

فراوانی ژن TEM در سویه‌های اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف جدا شده از شهرستان خرم آباد در سال ۱۳۹۲

آذین بهاروند احمدی^۱، دکتر غلامرضا گودرزی^{۲*}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبی شناسی، گروه میکروبی شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات گیلان، گیلان، ایران

۲. استادیار، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی و گروه میکروبی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بتالاکتامازهای وسیع الطیف واریانتهای آنزیمی جهش یافته‌ای هستند که عمدتاً از بتالاکتامازهای گستره اثر TEM_{1,2} و SHV₁ مشتق می‌شوند. این آنزیم‌ها دامنه‌ی اثر وسیعی دارند که باعث هیدرولیز همه‌ی سفالوسپورین‌ها، پنی‌سیلین‌ها و آزترونام می‌گردند. تنوع جغرافیایی قابل توجهی در شیوع این آنزیم‌ها در ایران وجود دارد. در مطالعه‌ی حاضر، حضور ژن TEM در بین جدایه‌های اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک ESBLs مثبت شهرستان خرم آباد در سال ۱۳۹۲ بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی مقطعی-توصیفی، ۲۰۰ جدایه اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک از بیمارستان‌های منتخب شهرستان خرم آباد جمع‌آوری و تعیین هویت گردید. غربالگری و تأیید فنوتیپی تولید ESBLs، بر اساس روش‌های پیشنهاد شده توسط مؤسسه‌ی استانداردهای آزمایشگاه و بالین انجام پذیرفت. فراوانی ژن TEM در بین جدایه‌های ESBLs مثبت به روش PCR تعیین گردید.

یافته‌ها: از مجموع ۲۰۰ اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک، ۹۱ (۴۵/۵٪) جدایه در روش انتشار از دیسک، تولیدکننده‌ی ESBLs بودند که در بین آنها، ۶۰ (۶۵/۹٪) جدایه به روش PCR حامل ژن TEM بودند.

نتیجه‌گیری: جدایه‌های اشریشیا کلی ESBLs مثبت و حمل‌کننده‌ی ژن TEM در شهرستان خرم، از فراوانی بالایی برخوردار است. این موضوع، یک تهدید جدی بوده و ممکن است منجر به شکست درمان گردد. حداقل در منطقه‌ی مورد مطالعه، کاربایپنم‌ها (مانند ایمی‌پنم)، می‌توانند به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی در حذف جدایه‌های اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک تولیدکننده‌ی ESBLs محسوب شوند. پیشنهاد می‌شود استراتژی بیمارستان‌ها در انجام روش‌های آزمایشگاهی برای ردیابی جدایه‌های ESBLs مثبت و سیاست تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها، به خصوص در موارد درمان تجربی، بازنگری شود.

واژگان کلیدی: PCR، اشریشیا کلی، TEM، بتالاکتامازهای وسیع الطیف

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Baharvand Ahmadi A, Goudarzi G. The occurrence of TEM gene among the extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) producing uropathogenic *Escherichia coli* strains, isolated from Khorramabad city, 2013. *Pejouhandeh* 2015;20(1):33-37.

مقدمه

عفونت مجاری ادراری (Urinary tract infection, UTI)، یکی از رایج‌ترین دلایل مراجعه‌ی بیماران به پزشک و همچنین یکی از مهم‌ترین علل عفونت‌های بیمارستانی است. هرچند فراوانی عوامل اتیولوژیک UTI در مناطق مختلف جهان متنوع است، اما به طور کلی، اشریشیا کلی شایع‌ترین

میکروارگانیزم جدا شده از مبتلایان به UTI می‌باشد (۱). این گروه از باکتری‌ها، اگرچه ممکن است منشأ روده‌ای داشته باشند، اما گاهی با کسب شاخص‌های ژنتیکی دخیل در بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، قابلیت اتصال و تهاجم به سلول‌های اپی‌تلیال ادراری (یوروپاتوژنیک) را کسب کرده‌اند (۱). آنتی‌بیوتیک‌هایی که غالباً برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری به کار می‌روند شامل آموکسی‌سیلین، سایر مشتقات نیمه‌صناعی پنی‌سیلین، برخی از سفالوسپورین‌ها، کاربایپنم‌ها، کوتریموکسازول، سیپروفلوکساسین، نیتروفوران‌توئین و آمینوگلیکوزیدها می‌باشند (۲).

