

اثرات عصاره هیدروالکلی گیاه تیمبر بر باکتری‌های گرم مثبت و منفی بیماری‌زا

- سمیه سبزی علی^۱، سالار بختیاری^{۲*}، آرمان رستم زاد^۴، کریمه حقانی^۳، کیانا شاهزمانی^۵
- ۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران.
- ۲- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران.
- ۳- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران.
- ۴- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.
- ۵- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران.

یافته / دوره شانزدهم / شماره ۲ / تابستان ۹۳ / مسلسل ۶۰

چکیده

پذیرش مقاله: ۹۳/۵/۱۱

دریافت مقاله: ۹۳/۳/۷

*** مقدمه:** درمان بیماری‌های باکتریایی توسط آنتی بیوتیک‌های سنتتیک با بروز مشکلاتی از قبیل ایجاد عوارض جانبی در انسان‌ها و ایجاد مقاومت در میکروارگانیسم‌ها همراه است. اخیراً به استعمال گیاهان در درمان بیماری‌های باکتریایی توجه زیادی شده است. از آنجایی که استفاد از گیاه تیمبر اسپیکاتا در طب سنتی ایران مرسوم است، در این تحقیق اثر ضد باکتریایی عصاره این گیاه بر روی تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا بررسی شد.

*** مواد و روش‌ها:** گیاه مذکور از کوه‌های زاگرس شهر ایلام جمع آوری و پس از شناسایی و نامگذاری، عصاره به روش ماسراسیون تهیه شد. غلظت‌های مختلف عصاره با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بر روی باکتری‌ها تأثیر داده شد. از آنتی بیوتیک‌های تشخیصی به عنوان کنترل مثبت و از DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. میزان MIC و MBC نیز مشخص شد.

*** یافته‌ها:** بیشترین تأثیر عصاره در باکتری‌های گرم مثبت دیده شد. بیشترین قطر هاله در غلظت ۷۶ mg/ml مشاهده، و در این میان *S. epidermidis* و *S. aureus* بیش از سایر میکروارگانیسم‌ها حساس بودند ($P < 0.05$). کمترین میزان MIC مربوط به *S. aureus* 1885 با میزان ۲/۵ و *S. epidermidis* 2405 با ۵ mg/ml بوده و *E. coli* و *K. pneumonia* با ۱۵ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، حساس‌ترین باکتری‌های گرم منفی به عصاره بودند ($P < 0.05$).

*** بحث و نتیجه‌گیری:** عصاره هیدروالکلی تیمبر تأثیر ضد باکتریایی قابل ملاحظه‌ای داشت. بررسی قطر هاله‌های عدم رشد نشان داد که عصاره در غلظت‌های مورد استفاده بر باکتری‌های گرم مثبت مؤثرتر بوده است.

*** واژه‌های کلیدی:** تیمبر اسپیکاتا، باکتری‌های گرم مثبت، باکتری‌های گرم منفی، عصاره هیدروالکلی.

* آدرس مکاتبه نویسنده مسئول: ایلام، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، گروه بیوشیمی بالینی.

پست الکترونیک: bakhtiyaribio@gmail.com

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی سابقه طولانی دارد. شواهد استفاده ایرانیان از طبیعت برای درمان بیماری‌ها در کتاب‌های ابن‌سینا (۱۰۳۷-۹۸۰) و دیگر کتب و مدارک تاریخی ایران موجود است. در حال حاضر بیماری‌های عفونی ایجاد شده توسط باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بزرگترین عامل مرگ و میر در کشورهای صنعتی می‌باشد. به همین دلیل، در سال‌های اخیر مجدداً توجه میکروبیولوژیست‌های بالینی و پزشکان به استفاده از گیاهان دارویی سوق داده شده است.

