Archive of SID

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

مهسا 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

شهرآشوب 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:90/2/15

چکیده

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

روش بررسی: *تعداد246 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 انجام گرفت. آنتی بیوتیک های تحت بررسی عبارت بودند از: سفوتاکسیم ، سفتازیدیم ، ایمی پنم ، نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین(شرکت Mast). ازروش Combined Disk Test برای آزمایش تائیدی استفاده گردید. نتایج با استانداردهای Clinical and laboratory (CLSI) standards institute مقایسه و در نهایت ایزوله های ESBL مثبت ، توسط روش PCR از نظر ژن های bla_{TEM} ,bla_{CTX-M},bla_{SHV} مورد بررسی قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *از 246 ایزوله مورد بررسی116 (47/1%) ایزوله مقاوم به سفتازیدیم و 96 (39/2%) ایزوله مقاوم به سفوتاکسیم بودند. همچنین 109 (44/3%) ایزوله مولد ESBL بودند. ژن ها bla_{TEM} ,bla_{CTX-M},bla_{SHV} به ترتیب در 95 (87/1%) (68/8%) 75 و 77 (70/6%) ایزوله های ESBL یافت شد. 40 (36/6%) نمونه حاوی هر سه ژن مورد نظر بودند. علاوه بر این 68 (62/3%) نمونه واجد دو ژن bla_{SHV} و bla_{TEM} ، 61 (55/9 %) نمونه واجد دوژن bla_{TEM} و bla_{CTX-M} و 54 (49/5 %) نمونه واجد دوژن bla_{SHV}, bla_{CTX-M} بودند*

نتیجه گیری: *با توجه به درصد بالای مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم، انجام دقیق آزمایشهای 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: *بتالاکتاماز وسیع الطیف ، اشرشیاکلی، عفونت ادراری ، CTX*

www.SID.ir

Archive of SID

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 است (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 سفالوسپوریی های وسیع الطیف، ازترئونام 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 اسیدآمینه 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 وخصوصیات فیزیکی نظیر وزن مولکولی و نقطه ایزوالکترویک بتا لاکتامازها ؛به چهار گروه یا چهار کلاس اصلی D,C,B,A طبقه بندی می شوند براساس این طبقه بندی ، آنزیم های وسیع الطیف در گروه A قرار گرفته وشامل مشتقات آنزیم های موتاسیون یافته SHV,TEM می باشند(5و6).بتالاکتامازهای تیپCTX-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 یکی از بحران های موجود در درمان عفونت های ناشی از این باکتری ها ست. انتقال وانتشار سریع ارگانیسم هایی که قادر به تولید آنزیم های مذکور ند، باعث بالا رفتن میزان عفونت های بیمارستانی مربوط در سراسر دنیا شده است(11). اشرشیاکلی یکی از باکتری هایی است که قادربه تولید آنزیم هایESBL 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.

روش بررسی

در یک دوره 8 ماهه از بهمن ماه 1388تا شهریور ماه 1389 تعداد444 نمونه ادراری از بیمارستان های تهران (بیمارستان علی اصغر، بهرامی، مفید،بوعلی)جمع آوری شدو به ازمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه ازاد اسلامی واحد تنکابن انتقال داده شد . سپس نمونه ها بر روی محیط کشت انتخابی ائوزین متیلن بلو (EMB) کشت داده شد وپلیت ها در دمای 37^{c} سانتی 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°- 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 $(30mg)$،سفتازیدیم $(30mg)$،ایمی پنم $(10mg)$،نالیدیکسیک اسید $(30mg)$ و سپیروفلوکساسین $(5mg)$ از شرکت Mast بودند.

www.SID.ir

Archive of SID

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 سفتازیدیم/کلاولانیک اسید $\left(\frac{CAZ\ :30\ m\ g}{CA\ :10\ m\ g}\right)$ ،سفوتاکسیم کلاولانیک اسید $\left(\frac{CTX\ :30\ m\ g}{CA:10\ m\ g}\right)$ ، سفوتاکسیم و سفتازیدیم 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 سفتازیدیم – کلاولانیک اسید و یا سفوتاکسیم – کلاولانیک اسید بر طبق ضابطه Clinical and Labaratory standards Institute (CSLI) 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 قرارداده 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(bla_{SHV} (214bp) ، bla_{TEM} (847bp) و $bla_{CTX\text{-}m}$(590bp) تحت شرایط مندرج در جدول 1 انجام شد(16و17).

