

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, Reza Yari³

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.

³Department of Biology, Faculty of Sciences, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, 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، رضا یاری^۳

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 ارگانیزم‌های تولیدکننده ESBL ضروری است.

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

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

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

^۳گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

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

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نماید:

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]

آدرس پست الکترونیکی:

z.hajigholami90@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۹

تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۲۷

مقدمه

امروزه نگرانی عمده در جوامع بشری، ایجاد مقاومت های دارویی در باکتری های بیماری زا نسبت به آنتی بیوتیک ها می باشد که نقش مهم و اساسی در عدم کنترل و درمان عفونت های باکتریایی دارند (۱). *اشرشیاکلی*، یکی از مهم ترین عوامل عفونت های ادراری در جامعه محسوب می شود که به علت دارا بودن مکانیسم های متعدد، از جمله دریافت ژن های مقاومت از طریق پلاسمید، ترانسپوزون و یا موتاسیون، نسبت به آنتی بیوتیک ها مقاوم است (۲). طی چند دهه اخیر، به دلیل استفاده گسترده از آنتی بیوتیک های بتالاکتام، بتالاکتامازهای مختلف ظاهر شده اند. آنتی بیوتیک های بتالاکتام با اتصال به پروتئین باندشونده به پنی سیلین که در دیواره سلولی باکتری می باشد سبب مهار ترنس پپتیدازها، تخریب پپتید و گلیکان و در پی آن تخریب دیواره سلول و در نتیجه از بین رفتن باکتری می شوند (۳، ۴).

آنزیم بتالاکتاماز، آنتی بیوتیک های بتالاکتام را قبل رسیدن به PBPs در غشای سلولی، هیدرولیز و غیرفعال می کنند (۵). بتالاکتامازهای وسیع الطیف، دسته ای از آنزیم ها هستند که به وسیله باسیل های گرم منفی، تولید و اهمیت ویژه ای در درمان ضد میکروبی دارند. در تقسیم بندی که توسط Bush، Jakobi و Modirur صورت گرفت، بتالاکتامازها به ۴ کلاس مولکولی A، B، C، D تقسیم بندی شدند (۶). بیشترین میزان تولید این آنزیم ها، به وسیله *کلبسیلا پنومونیه* و *اشرشیاکلی* صورت می گیرد؛ البته این آنزیم ها در سایر جنس های انتروباکتریاسه مانند *انتروباکتر*، *سیتروباکتر*، *سراسیا*، *پروتئوس* و *سالمونلا* نیز مشاهده شده است (۷). بتالاکتامازهای رده A، C، D دارای اسید آمینه سرین در سایت فعال خود می باشند و کلاس B برای انجام عملکرد، نیازمند عنصر روی بوده و متالوبتالاکتاماز محسوب می شود (۸). آنزیم های وسیع الطیف برای اولین بار در دهه ۱۹۸۰ شناسایی شدند. این آنزیم ها در گروه A قرار دارند و بیشتر از نوع SHV و TEM بوده که در نتیجه جهش های نقطه ای از آنزیم های اصلی فاقد فعالیت وسیع الطیف ایجاد شده اند. این آنزیم ها به طور معمول به وسیله پلاسمیدها کد می شوند که این پلاسمیدها ژن های مقاومت به دیگر کلاس های آنتی بیوتیکی مانند آمینو گلیکوزیدها را نیز حمل می کنند (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 تقسیم بندی می شود. بتالاکتامازهای CTX-M، ارتباط ژنتیکی کمی با اعضای بتالاکتامازهای TEM و SHV دارند و به طور گسترده از طریق پلاسمیدهای ESBL فاقد TEM و SHV، منتشر می شوند (۱۰). بتالاکتامازهای CTX-M، متعلق به گروه A هستند. *اشرشیاکلی* از جمله باکتری هایی است که قادر به تولید آنزیم ESBL می باشد. این باکتری، عضو خانواده انتروباکتریاسه و عامل بسیاری از عفونت های بیمارستانی از قبیل سپسیس، مننژیت نوزادی، گاستروانتریت و عفونت ادراری شناخته شده که به علت اکتساب پلاسمیدهای کدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف به آنتی بیوتیک های بتالاکتام مثل سفالوسپورین های وسیع الطیف مقاوم شده اند. از این رو درمان عفونت های ناشی از این باکتری با مشکل روبه رو شده است (۱۱، ۱۲).

این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت سویه های *اشرشیاکلی* جدا شده از بیماران با عفونت ادراری نسبت به آنتی بیوتیک های رایج در درمان و ردیابی سویه های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف تیپ CTX-M-1، با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - مقطعی، تعداد ۴۷۸ نمونه ادراری از آزمایشگاه های سطح استان قم از اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۳ تا خردادماه سال ۱۳۹۴ جمع آوری شد. بعد از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه و کشت روی محیط بلاد آگار و مک کانکی آگار، انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت صورت گرفت. پس از انجام تست های بیوشیمیایی (از قبیل MR، VP، سیمون سترات، اوره آز، TSI، SIM) بر روی کلنی ها، تعداد ۵۸ ایزوله *اشرشیاکلی* شناسایی گردید. مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها با انجام تست آنتی بیوگرام از طریق روش کربی - بایر مطابق با دستورات مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی بالینی CLSI و با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیک تهیه شده از شرکت های مدیا شامل: سفتیزوکسیم (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: ۱/۵mM MgCl₂، ۰/۵μl dNTP، ۰/۵μl 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 طولی شدن رشته هدف به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد، مرحله طولی شدن نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد.

