دراسة بكتريولوجية وجزيئية لبعض الاجناس البكتيرية السالبة لملون غرام المقاومة لمضادات البيتالاكتام والمعزولة من اخماج المجاري البولية.

عباس عبود فرحان الدليمي هادي رحمن رشيد الطائي محمد خضير عباس النعيمي

جامعة ديالى /كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة جامعة ديالى /كلية العلوم قسم علوم الحياة

الخلاصة

شملت الدراسة 300عينة ادرار جمعت من المرضى المصابين باخماج المجاري البولية من اجناس واعمار مختلفة وتم جمع العينات من مستشفى البتول للولادة والاطفال ومستشفى بعقوبة التعليمي، للمدة بين 2013/9/1 ولغاية 2014/1/1. أظهرت نتائج الزرع البكتيري على أوساط أكار الماكونكي وأكار الدم ووسط المثيلين الازرق والتشخيص المظهري والفحوصات الكيموحيوية وتأكيد التشخيص باستخدام نظام api 20E أن (66) عزلة سالبة لصبغة كرام وبنسبة (57.4%) من مجموع العينات البالغة 115عينة موجبة للنمو المايكروبي ومن هذه العينات المرضية تم تشخيص (25) عزلة تعود لبكتريا *Escherichia coli* وبنسبة(37.87%)، و(22)عزلة تعود لبكتريا *Proteus mirabilis* بنسبة (33.33 %).

أما بخصوص إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز فقد أظهرت كل من *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis* نسب إنتاج (60%) , (40.9%) على التوالي. كما أختبرت قابلية العزلات على إنتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف بأستخدام طريقة الاقراص المتاخمة (Disc Approximation) وقد أعطت كل من *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis* نسب انتاج (12%) , (31.8%) على التوالي.

فضلا عن ذلك اختبرت قابليه العزلات على إنتاج أنزيمات البيتالاكتميز المعدنية Metallo β-Lactamase وباستخدام طريقة IMP-EDTA combination disc ، أعطت كلا من *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis* نسب إنتاج (12%) , (13,6%) على التوالي.

بينت نتائج التشخيص الجيني لأنزيمات ESβL باستخدام تقنية *PCR* إن هنالك 9عزلات من أصل 10 عزلات مقسمة الى 3 عزلات *E.coli* وبنسبة (100%) و 6 عزلات *P.mirabilis* من أصل 7عزلات وبنسبة (85.7%) كانت تحوي جين *bla* $_{TEM}$ واعتمادا على ظهور حزمة بحجم 950 زوج قاعدة في هلام الاكاروز 1% ،وأن جميع العزلات كانت غيرحاوية على جين *bla* $_{SHV}$.

الكلمات المفتاحية :- أخماج المجاري البولية، أنزيمات البيتالاكتاميز ،عوائل جينات *bla* $_{TEM}$ و *bla* $_{SHV}$ ، تقنية PCR.

دراسة بكتريولوجية وجزيئية لبعض الاجناس البكتيرية السالبة لملون غرام المقاومة
لمضادات البيتالاكتام والمعزولة من اخماج المجاري البولية.

عباس عبود فرحان الدليمي هادي رحمن رشيد الطائي محمد خضير عباس النعيمي

Bacteriological and Genetic study of some genus for bacterial gram-negative resistant to β-lactam , isolated from urinary tract infections .

Abass Abod Farhan Aldulemia Hadi Rahman Rasheed Al-Taai

Mohammed khudhair Abass Alniaamy

Diyala University
College of Education Pure Science
Biology Dept.

Diyala University
College of Science
Biology Dept.

Received 24 August 2014 ; Accepted 2 November 2014

Abstract

This study included collection 300 samples from patients suffering from urinary tract infection from Baaquba Teaching Hospital and Al –Batool Hospital in Baaquba city for the period from 1/09/2013 to 1/01/2014.

The results refer that 66 isolates are belonging to bacteria of Gram negative (57.4%), 25 (37.78 %) *Escherichia coli* , 22(33.33%) *Proteus mirabilis* ,by using diagnostic phenotypic ,biochemical tests and confirm the diagnosis using regular API20E.