گیاهان متابولیت‌هایی تولید می‌کنند که می‌توان از آنها علیه حشرات، ویروس‌ها و میکروارگانیسم‌ها استفاده کرد (۱، ۲). همچنین گیاهان در پاسخ به برخی آلودگی‌ها و شرایط استرسی متابولیت‌های ثانویه‌ای با خاصیت ضدباکتریایی تولید می‌کنند (۳). بنابراین گیاهان می‌توانند به عنوان کارخانه‌های طبیعی تولید ترکیبات ضد میکروبی عمل کنند. آویشن زوفایی (*Thymbra spicata*) از خانواده لابیاسه (*Labiaceae*)، گیاهی است پایا که ترجیحاً در مناطق خشک و آفتابی تپه‌ها و مرغزارهای خشک می‌روید.

ارتفاع این گیاه متفاوت و حدود ۴۰-۱۵ سانتی‌متر است و دارای گل‌های ارغوانی زیباست (۴). ماه‌های اردیبهشت تا خرداد فصل شکوفایی و باروری تیمبر است. به خاطر وجود تیمول و کارواکرول به میزانی که برای فعالیت‌های بیولوژیک و دارویی مهم است گیاه شهرت زیادی دارد. اسانس موجود در قسمت‌های مختلف گیاه منبع خوبی از خواص ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدان است (۵). این گیاه در طب سنتی ترکیه، یونان، مصر و روم برای درمان آسم و

برونشیت استفاده می‌شده و در حال حاضر نیز برای بهبود طعم غذا استفاده می‌شود.

این گیاه بومی استان ایلام بوده که مصارف سنتی فراوانی داشته و در بین اهالی منطقه از توجه و اهمیت خاصی برخوردار است (۶). هدف این مطالعه بررسی خواص ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی تیمبر اسپیکاتا بومی استان ایلام و مقایسه آن با آنتی‌بیوتیک‌های تشخیصی است.

مواد و روش‌ها

بخش‌های هوایی گیاه تیمبر (آویشن زوفایی) در اواخر اردیبهشت و اوایل خرداد ماه از رشته کوه‌های زاگرس در اطراف شهر ایلام جمع‌آوری شدند. پس از نامگذاری و شناسایی توسط کارشناسان گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام در دمای اتاق و در سایه خشک شدند.

بخش‌های هوایی گیاه توسط آسیاب خرد شدند. مقدار ۲۰۰ گرم از پودر آسیاب شده را در یک لیتر حلال آب مقطر- اتانول (مرک آلمان) با نسبت مساوی ریخته و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و در تاریکی انکوبه شدند. سپس عصاره از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ عبور داده شد. مقدار ۲۴۰ میلی لیتر عصاره قهوه ای تیره با pH=۶/۱ جدا سازی شد. محلول حاصل به منظور تبخیر حلال در اون ۴۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴ روز قرار داده شد (۷).

باکتری‌های مورد آزمایش شامل *S.aureus* ATCC ۱۸۸۵، *E.faecalis* ATCC ۲۳۲۱، *P.aeruginosa* ATCC ۲۴۰۵، *S.epidermidis* ATCC ۱۲۲۲۸، *K.pneumonia* ATCC ۴۹۶۱، *S.typhi* ATCC ۱۹۶۱۹، *M.morganii* ATCC ۲۹۲۲۲، *E.coli* ATCC ۲۹۵۲۲، *B.cereus* ATCC ۲۹۵۴۱ و *E.aerogenes* ATCC ۲۹۵۴۲ بودند که از بانک میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه ایلام تهیه شدند به منظور

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره تیمبر از روش کربی- بوئر استفاده شد.

باکتری‌های تحت مطالعه روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس از کلنی‌های این محیط توسط سرم فیزیولوژی رقت نیم مک‌فارلند که OD آن در طول موج ۶۲۰ نانومتر برابر با ۰/۰۸-۰/۱ است، تهیه شد. از سوسپانسیون باکتری‌ها به وسیله سوپ کتانی استریل کشت چمنی گسترده بر روی محیط مولر هینتون آگار تهیه شد، سپس دیسک‌های کاغذی که قبلاً به عصاره آغشته شده و خشک شده بودند بر روی پلیت قرار داده شدند.

