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

فرشته راعی[۱]
فرشته افتخار[۲]
محمدمهدی فیض‌آبادی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۲۶
تاریخ تصویب: ۹۳/۲/۲

چکیده

جدایه‌های Klebsiella pneumoniae پاتوژن‌های فرصت طلبی هستند که می توانند 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، عمدتا با ایجاد بتالاکتامازهای وسیع الطیف توسط باکتری، درمان عفونت‌های حاصل از این میکروارگانیسم با مشکل روبرو شده است. در این پژوهش، ۱۹۶ جدایه بالینی

[۱] گروه میکروب شناسی ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی
[۲] دانشیار . میکروب شناسی ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی f-eftekhar@sbu.ac.ir
[۳] گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.

Klebsiella pneumoniae مورد بررسی قرار گرفتند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشاراز 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 ایمی پنم 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 تولید کننده ESBL، غالب ترین 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. درمیان 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 وسیع الطیف، bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{CTX-M}، *Klebsiella pneumoniae*

مقدمه

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 می نماید (Branger et al., 2005). بررسی‌های آماری نشان می دهد که جدایه‌های *K. pneumoniae* پس از *E. coli* مقام دوم را در ایجاد عفونت‌های ادراری دارند (Tice, 1999).

آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام به عنوان خط اول درمان برای معالجه عفونت‌های ادراری وابسته به *K. pneumoniae* به کار می‌روند. هر چند، مصرف بی رویه این داروها سبب ایجاد مقاومت در باکتری‌ها، عمدتا با تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز شده است که باعث

هیدرولیز این آنتی‌بیوتیک‌ها 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 ß -lactamases یا ESBL) شده که قادر به هیدرولیز آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین، سفالوسپورین‌ها و نیز آزترونام هستند. این آنزیم ها با بروز جهش های نقطه ای در توالی اسید های آمینه بتالاکتامازهای اولیه نظیر TEM-1، TEM-2 و SHV-2 حاصل شده اند (Peterson et al., 2003). جدایه‌های *K. pneumoniae* به لحاظ تولید ESBL از اهمیت قابل ملاحظه ای 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 جدایه های ادراری *K. pneumoniae* و ارتباط آن با حضور ژن‌های bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{CTX-M} در این باکتری‌ها بوده است.

مواد و روش‌ها

باکتری ها

تعداد ۱۹۶ جدایه ادراری *K. pnemoniae* از اسفند سال ۱۳۸۶ تا آبان سال ۱۳۹۱ از بیمارستان امام حسین تهران جمع آوری شدند. بعد ازتایید 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. سویه های *K. pneumoniae* 207L (Accession number: GQ470427) مولد TEM، 550L. (Accession number: GQ470460) مولد SHV و Accession number: GQ 285L (470435-1) مولد CTX (فراهم شده توسط دکتر محمدمهدی فیض‌آبادی) به عنوان کنترل در آزمون PCR استفاده شدند.

مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها 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

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

تست فنوتیپی تولید ESBL

تولید ESBL توسط جدایه ها با استفاده از تست تاییدی فنوتیپی (Phenotypic Confirmatory Test, PCT) صورت گرفت (CLSI، 2011). دراین تست، جدایه هایی که درآنها 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 برروی 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 ۲٤ ساعت گرما گذاری در ۳۷ درجه سانتیگراد، افزایش قطر هاله عدم رشد به اندازه ٥ میلی متر یا بیشتر در اطراف دیسک های ترکیبی در مقایسه با هر آنتی بیوتیک به تنهایی نشان دهنده تولید ESBL بود.

