

ارتباط فنوتیپ آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) با حضور ژن بتالاکتامازهای *bla_{CTX}* و *bla_{SHV}*، *bla_{TEM}* در جدایه‌های ادراری *Klebsiella pneumoniae* در تهران

فرشته راعی^۱

فرشته افتخار^۲

محمد مهدی فیض‌آبادی^۳

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۲۶

تاریخ تصویب: ۹۳/۲/۲

چکیده

جدایه‌های *Klebsiella pneumoniae* پاتوژن‌های فرصت طلبی هستند که می‌توانند عامل مهمی در ایجاد عفونت‌های جامعه و عفونت‌های بیمارستانی باشند. برای درمان این عفونت‌ها اغلب از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام استفاده می‌شود و با افزایش مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها، عمدتاً با ایجاد بتالاکتامازهای وسیع الطیف توسط باکتری، درمان عفونت‌های حاصل از این میکروارگانیسم با مشکل روبرو شده است. در این پژوهش، ۱۹۶ جدایه بالینی

^۱گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی

^۲دانشیار. میکروبی شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی f-eftekhar@sbu.ac.ir

^۳گروه میکروبی شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.

Klebsiella pneumoniae مورد بررسی قرار گرفتند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار از دیسک تعیین شد و تولید آنزیم‌های ESBL با روش تاییدی فنوتیپی (Phenotypic Confirmatory Test, PCT) نشان داده شد. حضور ژن‌های *bla*_{TEM}، *bla*_{SHV}، *bla*_{CTX-M} با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین میزان مقاومت به پیپراسیلین (۶۶/۳٪) و بیشترین حساسیت (۱۰۰٪) به ایمپنم مشاهده شد. فنوتیپ آنزیم‌های ESBL در ۹۲ جدایه (۴۶/۹٪) مشاهده شد. نتایج PCR وجود ژن‌های *bla*_{CTX-M} را در ۱۶۰ جدایه (۸۱/۶٪) *bla*_{TEM} را در ۱۰۴ جدایه (۵۳/۰۶٪) و *bla*_{SHV} را در ۸۲ جدایه (۴۱/۸٪) نشان داد. از میان جدایه‌های تولیدکننده ESBL، غالب‌ترین ژن *bla*_{CTX-M} بود که در ۷۷ جدایه (۸۳/۶٪) مشاهده شد و بدنبال آن *bla*_{TEM} در ۵۷ جدایه (۶۱/۹٪) و *bla*_{SHV} حامل در ۴۳ جدایه (۴۶/۷٪) یافت شد. علاوه بر آن، ۷ جدایه (۷/۶٪) فاقد هر ۳ ژن و ۲۴ جدایه (۲۶/۰۸٪) حامل هر ۳ ژن بودند. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که حضور ژن مستلزم بیان آن و ایجاد فنوتیپ ESBL نیست. در میان جدایه‌های ادراری *K. pneumoniae* جمع‌آوری شده *bla*_{CTX-M} فراوان‌ترین آنزیم ESBL بود و *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV} به ترتیب بعد از آن قرار می‌گرفتند.

واژه‌های کلیدی: بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، *bla*_{CTX-M}، *bla*_{SHV}، *bla*_{TEM}، *Klebsiella pneumoniae*

مقدمه

پس از *E. coli* مقام دوم را در ایجاد عفونت‌های ادراری دارند (Tice, 1999). آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به عنوان خط اول درمان برای معالجه عفونت‌های ادراری وابسته به *K. pneumoniae* به کار می‌روند. هر چند، مصرف بی‌رویه این داروها سبب ایجاد مقاومت در باکتری‌ها، عمدتاً با تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز شده است که باعث

عفونت‌های مجاری ادراری از عوامل شایع مراجعه بیماران به مراکز بهداشتی-درمانی بوده و با توجه به شیوع آن در سطح جامعه، هزینه‌های درمانی این عفونت‌ها بار اقتصادی زیادی را بر خانواده و جامعه وارد می‌نماید (Branger et al., 2005). بررسی‌های آماری نشان می‌دهد که جدایه‌های *K. pneumoniae*

