مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هفتم، شماره بیست و ششم - بهار ۱۳۹۶

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

فراوانی و الگوی مقاومت ایزوله‌های بالینی *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در مراکز درمانی شهرستان مرند، ایران

ابوالفضل جعفری ثالث [۱*]، هایده مبین [۲]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، اهر، ایران.

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: مهم‌ترین عامل مقاومت به سفالوسپورین‌ها باکتری‌های *اشریشیاکلی* تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف می‌باشد که در سراسر جهان در حال افزایش است. هدف از این مطالعه تعیین شیوع *اشریشیاکلی*‌های تولید کننده ESBL و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آن‌ها بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه طی ۶ ماه ۱۹۶ نمونه *اشریشیاکلی* از بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی دولتی و خصوصی شهرستان مرند جمع آوری و توسط تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. تأئید و غربالگری ESBL همراه با تست حساسیت ضد میکروبی با توجه به دستورالعمل‌های بالینی استانداردهای آزمایشگاهی (CLSI) انجام شد.

یافته‌ها: از ۱۹۶ نمونه جدا شده ، ۱۰۰ نمونه(۵۱/۰۲ ٪) تولید کننده ESBL بودند. ۸۲ درصد ایزوله‌ها مقاوم به آمپی سیلین و ۷۶ درصد حساس به ایمی پنم بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه حاکی از مقاومت بالای *اشرشیاکلی* به ویژه سویه های تولید کنندهESBL نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف می باشد. با توجه، به شیوع کمابیش بالای باکتری های تولیدکنندهESBL و مقاومت آن‌ها نسبت به سایر آنتی بیوتیک‌ها، باید از راهکارهای مهم کنترل عفونت مانند محدود نمودن مصرف از سفالوسپورین های وسیع الطیف، استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی :*اشریشیاکلی*، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، روش دیسک دیفیوژن، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه

استراتژی‌های مختلفی توسط باکتری‌ها به کار گرفته می‌شود تا از اثرهای زیان بار آنتی بیوتیک‌ها مصون بمانند.
یکی از مهم‌ترین این مکانیسم‌ها، که در باکتری‌های گرم منفی علیه آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام به کار گرفته می‌شود تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی(Beta- lactamase enzymes) می‌باشد (۱۲). این آنزیم‌ها، از طریق هیدرولیز حلقه بتالاکتام منجر به ایجاد مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک‌ها می‌شوند (۲۰). پیدایش آنتی‌بیوتیک‌های جدید از قبیل سفالوسپورین‌های طیف وسیع، آزترئونام‌ها و رواج استفاده از آن‌ها در درمان بیماری‌های عفونی باکتریال، منجر به بروز دسته جدیدی از این آنزیم‌ها به نام بتالاکتامازهای طیف وسیع شده است (۲۸). از زمان شناسایی این آنزیم‌ها درسال ۱۹۸۹ تاکنون بیش‌تر از ۱۵۰ نوع ESBLs شناخته شده است،که به طور عمده در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه بوده‌اند (۲۱). بتالاکتامازهای وسیع الطیف به‌طور عمده در دو جنس

نویسنده مسئول :
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، اهر، ایران
پست الکترونیکی:A.jafari_1392@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۰۹

کلبسیلا و *اشریشیا* تولید می‌شوند و سایر جنس‌های باکتری‌های روده ای در رتبه های بعدی قرار دارند (۵،۲۹).

امروزه گزارش‌های متعدد حاکی از شیوع این نوع مقاومت در اقصی نقاط دنیا بوده و مؤید یک مشکل جهانی است. این مطالعه‌ها مقاومت‌های چند دارویی باکتری‌ها را یکی از معضل‌های عمده پزشکی دانسته و بر لزوم بررسی و کنترل آن‌ها تأکید دارند (۹،۱۸). درمان عفونت با این دسته از ارگانیسم‌ها نیازمند تجویز آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف بوده و به ویژه در بیماران با ضعف سیستم ایمنی و در بخش‌های مراقبت‌های ویژه با مشکل‌های عدیده‌ای همراه است لذا آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی نقش مهمی در شناسایی و گزارش باکتری‌های مولد این نوع بتالاکتامازها و تسهیل در درمان مؤثر بیماران ایفا می‌کنند (۱۴،۲۴).