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 شدکه 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., 2007; Nasehi et al., 2010). پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ مشاهده می‌شوند (Bioneer, Korea). مخلوط واکنش PCR (۲٥µl) حاوی ۱ µl میکرولیتر از DNA تخلیص شده، ۱µl مخلوط پرایمر Forward و Reverse با غلظت pM ۲۰ ، ۰,۱ µl مخلوط dNTP با غلظت µM ۲۰۰، ۰,۷٥ µl $MgCl_2$ (۱,٥mM)، ۲,٥ µl PCR Buffer 10X، ۰,۱ µl آنزیم *Taq* polymerase بود. تکثیر ژن‌های رمز کننده بتالاکتاماز در دستگاه ترموسایکلر (MyGene Series Peltiler 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 نمونه ها در ژل آگارز ۱٪ انجام شده و پس از رنگ آمیزی با RedSafe (Intron, Korea) نتایج با UV مشاهده شد.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرها و دماهای به کار رفته به منظور بررسی حضور ژن‌های bla_{TEM}, bla_{SHV} و bla_{CTX-M}

ژن	توالی پرایمر (5' to 3')	اندازه محصول PCR (bp)	PCR		
			Denaturation	Annealing	Extension
bla_{TEM}-F bla_{TEM} -R	GAGTATCAACATTTCCGTGTC TAATCAGTGAGGCACCTTCTC	۸۸۹	۹٤°C ۱min	٤٥°C ۱min	۷۲°C ۱min
bla_{SHV}-F bla_{SHV}-R	ATGCGTTATATTCGCCTGTG AGCGTTGCCAGTGCTCGATC	۸٦۲	۹٤°C ۱min	٥۸°C ۱min	۷۲°C ۱min
bla_{CTXM}-F bla_{CTXM}-R	CGCTTTGCGATGTGCAG ACCGCGATATCGTTGGT	٥٥۰	۹٤°C ۱min	٦۳°C ۱min	۷۲°C ۱min

نتایج

میزان مقاومت ۱۹٦ جدایه ادراری *K. pneumoniae* نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف: مقاومت به پیپراسیلین ٦٦,۳٪، سفوتاکسیم ٥۰,٥٪، سفتازیدیم و آموکسی کلاو ٤۹,٤٪، آزترونام ٤۸,٤٪، سفتریاکسون ٤۷,۹٪، جنتامیسین ۳٦,۷٪، سیپروفلوکساسین ۳٦,۲٪، نالیدیکسیک اسید ۳٤,۱٪، آمیکاسین ۲۲,٤٪ و پیپراسیلین- تازوباکتام ۱۸,۳٪ بود. لازم به ذکر است که همه جدایه ها به ایمی‌پنم حساس بودند.

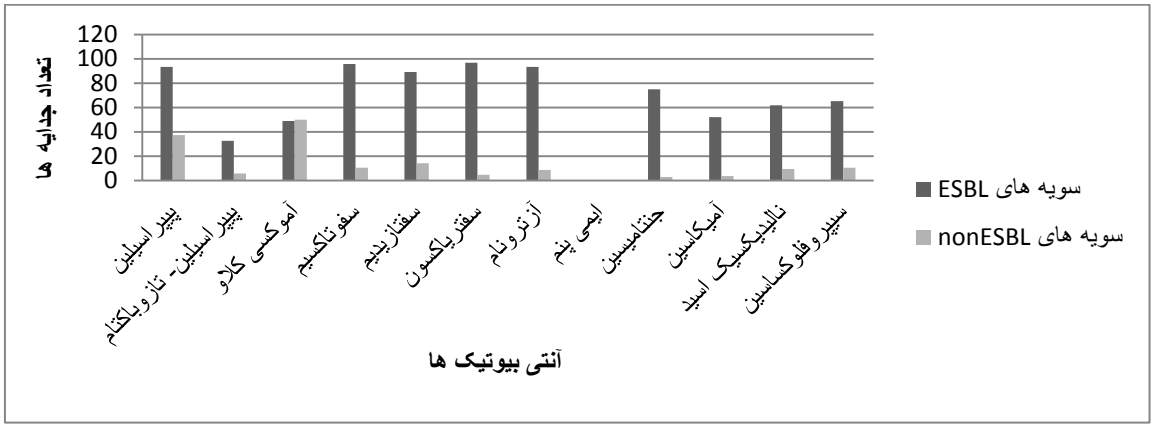
نتایج تست تولید ESBL با روش PCT نشان داد که ۹۲ جدایه (٤٦,۹٪) تولید کننده آنزیم‌های ESBL بودند. نمودار شماره ۱ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی را در ۲ گروه تولید کننده ESBL و غیرتولید کننده نشان می دهد. همانطور که مشاهده می‌شود در میان جدایه‌های تولید کننده ESBL، بیشترین مقاومت نسبت به سفوتاکسیم (۹٥,٦٪) و کمترین به پیراسیلین- تازوباکتام (۳۲,٦٪) مشاهده شد. در میان جدایه‌هایی که ESBL تولید نمی‌کردند بیشترین مقاومت به پیپراسیلین (۳۷,٥٪) و کمترین به جنتامیسین (۲,۷٪) بود.

