Informatics in Biology, Health, and Food

Interdisciplinary Explorations in Life Science

Volume 2. Number 1. Jun. 2025 DOI: 10.22034/ibhf.2025.523799.1029

Original Article

Rapid Identification of *Klebsiella pneumonia* Resistant to Nalidixic Acid in Urinary Specimens by Multiplex PCR

Safieh Abasieh[1], Mahboobeh Nakhaei Moghaddam[*1].

[1] Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Received: 2025/05/15 **Accepted:** 2025/06/16 **Online Published:** 2025/06/16

Abstract

Klebsiella pneumoniae is a major human pathogen and a significant cause of nosocomial infections. Multiplex PCR proved to be a precise, rapid, and cost-effective method for detecting the presence of the causative pathogen in a significantly shorter time frame compared to conventional culture methods. The detection and identification of pathogens using molecular methods facilitate rapid and accurate diagnosis. The aim of the present study was to rapidly and directly identify *nalidixic acid*-resistant *Klebsiella pneumoniae* in urine samples using the multiplex polymerase chain reaction (PCR) method, in comparison with conventional culture techniques. A total of 230 urine samples were randomly collected from Ghaem Hospital in Mashhad. To detect the presence of *Klebsiella pneumoniae* and genes associated with nalidixic acid resistance, bacterial DNA was directly extracted from the urine sediment. The extracted DNA was analyzed for the presence of the *16S rRNA* gene and resistance-related genes, namely *qnrA, qnrB, qnrS*, and *aac(6')-Ib-cr,* using the multiplex PCR method. For validation and comparison, phenotypic testing was also performed, including urine culture and antibiotic susceptibility testing using the disk diffusion method. Among the 230 urine samples, *Klebsiella pneumoniae* was identified in 17.39% of cases using direct multiplex PCR. The three genes *Kp/16S rRNA, qnrB,* and *qnrS* were simultaneously present in 50% of the urinary samples analyzed. Resistance to nalidixic acid was observed in 42.5% of the isolates, while resistance to norfloxacin, ciprofloxacin, and ofloxacin was found in 40% of the isolates. Multiplex polymerase chain reaction has high sensitivity and accuracy due to the use of multiple primer pairs simultaneously. On the other hand, the application of this technique directly on clinical samples will help in the rapid identification of infectious agent isolates and antibiotic-resistant strains.

Keywords: Multiplex polymerase chain reaction, quinolones, *Klebsiella pneumoniae*, *aac(6')-Ib-cr*.

Cite this article: Abasieh S, Nakhaei Moghaddam M. Rapid identification of *Klebsiella pneumonia* resistant to nalidixic acid in urinary specimens by multiplex PCR. *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2025;2(1):68-77.
Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education
Corresponding author: Mahboobeh Nakhaei Moghaddam **Email**: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

انفورماتیک در زیست‌شناسی، بهداشت و غذا
کاوش‌های بین رشته‌ای در علوم زیستی

دوره ۲. شماره ۱. خرداد ۱۴۰۴ DOI: 10.22034/ibhf.2025.523799.1029

مقاله پژوهشی

شناسایی سریع *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به نالیدیکسیک اسید در نمونه‌های ادراری با روش واکنش زنجیره پلی‌مراز چندگانه

صفیه عباسیه [۱]، محبوبه نخعی مقدم*[۱]

[۱] گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

دریافت: ۱۴۰۴/۲/۲۵ **پذیرش:** ۱۴۰۴/۳/۲۶ **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۴/۳/۲۶

چکیده

کلبسیلا پنومونیه از مهم‌ترین پاتوژن‌های انسانی و عامل مهم عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. ردیابی و شناسایی بیماری‌زاها با روش‌های مولکولی، به سرعت و دقت در تشخیص عفونت کمک می‌کند. واکنش زنجیره پلی‌مراز چندگانه، روشی دقیق، سریع و در عین حال کم هزینه می‌باشد که می‌تواند حضور باکتری عامل عفونت را در مدت زمان کم و با دقت بالا تشخیص دهد. هدف از مطالعه حاضر، شناسایی سریع و مستقیم *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به نالیدیکسیک اسید در نمونه‌های ادراری با روش واکنش زنجیره پلی‌مراز چندگانه، در مقایسه با روش کشت می‌باشد. ابتدا، ۲۳۰ نمونه ادراری به صورت تصادفی از بیمارستان قائم مشهد جمع‌آوری شد. برای ردیابی حضور *کلبسیلا پنومونیه* و ژن مقاوم به نالیدیکسیک اسید، DNA باکتری به طور مستقیم از رسوب ادراری استخراج شد. نمونه‌های استخراج شده، جهت حضور ژن‌های ۱۶S rRNA اختصاصی باکتری مربوطه و ژن‌های مربوط به مقاومت نالیدیکسیک اسید، یعنی *qnrA*، *qnrB*، *qnrS* و *aac(6')Ib-cr* با روش واکنش زنجیره پلی‌مراز چندگانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. در نهایت، جهت مقایسه و بررسی نتایج مولکولی، روش فنوتیپی، شامل کشت نمونه‌های ادرار و بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با انتشار از دیسک انجام شد. از بین ۲۳۰ نمونه ادراری جمع آوری شده، ۱۷/۳۹ درصد از نمونه‌ها با روش واکنش زنجیره پلی‌مراز چندگانه مستقیم، به عنوان *کلبسیلا پنومونیه* شناسایی شدند. سه ژن *Kp/16S rRNA*، *qnrB* و *qnrS* در ۵۰ درصد از نمونه‌های ادراری مورد بررسی به‌صورت هم‌زمان حضور داشتند. مقاومت ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید، ۴۲/۵ درصد و برای نوروفلوکساسین، سیپروفلوکساسین و افلوکساسین ۴۰ درصد بود. واکنش زنجیره پلی‌مراز چندگانه، به علت استفاده از چند جفت پرایمر به طور هم زمان از حساسیت و دقت بالایی برخوردار می‌باشد. از طرف دیگر به کارگیری این تکنیک، به طور مستقیم روی نمونه‌های بالینی، در شناسایی سریع ایزوله‌های عامل عفونت و سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، کمک کننده خواهد بود.

