مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۵، شماره ۴، زمستان ۹۴، صفحات ۲۷۷ تا ۲۸۲

Original Article

بررسی شیوع ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} در ایزوله های کلبسیلا مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در شهر کرج

شرف الدین عسگری[۱]، اعظم حدادی[۲]، ناصر هرزندی[۲]

[۱] *کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج*
[۲] *استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج*

چکیده

سابقه و هدف: *انواع مختلفی از بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) از قبیل bla_{TEM} و bla_{SHV} به طور برجسته در سویه‌های کلبسیلا حضور دارند. هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و اکسی‌توکا مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف جداسازی شده از نمونه های ادراری در کرج بود.*

روش بررسی: *از ۱۰۰ ایزوله کلبسیلای جداسازی شده از نمونه‌های ادراری، باکتری‌های مولد ESBLs با روش دابل دیسک دیفیوژن توسط دیسک‌های ترکیبی مشخص شدند. سپس DNAهای استخراج شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} مورد بررسی قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *میزان مقاومت ایزوله‌ها نسبت به سفتازیدیم و سفوتاکسیم ۲۴٪ مشخص شد. ۲۵ ایزوله (۲۵٪) به عنوان نمونه‌های مولد ESBLs تایید شدند که از این تعداد ۲۳ نمونه (۹۲٪) کلبسیلا پنومونیه و ۲ نمونه (۸٪) کلبسیلا اکسی‌توکا بودند. وجود ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} به ترتیب در ۸۰٪ (۲۰ نمونه) و ۸۸٪ (۲۲ نمونه) ایزوله‌های مولد ESBLs مشاهده شد.*

نتیجه‌گیری: *SHV آنزیم غالب در بین سویه‌های کلبسیلای مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌باشد. میزان بالای مقاومت سویه‌های واجد ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} به سفالوسپورین‌های نسل سوم از قبیل سفوتاکسیم و سفتریاکسون یک معضل محسوب شده و درمان عفونت‌های ناشی از این پاتوژن‌ها را مستلزم توجه مضاعفی به الگوی مقاومت این سویه‌ها می‌نماید.*

واژگان کلیدی: *کلبسیلا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عفونت دستگاه ادراری، ESBLs، SHV، TEM.*

مقدمه

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در اکثر باکتری‌های پاتوژن مشکل فزاینده‌ای بوده و معضل اصلی برای درمان عفونت‌های اکتسابی بیمارستانی می‌باشد (۱). کلبسیلا پنومونیه یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌ها در ایجاد عفونت‌های مجاری ادراری (UTIs) در بیماران بستری دارای نقص ایمنی یا بیماری‌های زمینه‌ای حاد می‌باشد (۲). در سال‌های اخیر به دنبال مصرف گسترده سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف، معضل آلودگی با کلبسیلا پنومونیه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف به صورت گسترده از سراسر دنیا گزارش شده است. تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، عمده‌ترین مشکل در استفاده از نسل جدید سفالوسپورین‌ها می‌باشد. بستری شدن طولانی مدت، ابتلا به دیابت، سن بالای ۶۰ سال و سابقه درمان آنتی‌بیوتیکی به عنوان عوامل خطر در آلودگی توسط سویه‌های مولد ESBL گزارش شده‌اند (۳). انواع مختلفی از بتالاکتامازهای وسیع الطیف مثل TEM، SHV، CTX، PER، OXA، AmpC و... شناسایی شده‌اند، اما اکثر بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از موتاسیون در ژن‌های کلاسیک TEM

آدرس نویسنده مسئول: کرج، انتهای رجائی شهر، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد کرج، اعظم حدادی
(**email**: Haddadi@kiau.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۱۱/۲۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۴/۴/۲

جدول ۱. ویژگی پرایمر های مورد استفاده برای تکثیر ژن های blaTEM و blaSHV

منبع	ژن	دمای اتصال	اندازه (bp)	توالی ('۵ به '۳)	نام پرایمر
۱۴	bla_{TEM}	۶۰°C	۸۴۸	GAGTATTCAACATTTCCGTGTC	TEM-F
				TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	TEM-R
	bla_{SHV}	۶۰°C	۲۳۱	AAGATCCACTATCGCCAGCAG	SHV-F
				ATTCAGTTCCGTTTCCCAGCGG	SHV-R