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

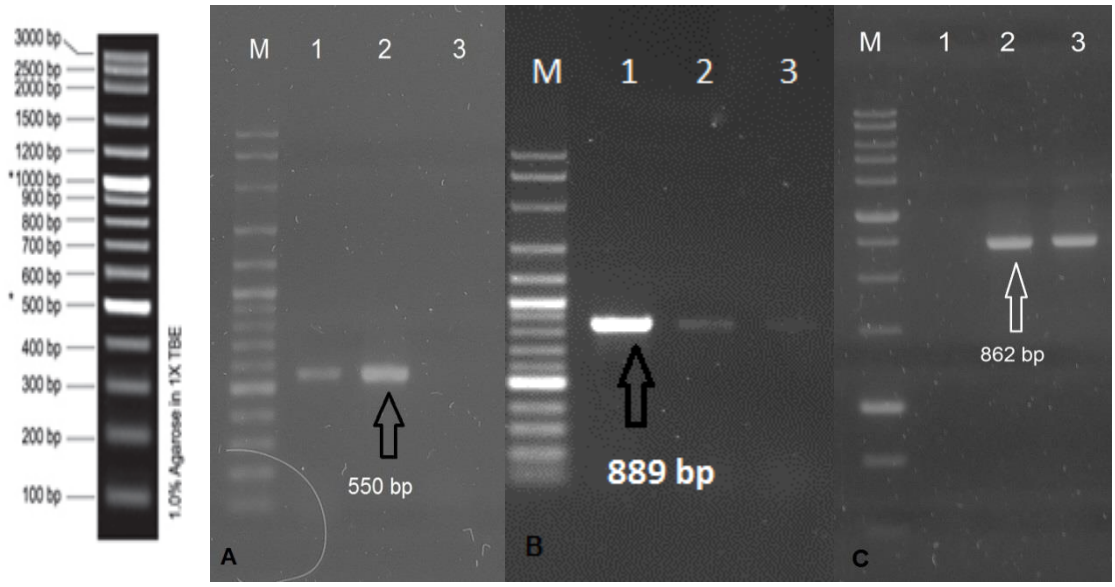
نتایج PCR، حضور ژن bla_{CTX-M} را در ۱٦۰ جدایه (۸۱,٦٪)، bla_{TEM} را در ۱۰٤ جدایه (٥۳,۰٦٪) و bla_{SHV} را در ۸۲ جدایه (٤۱,۸٪) نشان داد. دربین جدایه‌های تولیدکننده ESBL، ۷۷ جدایه (۸۳,٦٪) دارای ژن bla_{CTX-M}، ٥۷ جدایه (٦۱,۹٪) دارای ژن

bla_{TEM} و ٤٣ جدایه (٤٦,٧٪) دارای ژن bla_{SHV} بودند. در این میان، ٧ جدایه (٧,٦٪) فاقد هر ٣ ژن و ٢٤ (٢٦,٠٨٪) جدایه دارای هر ٣ ژن بودند.

