

Giá trị kiểu gen trong tiên đoán kiểu hình kháng cephalosporin của các chủng *Klebsiella pneumoniae* gây nhiễm khuẩn huyết

The value of antibiotic resistant genotype to predict cephalosporin resistance of *Klebsiella pneumoniae* causing blood stream infections

Trịnh Văn Sơn, Ngô Tất Trung,
Nguyễn Hồng Nhung, Nguyễn Đăng Mạnh
Lê Hữu Song

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Tìm hiểu giá trị của kiểu gen trong tiên đoán kiểu hình kháng cephalosporin phổ rộng của các chủng *K. pneumoniae* gây nhiễm khuẩn huyết. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu quan sát mô tả trên 50 chủng *K. pneumoniae* phân lập từ mẫu máu của 50 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 từ tháng 10/2014 đến tháng 05/2016. Kháng sinh đồ thực hiện trên hệ thống máy Vitek II của hãng BioMerieux, Pháp. Các gen kháng kháng sinh được phát hiện bằng sử dụng bộ kit Multiplex PCR tại Trung tâm Nghiên cứu Y học Việt Đức, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108. **Kết quả:** Tỷ lệ các chủng *K. pneumoniae* sinh ESBLs là 22,0%, tỷ lệ kháng với cefotaxime, ceftazidime và cefepime tương ứng là 54,0%, 48,0% và 29,2%. Tỷ lệ các chủng mang gen TEM, SHV và CTX-M tương ứng là 46,0%, 84,0% và 46,0%. 90% các chủng mang ít nhất một trong ba gen trên và 38% các chủng mang cả ba gen trên. Giá trị chẩn đoán *K. pneumoniae* sinh ESBLs của TEM và CTX-M có độ nhạy 90,9% và độ đặc hiệu 66,7%. Giá trị chẩn đoán *K. pneumoniae* kháng cephalosporin phổ rộng của CTX-M có độ nhạy từ 77,8% đến 89,5% và độ đặc hiệu từ 82,8% đến 91,3%, tương ứng gen TEM có độ nhạy từ 74,1% đến 78,9% và độ đặc hiệu từ 75,9% đến 87,0%. **Kết luận:** Gen TEM và CTX-M là những gen có thể sử dụng trong chẩn đoán kiểu hình kháng cephalosporin ở các chủng *K. pneumoniae* gây nhiễm khuẩn huyết.

Từ khóa: Nhiễm khuẩn huyết, kháng cephalosporin, *K. pneumoniae*, ESBL.

Summary

Objective: To evaluate the value of antibiotic resistant genotype to diagnose cephalosporin resistance of *K. pneumoniae* causing blood stream infections. **Subject and method:** A total of 50 *K. pneumoniae* septic patients were treated at 108 Military Central Hospital (108 MCH), in Hanoi, from October 2014 to May 2016. All strains were identified and determined antibiotic resistance by using Vitek II Automated system (BioMerieux, France). Genes producing ESBLs and carbapenemases were screened using in-house Multiplex PCR in Vietnamese-German Center for Medical Research, 108 MCH. **Result:** In total, the percentage of ESBLs producing *K. pneumoniae* was 22.0%. Cefotaxime, ceftazidime and cefepime resistant strains were 54.0%, 48.0% and 29.2% respectively. The percentages of ESBL genes: TEM, SHV and CTX-M were 46.0%, 84.0% and 46.0%; respectively. 90.0% of all strains carried at least one of three genes and 38.0% carried all of three genes. The sensitivity and specificity of TEM and CTX-M to diagnose *K. pneumoniae* producing ESBLs were 90.0%

Ngày nhận bài: 25/3/2020, ngày chấp nhận đăng: 1/4/2020

Người phản hồi: Lê Hữu Song; Email: lehuusong@108-icid.com - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

and 66.7%, respectively. The sensitivity and specificity of CTX-M to diagnose broad spectrum cephalosporin resistance were 77.8 - 89.5% and 82.9 - 91.3%, respectively. Similar results were found of TEM with 74.1 - 78.9% and 75.9 - 87.0%, respectively. *Conclusion:* CTX-M and TEM were good candidates to predict phenotypic resistance of *K. pneumoniae* causing BSIs.

Keywords: Sepsis, cephalosporin resistance, *K. pneumoniae*, ESBL.

