روی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بخش ICU در سال ۲۰۱۷ انجام گرفت، میزان مقاومت به ایمی‌پنم ۳۸ درصد گزارش شد (۲۴). همچنین در مطالعه فرج‌زاده و همکاران در اهواز (۲۰۱۵)، ۲۶ درصد ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به ایمی‌پنم مقاوم بودند (۲۵). این درحالی است که در مطالعه گله‌دار و همکاران در سال ۲۰۲۱، ۱۱ و ۳۴ درصد ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به ترتیب به ایمی‌پنم و مروپنم مقاوم بودند (۲۶). همان‌گونه که ملاحظه می‌شود میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در مطالعات مختلف متفاوت است که از دلایل آن می‌توان به شرایط جغرافیایی، شیوه زندگی و نحوه تجویز آنتی‌بیوتیک در هر منطقه یا بیمارستان اشاره کرد (۱۵). در کل با توجه به بالا بودن میزان مقاومت در این مطالعه و از طرفی به دلیل گسترش سریع سویه‌های مقاوم در بیمارستان‌ها، ارائه راهکارهای جدید مانند استفاده هم‌زمان از چندین آنتی‌بیوتیک برای کنترل ایزوله‌های مقاوم به کارباپنم‌ها لازم و ضروری می‌باشد.عوامل زیادی در ایجاد مقاومت به کارباپنم‌ها در *کلبسیلا پنومونیه* نقش دارد. Doumith و همکاران (۲۰۰۹)، در طی مطالعه‌ای به اهمیت پورین‌ها در ایجاد مقاومت به کارباپنم‌ها پرداختند و ایجاد جهش در ژن‌های *ompK35* و *ompK36* را یکی از دلایل ایجاد مقاومت در *کلبسیلا پنومونیه* دانستند (۲۷). همچنین الحاق توالی خارجی که باعث از کار افتادن عملکرد پورین می‌شود نیز در ایجاد مقاومت نقش دارد. Albertí و همکاران (۲۰۰۳) نیز نشان دادند که نبود پورین یا جهش در هر دو پورین OmpK35 و OmpK36 منجر به کاهش میزان MIC آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین‌ها، کلرامفنیکل، کارباپنم‌ها و سیپروفلوکساسین می‌شود (۲۸). در مطالعه حاضر جهش‌های ژنی در پورین OmpK35 مربوط به ایزوله‌های مقاوم آنتی بیوتیک *کلبسیلا پنومونیه* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که ۷۰ درصد ایزوله‌ها در ژن مربوطه دارای جهش‌های نقطه‌ای بودند. می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً یکی از دلایل مقاومت سویه‌های مورد مطالعه به بتالاکتام‌ها، حضور این جهش‌ها است. در مطالعه Shakib و همکاران در ایران میزان بیان پورین‌ها بررسی شد و نتایج نشان داد که سویه‌های ESBL مثبت نسبت به سویه‌های ESBL منفی، پورین‌های OmpK35 و OmpK36 را به میزان کمتری بیان می‌کنند (۲۹). در حقیقت بیان کمتر این پورین‌ها می‌تواند در ورود آنتی‌بیوتیک‌ها به داخل باکتری تداخل ایجاد کند و از تجمع آن در درون باکتری ممانعت کند. در مطالعه انجام شده توسط Yu و همکاران در چین ایزوله‌های مقاوم و حساس به کارباپنم *کلبسیلا پنومونیه* از لحاظ توالی ژن *ompK35* هیچ‌گونه تفاوتی با هم و با سویه استاندارد نداشتند (۱۲). در بین سویه‌های مقاوم مورد مطالعه ما نیز، ۳ سویه فاقد جهش بودند و توالی اسید آمینه آن‌ها کاملاً مشابه سویه استاندارد بود. احتمالاً در این ایزوله‌ها سایر مکانیسم‌ها در ایجاد مقاومت به بتالاکتام نقش دارند. در مطالعه انجام شده توسط Wise و همکاران در امریکا که بر روی پورین‌های *ompK35* و *ompK36* *کلبسیلا پنومونیه* انجام شده بود، نتایج توالی‌یابی نشان داد که ۷۷/۴ درصد ایزوله‌ها دارای جهش‌هایی در ژن *ompK35* بودند که ۲۰/۳ درصد جهش‌ها مربوط به توالی‌های الحاقی بود (۱۳). همچنین توالی‌یابی ژن *ompK35* در مطالعات Doumith و همکاران نیز نشان دهنده انواع جهش‌ها شامل جهش‌های نقطه‌ای و توالی‌های الحاقی بود (۲۷). بر خلاف مطالعات

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-07-08]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.13]

