



دکتر محمدمهدی سلطان‌دلال 1*
 آیلا صباغی 2
 دکتر جلیل فلاح 3
 هدروشا ملاآقامیرزایی 2
 دکتر عبدالعزیز رستگار لاری 1
 دکتر محمدرضا اشراقیان 4
 عاطفه فردصانعی 2

1- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 2- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی استادیار گروه میکروبیولوژی انستیتو بیوانفورماتیک
 4- استاد گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* نشانی نویسنده مسؤول: تهران، گروه پاتوبیولوژی، بخش میکروبی‌شناسی، دانشکده بهداشت مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تلفن: 021-88992971

نشانی الکترونیکی:

soltanirad34@yahoo.com

بررسی وجود ژن‌های بتالاکتامازی bla-SHV

و (bla-AmpC (CITM, FOX) در ایزوله‌های بالینی اشریشیاکلی

چکیده

زمینه: مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در میان ایزوله‌های بالینی، در اکثر مواقع ناشی از تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی است. در سال‌های اخیر، تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی طیف وسیع (ESBLs) و AmpC بتالاکتامازی در میان ایزوله‌های بالینی به ویژه باکتری Escherichia coli شیوع فراوانی یافته و از آنجا که این بتالاکتامازها شامل چندین زیر خانواده می‌باشند، طراحی و استفاده از پرایمرهای یونیورسال به منظور شناسایی کامل این زیر خانواده‌ها می‌تواند مفید واقع شود. لذا هدف از انجام این مطالعه، بررسی فنوتیپی شیوع آنزیم‌های ESBLs و شناسایی ژن‌های بتالاکتامازی SHV، CITM، FOX با استفاده از پرایمرهای یونیورسال از طریق PCR در نمونه‌های بالینی E.coli می‌باشد.

روش کار: 500 نمونه بالینی از بیمارستان‌های شهر تهران جمع‌آوری شد که از این بین، 200 باکتری E.coli از طریق تست‌های بیوشیمیایی انتخاب گردید و به منظور تشخیص فنوتیپی سویه‌های E.coli مولد آنزیم‌های بتالاکتامازی، تست‌های Disk diffusion method و Combined disk به کار گرفته شد که در نهایت سویه‌های غربال شده در تست‌های فنوتیپی، جهت PCR ژن‌های بتالاکتامازی SHV، CITM، FOX مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: از 200 سویه مورد بررسی، (64٪) 128 ایزوله از طریق تست‌های فنوتیپی برای انجام پروسه PCR ژن‌های SHV و AmpC انتخاب شد، (5/5٪) 7 و (10/2٪) 13 ایزوله با اطمینان 95٪ به ترتیب حاوی ژن‌های SHV و CITM بود و ژن FOX در هیچ ایزوله‌ای شناسایی نشد.

نتیجه‌گیری: شناسایی کامل آنزیم‌های بتالاکتامازی توسط آزمایشگاه‌ها می‌تواند در کنترل مقاومت و تجویز مناسب داروهای بتالاکتامی مفید واقع شود. لذا جهت اتخاذ این امر، استفاده از روش‌های مولکولی در کنار تست‌های فنوتیپی ضروری است.