* نویسنده مسؤؤل مکاتبات: دکتر غلامرضا گودرزی؛ گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران؛ تلفن: ۳۱۲۰۱۳۳ (۰۶۶۳)؛ پست الکترونیک: Goudarzi.gh@gmail.com

کلیه‌ی جدایه‌ها، با استفاده از روش‌های استاندارد بیوشیمیایی از جمله تست‌هایی چون سیمون سترات، MR، VP، TSI، SIM، تعیین هویت نهایی شدند (۷). حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها، به روش انتشار از دیسک (کربی - بائر) در محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) و بر اساس دستورالعمل‌های CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) تعیین گردید. نتایج آنتی‌بیوگرام پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از جداول CLSI قرائت گردید (۸). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده در این مطالعه شامل ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) و نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم) از شرکت Mast انگلیس با واسطه‌ی شرکت تجاری میکروبی شناسی راین تهیه گردیدند.

تمامی جدایه‌ها، مورد آزمایش غربال‌گری تولید ESBLs قرار گرفتند. در این روش، از سوسپانسیون باکتریایی با کدورتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند، جدایه‌های مقاوم به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین نسل سوم، روی محیط مولر هینتون آگار، کشت چمنی داده شد. سپس دو دیسک سفتازیدیم، سفوتاکسیم به طور جداگانه و همچنین دو دیسک ترکیبی از آنها با کلانولانیک اسید شامل سفتازیدیم/کلانولانیک اسید و سفوتاکسیم/کلانولانیک اسید، روی محیط کشت قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله‌ی عدم رشد در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد. در صورتی که اختلاف قطر هاله‌ی عدم رشد اطراف حداقل یکی از دیسک‌های ترکیبی حاوی کلانولانیک اسید نسبت به دیسک فاقد کلانولانیک اسید، بزرگتر یا مساوی ۵ میلی‌متر بود، جدایه‌ی مورد نظر به عنوان فنوتیپ ESBLs مثبت در نظر گرفته می‌شد (۸).

قبل از استخراج DNA، جدایه‌های دارای فنوتیپ ESBLs مثبت، در محیط LB (Luria bertani) کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت، انکوبه شدند. DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت AccuPrep DNA Extraction (Bioneer, Korea) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج شد. همچنین، DNA سویه اشریشیا کلی اهدایی دکتر علی ناظمی (گروه ژنتیک دانشگاه آزاد واحد تنکابن) نیز به عنوان کنترل مثبت (واجد ژن TEM) و سویه اشریشیا کلی ATCC 25922 نیز به عنوان کنترل منفی (فاقد ژن TEM) استخراج گردید.

کشف و گسترش آنتی‌بیوتیک‌های جدید و رواج استفاده از آنها در درمان بیماری‌های عفونی، باعث به وجود آمدن مقاومت‌های باکتریایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. مکانیسم‌های مقاومت باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها متفاوت است. یکی از شایع‌ترین این مکانیسم‌ها، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است که موجب هیدرولیز حلقه‌ی بتالاکتام و غیر فعال شدن دارو می‌گردند (۳،۴).

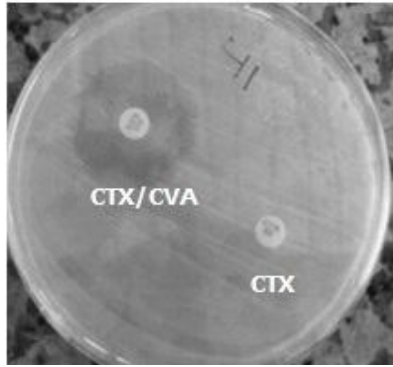
برای نخستین بار در سال ۱۹۶۹، بتالاکتاماز TEM1 از شایع‌ترین شهر آتن گزارش شد. امروزه TEM1 از شایع‌ترین بتالاکتامازها در خانواده‌ی انتروباکتریاسه بوده و عامل بیش از ۹۰ درصد مقاومت به آمپی‌سیلین می‌باشد. طولی نکشید که موتاسیون‌های نقطه‌ای در ناحیه‌ی فعال آنزیم‌های TEM1 و TEM2 باعث استخلاف اسیدهای آمینه‌ی جدید در این ناحیه گردید و واریانت‌های نوظهوری از TEM را به وجود آورد که متأسفانه طیف اثر آنها گسترده‌تر شد و قابلیت هیدرولیز سفالوسپورین‌های وسیع الطیف را نیز پیدا کردند. بر همین اساس، این دسته از بتالاکتامازها را "بتالاکتامازهای وسیع الطیف" یا ESBLs (Extended-spectrum beta-lactamases) می‌نامند (۵،۶).