کلمات کلیدی: واکنش زنجیره پلی‌مراز چندگانه ، کینولون، *کلبسیلا پنومونیه*، آنتی بیوگرام.

Cite this article: Abasieh S, Nakhaei Moghaddam M. Rapid identification of *Klebsiella pneumonia* resistant to nalidixic acid in urinary specimens by multiplex PCR. *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2025;2(1):68-77.
Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education
Corresponding author: Mahboobeh Nakhaei Moghaddam **Email**: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه[1] باکتری گرم منفی است که سبب ایجاد بیماری‌هایی، غالباً با منشاء بیمارستانی از جمله پنومونی، عفونت ادراری، عفونت خونی و عفونت زخم می‌شود (۱). عفونت بیمارستانی به عفونتی گفته می‌شود که بیمار در هنگام بستری شدن به آن مبتلا نمی باشد، در دوره کمون آن هم نبوده باشد و پس از پذیرش بیمار در بیمارستان یا در طی زمان مشخص، بعد از ترخیص بیمار اتفاق می‌افتد (۲،۳). *کلبسیلا پنومونیه* میکروارگانیسمی است ساپروفیت که در نازوفارنکس و مجرای گوارشی انسان یافت می‌شود. میزان آن در نمونه مدفوع ۵/۳۸ درصد و در نازوفارنکس ۱/۶ درصد است. به طور کلی، زمانی که باکتری *کلبسیلا* در روده وجود دارد، تداخل همسفرگی خواهد داشت. از این‌رو ساکن شدن آن‌ها در این محل، منبعی برای آلودگی و تولید بیماری در سایر نقاط از جمله ریه‌ها و مجاری ادراری به حساب می‌آید (۴).

حضور بیش از 10^5 میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر ادرار، همراه با حداکثر دو گونه باکتریایی، نشانه عفونت مجاری ادراری توسط باکتری محسوب می‌شود (۵). در حال حاضر، مقاومت آنتی‌بیوتیکی یک چالش مهم در پیشگیری، درمان و کنترل بیماری‌های عفونی محسوب می‌شود. مهم‌ترین، علت مقاومت آنتی‌بیوتیکی را می‌توان استفاده بیش از اندازه آنتی‌بیوتیک‌ها توسط انسان و همچنین استفاده بیش از اندازه آنها در چرخه تولید مواد غذایی در نظر گرفت (۶). مقاومت آنتی‌بیوتیکی به طور معمول از طریق جهش و یا کسب ژن‌های مقاومت از باکتری‌های دیگر، ایجاد می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌های خانواده کینولون یکی از رایج‌ترین گزینه‌ها در درمان عفونت ادراری هستند. این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها در برابر طیف وسیعی از باکتری‌ها اثرگذار هستند و مانع تولید و سنتز DNA، توسط مهار آنزیم جیراز می‌شوند (۶،۷). ژن‌های *qnr* جزء عوامل مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید[2] (PMQR) هستند که به دلیل قرار گرفتن بر روی اینتگرون‌های مختلف، باعث گسترش بسیار سریع مقاومت در باکتری‌های خانواده *انتروباکتریاسه* خواهد شد (۸). *qnr* نیز انواع متعددی دارد که از بین آن‌ها ژن *qnrA* از مهم‌ترین آن‌ها است که یک پروتئین ۲۱۸ اسید آمینه‌ای متعلق به خانواده‌ی پنتاپپتیدی را کد می‌کند و از طریق ممانعت از اتصال کینولون به DNA جیراز و توپوایزومراز IV باعث حفاظت از DNA باکتری می‌شود (۹). نوروفلوکساسین از اولین داروهای کینولون با طیف اثر گسترده می‌باشد که عملکرد بیشتری را دارا است، اما به خاطر سطح سرمی بالا و نفوذ به درون بافت ها، از این دارو برای درمان عفونت‌های مجاری ادراری بیماری منتقله از راه جنسی استفاده می‌گردد. سیپروفلوکساسین به عنوان یکی از داروهای مؤثر در درمان عفونت‌های متنوع ناشی از باکتری‌های گرم منفی و به میزان کمتردر باکتری‌های گرم مثبت قابل استفاده می‌باشد. موفقیت‌آمیز بودن عملکرد این دارو در درمان بیماران باعث پدید آمدن مجموعه‌ای از کینولون‌های نسل جدید شد که اثر بخشی مناسبی را به خصوص علیه گونه‌های مختلف باکتری‌های گرم مثبت دارند. لووفلوکساسین، موکسی‌فلوکساسین و آسپاروفلوکساسین برای درمان عفونت‌های تنفسی ناشی از باکتری‌های گرم مثبت، مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۰،۱۱). شناسایی و بررسی مولکولی *کلبسیلا پنومونیه* در بخش‌های مختلف بیمارستانی در بیماران مختلف با استفاده از تکنیک‌های مولکولی و تعیین رابطه این گونه با بیماری‌های ایجاد شده می‌تواند کمک زیادی در پیشگیری و درمان بیماری‌های عفونی ایجاد شده بنمایند و به لحاظ جلوگیری در شیوع گسترده بیماری دارای اهمیت می‌باشد (۱۲). روش واکنش زنجیره پلی‌مراز چندگانه، یکی از انواع روش‌های PCR است که در آن دو یا چند جفت پرایمر را در یک واکنش واحد می‌توان تکثیر داد. این روش به طور قابل توجهی در حفظ زمان،کاهش زحمت و هزینه درآزمایشگاه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳). هدف از مطالعه حاضر ردیابی *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به نالیدیکسیک اسید در نمونه‌های ادراری با روش واکنش زنجیره پلی‌مراز چندگانه در مقایسه با روش کشت است.