(Temoneira) وSHV (Sulphydryl variable) با جایگزینی یک یا تعداد بیشتر اسید آمینه در ناحیه فعال آنزیم مشتق می‌شوند (۴)؛ این آنزیم‌ها اغلب در اشرشیا کولای و کلبسیلا پنومونیه یافت می‌شوند (۵). بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مشتق از TEM و SHV روی پلاسمیدهای بزرگی حمل می‌شوند و اغلب همراه با سایر شاخص‌های مقاومت به سویه‌های مختلفی از یک جنس یا سایر جنس‌های خانواده انتروباکتریاسه انتقال می‌یابند (۶). اولین بتالاکتاماز وابسته به پلاسمید در باکتری های گرم منفی، TEM-1 بود که در اوایل دهه ۱۹۶۰ توصیف شد (۷). پس از آن TEM-1 از کلبسیلا در اروپا سال ۱۹۸۰، در آلمان سال ۱۹۸۳، و در فرانسه سال ۱۹۸۵ شناسایی شد (۸). ESBLsهای نوع TEM از TEM-1 و TEM-2 مشتق شده‌اند (۹). SHV خانواده‌ای از بتالاکتامازهاست که از گونه‌های کلبسیلا مشتق شده است. SHV-1 به صورت جهانی در کلبسیلا پنومونیه یافت می‌شود و از ژن کروموزومی در گونه‌های کلبسیلا منشا می‌گیرد که بعداً در پلاسمید قرار گرفته و در بین سایر گونه‌های انتروباکتریال انتشار یافته است (۴). موتاسیون اختصاصی در ساختار ژن blaSHV-1 باعث گسترش توانایی‌های هیدرولیز SHV-1 برای هیدرولیز سفالوسپورین‌های گسترده طیف و مونوباکتام‌ها می‌شود (۱۰). هدف از این مطالعه، بررسی شیوع ژن‌های کد کننده SHV و TEM، مولد ESBLs در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه و اکسی‌توکای جدا شده از نمونه‌های ادراری بیماران بستری و سرپایی مراجعه کننده به مراکز درمانی در کرج بود.

