

شیوع ژن های مقاومت بتا لاکتامازی SHV/CTX-M/TEM در اشرشیا کلی جدا شده از عفونت ادراری در شهر تهران

چکیده

زمینه و هدف: آنزیم های بتا لاکتامازی، مهمترین عامل مقاومت به آنتی بیوتیک های خانواده بتا لاکتام در میان باکتری های گرم منفی می باشد. امروزه شاهد افزایش روز افزون عفونت های ناشی از آن ها در جهان هستیم که این امر به عنوان یکی از مشکلات بهداشتی درمانی نو ظهور در سطح دنیا مطرح شده اند. هدف از انجام این تحقیق بررسی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک های بتا لاکتام و تحقیق پیرامون وجود ژن های بتا لاکتاماز bla_{SHV} ، bla_{TEM} ، bla_{CTX-M} در نمونه های ادراری *E. coli* می باشد.

روش بررسی: تعداد 246 ایزوله *E. coli* جدا شده از نمونه های ادراری در شهر تهران طی سال 1388-89 مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین مقاومت نمونه ها، تست آنتی بیوگرام با روش *Disk diffusion* صورت گرفت آنتی بیوتیک های تحت بررسی عبارت بودند از: سفوتاکسیم، سفنازیدیم، ایمپنم، نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین (*Mast*). از روش *combined disk test* جهت انجام تست تائیدی استفاده گردید. نتایج با استانداردهای (*CLSI Clinical and laboratory standards institute*) مقایسه و در نهایت ایزوله های *ESBL* مثبت، توسط روش *PCR* از نظر ژن های bla_{SHV} ، bla_{CTX-M} ، bla_{TEM} مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: از 246 ایزوله مورد بررسی 116 (47/1%) ایزوله مقاوم به سفنازیدیم و 96 (39/2%) ایزوله مقاوم به سفوتاکسیم بودند. همچنین 109 (44/3%) ایزوله مولد *ESBL* بودند. ژن ها bla_{TEM} ، bla_{SHV} ، bla_{CTX-M} به ترتیب در 95 (87/1%)، 75 (68/8%) و 77 (70/6%) ایزوله های *ESBL* یافت شد. (36/6%) 40 نمونه حاوی هر سه ژن مورد نظر بودند. علاوه بر این 68 (62/3%) نمونه واجد دو ژن bla_{SHV} و bla_{TEM} ، (55/9%) 61 نمونه واجد دو ژن bla_{CTX-M} و bla_{TEM} و (49/5%) 54 نمونه واجد دو ژن bla_{SHV} ، bla_{CTX-M} بودند.

نتیجه گیری: با توجه به درصد بالای مقاومت به سفالسپورین های نسل سوم، انجام دقیق تست های آنتی بیوگرام قبل از تجویز آنتی بیوتیک در عفونت های ناشی از ارگانیسم های تولید کننده *ESBL*، یک ضرورت اجتناب ناپذیر است.

واژه های کلیدی: بتا لاکتاماز وسیع الطیف، اشرشیا کلی، عفونت ادراری، SHV ، $CTX-M$ ،

TEM

مها یزدی

دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد واحد تنکابن.

علی ناظمی

استادیار، گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

میر ساعد میری نرگسی

استادیار، گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

محمد رضا خاتمی نژاد

استادیار، گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

شهر آشوب شریفی

دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی پزشکی، دانشکده بیولوژی پزشکی، دانشگاه آنکارا، ترکیه

مایا بابایی کوچکسرائی

دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد واحد تنکابن.