مواد و روش‌ها

ملاحظات اخلاقی

در این تحقیق، هزینه‌ای از بیماران شرکت کننده در طرح، دریافت نشد و تمام نکات اخلاقی رعایت شد. کد اخلاق با شناسه IR.IAU.MSHD.REC.1401.043 از کمیته اخلاق در پژوهش دریافت شد.

آماده‌سازی سویه استاندارد باکتریایی

برای انجام این تحقیق، ابتدا سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* ATCC۱۰۰۳۱ از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. کلنی خالص باکتری در ۵ میلی‌لیتر محیط آبگوشت مغز و

[1] *Klebsiella pneumoniae*

[2] Plasmid-mediated quinolone resistance

قلب (BHI broth)[1] تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. سپس از هر سویه باکتری، رقت‌های سری 10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5} تهیه و با استفاده از آگار مذاب به روش پور پلیت، کشت داده شد. پس از گرماگذاری، شمارش کلنی انجام شد. سپس DNA هر نمونه استخراج و غلظت DNA به روش نانودراپ در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. DNA استخراج شده برای انجام PCR استفاده شد تا دقت روش مولکولی مشخص شود.

جمع آوری نمونه

نمونه‌گیری و جمع‌آوری نمونه های ادراری، از شهرستان مشهد طی ۷ ماه از آزمایشگاه بیمارستان قائم مشهد انجام شد. نمونه‌ها از بیماران بستری از بخش‌های مختلف تهیه و پس از شناسایی باکتری مولد عفونت ادراری در نمونه‌های مورد بررسی، چهل نمونه که با باکتری *کلبسیلا پنومونیه* آلوده بودند، جداسازی شدند.

جداسازی و شناسایی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* از نمونه‌های ادرار

جهت تایید آلوده بودن نمونه‌های افراد مبتلا به عفونت ادراری به *کلبسیلا پنومونیه*، نمونه ادرار بر روی محیط کشت ائوزین متیلین بلو (EMB)[2] (شرکت مرک آلمان) و محیط کشت مک کانکی آگار[3] (شرکت مرک آلمان) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس برای شناسایی باکتری *کلبسیلا پنومونیه* از سایر باکتری‌های گرم منفی، تست-های بیوشیمیایی شامل اندول، سیمون سیترات، اوره آز، محیط سه قندی آهن‌دار (TSI)[4]، MR-VP[5]، SIM[6]، اکسیداز و کاتالاز استفاده شد. محیط‌های کشت برای ایجاد کلنی باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ انکوبه شدند و سپس، نتایج بررسی شدند.

استخراج DNA از نمونه‌های ادراری

استخراج ژنوم باکتری *کلبسیلا پنومونیه* با استفاده از کیت استخراج DNA باکتری گرم منفی (شرکت سینا کلون با نام Cinnapur-DNA CAT NO:PR881612) انجام شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با الکتروفورز بر روی آگارز و دستگاه نانودراپ کنترل شد. به این ترتیب که ۳ میکرولیتر از DNA بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد.

به منظور آگاهی از غلظت DNA استخراج شده از نمونه‌های ادراری و درجه خلوص آن، ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده در دستگاه نانودراپ قرار داده شد و نسبت جذب نوری آن در طول موج های ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. میزان جذب در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر، خلوص اسید نوکلئیک را مشخص می‌کند. اگر در این طول موج، جذب برابر ۱/۸-۲ باشد، مقدار DNA استخراج شده مورد تأیید است.

بهینه‌سازی PCR

در این تحقیق از دو نوع PCR استفاده شد. ابتدا برای بهینه‌سازی شرایط دمایی پرایمرها، از واکنش زنجیره پلیمراز منفرد[7] برای سویه‌های استاندارد انجام شد. توالی ژن‌های *16SrRNA*، *qnrA*، *qnrB*، *qnrS* و *aac(6')-Ib-cr* از درگاه اینترنتی NCBI دریافت شد. سپس آغازگرهای مناسب برای اتصال و شناسایی ژن‌های مورد نظر انتخاب شدند. در مرحله بعد آغازگرها به منظور بررسی اختصاصیت برای توالی مورد نظر در سایت NCBI، Blast شدند. در آخر توالی آغازگرهای انتخاب شده برای سنتز به شرکت سینا کلون سفارش داده شد. آغازگرها بعد از رقیق‌سازی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به منظور تعیین هویت باکتری *کلبسیلا پنومونیه* از پرایمرهای Kp/16SrRNA استفاده شد. حجم نهایی واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر بود. برای واکنش زنجیره پلیمراز از مسترمیکس رنگی (شرکت سیناکلون) استفاده شد. برای بهینه سازی دمای اتصال پرایمرها، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد انتخاب گردید. به طور خلاصه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر محلول واکنش PCR (مستر میکس آماده)، پرایمرهای فوروارد و ریورس به غلظت نیم پیکومول، ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۸/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام شد. واکنش نیز در دستگاه ترموسایکلر در دمای واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، سپس ۳۰ چرخه به ترتیب دمای واسرشت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای انیلینگ پرایمرها ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای طویل سازی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. طویل شدن نهایی نیز به مدت ۱۰ دقیقه در دمای فعالیت آنزیم ادامه داشت. پس از انجام PCR، برای اطمینان از صحت انجام PCR و تکثیر ژن‌های *16SrRNA*/Kp، *qnrA*، *qnrB*، *qnrS*

[1] Brain heart infusion
[2] Eosin Methylene Blue Agar
[3] Mac Conkey Agar
[4] Triple sugar iron
[5] Methyl Red andVoges-Proskauer
[6] *Sulfide Indole Motility*
[7] Single PCR

و *aac(6')-Ib-cr* از تکنیک الکتروفورز استفاده شد تا مطابق وزن مولکولی محصولات تکثیر شده، واکنش تفکیک گردد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه

پس از استخراج DNA از نمونه‌های باکتری شناسایی شده، برای بررسی حضور هم‌زمان ژن‌های *qnrA*، *qnrB*، *qnr* S، *aac(6')-Ib-cr* و *Kp/16sr RNA* از روش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه در یک محلول PCR به طور هم زمان استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جداول یک آورده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه نیز مطابق واکنش منفرد تنظیم شده در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر محلول واکنش PCR (مستر میکس آماده)، پرایمرهای فوروارد و ریورس هر کدام از پرایمرهای *qnrA*، *qnrB*، *qnr* S، *aac(6')-Ib-cr* و *Kp/16sr RNA* به غلظت نیم پیکومول (۰/۷۵ میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر DNA الگو و مابقی آب دوبار تقطیر و غیر یونیزه انجام شد. شرایط و برنامه ترموسایکلر مطابق واکنش زنجیره‌ای منفرد که در بخش بهینه‌سازی PCR ذکر شد انجام شد. پس از انجام واکنش، محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. از نمونه فاقد DNA (دارای آب مقطر) به عنوان کنترل منفی و از سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* ۱۰۰۳۱ ATCC برای کنترل مثبت، در کنار چاهک‌های نمونه‌های مورد آزمون، استفاده شد. سپس رنگ آمیزی با رنگ اتیدیوم بروماید و عکس برداری با دستگاه ژل داک انجام گرفت.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در PCR.

Table 1 .Sequence of primers used in PCR.

نام پرایمر	توالی پرایمر '3-'5	طول محصول PCR (bp)	رفرنس
qnrA-F qnrA-R	5' ATTTCTCACGCCAGGATTTG 3' 5' GATCGGCAAAGGTTAGGTCA 3'	۵۱۶	۱۴
qnrB-F qnrB-R	5'ATGACGCCCATTACTGTATAA 3' 5′ GATCGCAATGTGTGAAGTTT 3'	۵۶۲	۱۵
qnrS-F qnrS-R	5'ACGACATTCGTCAACTGCAAA3' 5' TAAATTGGCACCCTGTAGGC3'	۴۱۷	۱۴
aac(6)-Ib-cr-F aac (6')-Ib-cr-R	5'TTGCGATGCTCTAGAGTGGCTA3' 5'CTCGAATGCCTGGCGTGTTT 3'	۴۸۲	۱۶
Kp/16s-F Kp/16s-R	5'ATTTGAAGAGGTTGCAACGAT 3' 5'TTCACTCTGAAGTTTTCTTGTGTTC 3'	۱۳۰	۱۷

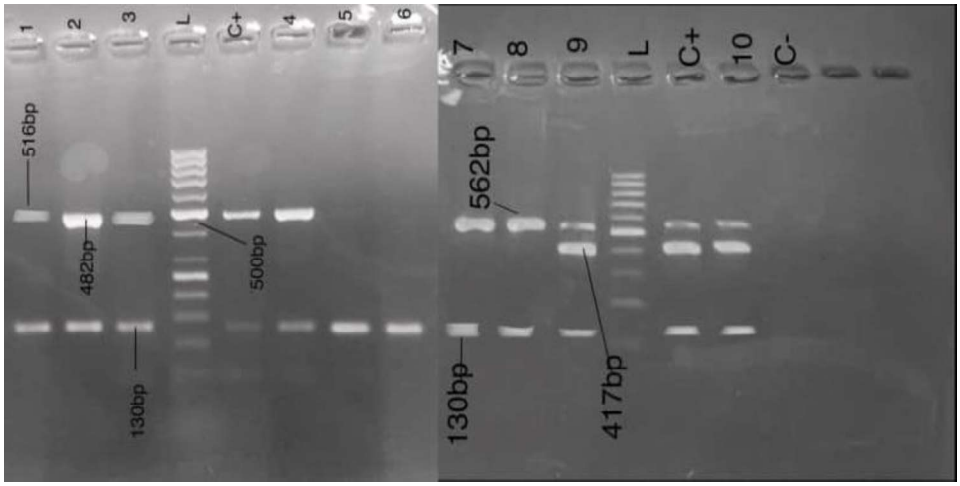
نتایج

کشت و شمارش باکتری‌ها

از بین ۲۳۰ نمونه ادراری جمع آوری شده، ۳۷ نمونه *کلبسیلا پنومونیه* به عنوان عامل عفونت با روش کشت شناسایی شدند. نمونه‌های جداسازی شده مربوط به ۹۲ نفر مرد (۴۰ درصد) و ۱۳۸ نفر زن (۶۰ درصد) بودند. محدوده سنی بین ۱۴ تا ۹۰ سال شناسایی شد.

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه

بعد از بهینه‌سازی دماهای مختلف برای اتصال پرایمرها، بهترین دما برای انجام واکنش زنجیره پلی‌مراز چندگانه دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. تعداد باکتری در هر میلی لیتر برای *کلبسیلا پنومونیه* ATCC10031 معادل $۳/۸\times۱۰^{۶}$ CFU/ml بود که برای بهینه‌سازی غلظت باکتری مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله بعد تمامی نمونه‌های ادرار به طور مستقل از کشت جهت حضور ژن‌های *qnrA* و *qnrB*، *qnrS*، *aac(6')-Ib-cr*، *Kp/16Sr RNA* با روش واکنش زنجیره پلی‌مراز چندگانه مورد بررسی قرار گرفتند. از ۲۳۰ نمونه ادراری، ۳۷ نمونه با روش کشت مثبت شدند و ۴۰ نمونه با واکنش زنجیره پلی‌مراز چندگانه که در این تحقیق



شکل ۱. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه

Figure 1. Multiplex polymerase chain reaction results.

چاهک شماره۱: نمونه دارای حضور ۲ ژن *qnr*A (۵۱۶bp) و *Kp/ 16S rRNA* (۱۳۰bp).

چاهک شماره ۲،۳و۴: نمونه دارای حضور ۲ ژن *aac(6')-Ib-cr* (۴۸۲bp) *Kp/ 16S rRNA* (۱۳۰bp).

چاهک شماره ۵و۶ حضور ژن *Kp/ 16S rRNA* (۱۳۰ bp).