پس از آنجائی که *اشرشیاکلی* از گونه‌های شایع در تولید آنزیم‌های ESBL بوده و عامل اصلی در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به ویژه عفونت‌های ادراری عفونت‌های مجاری تنفسی تحتانی، احشایی، آبسه‌های کبدی کلانژیت و کوله سیستیت و آبسه‌های پانکراس می‌باشد. لذا با توجه به افزایش روبه رشد این سویه‌ها در عفونت‌های بیمارستانی و مراکز درمانی تعیین الگوی مقاومت گونه‌های *اشرشیاکلی* جدا شده از منابع بالینی و شناسائی سویه‌های تولیدکننده در نمونه‌های بالینی از اهداف این تحقیق می‌باشد.

روش کار

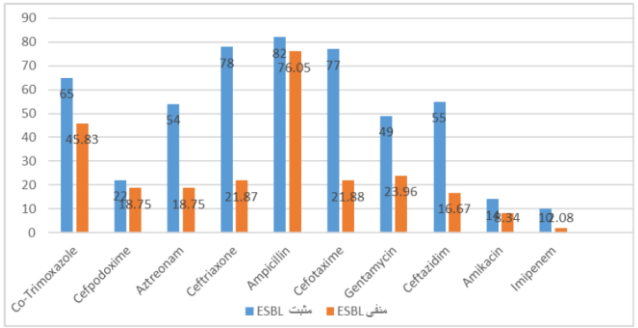
این مطالعه توصیفی مقطعی، به مدت ۷ ماه (از اردیبهشت تا مهر ماه سال۱۳۹۳) روی ۱۹۶ سویه *اشریشیاکلی* جدا شده از نمونه‌های بالینی (ادرار و خون) بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی دولتی و خصوصی شهرستان مرند انجام گردید و پس از انجام حداقل ۱۴ آزمایش بیوشیمیایی از جمله آزمایش‌های IMViC، دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه، اکسیداز، مصرف مالونات، اوره از تعیین هویت شدند. الگوی مقاومت این باکتری‌ها با روش Disk diffusion agar(DAD) مطابق دستورالعمل CLSI تعیین گردید. دیسک‌های آنتی بیوتیکی (پادتن طب) مورد استفاده عبارت بودند از : سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (3030 میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفپیم (۳۰ میکروگرم)، آزترونا (151میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰میکروگرم)، کوتریموکسازول (۲۵میکروگرم)، سفپودوکسیم (۳۰ میکروگرم). در این روش از محیط کشت مولرهینتون آگار (Merk) و با شرایط گرماگذاری ۳۵ به مدت ۲۴-۱۸ ساعت استفاده گردید به منظور شناسائی باکتری‌های تولیدکننده ESBLs در ابتدا آزمون غربال‌گری طبق دستورالعمل CLSI با استفاده از دیسک آنتی بیوتیک‌های سفپودوکسیم، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون و آزترونام انجام گردید. برای انجام این کار ابتدا برای تمام باکتری‌ها هاله عدم رشد مربوط به هر یک از این آنتی‌بیوتیک‌ها اندازه‌گیری شد، سپس اگر سویه‌هایی که حساسیت متوسط یا مقاومت، به یکی یا چند تا ازآنتی بیوتیک‌های سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفوتاکسیم، آزترونام وسفپودوکسیم را داشتند تست‌های تأئیدی برای باکتری انجام شد.

در آزمون تأئیدیDDST(double disk synergy test) از سری دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) وسفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، در فاصله ۲۵ میلی‌متری (مرکز به مرکز) از سفتازیدیم/کلاولانیک (۳۰/۱۰ میکروگرم) و سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید (۳۰/۱۰ میکروگرم) درمحیط مولرهینتون آگار از یکدیگر قرار داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴- ۱۸ ساعت انکوبه گردیدند. اگر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های ترکیبی حاوی اسید کلاولانیک، حداقل ۵ میلی‌متر ازدیسک‌های بدون اسید کلاولانیک بیش‌تر بود به عنوان تست تأئیدی ESBLs مثبت درنظر گرفته می‌شد (۱۳). ازسویه‌های استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 700603 به عنوان کنترل مثبت و *اشریشیاکلی* ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

