فصلنامه بیماری های عفونی و گرمسیری وابسته به انجمن متخصصین بیماری های عفونی و گرمسیری
سال سیزدهم ، شماره ۴۳ ، صفحات ۳۱ تا ۳۸ ، زمستان ۱۳۸۷

حساسیت آنتی بیوتیکی به سفالوسپورین های نسل سوم و شیوع تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف از خانواده TEM در ایزوله های بالینی اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه جمع آوری شده از بیمارستانهای شهر تهران

محسن چیت ساز[1*]، مریم بازرگان [2]

۱. میکروب شناس، استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد
۲. دانشجوی پی اچ دی، دانشکده داروسازی دانشگاه استرالیای جنوبی

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران، بلوار کشاورز، خ. شهید عبدالله زاده، شماره ۲۹ ، دانشکده پزشکی شاهد، گروه میکروبیولوژی، Mohsen.Chitsaz@unisa.edu.au ، Maryam.Bazargan@postgrads.unisa.edu.au

دریافت مقاله: مرداد هشتاد و هفت پذیرش برای چاپ: مهر هشتاد و هفت

چکیده

سابقه و هدف: *باسیل های گرم منفی تولید کنندهٔ بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) امروزه یک نگرانی درحال رشد درپزشکی هستند. تولید ESBLs موجب مقاومت گستردهٔ باکتری به سفالوسپورین های نسل سوم و مونوباکتام ها می شود. شمار زیادی از ژنها شناسایی شده اند که آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع‌الطیف را رمز بندی می کنند. بتالاکتامازهای خانواده TEM با بیش از ۱۶۰ تیپ بزرگترین گروه این آنزیمها را تشکیل می دهد. تیپ های مختلف این خانواده آنزیمی در مناطق مختلف جغرافیایی شیوع متفاوتی دارند . در این تحقیق ایزوله های بالینی اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه بدست آمده از بیمارستانهای شهر تهران برای حساسیت آنتی بیوتیکی به سفالوسپورین های نسل سوم و شیوع ژنهای ESBLs از خانواده TEM مورد بررسی قرار گرفته اند.*

روش کار: *از یک مجموعهٔ ۳۰۲ ایزوله باکتریال شامل ۱۵۴ ایزوله اشریشیا کلی و ۱۴۸ ایزوله کلبسیلا پنومونیه که در دوره زمانی شش ماه (مهر تا اسفند ماه ۱۳۸۵) از نمونه های بالینی بیماران در بیمارستان های مرکز طبی کودکان، امام خمینی و شهید مصطفی خمینی تهران جدا شدند، در این تحقیق استفاده شد. حساسیت آنتی بیوتیکی به سفالوسپورین های نسل سوم با تعیین MIC های ایزوله های باکتریال برای سفتازیدیم و سفتریاکسون به روش رقت در آگار استاندارد مشخص شد. شناسایی تولید ESBLs در سطح فنوتیپی بر پایهٔ کاهش MIC های ایزوله های باکتریال برای سفتازیدیم و سفتریاکسون در ترکیب با اسید کلاوولانیک در مقایسه با آنتی بیوتیکها به تنهایی صورت گرفت. معیارهای توصیه شدهٔ CLSI برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی و شناسایی ESBLs بکار رفت. ایزوله های فنوتیپ مثبت ESBL با روش PCR و استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنهای خانوادهٔ TEM مورد آزمایش قرار گرفتند.*

یافته ها: *نسبت کلی تولید کننده هایESBLs ٪۵۸ مشخص شد که آن برای کلبسیلا پنومونیه (٪۶۴) و برای اشریشیا کلی (٪۵۲) بود. از ایزوله های فنوتیپ مثبت اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ٪۵۸ و ٪۳۴ بتالاکتامازهای وسیع الطیف خانوادهٔ TEM را تولید می کردند. به ترتیب ٪۴۵ و ٪۱۷ از ایزوله های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه دارای دو خصوصیت عدم تولید ESBLs و حساسیت به سفتازیدیم (MIC کمتر یا برابر یک میلی گرم در لیتر) بودند، امّا ٪۳۰ و ٪۳ از ایزوله های بالینی همان گونه ها (به ترتیب)، تولید کننده ESBL ولی دارای MIC هایی در بازهٔ حساس یا اینترمدیت(۲ تا ۱۶ میلی گرم در لیتر) برای سفتازیدیم بودند. ٪۴۶ و ٪۱۷ از ایزوله های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه (به ترتیب) بدون تولید ESBLs و حساس به سفتریاکسون(MIC کمتر یا براب ۱ میلی گرم در لیتر) بودند. ولی ٪۲۳ و ٪۶ انواع ایزوله ها (به ترتیب)، تولید کننده ESBL و دارای MIC هایی در بازهٔ حساس یا اینترمدیت(۲ تا ۱۶ میلی گرم در لیتر) برای سفتریاکسون بودند.*

نتیجه گیری: *تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف درایزوله های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه در بیمارستانهای مرکز طبی کودکان، امام خمینی و شهید مصطفی خمینی تهران بسیار شایع است. در بخشی از این ایزوله های بالینی نوع بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف تولیدی از خانوادهٔ آنزیمهای TEM می باشد. درصد قابل توجهی از ایزوله های ESBL مثبت هر دو نوع ارگانیسم MIC هایی در محدوهٔ حساس یا غیر مقاوم به بعضی سفالوسپورین های نسل سوم را دارند. از آنجائیکه این قبیل ایزوله ها با آزمایشهای معمول آنتی بیوگرام بعنوان مقاوم به سفالوسپورین های نسل سوم قابل شناسایی نیستند، اجرای آزمایش های شناسایی ESBL در بیمارستانهای مورد مطالعه ضروری می باشد.*

