

فراوانی ژن *TEM* در سویه‌های اشريشيا کلی يوروپاتوژنيک مولد آنزيم‌هاي بتالاكتاماز وسیع الطیف جدا شده از شهرستان خرم آباد در سال ۱۳۹۲

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

- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات گیلان، گیلان، ایران
- استادیار، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی و گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بتالاكتاماز‌های وسیع‌الطیف واریانت‌های آنزیمی جهش‌یافته‌ای هستند که عمدتاً از بتالاكتاماز‌های گستره‌اثر TEM1,2 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 اشريشيا کلی يوروپاتوژنيک ESBLs مثبت شهرستان خرم آباد در سال ۱۳۹۲ بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی مقطعی-توصیفی، ۲۰۰ جدایه اشريشيا کلی يوروپاتوژنيک 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 اشريشيا کلی يوروپاتوژنيک، 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 اشريشيا کلی يوروپاتوژنيک 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، کارباپن‌ها (مانند ایمی‌پنم)، می‌توانند به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی در حذف جدایه‌های اشريشيا کلی يوروپاتوژنيک 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.

وازگان کلیدی: PCR، اشريشيا کلی، TEM، بتالاكتاماز‌های وسیع‌الطیف

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.

میکروارگانیسم 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 اپی‌تیلیال ادراری (يوروپاتوژنيک) را کسب کرده‌اند (۱). آنتی‌بیوتیک‌هایی که غالباً برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری به کار می‌روند شامل آموکسی‌سیلین، سایر مشتقات نیمه صناعی پنی‌سیلین، برخی از سفالوسپورین‌ها، کارباپن‌ها، کوتیریموکسازول، سیپروفلوکساسین، نیتروفورانتوئین و آمینوگلیکوزیدها می‌باشند (۲).

مقدمه

عفونت مجرای 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، اشريشيا کلی شایع‌ترین

*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر غلامرضا گودرزی؛ گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران؛ تلفن: ۳۱۲۰۱۳۳ (۳۰۶۳)، پست الکترونیک: Goudarzi.gh@gmail.com

شیوع ژن *TEM* در بین سویه‌های اشريشيا کلی یوروپاتوژنیک

کلیه‌ی جدایه‌ها، با استفاده از روش‌های استاندارد بیوشیمیایی از جمله تست‌هایی چون سیمون سیترات، TSI، VP، MR، SIM، تعیین هویت نهایی شدند (۷). حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها، به روش انتشار از دیسک (کربی-بائز) 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 ایمپنی (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) و نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم) از شرکت Mast با واسطه‌ی شرکت تجاری میکروب شناسی راین تهیه گردیدند.

تمامی جدایه‌ها، مورد آزمایش غربال‌گری تولید ESBLs قرار گرفتند. در این روش، از سوسپانسیون باکتریایی با کدورتی معادل ۰/۵ مکفارلنند، جدایه‌های مقاوم به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین نسل سوم، روی محیط مولرهینتون آگار، کشت چمنی داده شد. سپس دو دیسک سفتازیدیم، سفوتاکسیم به طور جداگانه و همچنین دو دیسک ترکیبی از آنها با کلاولانیک اسید شامل سفتازیدیم/کلاولانیک اسید و سفوتاکسیم/کلاولانیک 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 کلاولانیک اسید نسبت به دیسک فاقد کلاولانیک 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 Luria bertani LB (Luria bertani) کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت، انکوبه شدند. AccuPrep DNA Extraction (Bioneer, Korea) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج شد. همچنین، DNA سویه اشريشيا کلی اهدایی دکتر علی ناظمی (گروه ژنتیک دانشگاه آزاد واحد تنکابن) نیز به عنوان کنترل مثبت (واجد ژن *TEM*) و سویه اشريشيا 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 مقاومت‌هایی 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 می‌گردد (۴،۳).