1. Đặt vấn đề

Kháng kháng sinh đã và đang là thách thức với hệ thống chăm sóc y tế toàn cầu, trong đó đặc biệt là với các nước đang phát triển và có tỷ lệ lưu hành cao các bệnh lý truyền nhiễm như Việt Nam. Trong những năm vừa qua tỷ lệ mắc và tử vong do các nhiễm khuẩn do các chủng vi khuẩn kháng thuốc và đa kháng thuốc không ngừng gia tăng [1]. Theo thống kê của chương trình kiểm soát kháng kháng sinh toàn cầu thì Việt Nam là quốc gia có tỷ lệ lưu hành cao các chủng vi khuẩn kháng thuốc và đa kháng thuốc, như các chủng sinh beta-lactamases phổ rộng (ESBLs) [2]. Một trong các tác nhân phổ biến và quan trọng gây nhiễm khuẩn huyết (NKH) ở các nước Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam là *K. pneumoniae*, thuộc họ vi khuẩn đường ruột *Enterobacteriaceae* [3].

Chủng *K. pneumoniae* sinh ESBLs được phát hiện đầu tiên vào năm 1983, sau đó được ghi nhận trên toàn thế giới, các enzyme đầu tiên là sản phẩm của các đột biến họ gen TEM và SHV, sau đó cefotaximase (CTX-M) xuất hiện và đóng vai trò quan trọng trong khảo sát dịch tễ cũng như cơ chế kháng trong lâm sàng [4]. Các gen kháng kháng sinh được nghiên cứu đánh giá về cơ chế kháng và cơ chế lan truyền kháng thuốc giữa các chủng vi khuẩn, mà chưa có nhiều nghiên cứu đánh giá giá trị của chúng trong thực hành lâm sàng.

Trong lâm sàng, kháng sinh đồ vẫn là tiêu chuẩn vàng định hướng sử dụng kháng sinh phù hợp. Tuy nhiên đòi hỏi thời gian chờ đợi kéo dài vì vậy đòi hỏi các nhà nghiên cứu phát triển các công cụ mới như sinh học phân tử nhằm giúp các nhà lâm sàng có thêm thông tin để có quyết định lựa chọn kháng sinh phù hợp, đặc biệt là với những bệnh nhiễm khuẩn nặng như NKH. Với những lý do trên chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm: *Khảo sát các gen phổ biến mã hóa sinh beta-lactamase phổ rộng cũng như giá trị của*

chúng trong tiên đoán kiểu hình kháng cephalosporin của các chủng K. pneumoniae gây NKH.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 50 chủng *K. pneumoniae* được phân lập từ máu của 50 bệnh nhân (BN) NKH tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 từ tháng 10/2014 đến tháng 05/2016. BN được chẩn đoán dựa trên tiêu chuẩn chẩn đoán của Đồng thuận quốc tế lần thứ 2 [5] và có kết quả cấy máu dương tính với *K. pneumoniae*.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Cấy máu và định danh vi khuẩn

BN khi có các triệu chứng nghi ngờ nhiễm khuẩn sẽ được cấy máu theo quy trình của Khoa Vi sinh vật - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108. Mỗi BN được cấy hai bình máu, mỗi bình 8 - 10ml máu lấy từ hai vị trí khác nhau. Bình cấy máu sử dụng bình BACTEC™ Plus Aerobic/F của hãng Becton Dickinson, Hoa Kỳ và bình cấy được ủ và được quyết và báo dương tính tự động với hệ thống máy BD BACTEC™ 9120 cùng hãng. Khi các bình báo dương tính bệnh phẩm sẽ được nhuộm soi Gram và cấy chuyển sang đĩa thạch máu, sau đó các khuẩn lạc sẽ được định danh vi khuẩn và làm kháng sinh đồ bằng hệ thống máy định danh tự động VITEK® 2 của hãng BioMérieux, Pháp. Các chủng khi có kết quả cấy dương tính sẽ được bảo quản trong các type glycerol 20% ở -70°C chờ làm test về gen kháng thuốc.

2.2.2. Kháng sinh đồ

Đánh giá kháng sinh đồ dựa trên hệ thống xét nghiệm tự động VITEK® 2 của hãng BioMérieux, Pháp, sử dụng nồng độ ức chế tối thiểu và được phiên giải kết quả dựa trên tiêu chuẩn của Viện Tiêu chuẩn xét

nghiệm lâm sàng (Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI 2016). Các kháng sinh nhóm beta-lactam được khảo sát bao gồm: Ampicillin (AM), amoxicillin/clavulanic-acid (AMC), piperacillin/tazobactam (TZP), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP).

2.2.3. Xét nghiệm gen mã hóa sinh β -lactamase

Các chủng *K. pneumoniae* sau khi được bảo quản ở -70°C sẽ được cấy lại trong môi trường thạch máu, các khuẩn lạc sẽ được tách DNA theo quy trình chuẩn và được chạy PCR để xác định các gen mã hóa sinh beta-lactamase cần khảo sát, bao gồm: ESBL-1 (SHV, TEM, CTX-M); ESBL-2 (VEB, GES, PER).