در این تحقیق از آنتی‌بیوتیک‌های تشخیصی کلیندامایسین، استرپتومایسین، کانامایسین، جنتامیسین، متی‌سیلین، سیپروفلوکساسین و وانکومایسین نیز برای مقایسه تأثیر عصاره استفاده شد، از دیسک‌های حاوی DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سپس پلیت‌ها درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله‌های عدم رشد به وسیله خط کش میلیمتری اندازه‌گیری شد (۸،۹).

تعیین میزان MIC و MBC

به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC)، ابتدا از باکتری‌ها کشت تازه تهیه شد. پس از تهیه نیم مک‌فارلند از باکتری‌ها در محیط مولر هینتون برات، مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده به هر یک از چاهک‌ها، که حاوی ۵۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون برات بودند اضافه شد. سپس به هر چاهک میزان ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های تهیه شده، عصاره اضافه شد. پلیت‌های ۹۶ خانه به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شدند. سپس با مقایسه کدورت چاهک‌های تحت تیمار با چاهک‌های کنترل میزان MIC مشخص شد.

به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از باکتری‌های تحت تیمار در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه از یک رقت پایین‌تر از حداقل غلظت مهارکنندگی و دو رقت بالاتر از آن بر روی محیط مولر هینتون آگار به صورت خطی کشت داده شد و کمترین غلظتی که در آن خط رشدی بر روی محیط آگاردار دیده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد (۸،۹).

یافته‌ها

در این مطالعه اثر عصاره گیاه خرزهره با غلظت‌های مختلف به روش کربی- بوئر بر باکتری‌های *S.aureus* ATCC ۱۸۸۵، *E.faecalis* ATCC ۲۳۲۱، *P.aeruginosa* ATCC ۲۴۰۵، *S.epidermidis* ATCC ۱۲۲۲۸، *K.pneumonia* ATCC ۴۹۶۱، *S.typhi* ATCC ۱۹۶۱۹، *M.morganii* ATCC ۲۹۴۲۲، *E.coli* ATCC ۲۹۴۲۲، *B.cereus* ATCC ۲۵۲۶۹ و *E.aerogenes* ATCC ۲۹۴۲۲ بررسی و نتایج حاصل نشان داد که گیاه مورد نظر دارای اثر ضد باکتریایی است.

فعالیت ضد باکتریایی عصاره با اندازه‌گیری حضور و یا عدم حضور هاله عدم رشد و اندازه‌گیری قطر این هاله‌ها انجام شد. نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی تیمبر دارای خواص ضد باکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد. در این پژوهش قطر هاله عدم رشد کمتر از ۸ میلی‌متر به عنوان مقاوم، ۸ تا ۹ میلی‌متر نسبتاً مقاوم، بیشتر از ۱۰ تا ۱۲ میلی‌متر به عنوان نسبتاً حساس و بیشتر از ۱۲ میلی‌متر به عنوان حساس در نظر گرفته شد (۱۰،۱۱).

میزان اثربخشی عصاره بسته به نوع ارگانیزم متفاوت است. جدول ۱ نشان می‌دهد که تمام باکتری‌های گرم مثبت در ۳ غلظت اولیه نسبت به عصاره حساس بوده‌اند. بیشترین تأثیر عصاره در غلظت ۷۶ میلی‌گرم/میلی‌لیتر دیده شد. بیشترین قطر هاله عدم رشد در این غلظت مربوط به باکتری

۱۸۸۵ *S. aureus* ATCC با ۱۹ میلی‌متر و کمترین تأثیر عصاره در همین غلظت به *E. faecalis* ATCC ۲۳۲۱ و *B. cereus* اختصاص یافت. نتایج مربوط به باکتری‌های گرم منفی (جدول ۳) نشان داد که تمام باکتری‌ها در دو غلظت اولیه (۷۶ و ۳۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) نسبت به عصاره کاملاً حساس بودند. بیشترین قطر هاله عدم رشد در غلظت اولیه در بین باکتری‌های گرم منفی مربوط به باکتری *E. coli* و *K. pneumoniae* و کمترین میزان قطر هاله عدم رشد مربوط به *S. typhi* بود. بررسی نتایج MIC و MBC نشان داد که در بین باکتری‌های گرم مثبت (جدول ۲) کمترین میزان MIC مربوط به باکتری *S. aureus* ATCC ۱۸۸۵ با ۲/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و کمترین میزان MIC در بین باکتری‌های گرم منفی (جدول ۴) مربوط به باکتری‌های *M. morganii*، *P. aeruginosa* و *K. pneumoniae* بود.

