

## شیوع ژن‌های TEM1 و SHV1 در کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف

احمد خورشیدی<sup>۱</sup> PhD، زهرا موذن<sup>۱</sup> MSc، مهدی روحانی<sup>\*</sup> MSc

رضوان منیری<sup>۱</sup> PhD، غلامرضا شجری<sup>۱</sup> PhD، غلامعباس موسوی<sup>۱</sup> MSc، محمدمهدی امیری<sup>۱</sup> MSc

آدرس مکاتبه: گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران  
kia\_rohani@yahoo.com

تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۸۸/۱۰/۷

تاریخ اعلام وصول: ۸۸/۵/۲۱

### چکیده

**اهداف.** کلبسیلاها، پاتوژن‌های فرصت‌طلبی هستند که باعث عفونت‌های بیمارستانی می‌شوند. کلبسیلا پنومونیه در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی سهم عمده‌ای دارد. شیوع سویه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و مقاومت آنها به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در دهه اخیر افزایش روزافزونی داشته است. به دلیل اهمیت این آنزیم‌ها در کلبسیلا پنومونیه، این پژوهش به منظور بررسی آنها در این باکتری و میزان شیوع آن در بیمارستان شهید بهشتی کاشان انجام شد.

**روش‌ها.** این مطالعه توصیفی روی نمونه‌های کلینیکی (ادرار، خلط، زخم و غیره) جمع‌آوری شده از بخش‌های مختلف بیمارستان شهید بهشتی کاشان انجام گرفت. باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مشخص شدند و وجود آنها با روش دابل‌دیسک‌سینرژی تأیید گردید. DNAهای استخراج‌شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های SHV1 و TEM1 با روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته‌ها.** از ۱۰۰ مورد کلبسیلا پنومونیه جداشده، ۳۲ نمونه حاوی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بود. ۷ مورد (۲۱/۸٪) از این نمونه‌ها حاوی هر دو ژن SHV1 و TEM1 بودند. ۱۶ نمونه (۵۰٪) تنها ژن SHV1 و ۱۲ نمونه (۳۷/۵٪) تنها ژن TEM1 را داشتند.

**نتیجه‌گیری.** شیوع بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در کلبسیلا پنومونیه و الگوی مقاومت قابل توجه است، به طوری که ترکیبی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به همراه ممانعت‌کننده‌های بتالاکتامز فقط در عفونت‌های شدید توصیه می‌شوند. نوع و میزان مصرف آنتی‌بیوتیک و طول زمان بستری شدن در بیمارستان با تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف ارتباط مستقیم دارد.

**کلیدواژه‌ها:** بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، کلبسیلا پنومونیه، عفونت بیمارستانی

## مقدمه

از سال ۱۹۸۴، کلبسیلا پنومونیه حاوی مقاومت‌های چندگانه، به‌عنوان عامل عفونت‌های اکتسابی بیمارستانی شناخته شده است [۱]. میزان حاملین این باکتری، در محیط بیمارستان، جایی که کلونیزاسیون ارتباط مستقیمی با طول مدت بستری شدن در بیمارستان دارد، به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد. حتی کارکنان بیمارستان به میزان بالایی حامل کلبسیلا هستند.

طبق بررسی‌های سلدن، میزان حاملین کلبسیلا در بیماران بستری در حدود ۷۷٪ در مدفوع، ۱۹٪ در فارنکس و ۴۲٪ روی دست‌ها است که ارتباط مستقیمی با مصرف آنتی‌بیوتیک دارد؛ به‌طوری‌که درمان قبلی با آنتی‌بیوتیک، به میزان قابل توجهی در اکتساب کلبسیلا توسط بیماران تأثیر می‌گذارد [۲]. کلبسیلا عامل ۵ تا ۷/۵٪ کل عفونت‌های بیمارستانی است و عفونت‌های ناشی از آن در بخش کودکان و مراقبت‌های ویژه معضل بزرگی ایجاد می‌نماید. کلبسیلا یکی از چهار پاتوژن شایع در بخش مراقبت‌های ویژه است [۳، ۴، ۵]. همچنین میزان مرگومیر ناشی از پنومونی و باکتری می کلبسیلا بسیار بالاست.

