Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 35, No. 4, Oct. – Nov. 2013, Pages: 80-87

ESBLs Distribution in UPEP Isolates of *Escherichia coli*

Mehdi Moazzami Goudarzi[1*], Farzaneh Hosseini[2]

[1]Department of Microbiology, Science and Research Unit, School of Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Microbiology, School of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

Received: 14 Feb, 2013 Accepted: 11 Apr, 2013

Abstract

Backgrounds and Objectives: Despite the widespread availability of antibiotics, antibiotic resistance uropathogens are increasing. The most common mechanism of antibiotic resistance is production of extended spectrum B-lactamas (ESBL). ESBLs are derived from TEM-1 ، TEM-2 and SHV-1ancestoral plasmids. Currently, according to a variety of mutations in these plasmids, there are more than 90 types for TEM and 25 types for SHV plasmids.

Materials and Methods: In this study, 146 uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolates were collected. Isolated organisms were identified by standard biochemical and microbial tests. Antibiotic susceptibility was examined by disc diffusion method and isolates with ESBL, were recognized. The presence of TEM and SHV plasmids in isolates were examined by PCR method.

Results: According to molecular estimations, TEM and SHV plasmids would be detected in 68/1% of isolates. But, TEM and SHV plasmids were detected in 18/1% and 13/6% of isolates, Separately. It seems that a chromosomal gene of beta lactam resistance was responsible in 52/1% of samples.

Conclusion: According to increase level of antibiotic resistance among UEPC isolates, complete recognition of ESBLs is necessary and also trying to understand who they affect antibiotics resistance.

Keywords: *Escherichia coli*, ESBL, Antibiotic resistance

*Corresponding author:
E-mail: moma1675@gmail.com

مقاله پژوهشی

شیوع بتالاکتامازهای وسیع الطیف در نژادUPEC اشرشیاکلی

مهدی معظمی گودرزی: گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، نویسنده رابط:
E-mail: moma1675@gmail.com
فرزانه حسینی: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

دریافت: ۹۱/۱۱/۲۶ **پذیرش:** ۹۲/۱/۲۲

چکیده

زمینه و اهداف: علی رغم دستیابی به آنتی بیوتیک های متنوع، مقاومت دارویی پاتوژن های ادراری درحال فزونی است. یکی از شایع ترین ساز و کارها در مقاومت باکتری ها، تولید آنزیم های وسیع الطیف بتالاکتاماز است. پلاسمید های ESBL (بتالاکتامازهای وسیع الطیف) اجداد TEM-1 ، TEM-2 و SHV-1 می‌باشند که هم اکنون با رخداد جهش های نقطه ای درآنها، بیش از ۹۰ تیپ TEM و بیش از ۲۵ تیپ SHV بروز یافته است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ۱۴۶ جدایه ادراری باکتری اشرشیاکلی جمع آوری گردید. هویت میکروارگانیسمها با تست های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبی مورد تایید قرار گرفت. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها با روش Disc diffusion تعیین شد. سپس با استفاده از روش سینرژیسم، سویه های مولد بتالاکتاماز شناسایی شدند. در نهایت با استفاده از پرایمر های اختصاصی TEM-1 و SHV-1 و با استفاده از روش PCR ، پلاسمید های TEM و SHV مورد شناسایی قرار گرفتند.

یافته ها: بر اساس ارزیابی فنوتیپیک و مولکولی در جمعیت مورد مطالعه، در نهایت شیوع پلاسمید TEM و SHV به صورت همزمان در میان نژاد UPEC اشرشیاکلی ۶۸/۱٪ تعیین گردید. درحالی که شیوع مقاومت با منشا پلاسمیدی TEMو SHV به تنهایی به ترتیب ۱۸/۱٪ و ۱۳/۶٪ بود. مقاومت با منشا کروموزومی ۳۱/۹٪ تعیین گردید.

نتیجه گیری: با توجه به مقاومت بالای سویه ها به آنتی بیوتیک های بتالاکتام، شناسایی کامل ESBL ها، شناخت کامل مکانیسم های مقاومت ESBL ها و استفاده از آنتی بیوتیک های جایگزین، نقش موثری در کاهش ظهور مقاومت ایفا می نمایند.