جدول ۱. تأثیر آنتی‌بیوتیک‌ها و عصاره هیدروالکلی گیاه تیمبر بر باکتری‌های گرم مثبت

آنتی‌بیوتیک‌ها و غلظت‌های مختلف عصاره	<i>S. aureus</i> ATCC ۱۸۸۵	<i>E. faecalis</i> ATCC ۲۳۲۱	<i>B. cereus</i>	<i>S. epidermidis</i> ATCC ۲۴۰۵
Vancomycin	۶	۱۴	۶	۶
Ciprofloxacin	۲۷/۶۶	۱۸/۶۶	۲۴	۲۷/۳۳
Clindamycin	۹/۳۳	۸/۳۳	۶	۸/۶۶
Sterptomycin	۱۲/۳۳	۱۷/۳۳	۱۴/۳۳	۶
Methicillin	۶	۶	۶	۶
Gentamicin	۲۳	۲۲	۲۴/۳۳	۱۹/۳۳
kanamycin	۲۳	۶	۱۴	۶
۷۶	۱۹*	۱۶	۱۶	۱۸*
۳۸	۱۶	۱۳/۵۰	۱۳	۱۴
۱۹	۱۳	۱۱	۱۱	۱۱
۹/۵	۱۱	۱۰	۹	۱۲
۵	۹	۸	۶	۱۰
۲/۵	۶	۷	۶	۸
۱/۵	۶	۶	۶	۶

*، معنی‌دار ($P < 0.05$).

جدول ۲. حداقل غلظت مهارکننده حداقل غلظت کشنده عصاره هیدروالکلی تیمبر بر باکتری‌های گرم مثبت

	<i>S. aureus</i> ATCC ۱۸۸۵	<i>E. faecalis</i> ATCC ۲۳۲۱	<i>B. cereus</i>	<i>S. epidermidis</i> ATCC ۲۴۰۵	
غلظت عصاره (mg/ml)	MIC	۲/۵*	۵	۹/۵	۵*
	MBC	۵*	۹/۵	۱۹	۵*

*، معنی‌دار ($P < 0.05$).

جدول ۳. تأثیر آنتی‌بیوتیک‌ها و عصاره هیدروالکلی گیاه تیمبر بر باکتری‌های گرم منفی

آنتی‌بیوتیک‌ها و غلظت‌های مختلف عصاره	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. organii</i>	<i>S. typhi</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>E. aerogenes</i>
Vancomycin	۶	۶	۶	۶	۶	۱۱
Ciprofloxacin	۲۱	۲۶/۳۳	۲۴/۶۶	۲۷/۶۶	۲۹	۲۵
Clindamycin	۶	۶	۶	۶	۶	۶
Gentamicin	۱۴/۳۳	۱۹/۳۳	۱۷/۳۳	۲۲/۶۶	۱۹/۶۶	۲۰/۶۶
Sterptomycin	۶	۱۲/۶۶	۱۲/۶۶	۹/۶۶	۱۴/۶۶	۱۵
Methicillin	۶	۶	۶	۶	۶	۶
kanamycin	۲۱	۱۱	۶	۱۲	۲۴	۲۰
۷۶	۱۳	۱۵*	۱۳	۱۱	۱۵*	۱۲
۳۸	۱۱	۱۱	۱۰	۹	۱۲/۵	۹
۱۹	۱۰	۹	۸	۸	۱۰/۵۰	۸
۹/۵	۹	۷	۶	۶	۷/۴۵	۷/۵۰
۵	۷	۶	۶	۶	۶	۷
۲/۵	۶	۶	۶	۶	۶	۶
۱/۵	۶	۶	۶	۶	۶	۶

*، معنی‌دار ($P < 0.05$).

