

Evaluation of CTX-M-1 Beta Lactamase Gene in Escherichia coli Isolated from the Urine Tract Infections of Patients by PCR Method

Simin Saadatmand¹, Zahra Haji Gholami Esfahani^{1*}, Mohammad Dakhili²

¹Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

²Department of Laboratory Sciences, Faculty of Medicine, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

*Corresponding Author:
Zahra Haji Gholami Esfahani, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Email:
z.hajigholami90@yahoo.com

Received: 30 May, 2016

Accepted: 18 Jul, 2016

Abstract

Background and Objectives: Pathogenic bacteria, such as *Escherichia coli* are dangerous for human population due to acquisition of resistance genes to beta-lactam antibiotics. This resistance is due to extended spectrum β lactamase (ESBL) genes, which are caused by plasmids, transposons, and/or mutation. The main cause of resistance to beta-lactam antibiotics is lactamase enzymes. In this study, the frequency of ESBL producing *E. coli* and molecular detection of CTX-M-1 gene, were investigated.

Methods: In this descriptive cross-sectional study, 58 *E. coli* samples isolated from patients with urinary tract infection, were identified using standard biochemical tests. Then, drug susceptibility test was performed using standard disk diffusion method (Kirby-Bauer). In the following, combined disk test was performed to identify ESBL producing strains among the resistant isolates. Plasmid DNA was extracted from ESBL-producing strains and CTX-M-1 genes were detected using PCR.

Results: Out of 58 *E.coli* strains, 28 strains (48.27%), were ESBLs producer, which in the molecular analysis, 20 strains (71.42%) had CTX-M-1 gene.

Conclusion: The results of the preset study is indicative of a high percentage of beta-lactamase resistance among *E. coli* strains. Considering the high percentage of antibiotic resistance, precise antibiogram testing is necessary in infections caused by ESBL-producing organisms.

Keywords: *Escherichia coli*; Drug resistance, Microbial; Polymerase chain reaction.

ارزیابی ژن مقاومت بتالاکتاماز CTX-M-1 در اشرشیاکلی‌های جدا شده از عفونت‌های ادراری، با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

سیمین سعادت‌مند^۱، زهرا حاجی‌غلامی اصفهانی^{۱*}، محمد دخیلی^۲

چکیده

زمینه و هدف: باکتری‌های بیماری‌زا مانند اشرشیاکلی به علت دریافت ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، برای جامعه بشری خطرناک هستند. این مقاومت به علت ژن‌های ESBL بوده که توسط پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و یا موتاسیون ایجاد می‌شود. مهم‌ترین عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام؛ آنزیم‌های بتالاکتامازی می‌باشد. در این مطالعه، میزان فراوانی باکتری‌های اشرشیاکلی تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف و شناسایی ژن CTX-M-1 به روش مولکولی بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - مقطعی، ۵۸ نمونه اشرشیاکلی جدا شده از بیماران با عفونت ادراری با تست‌های بیوشیمیایی استاندارد تشخیص داده شدند. سپس با استفاده از روش استاندارد انتشار دیسک (Kirby-Bauer)، آزمون حساسیت دارویی انجام شد. در ادامه، به منظور شناسایی سویه‌های مولد ESBL در ایزوله‌های مقاوم، تست Combined disk صورت گرفت. از سویه‌های مولد ESBL؛ DNA پلاسمیدی، استخراج و ژن CTX-M-1 با استفاده از PCR شناسایی شد.

یافته‌ها: از مجموع ۵۸ سویه اشرشیاکلی مورد بررسی، ۲۸ سویه (۴۸/۲۷٪) مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بودند که در بررسی مولکولی، ۲۰ سویه (۷۱/۴۲٪) حاوی ژن CTX-M-1 بود.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر، نشان‌دهنده درصد بالای مقاومت بتالاکتامازی در بین سویه‌های اشرشیاکلی می‌باشد. با توجه به درصد بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی، انجام دقیق آزمایش‌های آنتی‌بیوگرام در عفونت‌های ناشی از ارگانسیم‌های تولیدکننده ESBL ضروری است.

