

Research Paper

Frequency of TEM and PER Beta-Lactamase Genes in Urinary Isolates of *Escherichia coli* Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases



*Maryam Ghane¹ , Fariba Adham¹

1. Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran.



Citation: Ghane M, Adham F. [Frequency of TEM and PER Beta-Lactamase Genes in Urinary Isolates of *Escherichia coli* Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences(JAMS). 2020; 22(6):218-229. <https://doi.org/10.32598/JAMS.22.6.2891.1>

doi <https://doi.org/10.32598/JAMS.22.6.2891.1>



Article Info:

Received: 05 May 2019

Accepted: 14 Dec 2019

Available Online: 01 Feb 2020

Key words:

Escherichia coli,
drug resistance,
 β -lactamases

ABSTRACT

Background and Aim In recent years, increase in extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) producing *Escherichia coli* has led to limitations of treatment options. This study aimed to find the frequency of *bla*_{TEM} and *bla*_{PER} genes among ESBL producing urinary isolates of *E. coli* and detect their resistance pattern.

Methods & Materials From January 2016 to February 2017, 972 urine samples from patients suspected of having urinary tract infections in three main hospitals and laboratories in Karaj were collected. Bacterial identification, antimicrobial susceptibility and ESBL production were performed according to the standard guidelines. Polymerase chain reaction was used for the detection of TEM and PER β -lactamases.

Ethical Considerations This study was approved by the Research Ethics Committee of Islamic Azad University of Tehran Medical Branch (Code: IR.IAU.TMU.REC.1396.274).

Results Out of 972 samples, 500 cases were culture-positive for *E. coli*. Thirty-six percent (n =180) of the isolates were determined as ESBL-producer. Among ESBL positive isolates, the most susceptibility was observed in amikacin and imipenem (80 and 60% respectively). Resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin, tetracycline and gentamicin was 92.7%, 78.9%, 66.1% and 57.8%, respectively. All ESBL producers exhibited multidrug resistance. Among the ESBL-positive isolates, *bla*_{TEM} gene was detected in 44.72% (n=85) of the isolates, but the *bla*_{PER} gene was not found in any of the isolates.

Conclusion The prevalence of multidrug resistant ESBLs producing uropathogenic *E. coli* is high. Continuous monitoring of ESBL producers and their resistance patterns can help to reduce the spread of such resistant strains in the community.

Extended Abstract

Introduction

Urinary tract infection (UTI) is one of the most important infectious diseases in society and also in hospitals and *Escherichia coli* is one of the most important causes of UTI. Among antibiotics,

β -lactam antibiotics are the most widely used chemotherapeutic drugs due to its non-toxicity [4]. Unfortunately due to the overuse of antibiotics, today we are seeing an increase in strains resistant to these antibiotics. Production of β -lactamase enzymes is one of the most important mechanisms of resistance to this class of antibiotics. Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) are enzymes that cause resistance to broad-spectrum cephalosporins, and as these enzymes are

* Corresponding Author:

Maryam Ghane, MSc.

Address: Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr Iran.

Tel: +98 (21) 56368994

E-mail: ghane@iaau.ac.ir; maryamghaneh@yahoo.com

encoded by the plasmid, bacterial resistance is rapidly spread because of these enzymes. These plasmids often carry genes resistant to other antibiotics such as aminoglycosides, fluoroquinolones, tetracycline, chloramphenicol and trimethoprim-sulfamethoxazole [5]. TEM-type ESBLs are one of the most important plasmid β -lactamases belonged to enterobacteriaceae family and one of the important causes of multidrug resistance in nosocomial infections [6]. PER enzymes are another type of ESBLs identified first in *Pseudomonas aeruginosa* but have also been identified in other organisms, especially in Acinetobacter isolates [7]. Treatment of UTI often begins experimentally based on the reports of antibiotic resistance patterns of urinary pathogens. Continuous presentation of antibiotic resistance patterns in each region can prevent the spread of resistant strains in addition to treating UTIs. In this regard, the purpose of this study was to determine the prevalence of *Escherichia coli* producing ESBLs isolated from the urine of patients with UTI, to determine their susceptibility to common antibiotics used in UTI treatment, and to evaluate the frequency of bla_{TEM} and bla_{PER} β -lactamase genes.

Methods and Materials

This study was conducted on 972 urine samples from January 2016 to February 2017. The samples were collected from outpatients suspected of urinary tract infection referred to hospitals of Imam Khomeini, Qaem, and Shahid Rajaei, and laboratories in Karaj, Iran. Urine samples were inoculated on blood agar and eosin methylene blue agar (Merck, Germany). After incubation at 37° C for 24 h, plates with remarkable growth (10^5 cfu /ml) were selected for subsequent experiments. Bacteria were identified based on their

morphological and biochemical properties [8]. Screening of *Escherichia coli* strains producing ESBLs were performed using disk diffusion method and two pairs of disc including cefotaxime (30 μ g) and cefotaxime/clavulanic acid (30/10 μ g) disks as well as ceftazidime (30 μ g) and ceftazidime/Clavulanic acid (30/10 μ g) disks (Rosco Company, Denmark) and in accordance with the recommendations of the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Antibiotic susceptibility assessment of strains producing ESBLs was carried out using gentamicin (10 μ g), tetracycline (30 μ g), trimethoprim sulfamethoxazole (25 μ g), imipenem (10 μ g), amikacin (30 μ g) and ciprofloxacin (5 μ g) antibiotics (Rosco, Denmark). For molecular identification of bla_{TEM} and bla_{PER} genes, after genomic DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) experiments were performed using specific primers [10, 11]. Statistical analysis were conducted in SPSS V. 20 software using chi-square test considering a significance level of $P < 0.05$.

