مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۴، شماره ۳، پاییز ۹۳، صفحات ۱۴۸ تا ۱۵۲

**Original Article**

# تشخیص مولکولی ژن بتالاکتاماز ***bla*CTX-M** در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از نمونه‌های بالینی

**نجمه لشگری[۱]،جلیل وند یوسفی[۲]، سید داور سیادت[۳]، فرشته شاهچراغی[۳]، مریم خسروی[۴]، حبیب وکیلی[۵]، ارفع مشیری[۵]، مهرانگیز زنگنه[۶]، احمد رضا بهره مند[۳]**

[۱] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج
[۲] استاد میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج
[۳] دانشیار میکروب شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران
[۴] گروه میکروب شناسی، بیمارستان بعثت تهران
[۵] گروه میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران
[۶] دانشیار گروه بیماری‌های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران

## چکیده

**سابقه و هدف**: *امروزه باکتری‌های تولید کننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBL) در سراسر جهان رو به افزایش هستند. تولید این آنزیم‌ها مهم‌ترین عامل مقاومت به سفالوسپورین‌های وسیع الطیف در کلبسیلا پنومونیه می‌باشد. در طی دهه گذشته آنزیم‌های نوع CTX-M شایع‌ترین نوع بتالاکتامازهای وسیع الطیف را در اروپا، کانادا و آسیا به خود اختصاص داده‌اند. هدف از این مطالعه بررسی میزان فراوانی باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف و شناسایی ژن CTX-M به روش مولکولی بود.*

**روش بررسی**: *در این مطالعه توصیفی، ۱۰۰ نمونه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های بعثت و امام رضا شهر تهران با تستهای بیوشیمیایی استاندارد تشخیص داده شد و میزان حساسیت آنها نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در درمان باکتری‌های گرم منفی با روش دیسک آگار دیفیوژن مشخص گردید. همچنین سویه‌های تولید کننده ESBL، با استفاده از روش دیسک ترکیبی شناسایی گردیدند. سپس سویه‌های تولید کننده آنزیم‌های گروه CTX-M-I به کمک روش PCR مشخص شدند.*

**یافته‌ها**: *۲۶ باکتری کلبسیلا پنومونیه از ۱۰۰ نمونه کلبسیلا مورد بررسی، تولید کننده ESBL بودند و در بررسی مولکولی، ۴۲ نمونه باکتری کلبسیلا پنومونیه حاوی ژن CTX-M بودند.*

**نتیجه‌گیری**: *با توجه به تفاوت مشاهده شده بین نتایج بررسی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی، شناسایی مولکولی ژن‌های مقاومت دارویی ضروری به نظر می‌رسد. در ضمن مطالعات بیشتری جهت مشخص شدن اپیدمیولوژی سویه‌های مولد ESBL در ایران لازم است.*

**واژگان کلیدی**: *کلبسیلا پنومونیه، بتالاکتاماز وسیع الطیف، CTX-M.*

## مقدمه

*کلبسیلا پنومونیه* باکتری گرم منفی و عامل پنومونی، سپسیس، عفونت‌های دستگاه ادراری ویکی از مهم‌ترین عوامل شناسایی شده در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی است (۱). با توجه به اهمیت مقاومت آنتی بیوتیکی در عفونت‌های بیمارستانی به عنوان یک مشکل جدی برای بخش سلامت کشور مطرح بوده است و بیماران را در بیمارستان های سراسر جهان تحت تاثیر قرار می‌دهد و سالانه قربانی‌های زیادی را به خود اختصاص داده است و هزینه‌های درمانی فراوانی بر کشور تحمیل می‌کند. از این رو سازمان بهداشت جهانی سال ۲۰۱۱ را به عنوان سال مقاومت آنتی‌بیوتیکی نامید (۲،۳).

**آدرس نویسنده مسئول**: تهران، انستیتو پاستور ایران، گروه میکروب شناسی، دکتر سید داور سیادت
(**email**: d.siadat@gmail.com)

**تاریخ دریافت مقاله**: ۹۲/۱۲/۱۹
**تاریخ پذیرش مقاله**: ۹۳/٤/۱۸

مقاومت‌های بتالاکتامازی وسیع الطیف (ESBL)Extended Spectrum β-Lactamase اغلب توسط ژن‌های پلاسمیدی کد گردیده و به راحتی در میان انواع باکتری‌های خانواده آنتروباکتریاسه انتقال می‌یابند (۴،۵). شایع‌ترین ESBL گزارش شده از کشورهای غربی و آسیایی، بتالاکتامازهای وسیع الطیف مشتق شده از CTX، TEM و SHV می‌باشد که بر روی پلاسمیدهای بزرگ قرار دارند و سویه‌های مقاوم به درمان را ایجاد می‌کنند (۶،۷).

