

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شناسایی ژن‌های *TEM* و *SHV* کلبسیلا پنومونیه جدا شده از دستگاه تنفس بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه

بیمارستانی شهر کرمان

علی‌رضا اسلامی^۱، دکتر بابک خیرخواه^{۲*}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، کرمان، ایران

۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، کرمان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آنتی‌بیوتیک، موجب شکست درمان با طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج در بخش مراقبت‌های ویژه می‌گردد. این مطالعه به منظور تعیین هویت مولکولی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی کلبسیلا پنومونیه جدا شده از دستگاه تنفس بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش توصیفی- مقطعی، ۵۰ نمونه هدفمند از ترشحات دستگاه تنفسی بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های شهر کرمان به مدت ۵ ماه مورد مطالعه قرار گرفت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ۸ آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم، سفووتاکسیم، سفتریاکسون، ایمپی‌پنم، سیپروفلوکسازین، آمیکاسین، آزترونام و سفالوتین تعیین گردید. آزمایش PCR جهت شناسایی ژن‌های *TEM* و *SHV* انجام و هویت مولکولی ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی این جدایه‌ها مشخص شد.

یافته‌ها: بیشترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به ایمپی‌پنم (۹۴٪) و بیشترین مقاومت به سفالوتین (۶۴٪) بود. همچنین، ۵۶٪ از جدایه‌ها به صورت فنوتوپی مولد (extended spectrum beta-lactamases) ESBL بودند. در ۲۸ ایزوله مولد ESBL، bla_{SHV+TEM} به تنها ۴/۳٪ دارای هر دو ژن را نداشته و هیچ‌یک از جدایه‌ها به تنها یکی دارای bla_{SHV} و تنها ۶۴٪ bla_{TEM} بودند.

نتیجه‌گیری: فراوانی کلبسیلاهای دارای ژن‌های بتالاکتماز وسیع الطیف در بیماران بستری ایجاد می‌نماید تا با روش‌های تشخیص سریع و دقیق مولکولی در شناسایی و تعیین نوع مقاومت ژنتیکی، میزان شیوع ایزوله‌های مقاوم باکتری‌ها را مورد ارزیابی قرار داده و تدبیر لازم جهت درمان بیماران و کنترل مقاومت در باکتری‌ها را به مورد اجرا گذاشت.

وازگان کلیدی: بتالاکتماز با طیف وسیع، کلبسیلا پنومونیه، بخش مراقبت‌های ویژه، PCR

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Eslami A, Kheirkhah B. Study of antibiotic resistance and identification of *TEM* and *SHV* *Klebsiella pneumoniae* genes isolated from respiratory system of patients in Intensive Care Unit in Kerman. Pejouhandeh 2015;20(3):149-153.

مقدمه

در بیمارستان‌های آمریکا ۵ تا ۱۰ درصد است، که حدود ۱ درصد آنها کشنده و ۴ درصد دیگر در مرگ و میر دخالت داشته و حدود ده میلیون دلار در سال هزینه دارند (۱). این عفونت‌ها از علل شایع و مهم مرگ و میر، ناتوانی، افزایش طول مدت بستری، افزایش هزینه‌های بیمارستانی و بروز مشکلات بهداشتی هستند (۲).

اگرچه روش‌های به کار رفته در زمینه‌ی کنترل عفونت‌های بیمارستانی، با موفقیت‌هایی همراه بوده است، اما انجام برخی مداخلات پزشکی مکرر از جمله مصرف وسیع داروهای مهارکننده سیستم ایمنی و آنتی‌بیوتیک‌ها، موجب افزایش

عفونت‌های بیمارستانی از جمله مهمترین مشکلات گریبان‌گیر تمامی بیمارستان‌ها در سرتاسر جهان بوده و هر دو گروه کشورهای در حال توسعه و توسعه‌یافته را تحت تأثیر قرار می‌دهد و یکی از دلایل اصلی مرگ و میر در کشورهای مختلف می‌باشد (۳). احتمال ابتلا به این عفونت‌ها