کلید واژه‌ها: اشرشیاکلی؛ مقاومت دارویی میکروبی؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

^۱گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

^۲گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات:

زهرا حاجی‌غلامی اصفهانی، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

z.hajigholami90@yahoo.com

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Saadatmand S, Haji Gholami Esfahani Z, Dakhili M. Evaluation of CTX-M-1 Beta Lactamase Gene in Escherichia Coli isolated from the urine tract infections of patients by PCR method. Qom Univ Med Sci J 2017;11(6):28-35. [Full Text in Persian]

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۹

تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۲۷

مقدمه

امروزه نگرانی عمده در جوامع بشری، ایجاد مقاومت‌های دارویی در باکتری‌های بیماری‌زا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد که نقش مهم و اساسی در عدم کنترل و درمان عفونت‌های باکتریایی دارند (۱). اشرشیاکلی، یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های ادراری در جامعه محسوب می‌شود که به علت دارا بودن مکانیسم‌های متعدد، از جمله دریافت ژن‌های مقاومت از طریق پلاسمید، ترانسپوزون و یا موتاسیون، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است (۲). طی چند دهه اخیر، به دلیل استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، بتالاکتام‌های مختلف ظاهر شده‌اند. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام با اتصال به پروتئین باندشونده به پنی‌سیلین که در دیواره سلولی باکتری می‌باشد سبب مهار ترنس‌پپتیدازها، تخریب پپتید و گلیکان و در پی آن تخریب دیواره سلول و در نتیجه از بین رفتن باکتری می‌شوند (۳،۴).

آنزیم بتالاکتاماز، آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را قبل رسیدن به PBPs در غشای سلولی، هیدرولیز و غیرفعال می‌کنند (۵). بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف، دسته‌ای از آنزیم‌ها هستند که به وسیله باسیل‌های گرم منفی، تولید و اهمیت ویژه‌ای در درمان ضد میکروبی دارند. در تقسیم‌بندی که توسط Bush، Jakobi و Modirus صورت گرفت، بتالاکتام‌ها به ۴ کلاس مولکولی A, B, C, D تقسیم‌بندی شدند (۶). بیشترین میزان تولید این آنزیم‌ها، به وسیله کلسیلا پنومونیه و اشرشیاکلی صورت می‌گیرد؛ البته این آنزیم‌ها در سایر جنس‌های انتروباکتریاسه مانند انتروباکتر، سیتروباکتر، سراسیا، پروتئوس و سالمونلا نیز مشاهده شده است (۷). بتالاکتام‌های رده A, C, D دارای اسید آمینه سرین در سایت فعال خود می‌باشند و کلاس B برای انجام عملکرد، نیازمند عنصر روی بوده و متالوبتالاکتاماز محسوب می‌شود (۸). آنزیم‌های وسیع‌الطیف برای اولین بار در دهه ۱۹۸۰ شناسایی شدند. این آنزیم‌ها در گروه A قرار دارند و بیشتر از نوع SHV و TEM بوده که در نتیجه جهش‌های نقطه‌ای از آنزیم‌های اصلی فاقد فعالیت وسیع‌الطیف ایجاد شده‌اند. این آنزیم‌ها به طور معمول به وسیله پلاسمیدها کد می‌شوند که این پلاسمیدها ژن‌های مقاومت به دیگر کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی مانند آمینوگلیکوزیدها را نیز حمل می‌کنند (۹).

خانواده CTX-M، اولین بار (سال ۱۹۸۹) در کشور آلمان گزارش شد. این خانواده به پنج گروه CTX-M1، CTX-M2، CTX-M8، CTX-M9، CTX-M25 تقسیم‌بندی می‌شود. بتالاکتام‌های CTX-M، ارتباط ژنتیکی کمی با اعضای بتالاکتام‌های TEM و SHV دارند و به طور گسترده از طریق پلاسمیدهای ESBL فاقد TEM و SHV، منتشر می‌شوند (۱۰). بتالاکتام‌های CTX-M، متعلق به گروه A هستند. اشرشیاکلی از جمله باکتری‌هایی است که قادر به تولید آنزیم ESBL می‌باشد. این باکتری، عضو خانواده انتروباکتریاسه و عامل بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی از قبیل سپسیس، مننژیت نوزادی، گاستروانتریت و عفونت ادراری شناخته شده که به علت اکتساب پلاسمیدهای کدکننده بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مثل سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف مقاوم شده‌اند. از این رو درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری با مشکل روبه‌رو شده است (۱۱،۱۲).