واژگان کلیدی: اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، ESBL، TEM

مقدمه

باسیل های گرم منفی تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف-Extended spectrum beta-lactamases (ESBLs)امروزه یک نگرانی درحال رشد درپزشکی هستند. اهمیت بالینی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بخاطر توانایی آنها در تجزیه اکثر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام رایج می‌باشد. باسیل های گرم منفی خصوصاً کلبسیلا پنومونیه و اشریشیا کلی وقتیکه این آنزیمها را تولید می کنند، در غیرفعال کردن سفالوسپورین‌های جدید نسل سوم بسیارکارآمدتر می شوند. علاوه براین، باکتریهای تولید کننده ESBLs بطورشایع به بسیاری از دسته های آنتی بیوتیکهای غیربتالاکتام مانند کوئینولونها و آمینوگلیکوزیدها نیزمقاوم هستند که موجب مشکل شدن بیشتر درمان عفونت آنها می شود(۱و۲).شمار زیادی از ژنها شناسایی شده اند که آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع‌الطیف را رمز بندی می کنند. بیش از ۴۰۰ واریانت ژنتیکی طبیعی ESBLsشناسایی شده‌اند که به خانواده‌های ژنیTEM، SHV، CTX-M و گروه‌های جدیداً شناسایی شده تعلق دارند(http://www.lahey.org/Studies). شیوع واریانت‌های ژنتیکی مسئول مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سوم در مناطق مختلف جغرافیایی، در بیمارستان‌های مختلف و در طول زمان تغییر می کند وعمدتاً تحت فشار انتخاب ناشی از مصرف آنتی بیوتیکها قرار دارد(۳و۴). این شاخصهای ژنتیکی مقاومت روی پلاسمید قرار گرفته اند و با سازوکارهای انتقال ژنتیکی به سویه های غیر مقاوم همین گونه ها و سایر انواع آنتروباکتریاسه منتقل می شوند و مقاومت آنتی بیوتیکی را گسترش میدهند(۵). آنتروباکتریاسه تولید کننده ESBLs در بیمارستانها شیوع بالاتری دارند و نسبتهای قابل توجهی ازعفونتهای بیمارستانی توسط این باکتریها ایجاد میشود. این میکروارگانیسم ها در مسایل مربوط به کنترل عفونت نیز چالش بوجود می آورند(۶). درپنج سال گذشته فراوانی ESBLs بطور واضح در سرتاسر دنیا افزایش یافته است و هم اکنون یک مشکل عمده درمانی دربسیاری ازمکانهای بالینی هستند. اطلاعات پی آمدهای بالینی حاکی ازآن است که ESBLs برحسب میزان عوارض ومرگ ومیر، ازنظر بالینی معنی دار و دارای اهمیت می باشند. بیماران عفونت یافته با ESBLs در صورتیکه بطور صحیح درمان نشوند با خطر مرگ مواجه هستند(۹-۷).بخاطر اهمیت زیاد تشخیص ارگانیسم مولد ESBLs به منظور دستیابی به انتخاب های درمانی صحیح، مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute در سال ۲۰۰۳ پیشنهاد کرد که تمام ایزوله های بالینی اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه برای شناسایی ESBLs مورد آزمایش قرار گیرند(۱۰و۱۱) و این آزمایش هم اکنون در کشورهای پیشرفته در بیمارستانها و آزمایشگاههای بالینی برای باکتریهای کلبسیلا پنومونیه و اشریشیاکلی بصورت روتین درآمده است و نتیجه آزمایش آنتی بیوگرام این باکتریها با در نظر گرفتن تست ESBL گزارش می شود. ولی باوجود مصرف بسیار زیاد آنتی بیوتیک در داخل کشور و خصوصاً بتالاکتام ها و از طرفی هزینه بسیار اندک و آسان بودن اجرای تست ESBL ، این تست در بیمارستانها و آزمایشگاههای داخل کشور انجام نمی شود. علت این مسأله می تواند ناشی از کمبود آگاهی نسبت به مشکل بتالاکتامازهای وسیع الطیف و شدت آن در جامعه بوده یا به سبب نبود یک سازمان متولی و مسئول برای تدوین راهنماهای عمل برای مصرف آنتی بیوتیکها و محدود کردن مصرف آنها بر پایه اطلاعات داخلی باشد. لذا تحقیق در باره ارگانیسمهای تولید کننده ESBLs ، و تأمین اطلاعات پایه برای: الف) تهیه استراتژیهای درمانی با استفاده از سفالوسپورینهای نسل سوم؛ ب) تهیه راهبردهای محدود کردن مصرف آنتی بیوتیک و انتشار مقاومت؛ ج) کنترل عفونتهای بیمارستانی ناشی از ارگانیسمهای تولید کننده ESBLs؛ د) بهبود شناسایی مقاومت به سفالوسپورینهای نسل سوم و سفالوسپورینهای جدیدتر در آزمایشگاههای تشخیصی بالینی و گزارش گزینه های درمانی مناسب تر برای اجتناب از شکست های درمانی، ضروری می باشد. ولی با این حال تحقیقات محدودی در داخل کشور در این رابطه صورت گرفته و نیاز به روشن تر شدن اهمیت موضوع و عطف توجه بیشتر به آن، خصوصاً در بیمارستانها وجود دارد.در این تحقیق ابتدا تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف در ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه و اشریشیا کلی که از نمونه های بیماران در بیمارستانهای شهید مصطفی خمینی، امام خمینی و مرکز طبی کودکان به مدت شش ماه (از مهر تا اسفند ۱۳۸۵) جمع آوری شده بودند در سطح فنوتیپی بر پایه MIC برای سفتازیدیم و سفتریاکسون مورد بررسی قرار گرفته، سپس بطور ویژه ژنهای بتالاکتامازهای وسیع الطیف از نوع TEM در ایزوله های فنوتیپ مثبت در سطح اختصاصی خانواده مورد شناسایی قرار گرفته است.

