فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف و تشخیص مولکولی ژن بتالاکتامازی bla_{TEM} در جدایه های ادراری *کلبسیلا پنومونیه* در شهر قم

نرگسیان منصوره ۱، زرگر محسن۲*، محمود صفاری۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد قم ، دانشکده علوم پایه ، گروه میکروبیولوژی

۲. استادیار ، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد قم ، دانشکده علوم پایه ، گروه میکروبیولوژی

۳. دانشیار ، دانشگاه علوم پزشکی کاشان ، دانشکده علوم پزشکی ، گروه میکروب شناسی

آدرس مکاتبات : دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد قم ، گروه میکروبیولوژی ، ۰۹۱۲۱۵۳۹۲۸۸ ،

zmohsen2002@yahoo.com

چکیده

سابقه و هدف:

کلبسیلا پنومونیه یک پاتوژن فرصت طلب و یکی از عوامل شایع عفونت های بیمارستانی به شمار می آید که باعث ایجاد بیماری های مختلفی از قبیل عفونت ادراری، سپتی سمی، عفونت دستگاه تنفسی، اسهال و سایر بیماری ها می شود. امروزه شیوع پاتوژن های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) موجب نگرانی شده است، به طوری که عفونت با این باکتری ها با میزان مرگ ومیر، افزایش شیوع بیماری ها و افزایش هزینه های درمانی مرتبط است. هدف از این تحقیق تعیین فراوانی ژن bla_{TEM} در باکتری های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری بیمارستان شهید بهشتی قم می باشد.

مواد و روش ها:

پس از تشخیص و تعین هویت باکتری ها با استفاده از روش های کشت و بیوشیمیایی، ۱۴۰ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* شناسایی شد. حساسیت این جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف با روش دیسک در آگار براساس استاندارد(CLSI, 2013) مورد بررسی گرفت. سپس با روش تست تاییدی فنوتیپی سویه های ESBL شناسایی شده و در نهایت با استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلی مراز برای وجود ژن bla_{TEM} مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها :

در این تحقیق از ۳۰۰ نمونه بیمار مورد بررسی قرار گرفته ،۱۴۰ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* جدا شد. که پس ازانجام تست تائیدی ۵۲ (۳۷/۱۴ ٪)جدایه به عنوان ESBL مثبت شناسایی شدند. در بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی بیشترین مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک سفتازیدیم (۵۰/۷۲ ٪) ، و کمترین مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک های ایمی پنم ، ۱۶/۴۳ ٪ گزارش شد. نتایج PCR نشان داد از ۵۲ جدایه ESBL مثبت، تعداد ۳۲ (۶۱/۵۳ ٪) جدایه حاوی ژن bla_{TEM} بودند.

نتیجه گیری:

نتایج این پژوهش شیوع قابل توجه ژن TEM را در جدایه های کلبسیلا پنومونیه در بیمارستان مورد بررسی را نشان داد. از این رو ضرورت توجه بیشتر به منظور پایش گسترده مقاومت آنتی بیوتیکی و پیشگیری از انتشار ژن های مقاومت دارویی در این باکتری ها احساس می گردد.

واژگان کلیدی:

کلبسیلا پنومونیه ، مقاومت آنتی بیوتیکی ، بتالاکتاماز وسیع الطیف ، ژن TEM

مقدمه:

کلبسیلا یک پاتوژن فرصت طلب و یکی از عوامل شایع عفونت های بیمارستانی به شمار می آید که باعث ایجاد بیماری های مختلفی از قبیل عفونت ادراری، سپتی سمی ، عفونت دستگاه تنفس ، اسهال و سایر بیماری ها می شود. هم چنین در دو دهه گذشته جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* مهاجم اکتسابی از جامعه که بیماری های عفونی نوظهوری را در کشورهای آسیایی ایجاد کرده اند گزارش شده است(۱،۲،۳).