Results

Out of 972 suspected samples, 780 infectious samples were diagnosed of which 500 *Escherichia coli* isolates were isolated. Mean age of patients was 45 ± 16 years. Of these, 169 (33.8%) were male and 331 (66.2%) were female. Out of 500 *Escherichia coli* isolates, 180 (36%) were positive for β -lactamase production. The number of ESBL strains was higher in females (73.33%; $n=132$) than in males (26.67%, $n=48$) ($p = 0.007$). The results of antibiotic susceptibility testing showed that the strains producing ESBLs were highly resistant to co-trimoxazole and ciprofloxacin (Table 1). The results of TEM β -lactamase gene analysis using

Table 1. Antibiotic susceptibility of ESBL producing isolates by using disk diffusion method

Antibiotics	No. (%)		
	Resistant	Intermediate	Sensitive
Gentamicin	95(57.8)	85 (47.2)	0
Tetracycline	119 (66.1)	9 (5)	52 (28.9)
Co-trimoxazole	167 (92.7)	2 (1.1)	11 (6.1)
Imipenem	54 (30)	18 (10)	108 (60)
Amikacin	36 (20)	0	144 (80)
Ciprofloxacin	142 (78.9)	2 (1.1)	36 (20)

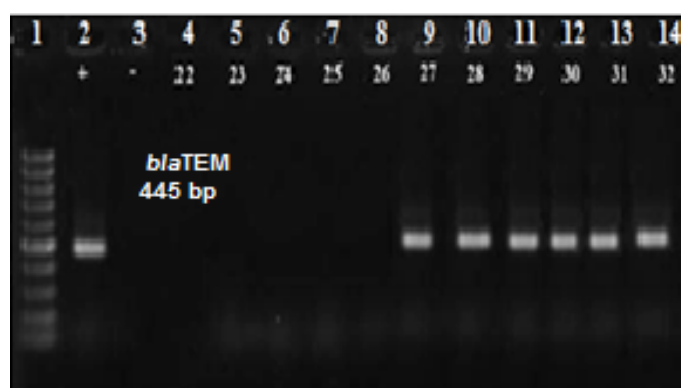


Figure 1. PCR results of *bla*_{TEM} gene on 1.5% agarose gel. Lane 1 100 bp size marker, lane 2 positive control (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603), lane 3 negative control, lanes 4-8 negative results, and lanes 9-14 positive results for *bla*_{TEM} gene.

specific primers (Figure 1) showed that *bla*_{TEM} gene was present in 85 (44.72%) of isolates whereas *bla*_{PER} gene were not present in any of the isolates.

Discussion

Over the past decades, gram-negative bacilli producing ESBLs have emerged as important pathogens in nosocomial and community-acquired infections worldwide. Knowing the antibiotic resistance of these strains and their prevalence in each region can help control these microorganisms and prevent them from spreading. The study was performed on 972 urine samples. Of the tested samples, 780 were diagnosed as infectious, and *Escherichia coli* was the most common bacteria (64.1%) isolated from patients with UTI. Similar results have been reported in other studies conducted in Iran and other countries [13, 14].

The results of this study showed that the prevalence of UTI in women was significantly higher than in men. These results are consistent with other studies in Iran and other countries [14, 16]. Women are more susceptible to colonization with enteric bacteria due to the proximity of urethra to the anus. The majority of ESBL-producing strains were also found among women (P=0.007).

The prevalence of ESBL-positive strains in our study was 36%. Its prevalence rate has been reported different in different countries and even in different hospitals. This is due to differences in treatment regimen applied in different regions. Overuse of antibiotics, especially cephalosporins, is one of the most important causes of the high prevalence of ESBL-producing strains.

In this study, ESBL-producing strains showed high resistance to ciprofloxacin. Studies in Iran have shown that ciprofloxacin is prescribed more than other antibiotics to treat UTI. This may contribute to an increase in the prevalence of antibiotic-resistant isolates. The results of this study indicate that this drug as an experimental antibacterial drug, cannot have the appropriate effect. High resistance to aminoglycosides, carbapenems and cotrimoxazole was observed in our study, which was higher compared to other studies in Iran and other countries. ESBL production is usually associated with resistance to several antibiotics. Since ESBL genes are encoded by plasmids, they usually carry genes resistant to other antibiotics as well. One worrying outcome of this study was the high resistance to carbapenems. Although most studies have indicated imipenem as a suitable drug to treat infections caused by ESBL-producing strains, the isolates in our study showed high resistance to imipenem. In this study, 47.2% of isolates had TEM gene. Similarly, in studies conducted in India, 47.93% of ESBL-producing isolates had TEM gene, while prevalence of TEM genes in Thailand was 31.93%. Antibiotics used in a hospital or region can affect the distribution of resistance genotypes.

Escherichia coli was isolated as the most common cause of UTI. The majority of ESBL-producing strains were resistant to most of the antibiotics used to treat UTI. A high percentage of these strains were resistant to imipenem and hence, imipenem has no effect on treatment. The findings of this study raise concerns about the release of ESBL-producing *Escherichia coli* strains and emphasize their detection in medical diagnostic laboratories and careful monitoring of their resistance patterns.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Research Ethics Committee of Islamic Azad University of Tehran Medical Branch (Code: IR.IAU.TMU.REC.1396.274).

Funding

This study was derived from an MSc. thesis of Fariba Adham funded by the Islamic Azad University, Islamshahr branch, Islamshahr, Iran.

Authors' contributions

Conceptualization, methodology, validation, supervision, data analysis, initial draft preparation, editing and review: Maryam Ghane; Investigation, resources, experiments and analysis: Fariba Adham.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

This Page Intentionally Left Blank

فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز TEM و PER در ایزوله‌های ادراری *اشرشیاکلی* مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در شهرستان کرج

*مریم قانع^۱، فریبا ادهم^۱

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر، افزایش سویه‌های *اشرشیاکلی* تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL) منجر به محدود شدن گزینه‌های درمانی شده است. این مطالعه به منظور یافتن ژن‌های bla_{TEM} و bla_{PER} در ایزوله‌های ادراری *اشرشیاکلی* مولد ESBL و تعیین الگوی مقاومت آن‌ها انجام شد.