روش کار

از یک مجموعهٔ ۴۵۸ ایزولهٔ بالینی باکتریال شامل ۲۸۹ ایزوله اشریشیا کلی و ۱۶۹ ایزوله کلبسیلا پنومونیه که در دوره زمانی شش ماه (مهر تا اسفند ماه ۱۳۸۵) از نمونه های بالینی بیماران در بیمارستان های مرکز طبی کودکان، امام خمینی و شهید مصطفی خمینی تهران جدا شدند، تعداد ۳۰۲ ایزوله شامل ۱۵۴ ایزوله اشریشیا کلی و ۱۴۸ ایزوله کلبسیلا پنومونیه بطور تصادفی انتخاب و در این تحقیق استفاده شد. ایزوله های باکتریال در محلول نگهدارنده (CryoBank [Mast Group Ltd, BOOTLE L20 1EA Merseyside, UK] بصورت سوسپانسیون تهیه و در فریزر ۷۰- درجه نگهداری می شدند. اطلاعات مربوط به هر ایزوله میکروبی شامل: نام بیمارستان، بخش بستری، نمونه بالینی، شماره ی پروندهٔ بیمار، مشخصات میکروارگانیسم جداسازی شده [نام جنس و گونه و شمارش کلنی در مورد نمونه های ادراری] همزمان با دریافت نمونهٔ میکروبی تهیه و در یک فایل اطلاعات اکسل وارد می گردید. در این تحقیق از سویه‌های اشریشیا کلی (ATCC25922) ، کلبسیلا پنومونیه(ATCC700603) ، سودوموناس آئروجیوزا (ATCC27853) و استافیلوکوکوس ارئوس(ATCC25923) به عنوان کنترل کیفی آزمایشهای MIC و تست های شناسایی ESBL استفاده گردید. از روش رقت در آگار استاندارد برای تعیین MIC ایزوله های بالینی برای آنتی بیوتیکهای سفتازیدیم و سفتریاکسون، هر کدام به تنهایی و در ترکیب هر یک با اسیدکلاوولانیک استفاده شد. ایزوله های مورد آزمایش و سویه های کنترل کیفی را ۴۸ ساعت قبل از انجام آزمایش از فریزر ۷۰° خارج کرده و توسط اپلیکاتورهای استریل مقداری از هر کدام را روی محیط کشت بلاد آگار کشت می دادیم و بعد از رشد ۲۴ ساعته یک مرتبه subculture می کردیم. همزمان با تهیه کشت تازه از سویه های میکروبی، به تعداد مورد نیاز سریهای رقتهای سریال از هر کدام از آنتی بیوتیکها در بازه رقتی(µg/ml) ۰/۰۰۸ - ۱۲۸ در پلیت های مولر هینتون آگار تهیه می شد. همچنین یک سری رقتی (با همان بازهٔ رقتی) از هر آنتی بیوتیک در ترکیب با اسید کلاوولانیک (با غلظت ثابت۴ µg/ml) تهیه می شد. در روز آزمایش سری رقتی هر یک از آنتی بیوتیکها و ترکیب ها را از یخچال خارج کرده و اجازه می دادیم به دمای اطاق برسند. سپس از سوسپانسون تهیه شده از هر ایزوله میکروبی که کدورت آنها با کدورت لولهٔ شمارهٔ ۰/۵ مک فارلند تنظیم شده و به نسبت ۱/۱۰ رقیق شده بود، توسط اپلیکاتورهای استریل ۱ میکرولیتری، به مقدار ۱ میکرولیتر بصورت نقطه ای در پلیتهای مولر-هینتون آگار تلقیح می شد(معادل 10^4 ارگانیسم زنده به هر نقطهٔ تلقیح). پلیت ها بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای۳۵ درجه از نظر رشد باکتری در نقاط تلقیح بررسی می شد. هرگونه رشد باکتری بصورت انبوه یا کلنی های معدود و منفرد، مقاومت نسبت به آن رقت تلقی از آنتی بیوتیک و حداقل غلظتی که ایزوله ی مورد آزمایش هیچگونه رشد قابل مشاهده در آن نداشت بعنوان MIC برای آن آنتی بیوتیک یا ترکیب تعیین و در فرم های مربوطه با شمارهٔ مرجع باکتری ثبت می شد.

