

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۲ شماره ۴ مهر و آبان ۱۳۸۹ صفحات ۱۵-۱۱

شیوع باسیلهای گرم منفی مولد آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف در نمونه های بالینی به دست آمده از بیماران بستری

ژینوس بیات ماکو: گروه بیماریهای عفونی، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
Email: zhinous-b@yahoo.com

احسان بینش: گروه بیماریهای عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
آلکا حسینی: گروه میکروبیوشناسی، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
بهروز نقیلی: گروه بیماریهای عفونی، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
لیلا علیپور: کارشناس پرستاری، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۷/۱۲/۱۵، پذیرش: ۸۸/۱۱/۱۶

چکیده

زمینه و اهداف: بتالاکتام ها بیشترین آنتی بیوتیک های مصرفی در درمان عفونت های باکتریایی می باشند. تولید بتالاکتامازها در میان باکتری های گرم منفی، یکی از علل مهم مقاومت به این آنتی بیوتیک ها در سرتاسر دنیا است. مواجهه مداوم گونه های باکتریایی به انواع بتالاکتام ها منجر به تولید و جهش دینامیک و مداوم بتالاکتامازها در این باکتریها و افزایش طیف فعالیت آنها در برابر آنتی بیوتیک های جدید شده است. باکتریهای تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (Extended spectrum β -lactamase) از مهمترین مشکلات پیش روی گروه های مطالعاتی مقاومت باکتریایی فعلی می باشند. هدف از این مطالعه بررسی شیوع باسیلهای گرم منفی تولید کننده Extended spectrum β -lactamase جدا شده از بیماران بستری است.

مواد و روشها: در یک بررسی توصیفی - تحلیلی، ۱۹۱ ارگانیزم گرم منفی جدا شده از بیماران بستری در بخشهای مختلف بیمارستان سینا در مدت ۱۵ ماه ارزیابی شدند. ترفیق آبگوشت، سینرژژی دیسک دوگانه و E-test جهت تایید حضور ارگانیزم های تولید کننده Extended spectrum β -lactamase بکار رفتند. عوامل خطر احتمالی جهت حضور باسیلهای گرم منفی تولید کننده Extended spectrum β -lactamase نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج: ۹۳ (۴۹٪) نمونه باکتری تولید کننده Extended spectrum β -lactamase شامل کلبسیلا پنومونیه (۶۲/۹٪)، اشیشیا (۴۹/۲٪)، انتروباکتر (۱۹/۲٪)، سینتروباکتر (۱۰۰٪) و سراسیا (۵۰٪) بودند. طول مدت بستری، بستری بخش مراقبت ویژه، سابقه مصرف طولانی مدت آنتی بیوتیک، عفونت با کلبسیلا پنومونیه، سابقه استفاده از کاتتر و سابقه بستری قبلی بیمارستانی طی ۳ ماه اخیر در نمونه های حاوی باسیلهای تولید کننده Extended spectrum β -lactamase به طور معنی داری بیشتر بود ($P < ۰/۰۵$). میزان مرگ و میر در گروه بیماران آلوده با باکتریهای تولید کننده Extended spectrum β -lactamase بیشتر بود ($P = ۰/۰۴۱$).

نتیجه گیری: مطالعه فعلی بیانگر میزان قابل توجه عفونت با باسیلهای گرم منفی مولد Extended spectrum β -lactamase بوده که اهمیت کنترل عوامل مستعد کننده بویژه لزوم دقت در تجویز منطقی آنتی بیوتیک را نشان می دهد.

کلمات کلیدی: آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف، عفونت بیمارستانی، باسیل گرم منفی

مقدمه

مقاومت باکتریایی نسبت به مهار کننده های بتالاکتاماز مشکل عمده ای بوده که علم طب با آن مواجه گردیده و هر روز این وضعیت بدتر می شود. تاکنون بیش از ۳۴۰ آنزیم بتالاکتاماز کشف شده

بتالاکتام ها بیشترین آنتی بیوتیکهای مورد استفاده در درمان عفونت های باکتریال بوده، ولی از طرف دیگر استفاده بیش از حد آنها منجر به تولید بتالاکتاماز در میان ارگانیزم ها گردیده است.