مواد و روش‌ها: از بهمن ۱۳۹۴ تا اسفند ۱۳۹۵، ۹۷۲ نمونه از بیماران مشکوک به عفونت ادراری از سه بیمارستان اصلی و آزمایشگاه‌های شهرستان کرج جمع‌آوری شدند. شناسایی باکتری‌ها، آزمون حساسیت میکروبی و تولید ESBL با استفاده از آزمون‌های استاندارد انجام شد. از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای تشخیص ژن‌های بتالاکتاماز TEM و PER استفاده شد.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه با کد IR.IAU.TMU.REC.1396.274 به تصویب کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران رسیده است.

یافته‌ها: از بین ۹۷۲ نمونه ادراری، ۵۰۰ ایزوله *اشرشیاکلی* جدا شد. ۱۸۰ ایزوله (۳۶ درصد) تولیدکننده ESBL بودند. در میان سویه‌های ESBL مثبت، بیشترین حساسیت نسبت به آمیکاسین و ایمی پنم (به ترتیب ۸۰ و ۶۰ درصد) مشاهده شد. مقاومت به کوتریموکسازول، سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین و جنتامیسین به ترتیب ۹۲/۷، ۷۸/۹، ۶۶/۱ و ۵۷/۸ درصد بود. همه سویه‌های ESBL مثبت مقاومت چندارویی داشتند. در میان سویه‌های ESBL مثبت، ژن bla_{TEM} در ۸۵ ایزوله (۴۴/۷۲ درصد) مشاهده شد، ولی ژن bla_{PER} در هیچ‌یک از ایزوله‌ها یافت نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج، شیوع بالایی از سویه‌های *اشرشیاکلی* تولیدکننده ESBL و مقاوم به چند دارو را نشان داد. نظارت مداوم بر باکتری‌های مولد ESBL و تعیین الگوهای مقاومتی آن‌ها می‌تواند به کاهش انتشار این گونه‌های مقاوم در جامعه کمک کند.

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۵ اردیبهشت ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: ۲۳ آذر ۱۳۹۸

تاریخ انتشار: ۱۲ بهمن ۱۳۹۸

کلیدواژه‌ها:

اشرشیاکلی، مقاومت دارویی، بتالاکتامازها

مقدمه

آن افزایش و پراکنده شدن باکتری‌های مقاوم در برابر چند داروست. در حال حاضر، کاهش حساسیت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها در ایزوله‌های ادراری *اشرشیاکلی* مشاهده می‌شود. این وضعیت به طور معمول در بیمارستان‌ها مشاهده می‌شود و می‌تواند به افزایش هزینه بیمارستان، اقامت طولانی‌مدت در بیمارستان و همچنین شکست درمان منجر شود [۱].

در میان آنتی‌بیوتیک‌ها، بتالاکتام‌ها به دلیل عدم سمیت به عنوان یکی از پر مصرف‌ترین داروهای شیمی‌درمانی محسوب می‌شوند. این ترکیبات در طی ۶۰ سال گذشته، در بین مؤثرترین داروها در درمان عفونت‌های باکتریایی ناشی از گونه‌های متعدد باکتری‌ها بوده‌اند و از سال ۲۰۰۴ بیش از ۶۵ درصد از بازار جهانی آنتی‌بیوتیک را به خود اختصاص داده‌اند [۲].

تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز توسط میکروارگانیزم‌های گرم مثبت

عفونت‌های دستگاه ادراری یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی در جامعه و نیز در بیمارستان‌هاست و باعث افزایش مرگ‌ومیر می‌شود. میکروارگانیزم‌های مختلفی مسئول ایجاد عفونت‌های ادراری هستند که در بین آن‌ها باکتری‌ها مهم‌ترین عوامل ایجادکننده بوده و در بین باکتری‌ها، *اشرشیاکلی* شایع‌ترین ارگانیزم است و بیش از ۸۰ درصد عفونت‌ها را شامل می‌شود [۱]. تشخیص بیش از ۱۵۰ میلیون مورد عفونت ادراری در هر سال در سراسر جهان، باعث شده که از زمان‌های گذشته از آن به عنوان یکی از متداول‌ترین عفونت‌های کسب‌شده از جامعه و نیز بیمارستان یاد شود [۲].

مصرف بیش از حد و سوءمصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های ادراری باعث فشار انتخابی آنتی‌بیوتیک شده که نتیجه

* نویسنده مسئول:

مریم قانع

نشانی: گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران.

تلفن: +۹۸ (۲۱) ۵۶۳۶۸۹۹۴

پست الکترونیکی: ghane@iaau.ac.ir; maryamghaneh@yahoo.com



شدند و از آن‌ها کشت خالص تهیه شد. شناسایی باکتری‌ها با استفاده از مورفولوژی، رنگ‌آمیزی گرم و خواص بیوشیمیایی آن‌ها انجام شد [۸]. آزمون‌های بیوشیمیایی مورد استفاده شامل کاتالاز، اکسیداز، کشت بر روی محیط SIM، محیط متیل رد، و ژس پروس کوثر، TSI و مصرف سیترات بودند. از ۹۷۲ نمونه ادراری مشکوک به عفونت ادراری ۵۰۰ سویه/شرشیاکلی شناسایی شد.