نویسنده مسئول: علی ناظمی

تلفن: 09126051565

پست الکترونیک:

alinazemy@yahoo.com

آدرس: تنکابن، خیابان جمهوری جنب پمپ بنزین

پلاک 351

وصول مقاله: 89/12/25

اصلاح نهایی: 90/2/5

پذیرش مقاله: 90/2/5

مقدمه

استراتژی های مختلفی توسط باکتری ها به کار گرفته می شود تا از اثرات زیان بار آنتی بیوتیک ها مصون بمانند یکی از مهمترین این مکانیسم ها، که در باکتری های گرم منفی علیه آنتی بیوتیک های بتالاکتام به کار گرفته می شود تولید آنزیم های بتالاکتامازی Beta-lactamase-enzymes می باشد (1). این آنزیم ها از طریق هیدرولیز هسته مرکزی درآنتی بیوتیک های بتالاکتام باعث غیر فعال شدن آن ها می شوند. پیدایش آنتی بیوتیک های جدید از قبیل سفالسپورینی های وسیع الطیف، از ترئونام ها و رواج استفاده از آن ها در درمان بیماری های عفونی باکتریال منجر به بروز دسته جدیدی از این آنزیم ها به نام بتالاکتامازی وسیع الطیف شده است (2). در واقع بروز موتاسیون های نقطه ای در سکانس اسیدآمینو ای بتا لاکتامازهای اولیه TEM(1), TEM(2) باعث اشتقاق و پیدایش این آنزیم ها گردیده است (3و4). الگوهای مختلفی برای طبقه بندی بتالاکتامازها وجود دارد. یکی از این روش ها که عمدتاً از آن استفاده می شود، به وسیله بوش (Bush)، جاکوبی (jacoby) و مدیروس (Medevios)، ابداع شده است که براساس نوع سوبسترا، ممانعت کنندگی و خصوصیات فیزیکی نظیر وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک بتا لاکتامازها به چهار گروه یا چهار کلاس اصلی A, B, C, D طبقه بندی می شوند براساس این طبقه بندی، آنزیم های وسیع الطیف در گروه A قرار گرفته و شامل مشتقات آنزیم های موتاسیون یافته SHV, TEM می باشند (5و6). بتالاکتامازهای تیپ CTX-M به طور گسترده از طریق پلاسمیدهای حامل ESBL که فاقد TEM و SHV می باشند منتشر گردید و برای اولین بار در اواخر دهه 1980 در اروپا گزارش شد (7و8). مقاومت باکتری گرم منفی به آنتی بیوتیک های بتالاکتام وسیع الطیف در دو دهه ی گذشته به سرعت گسترش یافت این مقاومت به طور عمده به پلاسمیدهای حاوی ESBLs نسبت داده می شود (9). تا به امروز حدود بیش از 200 نوع ESBLs در دنیا کشف شده

که اکثر آن ها در خانواده انتروباکتریاسه دیده شده اند (10).

این مسئله به عنوان یکی از بحران های موجود در درمان عفونت های ناشی از این باکتری ها مطرح است. انتقال وانتشار سریع ارگانیزم های که قادر به تولید آنزیم های مذکور هستند باعث بالا رفتن میزان عفونت های بیمارستانی مربوطه در سراسر دنیا شده است (11). اشرشیاکلی یکی از باکتری هایی است که قادر به تولید آنزیم های ESBL می باشد. این باکتری عضو اصلی خانواده انتروباکتریاسه و عامل بسیاری از عفونت های بیمارستانی از قبیل سپسیس، گاسترو انتریت، مننژیت نوزادی و بالاخص عفونت ادراری شناخته شده است (12). لذا بررسی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی و تحقیق پیرامون ژن های بتالاکتامازی در نمونه های اداری E.coli به عنوان اهداف این تحقیق لحاظ شده است.

در یک دوره 8 ماهه از بهمن ماه 1388 تا شهریور ماه 1389 تعداد 444 نمونه ادراری از بیمارستان های تهران (بیمارستان علی اصغر، بهرامی، مفید، بوعلی) جمع آوری شدو به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه ازاد اسلامی واحد تنکابن انتقال داده شد. سپس نمونه ها بر روی محیط کشت انتخابی اتوزین متیلن بلو (EMB) کشت داده شد و پلیت ها در دمای 37°C ساتی گراد به مدت 24 ساعت انکوبه شد از طریق انجام تست های بیوشیمیایی از قبیل MR, VP، سیمون سیترات، TSI، SIM بر روی کلنی ها، 246 ایزوله E.coli شناسایی گردید. کلنی های مربوط ایزوله های مثبت E.coli را در 70°C در محیط تریپتس سوی براث نگهداری کرده تا در مراحل بعدی از این ایزوله ها استفاده شود. تعیین حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن (kriby-Baur) صورت گرفتند (13). دیسک های مورد استفاده شامل: سفوتاکسیم (30m g)، فتازیدیم (30m g)، ایمپی پنم (10m g)، نالیدیکسیک اسید (30m g) و سپیروفلوکساسین (5m g) از شرکت Mast بودند.

