

بررسی مولکولی ژن بتا لاکتاماز طیف گسترده تیپ SHV در ایزوله‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنمونیه در نمونه‌های بالینی جدا شده از ۴ مرکز آموزشی و درمانی شهر تبریز

علیرضا مباشر کار جدی^۱، محمد رضا نهائی*^{۲،۳}، هایده مبین^۴، مجید پرنور^۱، جاوید صادقی^۲

۱) گروه میکروبی شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

۲) گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

۳) مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشکده علوم پزشکی تبریز

۴) گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز

نویسنده رابط: محمد رضا نهائی، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی و آزمایشگاه باکتریولوژی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

nahaeimr@tbzmed.ac.ir

تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۶۴۶۶۱

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱۰/۲۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۱/۲۴

چکیده:

زمینه و اهداف: امروزه به دلیل استفاده گسترده از سفالوسپورین‌های نسل سوم، شاهد بروز انواع مقاومت دارویی نسبت به این آنتی بیوتیک‌ها هستیم. هدف از این مطالعه، تعیین الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن *bla*_{SHV} در ایزوله‌های *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* از ۴ مرکز آموزشی و درمانی شهر تبریز (امام خمینی، سینا، شهدا و کودکان) بود.

روش بررسی: تعداد ۴۱ ایزوله *E. coli* و ۴۷ ایزوله *K. pneumoniae* از ۴ مرکز آموزشی و درمانی شهر تبریز جمع آوری شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌ها به روش Kirby-Bauer آزمایش شد و از روش Combined disk test جهت انجام تست تأییدی استفاده گردید. نتایج با استانداردهای (CLSI) *Clinical and laboratory standards institute* مقایسه و در نهایت ایزوله‌های ESBL مثبت، توسط روش PCR، از نظر ژن *bla*_{SHV} بررسی شدند.

یافته‌ها: از ایزوله‌های *E. coli* و *K. pneumoniae* به ترتیب ۳۳ (۸۰/۴۹٪) و ۴۳ (۹۱/۴۸٪) ایزوله به سفنازیدیم و ۳۲ (۷۸/۰۵٪) و ۴۲ (۸۹/۳۶٪) ایزوله به سفوتاکسیم مقاوم بودند. در *E. coli* ۴۰ (۹۷/۵۶٪) ایزوله ESBL مثبت و ۷ (۱۷/۰۷٪) ایزوله حاوی ژن *bla*_{SHV} بودند. از ۴۷ ایزوله *K. pneumoniae* ۴۶ (۹۷/۸۷٪) ایزوله ESBL مثبت و ۱۲ (۲۵/۵۳٪) ایزوله حاوی ژن *bla*_{SHV} بودند. ۱۰۰٪ ایزوله‌های *E. coli* و *K. pneumoniae* به ایمی پنم حساس بودند.

نتیجه گیری: با توجه به درصد بالای مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سوم، انجام دقیق آنتی بیوگرام و پرهیز از تجویز بی رویه آنتی بیوتیک‌ها در عفونت‌های ناشی از ارگانسیم‌های تولید کننده ESBL، یک ضرورت اجتناب ناپذیر است.

کلید واژه‌ها: بتا لاکتاماز طیف گسترده، اشریشیا کلی، کلبسیلا پنمونیه، واکنش زنجیره ای پلیمران، ژن *bla*_{SHV}

دیسک سفنازیدیم / کلاولانیک اسید و یا سفوتاکسیم / کلاولانیک اسید مشخص گردید.

جهت استخراج DNA و انجام PCR ابتدا کل DNA ایزوله‌ها با روش جوشانیدن (boiling) استخراج شد (۳۲). تست PCR برای شناسایی ژن های بتا لاکتامازی (*bla_{SHV}*) با اندازه ۴۷۱ bp تحت شرایط مندرج در جدول ۱ انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده به شرح ذیل بود:

5' - TCAGCGAAAAACACCTTG -3'

5' - TCCCGCAGATAAATCACC -3'

شایان ذکر است از سویه استاندارد *K. pneumoniae ATCC 700603* جهت کنترل در آزمون PCR استفاده گردید. از مارکر SMO323 (Ladder Fermentase) ۱۰۰bp جهت تأیید وزن مولکولی محصولات تکثیر شده توسط PCR استفاده شد. الکتروفورز محصولات PCR در ژل ۱٪ آگارز به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰ انجام پذیرفت. برای رنگ آمیزی ژل، آن را به مدت ۱۵ دقیقه در تانک حاوی اتیدیوم بروماید قرار داده و سپس نتایج توسط دستگاه Translominator یا geldocument با نور UV مشاهده شدند.