واژگان کلیدی: اشریشیاکلی، بتالاکتامازهای وسیع الطیف گروه (SHV، AmpC) بتالاکتاماز

مقدمه

بین ارگانوسم‌های دیگر منتشر شده و از آنجا که در برابر مهارکنندگان بتالاکتامازی به ویژه کلاوونیک اسید مقاوم است، منجر به اختلال در نتیجه تست تأییدی و گزارش منفی کاذب ESBLs می‌گردد [9 و 10]. از این رو تشخیص فنوتیپی میکروارگانوسم‌های مولد AmpC و ESBLs دشوار است. لذا استفاده از روش‌های مولکولی در کنار روش‌های فنوتیپی ضروری می‌باشد. از آنجا که ژن‌های خانواده بتالاکتاماز شامل زیر خانواده‌های متعدد بوده، پرایمرهای یونیورسال می‌تواند برای شناسایی کامل این زیرخانواده‌ها مؤثر باشد [4]. هدف از این تحقیق، بررسی فراوانی انواع آنزیم‌های ESBLs و شناسایی ژن‌های بتالاکتامازی خانواده SHV (CITM, FOX و AmpC) در نمونه‌های بالینی E.coli با استفاده از پرایمرهای یونیورسال از طریق PCR، می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه سویه‌های باکتریایی، 500 نمونه بالینی شامل ادرار، مدفوع، خون و زخم در طی 6 ماه از بیمارستان‌های شهر تهران جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه گروه میکروبی‌شناسی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران انتقال داده شد. سپس نمونه‌ها بر روی محیط کشت انتخابی Hekton Entric Agar (HE) کشت داده شد و پلیت‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت انکوبه شدند. از طریق انجام تست‌های بیوشیمیایی بر روی کلنی‌ها، 200 ایزوله E.coli شناسایی گردید. کلنی‌های مربوط به ایزوله‌های مثبت E.coli را در 70- درجه سانتی‌گراد در محیط skim milk نگهداری کرده تا در مراحل بعدی، از این ایزوله‌ها استفاده شود.

شناسایی فنوتیپی سویه‌های مولد ESBLs و AmpC بتالاکتاماز، به پیشنهاد Clinical and laboratory standards institute (CLSI) standards institute به منظور غربالگری اولیه ارگانوسم‌های مولد آنزیم‌های ESBL، از آزمون دیسک آگار دیفیوژن استفاده شد. در این روش ابتدا پس از تهیه محیط مولر هیتون آگار (7/4 - pH=7/2)، سوسپانسیون میکروبی مطابق با غلظت نیم مک فارلند تهیه و به طور کامل بر روی محیط مزبور پخش شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تهیه شده از شرکت Mast، شامل: جنتامایسین (10 میکروگرم)، کوتریماکسازول (1/25 میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (30 میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (5 میکروگرم)، سفوتاکسیم (30 میکروگرم)، ایمپنم (10 میکروگرم)،

ظهور مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در میان پاتوژن‌ها به ویژه در مراکز درمانی و بیمارستان‌ها به یک معضل بزرگ در رابطه با سلامت همگانی تبدیل شده است. برخی از باکتری‌ها قادر به تولید آنزیم‌هایی هستند که منجر به تغییر و یا تخریب ساختار شیمیایی آنتی‌بیوتیک‌ها و در نهایت سبب غیر فعال شدن آنتی‌بیوتیک و بروز فنوتیپ مقاوم از سوی باکتری می‌شوند. بهترین مثال از این مقاومت‌ها، آنزیم‌های بتالاکتامازی بوده که از طریق هیدرولیز حلقه بتالاکتام، منجر به غیر فعال شدن آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌شوند [1 و 2]. امروزه کاربرد روزافزون داروهای ضد میکروبی از جمله آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورینی منجر به ظهور دسته دیگری از ژن‌های بتالاکتامازی شده که در مقایسه با بتالاکتام‌های اولیه (TEM-1, TEM-2, SHV-1) طیف فعالیت بیشتری دارند که می‌توان آن‌ها را تحت عنوان کلی ESBLs (Extended Spectrum Beta-Lactamases) نامید [3 و 4]. پدیده ESBLs برای اولین بار در سال 1983 از اروپا گزارش شد اما طولی نکشید که بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف در ایالات متحده آمریکا و آسیا نیز شناسایی شدند [5]. خانواده SHV از آنزیم‌های بتالاکتامازی طیف وسیع در سال 1983 از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه گزارش شد. ژن کد کننده این آنزیم در ایزوله‌های کلبسیلا یک ژن کروموزومی به حساب می‌آید اما این ژن به صورت فاکتور (R) Resistant، طی پدیده‌ای به نام کانژوگیشن در میان سویه‌های پاتوژن گسترش پیدا کرده است [4 و 6]. یافته‌های اخیر محققان نشان داده که یکی از مکانیسم‌های اصلی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در میان اعضای خانواده انتروباکتریاسه به ویژه E.coli تولید آنزیم‌های ESBLs می‌باشد که همین امر مشکلات بسیاری را در رابطه با تشخیص و درمان این سویه‌ها ایجاد نموده است [7]. بهترین روش برای شناسایی بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف، یک غربالگری اولیه برای حساسیت کاهش یافته نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پیشنهادی (CLSI) Clinical and laboratory standards institute است و سپس انجام آزمون‌های تأییدی، به منظور اثبات اثر سینرژسم، بین یک نشانگر سفالوسپورین و یک مهارکننده بتالاکتامازی می‌باشد [8]. اخیراً برخی از سویه‌های باکتریایی به ویژه E.coli و کلبسیلا شناسایی شده‌اند که مولد یک سفالوسپوریناز از خانواده بتالاکتاماز به نام AmpC می‌باشند. AmpC بتالاکتام‌ها عموماً کروموزومی بوده اما به واسطه عناصر متحرک ژنتیکی به ویژه پلازمید به راحتی