The production of β-lactamase by *Eschrichia coli and Proteus mirabilis* was (60%) , (40.9%) respectively, also the isolated had the ability to produce the Extendended spectrum β-Lactamase enzyme by using disc Approximation ,The production from each of*Eschrichia coli* and *Proteus mirabilis* (12%), (31.8 %)respectively.

The results of Metalloβ-Lactamase by using the Imp-EDTA combination inducted that *E.coli* and *P.mirabilis* were (12%) and (13.6%) respectively.

The results of molecular detection of ESBL genes *(bla* $_{TEM}$ and *bla* $_{SHV}$) by using PCR technique ,(9) samples from (10) total , divided into 3(100%) *E.coli* and 6(85.7%) *P.mirabilis*

were harboring *bla* $_{TEM}$ gene based on the presence of 950 bp bands in 1% agarose gel. while results detect that the isolates of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* not harboring *bla* $_{SHV}$ gene.

KeyWords : -urinary tract infections , β-lactamase , *bla* $_{TEM}$ *and bla* $_{SHV}$, PCR

المقدمة

تُعدُّ اخماج المجاري البولية من المشاكل التي تأتي بالمرتبة الثانية بعد أمراض الجهاز التنفسي، فهي تحظى باهتمام الباحثين ، والعاملين في المجال الطبي، وتكمن خطورتها في زيادة معدل الوفيات من خلال ما تُحدثه من أضرار كبيرة في الكلية مسببة العجز الكلوي .لذا فقد ازدادت الدراسات المتعلقة بالعوامل المسببة لهذه الالتهابات، ولا سيما الجرثومية منها (1) .

تعد البكتيريا السالبة لصبغة كرام من أفراد العائلة المعوية المسبب الرئيس لهذا النوع من الالتهابات، فهي تشكل ما مقداره (40 – 80 %) من مجموع التهابات الكلية، وقد أشارت الدراسات إلى أن بكتيريا *Escherichia coli* واحدة من الأنواع البكتيرية المهمة الأكثر تسبباً في حدوث اخماج المجاري البولية سواء كان في ضمن أفراد المجتمع أو المرضى الراقدين في المستشفيات (2) .

تعد بكتريا *Proteus mirabilis* النوع الأهم في جنس *Proteus* وهي من المسببات الرئيسة لخمج المجاري البولية اذ تأتي بالمرتبة الثانية بعد بكتريا *E.coli* (3) .

أدى الاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية إلى ظهور ممرضات بكتيرية انتهازية مقاومة لهذه المضادات الحيوية، و من الوسائل التي تبديها البكتيريا لمقاومة مضادات β-lactam هو إنتاجها لأنزيمات β-lactamase التي تحلل حلقة β-lactam (4).

تستطيع العديد من الأنواع البكتيرية انتاج انزيمات تعمل على تحطم مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات والكاربابنيم (Carbapenems) وتدعى هذه الأنزيمات أنزيمات البيتالاكتاميز β –Lactamase (5).

استخدمت طرائق مظهرية عدة لتشخيص إنزيمات ESβLs و MβLs وان الدراسات الحديثة تعتمد على استخدام تقنية التفاعل التسلسلي للبوليميريز Polymerase Chain Reaction (PCR) للتحري عن الجينات التي تشفر إنزيمات β-lactamase (6).

تشفر أنزيمات ESβLs بوساطة جين على البلازميد مما يسهل انتقالها بين الأنواع البكتيرية المختلفة و اشتقت أساسا أنزيمات ESβLs من الانتشار الواسع لكل من انزيمات عائلتي TEM and SHV (7).

أهداف الدراسة:

1. تحديد الأجناس البكتيرية الأكثر شيوعا المسببة لاخماج المجاري البولية ومعرفة مقاومتها لمضادات البيتالاكتام و دراسة حساسية العزلات لمضادات البيتالاكتام وتحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) لبعض هذه المضادات.
2. إجراء دراسة مقارنة بين عوامل الضراوة للأجناس المختلفة.
3. الكشف عن جينات bla_{Tem} ,bla_{shv} المشفرة لانزيمات البيتالاكتاميز المحطمة لمضادات البيتالاكتام.