ذکر شده، در مطالعه حاضر، توالی‌یابی ژن *ompK35* حضور توالی‌های الحاقی را ثابت نکرد و جهش‌های موجود، همه از نوع جهش‌های نقطه‌ای بودند که منجر به تغییر اسید آمینه‌ها شده بودند. بیشترین فراوانی مربوط به جهش در اسید آمینه ۱۲۴ بودند که منجر به تغییر اسید آمینه آلانین به والین شده بود. با توجه به اینکه این جهش در ۶ ایزوله مقاوم به صورت همزمان رخ داده بود، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً این جهش نقش مهمی در ایجاد مقاومت به بتالاکتام‌ها دارد. اگرچه مطالعات بیشتری در این زمینه باید انجام پذیرد. به علاوه وجود جهش‌های مشابه بین ایزوله‌ها نشان می‌دهد که ممکن است این ایزوله‌ها از یک منبع مشترک سرچشمه گرفته باشند.

مطالعه حاضر محدودیت‌هایی داشت. اول اینکه مطالعه حاضر به یک بیمارستان محدود بود. با مطالعه گسترده‌تر بر روی تعداد بیشتری بیمارستان می‌توان اطلاعات دقیق‌تری از مقاومت آنتی‌بیوتیکی به دست آورد. دوم اینکه در این مطالعه صرفاً جهش‌های موجود در پورین Ompk35 به عنوان یکی از عوامل مؤثر در ایجاد مقاومت به بتالاکتام ها بررسی شده در حالی که برای مطالعه دقیق‌تر بهتر است سایر مکانیسم‌های مقاومت به بتالاکتام‌ها نیز بررسی گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های مورد مطالعه بود. این ایزوله‌ها به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی مقاومت بالایی داشتندکه نشان می‌دهد این آنتی‌بیوتیک‌ها به تدریج اثر پذیری خود را از دست داده‌اند. همچنین مقاومت نسبتاً بالا به کارباپنم‌ها به عنوان خط آخر درمان می‌تواند به عنوان یک هشدار جدی در مسئله سلامت و بهداشت جامعه تلقی گردد؛ بنابراین مدیریت دقیق در تجویز دارو و به کارگیری استراتژی‌های جدید درمانی برای کاهش بروز مقاومت ضروری است. بررسی توالی پورین OmpK35 نشان داد که جهش در این پورین در اغلب ایزوله‌های مقاوم وجود دارد و این مکانیسم می‌تواند به عنوان یکی از دلایل عدم پاسخ به سفالوسپورین‌ها و کارباپنم‌ها در بین ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* مورد مطالعه قلمداد شود. البته لازم است در مطالعات بعدی سایر مکانیسم‌های مقاومت به بتالاکتام‌ها نظیر بتالاکتامازها و پمپ‌های افلاکس نیز مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت دانشگاه آزاد واحد اسلامشهر قدردانی می‌کنند. همچنین این مطالعه با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1399.195 در کمیته اخلاق دانشکده داروسازی و علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی مصوب گردیده است. هیچ‌کدام از نویسندگان این مطالعه، تعارض منافعی برای انتشار این مقاله ندارند.

منابع

1.Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev. 2017;41(3):252-75.
2.Luo K, Tang J, Qu Y, Yang X, Zhang L, Chen Z, et al. Nosocomial infection by *Klebsiella pneumoniae* among neonates: a molecular epidemiological study. J Hosp Infect. 2021;108:174-80.
3.Aghamohammad S, Badmasti F, Solgi H, Aminzadeh Z, Khodabandelo Z, Shahcheraghi F. First report of extended-spectrum betalactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* among fecal carriage in Iran: high diversity of clonal relatedness and virulence factor profiles. Microb Drug Resist. 2020;26(3):261-9.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-07-08]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.13]