امروزه بتالاکتامازها را بر اساس عملکرد در گروه‌های مختلف (۴-۱) و بر اساس ساختار ملکولی و توالی اسیدهای آمینه، به چهار کلاس A تا D طبقه‌بندی می‌کنند که بر این مبنای، ESBLs در گروه 2be و همچنین کلاس A قرار می‌گیرند (۶).

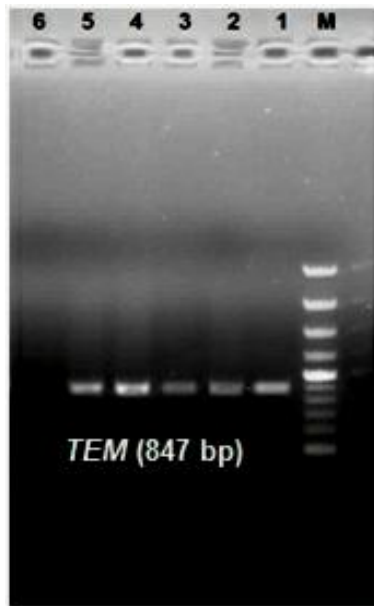
انجام مطالعات متعدد در راستای تعیین ژنوتایپ‌های مسبب تولید ESBLs در ایران و سایر کشورها، نشان‌دهنده‌ی اهمیت اپیدمیولوژی این آنزیم‌ها در هر منطقه می‌باشد. با توجه به عدم وجود اطلاعات مستند در خصوص فراوانی این آنزیم‌ها و همچنین حضور ژن TEM در بین جدایه‌های اشریشیا کلی شهرستان خرم‌آباد، تعیین فراوانی ESBLs و همچنین ژن TEM در بین اشریشیاکلی‌های یوروپاتوژنیک جدا شده از بیمارستان‌های شهرستان خرم‌آباد در سال ۱۳۹۲، هدف از انجام این مطالعه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه‌ی توصیفی-مقطعی، ۲۰۰ جدایه اشریشیا کلی به‌دست آمده از ادار مبتلایان به عفونت مجاری ادراری (اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک) مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های منتخب شهرستان خرم‌آباد (شهدای عشایر و شهید رحیمی) طی یک دوره‌ی یک ساله در سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری شد.



شکل ۱. ردیابی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) به روش دیسک ترکیبی. CTX: سفوناکسیم، CTX: سفوناکسیم، CVA: کلوالانیک اسید.



شکل ۲. آگارز ژل الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن TEM. M، DNA مارکر ۱۰۰ bp؛ ستون ۱، جدایه کنترل مثبت (واجد ژن TEM اهدایی آقای دکتر ناظمی)؛ ستون‌های ۲ تا ۵، جدایه‌های اشریشیاکلی مورد آزمایش حاوی ژن TEM؛ ستون ۶، سویه کنترل منفی (فاقد ژن TEM، ATCC 25922).

بتالاکتاماز از جمله سفالوسپورین‌ها گسترش یافت (۱۰، ۱۱). پس از مدت کوتاهی از معرفی این آنتی‌بیوتیک‌ها، پلاسمیدهای حاوی ژن‌های مقاومت در اشریشیاکلی و دیگر اعضای خانواده‌ی انتروباکتریاسه، ردیابی شدند که اغلب حامل ژن‌های کدکننده‌ی کلاس A (از جمله TEM و SHV) بتالاکتامازی بودند (۱۲). امروزه وجود بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در باکتری‌ها به یک معضل مهم درمانی در بیشتر کشورها تبدیل شده است، به طوری که در حال حاضر، گزارش‌های متنوعی مبنی بر فراگیر شدن این آنزیم‌ها در سراسر دنیا (اروپا، امریکای جنوبی، آسیا و آفریقا) منتشر شده است (۱۵-۱۲). در این راستا، مطالعات متنوعی نیز در نقاط