آزمایش تولید آنزیم های بتالاکتاز طیف گسترده (ESBLs)

برای این منظور از تست فنوتیپی تائیدی (phenotypic confirmatory tests) استفاده شد (14). دیسک های مورد آزمایش شامل سفنازیدیم/کلاولانیک اسید $\left(\frac{CAZ : 30 \text{ mg}}{CA : 10 \text{ mg}} \right)$ ، سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید $\left(\frac{CAZ : 30 \text{ mg}}{CA : 10 \text{ mg}} \right)$ ، سفوتاکسیم و سفنازیدیم بود. (محصول شرکت Mast).

بعد از انکوباسیون به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی گراد، تولید ESBLs از طریق افزایش قطر هاله به اندازه 5 میلی متر یا بیشتر در اطراف دیسک سفنازیدیم - کلاولانیک اسید و یا سفوتاکسیم - کلاولانیک اسید بر طبق ضابطه Clinical Laboratory standards Institute (CLSI) and تعیین گردید.

استخراج DNA و انجام PCR :

DNA باکتری با استفاده از روش جوشانیدن (boiling) طبق دستورالعمل زیر استخراج شد.

سوسپانسیون میکروبی در حجم 500ml تهیه و سپس به مدت 5 دقیقه در بن ماری در حال جوش قرار داده شد. بعد از گذشت این زمان به مدت 10 دقیقه در دور 14000rpm سانتریفوژ گردید و فاز رویی حاوی DNA مورد استفاده قرار گرفت (15). واکنش PCR برای شناسایی ژن های بتالاکتامازی (214bp) bla_{SHV} ، (847bp) bla_{TEM} ، (590bp) $CTX-m$ تحت شرایط مندرج در جدول 1 انجام شد (16و 17).

مخلوط واکنش در حجم 25ml شامل 50TrisHcl میلی مولار، 50 kcl میلی مولار، 0/2 dNTP میلی مولار، 2 Mgcl₂ میلی مولار، 10 پیکومول مخلوط پرایمر، 2 واحد آنزیم Taq DNA polymerase و 200 نانوگرم DNA بود. مشخصات پرایمرهایی مورد استفاده در PCR در جدول 2 نمایش داده شده است. نتیجه PCR برای شناسایی قطعات اختصاصی با اندازه های 214 bp، 590bp، 874bp بر روی آگاروز همراه با نشانگر اندازه 100 جفت بازی تعیین گردید.

جدول 1) شرایط انجام PCR

NO.	Gene	Factor	Temp.(°C)	Time
		Step	SHV/CTX-M/TEM	SHV/CTX-M/TEM
۱	Initial denaturation		۹۴/۹۴/۹۴	۵/۴/۵min
۲	Denaturation		۹۴/۹۴/۹۴	۱/۱/۱min
۳	Anneling		۶۱/۶۰/۵۸	۱min/۳۰s/۱min
۴	Extension		۷۲/۷۲/۷۲	۱/۱/۱min
۵	Final extension		۷۲/۷۲/۷۲	۵/۵/۵min
۶	Cycle number		۳۵	