معیار این که یک ایزوله ی بالینی کلبسیلا پنومونیه یا اشریشیا کلی بطور بالقوه تولید کننده ی ESBL محسوب شود بر اساس راهنمای CLSI در صورتی است که MIC آن برای یکی از عوامل تست (آنتی بیوتیکهای سفتازیدیم و سفتریکسون) بزرگتر از(µg/ml)۱ باشد. این آزمایش را غربالگری اولیه می نامند(۱۰و۱۱). بر این اساس تمامی اطلاعات حاصل از آزمایش MIC در مرحله ی قبل در یک فایل اطلاعات Excle که برای آنالیز اطلاعات ساخته شده و تعریف ESBL بصورت ریاضی در آن درج شده بود وارد گردید و ارگانیسم هایی را که طبق تعریف MIC آنها برای لااقل یکی از آنتی بیوتیکها بالاتر از (µg/ml)۱ بود بعنوان تولید کننده ی بالقوه ی ESBL مشخص نمود. برای این ارگانیسم ها صفت فنوتیپ اولیه مثبت برای ESBL ($P+^{3}$) Primary Positive Phenotype for ESBL تعریف گردید. همچنین براساس معیارهای CLSL هر ایزوله ایکه MIC آن لااقل برای یکی از عوامل تست در ترکیب با اسید کلاوولانیک سه مرتبه یا بیشتر کاهش می یافت، آن ارگانیسم بعنوان تولید کننده ی قطعی بتالاکتاماز وسیع الطیف در نظر گرفته می شد و دارای فنوتیپ ($P+C+^{3}$) Phenotypic confirmation of ESBL تعریف گردید. بطور منطقی صفت های دیگری نیز حاصل می شود که عبارتند از: P-C- یعنی ارگانیسمی که قطعاً فاقد بتالاکتاماز وسیع الطیف می باشد و برای سفالوسپورین های نسل سوم بطور حتم حساس در نظر گرفته می شود؛ و P+C- یعنی ارگانیسمهایی که MIC آنها برای لااقل یکی از عوامل تست بالاتر از µg/ml۱ بوده ولی کاهش سه مرتبه یا بیشتر MIC برای هیچکدام از عوامل تست در ترکیب با اسید کلاوولانیک نشان ندادند

تمامی ایزوله های کلبسیلا پنومونیه و اشریشیا کلی که در آزمایش فنوتیپی شناسایی ESBL دارای فنوتیپ مثبت P+ شناخته شدند (به ترتیب ۱۲۳ و ۸۴ ایزوله) با PCR برای شناسایی خانواده های ژنی TEM تحت آزمایشPCR قرار گرفتند. برای استخراج DNA ی نمونه Template DNA از یک کلنی خالص از هر ایزوله مورد مطالعه به محیط کشت لوریا برتانی براث (۵ میلی لیتر محیط در ظرف مناسب) تلقیح و کشت حاصله در انکوباتور شیکردار به مدت ۲۰ ساعت در ۳۵ درجه انکوبه می شد. پس از آن باکتریهای موجود در ۱/۵ میلی لیتر محیط لوریا برتانی توسط سانتریفوژ در دورrpm ۱۲۰۰۰ رسوب داده شده و رسوب حاصل در ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر استریل دوباره بصورت سوسپانسیون تعلیق می گردید. ویال های حاوی سوسپانسیون باکتریال در دستگاه ترموبلاک در دمای۹۵ درجه بمدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شده و با سانتریفوژ لاشهٔ باکتری ها ته نشین و محلول رویی که حاوی DNA باکتری است جداسازی و در فریزر نگهداری می شد. از محلول بدست آمده بعنوان DNA نمونه ی باکتریال در آزمایش های PCR استفاده می شد. برای آمپلیفیکاسیون PCR یک جفت پرایمر الیگونوکلئوتیدی که اختصاصی برای تکثیر ژنهای خانواده ی TEM می باشد مورد استفاده قرار گرفت. این زوج پرایمر به ترتیب مطابق با نوکلئوتیدهای شماره های ۹۰ تا ۱۰۵ و شماره های ۱۰۶۲ تا ۱۰۴۲ توالی نوکلئوتیدی معرفی شده توسط Sutcliffe می باشد و یک قطعه ی نوکلئوتیدی ۹۷۱ جفت بازی را تکثیر می کند. اختصاصیت این جفت پرایمر برای ژنهای بتالاکتاماز TEM قبلاً توسط Pitout JD و همکارانش تأیید شده بود(۱۲و۱۳). نام و توالی پرایمرها شامل TEM-F2 (5'-TCG GGG AAA TGT GCG CG-3') و TEM-R2 (5'-TGC TTA ATC AGT GAG GCA CC-3') بود.

آمپلیفیکاسیون PCR در یک دستگاه ترموسایکلر Techne صورت گرفت. از آنزیم تک DNA پلیمراز ، dNTPs و PCR بافر محصول شرکت Roche استفاده گردید. ترکیب مخلوط واکنش PCR به صورت زیر بود:

50 µl PCR mix in 0.2 ml thin-walled tubes:
1x PCR buffer [50mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 8.3]
1.5 mM MgCl2
200 µM (each) deoxyribonucleotides
0.5 µM of each primer
1.25 U Taq DNA polymerase
2 µl of template DNA

برنامه آمپلیفیکاسیون PCR شامل مراحل و سیکل های ۱- تقلیب آغازین DNA ، ۹۶° C ، ۳ دقیقه، ۱ سیکل؛ ۲- آمپلیفیکاسیون (سگمنت۱: تقلیب DNA ، ۹۶° C ، ۱ دقیقه؛ سگمنت۲: جفت شدن پرایمرها ، ۵۵°C ، ۱ دقیقه؛ سگمنت۳: طویل شدن پرایمرها، ۷۲° C ، ۱ دقیقه) ، ۳۵ سیکل؛ ۳- مرحله ی طویل شدن نهایی، ۷۲° C ، ۱۰ دقیقه، ۱ سیکل بود.