کلید واژه‌ها: اشرشیاکلی، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه

ظهور مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام به سال های اولیه کشف مقاومت نسبت به اولین آنتی بیوتیک (پنی سیلین) برمی‌گردد. گرچه اولین بتالاکتاماز در باکتری اشرشیا کلی مشاهده شد (۱)، امروزه شیوع این آنزیم ها در میان باکتری ها رو به افزایش است. چنین مقاومت هایی مربوط به پلاسمید کد کننده آنزیم تخریب کننده آنتی بیوتیک می باشد که به سرعت در میان نمونه های کلینیکی در حال افزایش است. در بسیاری از نژادهای باکتری های گرم منفی به طور طبیعی جهش‌های کروموزومی رخ می دهد، بر این اساس برخی از دانشمندان معتقدند، ممکن است این آنزیم ها محصول موتاسیون در ژن های کد کننده های پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین باشند. نخستین پلاسمید کد کننده ی بتالاکتامازکه در میان گرم منفی ها شناسایی شده است، TEM-1 نام دارد. این پلاسمید در سال ۱۹۶۰ در ایزوله های اشرشیاکلی حاصل از کشت خون به دست آمد (۲). ESBL ها شامل تعدادی آنزیم موتاسیون یافته هستند، که اجازه هیدرولیز آنتی بیوتیک های بتالاکتام وسیع الطیف را می دهند (۳). علی رغم تلاش های صورت گرفته با توجه به شیوع رو به گسترش بتالاکتاماز های وسیع الطیف، به نظر میرسد یکی از راهکارهای موثر در جهت پیشگیری و حتی درمان عفونت ادراری ناشی از باکتری اشرشیاکلی می تواند درک اکوفیزیولوژی بیان ژن های موثر در مرحله اتصال به عنوان نخستین گام پاتوژنز باکتری باشد. شناخت چنین فرایند های تنظیمی همراه با سایر فاکتور های محیطی ـ میزبانی در آینده ای نه چندان دور امکان جایگزینی درمان های

اکولوژیک محور، با درمان های تهاجم محور نظیر استفاده از آنتی بیوتیک ها که خود زمینه انتخاب سویه های مقاوم را فراهم خواهد آورد، مهیا خواهد نمود. ESBL ها در تقسیم بندی که توسط Bush، Jacoby و Medeiros بر اساس پروفایل سوسبترا، ممانعت کنندگی و خصوصیات فیزیکی نظیر وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک صورت گرفته است، به چهار گروه اصلی تقسیم بندی می شوند (۴). ESBL های گروه A: این گروه شامل بتالاکتاماز هایی است که فقط در باسیل های گرم منفی شرح داده شده اندو سبب هیدرولیز پنی سیلین و سفالوسپورین های با طیف اثر اندک و وسیع می گردند. بیشتر سویه های تولید کننده ی این گروه شامل موتانت های TEM-1 ، TEM-2 و SHV-1 می گردند.

۱) ESBL های گروه B: این گروه شامل متالوپروتئیناز هایی هستند که قادر به هیدرولیز کارباپنم ها بوده و به طور عمده در باکتری هایی نظیر سودوموناس آئروژینوزا و سراشیا مارسسنس گزارش شده اند.

۲) ESBL های گروه C: این گروه از آنزیم ها عمدتا محصول ژن های کروموزومی است و در میان آنتروباکتر کلوآکه با بیشترین فرکانس یافت می شوند.

۳) ESBL های گروه D: این گروه از آنزیم ها با توانایی هیدرولیز بالا، معمولا علیه اکساسیلین و کلوکساسیلین وارد عمل شده و اسید کلاولانیک به طور معمول تاثیر چندانی روی فعالیت آن ندارد (۶و۵).

بیشتر آن چه که در مورد تکامل ESBL ها میدانیم از مطالعات انجام شده روی آنزیم های TEM و SHV سرچشمه می گیرد. این آنزیم ها درواقع موتانت های ساختاری TEM-1 ، TEM-2 و SHV-1 می باشند (۷). امروزه بیش از ۹۰ تیپ TEM و بیش از ۲۵ تیپ SHV شناسایی شده است. تیپ های TEM و SHV معمولا اغلب در میان اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه و کمتر درمیان پروتئوس و پروویدنسیا یافت می گردند (۸). پلاسمیدی بودن TEM-1 و رخ داد جهش نقطه ای در آن سبب تسهیل انتشار آن به سایر باکتری ها می گردد. به این دلیل طی سال های گذسته TEM-1 در اعضای خانواده انتروباکتریاسه، سودوموناسیه و همچنین باکتری های هموفیلوس انفولانزا و نایسریا گونوره آ انتقال و انتشار یافته است. دیگر پلاسمید مشترک میان کلبسیلا پنومونیه و اشرشیاکلی، SHV-1 است که به صورت عمده به شکل کروموزومی در کلبسیلا پنومونیه و پلاسمیدی در اشرشیاکلی وجود دارد (۹و۸). پژوهش پیش رو با توجه به کثرت موارد عفونت ادراری ناشی از اشرشیاکلی و سهولت تماس فلور میکروبی دستگاه ادراری و گوارشی اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

برای اجرای این پژوهش تعداد ۱۴۶ جدایه ادراری باکتری اشرشیاکلی از پنج مرکز بهداشتی درمانی تهران جمع آوری گردید. تمامی نمونه ها در شرایط کاملا استریل و به صورت MID STREAM تهیه شدند. از میان این ۱۴۶ جدایه ۹۱ عدد از بیماران زن و۳۷ نفر بیمار مرد و ۱۸ نفر نوزاد شامل ۷ نوزاد دختر و۱۱ نوزاد پسر ایزوله گردیده است. صرف نظر از نوزادان ۳۶٪ افراد به صورت بیمار سرپایی و ۶۴٪ بستری در مرکز درمانی بوده اند. غربال گری جدایه های مولد بتالاکتاماز طی دو مرحله انجام پذیرفت.

