

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دوره ۳۲ شماره ۲ خرداد و تیر ۱۳۸۹ صفحات ۳۴-۳۰

بررسی مولکولی ژن های بتالاکتاماز طیف گسترده تیپ TEM در ایزوله های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه های بالینی

مجید پرنور: گروه میکروب شناسی، مرکز تحصیلات تکمیلی، دانشگاه آزاد اسلامی زنجان

محمد رضا نهایی: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز؛ نویسنده رابط

E-mail: nahaeim@tbzmed.ac.ir

هائده مبین: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز

علیرضا مبشر کار جدی: گروه میکروب شناسی، مرکز تحصیلات تکمیلی، دانشگاه آزاد اسلامی زنجان

دریافت: ۸۷/۹/۳۰، پذیرش: ۸۸/۴/۱۰

چکیده

زمینه و اهداف: یکی از مشکلات عمده در کنترل عفونتهای میکروبی بروز مقاومت دارویی است. تولید آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف (Extended spectrum beta lactamases, ESBLs) می تواند سبب ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیکها در باکتریها گردد. این مطالعه جهت بررسی الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی و بررسی حضور ژن *bla*_{TEM} در ایزوله های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه جدا سازی شده از نمونه های مختلف بالینی انجام شد.

روش بررسی: در طول یک سال (۱۳۸۷) از بیماران بستری در مراکز آموزشی و درمانی شهر تبریز نمونه برداری بعمل آمد که نمونه های مورد استفاده شامل ترشحات لوله تراشه، ادرار، خون، ترشحات برونش، خلط، مایع صفاق، زخم، سوآپ گلو بود. ایزوله های اشریشیاکلی (۴۱ ایزوله) و کلبسیلا پنومونیه (۴۷ ایزوله) به روش Kirby-Bauer آنتی بیوگرام گردیدند. آنتی بیوتیکهای استفاده شده در این تست سفوتاکسیم، سفنازیدیم، سفتریاکسون، آزترونام، آمیکاسین، پیراسیلین تازوباکتام، سفوروکسیم، سفیم و ایمی پنم بودند. جهت انجام تست تاییدی به روش Combined disk test از دیسک های سفوتاکسیم، سفوتاکسیم / کلاولانیک اسید و سفنازیدیم، سفنازیدیم / کلاولانیک اسید استفاده شد و از سویه *E. coli* ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی و از سویه *E. coli* ATCC 35218 به عنوان کنترل مثبت ژن *bla*_{TEM} استفاده گردید. در نهایت با استفاده از روش PCR ژنهای *bla*_{TEM} شناسایی شدند.

یافته ها: از ۴۱ ایزوله اشریشیاکلی تعداد ۳۶ ایزوله (۸۷/۸٪) حاوی ژن *bla*_{TEM} بودند. ۴۱ ایزوله (۱۰۰٪) حساس به ایمی پنم، ۳۶ ایزوله (۸۷/۸٪) مقاوم به آزترونام و ۴۰ ایزوله (۹۷/۵٪) مولد ESBL بودند. از ۴۷ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، ۴۷ ایزوله (۱۰۰٪) حساس به ایمی پنم، ۴۳ ایزوله (۹۷/۸٪) مقاوم به سفوروکسیم، ۴۱ ایزوله (۸۷/۲٪) مقاوم به آزترونام، ۴۶ ایزوله (۹۷/۸٪) مولد ESBL بودند و ۳۵ ایزوله (۷۴/۴٪) حاوی ژن *bla*_{TEM} بودند.

نتیجه گیری: درصد بالای مقاومت در ایزوله های اشریشیاکلی (۸۰/۴٪) و کلبسیلا پنومونیه (۹۱/۴٪) انجام دقیق آنتی بیوگرام لازم است.

کلید واژه ها: اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، بتا لاکتاماز طیف گسترده، دیسک آگار دیفیوژن، واکنش زنجیره پلیمرز.