توالی الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده در تکثیر ژن TEM در جدول ۱ نشان داده شده است (۹). واکنش PCR، با حضور ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۲/۵ میکرولیتر بافر X ۱۰، ۲ میلی‌مولار MgCl₂، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۲۰۰ نانوگرم DNA الگو، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (Gene Fanavaran) و تا حجم ۲۵ میکرولیتر آب مقطر، انجام گرفت. تکثیر ژن مذکور، در دستگاه ترمال سایکلر (Mycycler, BioRad) با شرایط زیر بهینه گردید: دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت، تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. پس از تکثیر، ۵ میکرولیتر از محصولات PCR با ۱ میکرولیتر بافر لودینگ مخلوط و پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪، با ژل رد رنگ آمیزی گردید.

جدول ۱. توالی اولیگونوکلئوتیدهای تکثیرکننده‌ی ژن TEM.

اندازه	توالی پرایمر	ژن
847 bp	5'- ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG-3'	TEM
	5'-CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA-3'	

یافته‌ها

از مجموع ۲۰۰ جدایه‌ی یوروباتونژن مورد آزمایش، ۱۲۸ (۶۴٪) جدایه مقاوم به نالیدیکسیک اسید، ۷۲ (۳۶٪) جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۷۰ (۳۵٪) جدایه مقاوم به سفوناکسیم و ۶۰ (۳۰٪) جدایه مقاوم به سفنازیدیم بودند در حالی که هیچ‌گونه مقاومتی نسبت به ایمی‌پنم مشاهده نشد. همچنین، ۲۴ (۱۲٪) ایزوله، مقاومت چهارگانه‌ای نسبت به سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، سفوناکسیم و سفنازیدیم از خود نشان دادند. از طرفی، ۲۰ (۱۰٪) ایزوله، همزمان به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. از میان ۲۰۰ جدایه اشریشیاکلی، ۹۱ (۴۵/۵٪) جدایه مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بودند (شکل ۱). از بین جدایه‌های مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، ۶۰ (۶۵/۹٪) جدایه، حامل ژن TEM بودند (شکل ۲).

بحث

آنزیم‌های بتالاکتاماز، سیستم دفاعی اصلی باکتری‌های گرم منفی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز هستند. ظهور آنزیم‌های بتالاکتاماز، با افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌های

خود محدودیتی در عمل ایجاد می‌کند، اما در مراکز که شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی قابل ملاحظه است، به منظور جلوگیری از گسترش جدایه‌های مقاوم، تعیین الگوی مقاومت به صورت فنوتیپی و ژنوتیپی، ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه و برخی از مطالعات دیگر، مشخص شده که ایمی‌پنم داروی مناسبی برای درمان عفونت‌های ناشی از اشریشیا کلی‌های تولیدکننده ESBLs می‌باشد، زیرا مقاومت چندانی به دارو دیده نشده است (۱۶، ۱۷، ۱۹). با این وجود، ظهور کاربامپنمازها در بین جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه (KPC) را نباید نادیده گرفت، چرا که انتقال ژن‌های مقاومت به کاربامپنمازها از طریق این جنس (انتقال افقی عناصر ژنتیکی) به سایر جنس‌ها و گونه‌ها در مصرف بی‌رویه‌ی این دارو، محتمل است (۲۳). اگر چه این مطالعه برای نخستین بار، فراوانی ژن TEM را در شهرستان خرم آباد گزارش می‌کند، اما حجم نمونه‌ی محدود (تعداد و گستره‌ی جغرافیایی)، عدم تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) برای برخی از سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف بر روی جدایه‌ها، و همچنین عدم بررسی سایر ژن‌های دخیل در ایجاد فنوتیپ ESBLs مثبت (SHV، CTX-M، و غیره)، از محدودیت‌های این مطالعه بود. با افزایش روند مقاومت‌های دارویی، پیشنهاد می‌شود که در مراکز بهداشتی و درمانی، برای جدایه‌های دارای مقاومت نسبت به یکی از سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف (نسل سوم)، علاوه بر انجام تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی معمول، آزمایش تأیید فنوتیپ ESBLs و در صورت امکان، تعیین ژن‌های دخیل در ایجاد مقاومت به کمک روش‌های مولکولی انجام پذیرد تا بتوان بهترین راهکار درمان عفونت‌ها را در کمترین زمان و با کمترین هزینه انتخاب کرد. همچنین، شستشوی دست‌ها، جداکردن و درمان کامل بیماران کلونیزه شده با جدایه‌های مقاوم، در کاهش گسترش ایزوله‌های مقاوم، به سایر بیماران و دیگر بخش‌های بیمارستان، مؤثر خواهد بود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با هزینه و همکاری معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی لرستان انجام پذیرفته است. لذا نویسندگان، صمیمانه از زحمات آن معاونت و تمامی کارشناسان و همکاران پژوهشی، تشکر و قدردانی می‌کنند.