الف) ارزیابی فنوتیپیک

جهت انجام نمونه‌گیری از کشت ادارار بیماران استفاده شد. سپس انجام تست‌های افتراقی نظیر IMViC برای شناسایی باکتری اشرشیا کلی در نمونه ادرار انجام شد. پس از تهیه کشت خالص از باکتری اشرشیاکلی، آزمون آنتی بیوگرام به روش دیسک گذاری (کربی بوئر) انجام شد. تمامی دیسک های انتی بیوتیک از شرکت Mast تهیه گردیدند. سپس جهت شناسایی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها، تشخیص فنوتیپیک سوش های عرضه کننده بتالاکتام وسیع الطیف به روش زیر اجرا گردید:

برای این منظور از میان آن دسته از جدایه هایی که از طریق آزمون آنتی بیوگرام نسبت به بتالاکتام ها، یا حداقل برخی از آنها مقاوم تشخیص داده شده بودند، جدایه هایی که نسبت به دو آنتی بیوتیک سفوتاکسیم و سفتازیدیم (دیسک های ۳۰ میکروگرمی) مقاوم بودند، انتخاب گردیدند. سپس با استفاده از روش دیسک سینرژیسم (Double Disc Method) بنا به تکنیک زیر نسبت به شناسایی فنوتیپیک جدایه های واجد بتالاکتاماز مطابق با توصیه (Clinical Standard Laboratory Institute, CSLI) اقدام شد. در این روش پس از تهیه سوسپانسیونی از باکتری، واجد کدورتی برابر نیم مک فارلند ، باکتری مقاوم به سفوتاکسیم و سفتازیدیم روی سطح پلیت مولر هینتون آگار توزیع گردید. سپس سه دیسک ۳۰ میکرو گرمی سفوتاکسیم، آموکسی کلاو، و سفتازیدیم به ترتیب و به فاصله تقریبی بیست میلی متر از یکدیگر روی پلیت تلقیح شده قرارگرفت. پلیت تلقیح شده برای مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. در صورتی که علت مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه مورد مطالعه نسبت به بتالاکتام ها وجود آنزیم های بتالاکتاماز باشد، اسید کلاولانیک موجود در دیسک آموکسی کلاو موجبات حفظ ساختار آنتی بیوتیک بتالاکتام در حضور بتالاکتاماز را فراهم می آورد. در این صورت در محل تلاقی هاله عدم رشد اطراف دیسک آنتی بیوتیک بتالاکتام و دیسک آموکسی کلاو، حالت تشدید مشاهده می گردد.

ب) ارزیابی مولکولی حضور بتالاکتامازها

بتالاکتامازهای وسیع الطیف ($ESBL_S$) از بتالاکتاماز های کلاس A / گروه be۲ می باشند. بیشتر این آنزیم ها از مشتقات TEM – 1 (یک بتالاکتاماز وابسته به پلاسمید از *E.coli*) و یا SHV – 1 (یک بتالاکتاماز کروموزومی از کلبسیلا پنومونیه) می باشد. در این پژوهش پس از تخلیص پلاسمید از جدایه هایی که

با آزمون فنوتیپیک حضور بتا لاکتامازهـای وسـیع الطیـف در آنهـا تایید شده بود، دو پرایمر اختصاصـی بـا نـام هـای TEM و SHV (شرکت Metabion) جهت شناسایی دو پلاسـمید TEM و SHV در اشرشیاکلی استفاده گردید. تـوالی ایـن دو پرایمـر از ایـن قـرار است:

TEM F: 5´- GAAGACGAAAGGGCCTCGTG - 3´
´TEM R: 5´- GGTCTGACAGTTACCAATGC - 3
SHV F: 5´- CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC – 3´
SHV R: 5´- TCTTTCCGATGGCGCCGCCAGTCA – 3

جهت تخلیص نمودن پلاسمیدها از سوش های انتخابی از کیـت استخراج پلاسمید (Miniprep) ساخت مرکـز رشـد پژوهشـگاه ملی مهندسی ژنتیـک و زیسـت فنـاوری، طبـق پروتکـل کیـت استفاده گردید. به این منظور ابتدا یک کشت اورنایـت از بـاکتری های انتخابی، مطابق شرایط زیر تهیه شد.