مواد و روش‌ها

باکتری‌ها

تعداد ۱۹۶ جدایه ادراری *K. pneumoniae* از اسفند سال ۱۳۸۶ تا آبان سال ۱۳۹۱ از بیمارستان امام حسین تهران جمع آوری شدند. بعد از تایید هویت توسط تست‌های استاندارد بیوشیمیایی، جدایه‌ها در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (MacFaddin, 2000). سویه *K. pneumoniae* ATCC 10031 جهت کنترل شناسایی و روش تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی استفاده شد. سویه‌های *K. pneumoniae* 207L (Accession number: GQ470427)، TEM، 550L، (Accession number: GQ470460) SHV و (Accession number: GQ 285L) و SHV (470435-1) مولد CTX (فراهم شده توسط دکتر محمد مهدی فیض‌آبادی) به عنوان کنترل در آزمون PCR استفاده شدند.

مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها با روش انتشار دیسک صورت گرفت (CLSI, 2011). دیسک‌های ایمی‌پنم (10 µg)، سفوتاکسیم (30 µg)، سفتریاکسون (30 µg)، سفتازیدیم (30 µg)، آزترونام (30 µg)، جنتامیسین (10 µg)، آمیکاسین (30 µg)، سیپروفلوکساسین (5 µg)، نالیدیکسیک اسید (30 µg)، آموکسی کلاو (20/10 µg)، پیپراسیلین-تازوباکتام (100/10 µg) و

هیدرولیز این آنتی بیوتیک‌ها می‌شوند. بتالاکتامازها انواع مختلفی دارند که از آن جمله می‌توان به آنزیم‌های TEM، SHV و CTX اشاره نمود. ژن‌های تولیدکننده این آنزیم‌ها به نام‌های *bla_{TEM}*، *bla_{SHV}*، *bla_{CTX-M}* از جمله ژن‌هایی هستند که بر روی پلاسمید قرار گرفته‌اند (Paterson et al., 2003; Singh, 1999). مصرف گسترده و روزافزون پنی سیلین‌ها و سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف منجر به ایجاد سفالوسپورینازهای وسیع‌الطیف (Extended spectrum β-lactamases یا ESBL) شده که قادر به هیدرولیز آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین، سفالوسپورین‌ها و نیز آزترونام هستند. این آنزیم‌ها با بروز جهش‌های نقطه ای در توالی اسیدهای آمینه بتالاکتامازهای اولیه نظیر TEM-1، TEM-2 و SHV-2 حاصل شده‌اند (Peterson et al., 2003). جدایه‌های *K. pneumoniae* به لحاظ تولید ESBL از اهمیت قابل ملاحظه‌ای برخوردار می‌باشند. انتقال و انتشار سریع این میکروارگانیسم‌ها باعث افزایش میزان عفونت‌های بیمارستانی در سراسر دنیا شده است و تولید ESBL دلیل اصلی شکست درمان‌های آنتی بیوتیکی است (Tice, 1999). هدف از این پژوهش بررسی تولید ESBL در جدایه‌های ادراری *K. pneumoniae* و ارتباط آن با حضور ژن‌های *bla_{TEM}*، *bla_{SHV}*، *bla_{CTX-M}* در این باکتری‌ها بوده است.

بررسی حضور ژن های بتا لاکتاماز در این پژوهش، استخراج DNA از کلیه جدایه‌ها، با روش بهینه شده فنل / کلروفرم انجام پذیرفت (Cheng et al., 2006). در این روش مستقیماً از فنل به منظور شکستن سلول‌ها استفاده شد که مستقیماً دیواره سلولی باکتری‌ها را تخریب و باعث رهاسازی DNA می شود.