*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر بابک خیرخواه؛ دانشکده علوم، دانشگاه آزاد

اسلامی، واحد کرمان؛ تلفن: ۰۹۱۳۳۴۵۴۷۸۷؛ نامابر: ۲۱۱۵۸۰۳؛ پست

کترونیک: Babakkheirkhah@yahoo.com

بتالاکتمازهای پلاسمیدی، به توانایی اجزای قابل انتقال این ژن‌ها مرتبط است به طوری که بسیاری از ژن‌های کدکننده‌ی این آنزیم‌ها به راحتی میان پلاسمیدها و بین ارگانیسم‌های مختلف قابل انتقال هستند (۱).

هدف از این مطالعه، شناسایی فنوتیپیک مقاومت جدایه‌های کلبسیلا پنومونیک دستگاه تنفس بیماران بستری در بخش مراقبت‌های بیمارستانی شهر کرمان به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتماز وسیع‌الطیف مورد استفاده و شناسایی ژن‌های *TEM* و *SHV* در این جدایه‌ها بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت توصیفی- مقطعی در سال ۱۳۹۳ در یک دوره ۵ ماهه، جمعاً روی ۵۰ نمونه‌ی جدا شده از ترشحات دستگاه تنفسی بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه‌ی سه بیمارستان شهر کرمان انجام گرفت.

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها با روش کربی- با بر مطابق با معیارهای CLSI (Clinical and Laboratory Standard) (MERK) سنجیده شد. محیط مولر هینتون آگار (Standard) به عنوان محیط انتخابی برای انجام آزمایش به کار رفت و برای شناسایی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیک تولیدکننده‌ی *ESBLs* از تست تأییدی فنوتیپی استفاده شد. دیسک‌های مورد آزمایش شامل سفتازیدیم کلاولانیک اسید (CAZ:30µg/CV:10µg) به همراه سفتازیدیم (CAZ:30µg) و سفوتاکسیم کلاولانیک اسید (CTX:30µg/CV:10µg) به همراه سفوتاکسیم (CTX:30µg) بود (زیست رویش) (۱۲) و با استفاده از جدول CLSI (۲۰۱۲) میزان حساسیت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک به صورت حساس، نیمه‌حساس و مقاوم گزارش شد (۱۳).

نمونه‌های خالص میکروب، جهت نگهداری و ذخیره‌سازی، در کرایوتیوب‌های حاوی محیط TSB و گلیسرول به نسبت ۶۰ به ۴۰ در دماهای ۲۰-۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردیدند. سپس، مراحل شناسایی ژن‌های *TEM* و *HVS* کلبسیلا پنومونیک تولیدکننده‌ی *ESBL* به شرح زیر انجام گرفت:

الف. استخراج DNA: پس از کشت ذخیره‌ی باکتریایی در نوترینت آگار (Merk)، یک کلنی در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل و در بن‌ماری ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. حجم برابر از کلروفرم و ایزوامیل الکل (شرکت ویژن پارس دلتا) (۷/۷ ۲۴:۱) به آب مقطر اضافه

افراد آسیب‌پذیر و تشدید و توسعه ایجاد مقاومت‌های قابل انتقال در عوامل بیماری‌زا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها شده است (۴). درمان عفونت‌های بیمارستانی با توجه به مقاومت بعضی از سویه‌های میکروبی بسیار مشکل بوده و به علت طولانی شدن زمان بستری بیماران، پرهزینه می‌باشد (۵). نظر به اهمیت موضوع، سازمان جهانی بهداشت، سال ۲۰۱۱ را به عنوان سال مقاومت آنتی‌بیوتیکی نام نهاد. این سازمان با در نظر گرفتن موارد مهمی مانند ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، استفاده صحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها و فروش آنتی‌بیوتیک‌ها فقط با نسخه‌ی پژوهش، کنترل عفونتها را جهت جلوگیری از مقاومت آنتی‌بیوتیکی به دولت‌ها توصیه نموده است (۶).