خون، ترشحات برونش، خلط، زخم، مایع پلور و مدفوع از ۴ مرکز آموزشی و درمانی امام خمینی، شهدا، سینا و کودکان شهر تبریز در یک دوره ۶ ماهه به روش تصادفی ساده (Simple Random Sampling) جمع آوری شدند. ایزوله‌ها با انجام تست های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به وسیله روش دیسک دیفیوژن (Kirby&Bauer) انجام شد (۳۰). دیسک های مورد استفاده شامل: سفوتاکسیم (۳۰μg)، سفنازیدیم (۳۰μg)، آمیکاسین (۳۰μg)، ایمی پنم (۱۰μg)، آزترونام (۱۰μg)، سفوروکسیم (۳۰μg)، پیراسیلین / تازویاکتام (۳۰μg/ ۱۰۰μg) و سفپیم (۳۰μg) از شرکت Mast بودند.

برای شناسایی ایزوله‌های تولید کننده ESBLs از تست تأییدی استفاده شد (۳۱). دیسک‌های مورد آزمایش سفنازیدیم / کلاولانیک اسید (CAZ: 30μg/ CV:10μg) و سفوتاکسیم / کلاولانیک اسید (CTX : 30μg/CV:10μg) به همراه سفوتاکسیم و سفنازیدیم هر کدام ۳۰ μg محصول شرکت Mast بودند. بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷° C، تولید ESBLs از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵ میلی‌متر یا بیشتر در اطراف

جدول ۱: شرایط مورد استفاده در PCR

مراحل آزمایش	درجه حرارت (C°)	
	SHV	زمان
First denaturation	94	4 min
Denaturation	94	1 min
Anneling	53	45 S
Extention	72	1 min
Final extention	72	10 min
Cycle number	35	

یافته‌ها:

سفتریاکسون، ۴۳ ایزوله (۹۱/۴۸٪) مقاوم به سفنازیدیم، ۴۲ ایزوله (۸۹/۳۶٪) مقاوم به سفوتاکسیم، ۴۱ ایزوله (۸۷/۲۳٪) مقاوم به پیراسیلین / تازوباکتام و آزترونام بودند. ۳۹ ایزوله (۸۲/۹۸٪) مقاوم به سفپیم و همچنان ۵ ایزوله (۱۰/۶۴٪) به آمیکاسین مقاومت نشان دادند. هیچ کدام از ایزوله‌ها به ایمی پنم مقاومت نشان ندادند (جدول ۲). از ۴۷ ایزوله مورد آزمایش، ۴۶ ایزوله (۹۷/۸۷٪) ESBL مثبت بود (جدول ۳). همچنین مشخص شد که ۱۲ ایزوله (۲۵/۵۳٪) بعد از انجام آزمایش PCR حاوی ژن *bla*_{SHV} بودند (شکل ۱).

از ۴۱ ایزوله‌ی *E. coli*، ۳۶ ایزوله (۸۷/۸٪) مقاوم به آزترونام، ۳۳ ایزوله (۸۰/۴۹٪) مقاوم به پیراسیلین / تازوباکتام، ۳۲ ایزوله (۷۸/۰۵٪) مقاوم به سفوتاکسیم، سفوروکسیم و سفتریاکسون بودند. ۲۷ ایزوله (۶۵/۸۵٪) مقاوم به سفپیم و ۲ ایزوله (۴/۸۸٪) به آمیکاسین مقاومت نشان دادند. هیچ کدام از ایزوله‌ها به ایمی پنم مقاوم نبودند (جدول ۲). از ۴۱ ایزوله *E. coli*، ۴۰ ایزوله (۹۷/۵۶٪) ESBL مثبت بودند (جدول ۳) و ۷ ایزوله (۱۷/۰۷٪) حاوی ژن *bla*_{SHV} بودند (شکل ۱). لازم به ذکر است که یک ایزوله حاوی ژن *bla*_{SHV} شناسایی گردید که آزمایش ESBL آن منفی بود.