مختلف ایران انجام گرفته است. در مطالعه‌ی ما، شیوع جدایه‌های تولیدکننده‌ی ESBLs در شهرستان خرم آباد ۴۵/۳۳٪ گزارش شد که با نتایج سایر مطالعات، از جمله مطالعه‌ی یزدی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در تهران (۴۴/۳٪)، شاهچراغی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در تهران (۵۲/۵٪) و سلطان دلال در سال ۲۰۱۰ در تهران (۶۴٪) همخوانی دارد (۹، ۱۷، ۱۶). بر خلاف نتایج ما، ریاحی زنیانی و همکاران در مشهد در سال ۲۰۱۲، فراوانی اشریشیا کلی‌های تولیدکننده‌ی ESBLs (۶۲/۱۵٪) را کمتر گزارش کردند (۱۸). همچنین مبین و همکاران (۲۰۰۹) در تبریز، شیوع اشریشیا کلی‌های تولیدکننده‌ی ESBLs را ۹۳/۷٪ گزارش کردند (۱۹). به طور قابل توجهی، در مطالعه‌ی گودرزی و همکاران در سال ۲۰۱۳، در شهرستان دلفان لرستان (همجوار شهرستان خرم آباد)، فراوانی اشریشیا کلی‌های ESBLs مثبت (۸۰٪) بیشتر از مطالعه‌ی حاضر بود (۲۰). در سایر مناطق دنیا نیز شیوع جدایه‌های ESBLs مثبت از یک کشور به کشور دیگر، متفاوت گزارش شده است. به عنوان مثال، در سال ۲۰۰۷ در مطالعه‌ی Ho و همکاران در هنگ‌کنگ، از ۴۶ جدایه اشریشیا کلی، ۸ جدایه مولد ESBLs بودند (۲۱). این میزان، در مطالعه‌ی مشابه در فرانسه در سال ۲۰۰۸، ۹/۴٪ گزارش شده است (۲۲). نتایج PCR در مطالعه‌ی حاضر نشان داد از میان ۹۱ جدایه تولیدکننده‌ی ESBLs شهرستان خرم‌آباد، ۶۰ (۶۵/۹٪) جدایه حاوی ژن TEM بودند. یزدی و همکاران در تهران در سال ۲۰۱۰، شیوع ژن‌های TEM را ۸۷/۱٪ گزارش کردند (۹). همچنین، مبین و همکاران در تبریز، فراوانی TEM را ۸۷/۵٪ گزارش کردند (۱۹). نتایج مطالعه‌ی حاضر و دیگر مطالعات انجام شده، نشان می‌دهند که فراوانی جدایه‌های اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک در استان لرستان و در کل ایران، نسبت به بسیاری از کشورها بالاتر است. از جمله دلایل گسترش آنزیم‌های بتالاکتاماز، می‌توان به مواردی چون الگوی نامناسب و نابجای مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، عدم جداسازی بیماران کلونیزه شده با جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از سایر بیماران، عدم غربال‌گری آزمایشگاهی جدایه‌های مولد ESBLs و در نهایت، گسترش کلون‌های مقاوم از یک بیمارستان به بیمارستان دیگر و از یک ناحیه به ناحیه‌ی دیگر، اشاره کرد. هرچند هزینه‌ی تحقیق و بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، نسبتاً بالاست و این

REFERENCES

1. Wagenlehner FME, Naber KG. Antibiotics and resistance of uropathogens. EAU Update 2004; Series 2: 125-35.
2. Diana SB, Fortino SS, Antenio AS, Rafael CJ, Patricia AB. Resistance of uropathogenic bacteria to first-line antibiotics in Mexico City. Curr Res Clin 2007; 68: 120-6.