هنگام تولید سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف، تمام سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و سایر گونه‌های کلبسیلا نسبت به آن حساس بودند، اما به‌سرعت سویه‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک‌ها نیز آشکار شدند. اولین سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به نسل سوم سفالوسپورین‌ها در سال ۱۹۸۳ در آلمان توسط نات و همکاران گزارش شد [۶، ۷]. به‌دنبال آن، گزارش‌های مشابهی مبنی بر شیوع سویه‌های کلبسیلا تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف که علاوه بر آمینوگلیکوزیدها نسبت به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف نیز مقاومت داشتند، از کشورهای مختلفی نظیر فرانسه، انگلستان، یونان، ایتالیا، هلند، ایالات متحده آمریکا، افریقای جنوبی، آسیا و بحرین منتشر شد [۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳]. بدین ترتیب مقاومت نسبت به نسل سوم سفالوسپورین‌ها به‌خصوص سفنازیدیم در اغلب ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه و کلبسیلا کسی‌توسا مشاهده شد [۹، ۱۲، ۱۳، ۱۴].

این ارگانیزم‌ها به‌دلیل اکتساب پلازمیدهایی که بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) و آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی را رمز می‌کنند، به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف و آمینوگلیکوزیدها مقاومت [۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸] و بدین ترتیب، احتمال درمان عفونت‌های کلبسیلائی توسط این آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار ضعیف است.

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف اغلب پلازمیدی هستند. از آنجایی که این پلازمیدها به‌راحتی در میان انواع مختلفی از انتروباکتریاسه‌ها انتقال می‌یابند، تجمع ژن‌های مقاومت منجر به ایجاد سویه‌های پلازمیدهایی با مقاومت چندگانه می‌شود. بنابراین، تعیین الگوی پلازمیدی این سویه‌ها ضروری است، چراکه در بررسی‌های اپیدمیولوژیک، درمان مناسب، کنترل و پیشگیری عفونت‌های بومی و

همه‌گیری‌شناسی ناشی از کلبسیلا از اهمیت بسزایی برخوردار است. شیوع عفونت‌های بیمارستانی ناشی از کلبسیلا پنومونیه، با واسطه پلازمیدهای خودانتقال‌دهنده‌ایست که بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف را رمز می‌کنند. شایع‌ترین ESBL‌های گزارش شده از کشورهای غربی و آسیایی، بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مشتق از TEM و SHV است که روی پلازمیدهای بزرگی حمل می‌شوند و اغلب همراه با سایر شاخص‌های مقاومت، به سویه‌های مختلفی از یک جنس یا سایر جنس‌های خانواده انتروباکتریاسه انتقال می‌یابند [۱۹]. بررسی‌ها نشان می‌دهند که SHV-1 شایع‌ترین بتالاکتاماز در ایزوله‌های کلینیکی کلبسیلا است و ۷۳-۱۱٪ ایزوله‌ها این آنزیم را دارند [۲۰]. بتالاکتاماز TEM-1 نیز در بسیاری از سویه‌های دیگر کلبسیلا، به‌تنهایی یا همراه با SHV-1 انتشار یافته است [۲۱، ۲۲].

در این تحقیق به بررسی وضعیت رایج گونه‌های کلبسیلائی حاوی ESBL جدا شده از بیمارستان شهید بهشتی کاشان در ارتباط با تعیین هویت ژنتیکی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری‌ها در ایجاد اپیدمیولوژی عفونت‌های بیمارستانی و مقاومت نسبت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها پرداخته شده است.

## روش‌ها

در این مطالعه در مجموع ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه از بیمارستان شهید بهشتی کاشان (از آذر ۱۳۸۶ تا شهریور ۱۳۸۷) با روش‌های بیوشیمیایی استاندارد تعیین هویت شدند و از نظر فنوتیپ ESBL با ۵ دیسک آنتی‌بیوتیک از ترونوم، سفی‌پیم، سفوناکسیم و سفتریاکسون و آموکسی‌سیلین کلاولونیک‌اسید تهیه شده از شرکت بکتون دیکینسون (Becton Dickinson Microbiology System; England) طبق معیار CLSI و با تهیه سوسپانسیون نیم‌مک‌فارلند و کشت روی محیط مولر هینتون و انجام آنتی‌بیوگرام به‌روش دابل دیسک دیفیوژن [۲۳] مورد شناسایی قرار گرفتند. سپس DNA نمونه‌های شناسایی شده به‌عنوان ESBL با استفاده از روش جوشاندن استخراج و برای انجام واکنش PCR در بافر TE و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