نتایج

در این مطالعه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۱۹۶ سویه *اشرشیاکلی* جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی شهرستان مرند نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک با روش

DAD تعیین گردید. نمونه‌ها از ۱۰۲ (۵۲/۰۴ ٪) زن و ۹۴ (۴۷/۹۶ ٪) مرد جمع آوری شد. با توجه به نمودار شماره یک، بالاترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین (۸۲ ٪) و کم‌ترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک ایمی پنم (۱۰٪) بود. در مورد شناسایی باکتری‌های تولیدکننده ESBL، در این تحقیق در آزمون غربال‌گری از میان ۱۹۶ باکتری ۱۷۲ باکتری وارد مطالعه شدند و در آزمون نهایی ۱۰۰ سویه *اشرشیاکلی* (۵۱/۰۲ ٪) به عنوان باکتری‌های تولید کننده ESBL مشاهده گردید که در این باکتری‌ها درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در مقایسه با تعداد کل باکتری‌ها بیش‌تر می‌باشد. ۷۰ درصد ایزوله‌های تولیدکننده ESBLاز افراد مؤنث و ۳۰ درصد از افراد مذکر جدا گردید. میانگین سن بیماران مبتلا به *اشریشیاکلی* ESBLs، ۲۴/۴ ±۵۰ سال بود و همچنین توزیع ایزوله‌های بتالاکتاماز مثبت و منفی بر اساس نمونه بالینی در جدول شماره یک بیان شده است. در ۶ آنتی‌بیوتیک مقاومت بالاتر از ۵۰ ٪ مشاهده می‌شود که این اختلاف معنی‌دار می‌باشد .



نمودار ۱ : توزیع فراوانی مقاومت سویه‌های *اشریشیاکلی* ESBL مثبت و منفی نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج به روش دیسک دیفیوژن آگار

جدول ۱ : توزیع فراوانی سویه های *اشریشیاکلی* تولیدکننده بتالاکتاماز براساس نمونه بالینی(٪)

ایزوله *اشریشیاکلی*	ادرار	خون
ایزوله های ESBL مثبت	۹۶	۴
ایزوله های ESBL منفی	۴۶	۵۰
مجموع	۱۴۲	۵۴

بحث

بتالاکتامازها مکانیسم اصلی مقاومت باکتری‌های گرم منفی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام هستند. از زمانی که آنتی-بیوتیک‌های بتالاکتام در بالین مورد استفاده قرار گرفتند، بتالاکتامازها به همراه آن‌ها تکامل یافتند و نقش اصلی را در شکست‌های درمانی در آنتی بیوتیک تراپی ایفا کردند (۲۲). از پانزده سال پیش اپیدمی های متعددی از عفونت با ارگانیسم‌های تولید کننده بتالاکتاماز در سراسر دنیا مشاهده شده است. این پدیده تهدید بزرگی در استفاده از سفالوسپورین‌ها محسوب می شود. هم‌چنین به خوبی مشخص شده است که درمان رضایت‌بخشی از معالجه این‌گونه عفونت‌های مقاوم به سفالوسپورین عاید نمی‌شود. میزان مرگ و میر ناشی از باکتری‌های مولد آنزیمESBL به طور قابل توجهی بالا می‌باشد. مسئله دیگر این است که آیا درمان با سفالوسپورین‌ها برای ارگانیسم‌هایESBL مثبتی کهMIC آن‌ها در محدوده حساس می‌باشد مناسب است یا خیر؟ (۱۹). به نظر می‌رسد پیدایش و انتشار باکتری‌های مولد ESBL غالبا ناشی از استفاده گسترده داروهای بتالاکتام وسیع الطیف باشد، به طوری که امروزه شاهد افزایش روز افزون این باکتری‌ها در بخش‌های مختلف بیمارستان هستیم. شیوع *اشریشیاکلی* تولید کننده ESBL در نمونه‌های کلینیکی در این مطالعه ۵۱/۰۲ درصد می‌باشد. در مطالعه Tasli و همکاران در ترکیه تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف در سویه‌های *اشریشیاکلی* معادل ۱۷ در صد (۲۷) در مطالعه Villegas در کلمبیا ۴/۷-۳/۳ در صد (۳۱) در مطالعه Duttaroy و همکارانش در هند ۲۹/۱ درصد (۷) در مطالعه Brookly ۴/۷ درصد (۲۳) و در مطالعه Lavigne در فرانسه ۱۶/۲ درصد (۱۱)گزارش شده است. از طرفی مطالعه Zhou در شانگهای نشان داده است که ۴۷/۴ درصد *اشریشیاکلی*های جدا شده از بیماران ، تولید کننده آنزیم فوق بوده اند (۳۳). در مطالعه دیگری که توسط WU و همکارانش در بیمارستان‌های تایوان انجام شد ، *اشریشیاکلی* تولید کننده ESBL به میزان ۱۸/۱۸ درصد بوده است (۳۲). در حالی که در لبنان این میزان را ۲۸/۱ درصد گزارش نمودند(۶). در مطالعه فاضلی و همکاران از ۲۷۸ نمونه *اشریشیاکلی* ۱۵۰ نمونه (۵۳/۹٪) تولید کننده ESBL بودند (۸). در مطالعه مهرگان و همکاران هم شیوع سویه‌های *اشریشیاکلی* تولید کننده بتالاکتاماز ۱۶٪ گزارش گردید(۱۵). مقایسه این نتایج نشان می‌دهد که میزان ESBL در سوش‌های ایزوله شده از