کلبسیلاها از پاتوژن‌های فرست طلب خانواده انتربوکتریاسه بوده و از سال ۱۹۸۴ به عنوان عامل عفونت‌های بیمارستانی و حامل مقاومت‌های چندگانه شناخته شده‌اند (۷). بیماران بستری با نقص سیستم ایمنی و مبتلا به بیماری‌های زمینه‌ای از جمله دیابت ملیتوس و اختلالات ریوی مزمن، از اهداف عمده‌ی این باکتری‌ها محسوب می‌شوند (۸). گروهی از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیک به علت مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی که به آنتی‌بیوتیک‌های متداول دارند و انتقال پلاسمیدی این ژن‌ها به گونه‌ها و جنس‌های دیگر انتربوکتریاسه، در سال‌های اخیر مسؤول طغیان عفونت‌های بیمارستانی زیادی در دنیا بوده‌اند، به طوری که امروزه جداسازی و شناسایی این سویه‌ها، یک چالش واقعی برای آزمایشگاه‌های تشخیصی می‌باشد (۹). برخی مطالعات، شیوع سویه‌های مقاوم این باکتری‌ها به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف را در بخش مراقبت‌های ویژه، ۲۸-۳۴ درصد ذکر نموده‌اند و این در حالی است که آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در پژوهشی را به خود اختصاص می‌دهند. امروزه، بتالاکتمازها قادرند علاوه بر سفالوسپورین‌های محدوداً و پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف و منوباً کتمها را نیز هیدرولیز کنند (۱۰).

تاکنون بیش از ۱۵۰ نوع *ESBL* از سراسر جهان گزارش شده که غالباً از باکتری‌های خانواده انتربوکتریاسه جداسازی شده‌اند. به دنبال رشد روز افزون ارگانیسم‌های تولیدکننده‌ی *ESBL* امروزه شاهد گزارش‌های متعددی مبنی بر شیوع گستردگی آنها در بخش‌های مراقبت ویژه (ICU) هستیم که این امر به طور عمده به دلیل مصرف داروهای بتالاکتم وسیع‌الطیف در این بخش می‌باشد. انتشار

ب. آزمایش PCR: شناسایی ژن‌های *SHV* و *TEM* با استفاده از پرایمر اختصاصی به کار رفته در PCR صورت گرفت (جدول ۱) (۱۴).

گردید. نمونه‌ها در ۸۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی حاوی DNA جدا و به میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید.

جدول ۱. پرایمرهای به کار رفته در PCR

پرایمر	سکانس الیگونوکلوتیدی	اندازه محصول (باز)
<i>SHV</i>	SHV F 5'-TCAGCGAAAAACACCTTG 3'	۴۷۱
	SHV R 5'-CCCGCAGATAAAATCACCA- 3'	
<i>TEM</i>	TEM F 5'-GAGTATTCAACATTTCCGTGTC- 3'	۸۶۱
	TEM R 5'-TAATCAGTGAGGCACCTATCTC- 3'	

منفی، بارگذاری شد. Ladder با حد تفکیک ۱۰۰ جفت باز، به عنوان نشانگر استاندارد استفاده شد.

یافته‌ها

بیشترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، مربوط به ایمی‌پنم (۶۴ درصد) و بیشترین مقاومت مربوط به سفالوتین (۶۴ درصد) بود (جدول ۲). ۵۶ درصد (۲۸ مورد) از جدایه‌ها به صورت فنوتیپی مولد ESBL مثبت بودند. از ۲۸ ایزوله‌ی مولد ESBL ۲۵ درصد (۷ مورد) واجد زن *bla_{SHV}* به تنها یاب و ۶۴/۳ درصد (۱۸ مورد) دارای هر دو ژن *bla_{SHV}* + *TEM* بودند. ۱۰/۷ درصد (۳ مورد) هیچ‌کدام از دو ژن را نداشتند. همچنین، هیچ‌یک از جدایه‌ها به تنها یاب دارای ژن *bla_{TEM}* نبودند.