در ابتدای کاربرد سفالوسپورین‌های وسیع الطیف در درمان عفونت‌های باکتریایی، تمام سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* و سایر گونه‌های *کلبسیلا* نسبت به آن حساس بودند، اما به زودی سویه‌های مقاوم به این آنتی بیوتیک‌ها نیز به وجود آمد و اولین سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به نسل سوم سفالوسپورین‌ها در سال ۱۹۸۳ در آلمان توسط نات و همکارانش گزارش شدند (۸).

بتالاکتامازهای CTX-M-I به طور فزاینده‌ای در *کلبسیلا پنومونیه* و *اشریشیاکلی* شایع شدند. این آنزیم‌ها به پنج گروه اصلی (CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9, CTX-M25) تقسیم می‌شوند. برخی از این آنزیم‌ها از ژن‌های کروموزومی Kluyveraspp (باکتری محیطی) می‌باشند که ژن‌های مربوطه در درون پلاسمیدهای کانژوگیتیو وارد شده و سپس به باکتری‌های پاتوژن منتقل شده‌اند (۹،۱۰) و تاکنون بیش از ۵۰ نوع CTX-M شناسایی شده‌اند (۱۱).

این بتالاکتامازها ارتباط ژنتیکی کمی با اعضاء بتالاکتامازهای TEM و SHV دارند ودر عوض همانندی بالایی میان آنزیم کروموزومی Ampc (خصوصا Klu-2,KLU-1) با آنزیم‌های CTX-M وجود دارد (۱۴،۱۵).

در ایران، مطالعات پراکنده‌ای در مورد ESBL صورت گرفته است که بیشتر این مطالعات به صورت فنوتیپی بوده و اطلاعات دقیقی در مورد فراوانی و تنوع این آنزیم‌ها وجود ندارد. لذا در مطالعه حاضر میزان شیوع بتالاکتامازها و نیز CTX-M در باکتری *کلبسیلا* بررسی شد.

## مواد و روشها

در این مطالعه توصیفی، ۱۰۰ نمونه بالینی شامل ادرار، مدفوع، خون و ترشحات دستگاه تنفسی که در طی شش ماه اول سال ۱۳۹۱ از بیمارستان‌های شهر تهران شامل امام رضا، بعثت جمع آوری شد و پس از کشت بر روی محیطEMB آگار و انجام تستهای بیوشیمیایی افتراقی نظیر TSI، سیمون سیترات، اوره آز، MR/VP، SIM و با استفاده از جداول استاندارد، باکتری کلبسیلا پنومونیه شناسایی شد و مقاومت آنتی بیوتیک با انجام تست آنتی بیوگرام از طریق روش انتشار دیسک (Disk diffusion method) و با استفاده از دیسک‌های آنتی بیوتیک تهیه شده از شرکت پادتن طب شامل سفتازیدیم (۳۰µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، سفتیزوکسیم(۲۵µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، کوتریموکسازول (۲۵µg)، ایمی پنم (۱۰µg)، مروپنم (۱۰µg)، آمیکاسین (۳۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg) و سفکسیم (۳۰µg) تعیین گردید. باکتری‌های مقاوم به نماینده سفالوسپورین‌ها جهت بررسی بتالاکتامازهای وسیع الطیف با روش Combined disk، با استفاده از دیسک‌های سفتازیدیم(۳۰µg)، سفتازیدیم+کلاوونیک اسید (۳۰µg-۱۰) و سفوتاکسیم (۳۰µg)، سفوتاکسیم +کلاوونیک اسید (۳۰µg-۱۰) تهیه شده از شرکت Mast مورد مطالعه قرارگرفت. در این روش سوسپانسیون میکروبی بر روی سطح محیط مولر هینتون آگار پخش و دیسک حاوی سفالوسپورین و دیسک حاوی سفالوسپورین و کلاولانیک اسید بر سطح آگار قرار می‌دهند. تولید ESBL از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵mm یا بیشتر در اطراف دیسک سفتازیدیم-کلاوولانیک اسید و یا سفوتاکسیم-کلاوولانیک مشخص گردید (۱۶،۱۷).