مورفولوژی کلنی و تستهای بیوشیمیایی استاندارد مشخص گردید. تائید سویه های ایزوله شده با استفاده از تشخیص بیوشیمیایی برای آنتریباکتریاسه ها صورت گرفت. آنتی بیوگرام به روش disk diffusion در محیط کشت Mueller - Hinton صورت گرفته و نتایج بر اساس معیارهای CLSI تفسیر شد. در آنتی بیوگرام، از آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین (10µg ، 25µg)، سیپروفلوکساسین (1µg)، جنتامایسین (10µg)، سفوتاکسیم (30µg)، سفنازیدیم (30µg)، کوتریموکسازول (25µg)، آزترونام (30µg) و ایمی پنم (10µg) استفاده شد. تولید Extended spectrum β-lactamase با ۳ روش، double disk synergy (DDS)، تهیه رقت در محیط کشت مایع و E-test تعیین شد.

۱) تعیین MIC به روش تعیین رقت در محیط کشت مایع MIC سفنازیدیم برای هر یک از سویه ها به روش broth microdilution مشخص شد. تمام سویه ها با $MIC \geq 2\mu g/ml$ برای احتمال تولید Extended spectrum β-lactamase تحت بررسی بیشتر با روشهای DDS و E-test قرار گرفت. سویه های مولد Extended spectrum β-lactamase تلقی شد که یکی از تستهای ذکر شده فوق (DDS یا E-test) در مورد آنها مثبت باشد. از آنجا که بر اساس معیارهای CLSI، نمی توان Extended spectrum β-lactamase بودن نمونه های غیرفرماتر (NLF) نظیر آسیتوباکتر و پseudomonas را تعیین کرد این موارد وارد مطالعه نشدند.

۲) DDS: در این تست، دیسک سفالوسپورین های نسل سوم و آزترونام به فاصله 25-30mm از دیسک آموکسی سیلین - کلاولانیک اسید در محیط کشت مولر شیتون قرار گرفتند. گسترش منطقه توقف از قسمت سفالوسپورین ها / آزترونام به طرف کوآموکسی کلاو، به عنوان Extended spectrum β-lactamase مثبت تلقی شد.

۳) E-test: در این روش از نوارهای E-test مربوط به Extended spectrum β-lactamase استفاده شد که یک طرف حاوی سفنازیدیم و طرف مقابل آن حاوی سفنازیدیم + کلاولانیک اسید می باشد. MIC به صورت ارتفاع محل تقاطع ناحیه مهارى بر روی نوار، در هر طرف از نوار مذکور تعریف شده است. نسبت MIC سفنازیدیم به MIC سفنازیدیم + کلاولانیک اسید، معادل یا بیشتر از ۸ نشان دهنده وجود Extended spectrum β-lactamase بوده است.

در این مطالعه جنس، سن، مدت بستری بیمارستانی، بخش بستری، نمونه بررسی شده، سابقه مصرف طولانی مدت آنتی بیوتیک، نوع میکروارگانیزم، سابقه استفاده از کاتتر، سابقه استفاده از آنتی بیوتیک در بخش، سابقه بستری قبلی طی سه ماه اخیر، پیامد بالینی بیمار هم بررسی گردید.

است. این گستردگی طیف مقاومت باکتریایی باعث ایجاد گروهی از بتالاکتامازها به نام Extended spectrum β-lactamase (ESBL) شده است. تولید Extended spectrum β-lactamase در ابتدا محدود به گونه های E.coli و کلبسیلا بوده ولی در حال حاضر در سایر گونه ها نیز مشاهده می شود (۱).

