فراوانی بتالاکتامازهای با طیف گسترده و ژنوتیپ های TEM و SHV در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه های بالینی جمع آوری شده از بیمارستان های شهر قزوین

امیر پیمانی[1]، محمد معینی راد[2]، تقی ناصرپور[3]، رحیمه صنیع خانی[2]، امیر جوادی[4]، علی اصغر پهلوان[*1]

1. استادیار میکرب شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین،
2. دانشجوی کارشناسی ارشد میکرب شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
3. دانشیار میکرب شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
4. مربی آمار زیستی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

*** نشانی برای مکاتبه:** دانشگاه علوم پزشکی قزوین ، بلوار شهید باهنر، دانشکده پزشکی، بخش میکرب شناسی کدپستی: 3419759811،
تلفن: 0281-3336001 ، نمابر 0281- 2239250، a.peymani@gmail.com

دریافت مقاله: دی نود و یک پذیرش برای چاپ: اسفند نود و یک

چکیده

سابقه و هدف: *کلبسیلا پنومونیه پاتوژن فرصت طلبی است که باعث عفونت های مهم بیمارستانی نظیر عفونت مجاری ادراری ، پنومونی ، سپتی سمی و عفونت های بافت نرم می گردد. در سطح جهان ایزوله های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بتالاکتامازهای با طیف گسترده(Extended spectrum β-lactamases (ESBLs* به شکلی سریع در حال گسترش هستند و مشکلات درمانی جدی را در ارتباط با عفونت های بیمارستانی در بخش های مختلف بیمارستانی ایجاد می نمایند. *ESBLS* عمدتا" بر روی پلاسمیدها قرار دارند و این امر سبب تسهیل در گسترش این عوامل مقاوم می گردد. بتالاکتامازهای با طیف گسترده از نوع *TEM* و *SHV* از مهم ترین و شایع ترین انواع این آنزیم ها بوده که از سراسر جهان گزارش می شوند. در این مطالعه فراوانی ژنهای bla_{TEM} و bla_{SHV} در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده بتالاکتامازهای با طیف گسترده جدا شده از نمونه های بالینی جمع آوری شده از بیمارستان های آموزشی شهر قزوین مورد بررسی قرار می گیرد.

روش کار: *100 ایزوله کلبسیلا پنومونیه از 4 بیمارستان آموزشی شهر قزوین در طی سالهای1390 تا 1391 جمع آوری و با استفاده از روش های استاندارد میکروب شناسی و آزمایشگاهی تعیین هویت شد. در ادامه تمامی ایزوله ها از نظر تولید بتالاکتامازهای با طیف گسترده ابتدا به روش دیسک آگار دیفیوژن مطابق توصیه موسسه استاندارد روش های آزمایشگاهی(CLSI)* غربال گری شد. سپس تست تائیدی به روش دیسک ترکیبی بر روی ایزوله هایی مثبت انجام گرفت و ایزوله های تولید کننده بتالاکتامازهای با طیف گسترده از نظر وجود ژن های bla_{TEM} و bla_{SHV} با استفاده از *PCR* بررسی شد.

یافته ها: *در مجموع 57 ایزوله کاهش حساسیت نسبت به یکی از آنتی بیوتیک های مورد استفاده در تست غربالگری ESBLs را نشان دادند که از این بین، 45 ایزوله (78/94%) تولید کننده ESBLs بودند. نتایج حاصل از آزمون PCR نشان داد که 26 ایزوله (58%) دارای ژن bla_{TEM} و 19 ایزوله (42%) دارای ژن bla_{SHV} بودند. 11 ایزوله (24/4%) نیز از نظر حضور هم زمان هر دو ژن* مثبت بودند.