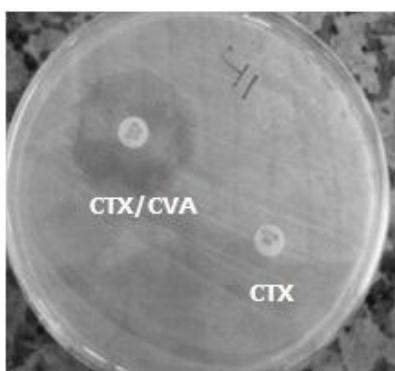
برای نخستین بار در سال ۱۹۶۹، بتالاکتاماز TEM1 از شهر آتن گزارش شد. امروزه TEM1 از شایع‌ترین بتالاکتامازها در خانواده‌ی انتروباکتریاسه بوده و عامل بیش از ۹۰ درصد مقاومت به آمپی‌سیلین می‌باشد. طولی نکشید که موتاسیون‌های نقطه‌ای در ناحیه‌ی فعال آنزیم‌های TEM1 و TEM2 باعث استخلاف اسیدهای آمینه‌ی جدید در 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" Extended-spectrum beta- ESBLs یا "وسیع الطیف" (lactamases) می‌نامند (۵،۶).

امروزه بتالاکتامازها را بر اساس عملکرد در گروه‌های مختلف (۱-۴) 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).

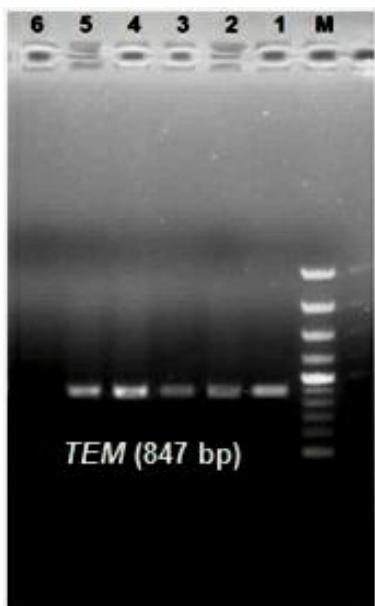
انجام مطالعات متعدد در راستای تعیین ژنوتاپ‌های مسبب تولید ESBLs در ایران و سایر کشورها، نشان‌دهنده‌ی اهمیت اپیدمیولوژی این آنزیم‌ها در هر منطقه می‌باشد. با توجه به عدم وجود اطلاعات مستند در خصوص فراوانی این آنزیم‌ها و همچنین حضور ژن *TEM* در بین جدایه‌های اشريشيا کلی شهرستان خرم آباد، تعیین فراوانی ESBLs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

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی- مقطعي، ۲۰۰ جدایه اشريشيا کلی به دست آمده از اداره مبتلایان به عفونت محاری اداری (اشريشيا کلی یوروپاتوژنیک) مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های منتخب شهرستان خرم آباد (شهدای عشاير 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: سفووتاکسیم، CVA: سفووتاکسیم، کلاولانیک اسید.



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

بتالاکتام از جمله سفالوسپورین‌ها گسترش یافت (۱۰، ۱۱). پس از مدت کوتاهی از معرفی این آنتی بیوتیک‌ها، پلاسمیدهای حاوی ژن‌های مقاومت در اشريشياکلي و دیگر اعضای خانواده انترباکتریاسه، ردیابی شدند که اغلب حامل ژن‌های کدکننده کلاس A (از جمله TEM و SHV) بتالاکتامازی بودند (۱۲). امروزه وجود بتالاکتامازهای وسیع الطیف در باکتری‌ها به یک معضل مهم درمانی در بیشتر کشورها تبدیل شده است، به طوری که در حال حاضر، گزارش‌های متنوعی مبنی بر فرآگیر شدن این آنزیم‌ها در سراسر دنیا (اروپا، امریکای جنوبی، آسیا و آفریقا) منتشر شده است (۱۳-۱۵). 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_{۱،۰۰} میلی‌مولار MgCl_۲، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۲۰۰ نانوگرم Taq DNA polymerase الگو، ۱ واحد آنزیم Gene Fanavarان (Mycycler، BioRad) با شرایط زیر بهینه گردید: دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمراهای در ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، تکثیر در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت، تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. پس از تکثیر، ۵ میکرولیتر از محصولات PCR با ۱ میکرولیتر بافر لودینگ مخلوط و پس از الکتروفوروز روی ژل آگارز ۱٪، با ژل رد رنگ آمیزی گردید.