تشخیص حضور ژن‌های *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* با کمک PCR انجام شد (Nabil Karaha et al., 2010; Shahcheraghi et al., 2010; Nasehi et al., 2007; پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ مشاهده می‌شوند (Bioneer, Korea). مخلوط واکنش PCR (۲۵µl) حاوی ۱ µl میکرولیتر از DNA تخلیص شده، ۱µl مخلوط پرایمر Forward و Reverse با غلظت ۲۰ pM، ۰,۱ µl، مخلوط dNTP با غلظت ۲۰۰ µM، ۰,۷۵ µl، PCR Buffer (۱,۵mM) MgCl₂، ۲,۵ µl، 10X، ۰,۱ µl آنزیم Taq polymerase بود. تکثیر ژن‌های رمز کننده بتالاکتاماز در دستگاه ترموسایکلر (MyGene Series Peltier مدل MG25+)، با برنامه ارائه شده در جدول ۱ برای ۳۲ سیکل صورت گرفت. مارکر 100 bp (Vivantis, Malaysia) جهت تایید وزن مولکولی محصولات تکثیر شده استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها در ژل آگارز ۱٪ انجام شده و پس از رنگ آمیزی با RedSafe (Intron, Korea) نتایج با UV مشاهده شد.

پیپراسیلین (100 µg) که از شرکت Mast تهیه شده بودند به کار گرفته شدند.

تست فنوتیپی تولید ESBL

تولید ESBL توسط جدایه‌ها با استفاده از تست تاییدی فنوتیپی (Phenotypic Confirmatory Test, PCT) صورت گرفت (CLSI, 2011). در این تست، جدایه‌هایی که در آنها قطر هاله عدم رشد برای آزترونام و سفوتاکسیم ≤ 27 mm، سفتازیدیم ≤ 22 mm، سفتریاکسون ≤ 25 mm و سفپودوکسیم ≤ 17 mm بود، بعنوان تولید کننده احتمالی ESBL انتخاب شدند و تست فنوتیپی تاییدی بر روی آنها انجام گرفت (CLSI, 2011). در این روش دیسک‌های سفتازیدیم - کلاولانیک اسید (CAZ 30µg/ CA 10 µg) و سفوتاکسیم - کلاولانیک اسید (CTX 30µg/ CA 10 µg)، سفوتاکسیم و سفتازیدیم به تنهایی (Mast, UK) بر روی کشت چمنی باکتری قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت گرما گذاری در ۳۷ درجه سانتیگراد، افزایش قطر هاله عدم رشد به اندازه ۵ میلی متر یا بیشتر در اطراف دیسک‌های ترکیبی در مقایسه با هر آنتی بیوتیک به تنهایی نشان دهنده تولید ESBL بود.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرها و دماهای به کار رفته به منظور بررسی حضور ژن‌های

bla_{CTX-M} و *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*

ژن	توالی پرایمر (5' to 3')	اندازه محصول PCR (bp)	PCR		
			Denaturation	Annealing	Extension
<i>bla_{TEM}</i> -F <i>bla_{TEM}</i> -R	GAGTATCAACATTTCCGTGTC TAATCAGTGAGGCACCTTCTC	۸۸۹	۹۴°C ۱min	۴۵°C ۱min	۷۲°C ۱min
<i>bla_{SHV}</i> -F <i>bla_{SHV}</i> -R	ATGCGTTATATTCGCCTGTG AGCGTTGCCAGTGCTCGATC	۸۶۲	۹۴°C ۱min	۵۸°C ۱min	۷۲°C ۱min
<i>bla_{CTX-M}</i> -F <i>bla_{CTX-M}</i> -R	CGCTTTGCGATGTGCAG ACCGCGATATCGTTGGT	۵۵۰	۹۴°C ۱min	۶۳°C ۱min	۷۲°C ۱min

نتایج

می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود در میان جدایه‌های تولید کننده ESBL، بیشترین مقاومت نسبت به سفوتاکسیم (۹۵,۶٪) و کمترین به پیراسیلین- تازوباکتام (۳۲,۶٪) مشاهده شد. در میان جدایه‌هایی که ESBL تولید نمی‌کردند بیشترین مقاومت به پیراسیلین (۳۷,۵٪) و کمترین به جنتامیسین (۲,۷٪) بود.

شکل ۱ قطعات حاصل از تکثیر ژن‌های مورد بررسی را در روش PCR نشان می‌دهد.