واکنش PCR با تغییر دمای اتصال پرایمرها و غلظت آنها بهینه شد. مخلوط واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار (pH ۸/۴)، KCl ۵۰ میلی‌مولار، MgCl<sub>۲</sub> ۲/۵ میلی‌مولار، پرایمرهای با غلظت ۱۵ پیکومول، غلظت بهینه dNTPs (سینازن؛ ایران) و یک میکرولیتر از آنزیم تک‌پلیمراز نیم‌واحدی (سینازن؛ ایران) تهیه و ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده به آنها اضافه شد. واکنش PCR برای ژن TEM به‌صورت واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵°C به‌مدت ۴ دقیقه و سپس در ۳۵ دوره PCR به‌ترتیب واسرشته‌سازی ۹۵°C به‌مدت یک دقیقه، اتصال پرایمر ۵۰°C به‌مدت یک دقیقه و طول‌سازی در ۷۲°C به‌مدت یک دقیقه انجام گرفت و در نهایت یک مرحله طول‌سازی نهایی

ژن SHV1 (شکل ۲) بودند. برخی از نمونه‌ها حاوی هر دو ژن به صورت همزمان بودند.

**جدول ۳** بررسی فراوانی سوبه‌های تولیدکننده ESBL بر حسب گروه سنی

جمع	سن		ESBL
	۸۵ تا ۴۰	۴۰ تا ۱۰	
۱۲	۱۰	۲	TEM1
۱۶	۱۴	۲	SHV1
۲۸	۲۴	۴	TEM1+SHV1
۱۰۰٪	۲۸	۴	PV
	۱ #		

## بحث

بیماری‌های عفونی و درمان آنها، مشکلی اساسی در زندگی بشر هستند و در سال‌های اخیر افزایش میزان مقاومت در باکتری‌ها به صورت روزافزون هزینه‌های بیماران را افزایش داده است. در دو دهه اخیر، میزان تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف توسط باکتری‌های انتروباکتریاسه افزایش چشمگیری داشته است. اغلب بیماران بستری در بیمارستان دارای ضعف در سیستم ایمنی و بیماری زمینه‌ای هستند و کلبسیلا پنومونیه به عنوان پاتوژن فرصت‌طلب، یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی به خصوص در بخش‌های مراقبت ویژه بیمارستانی است. در این مطالعه از مجموع ۱۰۰ نمونه کلبسیلا پنومونیه جدا شده ۳۲ نمونه (۳۲٪) تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بودند. گزارشات مختلفی از سراسر جهان در مورد میزان شیوع باکتری‌های ESBL وجود دارد. در مطالعه‌ای در ژاپن میزان شیوع آنها ۴۰٪ [۲۴] و در مطالعه مشابهی در ایالت برکلی آمریکا این مقدار ۴۴٪ گزارش شده است [۲۵]. در مطالعه‌ای در فرانسه میزان بروز این فنوتیپ در بیماران بستری ۳۰ تا ۴۰٪ و در بیماران سرپایی ۶٪ اعلام شده است [۲۶]. در آسیای جنوب شرقی هر چند میزان شیوع ESBLها در برخی مطالعات ۲۰٪ گزارش شده، اما در برخی مناطق به بیش از ۶۰٪ نیز رسیده است [۲۷]. به صورت میانگین در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۴ نشان داده شد که میزان شیوع ESBL در اروپا ۱۸/۴٪ است که در هلند ۴۰٪ و در سوئد ۳٪ گزارش شده است [۲۸]. در مطالعه‌ای در بیمارستان‌های ترکیه در سال ۲۰۰۵، مهم‌ترین ژن‌های جدا شده SHV-1 و SHV-5 بودند [۳۲]. در مطالعات محققان ایرانی نیز میزان شیوع این فنوتیپ متفاوت بوده است. در مطالعه‌ای در بیمارستان الزهراء اصفهان، ۲۱۸ سویه باکتری بررسی شد که از این میان ۷۰ سویه (۳۲٪) کلبسیلا و از این میان، ۴۹ سویه (۷۰٪) کلبسیلا پنومونیه دارای ESBL بود [۲۹]. مطالعه مشابه دیگری که توسط بینش و همکاران در تبریز صورت گرفت نشان داد که ۶۲/۹٪ نمونه‌های کلبسیلا پنومونیه دارای ESBL بودند [۳۰]. در مطالعه‌ای در دانشگاه تهران، ۷۶٪ سویه‌های کلبسیلا پنومونیه دارای آنزیم ESBL بودند که نشان‌دهنده پتانسیل بالای بیماری‌زایی این سویه‌ها در بخش‌های مختلف بیمارستانی است [۳۱].