استانداردهای کنترل مثبت مورد استفاده در این پژوهش عبارت بودند از سویه‌های ATCC 700603 برای ژن *SHV* و ATCC 43816 برای ژن *TEM* ATCC 25922 ATCC بود (۱۴). به منظور فراهم کردن شرایط مناسب جهت تکثیر DNA و اتصال پرایمراه، مخلوط ذکر شده به دستگاه ترمال سایکلر انتقال یافت و طبق پروتکل پرaba و همکاران (۱۴)، اقدام به تکثیر ژن‌های هدف تکثیر گردید. با توجه به وزن مولکولی محصول PCR، ژل آگاروز ۱/۵ درصد تهیه گردید و با اتیدیوم بروماید رنگ شد. سپس در تانک الکتروفوروز در محلول TBE غوطه‌ور گردید. برای بارگذاری نمونه‌ها، از بافر سنگین کنندگی (loading buffer 6x) استفاده شد. جهت اطمینان از صحت نتایج آزمایش در هر الکتروفوروز، یک کنترل مثبت و یک کنترل

جدول ۲. تعداد و درصد سویه‌های حساس یا نیمه حساس و مقاوم نسبت به ۸ آنتی‌بیوتیک.

مقاطوم (درصد) تعداد	نیمه حساس (درصد) تعداد	حساس (درصد) تعداد	غلظت دیسک (μg)	آنتی‌بیوتیک
۳۲(۶۴)	۶(۱۲)	۱۲(۲۴)	۳۰	سفالوتین
۲۰ (۴۰)	۱۱ (۲۲)	۱۹ (۳۸)	۳۰	آمیکاسین
۲۶ (۵۲)	۳ (۶)	۲۱ (۴۲)	۳۰	آزترونام
۲۹ (۵۸)	۵ (۱۰)	۱۶ (۳۲)	۳۰	سفوتاکسیم
۲۸ (۵۶)	۳ (۶)	۱۹ (۳۸)	۳۰	سفتازیدیم
۲۸ (۵۶)	۲ (۴)	۲۰ (۴۰)	۳۰	سفتریاکسون
۱۰ (۲۰)	۵ (۱۰)	۳۵ (۷۰)	۵	سیپروفلوکساسین
۱ (۲)	۲ (۴)	۴۷ (۹۴)	۱۰	ایمی‌پنم

مربوط به ایمی‌پنم با ۹۴ درصد بود. در مطالعه‌ای در بیمارستان‌های کشور چین طی سال‌های ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۲، میزان حساسیت به ایمی‌پنم در کلبسیلا پنومونیه ۹۴/۹ تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است (۱۴). در بررسی که توسط حدادی و همکاران (۱۳۸۳) روی بیماران بستری در بیمارستان سینا در شهر تهران انجام گرفت، مشخص شد که

بحث

در این پژوهش، برای نسختین بار در استان کرمان، مقاومت آنتی‌بیوتیکی کلبسیلا پنومونیه در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های شهر کرمان به دو روش کشت و مولکولی سنجیده شد. در مطالعه‌ی حاضر، بیشترین میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه،

توسط خورشیدی و همکاران در کاشان صورت گرفت، ژن‌های *TEM* و *SHV* مورد ارزیابی قرار گرفتند که ۳۷/۵ درصد از جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه حاوی ژن *TEM*، ۵۰ درصد حاوی ژن *SHV* و ۲۱/۸ درصد حاوی هر دو ژن بودند (۱۷). در مطالعات سایرین، میزان شیوع این ژن‌ها در کلبسیلا پنومونیه مورد ارزیابی قرار گرفته است، هر چند ژن *TEM* در سال‌های دهه‌ی ۱۹۸۰ و اوایل دهه‌ی ۱۹۹۰، شایع‌ترین ژن در *SHV* در بین تولیدکنندگان ESBL بوده است، اما امروزه اکثر نقاط و همچنین شهر نیویورک، شایع‌ترین ژن شناسایی شده است (۲۰). در مطالعه‌ی حاضر نیز میزان شیوع *SHV* بیش از *TEM* در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده‌ی بتالاکتاماز بوده است. در مطالعه‌ی حاضر، ۳ مورد (۱۰/۳٪) از سویه‌هایی که از طریق فنوتیپی، تولیدکننده‌ی ESBL بودند، فاقد ژن‌های *TEM* یا *SHV* بودند که به نظر می‌رسد به دلیل ژن‌های دیگری نظیر *CTX-M* که این خصوصیت را به باکتری اعطای می‌کنند، باشد که نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه، احساس می‌شود.