94°C، مرحله اتصال پرایمرها به مدت 1 دقیقه در دمای 62°C، مرحله طویل شدن رشته هدف به مدت 1 دقیقه در دمای 72°C و مرحله طویل شدن نهایی به مدت 10 دقیقه در دمای 72°C انجام شد. از طرف دیگر یک multiplex PCR برای ژن‌های SHV و CITM مشابه با برنامه ذکر شده با افزودن هر دو جفت پرایمر صورت گرفت. در این مطالعه از سویه *K. Pneumoniae* 7881، جهت کنترل مثبت و از مخلوطی از مواد PCR بدون رشته الگو به عنوان کنترل منفی برای ژن‌های SHV، CITM و FOX استفاده شد. الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز 2٪ 0/8 در حضور مارکر 100 bp (Fermentas) انجام شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید نتایج با UV مشاهده شد. به منظور اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر، باندهای محصولات PCR که از نظر اندازه مطابق با اندازه‌های پیش‌بینی شده بود، با استفاده از کیت Fermentas تخلیص گردید و نهایتاً تعیین توالی شد.

طراحی پرایمر

برای این منظور، از توالی‌های مربوط به ژن‌های SHV، CITM و FOX در بانک ژن *E. coli* که به تعداد 24، 50 و 5 (به ترتیب) در بانک ژن ثبت شده بود، استفاده گردید. توالی‌های هر گروه با استفاده از برنامه MEGA 4 multiple-alignment، هم طراز شده تا نواحی مشترک در زیر خانواده‌های هر گروه ژنی مشخص گردد. نواحی مشترک توالی‌های هم طراز شده به منظور طراحی پرایمر با استفاده از برنامه Generunner مورد بررسی قرار گرفت و جهت اطمینان از عملکرد اختصاصی این پرایمرها از برنامه BLAST در NCBI استفاده شد.