المواد وطرائق العمل

عزل البكتريا والتشخيص

اشتمك الدراسة جمع 300 عينة ادرار تحت الاشراف الطبي المختص من المرضى المصابين باخماج التهاب المجاري البولية من اجناس واعمار مختلفة وتم جمع العينات من مستشفى البتول للولادة والاطفال ومستشفى بعقوبة التعليمي، للمدة بين 1 /2013/9 ولغاية 1 /1 /2014.

شخصت العزلات البكتيرية اعتمادا على ما ورد في (8) إذ شخصت المستعمرات مبدئياً اعتماداً على الصفات المظهرية وتضمنت شكل المستعمرات ولونها وقوامها ورائحتها وحجمها على وسط أكار الماكونكي وأكار الدم ووسط Eosin methylene blue الصلب لتفرقة *Klebsiella* عن بكتريا *E.coli* ذات البريق المعدني. وأخضعت العزلات الى الفحص المجهري باستخدام صبغة غرام للتعرف على شكل البكتريا وترتيبها وتفاعلها مع صبغة غرام واستخدمت لتشخيص العزلات ايضا الفحوصات الكيموحيوية المختلفة كأختبار أنزيم الكاتاليز، وأنزيم الاوكسيديز، والاندول، وأحمر المثيل، و الفوكس بروسكاور، وأستهلاك السترات، والحركة، واليوريا، وتم تأكيد التشخيص باستخدام عدة التشخيص Api 20E Kit.

التحري عن إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز β-Lactamase Production

1 - طريقة اليود القياسية السريعة Rapid Iodometric:

أستخدمت هذه الطريقة للكشف عن قابلية العزلات قيد الدراسة على أنتاج أنزيم البيتالاكتاميز وذلك حسب ما ورد في (9) وكما يأتي :

حضرت مزارع للعزلات البكتيرية بعمر 24 ساعة ونقلت المستعمرات البكتيرية بوساطة العروة الى أنابيب صغيرة حاوية على (100) مايكرولتر من البنسلين جي ثم حضنت الأنابيب لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة 37 مْ.ثم أضيف الى

كل انبوبة 50مايكروليتر من محلول النشأ ومزجت جيدا ثم أضيف الى كل انبوبة في أعلاه (20) مايكروليتر من محلول اليوداذ يتحول لون المحلول الى أزرق غامق نتيجة تفاعل اليود مع النشأ. مزجت محتويات الأنابيب جيدا لمدة دقيقة واحدة وأحتسبت النتيجة موجبة عند حصول تغير لوني سريع من اللون الأزرق الى اللون الأبيض خلال دقيقة واحدة فقط من إضافة الكاشف (اليود)، أعيد الفحص بظهور نتيجة موجبة متأخرة (أكثر من خمس دقائق) .

2-التحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs) :

استخدمت طريقة الأقراص المتاخمة المحورة Disc approximation للتحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وذلك حسب ما جاء في (10) وكالاتي:

حضر العالق البكتيري للعزلات قيد الدراسة ونشر 0.1 من العالق البكتيري بوساطة المسحة القطنية Swab المعقمة على أطباق حاوية على وسط مولر هنتون بصورة كاملة، تركت الأطباق لمدة 10 دقائق لتجف ثم وضع قرص يحتوي على خليط من Amoxicillin/ Clavulanic acid (30 µg / Disc) في وسط الطبق الزرعي الملقح وبعد ذلك رتبت أقراص المضادات الحيوية, Cefotaxime,Ceftazidime Aztreonam على بعد 3 سم من مركز قرص خليط المضاد / المثبط ثم حضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 مئوية ولمدة 18-24 ساعة وبملاحظة مناطق التثبيط فإن حدوث أتساع في منطقة التثبيط بين القرص المركزي وواحد أو أكثر من الأقراص المذكورة دليل على النتيجة الموجبة أي أنتاج العزلة للأنزيم.