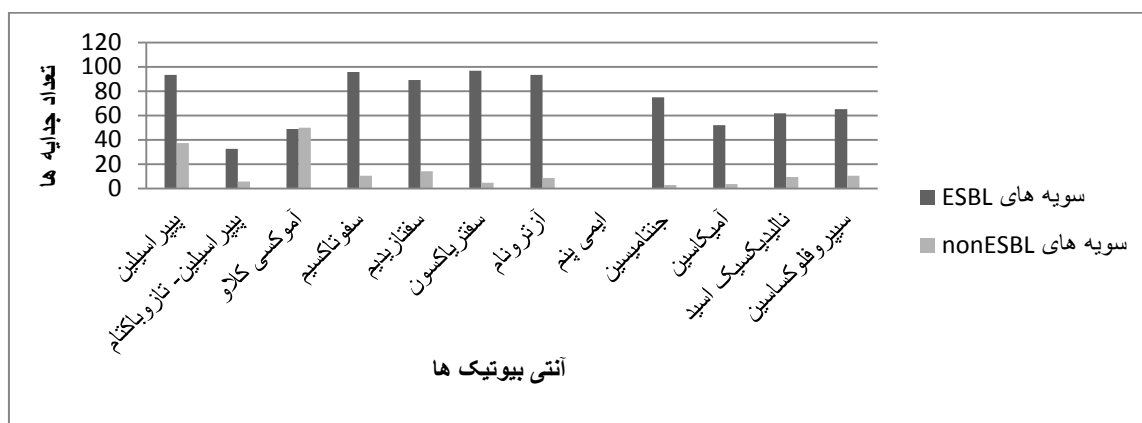
نتایج PCR، حضور ژن *bla_{CTX-M}* را در ۱۶۰ جدایه (۸۱,۶٪)، *bla_{TEM}* را در ۱۰۴ جدایه (۵۳,۰۶٪) و *bla_{SHV}* را در ۸۲ جدایه (۴۱,۸٪) نشان داد. در بین جدایه‌های تولیدکننده ESBL، ۷۷ جدایه (۸۳,۶٪) دارای ژن *bla_{CTX-M}*، ۵۷ جدایه (۶۱,۹٪) دارای ژن

میزان مقاومت ۱۹۶ جدایه ادراری *K. pneumoniae* نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف: مقاومت به پیراسیلین ۶۶,۳٪، سفوتاکسیم ۵۰,۵٪، سفتازیدیم و آموکسی کلاو ۴۹,۴٪، آزترونام ۴۸,۴٪، سفتریاکسون ۴۷,۹٪، جنتامیسین ۳۶,۷٪، سیپروفلوکساسین ۳۶,۲٪، نالیدیکسیک اسید ۳۴,۱٪، آمیکاسین ۲۲,۴٪ و پیراسیلین- تازوباکتام ۱۸,۳٪ بود. لازم به ذکر است که همه جدایه‌ها به ایمی‌پنم حساس بودند.