این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت سویه‌های اشرشیاکلی جدا شده از بیماران با عفونت ادراری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان و ردیابی سویه‌های مولد بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف تیپ CTX-M-1، با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - مقطعی، تعداد ۴۷۸ نمونه ادراری از آزمایشگاه‌های سطح استان قم از اردیبهشت‌ماه سال ۱۳۹۳ تا خردادماه سال ۱۳۹۴ جمع‌آوری شد. بعد از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه و کشت روی محیط بلاد آگار و مک‌کانکی آگار، انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت صورت گرفت. پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی (از قبیل MR، VP، سیمون سترات، اوره‌آز، TSI، SIM) بر روی کلنی‌ها، تعداد ۵۸ ایزوله/اشرشیاکلی شناسایی گردید. مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها با انجام تست آنتی‌بیوگرام از طریق روش کربی - بایر مطابق با دستورات مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی بالینی CLSI و با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک تهیه‌شده از شرکت‌های مدیا شامل: سفنزیکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)،

تولید ESBL از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵ میلی‌متر و یا بیشتر در اطراف دیسک سفنازیدیم، سفنازیدیم - کلاونیک اسید و سفوتاکسیم، سفوتاکسیم - کلاونیک اسید؛ براساس CSLI تعیین گردید. از سویه اشرشیاکلی ATCC25922، برای کنترل کیفی آنتی‌بیوگرام استفاده شد.

نمودار با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2012 رسم گردید.

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، DNA ایزوله‌ها به وسیله روش Boiling استخراج شد. همچنین به منظور بررسی فراوانی ژن بتالاکتامازی CTX-M-1 در طی فرآیند PCR، از یک جفت پرایمر اختصاصی (ساخت شرکت سیناکلون) استفاده گردید (جدول شماره ۱).

سیروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفالوتین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، نیتروفورانئوتین (۵۰ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۲۵ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۳۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، نورفلوکساسین (۱۰ میکروگرم) و اریترومایسین (۱۰ میکروگرم)، تعیین گردید (۱۳). برای تعیین باکتری‌های مولد بتالاکتاماز نیز از آزمایش تأییدی CLSI استفاده شد. پس از تهیه کشت خالص و یکنواخت بر روی محیط مولر هینتون آگار؛ دیسک‌های سفنازیدیم، سفنازیدیم - کلاونیک اسید و سفوتاکسیم، سفوتاکسیم - کلاونیک اسید با فاصله ۱۵ میلی‌متر روی سطح محیط قرار داده شدند.

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
CTX-M-1-F	5'-GCGGAAAAGCACGTCAATGGG-3'
CTX-M-1-R	5'-GCCAGATCACCGCGATATC-3'

نتیجه PCR برای شناسایی قطعات اختصاصی با اندازه ۴۲۷bp بعد از الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

از مجموع ۴۷۸ نمونه ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری مورد بررسی، ۵۸ سویه اشرشیاکلی جدا شد و به وسیله آزمون‌های بیوشیمیایی، تأیید و تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی روی آنها انجام گرفت.

جدول شماره ۲، الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش نشان می‌دهد.

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: 1/5mM MgCl₂، 0/5μl dNTP، 0/5μl Taq DNA polymerase، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۵ میکرولیتر پرایمر، ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱۳ میکرولیتر آب مقطر در طی ۴۰ سیکل تحت برنامه زمانی شامل: مرحله اولیه باز شدن دو رشته DNA به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سانتیگراد، مرحله باز شدن دو رشته DNA به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، مرحله اتصال پرایمرها به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد، مرحله طولیل شدن رشته هدف به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد، مرحله طولیل شدن نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد.

جدول شماره ۲: مقاومت آنتی‌بیوتیکی سوبه‌های مورد مطالعه

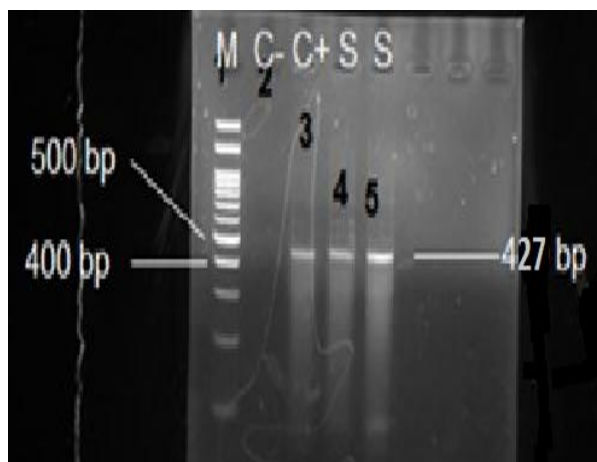
آنتی‌بیوتیک	نام اختصاری	حساس (درصد)	نیمه‌حساس (درصد)	مقاوم (درصد)
آمپی‌سیلین	AM	۳۵	۵	۶۰
کلرامفنیکل	C	۵۷	۲۱	۲۲
سفتازیدیم	CAZ	۷۶	۷	۱۷
سفالوتین	CF	۲۸	۲۲	۵۰
سیپروفلوکساسین	CP	۵۵	۱۲	۳۳
سفتی‌زوکسیم	CT	۶۰	۲۶	۱۴
سفتوتاکسیم	CTX	۵۳	۱۴	۳۳
اریترومایسین	E	۱۴	۳۴	۵۲
نیتروفورانتوئین	FM	۸۱	۵	۱۴
جنتامایسین	GM	۶۵	۷	۲۸
ایمی‌پنم	IPM	۷۸	۰	۲۲
نالیدیکسیک اسید	NA	۴۸	۱۰	۴۱
نورفلوکساسین	NOR	۷۱	۵	۲۴
کو‌تریموکسازول	SXT	۵۶	۳	۴۱