عفونت ادراری از مشکلاتی است که سالانه میلیونها انسان با آن روبرو میشوند. تخمین زده میشود در هرسال بیش از ۸/۳ میلیون نفر بیمار به دلیل عفونت ادراری به پزشک مراجعه مینمایند. در اکثر موارد عفونت های ادراری به شکل اورتریت تظاهر می کنند لیکن اغلب در اثر گسترش عفونت به مثانه ، حالب ها و کلیه ها، سیستیت و پیلونفریت عارض میگردد. بررسی های اپیدمیولوژیک نشان داده است که عفونت ادراری به سنین خاصی محدود نشده بلکه در تمام گروههای سنی از جمله در نوزادان، کودکان و بزرگسالان مشاهده می گردد(۵،۴). این عفونت به واسطه انواع خاصی از گونه های باکتریایی که بخشی از فلور طبیعی دستگاه گوارش هستند ایجاد میشود. از بین آنها *E. coli* شاخص ترین عامل عفونت ادراری می باشد که۹۰-۷۰ درصد موارد ابتلا را شامل می شود. در ۱۵-۵ درصد موارد کلبسیلا، موجب ایجاد این بیماری می شود(۶).

آن چه در مورد این باکتری بیشتر جلب توجه میکند، مقاومت بالای آن ها به آنتی بیوتیک های مختلف و گسترش سریع این مقاومت ها در بین این جمعیت باکتری ها می باشد. متاسفانه مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها در دهه های اخیر باعث افزایش ظهور این سویه های مقاوم شده است(۷). استراتژیهای مختلفی توسط باکتری به کار گرفته می شود تا از اثرات زیانبار آنتی بیوتیکها مصون بماند، یکی از این مکانیسمها که در باکتریهای گرم منفی علیه آنتی بیوتیکها به کار گرفته می شود تولید آنزیمهای بتالاکتامازی[1] می باشد(۸). امروزه شیوع پاتوژن های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف[2](ESBLs) باعث نگرانی ها شده است، به طوری که عفونت با این باکتری ها با میزان مرگ ومیر، افزایش شیوع بیماری ها و افزایش هزینه های درمانی مرتبط است (۹). این آنزیم ها از طریق هیدرولیز هسته مرکزی در آنتی بیوتیک های بتالاکتام باعث غیر فعال شدن آن ها می شوند(۱۰). بتالاکتامازهای وسیع الطیف ESBL ها در گروه ۲ از سیستم طبقه بندی *Bush-Jocoby* و کلاس A از سیستم طبقه بندی *Ambler* قرار دارند. از انواع ESBL ها که در کلاس A قرار دارند و به طور طبیعی توانایی هیدرولیز سفالوسپورین های نسل سوم را دارند می توان *TEM, SHV, CTX-M ,BES, PER ,TLA, GES, VEB, SFO* را نام برد(۱۱).

آنزیم بتالاکتاماز *TEM* یکی از مهم ترین بتالاکتاماز های پلاسمیدی در باکتری های خانواده انتروباکتریاسه می باشد و از علل مهم بروز مقاومت های چند دارویی در عفونت های بیمارستانی به شمار می آید(۱۲) .

با توجه به شیوع قابل توجه باکتری های مولد ESBL در جوامع مختلف، فقدان اطلاعات لازم در منطقه و از طرفی اهمیت ارگانیسم های تولید کننده ESBL ها انجام مطالعات بیشتر بر روی آنها ضروری به نظر می رسد. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی اشرشیا کلی مولد بتالاکتاماز های وسیع الطیف مولد عفونت ادراری بر اساس اثبات وجود ژن TEM و همچنین بررسی پروفایل مقاومت دارویی آنها می باشد.

مواد و روش ها:

از نمونه ادراری مشکوک به UTI یک کشت در محیط ائوزین متیلن بلو ، مکانکی آگار و بلاد آگار تهیه شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کلنی های موکوئیدی رشد یافته روی محیط های ذکر شده، جدا شدند. پس از انجام تستهای بیوشیمیایی افتراقی نظیر رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، چگونگی تخمیر قندها در محیط TSI، تولید اندول، سیترات، اوره آز، MRVP، عدم حرکت در SIM و در نهایت بررسی نتایج با استفاده از جداول جهت شناسایی *کلبسیلا پنومونیه* استفاده شد. اعضای جنس کلبسیلا باکتری های غیر متحرکی هستند که لاکتوز را تخمیر نموده واوره را به