نتیجه گیری: *با توجه به میزان شیوع بالای ایزوله های تولید کننده بتالاکتامازهای با طیف گسترده در بیمارستان های مورد مطالعه، شناسائی اولیه این ایزوله های مقاوم و پی گیری آنها به جهت جلوگیری از شیوع هر چه بیشتر آنها ضروری است. هم چنین استفاده از راه کارهای درمانی مناسب، تجویز درست و منطقی آنتی بیوتیک ها توسط پزشکان در کنترل آنها نیز حائز اهمیت است.*

واژگان کلیدی:کلبسیلا پنومونیه ، بتالاکتامازهای با طیف گسترده، bla_{TEM}، bla_{SHV}

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه به عنوان یکی از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی در ایجاد بیماری های مهمی از جمله عفونت مجاری ادراری، پنومونی، سپتی سمی و عفونت های بافت نرم نقش دارد. استفاده مداوم از آنتی بیوتیک های بتالاکتام و فشار انتخابی ناشی از این عوامل باعث بروز انواع مختلفی از مقاومت های داروئی نسبت به این دسته از آنتی بیوتیک ها در باکتری های گرم منفی به ویژه کلبسیلا پنومونیه گردیده است(1). یکی از مهم ترین مکانیسم های مقاومت نسبت به داروهای بتالاکتام تولید آنزیم هایی تحت عنوان بتالاکتامازهای با طیف گسترده (ESBLs) می باشد که این عوامل به طور عمده بر روی پلاسمیدها قرار دارند و این امر سبب تسهیل در گسترش این عوامل می گردد (۳،۲). این آنزیم ها اتصالات آمیدی در حلقه بتالاکتام را تخریب کرده و بواسطه آن سبب غیر فعال کردن آنتی بیوتیک های بتالاکتام می شوند. مقاومت باکتری ها به داروهای بتالاکتام در نتیجه تولید آنزیم های بتالاکتاماز در حال حاضر به عنوان یک مشکل جهانی مطرح است(4). مطالعات اخیر هم چنین نشان داده اند که این باکتری ها به طور فزاینده ای مقاومت هم زمان نسبت به آنتی بیوتیک های خانواده کوئینولون ها و آمینوگلیکوزیدها را نشان می دهد زیرا مشخص شده است که این عوامل مقاومت به طور هم زمان بر روی پلاسمیدهایی وجود دارند که می توانند بوسیله کونژوگاسیون به دیگر ایزوله های باکتریایی نیز انتقال یابند(۶،۵).

ESBLs ها در گروه 2 از سیستم طبقه بندی Bush-Jocoby و کلاس A از سیستم طبقه بندی Ambler قرار دارند (7). از جمله مهم ترین آنزیم های مرتبط با بتالاکتامازهای با طیف گسترده در کلاس A ، بتالاکتامازهای TEM و SHV بوده که بواسطه موتاسیون در ژن اجداد این آنزیم ها (TEM-1 ، TEM-2 و SHV-1) تاکنون 174 ساب تیپ از TEM و 119 ساب تیپ از SHV از سراسر جهان گزارش شده است. این تغییرات سبب گرایش این دسته آنزیم ها به سوبستراهای اختصاصی نظیر سفالوسپورین های نسل سوم و چهارم بویژه سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سفتازیدیم می گردند. از دیگر ESBL ها که در کلاس A قرار دارند و به طور طبیعی توانائی هیدرولیز سفالوسپورین های نسل سوم را دارند می توان CTX-M,VEB ,GES ,IBC ,PER ,TLA ,BES و SFO را نام برد که البته با شیوع کم تری نسبت به آنزیم های TEM و SHV گزارش می شوند(۸،۷).

یکی از معظلات درمانی در حال حاضر حضور ایزوله های تولید کننده ESBLs در ارتباط با عفونت های بیمارستانی به ویژه در بخشهای مراقبت ویژه (ICU) است که به طور خاص مشکلات فراوانی را در بیماران بدخیم ایجاد کرده اند(8). با توجه به شیوع قابل توجه باکتری های مولد ESBLs در جوامع مختلف، فقدان اطلاعات لازم در منطقه و از طرفی اهمیت ارگانیسم های تولید کننده ESBLs انجام مطالعات بیشتر بر روی آنها ضروری است. بعلاوه با توجه به نقش بالقوه این باکتری ها در ایجاد عفونت های بیمارستانی، گسترش ژن های مختلف کد کننده ESBLs و انتشار کلونال این ارگانیسم های مقاوم لزوم توجه به آنها بسیار حائز اهمیت است.