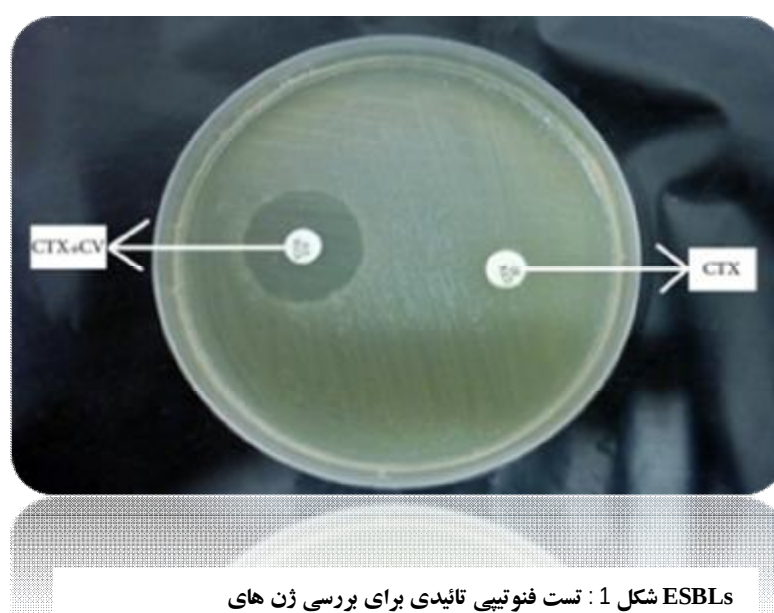
جدول 2: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR

نام ژن شناسایی شده	توالی نوکوتیدی	مشخصات نام پرایمر
SHV-A	5'-GATGAACGTTTCCCATG ATG-3'	bla _{SHV}
SHV-B	5'-CCC TGT TATCGCTCAGGTAA-3'	bla _{SHV}
CTX-M-A	5'-TTTGGCGATGCAT ACC AGT AA-3'	bla _{CTX-M}
CTX-M-B	5'-CGA TAT CGT TGG TGG TGC CAT -3'	bla _{CTX-M}
TEM-A	5' ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG-3'	bla _{TEM}
TEM-B	5'-CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA-3'	bla _{TEM}

یافته ها

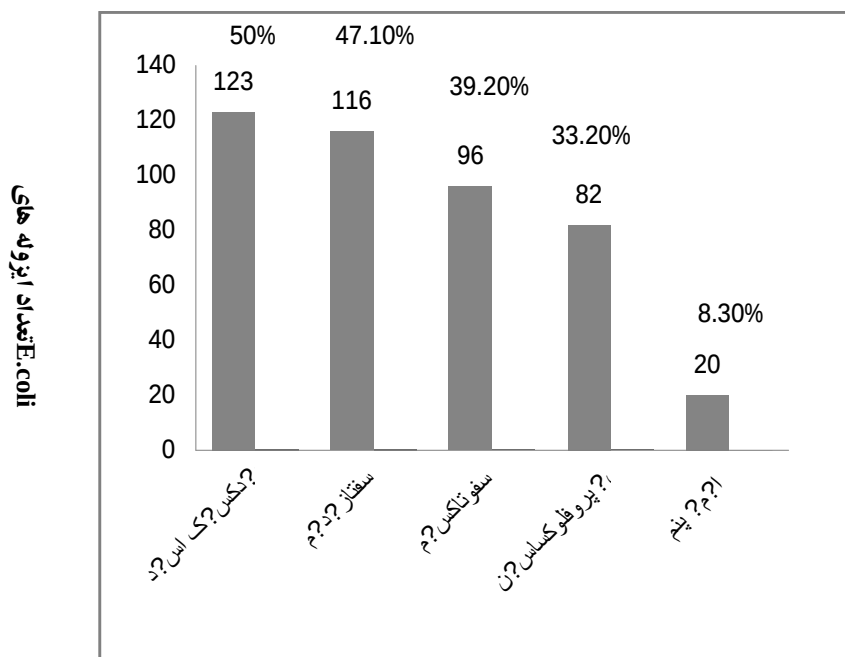
در آزمایش PCR برای تشخیص ژن SHV,CTX-M, TEM از تعداد 109 ایزوله ESBLs مثبت نشان داده شد که 77 نمونه دارای ژن bla_{SHV} (70/6%)، 75 نمونه دارای ژن bla_{CTX-M} (87/1%) و 95 نمونه دارای ژن bla_{TEM} (36/6%) بودند. 40 نمونه واحد هر سه ژن مورد نظر بودند. علاوه بر این 68 نمونه واحد دو ژن bla_{SHV} و bla_{TEM} (55/9%)، 61 نمونه واحد دو ژن bla_{TEM} و bla_{CTX-M} (49/5%) و 54 نمونه واحد دو ژن bla_{SHV}, bla_{CTX-M} بودند. (شکل 2)