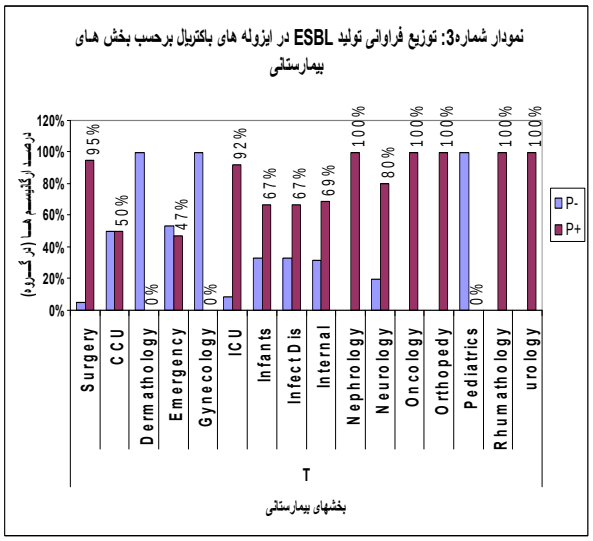
محصول PCR بعد از آخرین سیکل در دمای ۴°C نگهداری می شد. سپس ۱/۱۰ حجم محصول PCR توسط الکتروفورز با ژل آگارز ٪۱/۵ در بافر TAE (0.04M Tric-acetate, 0.002M EDTA [pH8.5]) آنالیز می گردید. برای قابل مشاهده کردن ژل ها از محلول اتیدیوم بروماید با غلظت (mg/ml) به نسبت µg/ml ۰/۴ به مخلوط ژل افزوده می شد و ژلها در زیر تابش اشعه ماورای بنفش در دستگاه ثبت ژل مشاهده و ثبت می شد.

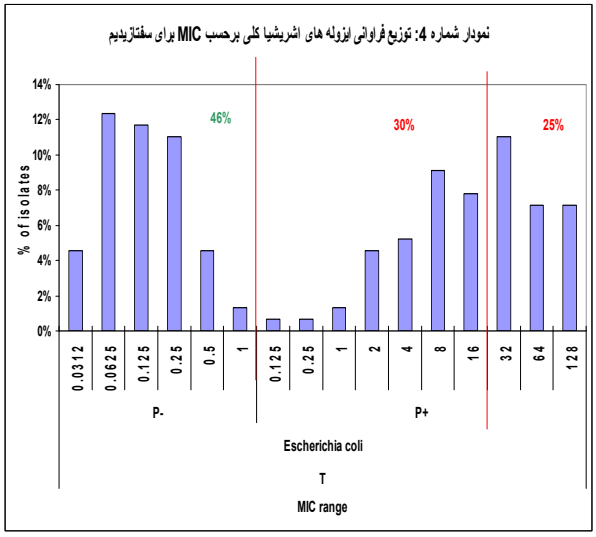
یافته ها

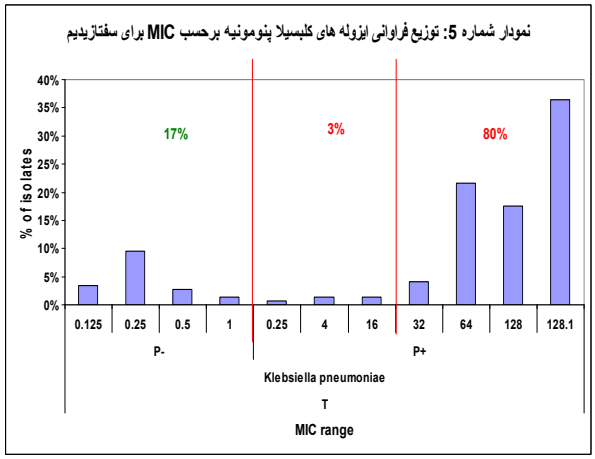
بیشترین فراوانی نمونه های بالینی را در مورد هر دو نوع ارگانیسم، نمونه های ادرار به خود اختصاص داد و فراوانی نسبی آن برای ایزوله های اشریشیا کلی ٪۷۲ و برای کلبسیلا پنومونیه ٪۴۹ بود. در مورد کلبسیلا پنومونیه نمونه های مجرای تنفسی فوقانی و خون در مرتبه های بعدی از لحاظ کثرت فراوانی قرار داشتند. نمونه ها از بخش های مختلف بیمارستانها بدست آمده بودند ولی تعداد نمونه های اشریشیا کلی از بخشهای اورژانس (٪۳۴)و داخلی(٪۲۰) برتری داشت و متفاوت با اشریشیا کلی در مورد کلبسیلا پنومونیه برتری تعداد نمونه مربوط به بخش آی سی یو (٪۲۳) بود.