روش کار

تعداد 100 ایزوله کلبسیلا پنومونیه از نمونه های بالینی مختلف از جمله ادرار، تراشه، زخم و خون طی مدت یک سال از اردیبهشت 1390 تا اردیبهشت 1391 از 4 بیمارستان آموزشی در شهر قزوین جمع آوری شد. تمامی ایزوله ها با استفاده از تست های استاندارد آزمایشگاهی و میکروب شناسی تعیین هویت شد(9). سپس باکتری های جداسازی شده بعد از تشخیص در محیط تریپتی کیز سوی براث حاوی 20% گلیسرول در 80- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمون های بعدی ذخیره شدند.

تمام ایزوله ها از نظر تولید بتالاکتامازهای با طیف گسترده به روش دیسک آگار دیفیوژن Disk Agar Diffusion (DAD) با استفاده آنتی بیوتیکهای سفتازیدیم (30µg) ،سفوتاکسیم (30µg)، سفتریاکسون (30µg)، سفپودوکسیم (10µg) وآزترونام (30µg) طبق توصیه موسسه استاندارد روشهای آزمایشگاهی Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) غربال گری شد(10).

تست تائیدی تولید بتالاکتامازهای با طیف گسترده به روش دیسک ترکیبی Combination Disk (CD) با استفاده از دیسک های سفتازیدیم (30µg) و سفتازیدیم (30µg)/کلاولانیک اسید(10µg)، سفوتاکسیم (30µg) و سفوتاکسیم (30µg)/کلاوولانیک اسید(10µg) انجام گرفت. نتایج طبق دستورالعمل CLSI تفسیر شد بدین ترتیب که اگر در ایزوله ای قطر هاله عدم رشد دیسک ترکیبی برابر یا بیش از mm 5 در مقایسه با قطر هاله عدم رشد دیسک به تنهایی باشد از نظر تولید ESBLs مثبت در نظر گرفته شد. در آزمون تائیدی از سویه E.coli ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی و از سویه Klebsiella pneumonia ATCC 700603 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

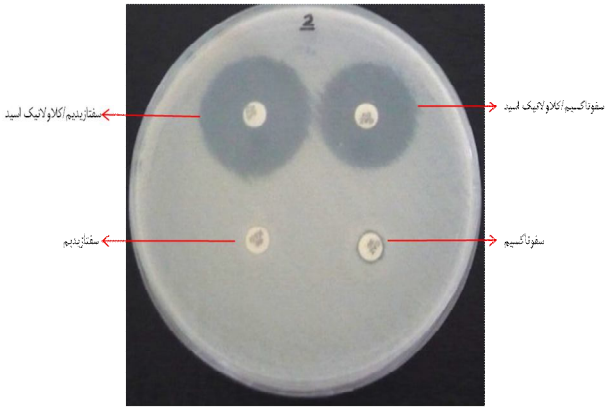
استخراج DNA با استفاده از روش boiling صورت گرفت(11). در ایزوله هایی که از نظر تست تائیدی ESBLs ، مثبت شدند به ترتیب از نظر حضور ژنهای bla_{TEM} , bla_{SHV} با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند(جدول 1). واکنش PCR در حجم 25 میکرولیتر انجام شد. هر واکنش PCR شامل 200 میکرومول dNTP، 10 پیکومول از هر پرایمر، 1/5 میلی مول در لیتر $MgCL_2$ ، 0/5 واحد آنزیم Taq و 50 نانوگرم DNA الگو بود. تکثیر ژن bla_{TEM} و bla_{SHV} با استفاده از دستگاه ترمال سیکلر(اپندورف آلمان) و به صورت : دمای دناتوراسیون اولیه (96 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه)، 35 سیکل حرارتی شامل دمای دناتوراسیون (94 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه)، دمای اتصال پرایمر (58 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه برای ژن bla_{TEM}) و (60 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه برای ژن bla_{SHV}) و دمای تکثیر (72 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه) و در پایان دمای تکثیر نهائی (72 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه) انجام شد(12). محصولات PCR از نظر حضور ژن های مورد نظر با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز 1% و پس از رنگ آمیزی با سایبر گرین بررسی شدند. در این آزمون از سویه استاندارد E.coli ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی و از سویه های استاندارد Klebsiella pneumonia ATCC 700603 به عنوان کنترل مثبت حاوی ژن bla_{SHV} و E.coli ATCC 35218 به عنوان کنترل مثبت حاوی ژن bla_{TEM} استفاده شد.

پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	اندازه محصول PCR
TEM-F TEM-R	ATGAGTATTCAACATTTCCG CTGACAGTTACCAATGCTTA	867
SHV-F SHV-R	GGTTATGCGTTATATTCGCC TTAGCGTTGCCAGTGCTC	867

جدول 1: توالی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده جهت انجام آزمون PCR برای جداسازی ژنهای bla_{TEM} و bla_{SHV} (12)

یافته ها

در مجموع از بین 100 ایزوله کلبسیلا پنومونیه بعد از انجام تست غربال گری ESBLs ، 57 ایزوله کاهش حساسیت نسبت به یکی از آنتی بیوتیک های مورد استفاده در تست غربال گری ESBLs نشان دادند. میزان مقاومت ایزوله ها نسبت به سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفپیم، آزترونام، سفتریاکسون و سفپودوکسیم ایزوله ها به ترتیب 49% ، 55% ، 26% ، 39% ،48% و 55% گزارش شد. بعد از انجام تست تائیدی به روش دیسک ترکیبی، از مجموع 57 ایزوله، 45 ایزوله (78/9%) از نظر تولید ESBLs مثبت شدند(شکل 1). ایزوله های تولید کننده ESBLs غالبا" از بیماران بستری در بخش های ICU (28 ایزوله) و نوزادان (11 ایزوله) و به ترتیب از نمونه های ادرار (18 ایزوله) و تراشه (17 ایزوله) جمع آوری شده بود(جدول 2). تمام ایزوله ها نسبت به ایمی پنم حساس بودند.

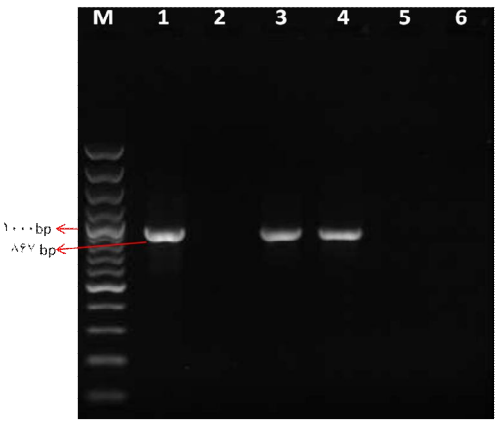


شکل 1: تست تائیدی تولید ESBL به روش دیسک ترکیبی، نمونه مورد نظر از نظر تولید ESBL مثبت می باشد

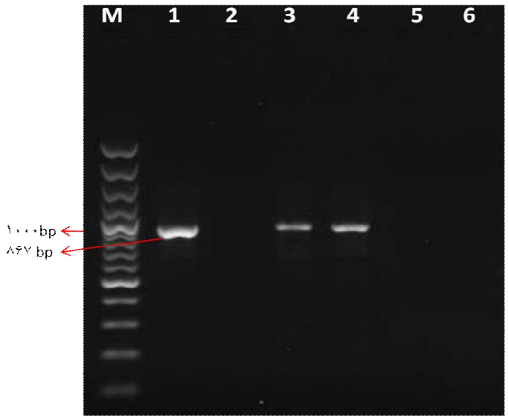
جدول 2 : فراوانی ایزوله های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده ESBLs به تفکیک بخش های بیمارستانی و نوع نمونه بالینی

ایزوله	نمونه				بخش			مجموع
	ادرار	زخم	تراشه	خون	بخش مراقبت ویژه	نوزادان	داخلی	
ایزوله های ESBL مثبت	18	3	17	7	28	11	6	**45**
ایزوله های ESBL منفی	30	7	13	5	8	25	22	**55**
مجموع	48	10	30	12	36	36	28	**100**

با انجام آزمون PCR بر روی ایزوله های تولید کننده ESBLs مشخص شد که 26 ایزوله (58%) از نظر حضور ژن bla_{TEM} و 19 ایزوله (42%) از نظر حضور ژن bla_{SHV} مثبت بودند(شکل 2 و3). هم چنین از بین این ایزوله ها، 11 ایزوله (24/4%) به طور همزمان دارای هر دو ژن بودند. در 10 ایزوله هیچ کدام از ژن های مورد نظر مشاهده نگردید.