باکتری ها در دمای ۳۷ درجه سـانتیگراد در محـیط کشـت مـایع (Luria bertani broth, LB) در انکوبـاتور شـیکر داربـا دور ۶۰۰ rpm کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت محـیط کشـت تلقـیح شـده توسـط سـانتریفیوژ یخچـال دار بـا دور ۱۳۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجـه سـانتیگراد و درون میکروتیـوپ ۲ میلـی لیتـری، سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویـی میکروتیـوپ درو ریختـه شـده وپلیت بـاقی مانـده کـه شـامل بیـومس میکروبـی اسـت مطـابق پروتکل کیـت جهـت اسـتخراج پلاسـمید مـورد اسـتفاده قـرار گرفت. پس از تخلیص پلاسمید، میکروتیوب حاوی پلاسمید تـا زمان انجام واکنش در منهای بیست درجه سانتی گـراد نگهـداری شد. واکنش PCR جهت تکثیر قطعه ۱۰۷۴ bp، مطابق برنامـه ای تحت عنواTEM ، با استفاده از دو پرایمر اختصاصـی TEM F و TEM R اجرا گردید. جزئیات برنامـه TEM در جـدول ۱ آورده شده است. واکـنش PCR جهـت تکثیـر قطعـه ۱۰۱۶bp مطـابق برنامه SHV، با استفاده از دو پرایمر اختصاصی SHV F و SHV R اجرا گردید. جزئیـات برنامـه SHV در جـدول ۲ آورده شـده است. جهت کنترل کیفی دیسک های آنتـی بیوتیـک و همچنـین کنترل مثبت در واکنش PCR از دو سوش اسـتاندارد اشرشـیاکلی شـامل: VEB-1, *E.coli* –MG-1 و *E.coli* -501,CTX-M-15 و به عنوان کنترل منفی از سوش های حساس استفاده شد.

یافته ها

ارزیابی فنوتیپیک حضور بتالاکتاماز های وسیع الطیـف درمیـان جدایه های مقاوم به بتالاکتام:

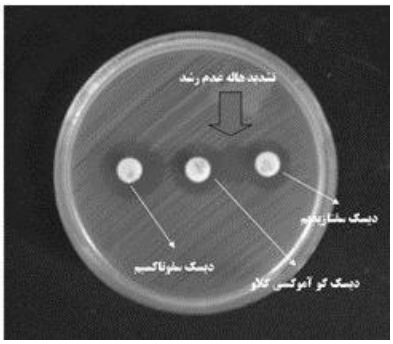
در این مرحله به منظور انتخاب جدایـه مولـد بتالاکتامـاز هـای وسیع الطیف در میان جدایه های مقاوم به بتالاکتام از روش دیسـک سینرژیسم استفاده گردید. جدایه هایی انتخـاب شـدند کـه تشـدید قطر هاله عدم رشد در محل طلاقی هاله دیسک اسـید کلاولانیـک و دیسک آنتی بیوتیک بتالاکتام در آنها مشـاهده گردیـد (شـکل ۱). همان طور که پیش تر اشـاره شـد، در اسـید کلاولانیـک از طریـق غیرفعال نمودن آنزیم های بتالاکتاماز ساختار آنتی بیوتیـک را حفـظ کرده و از این طریق در محل تلاقی هاله عدم رشد ناشی از دیسـک آنتی بیوتیک بتالاکتام و اسیدکلاولانیک سینرژیسم مشـاهده میگـردد (شکل ۱). این جدایه هـا بـرای آزمـون PCR مـورد اسـتفاده قـرار گرفتند. پس از اجرای تلخیص پلاسمید از ۴۶ جدایه ای که آزمـون دیسک سینرژیسم آنها مثبت شده بود، از تمامی ۴۶ جدایه پلاسـمید به دست آمد و در دمای منهای بیسـت درجـه سـانتیگراد تـا زمـان اجرای آزمون PCR نگهـداری شـدند. یـک سـاعت قبـل از انجـام PCR نمونه ها به دمای صفر درجه سانتیگراد منتقل شـدند. پـس از اجرای برنامه TEM باند ۱۰۷۴ bp روی ژل آگارز مشاهده گردیـد. نتیجه الکتروفورز محصول PCR روی ژل در شکل ۲ مشاهده مـی گردد. پس از اجرای برنامـه SHV بانـد ۱۰۱۶ bp روی ژل آگـارز مشاهده گردید. نتیجه آزمون PCR روی ژل الکتروفـورز در شـکل ۳ قابل مشاهده اسـت. از مجمـوع ۱۴۶ جدایـه ی بـاکتری اشرشـیا کلی ۴۶ جدایه که به طور هم زمان به دو آنتی بیوتیک سـفتازیدیم و سفوتاکسیم مقاوم بودند، از نظر حضور پلاسمیدهای کـد کننـده ی بتالاکتاماز وسیع الطیف مـورد بررسـی قـرار گرفتنـد. نتـایج آزمـون PCR نشان داد که بتالاکتاماز های وسیع الطیف با منشاء پلاسـمیدی دست کم در میان ۲۲ جدایه معادل تقریبا ۴۸٪ از سویه ها حضـور دارند. به این ترتیب که بتالاکتامـاز هـا بـا منشـاء TEM و SHV بـه صورت همزمان در میان ۱۵ جدایـه (معـادل: ۶۸/۱٪) از نمونـه هـا مشاهده گردید. در عین حال بتالاکتامازها با منشاء TEM بـه تنهـایی در ۴ جدایه (معـادل: ۱۸/۱٪) و بتالاکتامـاز هـا بـا منشـاء SHV بـه تنهایی در ۳ جدایه (معادل: ۱۳/۶٪) مشاهده گردید. با توجه به ایـن که نتایج آزمون PCR روی پلاسمیدهای تخلیص شده، تنهـا در ۲۲ نمونه از ۴۶ نمونه عرضه کننده خواص فنوتیپیک مشـاهده گردیـد، مقاومت نسبت به بتالاکتام ها در ۲۴ جدایه بـاقی مانـده بـا فراوانـی ۳۱/۹٪ منشاء کروموزمی دارد.