مقدمه

را از طریق گروه کربوکسیل حلقه بتا لاکتام بوجود می آورند که حاصل آن باز شدن حلقه بتا لاکتام و غیرفعال شدن دارو می باشد. نقش اولیه بتا لاکتاماز حفاظت باکتری در برابر آنتی بیوتیکهای بتا

از نقطه نظر بالینی بتا لاکتامازها مهم ترین و وسیع ترین آنزیمهای تخریب کننده ای هستند که به آنتی بیوتیک های بتا لاکتام حمله ور می شوند. این آنزیم ها یک اتصال آسپیل کووالان

سپس باکتریهای جداسازی شده در محیط تریپتیکاز سوی برات حاوی گلیسرول کشت و در 8°C - نگهداری شدند. تعیین حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی بوسیله روش دیسک آگار دیفیوژن (Kirby-Bauer) انجام شد (۷). دیسک های مورد استفاده شامل سفوتاکسیم ($30\mu\text{g}$)، سفنازیدیم ($30\mu\text{g}$)، آمیکاسین ($30\mu\text{g}$)، ایمی پنم ($10\mu\text{g}$)، آزترونام ($30\mu\text{g}$)، سفوروکسیم ($30\mu\text{g}$)، پیپراسیلین / تازوباکتام ($100\mu\text{g} / 10\mu\text{g}$) و سفیم ($30\mu\text{g}$) بودند که از شرکت MAST تهیه شدند (۷).

تست فوتیپی تاییدی:

هدف از انجام این تست جداسازی سویه های تولید کننده ESBL بود. دیسک های مورد آزمایش شامل سفنازیدیم / کلاولانیک اسید ($\text{CAZ: } 30\mu\text{g} / \text{CV: } 10\mu\text{g}$) و سفوتاکسیم / کلاولانیک اسید ($\text{CTX: } 30\mu\text{g} / \text{CV: } 10\mu\text{g}$) به همراه سفوتاکسیم ($30\mu\text{g}$) و سفنازیدیم ($30\mu\text{g}$) که محصول شرکت Mast بودند به کار گرفته شدند.

بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در 37°C تولید ESBLs از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵ میلیمتر یا بیشتر در اطراف دیسک سفنازیدیم/کلاولانیک اسید یا سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید مشخص گردید (۱).

استخراج DNA و انجام PCR

ابتدا DNA پلاسمیدی نمونه ها به روش جوشاندن (boiling) استخراج گردید (۸). سپس تست PCR جهت شناسایی ژن های بتا لاکتامازی bla_{TEM} (۴۲۱bp) با شرایط مندرج در جدول ۱ انجام شد (۹). مشخصات پرایمرهایی که در انجام PCR مورد استفاده قرار گرفتند به شرح جدول ۲ بود.

همچنین از سویه های استاندارد *E. coli* ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی و *E. coli* ATCC 35218 به عنوان کنترل مثبت ژن bla_{TEM} استفاده گردید. از ژل آگارز ۱٪ و مارکر (Ladder Fermantase) SMO323 100bp برای الکتروفورز محصولات PCR استفاده شد.

لاکتام است، اما در بیوستتر پیتیدوگلیکان آنها بطور موقتی پیوندهای موجود در واسطه های ساختمان بتا لاکتام را می شکنند (۱). درباکتری های گرم منفی مقاومت در برابر بتا لاکتام می تواند به واسطه ی ژن های کروموزومی یا پلاسمیدی باشد اما در نمونه های بالینی معمولاً بروز مقاومت وابسته به ژن پلاسمیدهای R است (۲ و ۳). بتالاکتامازهای وابسته به پلاسمید در ۳ گروه بزرگ قابل تقسیم هستند: ۱- پنی سیلینازهای وسیع الطیف ۲- آگزا سیلینازها ۳- کاربونی سیلینازها. TEM-1 و TEM-2 و SHV-1 مهمترین بتا لاکتامازها هستند که محدوده طیف اثر وسیعی بر روی پنی سیلینها و سفالوسپورینها دارند. این بتا لاکتامازها بر روی پلاسمیدها حمل می شوند (۴ و ۵). امروزه تعداد ارگانیزم هایی که قادر به تولید آنزیم های ESBL هستند در حال افزایش است (۳ و ۱). انتقال و شیوع سریع میکروارگانیزم هایی که قادر به تولید این آنزیم ها هستند سبب افزایش شیوع عفونت های بیمارستانی در سراسر دنیا شده است (۱). اشیریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه از باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه هستند که توانایی تولید آنزیم های ESBL را دارند و عامل بسیاری از عفونت های بیمارستانی مثل عفونت های ادراری، عفونت های وابسته به کاتتر، انتریت، مننژیت نوزادی، عفونتهای دستگاه تنفسی و سپسیس می باشند (۶ و ۷). هدف این مطالعه، بررسی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی شناسایی ژن های بتا لاکتاماز تیب TEM در نمونه های بالینی اشیریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده از مراکز آموزشی و درمانی شهر تبریز (امام خمینی، سینا، شهدا و کودکان) بود.