غربالگری سویه‌های تولیدکننده بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف و بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی

غربالگری سویه‌های/شرشیاکلی تولیدکننده بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف با استفاده از روش دیسک‌های ترکیبی و با استفاده از دو جفت دیسک سفوتاکسیم (۳۰ µg) و سفوتاکسیم / کلاوولانیک اسید (۳۰/۱۰ µg)، سفتازیدیم (۳۰ µg) و سفتازیدیم / کلاوولانیک اسید (۳۰/۱۰ µg) (شرکت روسکو، دانمارک) و مطابق با توصیه‌های مؤسسه استاندارد روش‌های آزمایشگاهی^۱ انجام شد [۹]. برای این منظور چند کلنی از کشت شبانه باکتری‌ها در محیط نوترینت آگار برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند تهیه شد و با استفاده از سوپ استریل بر روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) به صورت متراکم کشت داده شد.

پس از قراردادن دیسک‌ها بر روی پلیت و گرماگذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس، مسافت انتشار اطراف هر دیسک با استفاده از خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری و نتایج با استفاده از جداول استاندارد CLSI تفسیر شدند. اختلاف ≥ 5 mm بین قطر هاله عدم رشد اطراف سفوتاکسیم و سفوتاکسیم / کلاوولانیک اسید و نیز سفتازیدیم و سفتازیدیم / کلاوولانیک اسید به عنوان فنوتیپ مثبت در نظر گرفته شد. برای کنترل کیفی نتایج ESBL، از سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 استفاده شد.

سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مولد بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین (۱۰ µg)، تتراسایکلین (۳۰ µg)، تری متوپریم سولفامتوکسازول (۲۵ µg)، ایمی‌پنم (۱۰ µg)، آمیکاسین (۳۰ µg) و سیپروفلوکساسین (۵ µg) (شرکت روسکو، دانمارک) انجام شد. برای کنترل کیفی آنتی‌بیوگرام از سویه/شرشیاکلی ATCC25922 استفاده شد برای این منظور سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند از سویه مذکور تهیه شد و با استفاده از سوپ استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت متراکم کشت داده شد و دیسک‌ها با فاصله ۲۲ میلی‌متر از یکدیگر بر روی پلیت قرار داده شد. کنترل کیفی دیسک‌ها به صورت روزانه انجام گرفت.

و گرم منفی مهم‌ترین مکانیسم مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است. بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که باعث ایجاد مقاومت به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف می‌شوند. از آنجایی که این آنتی‌بیوتیک‌ها توسط پلاسمید رمز می‌شوند، مقاومت باکتریایی به دلیل این آنتی‌بیوتیک‌ها به سرعت منتشر می‌شود. این پلاسمیدها اغلب ژن‌های مقاومت در برابر سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مانند آمینوگلیکوزیدها، فلوروکینولون‌ها، تتراسایکلین، کلرامفنیکل و تری متوپریم سولفامتوکسازول را نیز با خود حمل می‌کنند [۵].

در باکتری‌ها مکانیسم اصلی مقاومت نسبت به بتالاکتام‌ها بیان بتالاکتام‌های TEM است. بتالاکتاماز TEM اولین بار در یک بیمار مبتلا به عفونت ادراری به نام تمورینا شناسایی شد. بتالاکتام‌های TEM یکی از مهم‌ترین بتالاکتام‌های پلاسمیدی در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه و از علل مهم بروز مقاومت‌های چندارویی در عفونت‌های بیمارستانی هستند. بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف وابسته به TEM، اغلب از بتالاکتام‌های اصلی (TEM-1، TEM-2) با جایگزینی یک یا دو اسید آمینه در جایگاه فعال آنتی‌بیوتیک حاصل شده‌اند [۶].

آنتی‌بیوتیک‌های PER نوع دیگری از بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف هستند. این آنتی‌بیوتیک‌ها برای اولین بار در سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شدند، اما در سایر ارگانیزم‌ها، به‌ویژه در ایزوله‌های اسپینتوباکتر نیز شناسایی شده‌اند [۷].

درمان عفونت‌های ادراری اغلب به طور تجربی و بر اساس گزارشات موجود در زمینه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی پاتوژن‌های ادراری آغاز می‌شود. ارائه مداوم الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در هر منطقه می‌تواند علاوه بر درمان عفونت‌های ادراری، از انتشار سویه‌های مقاوم جلوگیری کند. بنابراین، هدف از این مطالعه، تعیین میزان شیوع باکتری‌های/شرشیاکلی تولیدکننده بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف جداشده از ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری، تعیین حساسیت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده در عفونت ادراری و بررسی میزان شیوع بتالاکتام‌های نوع TEM و PER بود.

مواد و روش‌ها

کشت نمونه و شناسایی باکتری‌ها

این مطالعه مقطعی توصیفی در یک بازه زمانی ۱۳ ماهه (از بهمن ۱۳۹۴ تا دی ۱۳۹۵) بر روی ۹۷۲ نمونه مشکوک به عفونت ادراری با علائم سوزش و تکرر ادرار از بیماران سرپایی مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های امام خمینی، قائم و شهید رجایی شهرستان کرج و نیز آزمایشگاه‌های این شهرستان صورت گرفت. نمونه‌های ادراری از قسمت میانی جریان ادرار بیماران مشکوک به عفونت ادراری در لوله‌های استریل جمع‌آوری شدند. از نمونه‌های ادراری بر روی محیط بلاد آگار، آئوزین متیلن بلو آگار (مرک، آلمان) تلقیح شدند. بعد از گرماگذاری در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت، پلیت‌هایی که رشد قابل ملاحظه داشتند (10^5 CFU) برای آزمایشات بعدی انتخاب

1. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)

شناسایی مولکولی ژن‌های bla_{PER} و bla_{TEM}

یافته‌ها

در مجموع، از ۹۷۲ نمونه مشکوک به عفونت ادراری، ۷۸۰ نمونه عفونی تشخیص داده شد و از بین آن‌ها ۵۰۰ ایزوله/شرشیاکلی جداسازی شد. میانگین سنی افراد مبتلا ۴۵±۱۶ سال بود. در این بین ۱۶۹ نمونه (۳۳/۸ درصد) مربوط به مردان و ۳۳۱ نمونه (۶۶/۲ درصد) مربوط به زنان بود. از بین ۵۰۰ ایزوله/شرشیاکلی، ۱۸۰ ایزوله (۳۶ درصد) از لحاظ تولید بتالاکتاماز، مثبت بودند. تعداد سویه‌های ESBL در زنان (۱۳۲ نمونه؛ ۷۳/۳۳ درصد) بیش از مردان (۸ نمونه؛ ۲۶/۶۷ درصد) بود ($P=۰/۰۰۷$).

حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مولد ESBL در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود سویه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نسبت به کوتریموکسازول و سیپروفلوکساسین مقاومت بالایی نشان دادند.

نتایج حاصل از بررسی ژن‌های بتالاکتاماز TEM با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که ژن bla_{TEM} در ۸۵ ایزوله (۴۴/۷۲ درصد) مولد ESBL وجود دارد، در حالی که ژن‌های bla_{PER} در هیچ‌یک از ایزوله‌ها مشاهده نشد.

بحث

در طی دهه‌های گذشته، باسیل‌های گرم منفی تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به عنوان پاتوژن‌های مهم در عفونت‌های بیمارستانی و نیز عفونت‌های کسب‌شده از جامعه در سرتاسر جهان پدیدار شده‌اند. آگاهی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها و میزان شیوع آن‌ها در هر منطقه می‌تواند به کنترل این میکروارگانیسم‌ها کمک کرده و از انتشار این پاتوژن‌ها جلوگیری کند. این مطالعه بر روی ۹۷۲ نمونه ادراری مشکوک به عفونت ادراری که به بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های شهرستان کرج ارجاع داده شده بود، صورت گرفت. از بین نمونه‌های مورد آزمایش، ۷۸۰ نمونه عفونی تشخیص داده شد و باکتری/شرشیاکلی از ۵۰۰ نمونه (۶۴/۱ درصد) جداسازی شد.

در مطالعات انجام‌شده توسط جبرالدینی و همکاران باکتری/شرشیاکلی از ۴۳/۷ درصد نمونه‌های عفونی ادراری جدا شد [۱۲]. در مطالعه محمدی و همکاران در سنجند نیز اشریشیاکلی با ۶۳/۹

برای تهیه DNA ژنومی، تکه‌هایی از چند کلنی از هر یک از سویه‌های جداشده در پنج میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی (LB) (مرک، آلمان) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به صورت شبانه کشت داده شد. سپس استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناکلون، ایران) و بر اساس دستور کار شرکت سازنده کیت صورت گرفت.

کمیت و کیفیت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل ۲۰۰۰ (آمریکا) در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. آزمایش PCR برای شناسایی ژن bla_{PER} و bla_{TEM} با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده و طول قطعات حاصل از PCR در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. واکنش PCR با استفاده از ۱۰ میکرولیتر مستر میکس (سیناژن، ایران)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۵۰ پیکومول)، ۲ میکرولیتر (۵۰ پیکومول) DNA و آب مقطر دیونیزه استریل تا حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد.

برنامه زمانی PCR با یک سیکل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه آغاز شد. سپس با ۳۰ سیکل شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و طول‌سازی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه ادامه یافت. در نهایت ۱ سیکل ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه برای طول‌سازی نهایی انجام گرفت. واکنش PCR در دستگاه ترمال سایکلر (PEQ STAR، آلمان) انجام شد، سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (مرک، آلمان) الکتروفورز شدند.

از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 و سودوموناس آئروژینوزا سویه KOAS به ترتیب به عنوان کنترل مثبت برای ژن‌های TEM و PER استفاده شد [۱۱، ۱۰].

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و با استفاده از آزمون مربع کای انجام شد و $P \leq ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

منبع	طول قطعه (bp)	توالی (۵'–۳')	ژن هدف
۱۰	۴۴۵	F: TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA R: ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	bla_{TEM}
۱۱	۹۲۰	F: ATGAATGTCATTATAAAAGC R: AATTTGGGCTTAGGGCAGAA	bla_{PER}



جدول ۲. میزان حساسیت سویه‌های مولد ESBL به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن

آنتی‌بیوتیک	تعداد (درصد)	
	نیمه‌حساس	مقاوم
جنتامایسین	۸۵ (۴۷/۲)	۹۵ (۵۷/۸)
تتراسایکلین	۹ (۵)	۱۱۹ (۶۶/۱)
کوتریماکسازول	۲ (۱/۱)	۱۶۷ (۹۲/۷)
ایمی پنم	۱۸ (۱۰)	۵۴ (۳۰)
آمیکاسین	۰	۳۶ (۲۰)
سیپروفلوکساسین	۲ (۱/۱)	۱۴۲ (۷۸/۹)