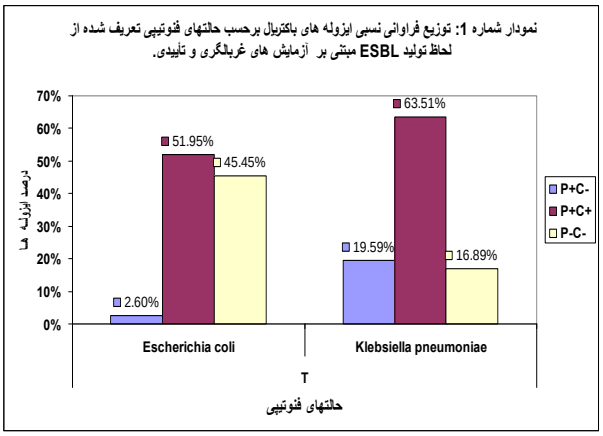
آزمایش غربالگری اولیه مشخص کرد که ازمجموع ۳۰۲ ایزولهٔ بالینی ۲۰۷ ایزوله (٪۶۹) دارای قابلیت تولید ESBL (P+)می باشند که نسبت این صفت برای اشریشیا کلی (٪۵۵) و برای کلبسیلا پنومونیه بیشتر و (٪۸۳) بود. استفاده از دو عامل آنتی بیوتیکی توصیه شده برای شناسایی ESBL حساست تست را تقویت کرد. بطوریکه استفاده از سفتازیدیم به تنهایی، فقط ٪۹۷/۵ از ایزوله های P+ و استفاده از سفتریاکسون به تنهایی، فقط ٪۹۴/۷ از ایزوله های P+ شناسایی کردند ولی با استفاده از دو عامل بطور همزمان ٪۵/۳ حساسیت شناسایی تست را تقویت کرد و ۱۱ ایزولهٔ تولید کنندهٔ ESBL بیشتر شناسایی شدند. نتایج آزمایش تأییدی سه حالت بوجود آورد. نسبت هر یک از حالت ها در نمودار ۱ نشان داده شده است. نسبت کلی تولید کننده های قطعی ESBLs در آزمایش تأییدی (حالت P+C+) ٪۵۸ مشخص شد که آن برای کلبسیلا پنومونیه (٪۶۴) و برای اشریشیا کلی (٪۵۲) بود.

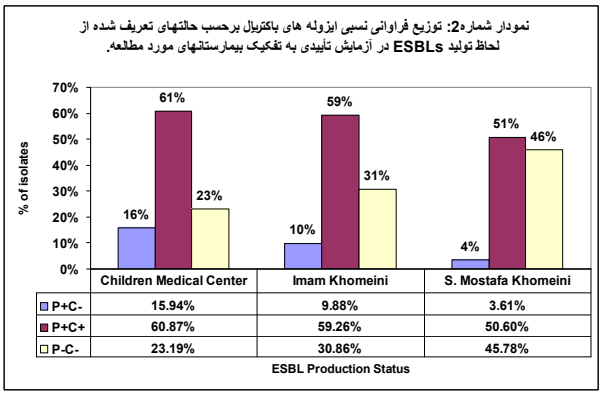
بخشی از ایزوله های بالینی P+ ، در آزمایش تأییدی حساسیت شان در برابر آنتی بیوتیک در حضور اسید کلاوولانیک افزایش نیافت و آنها در دسته ی P+C- قرار گرفتند. نسبت کلی این دسته ۱۱٪ و برای کلبسیلا پنومونیه و اشریشیا کلی به ترتیب ۲۰٪ و ۳٪ تعیین شد. همچنین بطور قطعی تنها ۳۱٪ از ایزوله های بالینی فاقد خصوصیت تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف بودند (دسته P-C-). فراوانی این صفت برای اشریشیا کلی ۴۵٪ و برای کلبسیلا پنومونیه ۱۷٪ بود. نمودار شماره ۲ نشان می دهد که وضعیت تقریباً مشابهی از لحاظ توزیع ارگانیسمهای تولید کنندهٔ ESBLs در بیمارستانهای مورد مطالعه وجود دارد. در نمودار ۳ توزیع فنوتیپ تولید ESBL در ایزوله های باکتریال بر حسب بخشهای بیمارستانی نشان داده شده است. صرف نظر از بخشهایی که تعداد نمونه های آنها کمتر از ۵ نمونه بود، تولید ESBLs در ایزوله هایی که از بخش های ای سی یو، جراحی و انکولوژی جمع آوری شده بودند بیش از ۹۰٪ ؛ در ایزوله هایی که از بخشهای داخلی، عفونی و نوزادان بدست آمده بودند بیش از ۶۰٪ و بالاخره در ایزوله های بالینی بدست آمده از بخش های اورژانس و سی سی یو بیش از ۴۰٪ بود.نتایج تحلیلی آزمایش های MIC در نمودارهای شماره ۴ و ۵ و ۶ و ۷ به ترتیب برای آنتی بیوتیکهای سفتازیدیم و سفتریاکسون و به تفکیک اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه ارائه شده است. همچنین آزمایش های PCR نشان داد که به ترتیب در ۵۸٪ و ۳۴٪ از ایزوله های فنوتیپ مثبت اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف بواسطهٔ دارا بودن پلاسمیدهای دربردارندهٔ ژنهایی از خانوادهٔ TEM می باشد. بازه های MIC برای سفتازیدیم و سفتریاکسون مرتبط با ایزوله های تولید کننده و بدون تولید بتالاکتامازهای خانوادهٔ TEM در جدول ۱ نشان داده شده است.