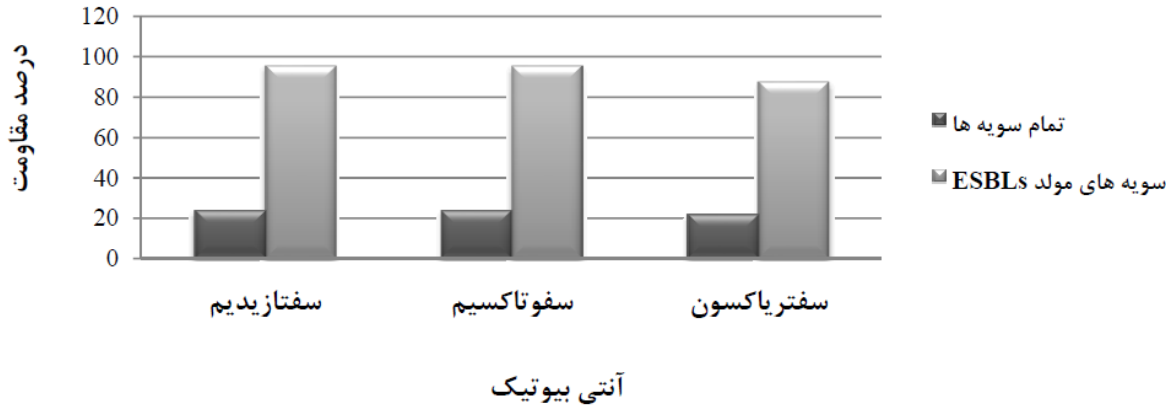
مواد و روشها

جمع‌آوری نمونه

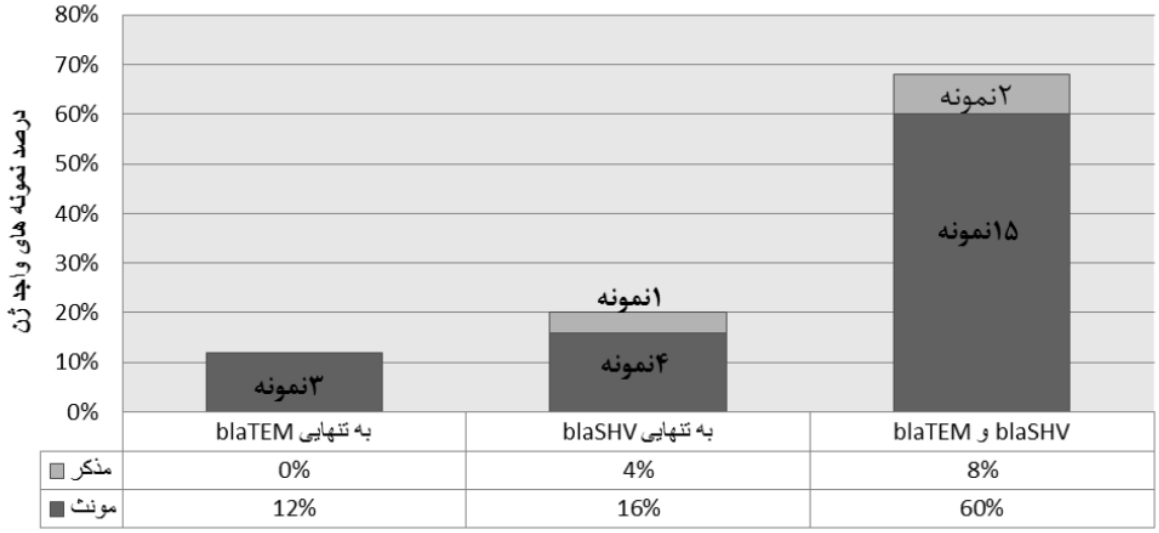
در این مطالعه مشاهده‌ای – توصیفی، در مجموع ۱۰۰ ایزوله اوروپاتوژن کلبسیلا از بیماران بستری و سرپایی مراجعه کننده به چند بیمارستان و آزمایشگاه تشخیص طبی در شهر کرج (از تیر تا اسفند ۱۳۹۲) جمع‌آوری شدند. تعیین هویت ایزوله‌ها توسط کیت API 20 E انجام شد. سویه کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 حاوی بتالاکتاماز های نوع bla_{TEM} و bla_{SHV} به عنوان کنترل مثبت و سویه اشرشیا کولای ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش کنترل کیفی دیسک‌ها توسط سویه استاندارد اشرشیا کولای ATCC 25922 انجام شد و نتایج با جدول ارائه شده توسط پروتکل CLSI مطابقت داده شد (۱۱). شناسایی ایزوله‌های کلبسیلای مولد ESBLs با روش‌های پیشنهادی CLSI یعنی روش غربالگری اولیه توسط سه دیسک آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفتریاکسون (ساخت شرکت پادتن طب) با تهیه سوسپانسیون نیم مک فارلند و کشت روی محیط مولر هینتون آگار (ساخت شرکت MERK) و انجام آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن توضیح داده شده در روش کربی بائر و همچنین آزمایش تاییدی توسط دیسک‌های آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم، سفتازیدیم-کلاولانیک اسید و سفوتاکسیم، سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید (ساخت شرکت پادتن طب) انجام گرفت (۱۲،۱۱).