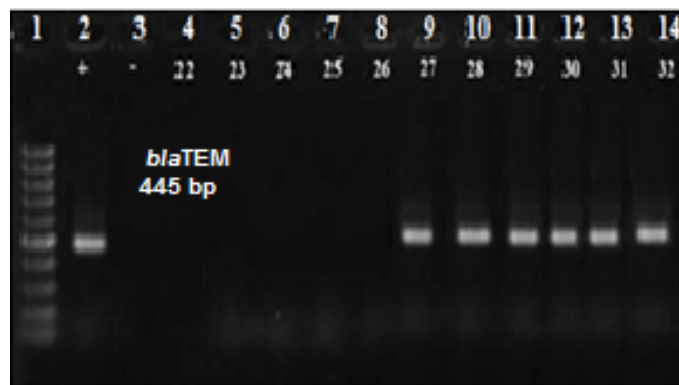
مشابه بود [۲۰]. شیوع پایین‌تری از *اشرشیاکلی* مولد ESBL در مطالعات بازی بورون و همکاران در سال ۲۰۱۸ (۲۵/۴ درصد) و اسلامی و همکاران در سال ۲۰۱۶ (۳۰/۵ درصد) مشاهده شد [۱۸، ۲۱]. شیوع سویه‌های مولد ESBL در نقاط مختلف دنیا، متفاوت گزارش شده است. میزان شیوع سویه‌های *اشرشیاکلی* مولد ESBL از ۳/۳ درصد در فرانسه تا ۶۱ درصد در هند متغیر است [۱۹، ۲۲]. نتایج نشان می‌دهد شیوع سویه‌های ESBL در کشورهای مختلف و حتی در بیمارستان‌های مختلف در یک شهر متفاوت است که این امر به دلیل تفاوت در رژیم درمانی به کار گرفته شده در مناطق مختلف است. مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌ویژه سفالوسپورین‌ها از مهم‌ترین عوامل شیوع بالای سویه‌های مولد ESBL است.

سویه‌های تولیدکننده ESBL مشکلات قابل توجهی را در درمان عفونت‌ها ایجاد می‌کنند؛ زیرا این پاتوژن‌ها به محدوده وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام شامل سفالوسپورین‌های نسل سوم مقاومت نشان می‌دهند. به علاوه آن‌ها به طور بالقوه دارای مقاومت کینولونی و کارباپنمی وابسته پلاسمید هستند [۱۴]. مطالعات نشان

درصد، شایع‌ترین باکتری جداشده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری بود [۱۳]. نتایج مشابهی در مطالعات انجام‌شده در سایر کشورها به دست آمد [۱۴، ۱۵].

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که شیوع عفونت ادراری در زنان به طور معنی‌داری بالاتر از مردان است. این نتایج با مطالعات انجام‌شده در ایران و سایر کشورها مطابقت دارد [۱۴، ۱۶]. نسبت مردان آلوده به زنان ۱:۱/۹۶ بود. زنان به دلیل کلونیزاسیون مجرای ادرار با باکتری‌های گرم منفی کلون که به دلیل نزدیکی مقعد و مجاری ادراری صورت می‌گیرد، بیشتر در معرض ابتلا به عفونت ادراری هستند [۱۷]. همچنین اکثریت سویه‌های تولیدکننده ESBL نیز در بین زنان مشاهده شد ($P=0/007$). این نتایج با مطالعات انجام‌شده در ایران در سال ۲۰۱۸ (۸۱/۸ درصد)، نپال در سال ۲۰۱۷ (۸۱/۸ درصد) و هند در سال ۲۰۱۶ (۶۲/۴ درصد) مطابقت دارد [۱۴، ۱۸، ۱۹].

میزان شیوع سویه‌های ESBL مثبت در مطالعه ما ۳۶ درصد بود که با مطالعات انجام‌شده در اصفهان در سال ۲۰۱۴ (۳۶ درصد)



تصویر ۱. نتایج حاصل از PCR ژن *bla_{TEM}* بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. ستون ۱ سایز مارکر ۱۰۰ pb، ستون ۲ کنترل مثبت (کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603)، ستون ۳ کنترل منفی، ستون ۴-۷ سویه‌های فاقد ژن *bla_{TEM}* و ستون ۹-۴۱ سویه‌های دارای ژن *bla_{TEM}*.

به اینکه حضور ژن TEM در تقریباً نیمی از ایزوله‌های ESBL مثبت به اثبات رسید، لازم است در مطالعات بعدی سایر ژن‌های مسئول فنوتیپ ESBL نظیر SHV و CTX-M نیز بررسی شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه باکتری *اشرشیاکلی* به عنوان شایع‌ترین عامل عفونت ادراری جدا شد. میزان شیوع سویه‌های *اشرشیاکلی* مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف با مقاومت چنددارویی بالا بود. نتایج نشان داد که اکثریت سویه‌های ESBL در برابر آنتی‌بیوتیک‌هایی که در درمان عفونت‌های ادراری به کار می‌روند، مقاوم هستند. همچنین نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که درصد بالایی از سویه‌های ESBL نسبت به ایمپنم مقاوم‌اند و ایمپنم به عنوان داروی انتخابی در درمان عفونت‌های ادراری تأثیر خود را از دست داده است. یافته‌های حاضر باعث افزایش نگرانی در مورد انتشار سویه‌های *اشرشیاکلی* تولیدکننده ESBL می‌شود و بر تشخیص سویه‌های تولیدکننده ESBL در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و نظارت دقیق بر الگوهای مقاومت آن‌ها تأکید دارد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه با کد IR.IAU.TMU.REC.1396.274 به تصویب کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران رسیده است.

حامی مالی

این مقاله برگرفته از پایان نامه خانم فریبا ادهم در مقطع کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی است که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر انجام شده است.

مشارکت‌نویسندگان

مفهوم‌سازی، روش‌شناسی، اعتبارسنجی، نظارت، تجزیه و تحلیل داده‌ها، تهیه پیش‌نویس اولیه، ویرایش و بررسی: مریم قانع؛ تحقیق، منابع، آزمایش و تجزیه و تحلیل داده‌ها: فریبا ادهم.

تعارض منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافی در خصوص این پژوهش وجود ندارد.

داده سویه‌های تولیدکننده ESBL در برابر عوامل ضد میکروبی نظیر تتراسایکلین، فلوروکینولون‌ها، آمینوگلیکوزیدها و تری متوپریم سولفامتوکسازول نیز مقاوم‌اند. الگوی مقاومت مشابهی در این مطالعه مشاهده شد. عوامل متعددی مسئول ایجاد چنین نرخ بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی هستند که شامل استفاده بی‌رویه از عوامل ضد میکروبی در بیمارستان‌ها و نیز خوددرمانی در جامعه است.