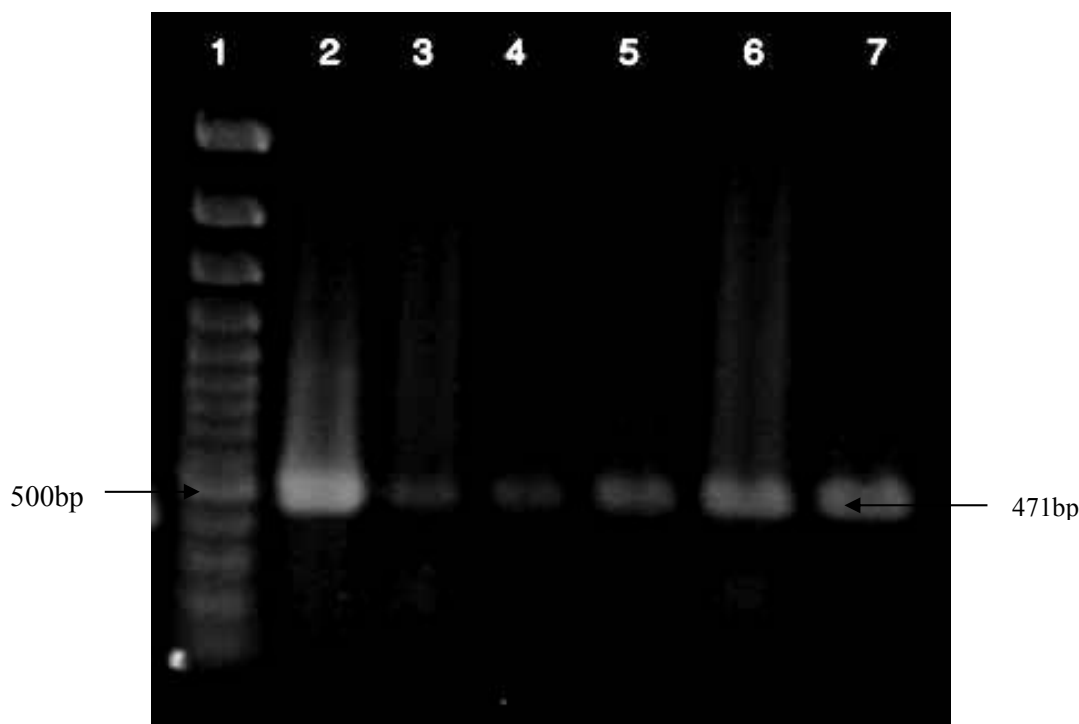
از بین ۴۷ ایزوله‌ی *K. pneumoniae*، ۴۶ ایزوله (۹۷/۸۷٪) مقاوم به سفوروکسیم، ۴۴ ایزوله (۹۳/۶۲٪) مقاوم به

جدول ۲: الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های *E. coli* و *K. pneumoniae* (٪)

باکتری	حساسیت / مقاومت	پیراسیلین / تازوباکتام	ایمی پنم	آمیکاسین	سفپیم	سفوروکسیم	سفنازیدیم	سفتریاکسون	سفوتاکسیم	آزترونام
<i>E. coli</i>	حساس	۹/۷۶	۱۰۰	۸۷/۸۰	۱۴/۶۳	۴/۸۸	۱۹/۵۱	۲۱/۹۵	۱۷/۰۷	۴/۸۸
	حد واسط	۹/۷۵	۰	۷/۳۲	۱۹/۵۲	۱۷/۰۷	۰	۰	۴/۸۸	۷/۳۲
	مقاوم	۸۰/۴۹	۰	۴/۸۸	۶۵/۸۵	۷۸/۰۵	۸۰/۴۹	۷۸/۰۵	۷۸/۰۵	۸۷/۸۰
<i>K. pneumoniae</i>	حساس	۴/۲۶	۱۰۰	۷۲/۳۴	۸/۵۱	۰	۴/۲۶	۲/۵۰	۰	۲/۱۳
	حد واسط	۸/۵۱	۰	۱۷/۰۲	۸/۵۱	۲/۱۳	۴/۲۶	۴/۲۵	۱۰/۶۴	۱۰/۶۴
	مقاوم	۸۷/۲۳	۰	۱۰/۶۴	۸۲/۹۸	۹۷/۸۷	۹۱/۴۸	۹۳/۶۲	۸۹/۳۶	۸۷/۲۳