3- التحري عن قابلية البكتريا لانتاج انزيم البيتالاكتاميز المعدني بأستخدام طريقة اتحادالمضاد الحيوي EDTA-IPM:

حضر العالق البكتيري للعزلات قيد الدراسة وفق الفقرة ونشر المزروع بوساطة المسحة القطنية swab المعقمة على اطباق حاوية على وسط مولر هئتون بصورة كاملة، وتركت الأطباق لمدة 10 دقائق لتجف ثم وضع قرصين من المضاد الحيوي Imipenem (10mg) في وسط الطبق الزرعي الملقح على ان تكون المسافة بينهما3 سم وتم وضع 10 مايكروليتر من محلول EDTA المحضر في الفقرة الى واحد من اقراص Imipeneum ثم حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37 م° لمدة (18-24)ساعة وبعد ملاحظة مناطق التثبيط فإن زيادة منطقة التثبيط عن 7ملم حول قرص ال Imipenem مع EDTA مقارنة مع قرص ال Imipenem لوحده تعد النتيجة موجبة وان البكتريا تعد منتجة لانزيم البيتالاكتاميز المعدني Metallo_ Beta Lactamase MBL (11).

4- الكشف عن الجينات المشفرة لانزيمات البيتالاكتاميز *bla TEM and bla SHV*

خضعت العزلات المختارة بواسطة الاختبارات المظهرية الموجبة الى دراسة الفحص الجزيئي بواسطة تقنية سلسلة تفاعل أنزيم البلمرة PCR وذلك عن طريق :

تحضير القالب:

تم استخلاص الدنا بحسب ماورد في.

أستعمال البادئات في تقنية PCR

جدول(1) البادئات المستخدمة في تضاعف تقنية PCR.

الجينات	اسم البادئات	تسلسل النيوكليوتيدات واتجاهها 5`----------→3`	الوزن الجزيئي µg/µmol	الحجم (bp)	المصادر
*bla*TEM	*bla* TEMC (F) *bla* TEMD (R)	TCG GGG AAA TGT GCG CG TGC TTA ATC AGT GAG GCA CC	5292.4 6118	950	(12)
*bla*SHV	*bla* SHVos5(F) *bla* SHVos6(R)	TAT CTC CCT GTT AGC CAC C GAT TTG CTG ATT TCG CTC GG	5675.8 6131	800	(12)

أعتمدت الضروف ادناه لغرض تفاعل PCR :

المسخ الاولي (دورة واحد) 94 م°/3 دقائق ثم 35 دورة تتضمن المسخ (94م°/30 ثانية) والتثبيت (57م°/30 ثانية) وألاستطالة (72م°/دقيقة واحدة) وأخيرا الاستطالة النهائية (دورة واحدة)72م°/ 5 دقائق ، أجريت عملية الترحيل الكهربائي في 1 غم من الاكاروز لفصل خليط الدنا المستخلص وفحصه(13).

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج البحث المتعلقة بالتهابات المجاري البولية ان الاصابة تمثلت في (66) عزلة سالبة لصبغة كرام وبنسبة (57,4%) من مجموع العينات البالغة 115عينة موجبة للنمو المايكروبي ومن هذه العينات المرضية تم تشخيص (25) عزلة تعود لبكتريا *Escherichia coli* وبنسبة (37,87%)،و(22)عزلة تعود لبكتريا *Proteus mirabilis* نسبة (33,33 %).

تم التشخيص بالاعتماد على الفحوصات المظهرية والمجهرية كتشخيص أولي إذ اعتمد شكل وقوام وهيئه المستعمرات فضلاً عن قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز على وسط الماكونكي. اظهرت مستعمرات *E.coli* بلون وردي نتيجة تخميرها لسكر اللاكتوز، جافة، متوسطة الحجم، محدبة و منتظمة و سالبة لاختبار الاوكسديز وتنمو بشكل مستعمرات ذات بريق اخضر معدني على الوسط الزرعي EMB . أما فيما يخص بكتريا *P. mirabilis* فكانت مستعمرات شاحبة اللون على وسط اكار الماكونكي لكونها غير قادرة على تخمر سكر اللاكتوز أعطت نتيجة سالبة لاختبار الاوكسديز وموجبة لاختبار اليوريز (Urease) وتميزت هذه البكتريا بظاهرة الحركة الزاحفة (الانثيال) Swarming، اما عن الفحص المجهري فقد ظهرت جميع العزلات السابقة الذكر سالبة لملون غرام عصوية جدول (2).

