Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Examining the frequency and role of ompk35 and ompk36 genes in Klebsiella pneumoniae isolates with multidrug resistance

Yousef Alikhani Master's Student, Department of Biology, Borujard Branch, Islamic Azad University, Borujard, Iran. y.alikhani2016@gmail.com
Mohammad Reza Mehrabi Assistant Professor, Department of Laboratory Sciences, Borujard Branch, Islamic Azad University, Borujard, Iran **(Corresponding author).** mehrabi.mehr@gmail.com
Mohsen Mirzaee Assistant Professor, Department of Laboratory Sciences, Borujard Branch, Islamic Azad University, Borujard, Iran. Mirzaei.iaub@gmail.com
Reza Yari Assistant Professor, Department of Biology, Research Center for Medicinal Plants, Health and Food Safety, Borujard Branch, Islamic Azad University, Borujard, Iran. rezayari@yahoo.com

Abstract

Objective: Increasing antimicrobial resistance in thermonegative bacteria of the Enterobacteriaceae family has become a global problem. Klebsiella pneumoniae is a thermonegative opportunistic pathogen that has been considered in causing a wide range of diseases and antibiotic resistance due to its various resistance mechanisms. In this regard, the aim of the present study is to investigate the presence and role of ompK35 and ompK36 genes in isolates of K. Pneumonia is resistant to several drugs.

Materials and methods: 96 isolates were collected from patients referred to hospitals in Borujerd city in 2019 and were identified using differential tests. Antibiotic sensitivity test was performed by disk diffusion method and identification of ompK35 and ompK36 genes using PCR.

Findings: 82.12% of isolates were resistant to ampicillin antibiotic. The most effective antibiotic was gentamicin with resistance rate (38.9%). 28 isolates had multidrug resistance. ompK35 gene in 12.5% of K. pneumoniae and ompK36 gene were observed in 11.45% of clinical isolates.

Conclusion: The results of this study showed that the absence of ompK35 and ompK36 genes plays a role in creating resistance to all kinds of antibiotics and it is necessary to pay attention to this issue in choosing antibiotics to treat and eliminate these isolates. Isolates lacking omk36 were more resistant to the studied antibiotics, especially gentamicin and ciprofloxacin, than isolates lacking ompk35 ($P<0.05$).

Keywords: Klebsiella pneumoniae bacteria, ompK35, ompK36, Multiple drug resistance, Borujerd.

Received: 2023/03/30 ; **Revised:** 2023/04/17 ; **Accepted:** 2023/05/05 ; **Published online:** 2023/05/08
Article type: Research Article © the authors **Publisher:** Qom Islamic Azad University

پیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۲۵۳۸-۳۴۳۴
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

بررسی فراوانی و نقش ژن‌های *ompk35* و *ompk36* در جدایه‌های باکتری *کلبسیلا پنومونیه* دارای مقاومت چند دارویی

یوسف علیخانی دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران. y.alikhani2016@gmail.com
محمدرضا مهرابی استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران (**نویسنده مسئول**). mehrabi.mehr@gmail.com
محسن میرزایی استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران. Mirzaei.iaub@gmail.com
رضا یاری استادیار، گروه زیست‌شناسی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، سلامت و امنیت غذایی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران. rezayari@yahoo.com

چکیده

هدف: افزایش مقاومت ضدمیکروبی در باکتری‌های گرم‌منفی خانواده انتروباکتریاسه، به مشکل جهانی تبدیل شده است. *کلبسیلا پنومونیه*، پاتوژن فرصت‌طلب گرم‌منفی است که به دلیل داشتن انواع مکانیسم‌های مقاومت، در ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها و مقاومت آنتی بیوتیکی مورد توجه قرار گرفته است. در این راستا، هدف پژوهش حاضر بررسی حضور و نقش ژن‌های *ompK35* و *ompK36* در ایزوله‌های ک. *پنومونیه* مقاوم به چندین دارو می‌باشد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۹۶ ایزوله از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های سطح شهر بروجرد در سال ۱۳۹۹ جمع‌آوری شده و با استفاده از تست‌های افتراقی، مورد شناسایی قرار گرفتند. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار در دیسک و شناسایی ژن‌های *ompK35* و *ompK36* با استفاده از PCR انجام شد.