2.2.4. Quy trình tách DNA và chạy PCR xác định gen kháng thuốc

Các chủng vi khuẩn được cấy lại trên môi trường thạch máu, khuẩn lạc hòa vào 300 μl dung dịch đệm TE (25mM Tris-base pH 8.0, 1mM EDTA) và tiến hành tách DNA. Bổ sung 300 μl NaOH-SDS, ủ 95°C trong 15 phút, trung hòa bằng 250 μl 1M Tris-HCl pH 4,8 $\rightarrow$ bổ sung 400 μl dung dịch 25 : 24 : 1 (phenol: Chloroform: Isoamylalcohol) $\rightarrow$ trộn đều $\rightarrow$ ly tâm 1320 vòng/phút $\times$ 15 phút $\rightarrow$ chuyển 600 μl dịch nổi sang type eppendorf mới $\rightarrow$ bổ sung 600 μl isopropanol $\rightarrow$ trộn đều $\rightarrow$ ủ 10 phút ở nhiệt độ

phòng $\rightarrow$ ly tâm 3200 vòng/phút $\times$ 30 phút ở 4°C $\rightarrow$ bỏ dịch nổi, thu phần tủa $\rightarrow$ rửa phần tủa 2 lần với ethanol 70% $\rightarrow$ để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng $\rightarrow$ bổ sung 200 μl dung dịch đệm TE $\rightarrow$ ủ ở 56°C trong 10 phút $\rightarrow$ đánh giá chất lượng và đo nồng độ DNA $\rightarrow$ bảo quản DNA ở -70°C cho đến khi thực hiện PCR.

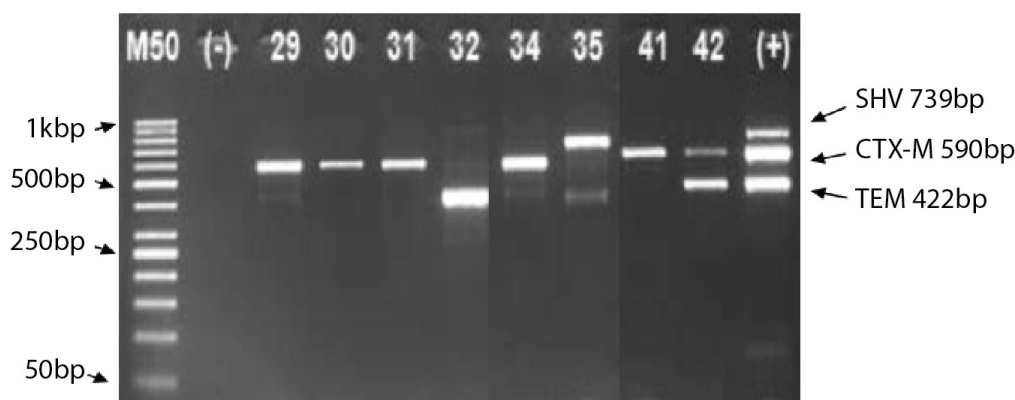
Phản ứng Multiplex PCR sử dụng Master mix Hotstart Promega (2x), bộ mỗi tương ứng, khuôn DNA vi khuẩn và nước cất vừa đủ tổng thể tích 20 μl . Chu trình nhiệt sử dụng máy luận nhiệt Mastercycler Eppendorf với chu trình 94°C trong 5 phút, 38 chu kỳ bao gồm (94°C trong 30 giây, 61°C trong 30 giây, 72°C trong 40 giây), 72°C trong 7 phút. Kết quả được đọc trên hệ thống chụp ảnh điện di trên thạch agarose 1,5% (Hình 1).

2.3. Phân tích số liệu

Các biến định lượng được thể hiện với số lượng (tỷ lệ phần trăm), Các biến số được đánh giá giữa hai nhóm độc lập là nhóm nhạy với kháng sinh và nhóm không còn nhạy với kháng sinh. So sánh sự khác biệt giữa các biến định lượng sử dụng kiểm định χ^2 , sự khác biệt được xem là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$. Độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán âm tính và giá trị tiên đoán dương tính được tính dựa trên công thức của bảng 2×2 .