در این مطالعه سویه‌های مولد ESBL مقاومت بالایی به سیپروفلوکساسین نشان دادند (۷۸/۷۵ درصد). در مطالعات انجام گرفته توسط بازی بورون و همکاران، دوستی مهاجر و همکاران و نیز اسلامی و همکاران به ترتیب ۶۱، ۵۵ و ۷۶ درصد سویه‌های *اشرشیاکلی* به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند [۱۸، ۲۱، ۲۳]. میزان شیوع مقاومت به سیپروفلوکساسین در کشورهای هند (۸۲/۶ درصد) و ترکیه (۸۴ درصد) نیز بالا و مشابه نتایج این تحقیق بود [۱۹، ۲۴]. مطالعات انجام گرفته در ایران نشان داده که سیپروفلوکساسین بیش از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های ادراری تجویز می‌شود [۲۵] که این امر می‌تواند در افزایش شیوع ایزوله‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک نقش داشته باشد. افزایش مقاومت به این دارو در مطالعه ما نشان می‌دهد که این دارو به عنوان داروی آنتی‌باکتریال تجربی نمی‌تواند اثربخشی لازم را داشته باشد. همچنین در سویه‌های مورد مطالعه در این تحقیق مقاومت بالایی در برابر آمینوگلیکوزیدها، کاربامپن‌ها و کوتریموکسازول مشاهده شد و مقاومت به دست آمده نسبت به سایر مطالعات انجام شده در ایران و خارج از کشور بالاتر بود [۱۸، ۱۹، ۲۰].

معمولاً تولید ESBL با مقاومت به چندین آنتی‌بیوتیک همراه است؛ زیرا ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف توسط پلاسمیدها رمز می‌شوند و این پلاسمیدها معمولاً ژن‌های مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها را نیز با خود حمل می‌کنند. یکی از یافته‌های نگران‌کننده در این تحقیق، مقاومت بالا نسبت به کاربامپن‌ها است. اگرچه در اغلب مطالعات، ایمپنم به عنوان داروی مناسب برای درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مولد ESBL ذکر شده است، اما ایزوله‌های مورد مطالعه در این تحقیق مقاومت بالایی به ایمپنم داشتند (۳۳ درصد). نتایج حاصل از این تحقیق با مطالعات بابایی همتی و همکاران (۲۰۱۵) و مهدی پور مقدم و همکاران (۲۰۱۵) در رشت (به ترتیب ۳۶/۳۶ و ۳۳/۳۳ درصد) مطابقت دارد [۲۶، ۲۷].

در مطالعه حاضر ۸۵ ایزوله (۴۷/۲ درصد) دارای ژن TEM بودند. در مطالعه رضایی و همکاران فراوانی ژن TEM در بین ایزوله‌های ESBL مثبت ۴۹ درصد گزارش شده بود [۲۸] که با میزان شیوع ایزوله‌های مورد مطالعه در این تحقیق مطابقت دارد. به طور مشابه در مطالعات انجام شده در سال ۲۰۱۷ در هند ۴۷/۹۳ درصد ایزوله‌های مولد ESBL دارای ژن TEM بودند [۲۹]. در حالی که شیوع ژن‌های TEM در تایلند ۳۱/۹۳ درصد گزارش شده است [۳۰]. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در هر بیمارستان با هر منطقه می‌تواند توزیع ژنوتیپ‌های مقاومت را تحت تأثیر قرار دهد. با توجه