ارگانیزم های مولد Extended spectrum β-lactamase معضل بزرگی را فرا روی میکروبیولوژیست های بالینی، پزشکان، متخصصین کنترل عفونت و دانشمندان فعال در زمینه یافتن آنتی بیوتیک های جدید قرار داده اند. Extended spectrum β-lactamases معمولاً در پلاسمیدهای قرار گرفته اند که می توانند از یک سویه به سویه ای دیگر و از گونه ای به گونه ای دیگر منتقل شوند و نیز آنها آنزیم هائی هستند که توانائی هیدرولیز کردن سفالوسپورین های نسل سوم و چهارم نظیر سفنازیدیم، سفوتاکسیم و سفپیم را دارند. امروزه کاربایم داروی انتخابی جهت درمان عفونت های ایجاد شده توسط ارگانیزم های مولد Extended spectrum β-lactamase محسوب می گردد (۱ و ۲).

تعیین گونه های مولد Extended spectrum β-lactamase در بیمارستانها به ۲ دلیل عمده اهمیت بسزائی دارد: ۱) شیوع این سویه ها به احتمال زیاد بیش از آن میزانی است که با تستهای روتین سنجش حساسیت به بتالاکتام های وسیع الطیف مشخص می شود، Extended spectrum β-lactamases در حال حاضر تهدیدی جدی برای درمان عفونت ها با بتالاکتام ها محسوب می شود (۲). در حال حاضر با توجه به گسترش گونه های تولید کننده Extended spectrum β-lactamase در سرتاسر دنیا، تعیین شیوع این باکتریها در هر مرکزی منطقی به نظر می رسد تا بتوان بر اساس آن سیاستی را برای درمان تجربی در موارد پرخطر که احتمال وجود این ارگانیزم بالاست، مشخص نمود (۱-۲). فلذا جهت نیل به اهداف مذکور، این مطالعه به منظور تعیین شیوع ارگانیزم های مولد Extended spectrum β-lactamase، شیوع بیماراران با عفونت های ایجاد شده با گونه های مولد Extended spectrum β-lactamases از خانواده آنتریباکتریاسه ها و پیامد (out come) بیماراران انجام گرفته است.

مواد و روشها

در یک مطالعه توصیفی - تحلیلی، ۱۹۱ سویه گرم منفی ایزوله شده از بیماراران بستری از نظر تولید Extended spectrum β-lactamase در بیمارستان سینای تبریز در طی ۱۵ ماه (بهمن ۸۵ لغایت اردیبهشت ۸۷) مورد بررسی قرار گرفت.

باسیلهای گرم منفی از نمونه های بالینی شامل ادرار، خون، چرک آسپیره شده، خلط، نمونه تهیه شده از chest tube، کاتتر های وریدی و کاتترهای مرکزی (CVP)، به آزمایشگاه میکروبیولوژی بیمارستان ارسال و کشت در محیط Blood agar و agar Meconkey's صورت گرفت. پلیت ها در شرایط هوازی و در 37°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شده و بعد ارگانیزم بر اساس

نتایج

در کل ۱۴۳۲ نمونه بالینی جدا شده از بیماران بستری در مرکز سینا مورد بررسی قرار گرفتند که ۲۶۵ سویه از باکتریهای جدا شده گرم منفی بودند (۱۸/۵٪). در ۱۹۱ (۷۲/۱) مورد، امکان بررسی وضعیت Extended spectrum β -lactamase میسر شد.

۹۸ نمونه Extended spectrum β -lactamase منفی (گروه N) و ۹۳ نمونه Extended spectrum β -lactamase مثبت (گروه P) بود. از نظر سن، جنس، سابقه استفاده از آنتی بیوتیک در بخش و نمونه‌های ارسالی (خون- خلط- ادرار- زخم) تفاوت معنی دار آماری بین دو گروه وجود نداشت.

از نظر مدت بستری بیمارستان ($P=0/06$)، سابقه مصرف طولانی مدت آنتی‌بیوتیک ($P=0/32$) سابقه استفاده از کاتتر ($P=0/028$)، سابقه بستری قبلی در بیمارستان در سه ماه اخیر ($P=0/33$) پیامد بالینی و درصد فراوانی فوت ($P=0/41$) در گروه Extended spectrum β -lactamase مثبت به طور معنی داری بیشتر بود.