مواد و روش ها

تعداد ۴۱ ایزوله ی بالینی اشیریشیا کلی و ۴۷ ایزوله ی بالینی کلبسیلا پنومونیه شامل نمونه های ادراری، مدفوع، زخم، آبه، کاتتر و تراشه از مراکز آموزشی و درمانی شهر تبریز (سینا، امام خمینی، شهدا و کودکان) جمع آوری و با انجام تست های بیوشیمیایی شناسایی و تعیین هویت شدند.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام PCR

ترتیب توالی نوکلئوتیدی	پرایمر
5'-ACA TGG GGG ATC ATG TACT-3'	Forward - TEM
5'-GAC AGT TAC AAT GCT TACT-3'	Reverse - TEM

جدول ۲: شرایط مورد استفاده در PCR

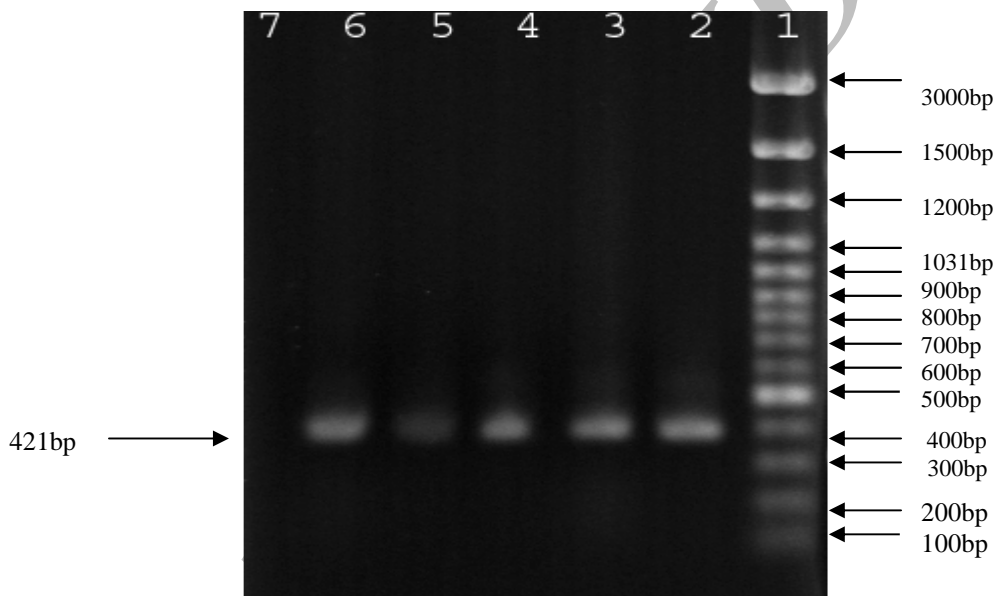
زمان	درجه حرارت ($^{\circ}\text{C}$)	مراحل آزمایش
۴ دقیقه	۹۴	دنا تورا سیون اولیه
۱ دقیقه	۹۴	دنا تورا سیون
۴۵ ثانیه	۵۳	اتصال پرایمر
۱ دقیقه	۷۲	طولیل سازی
۱۰ دقیقه	۷۲	طولیل سازی نهایی
	۳۵	تعداد سیکل ها

جدول ۳: الگو های حساسیت آنتی بیوتیکی در ایزوله های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه (%)