براساس آزمایش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی و باکتری کنترل مثبت، از تعداد ۲۸ ایزوله ESBL مثبت، ۲۰ نمونه دارای ژن CTX-M-1 بودند (شکل شماره ۲).

نتایج حاصل از Combined disk نشان داد از میان ۵۸ ایزوله اشرشیاکلی، ۲۸ نمونه مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بوده‌اند (شکل شماره ۱). پس از تعیین جدایه‌های مولد ESBL، DNA پلاسمیدی آنها استخراج شد.



شکل شماره ۱: تشخیص فنوتیپی مولدین ESBLs مثبت.



شکل شماره ۲: ژل آگارز حاوی نمونه های PCR ژن CTX-M-1 در اشرشیاکلی.

(۱) مارکو ۱۰۰۰bp (۲) کنترل منفی برای CTX-M-1 (۳) کنترل مثبت برای CTX-M-1 (۴) و (۵) ایزوله بالینی مثبت برای CTX-M-1.

بحث

امروزه، استفاده وسیع از آنتی بیوتیک های بتالاکتام باعث گسترش آنزیم های ESBL، همچنین افزایش شیوع آنزیم ESBL در اشرشیاکلی که شایع ترین عامل عفونت ادراری می باشد، شده است (۱۴). پلاسמיד های حمل کننده ESBL ها، به سهولت بین سویه ها و گونه های مختلف باسیل های گرم منفی روده ای منتقل می شوند. همچنین ارگانیسم هایی که این ژن را در خود حمل می کنند سبب افزایش بیماری زایی و مرگ و میر در بین افراد می شوند (۱). آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف، دسته ای از آنزیم های بتالاکتامازی هستند که در درمان ضد میکروبی اهمیت ویژه ای دارند. امروزه، تولید این آنزیم ها به عنوان یکی از معضلات بهداشت عمومی خود را نمایان ساخته و از خطرهای جدی در درمان عفونت های دارای مقاومت چندگانه می باشد که به سرعت در سراسر جهان گسترش یافته است (۱۵). در سالهای اخیر، آنزیم CTX-M به عنوان شایع ترین نوع ESBL در اروپا و امریکای شمالی گزارش شده، در ایران و شهرهای مختلف آن نیز مطالعاتی در این مورد صورت گرفته است (۱۶). در مطالعه حاضر، از میان ۵۸ ایزوله اشرشیاکلی، ۲۸ نمونه (۴۸/۲۷٪)، مولد ESBL و ۲۰ مورد (۷۱/۴۲٪) دارای ژن CTX-M-1 بودند. در مطالعه مشابهی (سال ۲۰۱۱)، Soltan Dallal و همکاران در بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی وسیع الطیف در ۲۰۰ اشرشیاکلی توانستند باکتری های مولد ESBL را شناسایی کنند که ۱۲۸ نمونه (۶۴٪)، ESBL و ۷۷/۳۴٪ آنها حاوی ژن CTX-M بودند (۱۷).

Shahid و همکاران، شیوع ژن CTX-M را در ۹۳ نمونه اشرشیاکلی مورد بررسی قرار دادند که ۷۲ نمونه (۷۷/۴٪) مثبت بودند (۱۸). Mirzaea و همکاران (سال ۲۰۰۹)، با بررسی باکتری اشرشیاکلی جدا شده از بیمارستان های تهران از نظر تولید بتالاکتامازهای CTX-M با روش PCR نشان دادند ۳۷/۸٪ نمونه ها مثبت بوده اند (۱۹). در مطالعه ای که توسط Burcu Bali و همکاران صورت گرفت از میان ۴۴ نمونه اشرشیاکلی، ۱۰ نمونه (۲۲/۷۲٪) حاوی ژن CTX-M بودند (۲۰). در تحقیقی که توسط Soltan Dallal انجام شد، مشخص گردید از ۱۸۸ اشرشیاکلی جدا شده از نمونه های ادراری بیمارستان های تبریز، ۸۴/۱٪ جدایه ها حاوی ژن بتالاکتاماز تیپ CTX-M می باشند (۲۱).