برای انجام واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) ژنوم باکتری به روشBoiling استخراج شد به همین منظوریک کلنی باکتری از کشت تازه تهیه شده در ۱/۵ml بافر PBS حل نموده و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰ سانتریفوژ نموده و شست و شو دادیم. سپس محلول رویی را تخلیه و ۵۰ml آب مقطر افزوده هموژنیزه کردیم و سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش و بلافاصله ۱۰ دقیقه در دمای ۴- درجه سانتی گراد قرار داده، در نهایت به مدت ۴ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ نموده و مایع رویی که حاوی ژنوم باکتری بود را جدا کردیم (۱۷).

به منظور تکثیر ژن بتالاکتامازی CTX-M در طی فرآیند PCR با استفاده ازیک جفت پرایمر یونیورسال، به جهت اطمینان از عملکرد اختصاصی این پرایمرها از برنامه BLAST در NCBI استفاده شد. پرایمر جهت ساخت به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شد (جدول ۱).

**جدول ۱.** ویژگی‌های پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR

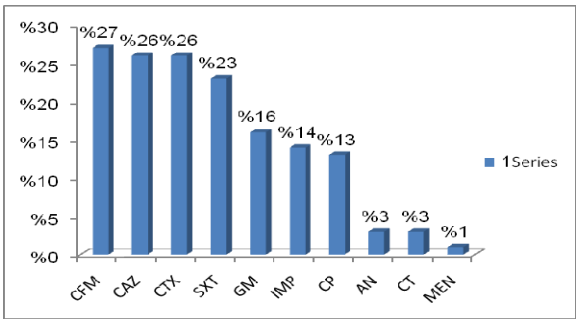
| نام پرایمر | سکانس (5´to 3´) | Amplicon size (bp) |
|---|---|---|
| CTX-M-I-F | ATGTGCAGCACCATGAAAGTGATGGC-3´ | 593 |
| CTX-M-I-R | TGGGTGAAGTAAGTGACCAGAATCAGCGG-3´ | |

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵µl شامل: $MgCl_2$ 1.5µl ، 2.5µlبافر10x ، dNTP1µl، 1µlاز هرکدام از پرایمرها،

آب 16.8 µl و الگو DNA 1µl، 0.2µlTaqDNA polymerase مقطر استریل در نظر گرفته شد. فرآیند تکثیر در دستگاه ترموسایکلر شامل مراحل زیر بود: مرحله اولیه بازشدن ۲ رشته DNA به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۶ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله باز شدن ۲ رشته به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد مرحله اتصال پرایمرها به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد مرحله طویل شدن رشته هدف به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله طویل شدن نهایی به مدت ۷دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد (۲۲). در انتهای این بررسی برای حصول اطمینان از صحت باندهای به دست آمده سکانس نمونه ها انجام گرفت که این عمل توسط انستیتو پاستور انجام شد. بعد از سکانس نمونه‌های مورد نظر، نتایج حاصل با برنامه BLAST تحلیل شدند و براساس نتایج، تمامی باندهای گرفته شده منطبق با سکانس‌های مشابه جهانی بر آورد شد ودر نهایت توالی ژن‌ها در (www.ncbi.nlm.nih.gov) با شماره BankIt1582072 گزارش و ثبت گردید.

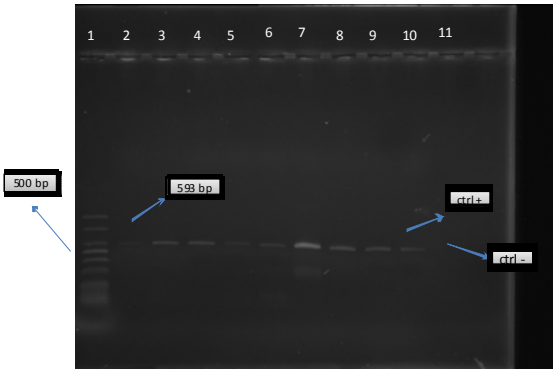
## یافته‌ها

از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی، ۵۵ نمونه ادرار، ۲۲ نمونه ترشحات تنفسی، ۱۴ نمونه مدفوع، ۶ نمونه خون و ۳ مورد سایر نمونه ها بودند که پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی و جداسازی، تست حساسیت آنتی بیوتیکی بر روی آنها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تست در مورد ۱۰ آنتی بیوتیک در نمودار ۱ بیان شده است.