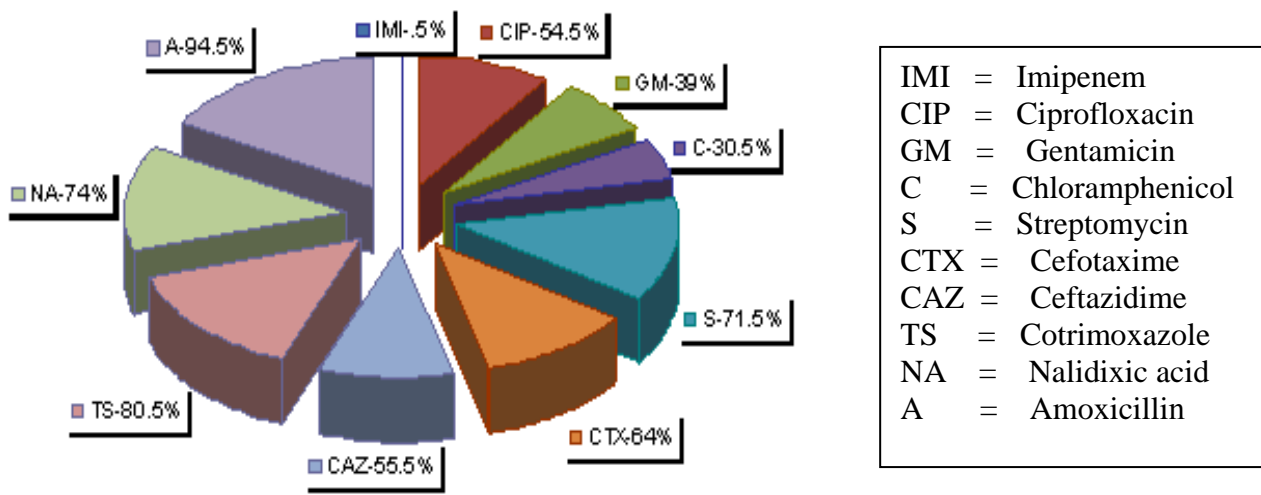
یافته‌ها

در این مطالعه از مجموع 200 ایزوله *E. coli*، 62/5% (125 ایزوله از ادرار و کاتر ادراری، 48 (24%) ایزوله از مدفوع، 18 (9%) ایزوله از خون، 5 (2/5%) ایزوله از زخم و 4 (2%) ایزوله از سایر نمونه‌های بالینی جمع‌آوری شد. الگوی مقاومتی سوش‌ها در برابر 10 آنتی‌بیوتیک به کار گرفته شده، در شکل 1 نشان داده شده است.

سفتنازیدیم (30 میکروگرم)، آموکسی‌سیلین (30 میکروگرم)، کلرامفنیکل (30 میکروگرم)، استرپتومایسین (10 میکروگرم) را به فاصله حداقل 2/5 سانتی‌متر از یکدیگر، بر روی محیط مزبور قرار داده و پس از 24 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، با استفاده از خط‌کش، هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و با استانداردهای جهانی (CLSI) مقایسه شد [11]. ایزوله‌های مقاوم به نماینده‌های سفالوسپورینی برای تست تأییدی انتخاب شدند. برای این منظور از آزمون Combined disk استفاده شد. در این آزمون، پس از تهیه محیط مولر هینتون آگار، سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند را، به طور کامل در محیط مزبور پخش نموده و سپس دیسک‌های سفتنازیدیم (30 میکروگرم)، سفتنازیدیم-کلاوونیک اسید (30-10 میکروگرم)، سفوتاکسیم (30 میکروگرم) و سفوتاکسیم-کلاوونیک اسید (30-10 میکروگرم) تهیه شده از شرکت Mast را به فاصله حداقل 2/5 سانتی‌متر از یکدیگر بر روی محیط قرار داده و پس از 24 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، هاله عدم رشد اطراف دیسک حاوی کلاوونیک اسید به عنوان مهارکننده آنزیم‌های ESBL نسبت به بدون کلاوونیک اسید سنجیده شد. به طوری که اگر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های حاوی کلاوونیک اسید بزرگتر یا مساوی 5 میلی‌متر نسبت به بدون کلاوونیک اسید باشد سوپه مورد نظر را می‌توان بر طبق CLSI، به عنوان مولد ESBLs در نظر گرفت [12]. از طرفی به پیشنهاد این سازمان، ایزوله‌هایی که در تست فنوتیپی تأییدی اثر بتالاکتاماز در آنها به وسیله مهارکننده بتالاکتامازی مهار نمی‌شود بالقوه به عنوان مولدین AmpC بتالاکتاماز محسوب می‌شوند [13].