3. Kết quả

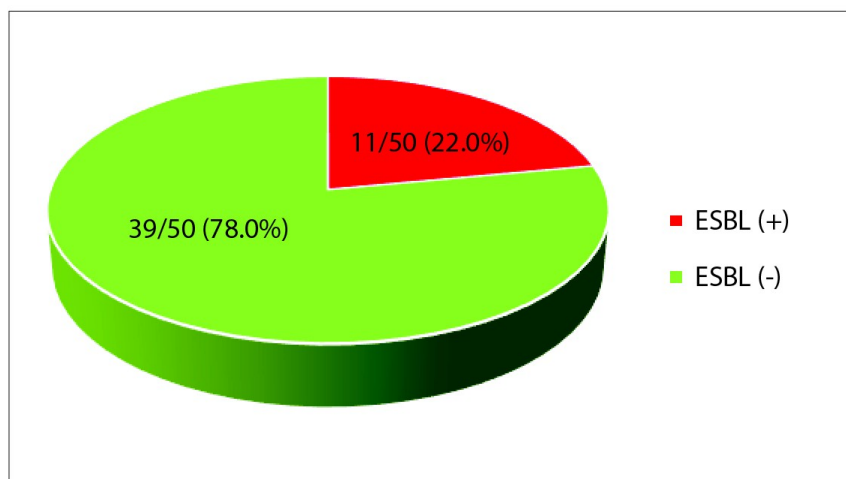
3.1. Hình ảnh điện di các gen mã hóa sinh ESBLs



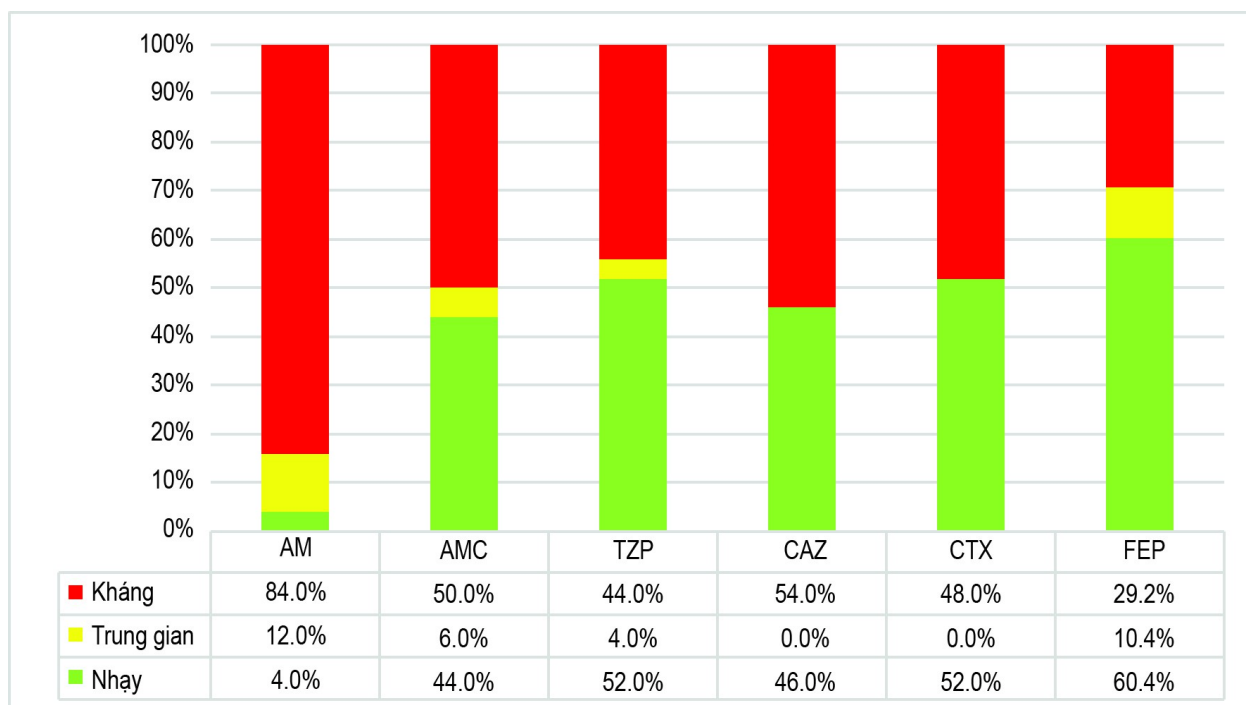
Hình 1. Hình ảnh điện di các gen SHV, TEM, CTX-M

Nhận xét: M50 là marker với band từ 50bp đến 1000bp, (-) chuẩn âm, (+) chuẩn dương với gen SHV (739 bp), CTX-M (590bp) và TEM (422bp), các mẫu 29, 30, 31, 34 và 41 dương tính với gen CTX-M, mẫu 32 dương tính với gen TEM, mẫu 35 dương tính với gen SHV và TEM, mẫu 42 dương tính với gen CTX-M và TEM.