به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C انجام شد. واکنش PCR برای ژن SHV به صورت واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵°C به مدت ۴ دقیقه و سپس در ۳۵ دوره PCR به ترتیب واسرشته‌سازی ۹۵°C به مدت یک دقیقه، اتصال پرایمر ۵۵°C به مدت یک دقیقه و طولیل‌سازی ۷۲°C به مدت یک دقیقه انجام گرفت و در نهایت یک مرحله طولیل‌سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. سپس ۵ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز ۱/۲٪ و اتیدیوم بروماید در دستگاه ژل داکومنتیشن (مدل InGenius، شرکت SYNGENE؛ آمریکا) مورد شناسایی قرار گرفت.

**جدول ۱** پرایمرهای مورد استفاده و قطعات تکثیر شده

اندازه قطعه تکثیر شده	توالی پرایمرها	هدف پرایمرها
1080 bp	5' ATA AAATTCTTGAAGACG AAA 3' 5' GCAAGTTACCAATGCTTAATC A3'	blaTEM
865 bp	5'TGGTTATGCGTTATATTCGCC 3' 5'GGTTAGCGTTGCCAGTGCT3'	blaSHV

## نتایج

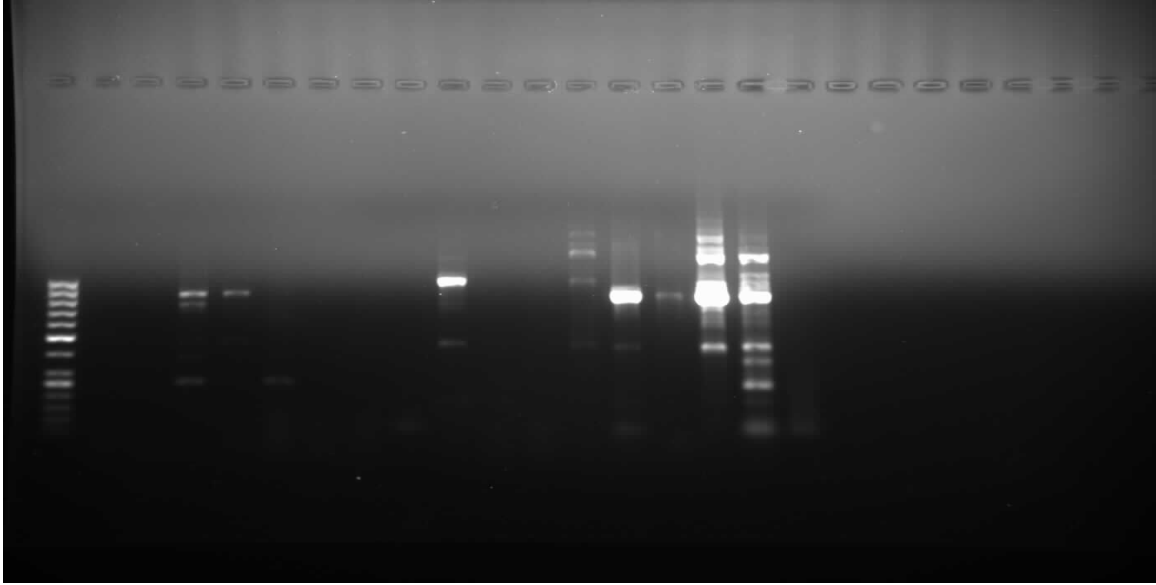
۳۲٪ نمونه‌ها حاوی فنوتیپ بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بودند که از این تعداد ۲۱ نفر مرد (۵۲/۵٪) و ۱۹ نفر زن (۴۷/۵٪) بودند. در جدول ۲ موارد جداسازی هر یک از ژن‌ها بر حسب جنس مورد بررسی قرار گرفته است.