کشورهای مختلف و هم‌چنین در یک کشور از یک بیمارستان با بیمارستان دیگر متفاوت می‌باشد که این مسئله بستگی به سیستم کنترل عفونت و نحوه درمان بیماران آن بیمارستان دارد (۲۵). در مطالعه حقی و همکاران ۶۶ سویه (۳۳٪) مولد ESBLs بوده و بیش‌ترین میزان مقاومت در برابر آموکسی‌سیلین (۷۱/۳۵٪) مشاهده شد و تمامی سویه‌ها (۱۰۰٪) در برابر ایمی‌پنم حساس بودند (۱۰) هم چنین در مطالعه مهاجری و همکاران بیشترین میزان حساسیت به ایمی پنم (۱۰۰٪) و بیش‌ترین میزان مقاومت به آمپی سیلین (۷۷٪) مشاهده شد (۱۶). رهبر و همکاران بیش‌ترین مقدار مقاومت را در سویه‌های *اشریشیاکلی*، به آمپی سیلین (۱۸ سویه، ۱۰۰٪) گزارش دادند (۴). در مطالعه Stephan در تانزانیا، مقاومت نسبت به آمپی سیلین ۹۲/۷ درصد گزارش شد (۱۷) در حالی که در مطالعه حاضر، این نسبت ۸۲ درصد می‌باشد. در این مطالعه ۷۶ درصد سویه‌ها حساس به ایمی پنم بودند در صورتی که در سایر مطالعه ها این میزان از ۹۱/۷ درصد تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است (۳۰، ۱،۲،۲۶).

در مطالعه حاضر ۵۵ درصد از نمونه‌های ESBL مثبت، مقاوم به سفتازیدیم بود و این امر حاکی از افزایش مقاومت به این دارو در کشور ما نسبت به گذشته می‌باشد که با توجه به این نتایج بایستی جهت جلوگیری از افزایش مقاومت در مصرف آنتی بیوتیک‌های فوق دقت نمود. در این مطالعه مقلیسه الگوی مقاومت *اشریشیاکلی* تولید کننده ESBL نسبت به آنتی بیوتیک‌ها بالاست که با نتایج به دست آمده با مطالعه Babypadmini و همکاران هم خوانی دارد (۳). در ظهور مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها که سالانه هزینه‌های گزافی به سیستم‌های بهداشتی کشورها تحمیل می‌کند علاوه بر مصرف نابه‌جای آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از اقدامات تهاجمی درمانی، بیماران دچار نقص ایمنی و عدم رعایت نکات عملی در زمینه کنترل عفونت نیز نقش مهمی را ایفا می‌نمایند.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه ، مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف به خصوص به بتالاکتام‌ها در *اشریشیاکلی* کسب شده از اجتماع یک مشکل درمانی مهم است و داشتن آنزیم ESBL یک نوع تهدید بزرگ برای مصرف سفالوسپورین طیف گسترده به شمار می‌رود. بنابراین برای درمان عفونت‌هایی که مشکوک به ارگانیسم تولید کننده ESBL هستند، باید آنتی‌بیوتیک مناسب بر اساس نتایج آزمایش آنتی بیوگرام انتخاب شود. هم‌چنین این یافته‌ها از یک طرف ضرورت تصمیم‌گیری درست در مورد تجویز منطقی داروها و از طرف دیگر اهمیت استفاده از روش‌های تشخیصی جدید در آزمایشگاه‌های میکروب شناسی را نشان می‌دهد .