3.2. Đặc điểm kháng kháng sinh



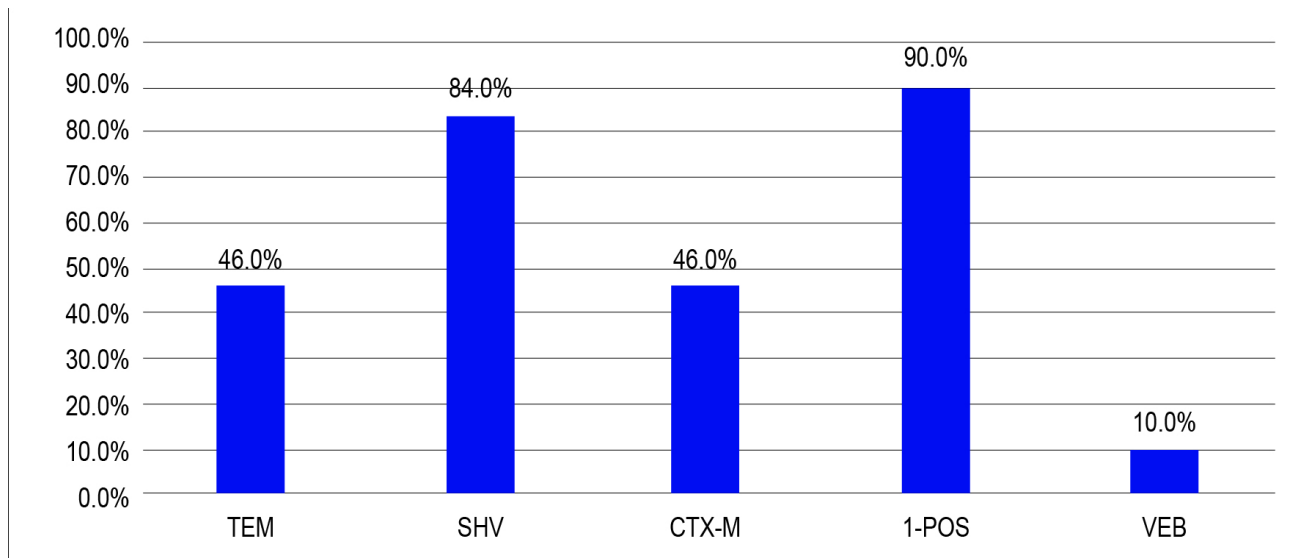
Biểu đồ 1. Tỷ lệ chủng *K. pneumoniae* sinh ESBLs



Biểu đồ 2. Tỷ lệ kháng kháng sinh nhóm beta-lactam

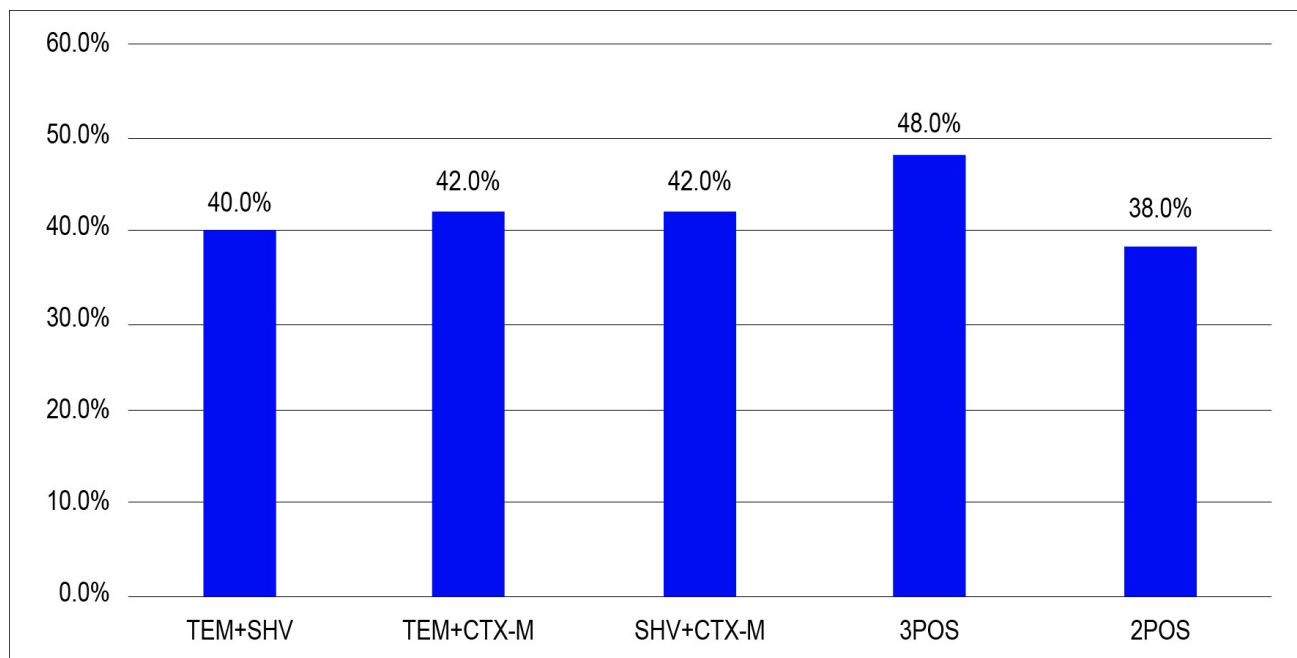
Nhận xét: Các chủng *K. pneumoniae* kháng cao với AM, AMC, TZP, CAZ và CTX nhưng có tỷ lệ kháng thấp hơn với FEP.