3. Majiduddin FK, Palzkill T. Amino acid residues that contribute to substrate specificity of class A β -lactamase SME-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(8): 3421-7.
4. Shannon K, Phillips I. The effects on beta-lactam susceptibility of phenotypic induction and genotypic derepression of beta-lactamase synthesis. *J Antimicrob Chemother* 1986; Suppl E: 15-22.
5. Bush K, Jackobi GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-33
6. Bush K, Jackobi GA, Medeiros AA. Updated functional classification of β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3): 969-76.
7. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Woods GL. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006: 211-38.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; M100-S20. CLSI document 2010; 30(1): 27-44.
9. Yazdi M, Nazemi A, Mir Inargasi M, Khataminejad MR, Sharifi SH, Babai Kochkaksaraei M. Prevalence of SHV/CTX-M/TEM (ESBL) Beta-lactamase resistance genes in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Tehran, Iran. *Med Lab J* 2010; 4: 120-4. (Full Text in Persian)
10. Masjedian GF, Valehi F, Talebi, Rastegar Lari A. Molecular evaluation of resistance to expanded antibiotics in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Med Microbiol* 2007; 1: 27-34. (Full Text in Persian)
11. De Champs C, Sirot D, Chanal C, Bonnet R, Sirot J. A 1998 survey of extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in France. The French Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3177-9.
12. Skippen I, Shemko M, Turton J, Kaufmann ME, Palmer C, Shetty N. Epidemiology of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp*: a nested case-control study from a tertiary hospital in London. *J Hosp Infect* 2006; 64:115-23.
13. Pitout DD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, Sanders CC. Beta-lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1350-4.
14. Oliver A1, Pérez-Díaz JC, Coque TM, Baquero F, Cantón R. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 616-20.
15. Zeba B, Simpoire J, Nacoulma OG, Frere JM. Identification of metallo-beta-lactamase from a clinical isolate at Saint Camille Hospital Center of Ouagadougou/Burkina Faso. *Afr J Biotechnol* 2005; 4: 286-9.
16. Shahcheraghi F, Nasiri S, Noveiri H. The survey of genes encoding beta-lactamases, in *Escherichia coli* resistant to beta-lactam and non-beta-lactam antibiotics. *Iran J Basic Med Sci* 2010; 13: 230-7.
17. Soltan Dallal MM, Molla Aghamirzaei H, Fallah Mehrabadi J, Rastegar Lari A, Eshraghiyan MR, Fard Sanei A, *et al*. Molecular detection of TEM and AmpC (Dha, mox) broad spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Tehran Univ Med J (TUMJ)* 2010; 68: 872-7.
18. Riyahi Zaniani F, Meshkat Z, Naderi Nasab M, Khaje-Karamadini M, Ghazvini K, Rezaee A, *et al*. The prevalence of TEM and SHV genes among extended-spectrum beta lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Basic Med Sci* 2012; 15: 654-60.
19. Mobayyen H, Nahaie MR, Pornour M, Mobasher A, Sadeggy J. The Prevalence of TEM gene among extended-spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* in Imam Reza Hospital in Tabriz, Iran. *Iran J Med Microbiol* 2009; 1: 33-9.
20. Goudarzi G, Momeni Mofrad S, Shakib P. The prevalence of extended-spectrum betalactamases among uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Ibn Sina Hospital of Delfan, Lorestan. *Yafteh* 2014; 16:17-23.
21. Ho PL, Wong RC, Chow KH, Yip K, Wong SS, Que TL. CTX-type beta- lactamases among fecal *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in non-hospitalized children and adults. *J Microbiol Immunol Infect* 2008; 41: 428-32.
22. Bonnedahl J, Drobni M, Gauthier-Clerc M, Hernandez J, Granholm S, Kayser Y, *et al*. Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M Type ESBL between Humans and Yellow-Legged Gulls in the South of France. *PLoS One* 2009; 4: e5958.
23. Robledo IE, Aquino EE, Va'zquez GJ. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 2968-70.