4.Ghashghaee A, Behzadifar M, Azari S, Farhadi Z, Bragazzi NL, Behzadifar M, et al. Prevalence of nosocomial infections in Iran: A systematic review and meta-analysis. Med J Islam Repub Iran. 2018;32:48.
5.Akbarian-Rad Z, Riahi SM, Abdollahi A, Sabbagh P, Ebrahimpour S, Javanian M, et al. Neonatal sepsis in Iran: A systematic review and meta-analysis on national prevalence and causative pathogens. PLoS One. 2020;15(1):e0227570.
6.Ferreira RL, da Silva B, Rezende GS, Nakamura-Silva R, Pitondo-Silva A, Campanini EB, et al. High prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β-lactamase encoding genes in a Brazilian intensive care unit. Front Microbiol. 2019;9:3198.
7.Amjad A, Mirza IA, Abbasi S, Farwa U, Malik N, Zia F. Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production .Iran J Microbiol. 2011;3(4):189.
8.Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Rev. 2015;28(2):337-418.
9.Sugawara E, Kojima S, Nikaido H. *Klebsiella pneumoniae* major porins OmpK35 and OmpK36 allow more efficient diffusion of β-lactams than their *Escherichia coli* homologs OmpF and OmpC. J Bacteriol. 2016;198(23):3200-8.
10.Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology-e-book: Elsevier Health Sciences; 2018: 412-47..
11.Clinical and laboratory standards institute (CLSI). M100, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28nd ed. Wayne: Clinical and laboratory standards institute; 2018:30-37.
12.Yu F, Ying Q, Chen C, Li T, Ding B, Liu Y, et al. Outbreak of pulmonary infection caused by *Klebsiella pneumoniae* isolates harbouring blaIMP-4 and blaDHA-1 in a neonatal intensive care unit in China. J Med Microbiol. 2012;61(7):984-9.
13.Wise MG, Horvath E, Young K, Sahm DF, Kazmierczak KM. Global survey of *Klebsiella pneumoniae* major porins from ertapenem non-susceptible isolates lacking carbapenemases. J Med Microbiol. 2018;67(3):289-95.
14.Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. Perspect Medicin Chem. 2014;6:PMC. S14459.
15.Tavakol M, Momtaz H. Determination of antibiotic resistance profile in *Klebsiella pneumonia* strains isolated from urinary tract infections of patients hospitalized in Peyambaran hospital (Tehran-Iran). KAUMS Journal (FEYZ). 2017;21(1):74-82.
16.PouraliSheshblouki 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. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 2016;6(1):52-9.
17.Abolsedgh R, Ghane M ,Babaeekhou L. High Frequency of qnr Genes in Urinary Isolates of Extended-Spectrum β-Lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* in Tehran, Iran. Shiraz E-Medical Journal. 2019;21:e92032.
18.Ahmadian Alashti F, Ghane M. High Frequency of 16S Ribosomal RNA Methyltransferases among *Klebsiella pneumoniae* Isolates: First Report of rmtA, rmtD, rmtE and rmtF Resistance Genes in Iran. Infection Epidemiology and Microbiology. 2020;6(3):153-63.
19.Ghane M, Babaeekhou L, Jafar Shanjani M. AmpC β lactamases in urinary *Klebsiella pneumoniae* isolates: First report of ACC type AmpC β-lactamase resistance in Iran. Journal of Advances in Medical and Biomedical Research. 2019;27(123):23-30.
20.Dehnamaki M, Ghane M, Babaeekhou L. Detection of OqxAB and QepA Efflux Pumps and Their Association with Antibiotic Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Urinary Tract Infection. International Journal of Infection. 2020;7(4): e107397.
21.Ahmadkhan Beygi L, Ghane M, Babaeekhou L. High Prevalence of CTXM-15 Type Extended-Spectrum Beta-Lactamase Among Clinical Isolates of *Klebsiella Pneumoniae*. Journal of Kerman University of Medical Sciences.26(5):339-48.
22.Amiri M, Ghane M, BabaeeKhou L. Molecular typing and investigating the presence of efflux genes in urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Studies in Medical Sciences. 2019;30(1):8-20.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-07-08]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.13]

23.Shokri D. Evaluation of carbapenems resistance and frequency of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) enzyme in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from clinical samples and determination of their acquired resistant profiles. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2016;24(3):18-30.
24.Soroush Z, Ghane M. Molecular identification of CTX-M, TEM and SHV Î²-lactamases in â *Klebsiella pneumoniae* isolated from respiratory system of patients in the ICU of educational hospitals in Tehran. Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences. 2017;21(3):232-9.
25.Faraj Zadeh Sheikh A, Momeni SZ, Aslani Hoseinabad S, Jomezadeh N. Prevalence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Patients Admitted to Taleghani Hospital of Abadan During 2014-2015. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2015;14(2):209-21.
26.Galehdar M, Ghane M, Babaeekhou L. Co-occurrence of Carbapenemase-encoding Genes Among *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates: Positive Relationship of bla NDM and bla SIM with Imipenem Resistance. Jundishapur J Microbiol. 2021;14(2): e112486.
27.Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. J Antimicrob Chemother. 2009;63(4):659-67.
28.Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, del Carmen Conejo M, Pascual Á, Tomás JM, et al. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemothe. 2003;47(10):3332-5.
29.Shakib P, Ghafourian S, Zolfaghary MR, Hushmandfar R, Ranjbar R, Sadeghifard N. Prevalence of OmpK35 and OmpK36 porin expression in beta-lactamase and non-betalactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Biol Targets Ther. 2012;6:1.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-07-08]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.13]