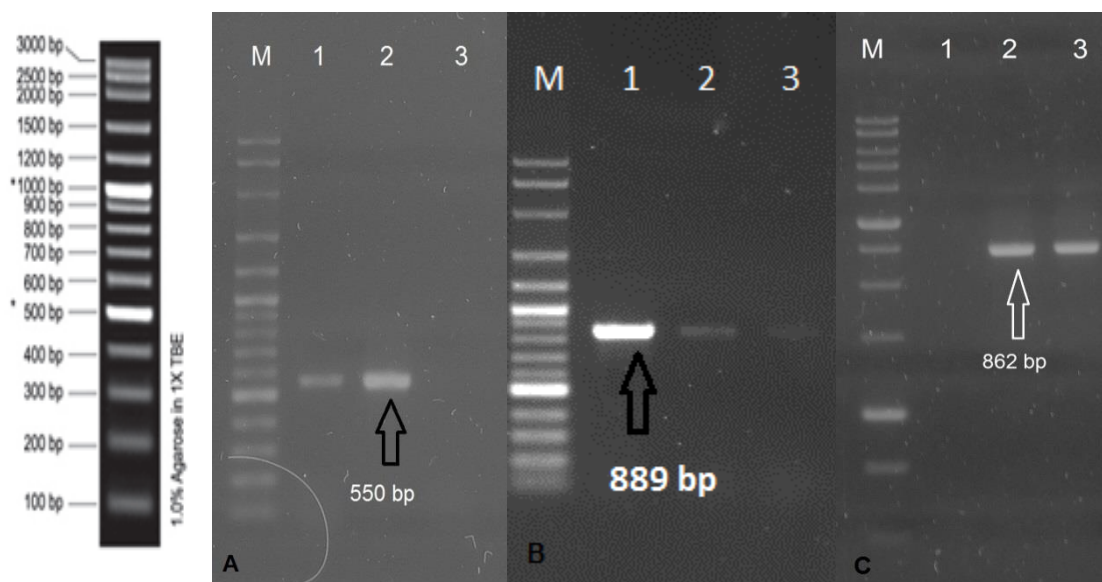
نتایج تست تولید ESBL با روش PCT نشان داد که ۹۲ جدایه (۴۶,۹٪) تولید کننده آنزیم‌های ESBL بودند. نمودار شماره ۱ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی را در ۲ گروه تولید کننده ESBL و غیرتولید کننده نشان

۴۷ جدایه (۴۵,۱٪) و *bla_{SHV}* در ۳۹ جدایه (۳۷,۵٪) یافت شدند. همچنین ۱۷ جدایه (۱۶,۳٪) حضور هر سه ژن را نشان دادند و تنها ۸ جدایه (۷,۷٪) فاقد این ژن بودند. این نتایج نشان می‌دهند که حضور ژن در شیشه (*in vitro*) لزوماً نشان دهنده بیان آن نیست.

bla_{TEM} و ۴۳ جدایه (۴۶,۷٪) دارای ژن *bla_{SHV}* بودند. در این میان، ۷ جدایه (۷,۶٪) فاقد هر ۳ ژن و ۲۴ (۲۶,۰۸٪) جدایه دارای هر ۳ ژن بودند. در بین جدایه‌های ESBL منفی، ژن *bla_{CTX-M}* در ۸۳ جدایه (۷۹,۸٪)، *bla_{TEM}*



نمودار شماره ۱: الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی در نمونه های مثبت و منفی ESBL



شکل شماره ۱: تصویر الکتروفورز ژل آگاروز. تکثیر ژن های *bla_{SHV}* و *bla_{TEM}* با ترتیب A و B و نشان داده شده اند. خط ۲ در تصاویر کنترل مثبت، در تصاویر سمت چپ و وسط، خط ۱ جدایه واجد ژن مربوطه و خط ۳ نشان دهنده جدایه فاقد ژن می‌باشد، در تصویر سمت راست خط ۳ جدایه واجد ژن مربوطه و خط ۱ نشان دهنده جدایه فاقد ژن می‌باشد. M: مارکر ۱۰۰ bp.

بحث

آنزیم‌های بتالاکتاماز بویژه انواع ESBL، از مهم‌ترین عوامل موثر در افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز از جمله سفالوسپورین‌های وسیع الطیف هستند. بنابراین تشخیص درست آزمایشگاهی برای جلوگیری از شکست درمانی ناشی از انتخاب نامناسب آنتی‌بیوتیک بسیار حائز اهمیت است (Poirel et al., 2001; Branger et al., 2005). مقایسه نتایج این تحقیق با نتایج حاصل از سایر تحقیقات گزارش شده از تهران نشان می‌دهد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های کلینیکی *K. pneumoniae* در حال افزایش می‌باشد (Shahcheraghi et al., 2007; Nasehi et al., 2010; Riyahi Zaniani et al., 2011; Eftekhar et al., 2006; Feizabadi et al., 2012). نتایج منتشر شده از تحقیقات علمی مختلف مربوط به تولید ESBL در ایران نیز بسیار متنوع است و میزان تولید ESBL در جدایه‌های *K. pneumoniae* بین ۸٫۹٪ تا ۷۵٫۷۵٪ گزارش شده است (Riyahi Zaniani et al., 2011). در این مطالعه ۴۶٫۹٪ جدایه‌های جمع‌آوری شده تولیدکننده ESBL بودند. یکی از دلایل تفاوت در مطالعات مختلف احتمالاً مربوط به منبع عفونت و نوع نمونه بررسی شده می‌باشد. همچنین گزارش‌های مربوط به میزان تولید ESBL در جدایه‌های کلینیکی *K. pneumoniae* از کشورهای مختلف نیز