**نمودار ۱.** مقاومت آنتی بیوتیکی سویه مورد بررسی در این مطالعه

نتایج حاصل از آزمایش Combined disk نشان داد که از میان ۱۰۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه*، ۲۶ نمونه مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف بودند که شامل ۱۳ نمونه ادرار، ۱۰ نمونه ترشحات نای، ۲ نمونه مدفوع و ۱ نمونه زخم بودند. از بررسی ۱۰۰ نمونه بالینی به روش PCR، ۴۲٪ ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه حاوی ژن CTX-M بودند (شکل ۱).




**شکل ۱.** ژل آگارز حاوی نمونه‌های PCR حاصل از تکثیر گروه CTX-M-I. چاهک شماره ۱ مارکر 100bp، چاهک ۹-۲ ایزوله های بالینی مثبت، چاهک ۱۰: کنترل مثبت، چاهک۱۱: کنترل منفی.

## بحث

گسترش تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف یکی از خطرهای جدی در درمان عفونت‌های دارای مقاومت چند گانه می‌باشد که از زمان کشف آنها در سال ۱۹۸۰ به سرعت در سطح جهان گسترش یافته‌اند وبه عنوان یکی از معضلات بهداشتی عمومی خود را نمایان ساخته است (۱۸).

عدم نظارت وکنترل مصرف آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی می‌تواند در آینده موجب شکل گیری مقاومت دارویی و در نتیجه شکست درمان عفونت‌ها شود.

براساس مطالعات انجام شده در ایران، شیوع آنزیم های گروه CTX-M عمدتا متعلق به گروه CTX-M-I است و بقیه گروه‌ها در ایران شیوع نداشته و یا در صد کمی را به خود اختصاص می‌دهند (۱۱). لذا در این مطالعه تصمیم به بررسی گروه CTX-M-I گرفته شد.

با توجه به فراوانی ۴۲٪ آنزیم‌های گروه CTX-M-I که در این مطالعه به دست آمد، می‌توان نتیجه گرفت که شتاب افزایش این نوع از آنزیم‌ها در ایران به نسبت سایر کشورهای جهان بیشتر بوده و نیاز به اقدامات عملی، جهت حفظ کارایی آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام احساس می‌شود.

در طی مطالعاتی که دربین سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۸ در ۸ بیمارستان کشور کره جنوبی توسط Kosoo و همکارانش صورت گرفت، یک روند افزایش از شیوع سویه‌های آنتروباکتریاسه مولد ESBL را نشان می‌دهند (۱۹).

در مطالعه صورت گرفته توسط میر صالحیان و همکاران، از ۱۵۰ ایزوله آنتروباکتریاسه ۵۹/۳ درصد به عنوان مولد ESBL تعیین شدند که به ترتیب کلبسیلا پنومونیه، اشریشیاکلی و انتروباکتر از بیشترین فراوانی برخوردار بودند (۲۰).

در مطالعه میرزایی و همکاران که با روش PCR انجام شد، ۳۷/۸ در صد از ایزوله‌های E.coli دارای ژن CTX-M بودند که گروه CTX-M-I با شیوع ۳۵/۷۸ درصد بالاترین شیوع را داشت (۱۱).

در یک بررسی انجام شده در کشور فرانسه مشخص گردید که ۴۰ درصد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به سفتازیدیم مقاوم هستند (۲۱).

در مطالعه شیبل و همکاران در سال ۲۰۱۲ در عربستان از ۶۰ نمونه بالینی ۳۹ مورد حامل ژن بتالاکتامازی و ۱۲ مورد حامل ژن کارباپنماز بودند. مقاومت چند دارویی در ایزوله‌هایی که حامل چند ژن مقاومت بتالاکتاماز بودند گزارش شد (۲۲).

در مطالعه JeantteTeo و همکاران در سال ۲۰۱۱ با بررسی ژن‌های مقاومت در بیمارستان سنگاپور، مقاومت علیه سفالوسپورین‌های نسل سوم و منوباکتام مشاهده شد که بیشترین مقاومت‌های چند دارویی مرتبط به کلبسیلا پنومونیه و اشرشیا کلی بود (۲۳).