جدول ۱. توالی اولیگونوکلئوتیدهای تکثیرکننده ژن TEM.

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

یافته‌ها

از مجموع ۲۰۰ جدایه‌ی یوروپاتوژن مورد آزمایش، ۱۲۸ (۶۴٪) جدایه مقاوم به نالیدیکسیک اسید، ۷۲ (۳۶٪) جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۷۰ (۳۵٪) جدایه مقاوم به سفووتاکسیم و ۶۰ (۳۰٪) جدایه مقاوم به سفتازیدیم بودند در حالی که هیچ گونه مقاومتی نسبت به ایمپنم مشاهده نشد. همچنین، ۲۴ (۱۲٪) ایزوله، مقاومت چهارگانه‌ای نسبت به سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، سفووتاکسیم و سفتازیدیم از خود نشان دادند. از طرفی، ۲۰ (۱۰٪) ایزوله، همزمان به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. از میان ۲۰۰ جدایه اشريشيا کلی، ۹۱ (۴۵٪) جدایه مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف بودند (شکل ۱). از بین جدایه‌های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف، ۶۰ (۳۰٪) جدایه، حامل ژن TEM بودند (شکل ۲).

بحث

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

خود محدودیتی در عمل ایجاد می‌کند، اما در مراکزی 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 ایمپنیم داروی مناسبی برای درمان عفونت‌های ناشی از اشريشیا کلی‌های تولیدکننده‌ی ESBLs می‌باشد، زیرا مقاومت چندانی به دارو دیده نشده است (۱۶، ۱۷، ۱۹). با این وجود، ظهور کارباپنمازها در بین جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه (KPC) را نباید نادیده گرفت، چرا که انتقال ژن‌های مقاومت به کارباپنمازها از طریق این جنس (انتقال افقی عناصر ژنوتیکی) 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 خرم‌آباد گزارش می‌کند، اما حجم نمونه‌ی محدود (تعداد و گستره‌ی جغرافیایی)، عدم تعیین حداقل غلظت مهارکننده‌ی (MIC) برای برخی از سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف بر روی جدایه‌ها، و همچنین عدم بررسی سایر ژن‌های دخیل در ایجاد فنوتیپ ESBLs مثبت (CTX-M SHV 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 ایزووله‌های 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 نویسنده‌گان، صمیمانه از زحمات آن معاونت و تماسی کارشناسان و همکاران پژوهشی، تشکر و قدردانی می‌کنند.

مختلف ایران انجام گرفته است. در مطالعه‌ی ما، شیوع جدایه‌های تولیدکننده‌ی ESBLs در شهرستان خرم‌آباد 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، ۱۶، ۱۷). بر خلاف نتایج ما، ریاحی زنیانی و همکاران در مشهد در سال ۲۰۱۲، فراوانی اشريشیا کلی‌های تولیدکننده‌ی ESBLs (۶۲/۱۵٪) را کمتر گزارش کردند (۱۸). همچنین مبین و همکاران (۰۰/۹٪) در تبریز، شیوع اشريشیاکلی‌های 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 خرم‌آباد)، فراوانی اشريشیا 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 H0 و همکاران در هنگ‌کنگ، از ۴۶ جدایه اشريشیا 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 اشريشیا کلی بوروپاتوزنیک در استان لرستان و در کل ایران، نسبت به بسیاری از کشورها بالاتر است. از جمله دلایل گسترش آنژیم‌های 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

- Wagenlehner FME, Naber KG. Antibiotics and resistance of uropathogens. EAU Update 2004; Series 2: 125-35.
- 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 -lactamases. *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, Simpore J, Nacoulma OG, Frere JM. Identification of metallo-beta-lactamase from a clinical isolate at Saint Camilile 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, Pournour 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 pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 2968-70.