References

- [1] Jena J, Debata N K, Subudhi E. Prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase and metallo-beta-lactamase producing multi drug resistance gram-negative bacteria from urinary isolates. *Indian J Med Microbiol.* 2013; 3(31):420-1. [DOI:10.4103/0255-0857.118890] [PMID]
- [2] Gonzalez CM, Schaeffer AJ. Treatment of urinary tract infection: What's old, what's new, and what works. *World J Urol.* 1999; 17(6):372-82. [DOI:10.1007/s003450050163] [PMID]
- [3] Pitout JD, Sanders CC, Sanders WE. Antimicrobial resistance with focus on beta-lactam resistance in gram-negative bacilli. *Am J Med.* 1997; 103:51-9. [DOI:10.1016/S0002-9343(97)00044-2]
- [4] Worthington RJ, Melander C. Overcoming resistance to β -lactam antibiotics. *J Org Chem.* 2013; 78(9):4207-13. [DOI:10.1021/jo400236f] [PMID] [PMCID]
- [5] Bagattini M, Crivaro V, Di Popolo A, Gentile F, Scarcella A, Triassi M, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57(5):979-82. [DOI:10.1093/jac/dki077] [PMID]
- [6] Tenover FC, Raney PM, Williams PP, Rasheed JK, Biddle JW, Oliver A, et al. Evaluation of the NCCLS extended-spectrum β -lactamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during project ICARE. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(7):3142-6. [DOI:10.1128/JCM.41.7.3142-3146.2003] [PMID] [PMCID]
- [7] Tada T, Shrestha S, Shimada K, Ohara H, Sherchand JB, Pokhrel BM, et al. PER-8, a novel extended-spectrum β -lactamase per variant, from an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate in Nepal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 23:61(3). [DOI:10.1128/AAC.02300-16] [PMID] [PMCID]
- [8] Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. *Manual of clinical microbiology.* 10th ed. Washington D.C: American Society of Microbiology; 2011. [DOI:10.1128/9781555816728]
- [9] Wayne P. M100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 27th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2017.
- [10] Monstain HJ, Ostholm- Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex amplification assay for detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *APMIS.* 2007; 115(12):1400-8. [DOI:10.1111/j.1600-0463.2007.00722.x] [PMID]
- [11] Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(8):2385-92. [DOI:10.1128/AAC.47.8.2385-2392.2003] [PMID] [PMCID]
- [12] Jabrodini A, Heidari F, Taghavi SF, Shokouh MR. [The investigation of frequency and antibiotic resistance pattern of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from urinary tract infection in outpatients referred to Amiralmomenin Ali hospital in Gerash city in 2017: A short Report (Persian)]. *J Rafsanjan Univ Med Sci.* 2018; 17:(1)75-84.
- [13] Mohammadi S, Ramazanzade R, Zandi S, Rouhi S, Mohammadi B. [Determination of prevalence of isolated bacteria from urinary tracts and antibiotic resistant pattern of them in Tohid hospital of Sanandaj (2013-2014) (Persian)]. *Zanko J Med Sci.* 2015; 50(16):55-62.
- [14] Shakya P, Shrestha D, Maharjan E, Sharma VK, Paudyal R. ESBL production among *E. coli* and *Klebsiella* spp. causing urinary tract infection: A hospital based study. *Open Microbiol J.* 2017; 11:23-30. [DOI:10.2174/1874285801711010023] [PMID] [PMCID]
- [15] Khawcharoenporn T, Vasoo S, Singh K. Urinary tract infections due to multidrug-resistant enterobacteriaceae: Prevalence and risk factors in a Chicago emergency department. *Emerg Med Int.* 2013; 2013:258517. [DOI:10.1155/2013/258517] [PMID] [PMCID]
- [16] Molazade A, Gholami MS, Shahi A, Najafipour S, Mobasheri F, Ashraf Mansuri JA, et al. [Evaluation of antibiotic resistance pattern of isolated gram-negative bacteria from urine culture of hospitalized patients in different wards of vali asr hospital in Fasa during the years 2012 and 2013 (Persian)]. *J Fasa Univ Med Sci.* 2014; 4(2):275-83.
- [17] Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.* 12th ed. Maryland Heights: Mosby Elsevier; 2007.
- [18] Baziboroun M, Bayani M, Poormontaseri Z, Shokri M, Tahmineh Biazar T. Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of extended spectrum beta lactamases producing *Escherichia coli* isolated from outpatients with urinary tract infections in Babol, northern of Iran. *Curr Issues Pharm Med Sci.* 2018; 31(2):61-4. [DOI:10.1515/cipms-2018-0013]
- [19] Singh N, Pattnaik D, Neogi DK, Jena J, Mallick B. Prevalence of ESBL in *Escherichia coli* isolates among ICU patients in a tertiary care hospital. *J Clin Diagn Res.* 2016; 10(9):19-22. [DOI:10.7860/JCDR/2016/21260.8544] [PMID] [PMCID]
- [20] Moayednia R, Shokri D, Mobasherizadeh S, Baradaran A, Fatemi SM, Merrikhi A. Frequency assessment of β -lactamase enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates in patients with urinary tract infection. *J Res Med Sci.* 2014; 19(Suppl. 1):S41-5. [PMID] [PMCID]
- [21] Eslami G, Rezaie MS, Salehifar E, Rafiei A, Langaie T, Rafati M, et al. [Epidemiology of extended spectrum beta lactamases producing *E. coli* genes in strains isolated from children with urinary tract infection in north of Iran (Persian)]. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2016; 25(132):270-9.
- [22] Martin D, Fougnot S, Grobost F, Thibaut-Jovelin S, Ballereau F, Guedet T, et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in community-onset urinary tract infections in France in 2013. *J Infect.* 2016; 72(2):201-6. [DOI:10.1016/j.jinf.2015.11.009] [PMID]
- [23] Doosti Mohajer M, Pajavand H, Abiri R, Alvand A. [Phenotypic and Genotypic Efflux pumps in resistance to Fluoroquinolones in *E.coli* isolated from inpatients in Kermanshah hospitals in 2013 (Persian)]. *Arak Med Uni J.* 2017; 20(126):22-32.
- [24] Azap OK, Arslan H, Serefhanoğlu K, Colakoğlu S, Erdoğan H, Timurkaynak F, et al. Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase positivity in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(2):147-51. [DOI:10.1111/j.1469-0691.2009.02941.x] [PMID]
- [25] Hashemi S, Nasrollah A, Rajabi M. Irrational antibiotic prescribing: A local issue or global concern? *EXCLI J.* 2013; 12:384-95. [PMID] [PMCID]
- [26] Babaei Hemmati T, Mehdipour Moghaddam MJ, Salehi Z, Habibzadeh SM. Prevalence of CTX-M-Type β -lactamases in multi-drug resistant *Escherichia coli* isolates from north of Iran, Rasht. *Biol J Microorg.* 2015; 3:69-78.
- [27] Mehdipour Moghaddam MJ, Mirbagheri AA, Salehi Z, Habibzadeh SM. Prevalence of class 1 integrons and extended spectrum beta lactamases among multi-drug resistant *Escherichia coli* isolates from north of Iran. *Iran Biomed J.* 2015; 19(4):233-9. [DOI:10.7508/ibj.2015.04.007] [PMID] [PMCID]

- [28] Rezai MS, Salehifar E, Rafiei A, Langae T, Rafati M, Shafahi K, et al. Characterization of multidrug resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among Uropathogens of pediatrics in north of Iran. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:309478 [DOI:10.1155/2015/309478] [PMID] [PMCID]
- [29] Jena J, Sahoo RK, Debata NK, Subudhi E. Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M genes of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections in adults. *3 Biotech.* 2017; 7(4):244. [DOI:10.1007/s13205-017-0879-2] [PMID] [PMCID]
- [30] Bubpamala J, Khuntayaporn P, Thirapanmethee K, Montakantikul P, Santanirand P, Chomnawang MT. Phenotypic and genotypic characterizations of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Thailand. *Infect Drug Resist.* 2018; 11: 2151-7. [DOI:10.2147/IDR.S174506] [PMID] [PMCID]