در مطالعه Poirel سال ۲۰۱۰ در امان، نمونه‌های ایزوله شده از بیمارانی که مسافر هند بوده‌اند حامل چندین ژن مقاومت بود و نمونه‌های دیگر بیماران نیز حامل ژن مقاومت بود (۲۴).

مطالعه حاضر نشان می‌دهد باکتری‌های *کلبسیلا پنومونیه* مولد ESBL در حال افزایش هستند و ۲۵ در صد کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران دارای مقاومت چند گانه دارویی هستند. در این میان، بتالاکتامازهای نوع CTX-M فراوانی بسیار بالایی دارد.

متاسفانه، پیدایش سویه‌های *کلبسیلای* چند مقاومتی، با پایداری نسبتا بالای پلاسمیدهای کد کننده ESBL همراه است. حتی سال‌ها پس از قطع مصرف سفتازیدیم و سایر سفالوسپورین‌های وسیع الطیف، ادامه کلونیزاسیون سویه‌های *کلبسیلای* مولد ESBL در بیماران بستری گزارش شده است. به نظر می‌رسد اقامت طولانی مدت در بیمارستان و استفاده از تجهیزات پزشکی همچون سوند و لوله گذاری، عوامل موثر در کسب عفونت *کلبسیلا* در بیماران بستری هستند (۲۵،۲۶).

مصرف بیش از حد و طولانی مدت سفالوسپورین‌های وسیع الطیف یکی دیگر از علل پیدایش ESBL می‌باشد که براساس بسیاری از گزارشات، شیوع این ارگانیسم‌ها از طریق به کار گیری روش‌های کنترل عفونت و محدود کردن استفاده از سفالوسپورین کاهش می‌یابد (۲۷،۲۸).

با توجه به شیوع بالای کلبسیلاپنومونیه و ژن‌های مقاومت گزارش شده از این باکتری به اشتباه ممکن است در تست‌های فنوتیپی معمول آزمایشگاهی، حساس در نظر گرفته شوند و با تجویز آنتی‌بیوتیک‌های غیر موثر باعث گسترش و به وجود آمدن پاتوژن‌های مقاوم‌تر شوند. از طرفی، اطلاعات ناکافی در مورد فراوانی این ژن پلاسمیدی و الگوی ژنتیکی آن در ایران وجود دارد. از این رو تشخیص سویه‌های کلبسیلاپنومونیه حاوی آنزیم‌های مقاومت بتالاکتامازی جهت درمان بهتر و جلوگیری از انتشار این ژن‌ها به دیگر باکتری‌ها با استفاده از روش‌های دقیق فنوتیپی و ژنوتیپی مهم می‌باشد.

مطالعات وسیع‌تر و شناسایی انواع گونه‌ها و زیر گونه‌های آنزیم‌های بتالاکتامازی وسیع الطیف در شناسایی نوع آنتی-بیوتیک‌های موثر در درمان عفونت‌های مقاوم و جلوگیری از گسترش مقاومت‌ها مفید می‌باشد.

## REFERENCES


1. Koneman W, Allen Stephan D, William MJ, editors. Color atlas and text book of diagnostic microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; 1997. P.171-241.
2. Lye DC, Kwa AL, Chlebicki P. World Health Day 2011: antimicrobial resistance and practical solutions. Ann Acad Med Singapore 2011; 40: 156-52.
3. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:5046-54.
4. .Mendonc N, Manageiro V, Robin F, Salgado MJ, Ferreira E, Canic M .The lys234Arg substitution in the enzyme SHV-72 is a determination for resistance to clavulanic acid inhibition. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 1806-11.
5. Walsh TR, Toleman MA. The Emergence of pan-resistant gram-negative pathogens merits a rapid global political response. J Antimicrob Chemother 2012; 67:1-3.
6. Fernández A, Pereira MJ, Suárez JM, Poza M, Treviño M, Villalón P, Sáez-Nieto JA, et al. Emergence in Spain of a multidrug-resistant enterobacter cloacae clinical isolate producing SFO-1 extended-spectrum beta-lactamase. J Clin Microbiol 2011; 49:822-28.