یافته‌ها: ۸۲/۱۲٪ از ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین مقاوم بودند. موثرترین آنتی‌بیوتیک جنتامایسین با میزان مقاومت (۳۸/۹٪) بود. ۲۸ ایزوله دارای مقاومت چند دارویی بودند. ژن *ompK35* در ۱۲/۵٪ نمونه‌های ک. *پنومونیه* و ژن *ompK36* در ۱۱/۴۵٪ ایزوله‌های بالینی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان دادند که نداشتن ژن‌های *ompK35* و *ompK36* در ایجاد مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها نقش دارد و توجه به این مسأله در انتخاب آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان و از بین بردن این ایزوله‌ها ضروری است. ایزوله‌های فاقد *omk36* نسبت به ایزوله‌های فاقد *ompk35*، مقاومت بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه، به ویژه جنتامایسین و سیپروفلوکسازین داشتند ($P<0.05$).

کلیدواژه‌ها: باکتری *کلبسیلا پنومونیه*، *ompK35*، *ompK36*، مقاومت چندگانه دارویی، بروجرد.

پژوهش حاضر برگرفته از: پایان‌نامه کارشناسی ارشد، با عنوان: **بررسی شیوع ژن‌های *ompk35* و *ompk36* در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* دارای مقاومت چند دارویی**، ارائه شده در دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد است.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۰ ؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۲/۰۱/۲۸ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۲/۱۵ ؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۲/۰۲/۱۸

ناشر: دانشگاه قم
© نویسندگان
نوع مقاله: پژوهشی

۱. مقدمه

کلبسیلا پنومونیه[1] یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی است (۱،۲). در حال حاضر کرباپنم‌ها آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی برای درمان عفونت‌های جدی ناشی از سویه‌های *ک. پنومونیه* مقاوم به چندین دارو می‌باشند (۳). مقاومت کارباپنم در *ک. پنومونیه* مبتنی بر مکانیسم‌های مختلفی است که شامل تولید کارباپنماز، تنظیم پمپ‌های افلاکس یا از بین رفتن پورین‌ها ازجمله OMPK35 و OMPK36 است. مکانیسم مورد استفاده توسط داروهای بتالاکتام برای ورود به سلول به این صورت می‌باشد که این داروها به گیرنده‌های سطح سلول متصل شده و از طریق منافذ روی سطح، از طریق پروتئین‌های آبدوست وارد می‌شوند (۴). برداشتن و یا غیرفعال کردن داروها در فضای پری پلاسمی به وسیله بتالاکتامازها و یا پمپ‌های افلاکس می‌تواند باعث مقاومت به داروها شود. در صورتی که پورین‌های[2] آبدوست که اجازه ورود دارو به فضای پری پلاسمی را می‌دهند، برداشته شوند، میزان مقاومت به داروها افزایش می‌یابد. بنابراین، از بین رفتن منافذ در باکتری‌های مقاوم به درمان در *ک. پنومونیه* برخلاف دیگر انتروباکتریاسه‌ها که منافذ خود را از دست نمی‌دهند، به فراوانی دیده می‌شود. حذف ژن کدکننده *ompK35* باعث افزایش قابل ملاحظه‌ای در مقاومت به داروهای بتالاکتام می‌شود. این پروتئین به صورت طبیعی نیز به مقدار کمی در درون سلول بیان می‌شود، اما بیان این پروتئین باعث ایجاد کانال‌های بزرگی شده که ترکیبات بزرگ و آبدوست را وارد سلول می‌کند. واکنش دیگری که به نفوذ داروها به داخل باکتری کمک می‌کند، تشکیل پیوندهای هیدروفوبیک میان آنتی‌بیوتیک و پورین OmpK35,36 در طول مسیر ورود آنتی‌بیوتیک به داخل سلول است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که حضور همزمان پورین‌های OmpK35 و OmpK36 باعث افزایش حساسیت زیاد *ک. پنومونیه* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌شود (۵-۷). گرچه حضور هر دو ژن باعث افزایش حساسیت نسبت به سفالوسپورین‌های مختلف می‌شود، اما حضور *ompK35* برای حساسیت کامل نسبت به سفتازیدیم و سفپیریم الزامی است (۸).