العزلات	صبغة كرام	الكاتليز	الاوكسديز	الاندول	احمر المثيل	فوكس بروسكاور	الستريت	تخمر اللاكتوز	الحركة	اليوريز
E. coli	–	+	–	+	+	–	–	+	+	–
P.mirabilis	–	+	–	–	+	–	+/_	–	+	+

جدول (2)الاختبارات الكيموحيوية والمجهرية والزرعية للأنواع البكتيرية

أظهرت نتائج دراسة انزيمات البيتالاكتاميز بطريقة اليود القياسية السريعة كما يتضح من الجدول (3) أن(15)عزلة من مجموع (25) عزلة لبكتريا *E.coli* وبنسبة (60%) أعطت نتيجة موجبة لفحص أنتاج البيتالاكتاميز، اما بالنسبة لبكتريا *P.mirabilis* فقد أظهرت نتائج هذه الدراسة أن(9)عزلات من مجموع (22) عزلة وبنسبة(40.9%) أعطت نتيجة موجبة لفحص أنتاج البيتالاكتاميز.

إن توافر بعض العزلات التي أعطت نتيجة سالبة لفحص البيتالاكتاميز ومقاومتها لمضاد واحد أو أكثر يدل على توافر آليات مقاومة أخرى غير البيتالاكتاميز مثل تغيير بروتينات الغشاء الخارجي بوصفها خطوة لتغيير موقع الهدف،أو أمتلاك حاجز النفاذية (14) بأعتبار إن إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز ليست الآلية الوحيدة في مقاومة مضادات البيتالاكتاميز.

الجدول (3) أعداد العزلات المنتجة لانزيم البيتالاكتاميز ونسبها

نوع العزلات	عدد العزلات الكلية	عدد العزلات المنتجة لانزيم البيتالاكتاميز	النسبة المئوية لانتاج البيتالاكتاميز
E.coli	25	15	%60
P.mirabilis	22	9	%40.9

أخضعت جميع العزلات قيد الدراسة للكشف عن انتاجها لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف، وقد أشارت النتائج في الجدول (4) الى أن بكتريا *E.coli* كانت منتجة للانزيم بنسبة(12%) ،اما بالنسبة لبكتريا *P.mirabilis* فقد أظهرت نتائج هذه الدراسة أن(7)عزلات من مجموع (22) عزلة وبنسبة(31.8%) أعطت نتيجة موجبة لفحص أنتاج الانزيم، إن إنتشار السلالات البكتيرية المنتجة للأنزيمات الواسعة الطيف في أي مستشفى يعتمد على عوامل مختلفة منها طريقة أستعمال المضادات الحيوية، ومعدل النقل للسلالات المنتجة بين الأشخاص العاملين والراقدين في المستشفيات، ونوع التعقيم المستخدم في وحدات المستشفى وخاصة في وحدات العناية المركزة(15).

الجدول (4) أعداد العزلات المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف ونسبها

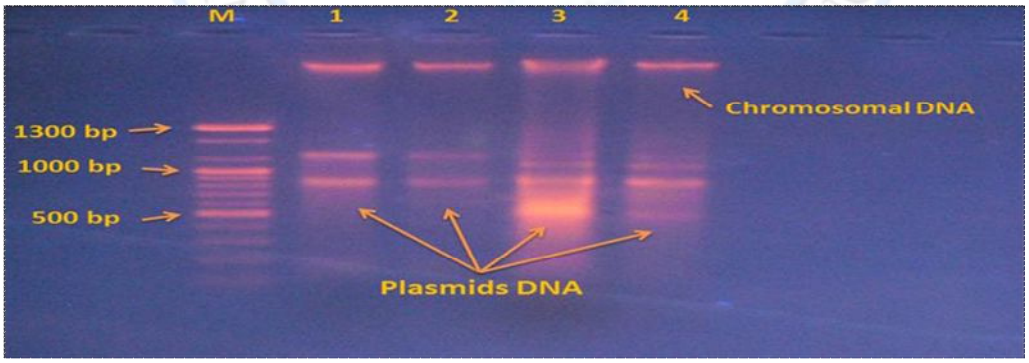
نوع العزلات	عددالعزلات الكلية	عددالعزلات المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف	النسبة المئويةلانتاج انزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف
E.coli	**25**	**3**	%12
P.mirabilis	22	**7**	%31.8