نتیجه گیری

مقایسه نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر با مطالعات انجام شده در سالهای اخیر نشان می دهد باکتری اشرشیاکلی تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف، به خصوص تیپ CTX-M با سرعت بیشتری در حال افزایش است که جهت کنترل این آنزیم ها نیاز به شناسایی ESBL ها توسط آزمایشگاه ها و تجویز مناسب داروهای بتالاکتام می باشد، همچنین پیشنهاد می گردد ژن های دیگر مسئول در ایجاد مقاومت نیز بررسی شوند.

References:

1. Al-Jasser AM. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): A global problem. *Kuwait Med J* 2006;38(3):171-85.
2. Sanchez U, Bello T, Dominguez Y, Mella M, Zemelman Z, Gonzalez R. Transference of extended-spectrum beta-lactamases from nosocomial strains of *Klebsiella pneumoniae* to other species of Enterobacteriaceae. *Rev Med Chil* 2006;134(4):415-20.
3. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8(4):557-84.
4. Medeiros A, Mayer KH, Opal SM. Plasmid-mediated beta-lactamases. *Antimicrob Newsl* 1988;5(9):61.
5. Falagas M, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms. *J Hosp Infec* 2009;73(4):345-54.
6. Howard C, Van Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard PM. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV β -lactamases in nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(3):659-64.
7. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *J Clin Microbiol* 2001;14(4):933-51.
8. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β -lactamases. *N Engl J Med* 2005;352(4):380-91.
9. Raveh D, Yinnon AM, Broide E, Rudensky B. Susceptibilities of ESBL-producing Enterobacteriaceae to ertapenem, meropenem and piperacillin-tazobactam with and without clavulanic acid. *Chemother* 2007;53(3):185-9.
10. Medeiros AA. Nosocomial outbreaks of multiresistant bacteria: Extended-spectrum beta-lactamases have arrived in North America. *Ann Intern Med* 1993;119(5):428-30.
11. Hadziyannis E, Tuohy M, Thomas L, Procop GW, Washington JA, Hall GS. Screening and confirmatory testing for extended spectrum β -lactamases (ESBL) in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;36(2):113-7.
12. Yagi T, Wachino J-i, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y, et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2005;43(6):2551-8.
13. Wikler MA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth informational supplement: Clin Lab Stand Inst 2015;35(3):M100-S25.
14. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Med* 2006;119(6 Suppl 1):S20-8;discussion S62-70.
15. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a Class A β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of Imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(9):2598-603.
16. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007;59(2):165-74.
17. Soltan Dallal M, Mobasser G, Fallah Mehrabadi J, Eshraghian M, Rastegar Lari A, Molla Aghamirzaei H. Detection of CTX-M-1 beta lactamase gene in *Escherichia coli* isolated from clinical samples by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Tehran Univ Med J* 2011;69(1):16-21. [Full Text in Persian]

18. Shahid M, Monil S, Abida M, Indu S, Khan H. ESBL phenotypes and prevalent genotype of CTX-M type beta lactamases in clinical isolates of E. coli in a North Indian tertiary care hospital. *Proceed Microcon* 2006:70.
19. Mirzaee M, Pourmand M, Chitsaz M, Mansouri S. Antibiotic resistance to third generation cephalosporins due to CTX-M-Type extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of Escherichia coli. *Iran J Pub Health* 2009;38(1):10-7.
20. Bali EB, Acik L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum beta-lactamase produced by Escherichia coli, Acinobacter baumannii and Klebsiella isolates in a Turkish hospital. *Afr J Microb Res* 2010;4(8):650-4.
21. Soltan Dallal M, Azarsa M, Shirazi MH, Owlia P, Sabbaghi A, Shamkani F, et al. The prevalence of extended-spectrum beta-lactamases and CTX-M-1 producing Escherichia coli in urine samples collected at Tabriz city Hospitals. *Tehran Univ Med J* 2011;69(5):273-8. [Full Text in Persian]