شکل 2. محصول PCR ژن bla_{SHV} ; M: DNA مارکر، 1: کنترل مثبت K. pneumoniae ATCC700603، 2: کنترل منفی E coli ATCC25922، 3-4: ایزوله های بالینی تولید کننده ESBL ، 5: ایزوله بالینی منفی از نظر تولید ESBL 6: واکنش بدون DNA الگو



بحث

ایزوله های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده ESBLs از عوامل بیماری زائی مهمی هستند که عفونت های جدی در بیماران بستری ایجاد می کنند. این عفونت ها اغلب به سختی درمان می شوند زیرا این ایزوله ها نه تنها به داروهای بتالاکتام مقاومت نشان می دهند بلکه به آمینوگلیکوزیدها و فلئوروکینولون ها نیز مقاوم می شوند . ایزوله های تولید کننده ESBLs به طور خاص می توانند به راحتی ژن های مقاومت را بوسیله پلاسمید از طریق انتقال افقی منتقل کرده و باعث ایجاد عفونت های بیمارستانی گردند(13). شیوع تیپ های مختلف ESBLs در ایزوله های بالینی کشورهای مختلف و حتی بیمارستان های موجود در یک منطقه می تواند متفاوت می باشد(14). در سال های اخیر به ویژه به دنبال استفاده گسترده از سفالوسپورین های وسیع الطیف، شیوع عفونت های ایجاد شده به وسیله ایزوله های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده بتالاکتامازهای با طیف گسترده به طور چشم گیری از سراسر جهان گزارش شده است(15). در این مطالعه 100 ایزوله کلبسیلا پنومونیه به دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی از نظر تولید بتالاکتامازهای با طیف گسترده مورد بررسی قرار گرفتند. 57 ایزوله، حداقل به یکی از سفالوسپورین های نسل سوم به کار رفته در این مطالعه کاهش حساسیت نشان دادند که میزان آن در مقایسه با نتایج مطالعه دیگری که در تهران در سال 2010 توسط ناصحی و هم کارانش انجام گرفت (41% از ایزوله ها کاهش حساسیت به حداقل یکی از سفالوسپورین های نسل سوم نشان دادند)، بیشتر است(16). در سایر کشورها، در سال 2007 در مطالعه ای که در هندوستان توسط Lal و هم کارانش انجام شد، 85/8% از ایزوله ها کاهش حساسیت به حداقل یکی از سفالوسپورین های نسل سوم را نشان دادند(17). نتایج این تحقیقات نشان دهنده تفاوت در میزان مقاومت ایزوله ها در مناطق جغرافیایی مختلف است.

در مطالعه حاضر، از مجموع 57 ایزوله، 45 ایزوله (78/94%) تولید کننده ESBLs بودند که در مقایسه با مطالعه ای که توسط میرصالحیان و هم کاران در سال 2008 در تهران انجام شد و میزان تولید ESBLs را در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه 76/7% گزارش کردند، هم خوانی نسبتا" مناسبی دارد(18). البته ناصحی و هم کارانش در سال 2010 با بررسی ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده از بیماران بستری، میزان شیوع ESBLs را 38/5% گزارش کردند(16). بزاز و هم کارانش در مطالعه دیگری شیوع ESBLs را در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه و اشرشیاکلی را 59/2% گزارش کردند (19). در دیگر نقاط جهان نیز مطالعات انجام شده از نظر تولید ESBLs نتایج متفاوتی را نشان دادند از جمله در کره جنوبی 26/5% (15)، در اندونزی 23/71% (20)، در چین 33/4% (21) ایزوله ها از نظر تولید ESBLs مثبت بودند. به نظر می رسد تنوع در الگوی مصرف و تجویز داروهای بتالاکتام و نحوه به کارگیری ابزارهای کنترل عفونت در بخش های مختلف بیمارستان دلایل عمده تنوع در میزان شیوع ارگانیسم های تولید کننده ESBLs در مناطق جغرافیایی متفاوت است.