نتیجه‌گیری

شناسایی ژن‌های *TEM* و *SHV* در ۲۵ ایزوله از ۲۸ ایزوله تولیدکننده‌ی بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، از یک طرف ضرورت اتخاذ تدابیر عملی در مورد تجویز منطقی داروها را ایجاد نموده و از طرف دیگر، اهمیت بهره‌وری از روش‌های تشخیصی جدید و متدهای مولکولی در زمینه‌ی تشخیص مناطق ژنی ایجادکننده‌ی مقاومت آنتیبیوتیکی در باکتری‌ها را گوشزد می‌نماید.

بیشترین میزان حساسیت به ایمی‌پنم در کلبسیلا پنومونیه، ۹۲/۹ درصد بوده است که با نتایج ما مطابقت دارد (۱۵). در بررسی حاضر از ۵۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، تعداد جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL، ۲۸ مورد (۵۶ درصد) بود. فیض‌آبادی و همکاران در سال ۲۰۰۶ در تهران، میزان جدایه‌های ESBL مثبت جدا شده از نمونه‌های کلینیکی را ۴۴/۵ درصد تعیین کردند (۱۶). در بررسی که توسط خورشیدی و همکاران از آذر ۱۳۸۶ تا شهریور ۱۳۸۷ در بیمارستان شهید بهشتی کاشان صورت گرفت، ۳۲ درصد از ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL بودند (۱۷). بررسی که توسط ناصحی و همکاران ۲۰۰۶ تا ۲۰۰۷ در بیمارستان‌های تهران، روی بیماران بستری و سرپایی صورت گرفت، از ۲۰۰ مورد ایزوله کلبسیلا پنومونیه، ۷۷ مورد (۳۸/۵ درصد) مولد ESBL بودند (۱۸). در مطالعه‌ی اعتمادی و همکاران در سال ۸۲، میزان سویه‌های تولیدکننده‌ی ESBL، ۲۲ درصد گزارش شد (۱۹). در تمامی این مطالعات، میزان شیوع ESBL کمتر از نتایج بررسی ما بود که به نظر می‌رسد میزان سویه‌های ESBL مثبت، در حال افزایش است که می‌تواند ناشی از استفاده‌ی گستره‌ای داروهای بتالاکتام وسیع‌الطیف در بخش‌های مختلف بیمارستان باشد. در مطالعه‌ی حاضر، از ۲۸ ایزوله کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده‌ی *ESBL*، ۷ مورد (۲۵ درصد) واجد ژن *SHV* به تنها ی و ۱۸ مورد (۶۴/۳ درصد) واجد هر دو ژن *SHV* و *TEM* بودند. هیچ‌کدام از ایزوله‌ها به تنها ی دارای ژن *TEM* نبودند. در بررسی که توسط Prabha و همکاران در هندوستان انجام *SHV* گرفت، میزان ژن *TEM* ۲۰ درصد، *SHV* ۸/۴ درصد و *TEM* با هم، ۶۷/۳ درصد تعیین شد (۱۴). در پژوهشی که