جدول ۱: برنامه TEM

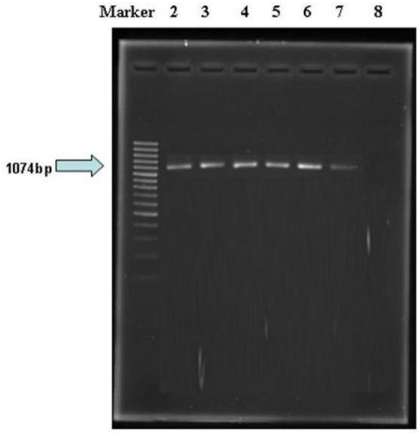
زمان	دما	مرحله
۳ دقیقه	۹۴	پیش واسرشت شدن
۷۵ ثانیه	۹۴	واسرشت شدن
۷۰ ثانیه	۵۵	اتصال آغازگرها
۱ دقیقه	۷۲	طویل شدن
–	۳۴	تکرار
۱ دقیقه	۷۲	طویل شدن انتهایی
–	۴	نگه داشتن

جدول ۲: برنامه SHV

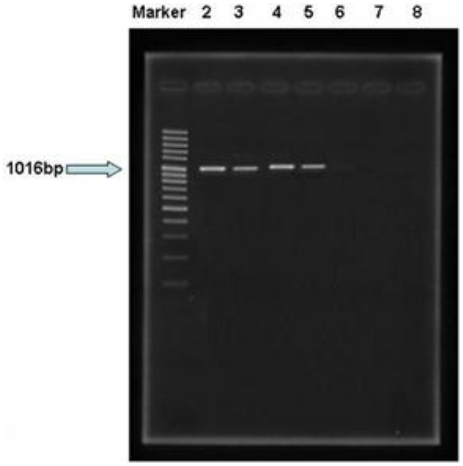
زمان	دما	مرحله
۳ دقیقه	۹۴	پیش واسرشت شدن
۷۵ ثانیه	۹۴	واسرشت شدن
۷۰ ثانیه	۶۰	اتصال آغازگرها
۱ دقیقه	۷۲	طویل شدن
–	۳۴	تکرار
۱ دقیقه	۷۲	طویل شدن نهایی
–	۴	نگه داشتن



شکل ۱: روش دیسک سینرژیسم جهت ارزیابی فنوتیپیک حضور بتالاکتامازهای وسیع الطیف. همان طور که در شکل مشاهده می‌گردد هاله عدم رشد درمحل تلاقی دیسک سفتازیدیم و کوآموکسی کلاو تشدید شده است. این دسته از نمونه ها به لحاظ فنوتیپیک کاندید عرضه بتالاکتاماز میباشند



شکل ۲: آزمون PCR جهت تعیین حضور پلاسمید TEM در جدایه های مقاوم به بتالاکتام. خط ۱ : مارکر .خطوط ۲ ، ۳ ، ۴ ، ۵ ، ۶ جدایه های مثبت از نظر حضور پلاسمید TEM- خط ۷ کنترل مثبت و خط ۸ کنترل منفی. مارکر (۱۵۰۰) bp ۱۰۰



شکل ۳: نتیجه آزمون PCR جهت تعیین حضور پلاسمید SHV درجدایه های مقاوم به بتالاکتام .خط ۱ : مارکر . خطوط ۲ ، ۳ ، ۴: نمونه های مثبت .خط ۵ کنترل مثبت. خط ۶ : کنترل منفی. خط ۷ و۸ نمونه ای لود نشده است. مارکر (۱۵۰۰) bp ۱۰۰