استخراج DNA

DNA نمونه‌های شناسایی شده به عنوان مولد ESBLs با استفاده از روش جوشاندن استخراج و جهت انجام واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت (۱۳). توالی پرایمرهای استفاده شده جهت شناسایی ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} و دمای اتصال بهینه شده آنها در جدول ۱ نمایش داده شده است. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر از 10×PCR reaction buffer، ۲۰۰ dNTPs میکرومولار، $MgCl_2$ ۲۰۰ میلی مولار، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم تک پلیمراز (500 U/ml) تهیه و ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده به آن اضافه شد. واکنش PCR برای ژن‌های TEM و SHV به صورت واسرشته سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و سپس در ۳۵ دوره PCR به ترتیب واسرشته سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمر ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و طویل سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام گرفت، در نهایت یک مرحله طویل سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. محصول PCR در ژل



نمودار ۱. مقایسه فراوانی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورینی بین ایزوله‌های مولد ESBL و تمامی ایزوله‌های کلبسیلا

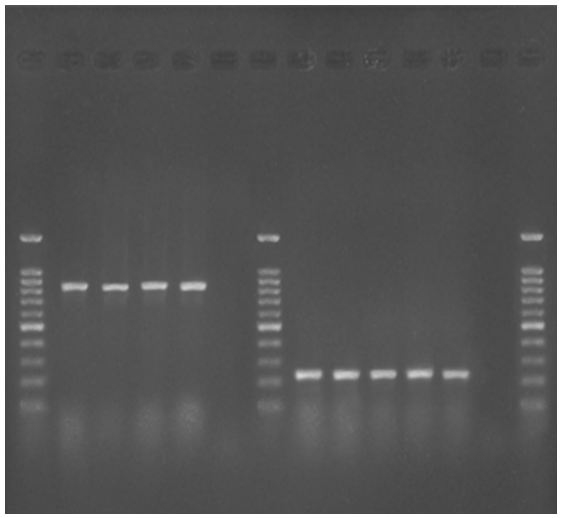


نمودار ۲. فراوانی توزیع ژن‌های blaTEM و blaSHV بر حسب جنسیت

آگارز ۱/۲٪ توسط دستگاه ژل داکیومنتیشن مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

از تعداد ۱۰۰ نمونه تایید شده کلبسیلا، ۸۶ ایزوله (۸۶٪)، کلبسیلا پنومونیه و ۱۴ ایزوله (۱۴٪) کلبسیلا اکسی‌توکا تشخیص داده شدند. میزان مقاومت ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفتریاکسون به ترتیب ۲۴٪، ۲۴٪ و ۲۲٪ بود. ۲۵٪ از نمونه‌ها از طریق پروتکل تست تایید فنوتیپی به عنوان ایزوله‌های مولد ESBLs شناسایی شدند که از این تعداد سهم کلبسیلا پنومونیه در تولید ESBLs ۲۳ نمونه (۹۲٪) و کلبسیلا اکسی‌توکا ۲ نمونه (۸٪) تعیین شد. میزان مقاومت ایزوله‌های مولد ESBLs نسبت به آنتی‌بیوتیک های سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفتریاکسون به ترتیب ۹۶٪، ۹۶٪ و ۸۸٪ بود. نمودار ۱ مقایسه مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین ایزوله‌های مولد ESBLs و تمامی ایزوله‌ها را نشان می‌دهد. وجود ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} در ۲۵ ایزوله مولد ESBLs به ترتیب ۸۰٪ (۲۰ نمونه) و ۸۸٪ (۲۲ نمونه) مشاهده شد. نمودار ۲ توزیع ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} را بر حسب جنسیت نشان داده است. همان گونه از این نمودار پیداست از مجموع ۲۵ ایزوله مولد ESBLs، ۱۷ مورد (۶۸٪) حاوی هر دو ژن bla_{TEM} و bla_{SHV} بودند که از این تعداد ۲ نمونه از جنس مذکر (۸٪) و ۱۵ نمونه از جنس مونث (۶۰٪) جدا شده بودند. ۵ نمونه (۲۰٪) تنها ژن bla_{SHV} را داشتند که ۱ نمونه از جنس مذکر (۴٪) و ۴ نمونه از جنس مونث (۱۶٪) جدا شده بود. ۳ نمونه نیز (۱۲٪) تنها ژن bla_{TEM} را داشتند که همگی از جنس مونث جدا شده بودند. نتایج الکتروفورز محصول PCR برای تکثیر ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} در شکل ۱ نمایش داده شده است.