جدول ۳: نتایج تست تاییدی (Combined disk)

سفتوتاکسیم / کلاولانیک اسید (<i>K. pneumoniae</i>)	سفتنازیدیم / کلاولانیک اسید (<i>K. pneumoniae</i>)	سفتوتاکسیم / کلاولانیک اسید (<i>E. coli</i>)	سفتنازیدیم / کلاولانیک اسید (<i>E. coli</i>)	هاله ی توقف رشد
۹۳/۶۲	۹۳/۶۲	۸۲/۹۲	۹۲/۶۸	افزایش هاله
۶/۳۸	۶/۳۸	۱۷/۰۸	۷/۳۲	عدم افزایش هاله



شکل ۱: نمایش ایزوله‌های حاوی ژن *bla*_{SHV} (۴۷۱ bp) : ۱: مارکر

۲: کنترل مثبت ژن *bla*_{SHV} (ATCC 700603) ۷-۳: ایزوله های حاوی ژن *bla*_{SHV}

بحث:

نتایج حاکی از مقاومت قابل توجه به سفالوسپورین‌های نسل سوم، شیوع همه جانبه ESBLها، و حضور ژن *bla*_{SHV} در ایزوله‌های مورد بررسی است.

ESBLها مولکول‌های بتالاکتاماز کلاس A یا D می‌باشند که قادر به هیدرولیز اکسی‌ایمینو سفالوسپورین‌ها در اندازه‌ای برابر یا ۱۰ درصد بیشتر از بنزیل پنی‌سیلین‌ها هستند (۳۳ و ۳۴). تیپ‌های مختلف این آنزیم‌ها روز به روز در حال افزایش است، به نحوی که دسترسی به یافته‌های جدید از طریق یک سایت اینترنتی (www.Lahey.Org/studies/webt/stm) امکان پذیر شده است (۳۵). ESBLs علیه مونوباکتام‌ها و اکسی‌ایمینوسفالوسپورین‌ها، به استثناء سفامایسین، فعال هستند. اکثر سویه‌های تولید کننده ESBL به سفوکسیتین و سفوتان حساس می‌باشند (۱۳ و ۹). یکی از مهم ترین راهکارهای موفق در غلبه بر مقاومت بتالاکتامازها، استفاده از ممانعت کننده‌های آن‌ها است. این مکانیسم بر اساس فعالیت ممانعت کننده‌گی توسط اتصالات کووالانست به سایت فعال بتالاکتامازهای کلاس A صورت می‌پذیرد. تازوباکتام، سولباکتام و کلولاونیک‌اسید، ممانعت کننده‌های بتالاکتاماز رایج مورد استفاده در بررسی‌های بالینی می‌باشند (۳۶). به علاوه، بزرگ شدن سایت فعال که منجر به افزایش

فعالیت علیه سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف می‌شود، ممکن است به افزایش حساسیت ESBLها به بازدارنده‌های بتالاکتاماز منجر شود. در این مطالعه ۲ باکتری گرم منفی که نقش اساسی را در تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز ایفا می‌کنند بررسی شدند. مروری بر فراوانی سویه‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز در ۲ دهه اخیر گسترش و پراکندگی این آنزیم‌ها را در نقاط مختلف جهان نمایان می‌سازد. مابین سال‌های ۱۹۹۱ تا ۱۹۹۵ محققان در بیمارستان Prniness Alexandera در استرالیا ۱۲ ایزوله کلبسیلا پنمونیه را یافتند که دارای توالی ژن‌های بتالاکتاماز تیپ SHV بودند (۳۷). هلند به عنوان کشوری است که با مصرف کم آنتی‌بیوتیک شناخته شده است. به‌طوریکه شیوع ایزوله‌های /شریشیا کلی و کلبسیلا پنمونیه تولید کننده ESBL (ESBL های تیپ SHV و TEM) در ۱۹۹۷ در این کشور کمتر از درصد بود. ولی مطالعات اخیر نشان دهنده افزایش مقاومت و حتی شناسایی تیپ‌های جدید از جمله تیپ SHV-31 در کلبسیلا پنمونیه در این کشور می‌باشد (۳۸). در تحقیقی مشابه (۲۰۰۰) در شمال تایوان که بر روی ۱۱۳ ایزوله‌ی کلبسیلا پنمونیه از نمونه‌های خون در ۱۰ بیمارستان جمع‌آوری شده بود، ۵۰ درصد ایزوله‌ها را ESBL مثبت گزارش دادند. در بین این ایزوله‌ها ۲ تیپ جدید SHV-25 و SHV-26 شناسایی