[1] Beta-Lactamaseenzymes

[2] Extended Spectrum Beta-Lactamases

آهستگی هیدرولیز می کنند. *کلبسیلا پنومونیه* به دلیل وجود کپسول، کلنی های بزرگ و موکوئیدی دارند و مرطوب به نظر می رسند. سپس سویه های جدا شده در محیط تریپتیکاز سوی براث حاوی گلیسرول ۲۰ ٪ در ۷۰- یا ۲۰- درجه سانتیگراد جهت انجام سایر آزمایش های بعدی نگهداری شدند.

به منظور بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه ها، روش انتشار دیسک در آگار (Kirby & Baur) بکار گرفته شد. محیط مولر هینتون آگار (MHA) بعنوان محیط انتخابی برای آزمایش به کار برده شد، میزان حساسیت جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* به آنتی بیوتیکهای ایمی پنم، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، مروپنم، سفپیم، پیپراسیلین/تازوباکتام ، سیپروفلوکساسین بر اساس راهنمای (CLSI) [3]تعیین شدند (CLSI، ۲۰۱۳).

طبق استانداردهای CLSI یک سوآپ از سوسپانسیون میکروبی با کدورت نیم مک فارلند از هر نمونه بر روی محیط MHA کشت چمنی داده و سپس دیسکهای آنتی بیوتیکی را با پنس استریل روی محیط کشت قرار می دهیم. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و نتایج بر اساس اندازه هاله ممانعت از رشد بر اساس جدول شرکت سازنده به صورت حساس(S)، نیمه حساس (I)، مقاوم (R) ثبت گردید. از جدایه استاندارد *E. coli* ATCC 25922 و *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 700603 به منظور کنترل کیفی استفاده شد.

تست تائیدی تولید بتالاکتامازهای با طیف گسترده به روش دیسک ترکیبی (Combined disk method) انجام شد. طبق دستورالعمل CLSI جدایه هایی که در مرحله اول نسبت به آنتی بیوتیک های سفتازیدیم دارای قطر هاله ≤۲۲ میلیمتر و یا آنتی بیوتیک سفوتاکسیم دارای ≤۲۷ میلیمتر بودند مورد بررسی قرار می گیرند. در این آزمون از دیسک های سفتازیدیم(CAZ: 30µg)، سفتازیدیم-کلاولانیک اسید (CAZ: 30µg/ CV:10µg)، سفوتاکسیم (CTX : 30µg)، سفوتاکسیم- کلاولانیک اسید (CTX : 30µg/CV:10) استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا سوسپانسیونی از باکتری معادل نیم مک فارلند تهیه کرده سپس بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. بعد از گذشت حدود ۱۰ دقیقه از تلقیح باکتری های جدا شده، دیسک ها بر روی محیط کشت قرار داده شد. پس از ۲۴-۱۸ ساعت گرما گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، قطر هاله عدم رشد هر یک از دیسک ها را اندازه گرفته شد. در صورت افزایش قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک های حاوی مهارکننده بتالاکتاماز (کلاولانیک اسید) به میزان ≤5mm نسبت به دیسک سفوتاکسیم یا سفتازیدیم به تنهایی، نمونه باکتری به عنوان ESBL مثبت در نظر گرفته شد(CLSI، ۲۰۱۳).

مطالعات مولکولی:

3 Clinical and Laboratory Standards Institute

استخراج DNA با استفاده از روش جوشاندن صورت گرفت (۱۴). جدایه هایی که از نظر تست تائیدی ESBLمثبت شدند از نظر حضور ژن TEM با استفاده از پرایمر اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱).

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش PCR شامل ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ میلی مول در لیتر $Mgcl_2$، ۰/۵ واحد آنزیم Taq و ۵۰ نانوگرم DNA الگو بود. تکثیر ژن bla_{TEM} با استفاده از دستگاه ترمال سیکلر (اپندورف آلمان) طبق جدول ۲ انجام شد.