شکل ۱. ژل آگارز حاوی نمونه‌های PCR حاصل از تکثیر ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} . M : چاهک مارکر bp ۱۰۰، چاهک ۴-۲ و ۱۰-۷: ایزوله های بالینی مثبت، چاهک ۱ و ۶ کنترل مثبت (کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603)، چاهک ۵ و ۱۱: کنترل منفی (اشرشیا کولای ATCC 25922)

بحث

عفونت دستگاه ادراری شایع‌ترین نوع عفونت بیمارستانی بوده و ۴۳-۲۳ درصد کل عفونت‌های بیمارستانی را شامل می‌شود. کلبسیلا در ۱۷-۶ درصد عفونت‌های مجاری ادراری نقش داشته و در بین باکتری‌های گرم منفی دومین عامل عفونت های ادراری پس از اشرشیا کولای می‌باشد (۱۶،۱۵). در سال های اخیر به دنبال مصرف گسترده سفالوسپورین‌های وسیع طیف، فاجعه آلودگی با کلبسیلا پنومونیه های مولد بتالاکتامازهای گسترده طیف به صورت گسترده از سراسر دنیا گزارش شده است. تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف عمده ترین مشکل در استفاده از نسل جدید سفالوسپورین‌ها می باشد. در این مطالعه، بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد ۲۴٪ نمونه‌ها به دو سفالوسپورین نسل سوم (سفتازیدیم و سفوتاکسیم) مقاومت نشان می‌دهند. از مجموع ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا، ۲۵ ایزوله به عنوان نمونه‌های مولد ESBLs تایید شدند که از این تعداد سهم کلبسیلا پنومونیه در تولید ESBLs ۲۳ نمونه (۹۲٪) و کلبسیلا اکسی‌توکا ۲ نمونه (۸٪) تعیین شد که نسبت به میزان گزارش شده از کشورهای دیگر منطقه ما از قبیل هند (۹۷/۱٪)، ترکیه (۵۷٪) و کره جنوبی (۳۰٪) متفاوت می‌باشد (۱۹-۱۷). از این تعداد، ۲۰ ایزوله (۸۰٪) واجد ژن bla_{TEM} بودند که تعداد ۱۸ ایزوله (۹۰٪) کلبسیلا پنومونیه و ۲ ایزوله (۱۰٪) کلبسیلا اکسی‌توکا بودند. همچنین فراوانی ژن bla_{SHV} در نمونه‌های ESBLs مثبت ۲۲ ایزوله (۸۸٪) به دست آمد که از این تعداد ۲۱ ایزوله (۹۵/۴۵٪) کلبسیلا پنومونیه و ۱ ایزوله (۴/۵۴٪) کلبسیلا اکسی‌توکا بودند. از این نمونه‌ها، ۱۷ نمونه (۶۸٪) حاوی هر دو ژن bla_{TEM} و bla_{SHV} بودند، ۵ نمونه (۲۰٪) تنها ژن bla_{SHV} را داشتند و ۳ نمونه نیز (۱۲٪) تنها ژن bla_{TEM} را حمل می‌کردند. مطالعات مختلفی در ایران و جهان در ارتباط با شیوع ESBLs و فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی TEM و SHV وجود دارد. در مطالعات محققان ایرانی نیز میزان شیوع این ژن‌های مقاومت متفاوت بوده است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ توسط شاهچراغی و همکارانش در تهران انجام گرفت، مقاومت به سفتریاکسون (۲۷٪)، سفتازیدیم (۳۱/۳٪) و سفوتاکسیم (۳۲/۶۶٪) در بین ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه بیان شد. همچنین در این تحقیق، ۳۳ درصد نمونه‌ها فنوتیپ ESBLs را از خود نشان دادند، و میزان شیوع ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} در بین سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBLs به ترتیب ۳۲/۱٪ و ۶۹/۶٪ بیان شد (۲۰). در مطالعه‌ای دیگر که در سال ۲۰۱۰ توسط شاهچراغی و همکارانش در تهران انجام گرفت، نشان داده شد ۴۱ درصد نمونه‌های کلبسیلا پنومونیه به حداقل یکی از سفالوسپورین‌های نسل سوم مقاوم بوده و به علاوه ۳۸/۵ درصد از نمونه‌ها فنوتیپ ESBLs را از طریق تست تایید فنوتیپی نمایش دادند، درصد مقاومت به سفتازیدیم ۳۳/۴٪، سفوتاکسیم ۳۳/۵٪ و سفتریاکسون ۲۷٪ درصد به دست آمد، همچنین میزان حضور ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ۲۶٪ و ۱۸٪ بود (۳).