بین نسل سوم در مقایسه با سفتازیدیم میزان جذب بالاتری به سفوتاکسیم دارد (۴۵). تفاوت در این عملکردها ممکن است ناشی از جایگزینی اسیدهای آمینه متفاوت در سایت فعال آنزیم باشد (۴۸-۴۶). روش های مولکولی مختلفی برای شناسایی و تعیین تیپ بتالاکتامازهای SHV پیشنهاد شده است، اما ترادف نوکلئوتیدی برای تعیین ژن های بتالاکتاماز در حال حاضر به عنوان یک استاندارد مطرح می باشد (۴۹).

نتیجه گیری :

بتالاکتامازهای وسیع الطیف شیوع روز افزون دارند و نتایج مطالعه حاضر هم نشان از مقاومت بیشتر ایزوله ها بر علیه سفالوسپورین های نسل سوم دارد. حساسیت همه ی ایزوله های مورد مطالعه به ایمی پنم (۱۰۰ درصد) و حساسیت اکثریت آن ها در برابر آمیکاسین (۸۷/۸ درصد) برای *E. coli* و ۷۲/۳ درصد برای *K. pneumoniae* و ارزشمند بودن این دارها ما را به توصیه های زیر رهنمون می سازد. در درمان عفونت باکتریال، با کمک متخصصین آزمایشگاه و به دنبال تعیین الگوی حساسیت دقیق، از یک بتالاکتام در ترکیب با یک بازدارنده بتالاکتاماز استفاده شود. بدین طریق از گسترش بتالاکتامازهای وسیع الطیف در بین سویه های مختلف باکتریایی کاسته شده و از بسط عفونت های مقاوم، و نیز روز افزون شدن مرگ و میر در مراکز درمانی پیشگیری می شود. در ادامه این مطالعه تعیین دقیق تیپ های مختلف آنزیم SHV و سایر آنزیم های ESBL با روش های مولکولی دیگر از قبیل REP-PCR، PCR-RFLP و تعیین توالی (Sequencing) این ژن ها توصیه می شود.

گردید (۳۹). سه سال بعد (۲۰۰۳) در تحقیقی در اسپانیا، از ۵۱ ایزوله ی اشریشیاکلی که به آموکسی سیلین- کلاولانات مقاومت داشتند، ۴۰ ایزوله به سفوتاکسیم مقاوم بودند. از آنها، ۶ ایزوله (۱۱ درصد) حاوی ژن *bla*_{SHV} بودند (۱۸). در همین سال Ryoo و همکاران در بررسی روی نمونه های جمع آوری شده از ۱۲ بیمارستان در کره، دریافتند که ۲۳/۱ درصد ایزوله های اشریشیاکلی و ۳۵/۹ درصد ایزوله های کلبسیلا پنمونیه، ESBL مثبت هستند (۴۰). در سال ۲۰۰۵، ۶ ایزوله کلبسیلا پنمونیه در یکی از مراکز درمانی تحت نظر دانشگاه های زهیچانگ چین مقاومت وسیع نسبت به آنتی بیوتیک ها نشان دادند. در بررسی با روش PCR مشخص شد که هر ۶ ایزوله حامل ژن های SHV هستند (۴۱). در هندوستان (۲۰۰۷)، تحقیق Lal و همکاران فراوانی ژن SHV را، ۷۵/۷ درصد نشان داد (۱۹). جالب توجه است که در مالزی در سال ۲۰۰۸ از ۱۶ ایزوله ی اشریشیاکلی، ۲ ایزوله (۱۲/۵ درصد) حامل ژن *bla*_{SHV} گزارش شد (۲۰). در مطالعه ی حاضر بیشترین میزان مقاومت ایزوله های *E. coli* در برابر آزترونام (۸۷/۸ درصد) بود و بیشترین میزان مقاومت ایزوله های *K. pneumoniae* در برابر سفوروکسیم (۹۷/۸۷ درصد) بود. ضمناً، همه ایزوله ها در برابر ایمی پنم حساس بودند. مقاومت ایزوله های *K. pneumoniae* نسبت به سفالوسپورین های نسل سوم، سفتریاکسون و سفوتاکسیم قابل توجه بود که در مقایسه با مطالعات Nijssen (۴۲) و Jones (۴۳) که به ترتیب ۱۸/۷ درصد و ۱۰ درصد گزارش نمودند، بسیار بالاتر است. بیش از ۹۷ درصد ایزوله های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنمونیه در مطالعه حاضر مولد آنزیم های ESBL هستند. همچنین به ترتیب ۱۷/۰۷ و ۲۵/۵۳ درصد حاوی ژن *bla*_{SHV} می باشند. مقایسه با نتایج مطالعات سایر کشورها نشان می دهد فراوانی و میزان شیوع ESBL ها در نقاط مختلف جهان یکسان نیست. پراکندگی آنها در کشورها و حتی در شهرهای مختلف، متفاوت است (۴۴).