مخلوط واکنش در حجم $25ml$ شامل 50TrisHcl میلی مولار ، 50 kcl میلی مولار، 0/2 dNTP میلی مولار، $Mgcl_2$ 2 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 874bp ،590bp ، 214 bp بر روی آگاروز همراه با نشانگر اندازه 100 جفت بازی تعیین گردید.

جدول1 : شرایط انجام PCR نمونه های اشرشیا کلی برای تکثیر ژنهای مسئول ESBL

ردیف	مرحله	ژن مورد نظر	
		زمان (دقیقه)	دما(درجه سیلیسیوس)
		SHV/CTX-M/TEM	SHV/CTX-M/TEM
1	Initial denaturation	94/94/94	5/4/5
2	Denaturation	94/94/94	1/1/1
3	Anneling	61/60/61	1/0,5/1
4	Extension	72/72/72	1/1/1
5	Final extension	72/72/72	5/5/5
6	تعداد سیکل	35 بار	

www.SID.ir

Archive of SID

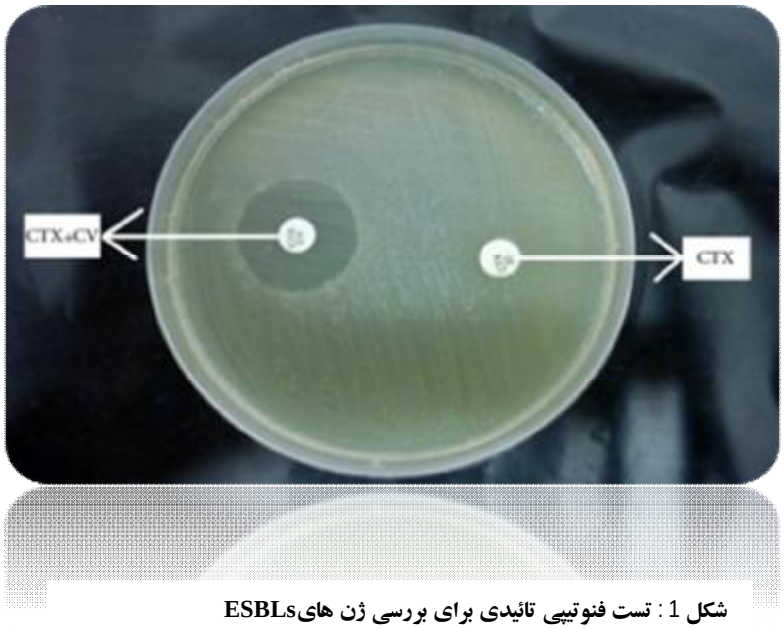
جدول 2: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده درPCR

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

یافته ها

از مجموع 246 ایزوله Ecoli جدا شده از نمونه های ادراری(50%) 123 ایزوله مقاوم به نالیدیکسیک اسید،(47/1%) 116 ایزوله مقاوم به سفتازیدیم ، (39/2%) 96ایزوله مقاوم به سفوتاکسیم، (33/3%)82 ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین و(8/3%)20ایزوله مقاومت به ایمی پنم نشان دادند. (نمودار 1) بر اساس نتایج حاصل از آزمون غربالی دیسک آگار دیفیوژن (47/1%) 116 نمونه (مقاوم به سفتازیدیم ، سفوتاکسیم) به منظور تائید تولید ،ESBLs ازطریق آزمون combined disk مورد ارزیابی قرارگرفت. که از این (94%)109 به عنوان مولد ESBLs شناسایی شد.(شکل1)