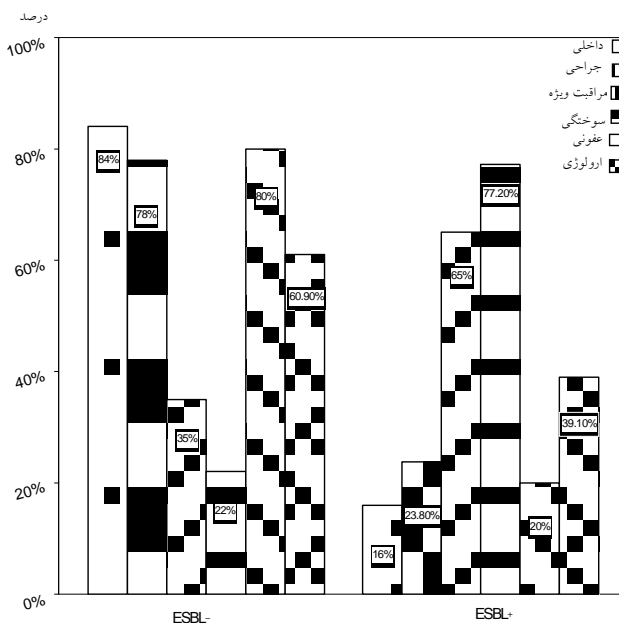
از نظر بخش بستری (نمودار ۱)، درصد فراوانی موارد بستری شده در بخش سوختگی در گروه Extended spectrum β -lactamase مثبت به طور معنی داری بیشتر بود ($P=0/001$).

از نظر نوع میکروارگانیزم (نمودار ۲)، درصد فراوانی عفونت با کلبسیلا پنومونیه در گروه Extended spectrum β -lactamase مثبت به طور معنی داری بیشتر بود ($P=0/03$).

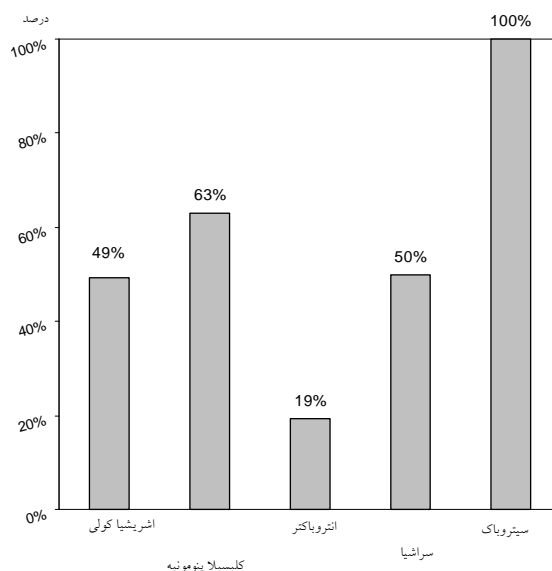
بحث

در این بررسی موارد Extended spectrum β -lactamase مثبت در بین سویه های گرم منفی جدا شده، از بیماران بستری در بیمارستان سینای تبریز مورد مطالعه قرار گرفت. ۴۸/۷٪ این سویه ها گرم منفی (بدون احتساب آسیتوباکتر و پسودوموناس) Extended spectrum β -lactamase مثبت بودند. از نظر نوع ارگانیزم، ۶۱/۹٪ سویه های کلبسیلا پنومونیه، ۴۹/۲٪ سویه های اشیشیا کلی، ۱۹/۲٪ سویه های انتروباکتر، ۵۰٪ سویه های سراسیا و ۱۰۰٪ سویه های سیتروباکتر Extended spectrum β -lactamase مثبت بودند. مطالعات گوناگون در سراسر دنیا در ارتباط با Extended spectrum β -lactamase انجام گرفته که نتایج بسیار متغیر داشته اند (۱۲-۳) که تعدادی از آنها با مطالعه فعلی مورد مقایسه قرار گرفته است.