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۰ توسط فیض آبادی و همکارانش در تهران انجام شد، از مجموع ۸۹ کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری، ۶۲ نمونه (۶۹/۷٪) فنوتیپ ESBLs را نشان دادند، و شیوع ژن‌های کد کننده ESBLs در این ایزوله‌ها برای ژن bla_{TEM} ۵۴٪ و ژن bla_{SHV} ۶۷/۴٪ اعلام شد (۹). در این مطالعات نیز همانند تحقیق حاضر، شیوع ژن bla_{SHV} به مراتب بیشتر از bla_{TEM} گزارش شده است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۴ توسط Meyer و همکارانش در جنوب آفریقا انجام شد، از مجموع ۵۰ نمونه کلبسیلا پنومونیه مولد ESBLs، ۶۶٪ واجد هر دو ژن bla_{TEM} و bla_{SHV} بودند، و ۱۰٪ فقط ژن bla_{TEM} و ۱۸٪ فقط ژن bla_{SHV} را حمل می‌کردند (۲۱). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ توسط Hassan و همکارانش در عربستان سعودی انجام شد، از مجموع ۹۲ نمونه کلبسیلای مولد ESBLs، ۹۰ ایزوله

کلبسیلا پنومونیه و ۲ ایزوله کلبسیلا اکسی‌توکا بودند، و ۸۶٪ ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه ژن bla_{SHV} و ۴۸٪ ژن bla_{TEM} را حمل می‌کردند. از دو سویه کلبسیلا اکسی‌توکای مولد ESBLs، هر دو سویه ۱۰۰٪ ژن bla_{SHV} و ۱ سویه ۵۰٪ ژن bla_{TEM} را حمل می‌کردند (۲۲).

ظهور و گسترش سویه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف کلبسیلا یک نگرانی جدی است، چرا که استفاده از سفالوسپورین‌ها علیه این ایزوله‌ها کم تاثیر و بعضاً بی‌تاثیر می‌باشد. بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های مولد ESBLs بیانگر وجود میزان بالایی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین این ایزوله‌ها می‌باشد، چنان‌که در مورد آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورینی نسل سه استفاده شده در این مطالعه از قبیل سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفترياکسون به ترتیب مقاومت ۹۶٪، ۹۶٪ و ۸۸٪ را مشاهده می‌کنیم، در حالی که میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در سایر ایزوله‌ها به مراتب بسیار پایین‌تر می‌باشد که نشان دهنده ضرورت استفاده بهینه از این نسل از آنتی‌بیوتیک‌ها و جلوگیری از ایجاد فشار محیطی در جهت تبدیل سویه‌های منفی به مولد ESBLs را گوشزد می‌کند. میزان بالای مقاومت حد وسط ایزوله‌ها یک نگرانی جدی است، چرا که آنها ممکن است با ادامه استفاده از سفالوسپورین‌های نسل سوم به سویه‌هایی با مقاومت کامل تبدیل شوند. به علت اهمیت تولید ESBLs توسط ارگانیسم‌ها و سختی درمان بیماری‌های ایجاد شده توسط این باکتری‌ها، باید شناسایی سریع تولید ESBLs در ایزوله‌ها توسط آزمایشگاه‌های تشخیص طبی بر پایه آزمایش ساده توصیه شده توسط CLSI برای تایید تولید ESBLs در گونه‌های انتروباکتریاسه انجام گیرد. آزمایشگاه‌های خدماتی باید واجد برنامه‌هایی برای کنترل هر گونه آلودگی باشند. متاسفانه همکاری ضعیفی بین مراکز بالینی و آزمایشگاه‌ها در ایران وجود دارد که باید همواره این مساله را یادآوری کرد که درمان موثر عفونت‌های جدی جز با همکاری نزدیک بین مراکز درمانی و آزمایشگاه‌ها حاصل نمی‌شود.