در ادامه مشخص شد که 62 % از ایزوله های تولید کننده ESBLs از بخش ICU جمع آوری شدند. که به نظر می رسد بستری طولانی مدت بیماران و وخیم بودن بیماری، بکارگیری ابزارهای تهاجمی و مواجهه طولانی با داروهای عمده مصرفی در این بخش از جمله عوامل تأثیر گذار در حضور قابل توجه این ارگانیسم های مقاوم می باشند(18). هم چنین مشخص شد که این ایزوله ها غالبا" از نمونه های ادرار و تراشه جداسازی شدند که به نظر می رسد بکارگیری ابزارهای تهاجمی طی پروسه درمانی این بیماران از جمله تراشه و کاتتر ادراری می تواند در انتشار آنها نقش داشته باشد.

در مطالعه حاضر فراوانی ژن های bla_{TEM} و bla_{SHV} با استفاده از آزمون PCR در ایزوله های تولید کننده ESBLs به ترتیب 57/7% و 42% گزارش گردید. اما ناصحی و هم کارانش میزان جداسازی ژنهای bla_{TEM} و bla_{SHV} را به ترتیب 18% و 26% گزارش کردند که نسبت به مطالعه حاضر از شیوع کم تری برخوردار است(16). فیض آبادی و هم کارانش در سال 2009 فراوانی ژن های bla_{TEM} و bla_{SHV} را در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به ترتیب 67/4% و 46/5% گزارش کردند(22). در مطالعه ی دیگری که در ترکیه توسط bali و هم کارانش در سال 2010 انجام شد، میزان جداسازی ژن های bla_{TEM} و bla_{SHV} در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جمع آوری شده از بیماران بستری به ترتیب 73/4% و 21/8% گزارش کردند(23). در این مطالعه در 10 ایزوله که پس از انجام آزمون تائیدی از نظر حضور ESBLs مثبت شدند، این دو ژن شناسائی نشد که به نظر می رسد ژن های دیگر دخیل در تولید ESBLs ممکن است نقش داشته باشند. البته میزان مقاومت بیشتر به سفوتاکسیم نسبت به سفتازیدیم در این ایزوله ها می تواند دلیلی بر حضور ژن bla_{CTX-M} باشدکه نیازمند مطالعات بیشتری در این خصوص است(۲۵،۲۴).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه حاکی از میزان قابل توجه ایزوله های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده ESBLs در بیمارستان های مورد مطالعه است. بر اساس نتایج این مطالعه و بررسی های مشابه در سراسر جهان، ارگانیسم های مولد ESBLs در بخش های مختلف بیمارستانی رو به افزایش است. تغییر در استراتژی مصرف آنتی بیوتیک ها و استفاده از ابزارهای مناسب کنترل عفونت در بخش هایی که به ویژه بیماران به مدت طولانی بستری می شوند از عوامل مهمی هستند که می تواند در کنترل انتشار ارگانیسم های تولید کننده ESBLs ایفای نقش کند.

تشکر و قدردانی

از شورای مرکزی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه جهت تامین هزینه این طرح تحقیقاتی تقدیر می شود.

REFERENCES

1. Kamatchi C, Magesh H, Sekhar U, Vaidyanathan R. Identification of clonal clusters of Klebsiella pneumoniae isolates from Chennai by extended spectrum b-lactamases genotyping and antibiotic resistance phenotyping analysis . Americ J Infect Diseas. 2009; 5 (2): 74-82.

2. Severin JA, Mertaniasih NM, Kuntaman K, Lestari ES, Purwanta M, Lemmens-Den Toom N, et al. Molecular characterization of extended-spectrum b-lactamases in clinical Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates from Surabaya, Indonesia. J Antimicrob Chemother. 2010 ; 65(3):465-9.

3. Mustafa OA, Yusuf D. Investigation of some antibiotic susceptibility plasmid profiles and ESBL characteristic of klebsiella pneumoniae isolated from urinary system infection. World Appl. Sci. J. 2009; 6(5) :630-636.