در مطالعه Paterson و همکاران ۲۰٪ سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و ۳۱٪ سویه های انتروباکتر ایزوله شده از بیماران بستری در بخش مراقبت های ویژه Extended spectrum β -lactamase مثبت بودند. در مطالعه Masterton و همکاران در بریتانیا موارد Extended spectrum β -lactamase مثبت در سویه‌های انتروباکتریاسه ها ۲۰-۱۷٪ در اشیشیاکلی ۲۰-۲٪، کلبسیلا پنومونیه ۱۴-۱۱٪، انتروباکتر ۳۹-۷۲٪ و در کل موارد گرم منفی ۴۴-۶۳٪ گزارش گردید. در بررسی شاه و همکاران در پاکستان ۲۰٪ سویه های کلبسیلا



نمودار ۱: درصد فراوانی بخش های بستری در نمونه های Extended spectrum β -lactamase- و spectrum β -lactamase+



نمودار ۲: درصد فراوانی نمونه های Extended spectrum β -lactamase+ در انواع مختلف میکروارگانیزم

بر اساس داده های به دست آمده بررسی آماری، با برنامه SPSSTM نسخه ۱۵ انجام گرفته، متغیرهای کمی با استفاده از student T-test (independent samples) مقایسه شده و مقایسه در مورد متغیرهای کیفی (categorical) توسط contingency tables و با استفاده از chi-square test و یا fisher's exact test برحسب شرایط صورت گرفت و نتایج در صورت دارا بودن $P \leq 0.05$ معنی دار شناخته شد.

قبلی در بیمارستان طی سه ماه اخیر در نمونه های باسیل های گرم منفی Extended spectrum β -lactamase مثبت به طور معنی داری بیشتر بود.

در مطالعات مختلف دیگر نیز سابقه مصرف آنتی بیوتیک قبلی و طولانی مدت به عنوان یکی از مهمترین عوامل خطر ایجاد سوشهای Extended spectrum β -lactamase مثبت معرفی شده است (۲۰-۱۷). در رابطه با ریسک فاکتورهای دیگر هم مطالعاتی بررسی شد (۲۱ و ۲۲). Rodriguez-Bano سابقه بستری طی ۳ ماه اخیر، عفونت با کلبسیلا پنومونیه و سابقه مصرف قبلی آنتی بیوتیک را مهمترین ریسک فاکتورهای این وضعیت گزارش نموده است. Kanafani نیز مصرف آنتی بیوتیک اخیر، وجود کاتتر، بستری طولانی مدت را از عوامل خطر ایجاد سویه های Extended spectrum β -lactamase مثبت دانسته است. همانگونه که ملاحظه می شود نتایج مطالعه ما در این زمینه هم راستا با نتایج مطالعات دیگر است. نیز در بررسی فعلی میزان مرگ و میر در دو دسته بیماران دارای نمونه های Extended spectrum β -lactamase مثبت و Extended spectrum β -lactamase منفی مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که تعداد موارد مرگ و میر ناشی از عفونت در گروه یا سویه باسیلهای گرم منفی Extended spectrum β -lactamase مثبت به طور معنی داری بیشتر بود. در مطالعات مختلف قبلی نیز میزان مرگ و میر در آلودگی در موارد Extended spectrum β -lactamase مثبت بالا گزارش شده است (۲۵-۲۳ و ۴).

نتیجه گیری

بر اساس نتایج این مطالعه و بررسی های مشابه در سراسر جهان موارد Extended spectrum β -lactamase مثبت به ویژه در باکتریهای گرم منفی رو به افزایش بوده، که خود منجر به مشکلات درمانی بیماران و در نهایت منجر به مرگ و میر بالای بیماران می گردد. بنابراین بهتر است که برنامه های کنترلی در هر مرکز از قبیل شناسایی ارگانسیم های مولد Extended spectrum β -lactamase، انتخاب آنتی بیوتیکی مناسب به درمان موثر این عوامل پرداخته و نیز با محدود ساختن مصرف آنتی بیوتیک وسیع الطیف فقط در موارد لزوم، از ایجاد ارگانسیم های مقاوم پیشگیری نمائیم.