بحث

کشور ایران طبق نتایج تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی مازندران در سال ۱۳۷۶ که روی ۹۰۹ نمونه انجام شده است، شیوع آلودگی مجرای ادرار۱۳/۳۲٪ (در خانم ها ۱۴/۹۲٪ و درآقایان ۱۱/۷۳٪) گزارش گردیده است (۱۷و۱۶). در یک مطالعه توصیفی بر روی ۴۰۰ خانم، ۱۱ نفر به طور واضح علامت عفونت ادراری داشتند و در آزمایش ادرار هم باکتریوری مثبت بودند و ۱۹ نفر بدون علامت اما باکتریوری مثبت بودند. بر اساس این مطالعه فراوانی باکتریوری علامت دار ۲/۷۵٪، و باکتریوری بدون علامت ۴/۷۵٪ و در کل ۷/۵٪ خانم های مورد مطالعه واجد باکتریوری بودند (۱۸). براساس مطالعه مشابه دیگری از ۲۵۵ خانم، ۲۷ نفر (۱۰/۵۸٪)واجد عفونت ادراری بودند (۱۹). نتایج این مطالعه و سایر مطالعات انجام گرفته در این راستا، بیانگر فراوانی بیشتر عفونت های ادراری در خانم ها در مقایسه با آقایان بوده است که این نتایج به وضعیت فیزیولو ژیک دستگاه ادراری در خانم ها ارتباط دارد (۱۹). فراوانی بالای عفونت های بیمارستانی نشان دهنده کیفیت ضعیف ارائه خدمات بهداشتی- درمانی می باشد (۱۹). درمان پادزست درصد قابل توجهی از عفونت ها، از جمله عفونت های ادراری اشرشیاکلی که در گذشته به سادگی امکان پذیر می بود، امروزه با کسب انواع مقاومت های آنتی بیوتیکی پرهزینه و دشوار گردیده است (۱۰). در مطالعه پیش رو از مجموع ۱۴۶ جدایه ی باکتری اشرشیا کلی ۴۶ جدایه که به طور هم زمان به دو آنتی بیوتیک سفتازیدیم و سفوتاکسیم مقاوم بودند، از نظر حضور پلاسمید های کد کننده ی بتالاکتاماز وسیع الطیف مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد که بتالاکتامازهای وسیع الطیف در میان ۶۸/۱٪ از سویه ها حضور دارند. پژوهشی از ۱۵ بیمارستان ایالتی در امریکا در سال ۱۹۹۷ حضور بتالاکتاماز ها را در ۴۴٪ از سویه های اشرشیا کلی نشان داد (۱۱). مطالعات مشابهی که توسط Song و همکاران در سال ۲۰۰۷ میلادی انجام گرفت نشان میدهد که در ۴۰٪ نمونه ها ژنوتیپ TEM و در ۸۰٪ نمونه ها ژنوتیپ SHV، مشاهده شده است (۱۲). در مطالعه ای دیگر Patzer و همکاران در سال ۲۰۰۷ میلادی نشان دادند که درصد سویه های اشرشیا کلی دارای ژن SHV از ۵۶٪ در سال ۲۰۰۱ به ۳۴٪ در سال ۲۰۰۵ کاهش یافته است (۱۱). در حالی که نتایج پژوهش مشابه در ترکیه نشان می دهد ۵۲/۷٪ از سویه های اشرشیاکلی دارای پلاسمید TEM و ۷۴/۳٪ از آنها دارای پلاسمید SHV و ۳۲/۴٪ از جدایه ها دارای هر دو نوع پلاسمید مقاومت آنتی بیوتیکی بودند (۱۳). در این راستا در ایران مشخص گردید که به ترتیب ۷۶/۷٪ و ۶۰/۶٪ از گونه های کلبسیلا و اشرشیاکولی، جداسازی شده از بخش های مراقبت ویژه، مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف بوده اند (۲۰). بر اساس مطالعات انجام شده مشخص گردید ۳۰/۸٪ باکتری های عامل عفونت های بیمارستانی و ۴۳/۵٪ از باکتری های مولد عفونت در بخش های مراقبت ویژه، مولدESBL بوده‌اند (۲۲و۲۱). در سال ۱۳۸۶ تحقیقی توسط حسین زادگان و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی لرستان با موضوع شیوع ESBL در میان اشرشیاکلی در بیمارستان شهدای عشایر شهر خرم آباد انجام گردید. از مجموع ۲۲۵ نمونه،۵۳ مورد (۲۳/۵۵٪) مثبت بودند که از این تعداد ۷ مورد عرضه کننده TEM بودند (۲۴). در تحقیقی که توسط شاهچراغی و همکاران در پاییز سال ۸۶ در انستیتو پاستور ایران انجام گرفت، از ۲۰۰ نمونه بالینی اشرشیاکلی ۱۰۵ مورد (۵۲/۵٪) از نظر ESBL مثبت گزارش شدند. که از این تعداد ۱۲ مورد (۶٪) حاوی TEM بودند (۲۳). میزان شیوع TEM در تحقیقی که توسط میرصالحی و همکاران در سال ۱۳۷۸ برروی ۳۳ ایزوله از اشرشیا کلی انجام گرفت شیوع ESBL (۳۹/۴٪) گزارش گردید (۲۵). در سال ۱۳۸۶ مسجدیان و همکاران نشان دادند که از ۱۴۸ جدایه اشرشیاکلی (۳۹/۴٪) حاوی ژن TEM بوده اند (۲۶). ژینوس بیات ماکو و همکاران در سال ۱۳۸۹ در مطالعه ای در دانشگاه علوم پزشکی تبریز شیوع ESBL را در میان جدایه های اشریشاکلی ۴۹/۲٪ گزارش کردند (۲۷). تنوع نتایج و افرایش نسبی مقادیر شیوع، جای نگرانی است. لازم به ذکر است که باکتری های حامل ژن آنزیم بتالاکتاماز حتی در صورت نشان دادن حساسیت نسبت به داروهای بتالاکتام در آزمایشگاه، درمان عفونت‌های ناشی از آن را با شکست مواجه می سازند. بیمارانی که به عوامل عفونی مولد بتالاکتاماز های وسیع الطیف دچار میشوند، علاوه بر عدم درمان با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف، غالبا نسبت به سایر آنتی بیوتیک ها نیز مقاومت نشان می دهند. بتالاکتاماز های وسیع الطیف اهمیت خاصی در استراتژی درمانی دارند، زیرا به علت شکست های درمانی حاصل از تجویز آنتی بیوتیک بدون انجام آزمون حساسیت، زمینه افزایش مرگ و میر، طولانی شدن طول دوره درمان و افزایش هزینه ها را فراهم آورده است (۱۱). تعیین و شناسایی بتالاکتاماز های وسیع الطیف از دو جهت واجد اهمیت می باشد : ۱) بتالاکتاماز های وسیع الطیف به طور گسترده در سطح جهان در حال گسترش می باشند. ۲) افزایش تعداد باکتری هایی که وارد بدن میزبان می گردند باعث ایجاد نژاد های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف میگردد. چرا که پژوهش ها نشان می دهد حداقل غلظت مهارکننده ی رشد باکتری در حضور سفالوسپورین ها با افزایش دوز تلقیح باکتری از 10^5 به 10^7 افزایش میابد (۱۳و۱۲). بیمارانی که به عوامل عفونت زای مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف مبتلا می باشند، معمولا به طور غالب به سایر آنتی بیوتیک ها نیز مقاومت نشان می دهند. لذا پیشنهاد می گردد کلیه ایزوله ها از نظر تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف مورد ارزیابی قرار گیرند و طبق دستورالعمل NCCLS گزارش گردند. در این گونه موارد ضروری است که پژوهشگر بدون توجه به نتیجه آزمون آنتی بیوگرام ، ایزوله به دست آمده را بالقوه مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در نظر بگیرد (۱۴). اگرچه برخی از نژاد های مولد ESBL دارای مقاومت آشکار به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف می باشند ولی درهر حال ممکن است در بررسی فنوتیپیک ، مقاومتی نشان ندهند (۱۵و۸). لذا ضروری است که آن دسته از باکتری هایی که MIC افزایش یافته نسبت به اکسی آمینوسفالوسپورین ها را نمایش می دهند، به طور دقیق مورد شناسایی مراجع تشخیصی قرار گرفته و حتی اگر سوش، حساس