بررسی پرونده بیماران نشان داد در بیشتر موارد از سه داروی سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفتریاکسون (به تنهایی و یا به صورت توأم) استفاده شده بود. این شرایط، نقش فشار انتخابی ناشی از مصرف زیاد و بدون محدودیت خاص را در ایجاد مقاومت به خوبی روشن می سازد. لازم به ذکر است که تمایل هر کدام از تیپ های SHV به آنتی بیوتیک ها متفاوت است. به طوریکه میزان گرایش SHV-55 و SHV-5 به پنی سیلین ها بیشتر از SHV-1 است. همچنین SHV-55 میزان گرایش بالایی، در مقایسه با SHV-1، به نسل های اول، دوم و سوم سفالوسپورین ها، مونوباکتام ها و در

فهرست مراجع:

1. Knot H, Shah P, Krcmery V, Natal M, Mitsuishi S. Transferable resistance to cefatoxime, cefoxitin, cefamandole and sefuroxime in clinical isolates of *K pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infect* 1983; **11**: 315 – 317.
 2. Al-Jasser AM. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL_s): a global problem. *Kuwait Med Journal* 006; **38** (3): 171-185.
 3. Corkill JE, Cuevas LE, Gurgel RQ, Greensill J, Hart A. *SHV-27*, a novel cefotaxime-hydrolysing beta-lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a brazilian hospital. *J Antimicrob Chemother* 2001; **47**: 463-465.
 4. Live more DM. Beta – lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbial Rev* 1995; **8** (4): 557 – 584.
 5. Shahid M, Malik A. Plasmid mediated amikacin resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J Med Microbiol* 2004; **22**(3): 182-184.
 6. Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanes C. *SHV-1* beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2856-2861.
 7. Miranda G, Castro N, Leanos B, Valenzuela A, Garza-Ramos U, Rojas T et al. Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing *SHV-5* extended-spectrum beta-lactamase in a Mexican pediatric hospital. *J Clinical Microbiol* 2004; **42**: 30-35.
 8. Ford PJ, Avison MB. Evolutionary mapping of the *SHV* beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent *bla_{SHV}* mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J Antimicrob Chemother* 2004; **54**: 69-75.
 9. Song JS, Lee JH, Lee J -H, Jeong B C, Lee W -K, Lee SH. Removal of contaminating *TEM-la* beta-lactamase gen from commercial Taq DNA polymerase. *J Microbiol* 2006; **44**: 126-128.
 10. Paterson DL, Ko W –C, Von Gottberg A, Casellas JM, Mulazimoglu L, Klugman KP et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended- spectrum beta-lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clinl Microbiol* 2001; **39**: 2206-2212.
 11. Pitout J DD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL_s) in the community. *J Antimicrob Chemother* 2005; 1-8.
 12. Nukaga M, Kumar S, Nukaga K, Pratt RF, Knox JR. Hydrolysis of third-generation cephalosporins by class C beta-lactamases. *J Biological Chemistry* 2004; **279**: 9344-9352.
 13. Bradford PA. Extended-spectrum beta lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; **14**, 933-951.
 14. Hammod DS, Schooneveldt J, Nimmo G, Huygens F, Giffard PM. *bla_{SHV}* genes in *Klebsiella pneumoniae*: Different allele distributions associated with different promoters within individual isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 256-263.
 15. Liu G, Ling B -D, Xie Y -E, Lin L, Zeng Y, Zhang X, Lei J. Characterization of CTX-M-22 and TEM-141 encoded by a single plasmid from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* in china. *Japan J Infect Dis* 2007; **60**: 295-297.
 16. Medeiros AA. Nosocomial outbreak of multiresistant bacteria extended – spectrum beta-lactamases have arrived in North America. *J Ann Inter Med* 1993; **119**: 428 -43.
 17. 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.
 18. Colom K, Perez J, Alonso R, Fernandez – Aranguiz A, Larino E, Cisterna R. Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA-1}* Genes in Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett* (2003); **223**:147 151.
 19. Lal p, Kapil A, Das KB, Sood S. Occurance *TEM* and *SHV* gene in extended-spectrum beta Lactamase (ESBL) producing *Klebseilla spp.* isolated from a tertiary care hospital. *Indian J Med Res* 2007; **125**: 173-178.
 20. Sekawi Z, Yusof R, Nor Shamsudin M. Extended-spectrum beta-lactamases- producing *Escherichia coli* from a tertiary hospital in Malaysia: Emergence of *CTX-M-type* beta-lactamases variation. *Research J Microbiol* 2008; 1-5.
۲۱. شاهچراغی ف، نیک بین و، شوریج ف. بررسی مولکولی