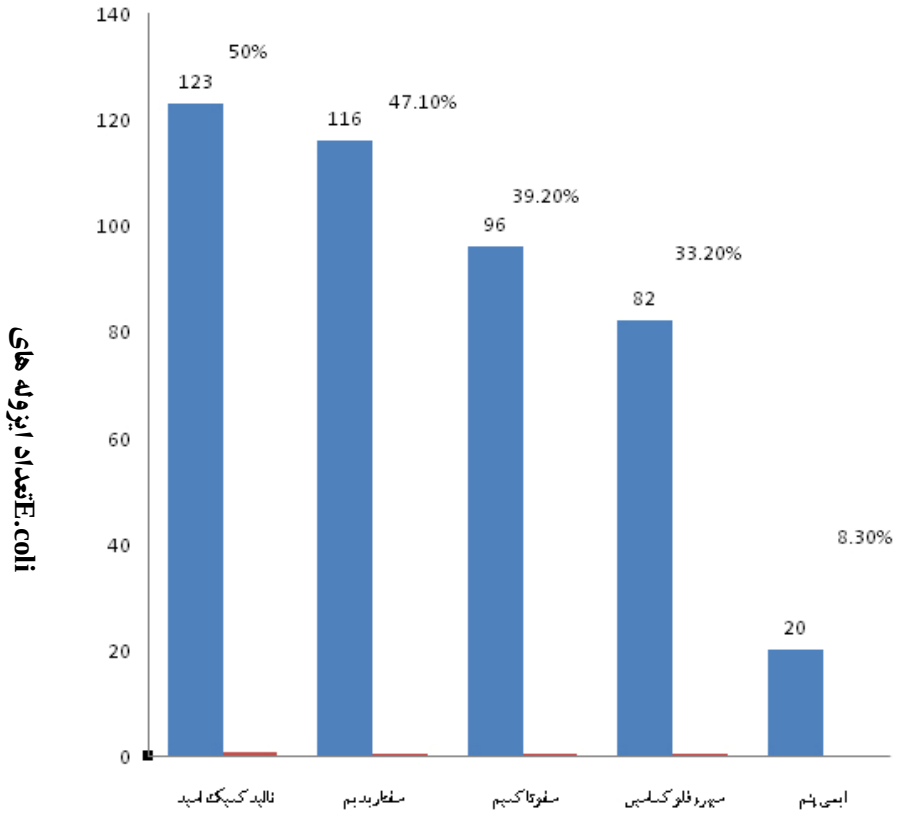
درآزمایش PCR برای تشخیص ژن SHV,CTX-M, TEM از تعداد109 ایزوله ESBLs مثبت نشان داده شد که (70/6%) 77 نمونه دارای ژن bla_{SHV} ,(68/8%) 75 نمونه دارای ژن bla_{CTX-M} و(87/1%)95 نمونه دارای ژن bla_{TEM} بودند. . (36/6%) 40نمونه واحد هر سه ژن مورد نظر بودند. علاوه بر این (62/3%) 68 نمونه واجد دو ژن bla_{SHV} و bla_{TEM} ، (55/9 %) 61 نمونه واجد دوژن bla_{TEM} وbla_{CTX-M}, (49/5 %)54 نمونه واجد دوژن bla_{SHV},bla_{CTX-M} بودند.(شکل 2)



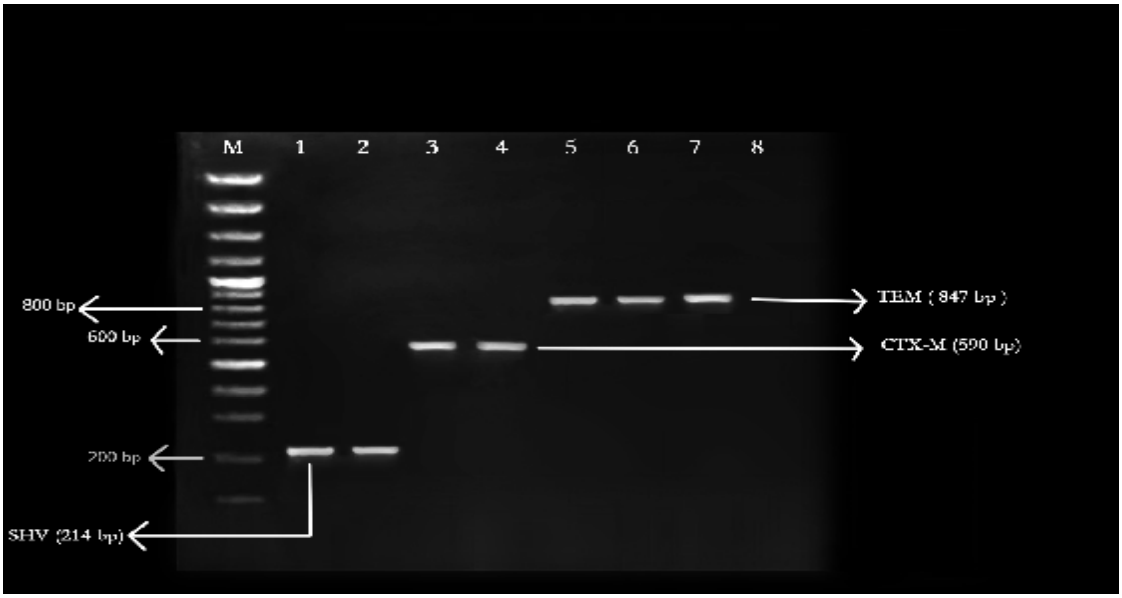
شکل 1 : تست فنوتیپی تائیدی برای بررسی ژن هایESBLs