محصولات PCR از نظر حضور ژن مورد نظر بر روی ژل آگارز ۱ ٪ الکتروفورز شد. برای تعیین وزن مولکولی محصول، از مارکر وزن مولکولی با قطعات ۱۰۰bp استفاده شد.

جدول(۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR برای جداسازی ژن TEM

Primer Name	Sequences 5'→3'	Size of Product (bp)
TEM F	CGTTTTCCAATGATGAGCAC	۴۴۲
TEM R	CCATCCAGTCTATTAATTGTTGC	

در این آزمون از سویه استاندارد *E. coli* (ATCC 25922) به عنوان کنترل منفی و از سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* (ATCC 700603) به عنوان کنترل مثبت حاوی ژن TEM استفاده شد.

جدول(۲) شرایط دمایی انجام واکنش PCR جهت TEM

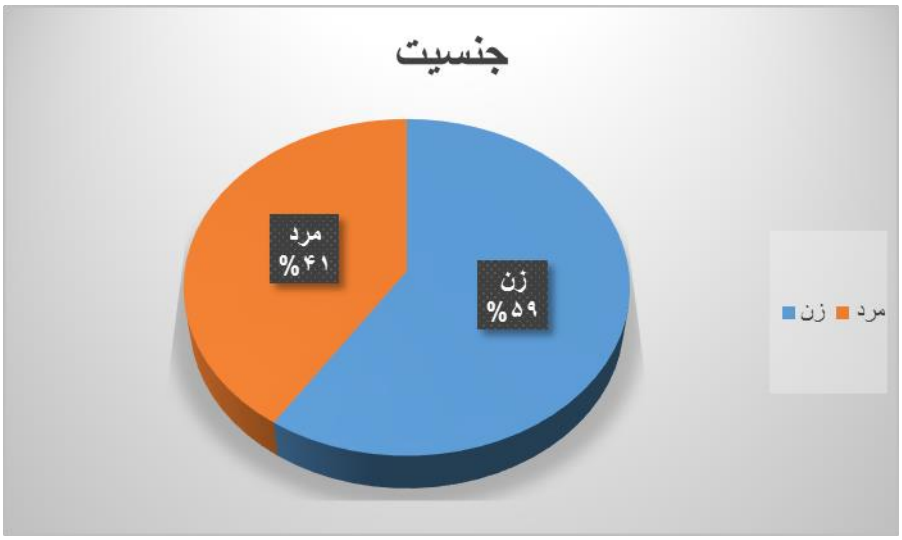
Step	مرحله	دما(درجه سانتیگراد)	زمان
Step1	Initial denaturation	۹۵	۲دقیقه
Step2	Denaturation	۹۵	۳۰ ثانیه
Step3	Annealing	۵۵	۳۰ ثانیه
Step4	Extention	۷۲	۵۰ ثانیه
Step5	Rapeat step	۲-۴	۳۳

Step6	Final extention	۷۲	۵ دقیقه
Step7	Hold	۴	-

یافته ها

در این مطالعه که به صورت مقطعی-توصیفی بود، نمونه های ادراری بیماران (سرپایی و بستری) مراجعه کننده به بیمارستان شهید بهشتی شهر قم مورد بررسی قرار گرفت، بعد از انجام تست های تشخیص میکروبی و تست های تکمیلی بیوشیمیایی جهت شناسایی باکتری مورد نظر، از حدود ۳۰۰ نمونه ادرار جمع آوری شده ۱۴۰ سویه *کلبسیلا پنومونیه* جدا شد.

از نظر جنسیت ۵۹ ٪ بیماران را خانم ها و ۴۱ ٪ را آقایان تشکیل می دادند. در بررسی میزان مقاومت جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه با استفاده از روش انتشار در آگار نشان داد که کمترین و بیشترین میزان مقاومت به ترتیب مربوط به ایمی پنم ۱۶/۴۳ ٪ و سفتازیدیم ۵۰/۷۲ ٪ بود.