از مجموع 246 ایزوله Ecoli جدا شده از نمونه های ادراری (50%) 123 ایزوله مقاوم به نالیدیکیسک اسید، (47/1%) 116 ایزوله مقاوم به سفنازیدیم، (39/2%) 96 ایزوله مقاوم به سفوتاکسیم، (33/3%) 82 ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین و (8/3%) 20 ایزوله مقاوم به ایمپنم نشان دادند. (نمودار 1) بر اساس نتایج حاصل از آزمون غربالی دیسک آگار دیفیوژن (47/1%) 116 نمونه (مقاوم به سفنازیدیم، سفوتاکسیم) به منظور تأیید تولید ESBLs، از طریق آزمون combined disk مورد ارزیابی قرار گرفت. که از این (94%) 109 به عنوان مولد ESBLs شناسایی شد. (شکل 1)



شکل 1: تست فنوتیپی تأییدی برای بررسی ژن های ESBLs

نمودار 1: مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های مورد بررسی در این مطالعه



شکل 2: الکتروفورز ژل آگاروز



1، 2: نمونه های مثبت برای ژن (214 bp) bla_{SHV} ، 3، 4: نمونه های مثبت برای ژن (590 bp) bla_{CTX-M} ، 5، 6، 7: نمونه های مثبت برای ژن (847 bp) bla_{TEM} ، 8: کنترل منفی ، M: مارکر

بحث

ژن های بتا لاکتامازی در باکتری به ویژه ژن های ESBLs، یکی از عوامل موثر در افزایش مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های بتا لاکتام از جمله سفالسپورین های وسیع الطیف است. ارگانسیم هایی که این ژن ها را در خود حمل می کنند باعث افزایش بیماری زایی و مرگ و میر در بین افراد می شوند، چه بسا ادامه روند رو به رشد در ایجاد مقاومت هایی از این دسته، جامعه را با خطر جدی مواجه خواهد کرد (18 و 19).

در مطالعه حاضر از مجموع 246 ایزوله E.coli (44/3%) 109 ایزوله دارای ESBLs بودند. در مطالعاتی که توسط علیرضا مباشر کار جدی و همکارانش در سال 1387 در تبریز صورت گرفت از میان 41 ایزوله اشرشیاکلی 40 ایزوله (97/56%) ESBL مثبت بودند. (20) محمد مهدی سلطان دلال در سال 1389 نشان داد که از میان 200 ایزوله اشرشیاکلی (64%) 128 ایزوله ESBL مثبت بودند که از این تعداد (57/8%) 74 حاوی ژن TEM بودند (21). Meyer و همکارانش در سال (2008) نشان دادند که فراوانی باسیلهای اشرشیاکلی های مولد ESBL در ICUهای کشور آلمان از 14/0% در سال 2001 به 52/1% در سال 2007 رسید. محققین معتقدند که توجه به اشرشیاکلی های مقاوم به ESBL اهمیت ویژه ای دارد. (22)

میزان ESBL در سویه های ایزوله شده از کشورهای مختلف و همچنین در یک کشور از یک بیمارستان با بیمارستان دیگر متفاوت می باشد که این مسئله بستگی به سیستم کنترل عفونت و رژیم درمانی دارد.

در این مطالعه با روش PCR، 70/6% حاوی ژن SHV، 68/8% حاوی ژن CTX-M و 87/1% حاوی ژن TEM بودند. در مطالعاتی که توسط مزبانی و سایر همکاران در سال 1386 در بیمارستان ولیعصر تهران صورت گرفت، از میان 76 نمونه بالینی E.coli، 47 (60%) ایزوله حاوی ژن TEM بودند (23). مسجیدیان نشان داد که از میان 148 سویه E.coli، 86/4% ایزوله ها ژن TEM را در برداشتند که این میزان بسیار مشابه با نتایج حاصل از این تحقیق بود (24). و در تحقیقی که توسط میر صالحیان انجام شد، نشان داده شد که از میان 33 سویه اشرشیاکلی، 39/4% ایزوله حاوی ژن TEM بتا لاکتامازی بودند