4. Poole K. Resistance to ß-lactam antibiotics. Cell Mol Life Sci. 2004; 61:2200–2223.

5. Wang A, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, et al. Occurrence of qnr-positive clinical isolates in Klebsiella pneumoniae producing ESBL or AmpC type beta-lactamase from five pediatric hospitals in China. FEMS. Microbiol. Lett. 2008; 283(1):112-116.

6. Wang A, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, et al. Presence of qnr gene in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China. BMC Infectious Diseases. 2008; 8(68)**:**1-6.

7. Meyer L, Labuschagne CDJ, Ehlers MM, Dove MG, Weldhagen GF. Diversity of bla-type genes in extended-spectrum b-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolated during 2003 - 2004 at pretoria academic hospital. The Southern African J Epidemiol and Infect. 2007; 22 (1):5-7.

8. Yvonne P, Angela C, Wolfgang W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. International J Med Microbiol. 2010; 300(6):371-379

9. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS.Enterobacteriaceae. BAILEY & SCOTT'S DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY, 12th Edition. Houston Texas, MOSBY ELSEVIER, 2007; 323-333.

10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighteenth informational supplement. Document M100-S18. Wayne, PA: CLSI; 2006.

11. Liu W, Chen L, Li H, Duan H, Zhang Y, Liang X, et al. Novel CTX-M b-lactamase genotype distribution and spread into multiple species of Enterobacteriaceae in Changsha, Southern China. J Antimicrob Chemother. 2009; 63(5):895-900.

12. Lim K, Yeo C, Rohani Y, Balan G, Tong KL. Characterization of multidrug-resistant and extended-spectrum β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae strains from Malaysian hospitals. Journal of Medical Microbiology. 2009; 58, 1463–1469.

13. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995; 8:557-84.

14. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 2001; 14: 933-51.

15. Hee Kim M, Lee HJ, Park KS, Suh JT. Molecular Characteristics of Extended Spectrum β-Lactamases in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae and the Prevalence of qnr in Extended Spectrum β-Lactamase Isolates in a Tertiary Care Hospital in Korea. Yonsei Med J. 2010; 51(5):768-774.

16. Nasehi L, Shahcheraghi F, Nikbin VJ, 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(3):111-118.

17. Lal P, Kapil A, K. D B, Sood S. Occurrence of TEM & SHV gene in extended spectrum β-lactamases (ESBLs) producing Klebsiella sp. Isolated from a tertiary care hospital. Indian J Med Res. 2007; 125:173-178.

18. Mirsalehian A, Akbari-Nakhjavani F, Peymani A, Kazemi B, Jabal Ameli F. Prevalence of Extended Spectrum β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae by Phenotypic and Genotypic Methods in Intensive Care Units in Tehran, Iran. Daru. 2008; 16 (3):169-173.

19. Bazzaz BS, Naderinasab M, Mohamadpoor AH, Farshadzadeh Z, Ahmadi S, Yousefi F. The prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae among clinicalisolates from a general hospital in Iran. Acta Microbiol Immunol Hung. 2009; 56:89-99.

20. Severin JA, Mertaniasih NM, Kuntaman K, Lestari ES, Purwanta M, Lemmens-Den Toom N, et al. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases in clinical Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates from Surabaya, Indonesia. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(3):465-9.

21. Liu W, Chen L, Li H, Duan H, Zhang Y, Liang X, Li, et al. Novel CTX-M {beta}-lactamase genotype distribution and spread into multiple species of Enterobacteriaceae in Changsha, Southern China. J Antimicrob Chemother**.** 2009; 63(5):895-900.

22. 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 pneumoniae at Labbafinejad hospital, Tehran, Iran. Microb Drug Resist. 2010; 16:49-53.

23. Burcu Bali E, Açik L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum –lactamase produced by Escherichia coli, Acinobacter baumannii and Klebsiella isolates in a Turkish hospital. African Journal of Microbiology Research. 2010; 4 (8):650-654.

24. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48:1–14.

25. Eckert C, Gautier V, Saladin-Allard M, Hidri N, Verdet C, Ould-Hocine Z, et al. Dissemination of CTX-M-type b-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48:1249–55.