پنومونیه در بیماران بستری در بخش های غیر از بخش مراقبت های ویژه (ICU) و ۴۲٪ نمونه های بستری شده در بخش مراقبت های ویژه از نظر Extended spectrum β -lactamase مثبت بودند. در بررسی جامع Hirakata و همکاران در مورد سویه های کلبسیلا پنومونیه ۳۵/۶٪ موارد در سنگاپور، ۳۰/۷٪ موارد در چین، ۲۸/۱٪ موارد در آفریقای جنوبی، ۲۱/۹٪ موارد در فیلیپین، ۱۰٪ موارد در ژاپن و ۱۰٪ موارد در استرالیا Extended spectrum β -lactamase مثبت بودند. در بررسی های انجام گرفته در تهران در یک بررسی ۶۷/۲٪ سویه های اشریشیاکلی Extended spectrum β -lactamase مثبت بوده (۷)، و در دو مطالعه دیگر به ترتیب ۴۴/۵٪ و ۲۰/۴٪ نمونه های کلبسیلا پنومونیه Extended spectrum β -lactamase مثبت بودند (۸ و ۹). همچنین در مطالعه میرصالحیان بر روی سویه های ایزوله شده از بخش های مراقبت ویژه ۸۰/۶٪ سویه های Extended spectrum β -lactamase مثبت بوده و در این میان کلبسیلا پنومونیه ۷۶/۷٪، اشریشیاکلی ۶۰/۶٪ و انتروباکتر ۴۷/۱٪ گزارش شد. در مطالعات انجام گرفته در تبریز بر روی سویه های کلبسیلا پنومونی ایزوله شده از بخش های مراقبت ویژه ۹۷/۷-۹۰/۹٪ سویه ها Extended spectrum β -lactamase مثبت بودند (۱۱). همچنین در مطالعه ای دیگر در بخش های مراقبت ویژه کودکان ۹۷/۹٪ نمونه های انتروباکتریاسه ها Extended spectrum β -lactamase مثبت بودند (۱۲). همانطور که مشاهده می شود نتایج مطالعات مختلف در این زمینه بسیار متنوع بوده و نتایج مطالعه فعلی نیز در غالب موارد در محدوده گزارش شده قرار دارد. وجود تفاوت عمده از نظر گزارش فراوانی موارد Extended spectrum β -lactamase، در مناطق مختلف جغرافیایی (۱۵-۱۳)، و نیز تفاوت در سیاست های کنترل عفونت در مراکز درمانی مختلف، از مهمترین دلایل گستردگی نتایج در بررسی های مختلف عنوان شده است (۱۶). جهت مشخص شدن دقیق تر علت تفاوت در مراکز مختلف، منطقی است که عوامل خطر مثبت شدن سویه ها از نظر Extended spectrum β -lactamase مورد بررسی قرار گیرند، که ما در این مطالعه ریسک فاکتورها را ارزیابی نمودیم، که طول مدت بستری بیمارستانی، موارد بستری در بخش مراقبت های ویژه، سابقه مصرف طولانی مدت آنتی بیوتیک، عفونت با کلبسیلا پنومونیه سابقه استفاده از کاتتر و سابقه بستری

References

- Helfand MS, Bonomo RA. β -lactamases: A survey of protein diversity, *Curr. Drug Targets Infect Disord* 2003; 3(1): 9-23.
- Blahova J, Kralikova K, Kremery V. New aspects of antibiotic resistance and possibilities of its prevention. *Cas Lek Cesk* 2001; 140(16): 487-491.
- Paterson DL, Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. *Am J med* 2006; 119 (6 supp 1): 20-S28.
- Masterton RG, Tuner PJ. Trends in antimicrobial susceptibility in vlc centers: the MYSTIC programme (1997-2002). *Int J Antimicrob Agents* 2006; (1): 69-72.
- Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. *Res Microbiol* 2004; 155(6): 409-421.