تشکروقدردانی

بدین وسیله از مساعدت‌های بخش میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و کارکنان آزمایشگاه تشخیص طبی پویش در فراهم کردن امکانات انجام این پژوهش قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Monnet DL, Archibald LK, Phillips L, Tenover FC, McGowan JE JR, Gaynes RP. Antimicrobial use and resistance in eight US hospitals: complexities of analysis and modeling. Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology Project and National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol 1998; 19: 388-94.
2. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 589-603.
3. Nasehi L, Shahcheraghi F, Nikbin VS, Nematzadeh S. PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from Tehran, Iran. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2010; 13: 111-18.
4. Jain A, Mondal R. TEM and SHV genes in extended spectrum β-lactamase producing *Klebsiella* species and their antimicrobial resistance pattern. Indian J Med Res 2008; 128: 759-64.
5. Sharma J, Sharma M, Ray P. Detection of TEM & SHV genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary care hospital from India. Indian J Med Res 2010; 132: 332-36.
6. Khorshidi A, Rohani M, Moniri R. The prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β-lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered from Kashan hospital university, Iran. Jundishapur J Microbiol 2011; 4: 289-294.
7. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors In Enterobacteriaceae. Nature 1965; 208: 239-41.
8. Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. The continuing challenge of ESBLs. Curr Opin Pharmacol 2007; 7: 459-69.
9. Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni A, Aligholi M, Shahcheraghi F, et al. Distribution of blaTEM, blaSHV, blaCTX-M genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. Microb Drug Resist 2010; 16: 49-53.
10. Knothe H, Shah P, Krcmery v, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 1983; 11: 315-17.

11. CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard—9th ed. document M2-A9. 26:1. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2006.
12. Bauer AW, Kirby MM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. AM J Clin Pathol 1966; 36: 493–96.
13. Hammond DS, Schooneveldt JM, Nimmo GR, Huygens F, Giffard PM. blaSHV genes in *Klebsiella pneumoniae*: different allele distributions are associated with different promoters within individual isolates. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 256-63.
14. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum β-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2385–92.
15. Babypadmini S, Appalaraju B. Extended spectrum β-lactamases in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* prevalence and susceptibility pattern in a territory care hospitals. Indian J Med Microbe 2004; 22: 172-74.
16. Gasmier P. Nosocomial urinary tract infection: many unresolved question. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 521-22.
17. Jeong SH, Bae IK, Lee JH, Sohn SG, Kang GH, Jeon GJ, et al. Molecular characterization of extended- spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and Escherichia coli from a Korean nationwide survey. J Clin Microbiol 2004; 42: 2902–906.
18. Lal P, Kapil A, Das BK, Sood S. Occurrence of TEM and SHV gene in extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella* sp. isolated from a tertiary care hospital. Indian J Med Res 2007; 125: 173-78.
19. Tasli H, Bahar IH. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based enterobacteriaceae in Turkey. Jpn J Infect Dis 2005; 58:162-67.
20. Shahcheraghi F, Moezi H, Feizabadi MM. Distribution of TEM and SHV b-lactamase genes among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Tehran. Med Sci Monit 2007; 13: 247-50.
21. Meyer L, Labuschagne CDJ, Ehlers MM, Dove MG, Weldhagen GF. Diversity of bla-type genes in extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated during 2003-2004 at Pretoria Academic Hospital. The Southern African Journal of Epidemiology and Infection 2007; 22: 5-7.
22. Hassan MI, Alkharsah KR, Alzahrani AJ, Obeid OE, Khamis AH, Diab A. Detection of extended spectrum beta-lactamases-producing isolates and effect of AmpC overlapping. J Infect Dev Ctries 2013; 7: 618-29.