3.3. Đặc trưng phân bố các gen mã hóa sinh beta-lactamases



Biểu đồ 3. Phân bố gen mã hóa sinh beta-lactamase

Nhận xét: Hầu hết các chủng được khảo sát mang ít nhất một trong 3 gen mã hóa sinh ESBLs (TEM, SHV hoặc CTX-M). Các gen GES và PER không được phát hiện trong số các chủng được khảo sát.



Biểu đồ 4. Phân bố chủng mang nhiều gen mã hóa sinh beta-lactamase

Nhận xét: Tỷ lệ cao các chủng mang đồng thời 2 trong 3 gen mã hóa sinh ESBLs là TEM, CTX-M và SHV (2POS) và mang đồng thời cả 3 gen trên (3POS).

3.4. Giá trị của kiểu gen trong chẩn đoán kiểu hình kháng beta-lactam

Bảng 2. Tương quan kiểu gen và kiểu hình của các chủng

ESBL	Dương tính		Âm tính		p
	Số lượng (n = 11)	Tỷ lệ %	Số lượng (n = 39)	Tỷ lệ %	
TEM	10	90,9	13	33,3	0,001
SHV	9	81,8	33	84,6	0,570
CTX-M	10	90,9	13	33,3	0,001
	Nhạy		Không nhạy		
CTX	Số lượng (n = 24)	Tỷ lệ %	Số lượng (n = 26)	Tỷ lệ %	
TEM	18	75%	5	19,2	0,001
SHV	20	83,3	22	84,6	0,601
CTX-M	19	79,2	4	15,4	0,001
CAZ	Số lượng (n = 27)	Tỷ lệ %	Số lượng (n = 23)	Tỷ lệ %	
TEM	20	74,1	3	13,0	0,001
SHV	23	85,2	19	82,6	0,552
CTX-M	21	77,8	2	8,7	0,001
FEP	Số lượng (n = 19)	Tỷ lệ %	Số lượng (n = 29)	Tỷ lệ %	
TEM	15	78,9	7	24,1	0,002
SHV	17	89,5	23	79,3	0,607
CTX-M	17	89,5	5	17,2	0,001

Nhận xét: Kết quả cho thấy gen TEM và CTX-M là các gen phân bố cao hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm các chủng vi khuẩn không còn nhạy với cephalosporin so với nhóm còn nhạy với $p < 0,01$.

Bảng 3. Giá trị của kiểu gen trong chẩn đoán kiểu hình kháng cephalosporin

Đặc điểm		Giá trị	Độ nhạy (%)	Độ đặc hiệu (%)	PPV* (%)	NPV** (%)
ESBL	TEM		90,9	66,7	43,5	96,3
	CTX-M		90,9	66,7	43,5	96,3
CTX	TEM		75,0	80,8	78,3	77,8
	CTX-M		79,2	84,6	82,6	81,5
CAZ	TEM		74,1	87,0	87,0	74,1
	CTX-M		77,8	91,3	91,3	77,8
FEP	TEM		78,9	75,9	68,2	84,6
	CTX-M		89,5	82,8	77,3	92,3

Ghi chú: (*) PPV giá trị tiên đoán dương tính; (**) NPV giá trị tiên đoán âm tính.

Nhận xét: Gen TEM và CTX-M có giá trị chẩn đoán kiểu hình sinh ESBLs và kháng sinh nhóm cephalosporin với độ nhạy từ 74,1% đến 90,9% và độ đặc hiệu từ 66,7% đến 91,3%.