تفاوت‌های فاحشی را نشان می‌دهند. بعنوان مثال، تولید ESBL در هندوستان (۴۴٫۴٪)، تایوان (۸٫۵-۲۹٫۸٪)، تایلند (۶۴٪)، کره (۲۲٫۵-۲۲٫۸٪) و پاکستان (۳۶-۵۶٫۹٪) گزارش شده است (Riyahi Zaniani et al., 2011). علاوه بر آن، این آمار در مراکز درمانی مختلف یک کشور نیز متفاوت می‌باشد. این مسئله بستگی به سیستم کنترل عفونت و رژیم درمانی دارد. مدت زیاد بستری شدن، مصرف زیاد آنتی‌بیوتیک (خصوصاً سفتازیدیم)، بستری شدن در بخش ICU و استفاده از سوندهای ادراری، موجب افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز از طریق تولید آنزیم‌های ESBL و در نهایت انتشار سویه‌های مقاوم در آن مرکز طبی می‌شود (Lucet et al., 1996). یک نگرانی ناشی از افزایش جدایه‌های تولیدکننده ESBL به دلیل آن است که چنین جدایه‌هایی معمولاً دارای مقاومت چندگانه دارویی نیز هستند.

نتایج مطالعات PCR در پژوهش حاضر برای بتالاکتامازهای *bla_{TEM}*، *bla_{CTX}* و *bla_{SHV}* وجود این آنزیم‌ها را به ترتیب ۸۱٫۶٪، ۵۳٫۰۶٪ و ۴۱٫۸٪ از جدایه‌های مورد بررسی نشان داد. افتخار و همکاران در سال ۲۰۱۲ حضور *bla_{SHV}* (۴۳٫۱٪)، *bla_{TEM}* (۳۵٫۲٪) و *bla_{CTX-M}* (۳۱٫۳٪) را در جدایه‌های ادراری *K. pneumoanie* نشان دادند (Eftekhar et al., 2012). ریاحی زینانی و

بعنوان شایع‌ترین نوع ESBL شناسایی شده است و به سرعت در میان پاتوژن‌های بیمارستانی و جامعه در حال گسترش است، همخوانی دارد (Livermore et al., 2005 ; Paterson et al., 2005). در ایران نیز *bla*_{CTX-M} بعنوان دومین ESBL شایع در میان جدایه‌های *K. pneumoniae* معرفی شده است (Nasehi et al., 2010 ; Riyahi et al., 2011).

تفاوت‌های مشاهده شده بین فنوتیپ و ژنوتیپ در این پژوهش نشان می‌دهد که ضمن اینکه روش‌های ژنتیک مولکولی در جهت تشخیص سریع ژن‌های عفونت‌زا و مقاومت در باکتری‌ها بسیار معمول هستند، تنها حضور ژن در میکروارگانیسم نشان دهنده بیان آن نیست و بیان ژن تحت تاثیر شرایط محیطی از جمله فشار حاصل از وجود آنتی‌بیوتیک تغییر می‌یابد.

همکاران نیز در سال ۲۰۱۰، به ترتیب میزان حضور *bla*_{SHV}، *bla*_{CTX-M} و *bla*_{TEM} را به ترتیب ۲۶٪، ۲۴٫۵٪ و ۱۸٪ گزارش کردند (Riyahi Zaniani, 2011). در یک مطالعه که روی جدایه‌های ۷ کشور انجام شد، حضور *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV} به ترتیب ۶۷٪ و ۱۶٪ گزارش شد (Paterson et al., 2003; Nasehi et al., 2010). این آمارها نشان می‌دهند که انتشار ژن بتالاکتامازهای *bla*_{CTX} نگران‌کننده می‌باشد.