- بتالاکتامازهای SHV، VEB، PER و TEM در سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های زخم در دو بیمارستان تهران به روش PCR، مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، زمستان ۱۳۸۶، سال ۱، شماره ۴، صص ۲۱ تا ۲۷.
۲۲. مبین ه، نهایی م ر، امیرمظفری ن، مودب س ر، مونس ش، صفائیان ف و همکاران. آنزیم بتالاکتاماز طیف گسترده (ESBL) گروه CTX-M در سویه‌های بالینی کلبسیلا پنمونیه جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه در بیمارستان‌های آموزشی شهر تبریز. فصلنامه بیماری‌های عفونی و گرمسیری، پائیز ۱۳۸۶، سال ۱۲، شماره ۳۸، صص ۲۱ تا ۲۵.
۲۳. زمان زاد ب، دیهم ب، نفیسی م ر، کریمی ع، فرخی ع. بررسی فراوانی ژن TEM-1 در سویه‌های اشریشیاکلی، کلبسیلا پنمونیه و انتروباکتر تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف ایزوله شده از نمونه‌های کلینیکی بیمارستان‌های آموزشی شهرکرد به روش PCR، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان، زمستان ۱۳۸۶، دوره ۱۴، شماره ۴، صص ۱۹ تا ۲۵.
24. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; **35**: 1697-1704.
25. Daoud Z, Hakime N. Prevalence and susceptibility pattern of ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general university hospital in Beirut, Lebanon. *Rev Esp Quimioter* 2003; **16**(2): 233-238.
26. Patricia A. ESBL in 21st century: Characterization, Epidemiology and Detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**(4): 933-951.
27. Liu G, Ling B -D, Zeng Y, Lin L, Xie Y -E, Lei J. Molecular characterization of extended-spectrum beta- lactamases produced by clinical isolates of *Enterobacter cloacae* from a teaching hospital in china. *Japan - Infect Dis* 2008; **61**: 286-289.
28. Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W. Concurrent outbreaks of ESBL producing organism of the family Entrobacteriaceae in a Warsaw Hospital. *J Antimicrob Chemother* 1999; **44**(4): 489-99.
29. Magdalena T, Fritz H, Herbert H. Survey and Molecular Genetics of SHV betalactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: Two Novel Enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**(5): 943-949.
30. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; **45**: 493-496.
31. 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.
32. Casali N, Preston A. Isolation of plasmids from *E. coli* by boiling lysis, methods in molecular biology. In: Ehrst S, Schnappinger D Totowa, NJ, eds. *E. coli Plasmid Vectors*. Humana Press Inc. 2003; pp: 79.
33. Prinarakis EE, Miriagou V, Tzelepi E, Gazouli M, Tzouvelekis LS. Emergence of an inhibitor-resistant beta – lactamases (*SHV-10*) derived from an *SHV- 5* variant. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 838 -84.
34. Stürnburg E, Mack D. Extended – spectrum beta – lactamases implication for clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *J Infect* 2003; **47**: 273 – 295.
35. Bush K, Jacoby GA & Medeiros AA. Afunctional classification scheme for beta – lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**(6) : 1211 -1233.
36. Pagan-Rodriguez D, Zhou X, Simmons R, Bethel CR, Hujer AM, Helfand MS et al. Tazobactam inactivation of *SHV-1* and the inhibitor-resistant ser¹³⁰ → Gly *SHV-1* beta-lactamase. *J Biological Chemistry* 2004; **279**: 19494-19501.
37. Harward C, Van Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard PM. Identification and minisequencing – based discrimination of *SHV* beta – lactamases in nosocomial infection – associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. *J American Society for Microbiol* 2002; 659–664.
38. Mazzariol A, Roelofsen E, Koncan R, Voss A, Cornaglia G. Detection of a new *SHV*-type extended-spectrum beta-lactamase, *SHV-31*, in a *Klebsiella pneumoniae* strain causing a large nosocomial outbreak in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1082-1084.
39. Chang FY, Siu LK, Fung CP, Huang MH, Ho M. Diversity of *SHV* and *TEM* beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: Gen evolution in northern Taiwan and novel beta-lactamases, *SHV-25* and *SHV-26*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**(9): 2407-2413.
40. Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, Park YJ, Lee K, Bae IK et al. Dissemination of *SHV-12* and *CTX-*