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار1: مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های مورد بررسی در این مطالعه



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

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

ژن های بتالاکتامازی در باکتری به ویژه ژن های ESBLs، یکی از عوامل موثر در افزایش مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام ازجمله سفالوسپورین های وسیع الطیف است. ارگانیسم 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(18و19).

در مطالعه حاضر از مجموع 246 ایزوله Ecoli (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 اشرشیا کلی (64%) 128 ایزوله ESBL مثبت بودند که از این تعداد (57/8%) 74حاوی ژن TEM بودند (21). Meyer و همکارانش در سال(2008) نشان دادند که فراوانی باسیلهای اشرشیا کلی 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 اشرشیا های مقاوم به ESBL اهمیت ویژه ای دارد.(22)

میزانESBL 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 ژنCTX-M و 87/1% حاوی ژن TEM بودند.در مطالعاتی که توسط مزیانی و سایر همکاران در سال 1386 در بیمارستان ولیعصر تهران صورت گرفت ،از میان 76 نمونه بالینی E.coli،(60%)47ایزوله حاوی ژن TEM بودند (23). مسجدیان نشان داد که از میان 148 سویه Ecoli ، 86/4 % ایزوله ها ژن TEM را در برداشتندکه 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 اشرشیا کلی ،39/4%ایزوله حاوی ژن TEMبتالاکتامازی 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.coliدر کشورما 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 و22/72%(10)دارای ژن CTX-M بودند (28).

مطالعات صورت گرفته نشان دهنده شیوع بالای ژن های بتالاکتامازی به خصوص تیپ TEM در سویه های اشرشیا کلی می باشد بنابراین ضروری است که برای شناسائی 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 انتی 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 تهدیدی بزرگ برای مصرف سفالسپورین با طیف وسیع به شمار می رود, بنابراین برای درمان عفونت های که مشکوک ارگانیسم های تولید کننده اند، باید آنتی بیوتیک مناسب به دقت انتخاب شود. همچنین سوش هایی که حساسیت آن ها در برابر سفتازیدیم و سفوتاکسیم کاهش پیدا کرده است باید از نظر داشتن ژن های ESBL مورد بررسی قرار بگیرند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Li Q, Lee JY, Castillo R, Hixon MS, Pujol C, Doppalapudi VR et al. A *novel antibacterial agent with broad-spectrumactivity and enhanced potency against beta-lactamase-producingstrains*. Antimicrob Agents Chemother .2002;46(5):1262-8.

2. Tenover FC, Raney PM, Williams PP, Rasheed JK, Biddle JW,Oliver A, et al. *Evaluation of the NCCLS extended-spectrumbeta-lactamase confirmation methods for Escherichia coli with isolates collected during Project ICARE*. J Clin Microbiol .2003;41(7):3142-6.

3. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommers HM. *Diagnostic Microbiology*.3rd Edition, Publisher: place of publication .1990; 90(102) :473-484.

4. Singh S. *Extended-Spectrum beta-Lactamases: An overview*. Diagnostic Laboratory Services.INC .1999.

5. 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.