چاهک شماره ۷و۸: نمونه ادراری حامل دو ژن *qnrB* (۵۶۲bp) و *Kp/ 16S rRNA* (۱۳۰bp).

چاهک شماره ۹و۱۰: نمونه ادراری حامل سه ژن *qnrS* (۴۱۷bp)، *qnrB* (۵۶۲bp) و *Kp/ 16S rRNA* (۱۳۰bp)،

L: مارکر مولکولی با سایز ۱۰۰bp،

C+ تصویر سمت چپ: کنترل مثبت سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* ATCC10036 وکنترل مثبت نمونه بالینی *aac (6')-Ib-cr* (۴۸۲bp).

C+ تصویر سمت راست: کنترل مثبت سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* ATC10036 و کنترل مثبت نمونه بالینی *qnrS* (۴۱۷bp)، *qnrB* (۵۶۲bp). -C: کنترل منفی.

Lane 1: The sample exhibits the presence of two genes: *qnrA* (516 bp) and *Kp/16S rRNA* (130 bp).
Lanes 2, 3, and 4: Samples show the presence of two genes: *aac(6')-Ib-cr* (482 bp) and *Kp/16S rRNA* (130 bp).
Lanes 5 and 6: Presence of the *Kp/16S rRNA* gene (130 bp) only.
Lanes 7 and 8: Urine samples harboring two genes: *qnrB* (562 bp) and *Kp/16S rRNA* (130 bp).
Lanes 9 and 10: Urine samples harboring three genes: *qnrS* (417 bp), *qnrB* (562 bp), and *Kp/16S rRNA* (130 bp).
Lane L: Molecular size marker (100 bp ladder).
C+ (left panel): Positive control including the standard strain *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10036 and a clinical isolate positive for *aac(6')-Ib-cr* (482 bp).
C+ (right panel): Positive control including the standard strain *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10036 and a clinical isolate positive for *qnrS* (417 bp) and *qnrB* (562 bp).
C-: Negative control.

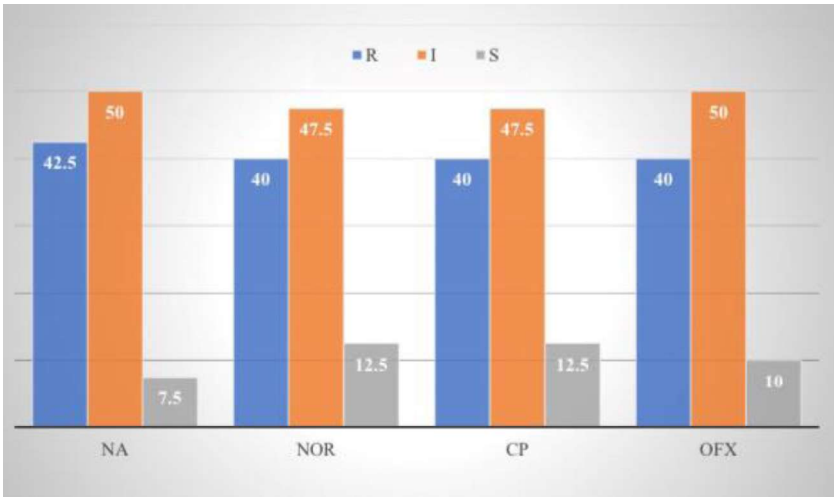
طراحی شده بود، مثبت شدند. سه نمونه با روش کشت شناسایی نشد وتمامی نمونه با روش زنجیره پلی‌مراز چندگانه شناسایی و نتیجه این تحقیق اختصاصیت بالای واکنش زنجیره پلی‌مراز چندگانه نسبت به روش کشت را نشان داد، که در مدت زمان کوتاه، به طور دقیق به صورت هم‌زمان چند ژن را می‌توان شناسایی کرد. نتایج مربوط به واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه نشان داد که فراوانی ژن *aac(6')-Ib-c* و *qnrS* در بین جدایه‌ها به ترتیب ۷۵ و ۵۰ درصد مشاهده شد. ژن *qnrS* در بین نمونه‌ها ۲۵ درصد مشاهده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سه ژن *16S rRNA*، *qnrB* و *qnrS* در ۵۰ درصد از نمونه‌های اداری مورد بررسی به‌صورت هم‌زمان حضور داشتند.

بنابراین می توان گفت که این پنج ژن (در مقایسه با هم زمانی حضور هر پنج ژن با هم) با فراوانی‌های متفاوت می‌توانند در باکتری *کلبسیلا پنومونیه* عامل عفونت ادراری، وجود داشته باشند. همچنین این پنج ژن با توجه به فراوانی بیشتر نمونه‌ها از جنس مؤنث، در خانم‌ها با درصد بالاتری حضور داشتند.

در روش زنجیره پلی‌مراز چندگانه، از نانودراپ برای اندازه‌گیری غلظت DNA استخراج شده به منظوردستیابی به نتایج بهتر استفاده شد. نتایج نانودراپ برای نمونه‌ها مناسب بود، اما برای برخی از نمونه‌های ادراری بیماران که حاوی قند یا پروتئین بالا بود نتایج دقیقی را نشان نداد. نمونه‌های مثبت با توجه به وجود باند و درجه وضوح باند حاصل از الکتروفورز پس از واکنش زنجیره پلی‌مراز چندگانه و نتایج نانودراپ قابل تشخیص بود و با نتایج کشت هم‌خوانی داشت. قابل ذکر می‌باشد که وجود *کلبسیلا پنومونیه* به تعداد کم (کمتر از 10^5 CFU/ml) در ادرار طبیعی و می‌تواند فلور نرمال باشد. با توجه به آزمایش کمی انجام شده تعداد کمتر 10^2 CFU/ml باکتری، محصول قابل ملاحظه‌ای را پس از PCR در الکتروفورز نشان نداد، اما 10^5 CFU/ml تا 10^3 نتایج قابل مشاهده بود که با افزایش تعداد باکتری، وضوح باندهای مربوط به محصول واکنش بیشتر مشاهده شد. در نتیجه می‌توان گفت واکنش زنجیره پلی‌مراز چندگانه می‌تواند به عنوان یک روش سریع و دقیق در مقایسه با روش کشت، برای شناسایی عفونت‌های ادراری ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* در نظر گرفته شود.

نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی

به منظور ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از نمونه‌های ادراری، از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، افلوکساسین و نوروفلوکساسین استفاده شد. در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از نمونه‌های ادراری، بیشترین میزان مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید (۴۲/۵ درصد) و کمترین میزان مقاومت در رابطه با آنتی‌بیوتیک افلوکساسین (۴۰ درصد)، سیپروفلوکساسین (۴۰ درصد) و نوروفلوکساسین (۴۰ درصد) تعیین شد. شکل ۲ الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* را نشان می‌دهد.



شکل ۲. نتایج حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های افلوکساسین (OFX)، سیپروفلوکساسین (CP)، نورفلوکساسین (NOR) و نالیدیکسیک اسید (NA) در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از نمونه‌های ادراری. R: مقاوم، S: حساس، I: حساسیت بینابینی.

Figure 2. Antibiotic susceptibility results for Klebsiella pneumoniae isolates obtained from urine samples against ofloxacin (OFX), ciprofloxacin (CP), norfloxacin (NOR), and nalidixic acid (NA).
R: Resistant, S: Susceptible, I: Intermediate susceptibility.

بحث

کلبسیلا پنومونیه عامل عفونت دستگاه ادراری می‌باشد که با حضور ژن‌های بیماری‌زای مختلف که با توانایی بیماری‌زایی باکتری ارتباط دارد، همراه می‌باشد (۱۹،۱۸). فعالیت وسیع کینولون‌ها بر علیه عفونت‌های مختلف و استفاده گسترده این

آنتی‌بیوتیک‌ها و سوء مصرف و استفاده غیرضروری از آن‌ها به خصوص در کشورهای در حال توسعه، باعث افزایش سرعت گسترش مکانیسم‌های مقاومت به آن‌ها شده است. در این راستا بکارگیری مؤثر از آزمایشگاه‌های میکروب شناسی برای تشخیص صحیح و جلوگیری از گسترش پاتوژن‌های مقاوم، باعث کنترل و شیوع عوامل مقاوم خواهد شد. همچنین جهت افزایش سرعت و دقت تشخیص و کنترل پیشرفت عفونت در میزبان و درمان مناسب، شناخت خصوصیت‌های بیماری‌زایی ارگانیسم مهاجم، از جمله حضور ژن‌های پاتوژن و بیماری‌زا همزمان با حضور باکتری در عامل عفونت، ضروری می‌باشد. بنابراین در این مطالعه ۵ ژن مربوط به شناسایی اختصاصی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی *کلبسیلا پنومونیه* ایجاد کننده عفونت شامل *qnrA*، *qnrB*، *qnrS*، *aac(6')-Ib-cr* و *Kp/16S rRNA* به طور مستقیم از طریق استخراج DNA از ادرار و باکتری‌های کشت شده، بررسی شد.

در بررسی حاضر با استفاده از واکنش زنجیره پلی‌مراز چندگانه حضور ۱۰۰ درصدی ژن 16S rRNA در همه نمونه‌ها تأییدکننده‌ی وجود باکتری در تمامی نمونه‌ها است، چرا که این ژن به‌عنوان نشانگر مولکولی عمومی برای تشخیص باکتری‌ها به‌کار می‌رود. این نتیجه اعتبار روش انجام‌شده را تقویت کرده و نشان می‌دهد که PCR به درستی عمل کرده است. وجود ژن *qnrB* در کل نمونه‌ها نشان‌دهنده‌ی شیوع بسیار بالای مقاومت به کینولون‌ها در این جدایه‌هاست. ژن‌های خانواده *qnr* با تولید پروتئین‌هایی که آنزیم DNA جیراز را از عملکرد مهارکننده‌های فلوروکینولونی محافظت می‌کنند، نقش مهمی در مقاومت به این دسته دارویی ایفا می‌کنند. ژن *aac(6')-Ib-cr* در ۷۵درصد نمونه‌ها شناسایی شده که نشان‌دهنده‌ی شیوع بالای آن است. این ژن توانایی اصلاح آنزیمی برخی آمینوگلیکوزیدها و نیز افزایش مقاومت به کینولون‌ها را دارد. وجود آن در درصد بالایی از نمونه‌ها نگرانی‌هایی را در مورد مقاومت چندگانه دارویی ایجاد می‌کند. حضور ژن *qnrS* در نیمی از نمونه‌ها نیز مؤید گسترش مقاومت به کینولون‌ها است، اگرچه نسبت به *qnrB* شیوع کمتری دارد. ترکیب این دو ژن می‌تواند سطح بالاتری از مقاومت را در باکتری ایجاد کند. ژن مذکور کمترین فراوانی را در میان ژن‌های مقاومت داشته است. این مسئله می‌تواند به دلایل مختلفی از جمله شیوع جغرافیایی محدود، انتقال افقی کم‌تر، یا الگوی مصرف آنتی‌بیوتیکی متفاوت در منطقه مورد مطالعه مربوط باشد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سه ژن *Kp/16S rRNA*، *qnrB* و *qnrS* در ۵۰ درصد از نمونه‌های اداری مورد بررسی به‌صورت هم‌زمان حضور داشتند. همچنین، میان فراوانی و حضور پنج ژن مورد مطالعه در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* عامل عفونت‌های اداری، ارتباط آماری معناداری مشاهده شد. بر اساس این یافته‌ها و با استناد به مطالعات مشابه (۱۸–۲۲)، می‌توان این‌گونه استنباط کرد که حضور این ژن‌ها در ایزوله‌های *کلبسیلا* ممکن است با توان کلونیزاسیون و گسترش عفونت‌های اداری توسط این باکتری مرتبط باشد.