به آنتی بیوتیک گزارش شود، ضرورتا بایستی حضور یک نوع ESBL را درنظر داشت. در میان بیماران مبتلا به عفونت های ناشی از ارگانیسم های مولد بتالاکتاماز های وسیع الطیف غالبا به علت مقاومت متقاطع وسیعی که با سایر داروهای پادزیست ایجاد می شود، درمان همواره با مشکلات جدی روبه رو بوده است. بر این اساس ضرورت غربالگری ایزوله ها و شناسایی نوع آنزیمی که توسط ایزوله ها حمل می شود، جهت اتخاذ تدابیر پیشگیرانه و طراحی استراتژی های درمانی کارآمدتر ضروری می نماید.

References

1. Simoes RR, Poirel L, Da Costa PM, Nordmann P. Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant Escherichia coli. *Emerg Infect Dis* 2010; **16**: 110-112.
2. Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortés P, González JJ, Lavilla S, et.al. Extended spectrum beta lactamase producing Entrobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *Journal of Antimicrobial chemotherapy* 2006; **58**(1): 211-215.
3. Rodr iguez-Bano JP, Paasch F. Community-onset bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis* 2010; **50**: 40-43.
4. Abraham E, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 1970; **12**: 125-126.
5. Tschudin-Sutter S, Casellas JM. Rate of transmission of extended-spectrum Beta-lactamase-producing enterobacteriaceae without contact isolation. *Clin Infect Dis* 2012; **55**: 1505-1509.
6. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 1995; **39**: 1211-1233.
7. Hitikhar A, Abdus S. Extended spectrum beta lactamases and bacterial resistance. *J Med* Sci 2002; **18**(2): 151-152.
8. Tetsuya Y, Hiroshi K, Naohiro S, Keigia S. A preliminary survey of extended spectrum beta lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pnenumoniea* and *Escherichia coli* in Japan. *Microbialogy letters* 2000; **184**(1): 53-56.
9. Tangden T, Cars O, Melhus A, Lowdin E. Foreign travel is a major risk factor for colonization with Escherichia coli producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases: a prospective study with Swedish volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 3564-3566.
10. Marty L, Jarlier V. Surveillance des batteries multiresistant: Justification, role of laboratories. *Progress in urology* 1999; **9**: 41-49.
11. Patzer JA, Dzierzaniwska D, Pawinska A, Turner PJ. High activity of meropenem against Gran negative bacteria from a pediatric intensive Care Unit, 2001 -2005. *J Antimicrobial agents* 2007; **2**: 211-212.
12. Song W, Bae IK, Lee CH, Lee SH. Detection of extended – spectrum β – lactamases by using boronic acid as an AmpC β – lactamas inhibitor in clinical isolates of Klebsiella SPP. & Escherichia coli, K. *CLI MICROBIAL* 2007; **6**: 115-116.
13. Alsterlund R, Axelsson C, Olsson-Liljequist B. Long-term carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli. *Scand J Infect Dis* 2012; **44**: 51-55.
14. Gould CV, Umscheid CA, Agarwal RK, Kuntz G, Pegues DA. Guideline for revention of catheter-associated urinary tract infections 2009. *Infect Control Hosp Epidemiol* 201; **31**(4): 319-326.
15. Salverda ML, De Visser JA, Barlow M. Natural evolution of TEM-1 beta-lactamase; experimental reconstruction and clinical relevance. *Fems Microbial Rev* 2010; **34**(6): 1015-1036.
16. Myrmobiny M, Haghshenas M. Comparison of bacterial pollution in ureteral men and women referred to health centers of Sari. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 1997; **15**: 6-9.
17. Nikpour S, Tabrizian L, Masroor Roodsari D, Haghani H. Study of predisposing factors of urinary tract infections among married women referred to selected hospitals in Tehran city (2003). *IUMSJ* 2004; **11**: 489-491.
18. Jain A. Prevalence of extended spectrum beta-lactamases producing gram negative bacteria in septicemia neonates in a tertiary care hospital. *J Med Microbial* 2003; **52**: 421-425.
19. Zeighami H. Etiology of UTI in pregnant women. *The 9th National Congress of Microbiology. Iran-Kerman* 2007; **34**.
20. Mirsalehian A, Nakhjavani F. Prevalence of ESBLs producing Enter bacteria in intensive care units. *The 8th National Congress of Microbiology. Iran-Isfahan* 2006; **15**.
21. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A. International prospective study of Klebsiella pneumoniae bacteremia: *J Med Microbial* 2003; **57**: 354-357.
22. Mendelson GV, Hait J, Ben-Israel D, Gronich E, Granot R. Prevalence and risk factors of extended-spectrum beta lactamase- producing Escherichia coli and Klebsiella pneumonia in an Israeli long-term care facility. *Eur J Clin Microbial Infect Dis* 2005; **24**: 17-22.
23. Shahcheragh F, Nasiri S, Neurath H. Presence of SHV and TEM lactamase genes in E. coli strains resistant to antibiotics isolated from clinical specimens from hospitals in Tehran. *Journal of Medical Microbiology. Iran J Med Microbial* 2007; **1**: 1-8.

24. Hosseinzadegan H, Hasani A, Azadpor M, Soleiman Nejad S, Mohammadi F. Identification B-lactamase producing gram negative broad spectrum of bacteria isolated from clinical cases. *Iran J Experiment Sci* 2007; **1**: 33-38.
25. Mirsalehian A, Akbari-Nakhjavani F, Peymani A, Kazemi B, Jabal Ameil F, Mirafshar SM. Prevalence of extended spectrum B-lactamase producing Enterobacteriaceae by phenotypic and genotypic methods in intensive care unit in Tehran. *Iran Daru* 2008; **16**(3): 169-173.
26. Masjedian GF, Valehi F, Talebi A, Rastegar LA. Molecular evaluation of resistance to espanded antibiotics in Escherchia coli and Klebsiella pneumoniae. *Iran J Med Microbial* 2007; **1**: 27-34.
27. Bayat Makoo Z, Binesh E, Hasani A, Nagili B, Alipour Study on Prevalence of Extended Spectrum , Lactamase Producing Gram Negative Bacilli in Clinical Specimens Isolated From Hospitalized Patients in Tabriz Sina Hospital. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences* 2010; **32**: 11-15.