سپاسگزاری

از ریاست محترم بیمارستان رازی شهرستان مرند و مسئولین آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد اهر و مرند به دلیل ارائه امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی جهت انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱. میرصالحیان اکبر، جبل‌عاملی فرشته، میرافشار سیدمحمد، باذرجانی فرزانه، گرجی‌پور عالیه، گلی حمیدرضا. تعیین سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در اشرشیاکلی و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها به روش دیسک آگار دیفیوژن .(DAD) مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران .۱۳۸۷ ;۶۶ (۶): ۳۷۸-۳۷۳.

۲. یزدی م، ناظمی ع، میری نرگسی میر ساعد، خاتمی نژاد محمد رضا، شریفی شهرآشوب، بابایی کوچکسرائی مایا. شیوع ژن های مقاومت بتا لاکتامازی SHV/CTX-M/TEMدر اشرشیا کلی جدا شده از عفونت ادراری در شهر تهران .مجله علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی گرگان. ۱۳۸۹; ۴ (۱) :۵۴-۴۸.

3. Babypadmini S, Appalaraju B. Extended spectrum -lactamases in urinary isolates of *Escherichia coli* and *klebsiella pneumoniae* - Prevalence and susceptibility pattern in a tertiary care hospital. Indian J Med Microbiol. 2004 Jul-Sep; 22(3): 172-4.
4. Behrouzi A, Rahbar M, Vand Yousefi J. The prevalence of Extended-Spectrum β-lactamase (ESBLs) producing *Klebsiella pneumonia* and *Eschrrichia coli* isolated in Milad hospital of Tehran in 2010. Iran J Med Microbiol. 2010; 4 (1 and 2) :36-41.
5. Bush KA, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta- lactamases and its correlation with molecular structures. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39: 1211-1233.
6. Daoud Z, Hakime N. Prevalence and susceptibility patterns of extended-spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general university hospital in Beirut, Lebanon. Rev Esp Quimioter. 2003 Jun; 16(2): 233-8.
7. Duttaroy B, Mehta S. Extended spectrum b lactamases (ESBL) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Indian J Pathol Microbiol 2005; 48: 45-8.
8. Fazeli H, Hoseini M, Mohammadi Ghalaei P. Frequency and resistance pattern of extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* in clinical specimen of Alzahra hospital in Isfahan, Iran, 2007. J Shahrekord Univ Med Sci. 2009; 10 (4) :58-64.
9. Franceschini N, Perilli M, Segatore B, Setacci, Amicosante G, Mazzariol A. Ceftazidime and aztreonam resistance in Providencia stuartii: characterization of a natural TEM- derived extended spectrum beta-lactamase, TEM-60. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42: 1459-1462.
10. Haghi F, Zeighami H, Keramati N, Hemmati F, Hajiahmadi F. Frequency of TEM Extended Spectrum Beta Lactamase Producing *Escherichia coli* in Clinical Specimens by Phenotypic and Molecular Methods in Zanjan. ZUMS Journal. 2013; 21 (85) :55-63.
11. Lavigne JP, Bouziges N, Chanal C, Mahamat A, Michaux- Charachon S, Sotto A. Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* isolates producing extended-spectrum betalactamases in a French hospital. J Clin Microbiol 2004; 42: 3805-8.
12. Li Q, Lee JY, Castillo R, Hixon MS, Pujol C, Doppalapudi VR, et al. NB2001, a novel antibacterial agent with broad-spectrum activity and enhanced potency against beta-lactamase-producing strains. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(5):1262-8.
13. Livermore DM, Woodford N. Guidance to Diagnostic Laboratories: laboratory Detection and Reporting of Bacteria With extended spectrum β-lactamases. Issued by Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory. Centre for Infections. Health Protection Agency. June 2004. http://www.evaluations-standards.org.uk.