در این راستا، هدف مطالعه حاضر، تعیین الگوی مقاومت دارویی و شناسایی پورین‌های *ompK35* و *ompK36* در ایزوله‌های *ک. پنومونیه* دارای مقاومت چند دارویی جدا شده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های سطح شهر بروجرد است.

---

1. Klebsiella pneumoniae
2. Porin

۲. مواد و روش‌ها

جامعه مورد بررسی در این تحقیق شامل جدایه‌های *ک. پنومونیه* جدا شده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های سطح شهر بروجرد بود. تعداد ۹۶ ایزوله *ک. پنومونیه* در طی ۶ ماه جمع‌آوری و پس از کشت با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. از باکتری‌ها غلظت نیم مک فارلند تهیه شده و روی محیط مولرهینتون آگار کشت چمنی تهیه شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (AM)، پیپراسیلین (PIP)، جنتامایسین (GM)، سفتریاکسون (CRO)، ایمی‌پنم (IMP)، نالیدیکسیک اسید (NA)، آمیکاسین (AN)، سیپروفلوکساسین (CP) و دیسک‌های ترکیبی سفتازیدیم/کلاوونیک اسید (CZA)، سفوتاکسیم/ کلاوونیک اسید (CTC) خریداری شده از شرکت Rosco در کشور روسیه، بر روی پلیت قرار داده شد. سپس پلیت‌ها درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و بعد از ۲۴ ساعت، قطر هاله‌های عدم رشد با توجه به جدول استاندارد CLSI تجزیه و تحلیل شد.

استخراج DNA با استفاده از روش جوشاندن انجام شد. پس از استخراج DNA، هر نمونه تا زمان انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت تعیین حضور ژن‌های مورد بررسی در ایزوله‌ها، از واکنش PCR استفاده شد. ابتدا پرایمرها طراحی و پس از بلاست کردن در پایگاه NCBI، پرایمرهای موردنظر از شرکت سیناژن تهیه شدند. واکنش‌ها در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل 12.5µl مسترمیکس، هر پرایمر 1µl، 3µl DNA و 7.5µl آب مقطر استریل دوبار تقطیر انجام شدند.

الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱% حاوی محلول رنگی DNA Safe Stain (سیناژن-ایران) در حضور DNA مارکر ۱۰۰ جفت بازی با ولتاژ ۸۰ ولت، به مدت ۵۰ دقیقه انجام شد. ژل‌های مورد نظر با دستگاه ژل UV-DOC (ساخت ایران) مورد بررسی قرار گرفت. اندازه امپلیکون ژن *ompk35* معادل ۷۸ جفت باز و ژن *ompk36* معادل ۸۱ جفت باز می‌باشد.

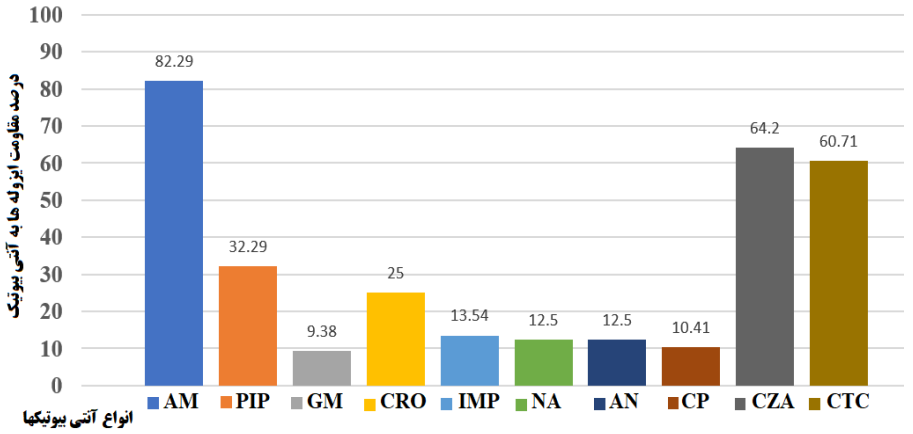
جدول ۱- توالی پرایمرها (۸) و شرایط دمایی/زمانی واکنش‌های PCR

پرایمر	توالی	شرایط دمایی/ زمانی
ompK35	5′GTCTGGACCACCAATGGC3′ 5′GATCTGAGTTTCGCCTTTCA3′	1 cycle 94°C 5min, 94°C 30 min, 58°C 20s, 72°C 10min, 30 cycle
ompK36	5′GACCAGACCTACATGCGTGTA3′ 5′GTATTCCCACTGGCCGTAA3′	1 cycle 94°C 5min, 94°C 30 min, 50°C 20s, 72°C 10min, 30 cycle