جدول شماره ۲: مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مورد مطالعه

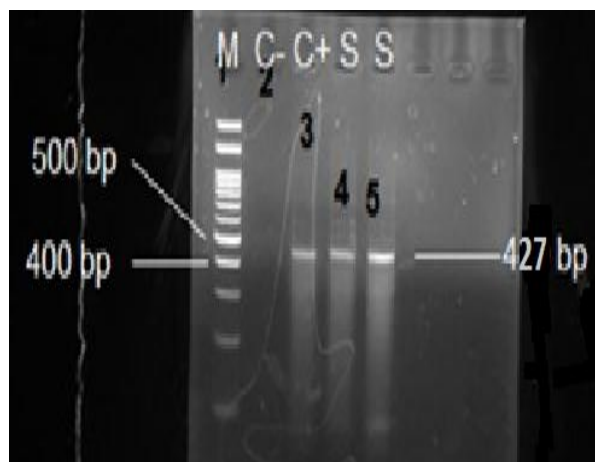
آنتی‌بیوتیک	نام اختصاری	حساس (درصد)	نیمه‌حساس (درصد)	مقاوم (درصد)
آمپی‌سیلین	AM	۳۵	۵	۶۰
کلرامفنیکل	C	۵۷	۲۱	۲۲
سفتازیدیم	CAZ	۷۶	۷	۱۷
سفالوتین	CF	۲۸	۲۲	۵۰
سیپروفلوکساسین	CP	۵۵	۱۲	۳۳
سفتی‌زوکسیم	CT	۶۰	۲۶	۱۴
سفتوناکسیم	CTX	۵۳	۱۴	۳۳
اریترومایسین	E	۱۴	۳۴	۵۲
نیتروفورانتوئین	FM	۸۱	۵	۱۴
جنتامایسین	GM	۶۵	۷	۲۸
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 نمونه‌های PCR ژن CTX-M-1 در/شرشیاکلی.

(۱) مارکر ۱۰۰۰ bp؛ (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 آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام باعث گسترش آنزیم‌های ESBL، همچنین افزایش شیوع آنزیم ESBL در/شرشیاکلی که شایع‌ترین عامل عفونت ادراری می‌باشد، شده است (۱۴). پلاسمیدهای حمل‌کننده ESBLها، به‌سبب انتقال سویه‌ها و گونه‌های مختلف باسیل‌های گرم منفی روده‌ای منتقل می‌شوند. همچنین ارگانیسم‌هایی که این ژن را در خود حمل می‌کنند سبب افزایش بیماری‌زایی و مرگ و میر در بین افراد می‌شوند (۱). آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، دسته‌ای از آنزیم‌های بتالاکتامازی هستند که در درمان ضد میکروبی اهمیت ویژه‌ای دارند. امروزه، تولید این آنزیم‌ها به‌عنوان یکی از معضلات بهداشت عمومی خود را نمایان ساخته و از خطرهای جدی در درمان عفونت‌های دارای مقاومت چندگانه می‌باشد که به سرعت در سراسر جهان گسترش یافته است (۱۵). در سالهای اخیر، آنزیم CTX-M به‌عنوان شایع‌ترین 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/شرشیاکلی، 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 آنتی‌بیوتیکی وسیع‌الطیف در ۲۰۰/شرشیاکلی توانستند باکتری‌های 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/شرشیاکلی مورد بررسی قرار دادند که ۷۲ نمونه (۷۷/۴٪) مثبت بودند (۱۸). Mirzaee و همکاران (سال ۲۰۰۹)، با بررسی باکتری/شرشیاکلی جدا شده از بیمارستان‌های تهران از نظر تولید بتالاکتامازهای CTX-M با روش PCR نشان دادند ۳۷/۸٪ نمونه‌ها مثبت بوده‌اند (۱۹). در مطالعه‌ای که توسط Burcu Bali و همکاران صورت گرفت از میان ۴۴ نمونه/شرشیاکلی، ۱۰ نمونه (۲۲/۷۲٪) حاوی ژن CTX-M بودند (۲۰). در تحقیقی که توسط Soltan Dallal انجام شد، مشخص گردید از ۱۸۸/شرشیاکلی جدا شده از نمونه‌های ادراری بیمارستان‌های تبریز، ۸۴/۱٪ جدایه‌ها حاوی ژن بتالاکتاماز تیپ CTX-M می‌باشند (۲۱).

نتیجه‌گیری

مقایسه نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر با مطالعات انجام شده در سالهای اخیر نشان می‌دهد باکتری/شرشیاکلی تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، به‌خصوص تیپ CTX-M با سرعت بیشتری در حال افزایش است که جهت کنترل این آنزیم‌ها نیاز به شناسایی ESBLها توسط آزمایشگاه‌ها و تجویز مناسب داروهای بتالاکتام می‌باشد، همچنین پیشنهاد می‌گردد ژن‌های 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]