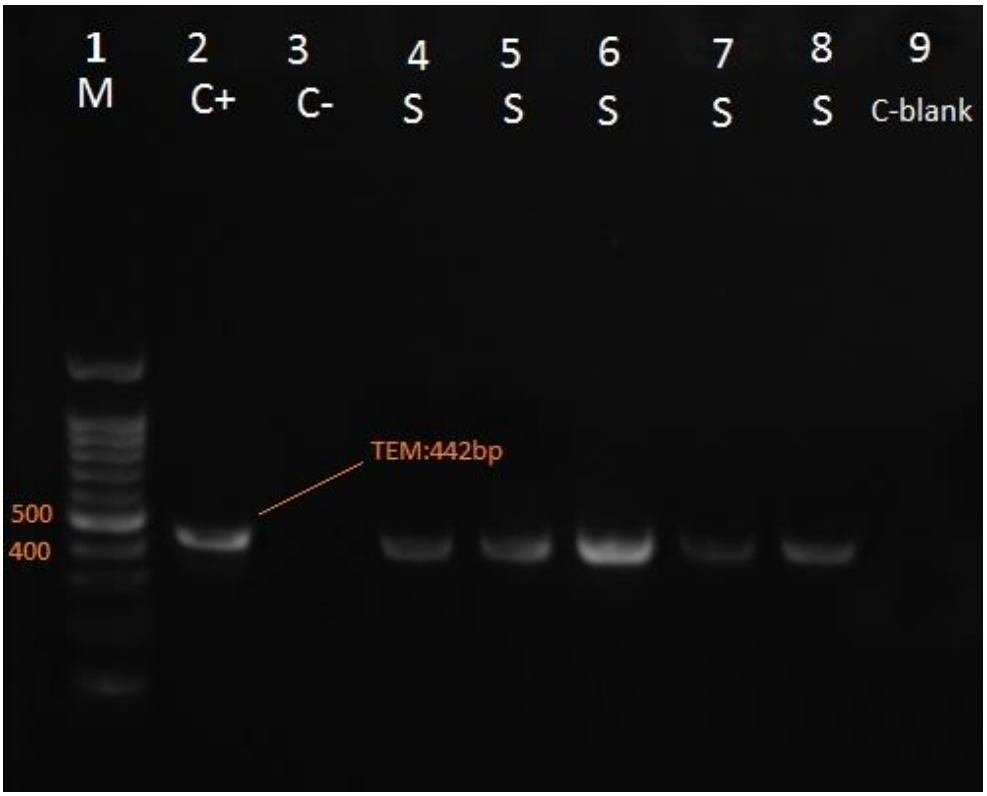
نمودار (۱) جنسیت بیماران مورد مطالعه در بیمارستان شهید بهشتی قم

میزان مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها نیز به شرح زیر بود. سفوتاکسیم ۴۵/۷۱ ٪ ، مروپنم ۲۳/۵۸ ٪ ، سفپیم ۳۴/۲۹ ٪ ، پیپراسیلین/تازوباکتام ۳۰ ٪ و سیپروفلوکساسین ۴۰ ٪ گزارش شد(جدول۳).

براساس نتایج حاصل از آزمون فنوتیپی تائیدی ۵۲(۳۷/۱۴ ٪) از سوش های باکتریایی *کلبسیلا پنومونیه* تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند. جهت تعیین حضور ژن TEM از واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) استفاده شد. از نمونه های ESBL مثبت ، ۳۲ (۶۱/۵۳ ٪) نمونه حامل ژن TEM بودند.

جدول (۳) میزان و درصد فراوانی حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *کلبسیلا پنومونیه*

آنتی بیوتیک	مقاوم		نیمه حساس		حساس	
	درصد	**تعداد**	**درصد**	**تعداد**	**درصد**	**تعداد**
ایمی پنم	٪ ۱۶/۴۳	۲۳	٪ ۱۷/۱۴	۲۴	٪ ۶۶/۴۳	۹۳
سفوتاکسیم	٪ ۴۵/۷۱	۶۴	٪ ۱۷/۱۴	۲۴	٪ ۳۷/۱۵	۵۲
مروپنم	٪ ۲۳/۵۸	۳۳	٪۷/۸۵	۱۱	٪۶۸/۵۷	۹۶
سفپیم	٪ ۳۴/۲۹	۴۸	٪ ۶/۴۲	۹	٪ ۵۹/۲۹	۸۳
پیپراسیلین/تازوباکتام	٪ ۳۰	۴۲	٪۲۰/۷۱	۲۹	٪ ۴۹/۲۹	۶۹
سیپروفلوکساسین	٪۴۰	۵۶	٪ ۱۰	۱۴	٪ ۵۰	۷۰
سفتازیدیم	٪ ۵۰/۷۲	۷۱	٪ ۷/۸۵	۱۱	٪ ۴۱/۴۳	۵۸