ایزوله	نوع مقاومت	پیراسیلین/تازوباکتام	ایمی پنم	آمیکاسین	سفیسم	سفروکسیم	سفتازیدیم	سفترباکسون	سفتوتاکسیم	آزترونام
اشریشیا کلی	حساس	۹/۷۶	۱۰۰	۸۷/۸۰	۱۴/۶۳	۴/۸۸	۱۹/۵۱	۲۱/۹۵	۷۸/۰۵	۴/۸۸
	بینابینی	۹/۷۵	۰/۰۰	۷/۳۲	۱۹/۵۲	۱۷/۰۷	۰/۰۰	۰/۰۰	۴/۸۸	۷/۳۲
	مقاوم	۸۰/۴۹	۰/۰۰	۴/۸۸	۶۵/۸۵	۷۸/۰۵	۸۰/۴۹	۷۸/۰۵	۱۷/۰۷	۸۷/۸۰
کلبسیلا پنومونیه	حساس	۴/۲۶	۱۰۰	۷۲/۳۴	۸/۵۱	۰/۰۰	۴/۲۶	۲/۵۰	۰/۰۰	۲/۱۳
	بینابینی	۸/۵۱	۰/۰۰	۱۷/۰۲	۸/۵۱	۲/۱۳	۴/۲۶	۴/۲۵	۱۰/۶۴	۱۰/۶۴
	مقاوم	۸۷/۲۳	۰/۰۰	۱۰/۶۴	۸۲/۹۸	۹۷/۸۷	۹۱/۴۸	۹۳/۶۲	۸۹/۳۶	۸۷/۲۳

جدول ۴: نتایج تست تاییدی در ایزوله های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه (%)

تغییرات هاله عدم رشد	سفتوتاکسیم/کلاولانیک اسید (کلبسیلا پنومونیه)	سفتازیدیم/کلاولانیک اسید (کلبسیلا پنومونیه)	سفتوتاکسیم/کلاولانیک اسید (اشریشیا کلی)	سفتازیدیم/کلاولانیک اسید (اشریشیا کلی)
افزایش هاله	۹۳/۶۲	۹۳/۶۲	۸۲/۹۲	۹۲/۶۸
عدم افزایش هاله	۶/۳۸	۶/۳۸	۱۷/۰۸	۷/۳۲



شکل ۱: نمایش ایزوله های دارای ژن *bla*_{TEM} (۴۲۱ bp).
۱: مارکر.

۲: کنترل مثبت ژن *bla*_{TEM} (*E. coli* ATCC 35218)
۳-۶: ایزوله های دارای ژن *bla*_{TEM}
۷: کنترل منفی (*E. coli* ATCC25922)

یافته ها

در بین ۴۱ ایزوله اشریشیا کلی بدست آمده ۳۶ ایزوله (۸۷/۸) مقاوم به آزترونام، ۳۳ ایزوله (۸۰/۴۹) مقاوم به پیراسیلین/تازوباکتام و سفتازیدیم، ۳۲ ایزوله (۷۸/۰۵) مقاوم به سفوتاکسیم، سفروکسیم و سفترباکسون، ۲۷ ایزوله (۶۵/۸۵) مقاوم به سفیسم و ۲ ایزوله (۴/۸۸) مقاوم به آمیکاسین بودند، ولی هیچکدام از ایزوله ها به ایمی پنم مقاومت نداشتند. تعداد ۱۹ ایزوله (۴۶/۳۴) مربوط به نمونه های ادراری و تعداد ۱۲ ایزوله (۲۹/۲۷) متعلق به نمونه های تراشه، ۷ ایزوله (۱۷/۰۷) مربوط به نمونه خون، یک ایزوله (۲/۴۴) مربوط به نمونه کاتتر، یک ایزوله (۲/۴۴) مربوط به نمونه مایع پلور و یک ایزوله (۲/۴۴) مربوط به نمونه خلط بود. همچنین ۴۰ ایزوله (۹۷/۵۶) ESBL مثبت و از ۴۱ ایزوله ای

که آزمایش PCR بر روی آنها انجام گرفت ۳۶ ایزوله (۸۷/۸) حاوی ژن *bla*_{TEM} بودند. در این مطالعه یک ایزوله حاوی ژن *bla*_{TEM} شناسایی گردید که آزمایش ESBL آن منفی بود. از بین ۴۷ ایزوله کلبسیلا پنومونیه ۴۶ ایزوله (۹۷/۸۷) مقاوم به سفروکسیم، ۴۴ ایزوله (۹۳/۶۲) مقاوم به سفترباکسون، ۴۳ ایزوله (۹۱/۴۸) مقاوم به سفتازیدیم، ۴۲ ایزوله (۸۹/۳۶) مقاوم به سفوتاکسیم، ۴۱ ایزوله (۸۷/۲۳) مقاوم به آزترونام و پیراسیلین/تازوباکتام، ۳۹ ایزوله (۸۲/۹۸) مقاوم به سفیسم و ۵ ایزوله (۱۰/۶۴) مقاوم به آمیکاسین بودند ولی هیچکدام از ایزوله ها به ایمی پنم مقاومت نداشتند. تعداد ۱۹ ایزوله (۴۰/۴۲) مربوط به نمونه های خون، ۱۷ ایزوله (۳۶/۱۷) مربوط به نمونه های تراشه،