۳. یافته‌ها

در این بررسی ۹۶ ایزوله از باکتری‌های میله‌ای گرم منفی پس از تعیین هویت (آزمون‌های گرم و بیوشیمیایی، PCR ژن *16 srRNA*) به عنوان *ک. پنومونیه* شناسایی و مورد مطالعه قرار گرفتند. تست آنتی بیوگرام بر روی تمامی ایزوله‌های *ک. پنومونیه* انجام شد (نمودار ۱).

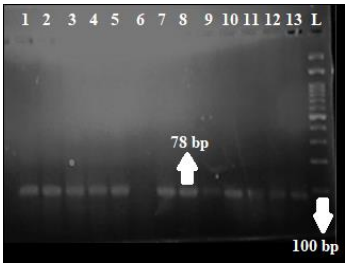
بیشترین میزان مقاومت این جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۸۲/۲۹%) و پیپراسیلین (۳۲/۲۹%) و کمترین مقاومت نسبت به جنتامایسین (۹/۳۸%) و سپس سیپروفلوکسازین (۱۰/۴۱%) بود که نشان می‌دهد موثرترین آنتی‌بیوتیک می‌باشند. بررسی‌ها نشان دادند که ۲۹/۱۶ درصد از ایزوله‌ها مقاوم به چندین دارو هستند که ۱۸ ایزوله (۶۴/۲%) مقاوم به سفتازیدیم کلاوونیک اسید و ۱۷ ایزوله (۶۰/۷۱%) مقاوم به سفوتاکسیم کلاوونیک اسید بودند (نمودار ۱).



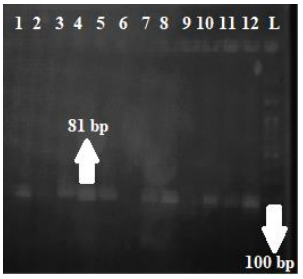
نمودار ۱- میزان مقاومت ایزوله‌های بالینی به آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده

آمپی سیلین (AM)، پیپراسیلین(PIP)، جنتامایسین (GM)، سفتریاکسون (CRO)، ایمی‌پنم (IMP)، نالیدیکسیک اسید (NA)، آمیکاسین (AN)، سیپروفلوکساسین(CP)، سفتازیدیم/کلاوونیک اسید (CZA)، سفوتاکسیم/کلاوونیک اسید (CTC).

نتایج مربوط به حضور ژن‌های *OMPK35* و *OMPK36* در تصاویر (۲ و ۳) نشان داده شده است. ۱۲/۵ درصد از ایزوله‌ها حاوی ژن *ompK35* (معادل ۱۲ ایزوله) و ۱۱/۴۶ درصد حاوی ژن *ompK36* (معادل ۱۱ ایزوله) بودند.



شکل ۱- نتایج مربوط به الکتروفورز محصولات PCR ژن *ompk35*
L: DNA مارکر ۱۰۰ bp، چاهک شماره (٦) کنترل منفی (شامل همه مواد آزمایشPCR، به‌جز DNA الگو)، چاهک شماره (۱) کنترل مثبت، چاهک‌های۲ تا ۵ و ۷ تا ۱۳ از نظر وجود ژن مثبت می‌باشند.



شکل ۲- نتایج مربوط به الکتروفورز محصولات PCR ژن *ompk36*
L: DNA مارکر ۱۰۰ bp، چاهک شماره (٦) کنترل منفی (شامل همه مواد آزمایشPCR، به‌جز DNA الگو)، چاهک شماره (۱) کنترل مثبت، چاهک‌های۲ تا ۵ و ۷ تا ۱۲ از نظر وجود ژن مثبت می‌باشند.