6. Hirakata Y, matsuda J, Miyazaki Y, Kamihira S, Kawakami S, Miyazawa Y, et al. Asia-Pacific Participants. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; **52**(4): 323-329.
7. Mehrgan H, Rahbar M. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. *Int J Antimicrob Agents* 2008; **31**(2): 147-151.
8. Feizabadi MM, Etemadi G, Yadegarinia D, Rahmati M, Shabanpoor S, Bokaei S. Antibiotic-resistance patterns and frequency of extended-spectrum beta-lactamase-producing isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Tehran. *Med Sci Monit* 2006; **12**(11): 362-365.
9. Mozafari A, Foruhesh Tehrani H, Tavad Langroodi Z, et al. extended - spectrum β -lactamase induced drug resistance in multi-drug resistant *klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients. *Shaheed Beheshti Medical Research Journal* 2007; **31** (3): 241-245.
10. Mirsalehian A, Akbari Nakhjavani F, Peymani A, et al. Frequency of extended spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae in intensive care units. *Tehran University Medical Journal*. 2007; **65** (1): 33-38.
11. Mobaiyen H, Nahaei MR, Amir mozafari N, et al. CTX-M Extended - spectrum β -lactamase among clinical Isolates of *klebsiella pneumoniae* strains Isolated from Intensive care units in Tabriz. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine* 2007; **12** (38): 21-25.
12. Mobaiyen H, Nahaei MR, Amir mozafari N, et al. prevalence and plasmid profiles of Extended - spectrum Beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in Intensive care unit of children hospital in Tabriz. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences* 2006; **28** (2): 95-101.
13. Barroso H, Freitas-Vieira A, Lito LM, Cristino JM, Salgado MJ, Neto HF, et al. Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases at a Portuguese hospital: TEM-10 as the endemic enzyme, *J Antimicrob Chemothe* 2004; **5**: 611-616.
14. Nordmann P. Trends in β -lactam resistance among Enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis* 1998; **27**(1): 100-106.
15. Pai H, Lyu S, Lee JH, Kim J, Kwon Y, Kim JW, et al. Survey of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Prevalence of TEM-52 in Korea, *J Clin. Microbiol* 1999; **37**(6): 1758-1763.
16. Shahcheraghi F, Moezi H, Feizabadi MM. Distribution of TEM and SHV beta-lactamase genes among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Tehran. *Med Sci Monit*, 2007; **13**(11): BR247-BR250.
17. Hsueh PR, Chen WH, Luh KT.. Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria causing nosocomial infections from 1991-2003 at a university hospital in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 2005; **26**(6): 463-472.
18. Schwaber MJ, Cosgrove SE, Gold HS. Fluoroquinolones protective against cephalosporin resistance in gram-negative nosocomial pathogens. *Emerg Infect Dis* 2004; **10**(1): 94-99.
19. White RL, Friedrich LV, Mihm LB. Assessment of the relationship between antimicrobial usage and susceptibility: differences between the hospital and specific patients-care areas. *Clin Infect Dis* 2000; **31**(1): 16-23
20. Ray GT, Baxter R, Delorenze GN. Hospital-level rates of fluoroquinolone use and the risk of hospital-acquired infection with ciprofloxacin-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*, 2005; **41**(4): 441-449.
21. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(3): 1089-1094.
22. Kanafani ZA, mehio-Sibai A, Araj GF, Kanaan M, Kanj SS. Epidemiology and risk factors for extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms: a case control study at a tertiary care center in Lebanon. *Am J Infect Control* 2005; **33**(6): 326-332.
23. Baden LR, Eisenstein BI. Impact of antibiotic resistance on the treatment of Gram-negative sepsis. *Curr Infect Dis Rep* 2000; **2**(5): 409-416.
24. Reymond DP, Pelletier SJ, Crabtree TD, Evans HL, Pruett TL, Sawyer RG, et al. Impact of antibiotic resistant Gram-negative bacilli infections on outcome in hospitalized patients. *Crit Care Med* 2003; **31**(4): 1035-1041.
25. Vonberg RP, Wolter A, Chabermay IF, Kola A, Ziesing S, Suerbaum S, et al. Epidemiology of multi-drug-resistant Gram-negative bacteria: Data from an university hospital over a 36-month period. *Int J Hyg Environ Health*, 2007; **211**(3-4): Epub ahead of print