ESBL در کشورهای مختلف به شرح ذیل بوده است: سال ۲۰۰۲ در ژاپن کمتر از ۱۰٪ (۱۸)، در ۲۰۰۲ در هندوستان ۶۸٪ (۱۴)، ۲۰۰۵ در پاکستان ۲۵٪ (۱۲) و ۲۰۰۲ در چین ۳۰٪ (۱۷) بود. میزان شیوع ESBL ها در نمونه های جداسازی شده از کشورهای مختلف و حتی از یک بیمارستان در یک کشور با بیمارستان دیگر در همان کشور می تواند تفاوت زیادی داشته باشد (۶).

در این مطالعه میزان تولید ژن *bla*_{TEM} در ایزوله های اشریشیا کلی حدود ۸۷/۸٪ بود. این میزان در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۸ در مالزی توسط Zamberi و همکاران انجام گرفت ۷۵٪ گزارش شد (۱۹). همچنین در مطالعه ای دیگر سال ۲۰۰۵ در کره ۷۸/۳٪ از کل ایزوله های اشریشیاکلی، ESBL مثبت دارای ژن *bla*_{TEM} بودند (۲۰) و این میزان در مطالعه اخیر ۹۰٪ نمونه های ESBL مثبت (۸۷/۸٪ کل نمونه ها) بود.

همچنین میزان ژن *bla*_{TEM} در یک مطالعه در هندوستان ۸۷/۳٪ بود (۱۰). در سال ۲۰۰۵ در کره ۶۰٪ از کل ایزوله های ESBL مثبت کلبسیلا پنومونیه دارای ژن *bla*_{TEM} بودند (۲۰) و این میزان در مطالعه اخیر ۷۶/۰۹٪ نمونه های ESBL مثبت بود (۲۰). در این مطالعه به ترتیب ۷۸/۰۵٪، ۷۵/۶۱٪ و ۷۳/۱۷٪ از ایزوله های اشریشیاکلی همزمان با داشتن ژن *bla*_{TEM} مقاوم به پیراسیلین/تازوباکتام، سفوتاکسیم و سفنازیدیم بودند و به همین ترتیب در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه، ۷۲/۳۴٪ مقاوم به پیراسیلین/تازوباکتام و سفوتاکسیم و ۷۰/۲۱٪ مقاوم به سفنازیدیم بودند. با توجه به افزایش روز افزون تپ های مختلف آنزیم های ESBL و تاثیر متفاوت آنها بر روی آنتی بیوتیک های مختلف، تعیین دقیق تپ های مختلف آنزیم TEM و سایر آنزیم های ESBL با روش های مولکولی دیگر مانند REP-PCR، PCR-RFLP و تعیین توالی (Sequencing) این ژن ها را گوشزد می نماید.

نتیجه گیری

با در نظر گرفتن این امر که آنتی بیوتیک های بتالاکتام بخصوص سفالوسپورین های نسل سوم اغلب درمان های آنتی بیوتیکی را در مراکز درمانی بخود اختصاص می دهند، مقاومت باکتریایی نسبت به این داروها به ویژه سفنازیدیم (۸۰/۴۹٪) در ایزوله های اشریشیاکلی و ۹۱/۴۸٪ در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه و مهارکنندگان بتا لاکتاماز ۹۳/۶۲٪ و ۹۳/۶۲٪ به ترتیب در برابر سفنازیدیم/ کلاولانیک اسید و سفوتاکسیم/ کلاولانیک اسید در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه و همچنین به ترتیب ۹۲/۶۸٪ و ۸۲/۹۲٪ نسبت به سفنازیدیم/ کلاولانیک اسید و سفوتاکسیم/ کلاولانیک اسید در ایزوله های اشریشیاکلی در حال افزایش است که تاثیر بالینی این داروها را به خطر انداخته است. بنابراین با توجه به ترشح آنزیم های ESBL در باکتریهای مهم پزشکی جهت پیشگیری از انتشار بیشتر این مقاومت های دارویی، تجویز آنتی بیوتیک های مناسب بر اساس نتایج دقیق تست حساسیت توصیه می گردد (۲۱).