6.Thomson KS, Prevan AM, Sanders CC. *Novel plasmidmediated beta-lactamases in enterobacteriaceae: emerging problems for new beta-lactam antibiotics.* Curr Clin Top Infect Dis. 1996;16:151-63.

7. Al-Jasser AM. *Extended-spectrum beta-lactamase (ESBLS): a global problem*. Kuwait Med Journal . 2006; 38 (3): 171-185.

8. Medeiros AA. *Nosocomial outbreak of multiresistant bacteria extended – spectrum betalactamases have arrived in North America*. J Ann Inter Med . 1993; 119: 428 -43.

9. 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.

10. Liu G, Ling BD, Zeng Y, Lin L, Xie YE, Lei J. *Molecular characterization of extendedspectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of Enterobacter cloacae from a teaching hospital in china*. Japan Infect Dis. 2008; 61:286-289.

11. Paterson DL, and Bonomo RA. *Extended-Spectrum beta-Lactamases:a clinical update.* Clinl Microbiol Rev. 2005; 18 (4): 657-86.

12. 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.

13. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing,15th informational supplement (M100-s15).National Committee For Clinical LaboratoryStandards wayne, pa .2005.

14. 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.

15.Edelstein M,Pimkin M,Palagin I,Edelstin I,Stratchounski L.*Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum betalactamase producing E.coli and K.pneumoniae in Russian hospital*. Antimicrob Agents chemother .2003;47:3724-32.

16.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 Entrobacteriaceae by use of a Multiplex PCR-based Method* .2009;41(3):181-184.

17.Amaral S,Peixe L,Machado E.*Characterization of CTX-M Type extended-spectrum beta-lactamases(ESBLs) among entrobacteriaceae from a Portuguese hospital*. 2009;6:259-263.

18.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.

19.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.

20.Mobasher-kare-Jeddi AR,Nahaei MR,Mobayyen H,Pornour M,Sadeghi J.*Molecular study of extended-spectrum beta-lactamase(SHV Type)in Esherchia Coli and Klebsiella penumoniae isolated from* Medical *Centers of Tabriz*. Iran J Med Microbiol.2008; 3,4:9-17.

21.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.

22- Meyer E , GastmeierP, Schwab F. *The burden of multiresistant bacteria in German intensive care units*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008. 62(6):1474-1476.

23- Hosseini –Mazinani SM,Eftekhar F,Milani M,Gandili.*Characterization of β-lactamase from Urinary Isolated of Escherichia coli in Tehran*. Iranian Biomedical Jurnal. 2007; 11(2):95-99.

24. Masjedian GF, Valehi F, Talebi A and Rastegar LA. *Moulecular evaluation of resistance to espanded antibiotics in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae.* Iran J Med Microbiol. 2006;1(2):27-34.

25- Mirsalehian A,Akbari-Nakhjavani F,Peymani A,Kaze mi B,Jabal Ameli F,Mirafshar Sm.*Prevelance of Extended spectrum β- Lactamase –production Enterobacteriacea by Phenotypic and Genotypic Methodsin Intensive care Units in Tehran,Iran* .2008; 6:169-173.

26. Tasli H, Bahar H. *Moleculare characterization of TEM and SHV derived ESBL in Hospital-Based Enterobacteriaceae in Turkey*.Jpn J Infect .2005; 58: 162-167.

27.Shahid M, Singhal M, Malik A, Shukla I, Khan HM. *ESBLphenotypes and prevalent genotype of CTX-M type betalactamases in clinical isolates of E.coli in a North Indiantertiary care hospital*. Proceedings of MICROCON 2006. XXXNational Congress of Indian Association of MedicalMicrobiologists .2006 Oct 27-29; Government MedicalCollege, Nagpur. MICROCON. 2006; 46: 70.

28.Burcu B,Acik L,Sultan N. *Phenotypic and molecular characterization of SHV,TEM, CTX-M and extended-spectrum _-lactamase produced by Escherichia coli, Acinobacter baumannii and Klebsiella isolates in a Turkish hospital*,African Journal of Microbiology .2010; 4(8): 650-654.

29. Mesa RJ. *Extended –spectrum β-lactamaseproducing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage).* Journal of Antimicrobial chemotherapy .2006; 58(1): 211-215.

www.SID.ir