شناسایی ژن‌های بتالاکتامازی نوع SHV، CITM و FOX، DNA ژنومیک سویه‌های غربال شده طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (Bioneer) استخراج شد و برای پروسه PCR به منظور تکثیر ژن‌های بتالاکتامازی (SHV، CITM 764 bp) و FOX (167 bp) با استفاده از 3 جفت پرایمر یونیورسال با شرایط زیر به کار گرفته شد.

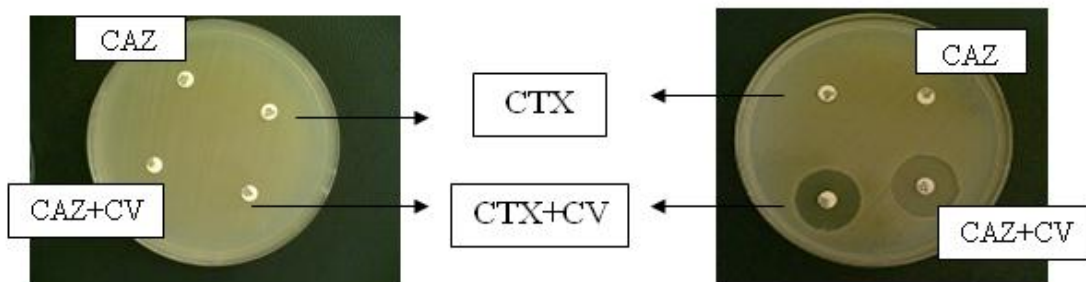
واکنش PCR در حجم نهایی 25 μl شامل: 50 mM μl، 2.5 MgCl₂ μl بافر 10 mM x 1، 1 dNTP μl، 1.5 پرایمر μl/50Pmol از هر کدام، (5U) μl Taq، DNA polymerase μl/50Pmol و DNA 2 μl، H₂O 14.5 μl در طی 35 سیکل، تحت برنامه زمانی ترموسایکلر شامل: مرحله اولیه باز شدن 2 رشته DNA به مدت 3 دقیقه در دمای 94°C، مرحله باز شدن 2 رشته به مدت 1 دقیقه در دمای



شکل 1- مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های مورد بررسی در این مطالعه

ESBLs و AmpC بتالاکتامازی (شکل 2) شناسایی شد. قابل توجه است که بیشترین مولدین آنزیم های بتالاکتامازی (80%) متعلق به نمونه های ادراری بود.

بر اساس نتایج حاصل از آزمون غربالی دیسک آگار دیفیوژن، 128 (64%) نمونه به منظور تأیید تولید ESBLs از طریق آزمون Combined disk مورد ارزیابی قرار گرفت که از این میان، 115 (89/8%) و 13 (10/2%) ایزوله به ترتیب به عنوان مولدین



شکل 2- تشخیص فنوتیپی مولدین ESBLs و AmpC

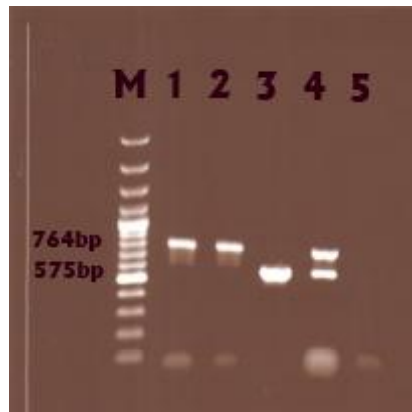
شکل سمت راست: تست فنوتیپی ESBLs مثبت،

شکل سمت چپ: تست فنوتیپی AmpC مثبت.

CTX: سفوتاکسیم، CAZ: سفتازیدیم و CV: کلاوونیک اسید.

بالینی از ادرار، واجد 2 خانواده مختلف از آنزیم های بتالاکتامازی (SHV و CITM) بود که از طریق multiplex PCR به اثبات رسید (شکل 3).

در آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمرز، از میان 128 ایزوله غربال شده در تست تأییدی، 7 (5/5%) و 13 (10/2%) ایزوله به ترتیب حاوی ژن های SHV و CITM بود و ژن FOX در هیچ ایزوله ای شناسایی نشد. لازم به ذکر است که از این میان، یک نمونه



شکل 3- الکتروفورز ژل آگارز.

M: مارکر 100 bp. 1: کنترل مثبت (کلبسیلا پنومونیه 7881) برای bla-SHV. 2: ایزوله بالینی مثبت برای bla-SHV. 3: ایزوله بالینی مثبت برای bla-CITM. 4: ایزوله بالینی مثبت برای bla-SHV و bla-CITM. 5: کنترل منفی

وسیع‌الطیف وارد فاز تأییدی شده بودند، تنها 115 ایزوله فنوتیپ ESBLs را نشان دادند و بر اساس توصیه سازمان جهانی CLSI، 13 ایزوله دیگر با نتایج منفی تست فنوتیپ تأییدی به عنوان مولد AmpC بتالاکتامازی در نظر گرفته شدند که برای بررسی بیشتر و اثبات این موضوع، از پروسه PCR استفاده شد. با مد نظر قرار دادن اینکه خانواده‌های بتالاکتامازی (SHV، CITM) و FOX واجد زیر گروه‌های متعدد بوده لذا به منظور شناسایی کامل این زیر گروه‌ها در فرایند PCR از پرایمرهای یونیورسالی استفاده شد که با استفاده از برنامه BLAST این اطمینان حاصل گشت که این پرایمرها می‌توانند طیف وسیعی از این زیر گروه‌ها را پوشش دهند. در آزمایش PCR، اولاً مشخص شد که تمام این 13 ایزوله حاوی ژن CITM (AmpC) بوده و از طرفی یکی از ایزوله‌های E.coli که در تست تأییدی به عنوان مولد AmpC شناخته شده بود در حقیقت حاوی هر دو کلاس بتالاکتامازی (SHV، CITM) بوده که حضور AmpC مانع از بروز فنوتیپ ESBLs در تست تأییدی و به دنبال آن گزارش منفی کاذب ESBLs شده است. از طرفی ژن Fox با وجود کنترل مثبت در هیچ ایزوله‌ای شناسایی نشد. ژن SHV، تنها در 5/5٪ ایزوله‌ها شناسایی شد. مطالعات گسترده بیانگر این واقعیت هستند که بیان فنوتیپ ESBLs در نتیجه تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف گروه A می‌باشد که به وسیله ژن‌های متعددی از جمله TEM، PER، CTX-M و ... کد می‌شوند لذا اختلاف در شیوع موارد فنوتیپ مثبت و ژنوتیپ مثبت در مطالعه حاضر را باید در حضور ژن‌های دیگر مولد مقاومت بتالاکتامازی گروه A، جستجو کرد [17 و 18].

نتایج به دست آمده از توالی‌های سکانس شده با استفاده از برنامه ClustaW2 و هم طراز کردن آنها با توالی‌های مربوطه، در ژن بانک بررسی شدند که تشابه بالایی را نسبت به توالی‌های مورد نظر ثبت شده نشان دادند که این امر صحت طراحی پرایمرها و تکثیر درست و مناسب قطعه مورد نظر در طی روند PCR را نشان می‌دهد.