**جدول ۲** توزیع ژن TEM1 و SHV1 بر حسب جنس

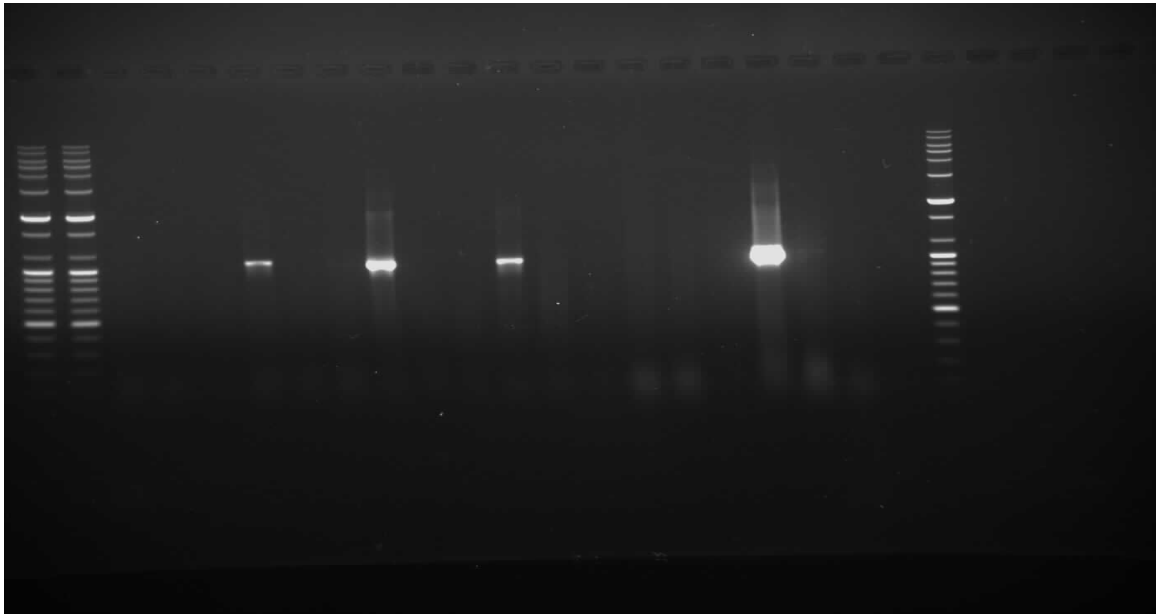
جمع	جنس		ESBL
	مرد	زن	
۱۲	۷	۵	TEM1
۱۶	۳	۹	SHV1
۲۸	۱۴	۱۴	TEM1+SHV1
۱۰۰٪	۵۰٪	۵۰٪	PV
	۰/۴۴۵		

همان‌گونه که در جدول ۳ نشان داده شده است، بیشترین فراوانی ژن TEM1 در گروه سنی ۴۰ تا ۸۵ سال و همین‌طور بالاترین میزان SHV1 نیز در همین گروه سنی دیده شد. در گروه سنی زیر ۴۰ سال تعداد ۹ نفر (۲۸/۱٪) و بالای ۴۰ سال تعداد ۳۱ نفر (۴۵/۶٪) قرار داشتند که میانگین سنی افراد مورد مطالعه ۳۹/۲۷±۱۹/۲ بود. از مجموع ۳۲ سویه جدا شده، ۲۸ مورد (۸۷/۵٪) حاوی ژن‌های SHV1 و TEM1 بودند که از این میان ۱۲ نمونه (۳۷/۵٪) حاوی ژن TEM1 (شکل ۱) و ۱۶ نمونه (۵۰٪) حاوی

شکل ۱) تکثیر قطعه ۱۰۸۰ جفت‌بازی برای ژن TEM-1 (ستون ۱ و ۲: نردبان ۱۰۰ جفت‌بازی)



شکل ۲) تکثیر قطعه ۸۶۵ جفت بازی برای ژن SHV-1 (ستون ۱: نردبان ۱۰۰ جفت‌بازی)



می‌شود. علاوه بر این استفاده از سوندهای ادراری و مصرف نابه‌جای آنتی‌بیوتیک می‌توانند موجب شیوع و کلونیزاسیون بیشتر ارگانیزم‌های تولیدکننده ESBL باشند.