7. Jean SS, Hsueh PR. High burden of antimicrobial resistance in Asia. Int J Antimicrob Agents 2011; 37:291-95.

8. Duttaroy B, Mehta S. Extended spectrum b- lactamases (ESBL) in clinical isolates of Klebsiellapnumoniae and Escherchia coli. Indian J Pathol Microbiol 2005; 48: 45-48.

9. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M type b-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. Int J Antimicrob Agents 2000; 14: 137-42.

10. Oliver A, Coque TM, Alonso D, Valverde A, Baquero F, Conton R . CTX-M -10 linked to a phage-related element in a widely disseminated among enterobacteriaceae in a Spanish hospital .Antimicrob Agent Chemother 2005; 49: 1567-71.

11. Mirzaee M, pourmand MR, Chitsaz M, Mansouri S. Antibiotic resistance to third generation cephalosporins due to CTX-M-Type extended-Spectrum β-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* .Iranian J Pub Health 2009; 1: 10-17.

12. Fallah F, HakemiVala M, Hashemi A, Shams S. Emergence of novel plasmid-mediated beta-lactamase in *Klebsiella pneumonia*. Qom Univ Med Sci J 2013;6:104-16. [In Persian]

13. Hashemi A, Shams S, Barati M, Samedani A. Antibacterial effects of methanolic extracts of Zatariamultiflora, Myrtuscommunis and Peganumharmala on *Pseudomonas aeruginosa* producing ESBL. Arak Med Univ Sci J 2011;14:104-12. [In Persian]

14. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamases. Clin Microbiol Infect 2008;14:S33-41.

15. Block C. Antibiotic susceptibility testing. Methods in Molecular Medicine 2005; 67.

16. Henshke-Bar-Meir R, Yinnon AM, Rudensky B, Attias D, Schlesinger Y, Raveh D. Assessment of the clinical significance of production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) by Enterobacteriaceae. Infection 2006;34:66-74.

17. Del Carmen Rodriguez M, Vera DE, Ramirez-Ronda CH, Saavedra S. Phenotypic confirmation of extended-spectrum B-lactamases (ESBL) in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at the San Juan Veterans Affairs Medical Center. PR Health Sci J 2004;23:207-15.

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

19. Ko Ks, Lee MY, Song JH, Lee H, Junge DS, Junge SI, et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum b-lactamase producing Enterobacteriaceae isolated in Korean hospital. Diagn Microbiol Infect Dis 2008;61:453-59.

20. Mirsalehian A, Akbari-Nakhjavani F, Peymani A, Kazemi B, Jabal Ameli F, Mirafshar SM. Prevalence of extended spectrum b- lactamase-producing Enterobactriaceae by phenotypic and genotypic methods in intensive care units in Tehran, Iran. Daru 2008; 16: 169-73. [In Persian]

21. Labia R, Barthelemy M, Peduzzi J, Morand A, Tiwari K. Behavior of ceftazidime in regard to different classes ofbeta-lactamases. The situation in 1988. Presse Med 1988;17:1890-94.

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

23. Teo J, Ngan G, Balm M, Jureen R, Krishnanb P, Lina R. Molecular characterization of NDM-1producing Enterobacteriaceae isolates in Singapore hospitals. Western Pac Surveill Response J 2012;3:19-24.

24. Poirel L, Al Maskari Z, Al Rashdi F Bernabeu S, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman. J Antimicrob Chemother 2011; 66: 304–306.

25. Pitout JD, Hamilton N, Church L, Nordmann P, Poire L. Development and clinical validationof a molecular diagnosticassay to detect CTX-M-type b-lactamases in enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2007; 13: 291-97.

26. Tadahiro S, Itaru H, Marie N, Tatsuya N, Chalit K, Wanna M. High prevalence of CTX-M β-lactamase-producing Enterobacteriaceae in stool specimens obtained from healthy individuals in Thailand. J Clin Microbiol 2010;23:207-15.

27. Song W, Lee KM, Kim HS, Kim JS, Kim J, Jeong SH, et al. Clonal spread of both oxyimino-cephalosporin-andcefoxitin-resistant Klebsiellapneumoniae isolates co-producing SHV-2a and DHA-1 beta-lactamase at a burnsintensive care unit. Int J Antimicrob Agents 2006;28:520-24.

28. Moland ES, Hong SG, Thomson KS, Larone DH, Hanson ND. Klebsiellapneumoniae isolate producing at leasteight different β-lactamases, including AmpC and KPC β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:800–801.