۴ ایزوله (۸/۵۱٪) مربوط به نمونه های ادراری، ۴ ایزوله (۸/۵۱٪) مربوط به نمونه های مایع برونش، یک ایزوله (۲/۱۳٪) مربوط به مایع پلور، یک ایزوله (۲/۱۳٪) مربوط به ترشحات حلق و یک ایزوله (۲/۱۳٪) مربوط به نمونه مدفوع بود. تعداد ۴۶ ایزوله (۹۷/۸۷٪) ESBL مثبت بودند. از ۴۷ ایزوله کلبسیلا پنومونیه که آزمایش PCR بر روی آنها انجام گرفت ۳۵ ایزوله (۷۴/۴۶٪) حاوی ژن *bla*_{TEM} بودند.

بحث

بتالاکتامازهای طیف گسترده قادر هستند تعداد زیادی از آنتی بیوتیک های بتالاکتام را که بطور رایج استفاده می شوند هیدرولیز کنند و به همین دلیل به آنها بتا لاکتامازهای طیف گسترده (ESBLs) گفته می شود. بطور ذاتی به نظر می رسد ESBL ها بوسیله ژن های کروموزومی سفالوسپورین های کلاس C (*AmpC*) تولید و در مکانیسم ایجاد مقاومت در باکتری های گرم منفی شرکت می کنند. با این تعاریف ESBL ها مولکول های بتا لاکتاماز کلاس A یا D هستند که قادر به هیدرولیز اکسی ایمینوسفالوسپورین ها در اندازه های برابر یا ۱۰٪ بیشتر از بنزیل پنی سیلین ها می باشند (۶). ارگانیسم هایی که این ژن ها را حمل می کنند، باعث افزایش بیماریزایی در بین افراد می شوند (۴). مطالعات Chmelitsky و همکاران در سال ۲۰۰۵ در اسرائیل نشان می دهد که میزان حساسیت به سفنازیدیم در ایزوله های اشریشیاکلی ۴۵٪ است و در مقابل میزان مقاومت به سفنازیدیم در این مطالعه ۸۰/۴۹٪ بود (۱۰). بر اساس نتایجی که Lal و همکاران در سال ۲۰۰۶ در هندوستان بر روی نمونه های کلبسیلا پنومونیه به دست آوردند، میزان ESBL ها را ۸۶٪ تعیین کردند (۸) و این در حالی است که این میزان در این مطالعه ۷۴/۴۷٪ است میزان ایزوله های اشریشیاکلی مقاوم به آمیکاسین و پیراسیلین/تازوباکتام در مطالعه ی حاضر ۴/۸۸٪ و ۸۰/۴۹٪ و این میزان در یک مطالعه که در آلمان در سال ۲۰۰۵ توسط Kader و همکاران انجام گرفته بود ۷۲/۸٪ و ۶۶٪ گزارش شده بود (۱۱).

در این مطالعه ۹۷/۵۶٪ از ایزوله های اشریشیاکلی و ۹۷/۸۷٪ از ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مولد آنزیم های ESBL بودند. مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها بخصوص سفنازیدیم و بستری شدن در بخش ICU و استفاده از سوندهای ادراری و کاتترها جزو عوامل شیوع ESBL ها بودند. نتایج انتشار یافته در تحقیقات علمی گوناگون در سال های گذشته در مورد سویه های اشریشیاکلی تولید کننده ESBL در کشورهای مختلف به شرح ذیل بوده است: سال ۲۰۰۶ در پاکستان ۵۳/۳٪ (۱۲)، سال ۲۰۰۲ در هندوستان ۶۸٪ (۱۳)، سال ۲۰۰۵ در اسپانیا ۵۱/۸٪ (۱۴)، سال ۲۰۰۴ در کره ۹/۲٪ (۱۵)، سال ۲۰۰۵ در لبنان ۱۳/۳٪ (۱۶)، سال ۲۰۰۵ در اسرائیل ۲۲٪ (۱۰) و سال ۲۰۰۲ در چین ۳۵-۱۳٪ (۱۷) بود. همچنین نتایج انتشار یافته در تحقیقات علمی گوناگون در سال های گذشته در مورد سویه های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده

References:

- Joklik WK, Willett HS, Wilfert CH (eds). Antimicrobial agents. In: *Zinsser Microbiology*. 20th ed. Norwalk, Appleton and Lange, 1992; PP: 153-187.
- Mocktar C, Govinden U, Sturm AW, Essack S. TEM-146 beta-lactamases produced by *Escherichia Coli* isolates from state hospitals Kwazulu- Natal, South Africa. *African Journal Of Biotechnology* 2007; **6**(5): 493-495.
- AL-Agamy MHM, Ashour MS, Wiegand I. First description of CTX_M beta-lactamase-producing clinical *Escherichia Coli* isolates from Egypt. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2006; **27**: 545-548.
- Song JS, Lee JH, Lee JH, Jeong BC, Lee WK, Lee SH. Removal of contaminating TEM-1a beta-lactamase gene from commercial Taq DNA polymerase. *Journal of Microbiology* 2006; **44**(1): 126-128.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents Chemother* 1995; **39**: 1211-1233.
- Sturenburg E, Mak D. Extended-spectrum beta-lactamases: Implications for the clinical microbiology Laboratory, therapy, and infection control of infection, *Journal of Infection* 2003; **47**: 273-295.
- Clinical Laboratory and Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 15th informational supplement (M100-s15). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa: 2005.
- 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 Journal Med Res* 2007; **125**: 173-178.
- Goyal A, Prasad A, Ghoshal U, Prasad KN. Comparison of disk diffusion, disk potentiation and double disk synergy methods for detection of extended spectrum beta lactamases in Enterobacteriaceae. *Indian Journal Med Res* 2008; **128**: 209-211.
- Chmelinitzky I, Carmeli Y, Leavitt A, Schwaber MJ, Navon - Venezia S. CTX - M - 2 and a new CTX - M - 39 enzyme are the major extended-spectrum beta - lactamases in multiple *Escherichia Coli* clones isolated in Tel Aviv, Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49** (11): 4745-4750.
- Kader AA, Kumar A. Prevalence and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-15) producing *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* in a general hospital. *Ann Saudi Med* 2005; **25**(3): 239-242.
- Shamim M, Mumtaz A, Irum A, Naeem A, Abdul H. Frequency of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and Blood Stream Infections. *Infection Journal of Pakestan* 2008; **17**: 48-51.
- Mathani D, Rhomberg PR, Biedenbach, Jones RN. Evaluation of the invitro activity of six broad-spectrum beta-lactam antimicrobial agents tested against recent clinical isolates from India: a survey of ten medical center laboratories. *Diagn Microbial Infect Dis* 2002; **44**: 367-377.
- Rodriguez BJ, Navarro MD, Romero L, Martinez L. Epidemiology and clinical infections ESBL- producing *Klebsiella Strain*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; **57**: 562-565.
- Jeong SH, Bae IK, Lee JH, Sohn SG, Jeon GJ, Kim YH, Jeong BC, Lee SH. Spectrum beta-Lactamases Produced by Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia Coli* from a Korean Nationwide Survey. *Journal Clinical Microbiol* 2004; **42** (7): 2902-2906.
- Moubareck C, Daoud Z, Hakime NI, Hamze M, Mangeney N. Countrywide Spread of Community and Hospital Acquired Extended-Spectrum beta-Lactamases (CTX - M - 15) Producing Enterobacteriaceae in Lebanon, *Journal Clinical Microbial* 2005; **43**(7): 3309 - 3313.
- Hawkey PM. Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamase in Asia. *Journal European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2008; **14**: 159-165.
- Hira KY, Matsuda J, Mizuyazaki Y. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing clinical isolates in the Asia Pacific region (SENTRY 1998-2002). *Diagn Microbial Infect Dis* 2005; **52**: 323-329.
- Zamperi S, Rusmah Y, Rusmah M. Extended spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* from a tertiary hospital in Malaysia: emergence of CTX-M-type beta-lactamases variation. *Research of Microbiology* 2008; **125**: 1-5.
- Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, Park YJ, Lee K, Bae IK. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; **56**: 698-702.
- Thomson KS. Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *Emerg Infect Dis* 2001; **7**(2): 1-9.