بحث

در مطالعه حاضر، سویه‌های E.coli مولد آنزیم‌های بتالاکتامازی، شیوع بالایی (64٪) را نشان دادند که این میزان در کشورهای مختلف متفاوت است و مطالعات حاکی از آن است که میزان شیوع این نوع از آنزیم‌ها در ایران نسبت به سایر کشورهای جهان بیشتر است [14] که یکی از مهم‌ترین دلایل آن می‌تواند استفاده بیش از حد و خودسرانه از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی باشد. امروزه شناسایی ارگانسیم‌های مولد ESBLs به یکی از چالش‌های اصلی در آزمایشگاه‌ها مبدل شده است چرا که حضور این آنزیم‌ها اغلب در تست‌های فنوتیپی تأیید نشده و همین امر مشکلاتی را در رابطه با تفسیر این نوع مقاومت ایجاد کرده است. یکی از عواملی که منجر به نتایج منفی کاذب ESBLs می‌شود، ظهور AmpC بتالاکتامازها در میان پاتوژن‌ها و تولید این 2 کلاس بتالاکتامازی به طور همزمان می‌باشد [15 و 16]. در مطالعه حاضر از میان 128 ایزوله که در غربالگری اولیه به منظور تولید بتالاکتامازهای

دیگر، از یک کشور به کشور دیگر و حتی از یک بیمارستان به بیمارستان دیگر متفاوت می‌باشد [25] که این امر گواهی بر میزان اختلاف در شیوع ژن SHV در داخل و خارج از کشور می‌باشد. در گزارشات به دست آمده از ایران اشاره کمتری به حضور AmpC بتالاکتامازها شده است که این امر ضرورت استفاده از تست‌های فنوتیپی در کنار تست‌های ژنوتیپی را نشان می‌دهد. لازم به ذکر است بیشتر تحقیقات انجام شده روی کلاس‌های محدودی از بتالاکتامازها بوده، در این تحقیق سعی بر آن بود که با طراحی 3 جفت پرایمر با طیف وسیع، بتوانیم گروه‌های بیشتری از این خانواده‌ها را مورد بررسی قرار دهیم.

نتیجه‌گیری

امروزه تعداد ارگانسیم‌هایی که قادر به تولید آنزیم‌های ESBLs هستند، در حال افزایش است و این مسأله به عنوان یکی از بحران‌های موجود در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها مطرح می‌باشد. بنابراین شناسایی عوامل مهم و شایع در عفونت‌های بیمارستانی و تعیین الگوی دقیق مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جهت کنترل شیوع این گونه عوامل، مهم به نظر می‌رسد [4].

بنابراین انجام تکنیک‌های مولکولی از قبیل PCR جهت تشخیص انواع آنزیم‌های بتالاکتامازی لازم به نظر می‌رسد.

میزان شیوع ژن SHV در این مطالعه بسیار مشابه با نتایج حاصل از Hong Fang و همکاران در طی سال‌های 2001 الی 2006 در سوئد بود (6%) [19] و این میزان، از گزارشات به عمل آمده توسط Romero و همکاران در اسپانیا (15/6%)، 2004-2001 [20] و Hosoglu و همکاران در ترکیه (28/6%)، 2007 [21] کمتر بود.

در مطالعه انجام شده توسط شاه چراغی و همکاران (1386) از میان 200 ایزوله بالینی *E. coli* 105 نمونه در تست فنوتیپی تأییدی به عنوان مولد ESBLs گزارش شد که از این بین، 12 ایزوله حاوی SHV bla بود [22]. مسجیدیان و همکاران در سال 1386 نشان دادند که از میان 148 سویه *E. coli* 76 ایزوله مولد ESBLs بوده که از این میان 9 مورد حاوی bla-SHV بود [23] و در تحقیقی دیگر که توسط میرصالحیان و همکاران (1387) انجام شد از میان 33 ایزوله بالینی *E. coli* 20 ایزوله از لحاظ ESBLs مثبت بوده که از این میان تنها 1 نمونه حاوی ژن SHV بود [24]. نتایج حاصل از این تحقیق نزدیکی زیادی را با نتایج حاصله از کارهای انجام شده مشابه نشان داد. امروزه ارگانسیم‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتامازی به سرعت در تمام جهان شیوع پیدا کرده‌اند و میزان فراوانی این آنزیم‌ها از یک سال به سال