REFERENCES

- Ducle G, Fabry J, Nicolle L, Girard R, Perraud M. Prevention of hospital-acquired infections, A practical guide, Department of Communicable Disease, Surveillance and Response. 2nd ed. Available from WHO/CDS/CSR/ EPH2012.
- Weinstein RA. Hospital acquired infections. In: Harrison principles of internal medicine. 16th ed. USA: Mc Graw Hill; 2005. p. 775-81.
- Arvanitidou M, Katikaridou E, Douboyes J, Tsakris, A. Prognostic factors for nosocomial bacteraemia outcome. J Hosp Infect 2006; (61): 219-24.
- Eriksen, HM, Iversen BG, Aavitsland P. Prevalence of nosocomial infections in hospital in Norway, 2002 and 2003. J Hosp Infect 2005; 60: 40-5.
- Unal S, Garcia-Rodriguez JA. Activity of meropeneme and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in the MYSTIC program, 2002-2004. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 53: 265-71.
- Lye DC, Kwa AL, Chlebicki P. World health day 2011: Antimicrobial resistance and practical solutions. Ann Acad Med Singapore 2011; 40(4): 156-2.
- Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998; (11): 589-603.

8. Babypadmini S, Appalaraju B. Extended Spectrum β -lactamases in urinary isolates of *Escherishia coli* and *Klebsiella pneumonia* prevalence and susceptibility pattern in a territory care hospitals, Indian. J Med Microbe 2004; 22(3): 172-4.
9. Da Silva RM, Traebert J, Galato D. Klebsiella pneumonia carbapenemase (KPC) producing *Klebsiella pneumonia*: a review of epidemiological and clinical aspects. Expert Opin Biol Ther 2012; 12(6): 663-71.
10. Kesselov M, Kolar M, Sauer P, KoukalovaD, Petrzelova J, Vágnerová I, et al. Molecular biology characteristics of ESBL *Klebsiella pneumonia* collected in the neonatal unit of the Teaching Hospital in Olomouc. Klin Microbiol InfekcLek 2005; 11(1) :20-4.
11. Jacoby GA, Munoz-Price LS. Mechanisms of Disease: The New β -Lactamases. N Engl J Med 2005; 352(4): 380-91.
12. Livermore DM. Guidance to diagnostic laboratories: laboratory detectionand reporting of bacteria with extended spectrum β -lactamases. Issued by Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory. Centre for Infections Health Protection Agency; 2008.
13. Cockerill FR, Patel JB, Alder J. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty- second informational supplement. January 2012; M100-S22,32(3).
14. Lal P, Kapil A, Das BK, Sood S. Occurrence of TEM & SHV gene in extended spectrum b-lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella* sp. Isolated from a tertiary care hospital. Indian J Med Res 2007; 173-8.
15. Hadadi A, Rasoulinejad M, Maleki Z, Mojtabahedzadeh M, Younesian M, Ahmadi SA, et al. Antimicrobial resistance patterns among gram-negative bacilli isolated from patients with nosocomial infections by E-test versus disk diffusion test. Tehran Univ Med J 2007; (65)4: 1-10. (Full Text in Persian)
16. Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni A, Aligholi M, Shahcheraghi F, et al. Distribution of bla(TEM), bla(SHV), bla(ctx-m), genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. Microb Drug Resist 2010; (16): 49-53.
17. Khorshidi A, Moazen Z, Rohani M, Moniri R. Prevalence of TEM1 & SHV1 genes in *Kelebsiella pneumoniae* with ESBL. J Mil Med 2009; 11(3): 149-53. (Full Text in Persian)
18. Nasehi L, Shahcheraghi F, Sadat Nikbin V, Shoeib N. PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lacamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* isolated from Tehran, Iran. Irain J Basic Med Sci 2010; 13(3): 111-8.
19. Feyzabadi M, Etemadi G, Sadeghian S, Asadi S, Amirkhani A, Shahrabi Farhani A, et al. Drug resistance patterns and prevalence of extended spectrum beta lactamase producers among isolates of *Klebsiella Pneumoniae* cultured from patients at Tehran Hospitals during 2003-2004. Tehran Univ Med J 2005; 63(7): 530-50. (Full Text in Persian)
20. Mackowiak PA, Yanagisawa N, Imamura A. HIV-positive man with ulceronecrotic skin lesions. Clin Infect Dis 2008; 47(8): 1068-109.