### نتیجه‌گیری

شیوع بسیار کم ESBL‌ها در برخی کشورها که کنترل عفونت‌های بیمارستانی دقیقی در آنها اعمال شده و نظارت مناسبی در مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد، نشان‌دهنده اهمیت نظارت‌های بیمارستانی در توانایی کنترل این سویه‌های هزینه‌آور در مراکز بهداشتی است.

در پژوهش حاضر، ژن‌های SHV-1 و TEM-1 مورد ارزیابی قرار گرفتند که ۱۲ نمونه حاوی TEM-1 (۳۷/۵٪) و ۱۶ نمونه حاوی SHV-1 (۵۰٪) هستند. در مطالعات سایرین، میزان شیوع این ژن‌ها در کلبسیلا پنومونیه مورد ارزیابی قرار گرفته است؛ هرچند ژن TEM-1 در سال‌های دهه ۱۹۸۰ و اوایل دهه ۱۹۹۰ میلادی شایع‌ترین ژن در تولیدکنندگان ESBL بوده است، اما امروزه SHV-1 در اکثر نقاط و همچنین شهر نیویورک شایع‌ترین ژن شناسایی شده است [۳۳]. در مطالعه حاضر نیز میزان شیوع SHV-1 بیش از TEM-1 در سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز کلبسیلا پنومونیه بوده است. در آسیا، ناقلین مدفوعی ESBL رو به افزایش است و به‌نظر می‌رسد عدم دفع صحیح فاضلاب‌ها باعث افزایش شیوع این گونه ارگانیزم‌ها

- associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase and the floss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(3):563-9.
- 19- Verma A, Desai N, Shannon K, Philpott-Howard J, Hill RLR. Intra- and inter-generic plasmid-mediated spread of cephalosporin and aminoglycoside resistance among *Klebsiella aerogenes* K41 and other enterobacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;17(2):123-9.
- 20- Mitchell J, Navon-Venezia SS, Schwartz D, Carmeli Y. High levels of antimicrobial coresistance among extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing enterobacteriaceae. *Am Soc Microbiol.* 2005;49(5):2137-9.
- 21- Jada JM, Abbot SL. *The enterobacteria.* New York: Lippincott; 1998.
- 22- Urban C, rahal JJ. *Klebsiella* and extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *Int J Antimicrob Agents.* 2002;6(1):125-9.
- 23- Bush K. *B-lactamase inhibitors.* In: Grady HP, Finch RG, editors. *Antibiotics and chemotherapy.* 7<sup>th</sup> ed. Livingstone: Churchill; 1997.
- 24- Hawkey PM. Prevalence and clonality of extended spectrum B-lactamases in Asia. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(1):159-65.
- 25- Patzer JA, Dzierzanowska D, Pawinska A, Turner PJ. High activity of meropenem against gram-negative bacteria from a pediatric intensive care unit, 2001-2005. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;29(3):285-8.
- 26- Sirot DL, Goldstein FFW, Soussy CJ. Resistance to cefotaxime and seven other beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: A 3-year survey in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36(8):1677-81.
- 27- Pitout JD. Multiresistant Enterobacteriaceae: New threat of an old problem. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008;6(5):657-69.
- 28- Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(1):144-53.
- ۲۹- مسجیدیان‌جزی فرامرزی، والهی فرحناز، طالی اردشیر، رستگارلاری عبدالعزیز. بررسی مولکولی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف در اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه. *مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران.* ۱۳۸۶؛(۲):۳۴-۲۷.
- 30- Mirsalehian A, Akbari-Nakhjavani F, Peymani A, Kazemi B, Jabal-Ameli F, Mirafshar SM. Prevalence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae by phenotypic and genotypic methods in intensive care units in Tehran, Iran. *Daru.* 2008;16(3):169-73.
- ۳۱- میرالصالحیان اکبر، اکبری‌نخجوانی فرخ، پیمانی امیر، جبل‌عاملی فرشته، میرافشار سیدمحمد، حمیدیان محمد. بررسی فراوانی انتروباکتریاسه تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در بخش‌های مراقبت ویژه. *مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.* ۱۳۸۶؛(۱):۶۵-۸۰-۳۳.
- 32- Machado E, Coque TM, Canton R, Novais A, Sousa JC, Baquero F, et al. High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae from Portugal. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(6):1370-4.
- 33- Schumachera H, Scheibelb J, Mollera JK. Cross-resistance patterns among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with decreased susceptibility to cefuroxime. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46:215-21.
- 32- Iwuji CC, Reeves I, Nambiar K, Richardson D. Diagnostic utility of urethral smears in predicting urethral chlamydia in HIV-infected men. *Int J STD AIDS.* 2008;19(11):741-3.
- 33- Yanagisawa N, Imamura A. HIV-positive man with ulceronecrotic skin lesions. *Clin Infect Dis.* 2008;47(8):1068-109.
- 1- Eisen D, Russell EG, Tymus M, Roper EJ, Grayson ML, Turnidge J. Random amplified polymorphic DNA and plasmid analyses used in investigation of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 1995;33(3):713-7.
- 2- Selden R, Lee S, Wang WL, Bennett JV, Eickhoff TC. Nosocomial *Klebsiella* infections: Intestinal colonization as a reservoir. *Ann Intern Med.* 1971;74(5):657-64.
- 3- Cryz SJ, Furer E, Germanier R. Safety and immunogenicity of *Klebsiella pneumoniae* K1 capsular polysaccharide vaccine in humans. *J Infect Dis.* 1985;151(4):665-71.
- 4- Domenico P, Marx JL, Schoch PE, Cunha BA. Rapid plasmid DNA isolation from mucoid gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol.* 1992;30(11):2859-63.
- 5- Tash H, Hakki Bahar L. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended spectrum  $\beta$ -lactamases in hospital: Based Enterobacteriaceae in Turkey. *Jpn J Infect Dis.* 2005;58:162-7.
- 6- Urban C, Rahal JJ. *Klebsiella* and extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *Int J Antimicrob Agents.* 1997;8(1):37-43.
- 7- 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(6):315-7.
- 8- Coovadia YM, Johnson AP. Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal nursery: The importance of maintenance of infection control policies and procedures in the prevention of outbreaks. *J Hosp Infect.* 1992;22:197-205.
- 9- Johnson AP, Weinbren MJ, Ayling-Smith B, Bois SK, Amyes SG, George RC. Outbreak of infection in two UK hospital caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* resistant to cefotaxime and ceftazidime. *J Hosp Infect.* 1992;20(2):97-103.
- 10- Noriega ER, Leibowitz RE, Richmond AS, Rubinstein E, Schaeffler S, Simberkoff MS, et al. Nosocomial infection caused by gentamycin-resistant, streptomycin-sensitive *Klebsiella*. *J Infect Dis.* 1975;131:45-50.
- 11- Bauernfeind A, Rosenthal E, Eberlein E, Holley M, Schweighart S. Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5  $\beta$ -lactamases among hospitalized patients. *Infection.* 1993;21(1):18-22.
- 12- Medeiros AA. Nosocomial outbreaks of multiresistant bacteria: Extended-spectrum beta-lactamases have arrived in North America. *Ann Intern Med.* 1993;119(5):428-30.
- 13- Reish O, Ashkenazi S, Naor N, Samra Z, Merlob P. An outbreak of multiresistant *Klebsiella* in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect.* 1993;25(4):287-91.
- 14- Smith JMB, Chambers ST. *Klebsiella oxytoca* revealing decreased susceptibility to extended spectrum beta-lactamses. *J Antimicrob Chemother.* 1995;36(1):265-7.
- 15- Quinn JP, Miyashiro D, Sahn D, Flamm R, Bush K. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Infect Dis.* 1988;10(9):850-8.
- 16- Meyer KS, Urban C, Eagan JA, Berger BJ, Rahal JJ. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Ann Intern Med.* 1993;119(5):353-8.
- 17- French GL, Shanon KP, Simmons N. Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and  $\beta$ -lactam:  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5  $\beta$ -lactamase. *J Clin Microbiol.* 1996;34(2):358-63.
- 18- Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is