جدول ۴. حداقل غلظت مهارکننده حداقل غلظت کشنده عصاره هیدروالکلی تیمبر بر باکتری‌های گرم منفی

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. organii</i>	<i>S. typhi</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>E. aerogenes</i>
غلظت عصاره (mg/ml)	MIC *۹/۵	۱۹	*۹/۵	۱۹	*۹/۵	۱۹
	MBC	۳۸	۱۹	۳۸	۱۹	۳۸

*، معنی‌دار ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری

میکروارگانیزم‌های خاک و یا قارچ‌ها تولید می‌شوند، گیاهان عالی نیز می‌توانند به عنوان منابع خوبی برای تهیه آنتی‌بیوتیک باشند. اجزای فعال برخی داروها به عنوان متابولیت ثانویه توسط برخی گیاهان تولید می‌شود (۱۴). پتانسیل گیاهان آلی برای خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی آشکار شده است و به نظر می‌رسد باعث پیشرفت درمان گیاهی شود. گیاهان می‌توانند به عنوان منابع عظیم دارویی به شمار بیایند که می‌توانند بدون عوارض جانبی یا با عوارض کمتر نسبت به داروهای شیمیایی باعث بهبود عملکرد داروهای شیمیایی شوند.

در طول تاریخ بشری بسیاری از بیماری‌های عفونی به طور سنتی با داروهای گیاهی درمان شده‌اند. وجود ترکیباتی با خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد سرطانی در گیاهان از مدت‌ها پیش به اثبات رسیده است (۱۲). گیاهان می‌توانند به عنوان یک منبع برای تولید مواد ضد میکروبی جدید عمل کنند، همچنین ترکیبات جدا شده از گیاهان سهم بسزایی در پیشبرد سلامت انسان دارند (۱۳). بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها توسط

باشد. در این مطالعه از عصاره هیدروالکلی گیاه تیمبر اسپیکاتا استفاده شده است زیرا تهیه عصاره نسبت به تهیه اسانس کم هزینه‌تر می‌باشد. همچنین برخلاف اسانس که حاوی ترکیبات لپیدی است، طی تهیه عصاره ترکیبات قندی نیز استخراج شده که دارای خواص ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای هستند.

از آنجایی که مطالعات اخیر نشان داده که اثر ضد باکتریایی بعضی از داروهای گیاهی در حد و یا بیشتر از بعضی از داروهای شیمیایی می‌باشد (۲۰)، امید است در آینده تحقیقات بیشتری در زمینه اثر ضد میکروبی این گیاه بر گونه‌های مختلف میکروبی انجام گیرد تا با یافتن مواد مؤثره ضد میکروبی گیاه تیمبر و فرمولاسیون آن تهیه اشکال دارویی مختلف از آن ممکن شده و اقدام ارزنده‌ای جهت بهبود بیماری‌هایی عفونی ناشی از گونه‌های مختلف میکروبی، انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام که با تصویب و تأمین هزینه‌های این طرح (شماره ۹۱۹۰۰۱/۱)، ما را در انجام این پروژه تحقیقاتی یاری رسانیده‌اند، سپاسگزاری می‌نماییم.