در اکثر گزارشات فراوان‌ترین نوع بتالاکتامازها در میان جدایه‌های *K. pneumoniae* مشتقات گروه SHV و TEM بوده‌اند (Paterson et al., 2003; Nasehi et al., 2010). در این پژوهش، غالب‌ترین نوع بتالاکتاماز بود. این نتیجه با گزارشاتی که نشان می‌دهند *bla*_{CTX-M} در برخی نواحی جغرافیایی *bla*_{CTX-M}

منابع

- Branger, C. Zamfir, O. Geoffroy, S. Laurans, G. Arlet, G. Thien, H. Gourio, S. Picard, B. Denamurt, E. (2005). Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum β -lactamase type. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 11(1):54-61.
- Cheng, HR. Jiang, N. (2006). Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters*. 28:55-59.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2011). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty first informational supplements. Clinical and Laboratory Standards Institute. 31(1).

- Eftekhar, F. Rastegar, M. Golalipoor, M. Mansoursamaei, N. (2012). Detection of extended spectrum β -lactamases in urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae* in relation to Bla_{SHV} , Bla_{TEM} and Bla_{CTX-M} gene carriage. Iranian Journal of Public Health. 41(3):127-132.
- Feizabadi, MM. Etemadi, G. Yadegarinia, D. Rahmati, M. Shabanpoor, Sh. Bokaei, S. (2006). Antibiotic-resistance patterns and frequency of extended-spectrum β -lactamase-producing isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Tehran. Medical Science Monitor. 12(11): 362-365.
- Livermore, DM. Hawkey, PM. (2005). CTX-M: Changing the face of ESBLs in the UK. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 56:451-4.
- Lucet, JC. Chevert, S. Vanjak, D. Decre, D. Macrez, A. Wolff, M. (1996). Outbreak of multiple resistance Enterobacteriaceae in an intensive care unit: Epidemiology and risk factor acquisition. Clinical Infectious Diseases Journal. 22:430-6.
- MacFaddin, FJ. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd edn. Philadelphia. USA. P. 912.
- Nabil Karaha, B. Poirelc, L. Bengtsson, S. Sundqvist, M. Gunnar Kahlmeter, F. Nordmann, P. Arnfinn Sundsfjorda, B. Samuelsen, Q. (2010). Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6)-Ib-cr in *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* from Norway and Sweden. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 66: 425–431.
- Nasehi, L. Shahcheraghi, F. Nikbin, FS. Nematzadeh, Sh. (2010). PER, CTX-M, TEM and SHV β -lactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Tehran, Iran. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 13(3); 111-118.
- Paterson, DL. Hujer, KM. Hujer, AM. Yeiser, B. Bonomo, MD. Rice, LB. Bonomo, RA. (2003). Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV and CTX-M type β -lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47: 3554–60.
- Paterson, DL. Bonomo, RA. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. Clinical Microbiology Reviews. 18:657-86.
- Poirel, L. Weldhagen, GF. Naas, T. De Champs, C. Dove, MG. Nordmann, P. (2001). GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45(9): 2598-603.
- Riyahi Zaniani, F. Meshkat, Z. Naderinasab, M. Khajeh-Karamadini, M. Ghazvini, K. Rezaee, A. Esmaily, H. Nabavinia, MS. Darban Hoseini, M. (2011). The prevalence of TEM and SHV genes among extended-spectrum β -lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Iranian Journal Basic Medical Sciences. 15(1): 654-660.

- Shahcheraghi, F. Moezi, H. Feizabadi, MM. (2007). Distribution of TEM and SHV β -lactamase genes among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Tehran. Medical Science Monitor. 13: 247-250.
- Singh, S. (1999). Extended-Spectrum β -Lactamases: An overview. Diagnostic Laboratory Services. INC.
- Tice, AD. (1999). Short course therapy of acute cystitis: a brief review of therapeutic strategies. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 43: 85-93.