شکل(۱) نتایج PCR ژن TEM ،ستون ۱ مارکر(۱۰۰bp) ، ستون ۲ کنترل مثبت *کلبسیلا پنومونیه ATCC700603* ستون ۴،۵،۶،۷،۸نمونه های دارای ژن TEM ، ستون۳ کنترل منفی *E.coliATCC 25922* ستون شماره ۹ واکنش بدون DNA الگو

بحث

گسترش تولید آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف یکی از خطرهای جدی در درمان عفونت های دارای مقاومت چندگانه می باشد که از زمان کشف آن ها در سال ۱۹۸۰ به سرعت در سطح جهان گسترش یافته اند و به عنوان یکی از معضلات بهداشتی عمومی خود را نمایان ساخته است (۱۵).

شیوع تیپ های مختلف ESBLs در جدایه های بالینی کشورهای مختلف و حتی بیمارستان های موجود در یک منطقه می تواند متفاوت باشد (۱۶). در سال های اخیر به ویژه به دنبال استفاده گسترده از سفالوسپورین های وسیع الطیف با شیوع عفونت های ایجاد شده به وسیله جدایه های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده بتالاکتامازها با طیف گسترده به طور چشمگیری از سراسر جهان گزارش شده است(۱۷).

نتایج منتشر شده از تحقیقات علمی مختلف مربوط به تولید ESBLs در ایران نیز بسیار متنوع است و میزان تولید ESBLs در جدایه های کلبسیلا پنومونیه بین ۸/۹ ٪ تا ۷۵/۷۵ ٪ گزارش شده است(۱۸).

در این مطالعه از مجموع ۱۴۰ جدایه *کلبسیلا پنومونیه*، ۵۲(۳۷/۱۴ ٪) جدایه تولید کننده ESBLs بودند که در مقایسه با مطالعه ناصحی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ با بررسی جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* جداسازی شده از بیماران بستری، میزان شیوع را ۳۸/۵ ٪ گزارش کردند هم خوانی دارد(۱۹). در مطالعه ی شیبل و همکاران در سال ۲۰۱۲ در عربستان ۶۵٪ از نمونه ها تولید کننده ESBLs بودند (۲۰).

در دیگر نقاط جهان نیز مطالعات انجام شده ازنظر تولید ESBLs نتایج متفاوتی را نشان دادند از جمله در کره جنوبی ۲۶/۵ ٪ (۲۱)، در اندونزی ۲۳/۷۱ ٪ (۲۲)، در چین ۳۳/۴ ٪ (۱۴) جدایه ها از نظر تولید ESBLs مثبت بودند. علت تفاوت در میزان شیوع ESBLs در نواحی مختلف و حتی بیمارستان های موجود در یک منطقه جغرافیایی را می توان ناشی از تفاوت در سیستم کنترل عفونت و رژیم درمانی دارو در مناطق مختلف دانست.

در مطالعه حاضر فراوانی ژن bla_{TEM} با استفاده از آزمون PCR در جدایه های تولید کننده ESBLs ، ۳۲(۶۱/۵۳ ٪) گزارش شد و همچنین در مطالعه فیض آبادی و همکارانش در سال ۲۰۰۹ فراوانی ژن bla_{TEM} ۶۷/۴ ٪ گزارش گردید که با این مطالعه هم خوانی دارد (۲۳). فراوانی ژن bla_{TEM} در مطالعه ناصحی و همکارانش به میزان ۱۸٪ گزارش شده است که نسبت به مطالعه حاضر دارای شیوع کمتری است (۲۴).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه حاکی از میزان قابل توجه جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* تولید کننده ESBLs در بیمارستان مورد مطالعه است. براساس نتایج این مطالعه و بررسی های مشابه در سراسر جهان شیوع ارگانیسم های مولد ESBLs در بیمارستان ها و مراکز درمانی رو به افزایش است. با تغییر در استراتژی مصرف آنتی بیوتیک ها و استفاده ار روش های مناسب جهت کنترل عفونت در بخش های مختلف ، از عوامل مهمی هستند که می تواند در کنترل انتشار ارگانیسم های تولید کننده ESBLs نقش مهمی را ایفا کند.