مقایسه نتایج حاصل از روش نانودراپ، زنجیره پلی‌مراز چندگانه و روش کشت سنتی نشان داد که روش نانودراپ به دلیل امکان تعیین کمی DNA، می‌تواند روشی مؤثر در برآورد غلظت باکتری در نمونه اداری محسوب شود. این روش با زمان پاسخ‌دهی کوتاه، اطلاعات دقیقی در مورد میزان بار میکروبی نمونه فراهم می‌آورد. از سوی دیگر، روش زنجیره پلی‌مراز چندگانه با توانایی شناسایی هم‌زمان چندین ژن و تحلیل کیفیت باندها (مانند پهنا، شدت و وضوح آن‌ها) در الکتروفورز، قادر است به سرعت باکتری‌های بیماری‌زا را از فلور نرمال تشخیص دهد. به‌دلیل دقت، حساسیت بالا و سرعت انجام، این دو روش در مقایسه با روش کشت که ممکن است نتایج مثبت یا منفی کاذب داشته باشد، از اولویت بالاتری برای تشخیص سریع عفونت برخوردار هستند.

در این تحقیق میزان مقاومت ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* به آنتی بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید معادل ۴۲/۵ درصد ، افلوکساسین، سیپروفلوکساین و نوروفلوکساسین هر یک معادل ۴۰ درصد می‌باشد. با توجه به اینکه اولین داروی خانواده کینولون‌ها، نالیدیکسیک اسید، در سال ۱۹۶۲ معرفی شد و به‌طور گسترده در درمان عفونت‌های ادراری به کار رفت، انتظار می‌رود که سطح مقاومت باکتری‌ها به این دارو نسبت به سایر اعضای این گروه بیشتر باشد. مطالعه یوسفی و همکاران نشان داد که به‌طور قابل توجهی ۶۳/۳ درصد و ۵۵ درصد از ایزوله‌ها نسبت به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. در این مطالعه، از بین ۳۵۰ ایزوله مقاوم به کینولون‌ها، ۸۷/۵ درصد مقاومت سطح بالا و ۱۲/۵ درصد مقاومت سطح پایین را نشان دادند (۱۹) .

در مطالعه‌ای که توسط Cao و همکاران در چین انجام شد، از بین ۲۲۲ ایزوله جداشده از بیماران بخش مراقبت ویژه، مقاومت نسبت به ماکسی‌فلوکساسین ۸۵ درصد، سیپروفلوکساسین ۷۵ درصد و لووفلوکساسین ۷۱ درصد گزارش گردید (۲۳). همچنین، استیفنز و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه‌ای روی ۲۵۵ ایزوله انتروباکتریاسه

در جامائیکا، میزان شیوع ژن‌های *qnr* را در *اشرشیا کلی*[1] برابر با ۵۰ درصد و در *کلبسیلا پنومونیه* برابر با ۳۰ درصد گزارش کردند که با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌راستا است (۲۳).

در پژوهش دیگری که توسط Wang و همکاران در سال ۲۰۰۸ در چین انجام شد، از میان ۳۳۵ ایزوله *اشرشیا کلی*، حدود ۴۳/۶ درصد نسبت به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. این در حالی است که تنها ۱۷/۰۹ درصد از ۳۹۲ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* مقاومت مشابهی نشان دادند (۲۴). مطالعه Briñas و همکاران (۲۰۰۶) در اسپانیا نیز نشان داد که فراوانی ژن‌های *qnrA*، *aac(6')-Ib-cr*، *qnrB* و *qnrS* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* و *اشرشیا کلی* به ترتیب ۰/۷ درصد، ۱/۳ درصد، ۱/۵ درصد و ۱۶/۲ درصد بوده است که نسبت به یافته‌های مطالعه حاضر درصد پایین‌تری را نشان می‌دهد (۲۵). این تحقیق، وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از نمونه‌های اداری در مشهد را تأیید می‌کند و یافته‌های آن با نتایج گزارش‌شده در سایر مطالعات داخلی و بین‌المللی هم‌خوانی دارد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که روش زنجیره پلی‌مراز چندگانه به عنوان روشی سریع، دقیق، و کم‌هزینه می‌تواند در مدت زمان کوتاه، حضور باکتری عامل عفونت و ژن‌های مقاومت دارویی را شناسایی کند. در حالی‌که روش‌های سنتی مانند کشت ممکن است نیاز به ۴۸ ساعت یا بیشتر برای تشخیص داشته باشند، این روش در کمتر از ۹ ساعت می‌تواند نتایج قابل اعتمادی ارائه دهد. افزون بر این، توانایی تشخیص هم‌زمان چندین ژن در زنجیره پلی‌مراز چندگانه، آن را به گزینه‌ای بسیار مناسب برای استفاده در آزمایشگاه‌های بالینی و در راستای مدیریت بهتر درمان بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری بدل کرده است. بر اساس نتایج این مطالعه، می‌توان پیشنهاد کرد که روش زنجیره پلی‌مراز چندگانه به عنوان ابزار استاندارد در ردیابی سریع و تیپ‌بندی ایزوله‌های باکتریایی در مراکز درمانی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از حمایت‌ها و همکاری‌های مسئولان محترم بیمارستان قائم در فراهم آوردن نمونه‌های بالینی این مطالعه، صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

Refrances

1. Vali L, Dashti AA, Jadaon MM, El-Shazly S. The emergence of plasmid mediated quinolone resistance qnrA2 in extended spectrum β-lactamase producing Klebsiella pneumoniae in the Middle East DAR Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015 Dec 1;23(1):34. doi: 10.1186/s40199-015-0116-7

2. Kim JM, Park ES, Jeong JS, Kim KM, Kim JM, Oh HS, et al. Multicenter surveillance study for nosocomial infections in major hospitals in Korea. Nosocomial Infection Surveillance Committee of the Korean Society for Nosocomial Infection Control. Am J Infect Control 2000; 28(6): 454-8. doi: 10.1067/mic.2000.107592

3. Larypoor M, Frsad S. Evaluation of nosocomial infections in one of hospitals of Qom, 2008. Iran J Med Microbiol2011; 5(3): 7-17. http://ijmm.ir/article-1-194-en.html

4. Lautenbach, E., Patel, JB., Bilker, WB., Edelstein, PH., Fishman, NO. (2001): Extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. Clin Infect Dis. 32(8):.1162-71. doi: 10.1086/319757

5. Yankowitz J, Niebyl JR. Drug therapy in pregnancy. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 63-72. doi: Not available.