(25). مقایسه نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر با مطالعات مذکور نشان دهنده شیوع بالای این تیپ انزیمی در سویه های بالینی E.coli در کشور ما می باشد. مطالعات مشابهی در ترکیه نشان داده شد که 52/7% سویه های اشرشیاکلی دارای پلاسمید TEM 74/3% دارای ژن SHV، 32/4% دارای هر دو پلاسمید بوده اند (26). در مطالعه دیگری که توسط Shahid و همکارانش انجام شد، شیوع ژن bla_{CTX-M} را در 93 نمونه E.coli مورد بررسی قرار دادند. و مشخص کردند که از 93 نمونه، 72 نمونه (77/4%) به وسیله PCR، CTX-M مثبت بودند (27). در مطالعه انجام شده توسط Burcu Bali، نشان داده شد از میان 44 نمونه اشرشیاکلی 72/72% (32) دارای ژن TEM و 22/72% (10) دارای ژن CTX-M بودند (28).

مطالعات صورت گرفته نشان دهنده شیوع بالای ژن های بتا لاکتامازی به خصوص تیپ TEM در سویه های اشرشیاکلی می باشد بنابراین ضروری است که برای شناسایی این نوع از مقاومت از روش های مولکولی در کنار روش های فنوتیپی استفاده شود.

بیمارانی که مبتلا به عوامل عفونت زا تولید کننده ESBL هستند علاوه بر عدم درمان با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف غالباً به سایر انواع آنتی بیوتیک ها نیز مقاومت نشان می دهند. ESBLs از اهمیت خاصی در استراتژی درمانی برخوردار بوده است. زیرا این موضوع به علت شکست های درمانی حاصل از تجویز آنتی بیوتیک بدون انجام تست تعیین حساسیت است که خود باعث شناسایی افزایش مرگ و میر و طولانی شدن زمان بستری و افزایش هزینه درمان می گردد (29). بنابراین شناسایی سریع سویه های تولید کننده ESBLs در آزمایشگاه های میکروب شناسی بسیار مهم و ضروری است.

نتیجه گیری

تولید ESBLs به عنوان یک تهدید بزرگ برای مصرف سفالسپورین با طیف وسیع به شمار می رود بنابراین برای درمان عفونت های که مشکوک ارگانسیم های تولید کننده هستند باید آنتی بیوتیک مناسب به دقت انتخاب شود. همچنین سوش های که حساسیت آن ها در برابر سفنازیدیم و سفوتاکسیم کاهش پیدا کرده است باید از نظر داشتن ژن های ESBL مورد بررسی قرار بگیرند.