قدردانی و تشکر:

مولفین بر خود لازم می دانند تا از امکانات قرار گرفته توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم و همکاری ایشان در جهت پیشبرد این تحقیق قدردانی و تشکر نمایند.

References

1. Livermore DM.Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. Korean J Intern Med.2012; 27(2):128-142.
2. Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, et al.. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 Play Roles in both antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob Agents Chemother.2011؛ 55(4):1485-1493.
3. Lu PL, Liu YC, Toh HS, et al Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: 2009- 2010 results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Int J Antimicrob Agents*.2012؛ 40:37-43.
4. Stock I, WiedemannB.Natural antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* and *K. terrigena* strains. *Journal of medical microbiology*. 2001؛50(5): p. 396-406.
5. Olesen B, Kolmos HJ, Orskov F, Orskov I. A comparative study of nosocominal and community-acquired strains of *Escherichia coli* causing bacteraemia in a Danish university Hospital. *J HospInfec*. 1995؛31:295-304.
6. Harrison's Principles of Internal Medicine .Braunwald , Eugene .MC Graw Hill . 2015.
7. Gootz TD. The global problem of antibiotic resistance. Crit Rev Immunol.2010؛ 30(1):79- 93.
8. Daoud Z., Hobeika E., Choucair A., Rohban R. Isolation of the first metallo-B-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in Lebanon. *Revista Espanola de Quimioterapia*.2008؛ 21(2): p. 123-126.
9. Al-Zarouni M, Senok A, Rashid F, Al-Jesmi SM, Panigrahi D. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum beta lactamase producing Enterobacteriaceae in the United Arab Emirates. Med PrincPract.2008؛ 17(1): 32-36.

10. Du B, Long Y, Liu H, Chen D, Liu D, Xu Y, et al..Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. Intensive Care Med.2002؛ 28(12): 1718–1723.

11. 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.

12. Jacoby GA, Munoz-Price LS.. The new beta lactamases. N Engl J Med.2005؛ 352(4): 380-391.

13. Clinical and Laboratory Standards Institute (2013) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. M100-S232013. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

14. 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

15. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum blactamases producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 : 144-53.

16. 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.

17. Hee Kim M, Lee HJ, Park KS, Suh JT. Molecular Characteristics of Extended Spectrum β-Lactamases in Escherichia coli and Klebsiellapneumoniae 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.

18. RiyahiZaniani, F. Meshkat, Z. Naderinasab, M. Khajeh-Karamadini, M. Ghazvini, K. Rezaee, A. Esmaily, H. Nabavinia, MS. DarbanHoseini, M.). The prevalence of TEM and SHV genes among extended-spectrum ß- lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae. Iranian Journal Basic Medical Sciences* ؛2011 15(1): 654-660.

19. 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.

20. Shibl A, Al-Agamy M, Memish Z, Senok A, Khader SA, Assiri A.. The emergence of OXA-48- and NDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. Int J Infect Dis 2013;17:1130–33.

21. 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.

22. 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.

23. Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni ,Aligholi M, Shahcheraghi F, et al. 2010. Distribution of bla(TEM), bla(SHV), bla(CTX-M) genes among clinical isolates of *K. pneumoniae* a Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. Microb Drug Resist.; 16(1): 49-53.

24. Nasehi L, Shahcheraghi , Sadat Nikbin V, Nematzadeh SH. 2010 . PER, CTX-M, TEM and SHV Betalactamases in clinicalisolates of Klebsiella pneumonia isolated from Tehran, Iran. Iran J Basic Med Sci. 13(3): 111-118.