مراجعه

- 1- Mulvey RM and Simor EA. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be?. *Can Med Assoc J.* 2009; 180(4): 371-416.
- 2- Mendonc N, Manageiro V, Robin F and et al. The Lys234Arg substitution in the enzyme SHV-72 is a determinant for resistance to clavulanic acid inhibition. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(5): 1806-1811.
- 3- Silva J, Agullar C, Ayala G and et al. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(4): 997-1003.
- 4- Bradford AP. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14 (4): 933-951.
- 5- Jacoby AG and Medeiros AA. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35(9): 1697-1704.
- 6- Stu`renburg E and Mack D. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 2003; 47: 273-295.
- 7- Paterson LD and Bonomo AR. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews* 2005; 18(4): 657-686.
- 8- Block Colin. Antibiotic susceptibility testing. *Methods Mol Med* 67 (6): 89-106.
- 9- Singhal S, Mathur T, Khan S and et al. Evaluation of methods for AmpC β -lactamases in gram negative clinical isolates from tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol* 2005; 23(2): 120-124.
- 10- Hanson ND and Sanders CC. Regulation of inducible AmpC β -lactamases expression among *Enterobacteriaceae*. *Curr Pharm Des* 1999; 5: 881-884.
- 11- Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 15th informational supplement. Wayne, Pennsylvania: Clinical Laboratory Standards Institute Document M100-S15; 2005.
- 12- Wonkeun S, Kwon B, You-Nae L, Chae-Hoon L, Sang HL and Seok HJ. Detection of extended-spectrum β -lactamases by using Boronic acid as an AmpC β -lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (4): 1180-1184.
- 13- Coudron PE, Moland ES and Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol* 2000; 38(5): 1791-1796.
- 14- M Al-Jasser A. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): a global problem . *Kuwait Med J* 2006; 38 (3): 171-185.
- 15- Kenneth ST. Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *Emerg Infect Dis* 2001; 7 (2): 333-336.
- 16- Denton M. *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29 (3) S9-S22.
- 17- Bush K, Jacoby AG and Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and it's correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(6): 1211-1233.
- 18- Zhang Z, Guo X and Zhang Q. Prevalence characterization of extended-spectrum β -lactamases

among *Escherichia coli* isolates collected in Zhengzhou. *J Clin Lab Anal* 2009; 23(6): 404-407.

19- Fang H, Ataker F, Hedin G and Dornbusch K. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish Hospital and Its associated health care facilities from 2001 to 2006. *J Clin Microbiol* 2008; 46(2): 707-712.

20- Romero EDV, Padilla TP, Hernández AH and et al. Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. producing multiple extended-spectrum β -lactamases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59 (4): 433-437.

21- Hosoglu S, Gundes S, Kolayli F and et al. Extended-spectrum beta-lactamases in ceftazidime resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Turkish hospitals. *Indian J Med Microbiol* 2007; 25(4) 4346-350.

22- Shahcheraghi F, Nasiri S and Naviri H. Evaluation of presence the bla-SHV and bla-TEM β -

lactamase genes in clinical isolates resistant *Escherichia coli* to antibiotics from Tehran hospital. *Iran J Med Microbiol* 1386; 1(3): 1-8.

23- Masjedian GF, Valehi F, Talebi A and Rastegar LA. Molecular evaluation of resistance to expanded antibiotics in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Med Microbiol* 1386; 1(2): 27-34.

24- Mirsalehian A, Akbari-Nakhjavani F, Peymani A, Kazemi B, Jabal Ameli F and Mirafshar SM. Prevalence of extended spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae by phenotypic and genotypic methods in intensive care units in Tehran, Iran. *Daru* 2008; 16(3): 169-173.

25- Empel J, Baraniak A, Literacka E and et al. Molecular survey of β -lactamases conferring resistance to newer β -lactams in Enterobacteriaceae isolates from Polish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52 (7): 2449-2454.