٤. بحث

از ۹۶ ایزوله، ۱۲ ایزوله حاوی ژن *ompk35* و ۱۱ ایزوله حاوی ژن *ompk36* بوده که ۵ ایزوله دارای هر دو ژن بودند. با توجه به نتایج تست‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تعداد ۲۸ باکتری دارای مقاومت چند دارویی بودند. از این تعداد هر ۵ ایزوله که دارای ژن‌های *omk35* و *ompk36* بودند، همگی فاقد مقاومت چندگانه بوده که حاکی از تاثیرگذاری مهم آنها در کمک به ورود آنتی‌بیوتیک‌ها به داخل سلول می‌باشد. در میان ایزوله‌های فاقد این دو ژن، ایزوله‌های فاقد *omk36* نسبت به ایزوله‌های فاقد *ompk35*، مقاومت بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه به ویژه جنتامایسین و سیپروفلوکسازین داشتند ($P < 0.05$). براساس مطالعات Dutzler و همکاران (۱۹۹۹) و Garavito و همکاران (۱۹۸۰) علت این امر افزایش در چگالی بار پورین Ompk36 در مقایسه با پورین Ompk35 است، نه اندازه قطر منافذ آنها؛ و این باعث جریان بیشتر املاح و مولکول‌ها نظیر داروها، به سمت سیتوپلاسم سلول هدف می‌شود (۹، ۱۰). کانال‌های تولیدی از پروتئین‌های

OmpK35 و OmpK36 در کلبسیلا مشابه پورین‌های OmpF و OmpC در باکتری *اشریشیا کلی* هستند و نفوذپذیری بالایی نسبت به ترکیبات آبدوست (مانند بنزیل پنی‌سیلین)، مولکول‌های بزرگ و طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها به داخل دیواره سلولی باکتری دارند (۱۱).

در مطالعه Farivar و همکاران (۲۰۱۶)، بیشترین حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های کلیستین، استرپتومایسین، کلرامفنیکل و ایمی پنم نشان داده شد. مقاومت فلوروکینولون‌ها ازجمله سیپروفلوکساسین، نوروفلوکساسین و افلوکساسین به ترتیب ۶۸/۷%، ۶۶/۳% و ۶۵% بود (۱۲). در مطالعه Asadpour و همکاران (۱۳۹۶) نیز میزان مقاومت به پنی‌سیلین (۹۲%)، آموکسی‌سیلین (۸۷/۶%) و اریترومایسین (۸۴/۶%) بوده و جنتامایسین و آمیکاسین، موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها بودند که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (۱۳). نتایج مطالعه Soltan Dalal و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که ایزوله‌های بالینی کلبسیلا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم، آمیکاسین، سفتازیدیم و نالیدیکسیک اسید، حساس هستند؛ به‌طوری‌که این حساسیت برای آمیکاسین حدود ۹۹%، سفتازیدیم، نالیدیکسیک اسید و ایمی‌پنم ۹۸% بود (۱۴)، که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. نتایج بدست آمده توسط Amin و همکاران (۲۰۰۹)، حساسیت به نالیدیکسیک اسید را ۵۷/۵% و ایمی‌پنم را ۹۲/۵% نشان می‌دهد (۱۵)؛ درحالی‌که نتایج بدست آمده در اردن بیانگر تفاوت بسیار با نتایج حاضر و سایر محققین بوده است؛ به‌طوری‌که مقاومت به آمیکاسین ۳۸%، سفتازیدیم ۵۷% و نالیدیکسیک اسید ۳۳/۶% بوده است، ولی ایمی‌پنم همچنان به عنوان یک آنتی‌بیوتیک موثر در درمان عفونت‌های ناشی از *ک. پنومونیه* با ۹۰/۹% اثردهی داشته است (۱۶). در بررسی نتایج حاصل از این پژوهش و مقایسه با سایر گزارشات مانند گزارش مدیر منطقه‌ای سازمان بهداشت جهانی، باید به نکاتی مانند تاثیر خطاهای تکنیکی همچون قطر نامناسب محیط موجود در پلیت‌های آنتی بیوگرام یا شرکت سازنده دیسک‌های آنتی‌بیوتیک توجه داشت. علاوه‌بر این تفاوت توزیع سویه‌های مقاوم در مناطق جغرافیایی و مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها در آن مناطق که مهم‌ترین معضل بهداشتی سالیان اخیر دنیا بوده است، بایستی مد نظر قرار گیرد (۱۷،۱۸).