14. Magdalena T, Fritz H, Herbert H. Survey and Molecular Genetics of SHV betalactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: Two Novel Enzymes, SHV-11 and SHV-12. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41(5): 943-949
15. Mehrgan H, Rahbar M. Prevalence of extended – spectrum beta – lactamase producing *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in Tehran. Iran J Antimicrob Agents. 2008; 31: 147 – 51.
16. Mohajeri P, Izadi B, Rezai M, Falahi B, Khademi H, Ebrahimi R. Assessment of the frequency of Extended Spectrum Beta Lactamases Producing *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections and its Antibiotic Resistance Pattern in Kermanshah. J Ardabil Univ Med Sci. 2011; 11 (1) :86-94.
17. Mshana SE, Kamugisha E, Mirambo M, Chakraborty T, Lyamuya EF. Prevalence of multiresistant gram negative organisms in a tertiary hospital in Mwanza, Tanzania. BMC Res Notes. 2009 Mar;2(49):325-328.
18. Palucha A, Mikiewics B, Hryniewicz W. Concurrent outbreaks of ESBL producing organism of the family *Entrobacteriaceae* in a Warsaw Hospital. J Antimicrobiol Chemother. 1999; 44(4): 489-99.
19. Paterson DL, Ko WC, Gottberg VA, Casellas JM, Mulazimoglu L, Klugman KP, et al. Outcome of Cephalosporin Treatment for Serious Infections Due to Apparently Susceptible Organisms Producing Extended – Spectrum Beta-lactamases: Implications for the Clinical Microbiology Laboratory. J Clin Microbiol 2001; 39(6): 2206-12
20. Perilli M, Celenza G, De Santis F, Pellegrini C, Forcella C, Rossolini GM, et al. E240V substitution increases catalytic efficiency toward ceftazidime in a new natural TEM-type extended-spectrum beta-lactamase, TEM-149, from *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(3):915-9.
21. Rupp ME, Fey PD. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. Drugs. 2003 Jan;63(4):353-65.
22. Sanders, CC. Chromosomal cphalosporinases responsible for multiple resistances to newer β–lactam antibiotics. Clin Microbiol Rev. 1987; 41:573- 593.
23. Saurina G, Quale JM, Manikal VM, Oydna E, Landman D. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brooklyn, NY: epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. J Antimicrob Chemother. 2000; 45: 895-8.
24. Schiappa DA, Haiden MK, Matushek MG, Hashemi FN, Sullivan J, Miyashiro KY et al. Ceftazidime resistant *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* bloodstream infection: a case-control and molecular epidemiologic investigation. J Infect Dis 1996; 174: 529-536.
25. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum betalactamases. Res Microbiol. 2004 Jul-Aug; 155(6): 409-21.
26. Shiju MP, Yashavanth R, Narendra N. Detection of Extended Spectrum β-lactamase production and multidrug resistance in clinical isolates of *E.coli* and *K.pneumoniae* in mangalore. J Clin Diagn Res. 2010 June;4(3):2442-45.
27. Tasli H, Bahar IH. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended spectrum beta-lactamases in hospital-based *Enterobacteriaceae* in Turkey. Jpn J Infect Dis. 2005 Jun; 58(3): 162-7.

28. Tenover FC, Raney PM, Williams PP, Rasheed JK, Biddle JW, Oliver A, et al. Evaluation of the NCCLS extended-spectrum beta-lactamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during Project ICARE. J Clin Microbiol 2003;41(7):3142-6.
29. Thomas KS, Moland ES, Coudron PE. Occurrence and detection of extended spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a Veterans Medical Center: seek and you may find. J Clin Microbio.l 1997; 35: 2593-7.
30. Tsering DC, Das S, Adhiakari L, Pal R, Singh TS. Extended spectrum beta-lactamase detection in gramnegative bacilli of nosocomial origin. J Glob Infect Dis. 2009 Jul;1(2):87-92.
31. Villegas MV, Correa A, Perez F, Miranda MC, Zuluaga T, Quinn JP, et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004 Jul; 49(3): 217-22.
32. Wu TL, Chia JH, Su LH, Kuo AJ, Chu C, Chiu CH. Dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in pediatric intensive care units. J Clin Microbiol. 2003 Oct; 41(10): 4836-8.
33. Zhou L. Pathogens and associated factors of infections in PICU. Shanghai second medical university afflicted shanghai children medical center: 2001.