در بین جدایه‌های ESBL منفی ، ژن bla_{CTX-M} در ٨٣ جدایه (٧٩,٨٪) ، bla_{TEM} در ٤٧ جدایه (٤٥,١٪) و bla_{SHV} در ٣٩ جدایه (٣٧,٥٪) یافت شدند. همچنین ١٧ جدایه (١٦,٣٪) حضور هر سه ژن را نشان دادند و تنها ٨ جدایه (٧,٧٪) فاقد این ژن بودند. این نتایج نشان می‌دهند که حضور ژن در شیشه (*in vitro*) لزوما نشان دهنده بیان آن نیست.



نمودار شماره ١: الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی در نمونه های مثبت و منفی ESBL



شکل شماره ١: تصویر الکتروفورز ژل آگاروز. تکثیر ژن های bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV} بترتیب با A،B و C نشان داده شده اند. خط ٢ در تصاویر کنترل مثبت، در تصاویر سمت چپ و وسط، خط ١ جدایه واجد ژن مربوطه و خط ٣ نشان دهنده جدایه فاقد ژن می‌باشد، در تصویر سمت راست خط ٣ جدایه واجد ژن مربوطه و خط ١ نشان دهنده جدایه فاقد ژن می‌باشد . M: مارکر ١٠٠ bp.

بحث

آنزیم های بتالاکتاماز بویژه انواع ESBL، از مهم ترین عوامل موثر در افزایش مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام از جمله سفالوسپورین‌های وسیع الطیف هستند. بنابراین تشخیص درست آزمایشگاهی برای جلوگیری از شکست درمانی ناشی از انتخاب نامناسب آنتی بیوتیک 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 آنتی بیوتیکی 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., 2012; Feizabadi et al., 2006). 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 گزارش های مربوط به میزان تولید ESBL در جدایه های کلینیکی *K. pneumoniae* از کشورهای مختلف نیز تفاوت های 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 درمراکز درمانی مختلف یک کشور نیز متفاوت می باشد. 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 باکتری ها به آنتی بیوتیکهای بتا لاکتام از طریق تولیدآنزیم های 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 نیزهستند.

نتایج مطالعات PCR درپژوهش 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

همکاران نیز در سال ۲۰۱۰، به ترتیب میزان حضور bla_{SHV}، $bla_{CTX\text{-}M}$ و bla_{TEM} را بترتیب 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} bla_{TEM} و bla_{SHV} رو به افزایش بوده و 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، $bla_{CTX\text{-}M}$ غالب‌ترین نوع بتالاکتاماز بود. این نتیجه با گزارشاتی که نشان می‌دهند $bla_{CTX\text{-}M}$ در برخی نواحی جغرافیایی $bla_{CTX\text{-}M}$ 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 $bla_{CTX\text{-}M}$ بعنوان دومین ESBL شایع در میان جدایه‌های *K. pneumoniae* معرفی شده است (Nasehi et al., 2010 ; Riyahi Zaniani et al., 2011).

تفاوت‌های مشاهده شده بین فنوتیپ و ژنوتیپ در این پژوهش نشان می دهد که ضمن اینکه روش‌های ژنتیک مولکولی در جهت تشخیص سریع ژن‌های عفئنت زا و مقاومت در باکتری ها 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 آنتی بیوتیک تغییر می یابد.

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 ß-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 ß-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. Bengtssond, S. Sundqvistd, M. Gunnar Kahlmeterd, F. Nordmannc, P. Arnfinn Sundsfjorda, B. Samuelsena, 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 ß-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 ß-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV and CTX-M type ß-lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47: 3554–60.

Paterson, DL. Bonomo, RA. (2005). Extended-spectrum ß-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 ß-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 ß- 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 ß-lactamase genes among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Tehran. Medical Science Monitor. 13: 247-250.

Singh, S. (1999). Extended-Spectrum ß-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.