References

- Li Q, Lee JY, Castillo R, Hixon MS, Pujol C, Doppalapudi VR et al. A novel antibacterial agent with broad-spectrum activity and enhanced potency against beta-lactamase-producing strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(5):1262-8.
- Tenover FC, Raney PM, Williams PP, Rasheed JK, Biddle JW, Oliver A, et al. Evaluation of the NCCLS extended-spectrum beta-lactamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during Project ICARE. *J Clin Microbiol*. 2003;41(7):3142-6.
- Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommers HM. *Diagnostic Microbiology*. 3rd Edition, Publisher: place of publication. 1990; 90(102):473-484.
- Singh S. Extended-Spectrum beta-Lactamases: An overview. *Diagnostic Laboratory Services*. INC. 1999.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(6):1211-33.
- Thomson KS, Prevan AM, Sanders CC. Novel plasmid-mediated beta-lactamases in enterobacteriaceae: emerging problems for new beta-lactam antibiotics. *Curr Clin Top Infect Dis*. 1996;16:151-63.
- Al-Jasser AM. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBLs): a global problem. *Kuwait Med Journal*. 2006; 38 (3): 171-185.
- Medeiros AA. Nosocomial outbreak of multiresistant bacteria extended - spectrum betalactamases have arrived in North America. *J Ann Inter Med*. 1993; 119: 428 -43.
- Kurokawa H, Shibata N, Doi Y, Shibayama K, Kamachi K, Yagi T et al. A new TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase (TEM-91) with an R164C substitution at the Ω -loop confers ceftazidime resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47: 2981-2983.
- Liu G, Ling BD, Zeng Y, Lin L, Xie YE, Lei J. Molecular characterization of extended spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Enterobacter cloacae* from a teaching hospital in China. *Japan Infect Dis*. 2008; 61:286-289.
- Paterson DL, and Bonomo RA. Extended-Spectrum beta-Lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18 (4): 657-86.
- Shahcheraghi F, Noveiri H, Nasiri S. Detection of *bla_{TEM}* & *bla_{SHV}* genes among clinical isolates of *E. coli* from Tehran hospitals. *Iran J Med Microbiol*. 1386; 3:1-8.
- National Committee For Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 15th informational supplement (M100-s15). National Committee For Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 2005.
- Srisangkaew S, Vorachit M. The Optimum Agent for Screening and Confirmatory Tests for Extended-Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Ramathibodi Hospital, Thailand. *J Infect Dis Antimicrob Agents*. 2004; 21: 1-5.
- Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Strachounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase producing *E. coli* and *K. pneumoniae* in Russian hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:3724-32.
- Kim J, Semi J, Rhie H, Lee B, Park M, Lee H, Lee J, Kim S. Rapid Detection of Extended Spectrum B-Lactamases (ESBL) for Enterobacteriaceae by use of a Multiplex PCR-based Method. 2009;41(3):181-184.
- Amaral S, Peixe L, Machado E. Characterization of CTX-M Type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) among enterobacteriaceae from a Portuguese hospital. 2009;6:259-263.
- Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG12-, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(9):2598-603.
- Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien H, et al. Genetic Background of *Escherichia coli* and Extended-Spectrum Beta- Lactamase type. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11(1):54-61.
- Mobasher-kare-Jeddi AR, Nahaei MR, Mobayyen H, Pornour M, Sadeghi J. Molecular study of extended-spectrum beta-lactamase (SHV Type) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Medical Centers of Tabriz. *Iran J Med Microbiol*. 2008; 3,4:9-17.
- Soltan-Dallal MM, Molla-Aghamirzaei H, Sabbaghi A, Eshraghian MR. Molecular detection of TEM and AmpC (Dha, mox) broad spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Tehran University Medical Journal*. 2010; 68(6): 315-320.
- Meyer E, Gastmeier P, Schwab F. The burden of multiresistant bacteria in German intensive care units. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008. 62(6):1474-1476.
- Hosseini -Mazinani SM, Eftekhari F, Milani M, Gandili. Characterization of β -lactamase from Urinary Isolated of *Escherichia coli* in Tehran. *Iranian Biomedical Journal*. 2007.1.11(2):95-99.
- Masjedani GF, Valehi F, Talebi A and Rastegar LA. Molecular evaluation of resistance to expanded antibiotics in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Med Microbiol*. 2006;1(2):27-34.
- Mirsalehian A, Akbari-Nakhjavani F, Peymani A, Kaze mi B, Jabal Ameli F, Mirafshar SM. Prevalence of Extended spectrum β - Lactamase -production Enterobacteriaceae by Phenotypic and Genotypic Methods in Intensive care Units in Tehran, Iran. 2008; 6:169-173.
- Tasli H, Bahar H. Molecular characterization of TEM and SHV derived ESBL in Hospital-Based Enterobacteriaceae in Turkey. *Jpn J Infect*. 2005; 58: 162-167.
- Shahid M, Singhal M, Malik A, Shukla I, Khan HM. ESBL phenotypes and prevalent genotype of CTX-M type beta-lactamases in clinical isolates of *E. coli* in a North Indian tertiary care hospital. Proceedings of MICROCON 2006. XXX National Congress of Indian Association of Medical Microbiologists. 2006 Oct 27-29; Government Medical College, Nagpur. MICROCON. 2006; 46: 70.
- Burcu B, Acik L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum β -lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital, African Journal of Microbiology. 2010; 4(8): 650-654.
- Mesa RJ. Extended -spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *Journal of Antimicrobial chemotherapy*. 2006; 58(1): 211-215.