- M-type* extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of *GES-3* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 698-702.
41. Zei – qing Wei, Ya – gang chen, Yung – Song Yu, Xin Lu and Lan – Juan Li. laboratory, therapy and infection control Extended – spectrum beta – lactamases implication for clinical microbiology. *J Medical Microbiol* 2005; **54**: 885-886.
42. Nijssen S, Florijn A, Bonten MJM, Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. Beta-lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European Enterobacteriaceae isolates. *Intern J Antimicrob Chemother* 2004; **24**(6): 585-591.
43. Jones RN, Biedenbach DJ, Gales AC Sustained activity and spectrum of selected extended-spectrum β - lactams (Carbapenems and Cefepim) against Enterobacter spp. And ESBL-producing *Klebsiella* spp. report of the SENTRY antimicrobial surveillance program (USA, 1997-2000). *Intern J Antimicrob Chemother* 2003; **21**: 1-7
44. Nass T, Philippon L, Poirel L, Ronca E, Nordman P. An *SHV*- derived extended– spectrum beta– lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 1281 – 1284.
45. Mendonca N, Manageiro V, Bonnet R, Canica M. Biochemical characterization of *SHV-55*, an extended-spectrum class A beta-lactamases from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1897-1898.
46. Heffernan H, Woodhouse R, Blackmore T. Methods used in New Zealand diagnostic laboratories to identify and report extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteriaceae. *Institute of Environmental Science and Research Limited(ESR)* 2005; 1-38.
47. Heffernan H, Pope C, Carter P. Identification of extended-spectrum beta-lactamase types, plasmid-mediated AMPC beta-lactamases and strains among urinary *Escherichia coli* and *Klebsiella* in New Zealand in 2006. *Institute of Environmental Science and Research Limited(ESR)* 2007; 1-28.
48. Arpin C, Labia R, Andre C, Frigo C, El Harrif Z, Quentin C. *SHV-16*, beta-lactamase with a pentapeptide duplication in the omega loop. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2480-2485.
49. Naiemi NA, Schipper K, Duim B, Bart A. Application of minimal sequence quality values prevents misidentification of the *bla_{SHV}* type in single bacterial isolates carrying different *SHV* extended-spectrum beta-lactamase genes. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 1896-1898.