4. Bàn luận

Các chủng *K. pneumoniae* kháng kháng sinh là một trong những tác nhân chính gây nhiễm khuẩn bệnh viện và NKH. Năm 2017, Tổ chức Y tế Thế giới đã xếp *K. pneumoniae* sinh ESBLs là một trong các chủng đa kháng thuốc ngang hàng các chủng *Acinetobacter baumannii* và *Pseudomonas aeruginosa* đa kháng thuốc. Một khảo sát ở Mỹ trong giai đoạn 2000 - 2015 cho thấy tỷ lệ các chủng *K. pneumoniae* sinh ESBLs và không ngừng gia tăng [6] và giao động phụ thuộc vào từng khu vực và vùng lãnh thổ khác nhau. Kết quả của chúng tôi gặp tỷ lệ chủng *K. pneumoniae* sinh ESBLs gây NKH là 22,0%; phù hợp với báo cáo về kháng kháng sinh (2017) trong nhiễm khuẩn ổ bụng, tỷ lệ chủng *K. pneumoniae* sinh ESBLs là 24,3% trong khu vực châu Á Thái Bình Dương, trong đó cao nhất là Thái Lan (36,5%) [7].

Tương tự với đặc điểm kháng kháng sinh nhóm penicillin và cephalosporin. Kết quả nghiên cứu cho thấy các chủng *K. pneumoniae* kháng cao với AM (84,4%), CAZ (54,0%) CTX (48,0%) và FEP 28,0%. Nghiên cứu KARMS (2013 - 2015) tại Hàn Quốc tỷ lệ chủng *K. pneumoniae* kháng với CTX tăng từ 38% đến 41% trong giai đoạn nghiên cứu [8]. Báo cáo SMART (2009 - 2011) về kháng kháng sinh với các chủng gây nhiễm khuẩn ổ bụng, tỷ lệ các chủng *K. pneumoniae* kháng với CTX, CAZ, FEP, CIP lần lượt tương ứng là 41,1%, 28,7%, 34,1%, 21,7% và còn nhạy cao với TZP (82,9%) và amikacin (88,4%) [9]. Kháng sinh cephalosporin phổ rộng được sử dụng rộng rãi trong bệnh nhiễm khuẩn do các vi khuẩn kháng thuốc và được sử dụng rộng rãi trong các cơ sở y tế ở các nước đang phát triển cũng như ở Việt Nam. Do đó các báo cáo đều ghi nhận tỷ lệ cao các chủng *K. pneumoniae* kháng cephalosporin.

Các nghiên cứu về gen mã hóa sinh ESBL gặp chủ yếu là họ gen CTX-M. Nghiên cứu SMART (2016) khảo sát các gen kháng kháng sinh của các chủng gây nhiễm khuẩn ổ bụng và nhiễm khuẩn tiết niệu trong giai đoạn 2008 - 2014 cho thấy, tỷ lệ các chủng *K. pneumoniae* mang gen CTX-M-15 cao 89,8% và 100% tương ứng ở New Zealand và Kazakhstan, tỷ lệ các chủng này mang gen CTX-M-15; CTX-M-14 và SHV-12 ở Việt Nam lần lượt là 48,0%, 20,6% và 15,7%, tỷ lệ ở các nước Đông Nam Á tương ứng là Philipines (74,6%, 0,8% và 13,6%); Singapore (75,7%, 5,4% và 6,8%) và Thái Lan (73,1%, 11,5% và 12,8%) [10]. Kết quả của chúng tôi gặp CTX-M 45,0%. Các báo cáo khác cho thấy họ gen CTX-M trở thành họ gen quan trọng và phổ biến trên thế giới cũng như trong khu vực Đông Nam châu Á.

Có nhiều họ gen mã hóa sinh beta-lactamase phổ rộng, tuy nhiên có ba họ gen quan trọng và được nghiên cứu nhiều nhất là họ gen TEM, SHV và CTX-M. Nghiên cứu của chúng tôi phân tích mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình kháng cephalosporin cho thấy rằng phân bố họ gen SHV là không có sự khác biệt giữa kiểu hình nhạy và không nhạy với các cephalosporin, trong khi đó họ gen TEM và CTX-M có tỷ lệ phân bố cao hơn có ý nghĩa của nhóm không nhạy so với nhóm còn nhạy với các kháng sinh cephalosporin. Như vậy, với các chủng *K. pneumoniae* gây NKH: Gen TEM và CTX-M có giá trị chẩn đoán kiểu hình sinh ESBLs và kháng sinh nhóm cephalosporin với độ nhạy từ 74,1% đến 90,9% và độ đặc hiệu từ 66,7% đến 91,3%. Một nghiên cứu sử dụng phương pháp giải trình tự toàn bộ bộ gen (WGS) trong xác định kháng beta-lactam phổ rộng của các chủng vi khuẩn Gram âm gây bệnh so sánh với dữ liệu sử dụng trên lâm sàng (vi sinh lâm sàng) và sử dụng phương pháp vi pha loãng (Broth Microdilution) làm chuẩn cho thấy: Độ nhạy; độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương tính và giá trị tiên đoán âm tính của phương pháp WGS lần lượt là 87%, 98%, 97% và 91%, cao hơn so với phương pháp vi sinh lâm sàng tương ứng là 82%, 95%, 92% và 88% [11].