بنابراین ادامه پژوهش در مورد گیاهان دارویی امری ضروری به نظر می‌رسد. امروزه تلاش برای استخراج و شناسایی مواد مؤثر گیاهان که خاصیت ضد میکروبی دارند ادامه دارد (۱۵، ۱۶). تا کنون مطالعه‌ای روی عصاره‌ی تیمبر صورت نگرفته است، اما مطالعات محدودی روی اسانس این گیاه و ترکیبات آن انجام شده است. نگاهی اجمالی به نتایج بدست آمده در مطالعات گذشته، نشان می‌دهد که اسانس استخراج شده از اندام هوایی گیاه تیمبر حاوی ترکیباتی مثل تیمول و کارواکرول است (۱۷). آنالیز شیمیایی اسانس تیمبر اسپیکاتا و بررسی خواص ضد قارچی، ضد باکتریایی و ضد مایکوباکتریومی اسانس تهیه شده از برگ‌های تازه گیاه نشان دادند که اسانس گیاه حاوی ترکیبات مختلفی از جمله کارواکرول، P-سیمن، - میرسن، - ترپینن، - ترپینن، ترانس- کاروپیلن است. مشخص شد که اسانس و کارواکرول خواص ضد باکتریایی قوی دارند. همچنین اسانس و کارواکرول فعالیت ضد مایکوباکتریومی دارند (۱۸). در مطالعات انجام شده نشان داده شده است که اسانس تیمبر اسپیکاتا روی باکتری‌های *E. coli* و *B. cereus* مؤثرتر بوده است (۱۹).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی تیمبر خواص ضد باکتریایی قابل ملاحظه‌ای دارد. همچنین تأثیر عصاره بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است که این می‌تواند به دلیل تفاوت در ساختار باکتری‌ها

References

1. Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8(4): 557-584.
2. Patricia A. ESBL in 21st century: Characterization, Epidemiology and Detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(4): 933-951.
3. Sadeghi MR, Nahaei MR, Soltan Dallal MM. Resistance to Extended Spectrum - Lactam antibiotics in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from hospital. *Tabriz Uni Med J.* 2008; 30(2):79-86. (In Persian).
4. Mohajeri P, Izadi B, Rezai M, Falahi B, Khademi H. Assessment of the frequency of Extended Spectrum Beta Lactamases Producing, *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections and its Antibiotic Resistance Pattern in Kermanshah. *Ardebil Uni Med J.* 2011; 11(1): 86-94. (In Persian).
5. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Woods GL. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology.* 6th ed. Baltimore; Lippincott Williams & Wilkins. 2006; PP: 211-238.
6. Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; M100-S20.* CLSI Document. 2010; 30(1): 27-44.
7. 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.
8. Farsha S, Anvarinejad M, Mehrabi Tavana A, Ranjbar R, Japoni A, et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* strains isolated from children with community acquired urinary tract infections. *Afr J Microb Res.* 2011; 5(26): 4476-4483.
9. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;14(2):137-142.
10. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum betalactamase-producing organisms. *J Hosp Infect.* 2009; 73(4): 345-354.
11. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 (Suppl 1):144-153.
12. Masjedian GF, Valehi F, Talebi, Rastegar Lari A. Molecular evaluation of resistance to expanded antibiotics in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Med Microbiol.* 2007; 1(2):27-34. (In Persian).
13. Babypadmini S, Appalaraju B. Extended spectrum -lactamases in urinary isolates of *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae*-Prevalence and susceptibility pattern in a tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol.* 2004; 22 (3): 172-174.
14. Ndugulile F, Jureen R, Harthug S, Urassa W, Langeland N. Extended spectrum - lactamases among Gram negative bacteria

- of nosocomial origin from an intensive care unit of a tertiary health facility in Tanzania. *BMC Infect Dis.* 2005; 5: 86. doi: 10.1186/1471-2334-5-86
15. Bercion R, Mossoro-Kpinde D, Manirakiza A, Le Faou A. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among enterobacteriaceae uropathogens in Bangui, Central African Republic. *J Infect Dev Ctries.* 2009; 30 (3): 187-190.
16. Goyal A, Prasad KN, Prasad A, Gupta S, Ghoshal U, Ayagari A. Extended spectrum - lactamases in *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* and associated risk factors. *Indian J Med Res.* 2009; 129 (6): 695-700.
17. Ho PL, Wong RC, Chow KH, Yip K, Wong SS, Que TL. CTX-M type beta-lactamases among fecal *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in non-hospitalized children and adults. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008; 41(5): 428-432.
18. Patzer JA, Dzierzanowska D, Pawinska A, Turner PJ. High activity of meropenem against gram negative bacteria from a pediatric intensive care unit, 2001-2005. *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 29(3): 285-288.