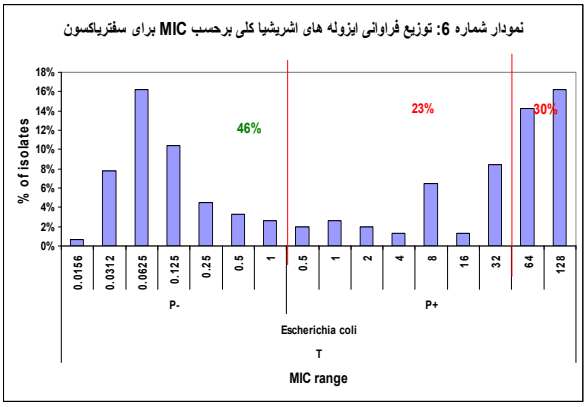


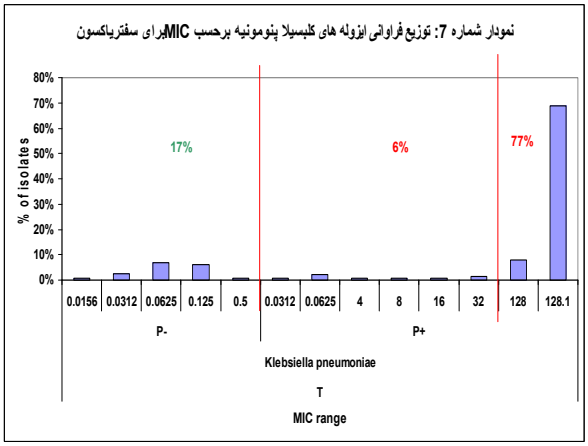












جدول ۱: ارتباط بین ژنوتیپ های ESBL و بازه های MIC مرتبط با آنها در ایزوله های بالینی اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه

نام ارگانیسم	ژنوتیپ	بازهٔ MIC (mcg/ml)	
		CAZ	CTR
اشریشیا کلی	TEM	1-128	1-128
	–	0.125-128	0.5-128
کلبسیلا پنومونیه	TEM	32- >128	≥128
	–	16- >128	0.03- >128

بحث

سفالوسپورین های نسل سوم بعنوان سلاحهای درمانی قوی در برابر عفونت های باسیل های گرم منفی روده ای در موقعیت های درمانی مورد مطالعه تا چه اندازه مؤثر و سودمند باقی مانده اند؟ اکنون با استفاده از نتایج تحقیق حاضر می توان به این پرسش پاسخ داد. شیوع تولید ESBL در ایزوله های بالینی اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه در سه بیمارستان بطور کلی ٪۵۷/۶ مشخص گردید. این در حالی است که نسبت تولید ESBL در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه بالاتر از آن در ایزوله های اشریشیا کلی (٪۶۴ دربرابر٪۵۲) بود. هچنین مشخص شد که ٪۱۰/۹ از کل ایزوله های بالینی معیار شناسایی ESBLs بر پایهٔ تعریف CLSI را در آزمایش تأییدی پر نکردند و در برابر مهار کنندگی اسید کلاوولانیک پایداری نمودند. دراین دسته نیز که با فنوتیپ P+C- مشخص گردید سفالوسپورین های نسل سوم، مونوباکتام و همچنین سفامایسین ها نمی توانند مورد استفاده قرارگیرند. پس سریعترین نتیجه گیری که از این تحقیق می توان داشت این است که متأسفانه دامنهٔ سودمندی سفالوسپورین های نسل سوم در درمان عفونت های باسیل های گرم منفی روده ای در بیمارستانهای مورد مطالعه بشدت محدود شده است و بطور دقیق تر بر اساس نتایج تفکیکی، می توان پیش بینی کرد که در حدود ٪۵۵ از عفونت های ناشی ازاشریشیا کلی و ٪۸۳ از عفونت های کلبسیلا پنومونیه نمی توان هیچیک از سفالوسپورین های نسل سوم، و سایر بتالاکتامها و آزترئونام را استفاده کرد.