6. Amiri M, Jajarmi M, Ghanbarpour R. Prevalence of Resistance to Quinolone and Fluoroquinolone Antibiotics and Screening of qnr Genes Among Escherichia coli Isolates From Urinary Tract Infection. Int J Enteric Pathog. 2017, 5(4):100-105. doi: 10.15171/ijep.2017.24

7. Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(2):639-645. doi: 10.1128/AAC.01051-08

8. Cavaco LM, Frimodt-Møller N, Hasman H, Guardabassi L, Nielsen L, Aarestrup FM. Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant Escherichia coli isolated from humans and swine in Denmark. Microbial Drug Resistance. 2008;14(2):163-9. doi: 10.1089/mdr.2008.0821

[1] *Escherichia coli*

9. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. The Lancet Infectious Diseases. 2006;6(10):629-40. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70599-0

10. Yanat B, Rodríguez-Martínez JM, Touati A. Plasmid-mediated quinolone resistance in Enterobacteriaceae: a systematic review with a focus on Mediterranean countries. Eur Clin Microbiol Infect Dis 2017; 36(3): 421-35. doi: 10.1007/s10096-016-2847-x

11. Martínez-Martínez L, Pascual A, García I, Tran J, Jacoby GA. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. J Antimicrob Chemother 2003; 51(4): 1037-9. doi: 10.1093/jac/dkg157

12. Onori R, Gaiarsa S, Comandatore F, Pongolini S, Bri sse S, Colombo A, Cassani G, Marone P, Grossi P,Minoja G, Bandi C. Tracking nosocomial Klebsiella pneumoniae infections and outbreaks by whole-genome analysis: small-scale Italian scenario within a single hospital. Journal of clinical microbiology. 2015 Sep 1;53(9):2861-8. doi: 10.1128/JCM.00545-15

13. Markoulatos NS, Moncany M. Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. Journal of Clinical Laboratory Analysis 2002;16:47-51. doi: 10.1002/jcla.20516

14. A. Robicsek, (2006) qnr Prevalence in Ceftazidime-Resistant Enterobacteriaceae Isolates from the United States, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts. p.2872-2874. doi: 10.1128/AAC.01647-05

15. Mansouri Jamshidi Neda, Pakzad Iraj, Tabrai Bahman and Haddadi Azam2012 .Survey of the frequency of qnr genes resistant to ciprofloxacin in E.coli isolates isolated from clinical samples of Imam Khomeini Hospital, Ilam and Milad Hospital, Tehran. Scientific Research Journal of Ilam University of Medical Sciences. November.2012,22-16. https://sjimu.medilam.ac.ir/browse.php?sid=1&a_id=1284&slc_lang=en&ftxt=1

16. Vaziri Slavash,Afsharian Mandana .(2020) Frequency of qnr and aac(6')-Ib-cr Genes Among ESBL-Producing klebsiella pneumoniae Strains Isolation from Burn Patients in Kermanshah,Iran.July;13(7). doi: 10.5812/jjm.100348

17. Mohammadalipour Z, Asadpour L, Ranji N. Volume10 ,Numbe(November - December),Fluoroquinolone resistance and mutationin gyrA gene in clinical isolates of Klebsiella pnemoniae, Iranian Journal of Medical Microbiology2016;10(5):31-37.https://ijmm.ir/browse.php?a_id=501&slc_lang=en&sid=1&ftxt=1.

18. Arisoy M، Aysev D, Ekim M, Ozel D, Kose SK, Ozsoy ED, et al. Detection of virulence factors of Escherichia Coli from children by multiplex polymerase chain reaction. I J Clin Prac. 2006; 60(2): 170-173. doi: 10.1111/j.1368-5031.2006.00734.x

19. Alishah M, Amini K, Zahraci Salehi T. Detection of virulence genes in Escherichia Coli strains isolated from pediatric With urinary track infection and 27(11):942-949. http://umj.umsu.ac.ir/article-1-3440-en.html.

20. Darko SN, Kwabena Nsiah K, Twumasi P. Prevalence of PapC and usp Virulence Factors in Uropathogenic Escherichia Coli Causing Asymptomatic Urinary Tract Infection in Adolescents. British Microb Res J.2013; 3(3): 423-430. doi: 10.9734/BMRJ/2013/3067

21.Oliveira FA, Paludo KS,Arend LN, Farah SM, Pedrosa FO, Souza EM.et al. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic Escherichia Coli strains.Genetics and molecular research. Genet Mol Res.2011;10(4):4114-4125. doi: 10.4238/2011.December.16.1

22. Mohammadi J, Amini K. Detection of virulence genes in Uropathogenic E. coli (UPEC) strains by Multiplex-PCR method. JABS 2017; 7 (1) :128-133. http://jabs.fums.ac.ir/article-1-1042-en.htm

23. Stephenson S, Brown PD, Holness A, Wilks M. The Emergence of Qnr-Mediated uinolone Resistance among Enterobacteriaceae in Jamaica. West Indian Med J. 2010; 59(3):241. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21291099/

24. Minnggui Wang, Daniel F. Sahm, George A. Jacoby and David C. Hooper. Emrerging Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Associated With the qnr Gene in Kelebsiella pneumonia Clinical isolates in the Unitedstates. Antimicrob Agent Chemothe. 2004;48(4):1295. doi: 10.1128/AAC.48.4.1295-1299.2004

25. Briales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, de Alba PD, Rodríguez-Baño J, Martínez- Martínez L, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6´)-Ib-cr in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum β-lactamases in Spain. Int J Antimicrob Agents.2012;39(5):431-4. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.12.009