۵. نتیجه‌گیری

پورین‌ها نقش مهمی در جابجایی املاح و مولکول‌ها به داخل سلول، اتصال به سطوح، ارتباطات سلول- سلول داشته و حذف آنها در غشاء خارجی ایزوله‌های *ک. پنومونیه*، منجربه افزایش مقاومت

آنها به داروها و نیز مقاومت باکتری در برابر فاگوسیتوز توسط نوتروفیل‌ها می‌شود. لذا، حضور و عدم حضور آنها اثرات متفاوتی در ارتباط سلول- باکتری دارد که نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

٦. سپاسگزاری

از کارشناسان آزمایشگاه تحقیقاتی بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد که با صبر و حوصله و همکاری ارزنده، شرایط مناسبی جهت انجام مطالعه حاضر فراهم کردند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL & Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012; 50(12): 3877-3880.
2. Podschun R & Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998; 11(4): 589-603.
3. Peirano G, van der Bij AK, Freeman JL, Poirel L, Nordmann P, Costello M & et al. Characteristics of *Escherichia coli* sequence type 131 isolates that produce extended-spectrum β-lactamases: Global distribution of the H30-Rx sublineage. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014; 58(7): 3762-3767.
4. Martínez-Martínez L, Pascual A, del Carmen Conejo M, García I, Joyanes P, Doménech-Sánchez A & et al. Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum β-lactamase production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002; 46(12): 3926-3932.
5. Doménech-Sánchez A, Hernández-Allés S, Martínez-Martínez L, Benedí VJ & Albertí S. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in β-lactam antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*. 1999; 181(9): 2726-2732.
6. Hernández-Allés S, Albertí S, Álvarez D, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Gil J & et al. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology*. 1999; 145(3): 673-679.
7. Majiduddin FK, Materon IC & Palzkill TG. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *International journal of Medical Microbiology*. 2002; 292(2): 127-137.
8. Landman D, Bratu S & Quale J. Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing Klebsiella pneumoniae. *Journal of Medical Microbiology*. 2009; 58(Pt 10): 1303-1308.
9. Dutzler R, Rummel G, Albertí S, Hernández-Allés S, Phale PS, Rosenbusch JP & et al. Crystal structure and functional characterization of OmpK36, the osmoporin of *Klebsiella pneumoniae*. *Structure*. 1999; 7: 425–434.
10. Garavito RM & Rosenbusch JP. Three-dimensional crystals of an integral membrane protein: an initial x-ray analysis. *Journal of Cell Biology*. 1980; 86(1): 327–329.
11. Bialek-Davenet S, Lavigne J-P, Guyot K, Mayer N, Tournebize R, Brisse S & et al. Differential contribution of AcrAB and OqxAB efflux pumps to multidrug resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015; 70(1): 81-88.
12. Farivar AS, Nowroozi J, Eslami G, Sabokbar A & Hashemi A. The study of antibiotic resistance among *Klebsiella pneumoniae* and expression level of *oqxA* and *acrA* genes by using real-time PCR. *Research in Medicine*. 2016; 40(1): 42-48. [in persian]
13. Asadpour L & Nahavandinejhad M. Frequency of extended spectrum beta lactamase producing multidrug resistant *Klebsiella pnemoniae* in urinary tract infections in Rasht.

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2017; 25(2): 82-90. [in persian]

14. Soltan Dalal MM, Miremadi SA, Sharify Yazdi MK, Rastegar Lari A, Rajabi Z & Avadis Yans S. Antimicrobial resistance trends Of Klebsiella Spp. isolated from patients in Imam Khomeini hospital. *Payavard Salamat*. 2012; 6(4): 275-281. [in persian]
15. Amin A. ghumro PB, Hussain S, Hameed A. Prevalence of antibiotic resistance among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from a tertiary care Hospital in Pakistan. Malaysian *Journal of Microbiology*. 2009; 5(2): 81-86.
16. Al Shara MA. Emerging antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from pediatric patients in jordan. *New Iraqi Journal of Medicine*. 2011; 7(2): 29-32.
17. Parker MT. Organization WHO. *Hospital-acquired infections: Guidelines to laboratory methods: World Health Organization*. Regional Office for Europe; 1978.
18. Stratchounski LS, Kozlov RS, Rechedko GK, Stetsiouk OU & Chavrikova EP. Antimicrobial resistance patterns among aerobic Gram-negative bacilli isolated from patients in intensive care units: results of a multicenter study in Russia. *Clinical Microbiology and Infection*. 1998; 4(9): 497-507.