أخضعت جميع العزلات قيد الدراسة للكشف عن انتاجها لانزيمات البيتالاكتاميزالمعدنية، إذ أشارت النتائج في الجدول (5) الى أن بكتريا *E.coli* كانت (3) عزلات منتجة للانزيم وبنسبة (12%) اما بالنسبة لبكتريا *P.mirabilis* فقد أظهرت نتائج هذه الدراسة أن (3) عزلات من مجموع (22) عزلة وبنسبة(13.6%) أعطت نتيجة موجبة لفحص أنتاج الأنزيم ، وفي دراسة اجريت من قبل الباحث (16) اشار الى ظهور عزلة واحدة مقاومة لمضادات البيتالاكتاميز ومنتجة لهذا الانزيم كانت محمولة على بلازميد اقتراني. وقد يكون سبب عدم انتاج عزلات الدراسة لهذا الانزيم بوصفها حساسة لمضاد الاميبينيم بدرجة كبيرة.

الجدول (5) أعداد العزلات المنتجة لانزيمات الميتالوبيتالاكتاميز المعدنية ونسبها.

نوع العزلات	عدد العزلات الكلية	عددالعزلات المنتجة لانزيمات الميتالوبيتالاكتاميز المعدنية	النسبة المئويةلانتاج انزيمات الميتالوبيتالاكتاميز المعدنية
E.coli	25	3	%12
P.mirabilis	22	3	%13.6

تم اجراء التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR) لعزلات *E.coli* المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف والبالغ عددها (3) عزلات ولعزلات *P.mirabilis* المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف باستخدام بادئ متخصص يستهدف التسلسل النوعي لجين bla_{SHV} ولجين bla_{TEM} لغرض تشخيص الجينات المنتجة لأنزيمات ESβL ، بينت النتائج إن هنالك 9عزلات من أصل 10 عزلات مقسمة الى 3 عزلات *E.coli* وبنسبة (100%) و 6 عزلات *P.mirabilis* من أصل 7 عزلات وبنسبة (85,7%) كانت تحوي جين bla_{TEM} واعتمادا على ظهور حزمة بحجم 950 زوج قاعدة في هلام 1% كما موضح في الشكل(1) ، وأن جميع العزلات كانت غيرحاوية على جين bla_{SHV} كما موضح في الشكل (2) .

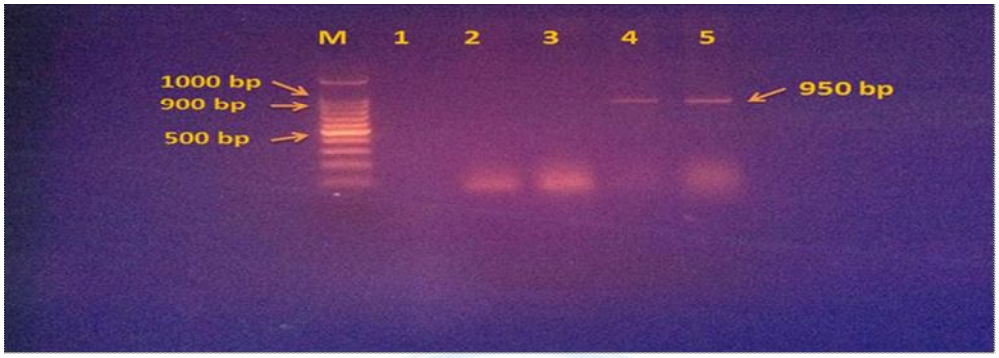


الشكل (4-1) الترحيل الكهربائي للعزلات باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1%، 75 فولت / سم لمدة 90 دقيقة.