Điều này cho thấy độ chính xác cao của WGS trong tiên đoán các chủng kháng kháng sinh là rất tốt và hứa hẹn việc ứng dụng phương pháp phân tử trong định hướng sử dụng kháng sinh trên lâm sàng. Tuy nhiên, giải trình tự bộ gen là kỹ thuật hiện đại, tiên tiến nhưng còn phức tạp và khó ứng dụng trong thực tế lâm sàng, đặc biệt ở các nước đang phát triển. Mặt khác với bệnh lý nhiễm khuẩn nặng như NKKH chúng ta có thể sử dụng các xét nghiệm có độ nhạy cao và cho kết quả sớm nhằm có định hướng sử dụng kháng sinh trong lâm sàng và bổ sung cho cấy máu và kháng sinh đồ trong thực hành lâm sàng. Như vậy, với việc sử dụng phương pháp đơn giản và lựa chọn các gen phù hợp với đặc điểm dịch tễ học phân tử của từng khu vực chúng ta có thêm các phương tiện thích hợp trên lâm sàng giúp định hướng sử dụng kháng sinh hợp lý.

5. Kết luận

Gen TEM và CTX-M là những gen có thể sử dụng trong chẩn đoán kiểu hình kháng cephalosporin ở các chủng *K. pneumoniae* gây nhiễm khuẩn huyết.

Tài liệu tham khảo

1. Paoli CJ et al (2018) *Epidemiology and costs of sepsis in the United States-An analysis based on timing of diagnosis and severity level*. Crit Care Med 46(12): 1889-1897.
2. Dagher GA et al (2015) *Descriptive analysis of sepsis in a developing country*. International journal of emergency medicine 8: 19-19.
3. Southeast Asia Infectious Disease Clinical Research N (2017) *Causes and outcomes of sepsis in southeast Asia: A multinational multicentre cross-sectional study*. The Lancet. Global health 5(2): 157-167.
4. D'Andrea MM et al (2013) *CTX-M-type beta-lactamases: A successful story of antibiotic resistance*. Int J Med Microbiol 303(6-7): 305-317.
5. Dellinger RP et al (2013) *Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012*. Crit Care Med 41(2): 580-637.
6. McDanel J et al (2017) *Incidence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli and Klebsiella infections in the United States: A systematic literature review*. Infect Control Hosp Epidemiol 38(10): 1209-1215.
7. Chang YT et al (2017) *Epidemiology and trends in the antibiotic susceptibilities of Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region, 2010 - 2013*. Int J Antimicrob Agents 49(6): 734-739.
8. Kim D et al (2017) *Increasing resistance to extended - spectrum cephalosporins, fluoroquinolone, and carbapenem in Ggram-negative bacilli and the emergence of carbapenem non-susceptibility in Klebsiella pneumoniae: Analysis of Korean antimicrobial resistance monitoring system (KARMS) data from 2013 to 2015*. Ann Lab Med 37(3): 231-239.
9. Biedenbach DJ et al (2014) *Antimicrobial susceptibility and extended-spectrum beta-lactamase rates in aerobic gram-negative bacteria causing intra-abdominal infections in Vietnam: Report from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART 2009 - 2011)*. Diagn Microbiol Infect Dis 79(4): 463-467.
10. Jean SS, Hsueh PR, and o.b.o.t.S.A.-P. Group (2016) *Distribution of ESBLs, AmpC β -lactamases and carbapenemases among Enterobacteriaceae isolates causing intra-abdominal and urinary tract infections in the Asia-Pacific region during 2008-14: Results from the study for monitoring antimicrobial resistancet Trends (SMART)*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 72(1): 166-171.
11. Shelburne SA et al (2017) *Whole-genome sequencing accurately identifies resistance to extended-spectrum beta-Lactams for major gram-negative bacterial pathogens*. Clin Infect Dis 65(5): 738-745.