M: 100 bp DNA ladder،

المسار (1)،(2): المحتوى البلازميدي لل *E.coli*

المسار(3)، (4): المحتوى البلازميدي *P.mirabilis*



شكل (1) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل (PCR)

M: 100bp DNA ladder, 1: negative control, 2: SHV gene for *E. coli*, 3: SHV gene for *P.mirabilis* , 4: TEM gene for *E. coli*, 5: TEM gene for *P.mirabilis*.

المصادر

1. **Foxman**, B. ; Gillepie, B. and Koopman, J.(2000) .Risk factors for second urinary tract infection in College Women. Am. J. Epidemiol. 151 : 1194.
2. **Todar**,K.(2002) Antimicrobial agents used in treatment of infectious disease.citted by: http://www.kfshrc.edu.sa/annals/.
3. Jen -Shwu, L; Lai, Ho, S.W.; Luh, K.T.; Wang, W.B. (2000). Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in Proteus mirabilis by P-nitrophenylglycerol. J.Med- Microbiol.49: 723-731.
4. **Sobia,** f.; Shahia, M.; Singh, A.; Kham, H.M.;Shulka, I, and Malik, A. (2011). Occurrence of bla_{AmpC} in cefoxitin- resistant *Escherichia coil* and *Klebsiella pneumonia* isolate from a North india tertiary care hospital. NZJ med Labsci, 65: 00-00.
5. المرجاني، محمد فرج. (2011) . المضادات الحيوية المقاومة الحيوية البكتيرية للمضادات الحيوية. عمان: دار دجلة.
6. **Pitout**, J. D.D and laupland, K.B. (2008). Extended spectrum β-lactamase producing *enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. Lamcet infect Dis. 8: 159-166.
7. **Lee**, J. H.; Bae, I.K. and Lee, S.H. (2010) New Defintion of Extended – spectrum *B*-Lactamses conferring Emerging Antibiotic Resistance. Med Res Rev. 10-1002.

8. **Holt**,J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.A.; and Williams, S.T.(1994). Bergy, s Manual Of Derminative Bacteriology. (9th) ed. Williams & Wilkins.
9. **WHO**. (1978). Techniques for the detection of β – Lactamase producing strains *ofneisseriagonorrhoeae*. 616:pp. 137 – 143.
10. **Jarlier**, V.; Nicolas, M.; Fournier, G.; and Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum β-Lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. ***Rev. Infect****. Dis*. Vol.10,No. 4 :pp. 867-78.
11. **Bhalerao**, D. S., Roushani, S., Kinikar, A. G. and Akhter, I. (2010) ; Study of Metallo-beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pravara Rural Hospital. ***Pravara Med Rev****;*pp : 1-5.
12. **Ruppé**, E.; Hem, S.; Lath, S.; Gautier, V.; Ariey, F.; Sarthou, J. L.; Monchy, D. and Arlet, G. (2009). CTX-M β-Lactamases in *Escherichia coli* from Communityacquired Urinary Tract Infections, Cambodia. *Emerg Infect Dis.* 15(5):741-8.
13. **Al-Jubouri** , A . S. ; Mahmood, Y. A.R ; AL-Salihi. S. Sh.(2012). Pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae* isolated from diarrheal cases among children in Kirkuk city. Tikrit Journal of Pure Science Vol. 17 ,No. 4 .pp. 377- 388.
14. **Poirel**, L.; Thomas, I.; Naas, T.; Karim, A.; and Nordmann, P.(2000) Biochemical sequence analysis of GES-1 a novel class A, extended – spectrum 13 – Lactamase, and the class 1 integron in 52 from *Klebsiella pneumonia*. ***Antimicrob. Agents Chemother***. Vol. 44,No. 3 : pp.622-632.
15. **Sarojamma,** V. and Ramakrishna, V. (2011) ; Prevalence of ESBL-Producing Klebsiellapneumoniae Isolates in Tertiary Care Hospital. International Scholarly Research Network . ISRN Microbiology.pp.1-5
16. **AL-Ouqaili** ,M. T. S. (2005).Genetic aspects of Ambler class c, extended spectrum and metallo-beta-lactamases among beta-lactam resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. ***J .Al-Anbar Medical*** Vol.5 , No.1 .