نسبت های بدست آمده در این تحقیق در خصوص شیوع تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف در ایزوله های بالینی اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه چقدر با سایر مطالعات داخل کشور مطابقت می کند؟ علی اکبر میر صالحیان و همکارانش در تحقیقی که در سال ۱۳۸۵ در بخشهای ICU دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام دادند، از مجموع ۱۵۰ ایزولهٔ اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه، ٪۵۹/۳ را تولید کننده ESBL شناسایی کردند که نسبت آن برای ایزوله های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ٪۶۰/۶۰ و ٪۷۶/۷۴ بود۰ (۱۴). نتایج تحقیق حاضر مشابهت هایی با نتایج بدست آمده از بررسی آنها دارد. با این تفاوت که نسبت های کلی بدست آمده برای تولید کننده های ESBLs در تحقیق ما جزئی کمتر از تحقیق آنهاست که با توجه به اینکه بررسی ما همهٔ بخش های بیمارستانهای مورد مطالعه را دربر می گرفت قابل توجیه و منطقی بنظرمی رسد. همچنین مهرگان و همکارانش در مطالعه ای طی ۹ ماه از تیر تا اسفند ۱۳۸۴ از یک بیمارستان مراقبتهای ویژهٔ سطح سوم در تهران شیوع ESBLs در ۲۰۱ ایزولهٔ بالینی اشریشیاکلی بدست آمده از بیماران بستری را ٪۶۷/۲ (۱۳۵ ایزوله) گزارش کردند(۱۵). نتایج کلی ما از نظر شیوع ESBLs با بررسی مهرگان و همکارانش نیز نزدیکی زیادی دارد و با وجود نسبت اندکی کمتر شیوع تولید ESBLs در ایزوله های اشریشیا کلی در بررسی ما، به دلیل اینکه مطالعهٔ نامبردگان در بخشهای ویژه ای انجام شده است که خاستگاه اصلی تولید کنندگان ESBL است قابل توجیه می باشد. در همین دوره زمانی یک تحقیق دیگر در بیمارستانهای تهران نیز مورد توجه واقع شد. فرشته شاهچراغی و همکارانش در سال ۱۳۸۵، ۱۴۵ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه از ۵ بیمارستان تهران را برای مقاومت آنتی بیوتیکی و تولید ESBL مورد بررسی قراردادند. آنها MIC سفتازیدیم ایزوله ها را سنجیده و ایزوله هایی که MIC برای سفتازیدیم آنها بزرگتر یا مساوی ۴ mcg/ml بوده بعنوان مشکوک به تولید ESBL با تست تأییدی اسید کلاوولانیک مورد آزمایش قرار داده و برای ژنهای TEM و SHV با PCR آزمایش کردند. مقاومت به سفتازیدیم و سفوتاکسیم به ترتیب ٪۳۱ و ٪۳۲ بود. ۵۶ ایزوله دارای MIC برابر یا بیش از ۴ بودند که از بین آنها ۵۰ ایزوله در تست تأییدی دارای تولید ESBL شناخته شد (۱۶). شیوع واقعی ESBLs در جمعیت میکروبی مورد مطالعهٔ شاهچراغی و همکارانش قابل استنتاج نیست و لذا مقایسهٔ درستی نمی تواند صورت بگیرد. نامبردگان معیار MIC برابر یا بیش از ۴ را بعنوان سویه های مشکوک به ESBL در نظر گرفته اند که متفاوت از معیار توصیه شدهٔ CLSI (MIC>1 mcg/ml) است(۱۰و۱۱). همچنین شاخص دیگر آنها که مقاومت واضح به دو عامل سفتازیدیم و سفوتاکسیم است، هر دو معیار ، نسبت تولید کنندگان ESBL را خیلی کمتر از مقدار واقعی شناسایی می کند. قدر مسلم این که در چند گزارش مورد استناد و تحقیق حاضر نسبت کلی تولید ESBLs در ایزوله های اشریشیا کلی از ٪۵۲ تا ٪۶۷ و در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه از ٪۶۴ تا ٪ ۷۷ در بیمارستانهای تهران برآورد شده است. این بیمارستانها عمدتاً دانشگاهی می باشند. این شرایط بسیار وخیم و خسارت بار است. در این شرایط نسبت عفونتهای بیمارستانی، بستری های طولانی مدت، میزان عوارض ومرگ ومیر بالا خواهد بود و هزینه های زیادی را تحمیل خواهد کرد(۸-۶).

اکنون همچنین می توانیم میزانهای شیوع بتالاکتامازهای وسیع الطیف در ایزوله های اشریشیا کلی (٪۵۲) و کلبسیلا پنومونیه (٪۶۴) را که در سه بیمارستان مورد مطالعه دراین تحقیق بدست آمد با گزارش هایی که از سایر مناطق و کشورها وجود دارد مورد مقایسه قرار دهیم. تولید ESBLs در ایزوله های ECOL و KPNE در USA در بین سالهای ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۴به ترتیب کمتر از ٪۱/۵ در ECOL و ٪۲/۴ تا ٪۴/۴ در KPNE گزارش شده است(۱۷و۱۸)، تولید ESBLs در ایزوله های ECOL و KPNE در ۱۸ کشور از ۲۵ کشور اروپایی در سال ۲۰۰۵ کمتر از ٪۵ می باشد. با اینحال توزیع ایزوله های آنتروباکتریاسه تولید کننده ی ESBLs در کشورهای اروپایی متغیر است، بالا ترین نسبت ها در روسیه (نزدیک ٪۵۰) و لهستان (نزدیک ٪۴۰) در سال ۲۰۰۰ گزارش گردید(۱۹) و کشورهای اروپای شمالی و غربی معمولاً نسبت های کمتر از ٪۵ دارند ؛ مقادیر شیوع در استرالیا و ژاپن هم کمتر از ٪۵ می باشد(۲۰ و ۲۱). شیوع بتالاکتامازهای وسیع الطیف در ایزوله های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه در بیمارستانهای مورد مطالعه از نسبت های گزارش شده از امریکا و کانادا، کشورهای اروپای غربی و شمالی، استرالیا و ژاپن بطور قابل توجهی بالاتر است. در حالیکه تعدادی از کشورها و مناطق قاره ای هستند که شیوع ESBLs در آنها بالا است بطوریکه تولید ESBLs در کشورهای امریکای جنوبی بیش از ٪۳۰ (شیوع در بین ایزوله های کلبسیلای بدست آمده از امریکای لاتین (٪۶۰ - ٪۴۵/۵) و در بین ایزوله های اشریشیاکلی در محدودهٔ بین ٪۸/۵ تا ٪۱۸/۱)(۲۲)، در ترکیه بیش از ٪۲۵ ، در ایزوله های KPNE در چین نزدیک ٪۳۰(۲۱)، و در شبه قارهٔ هند و پاکستان بسیار بالا گزارش شده است. یک مطالعه شیوع ٪۶۷ فنوتیپ ESBLs در بین ایزوله های ECOL و KPNE از هند را گزارش کرده است. مطالعات دیگری نسبت های بالاتری را هم گزارش کرده اند و وضعیت مشابهی در پاکستان وجود دارد(۲۰ و۲۳). بنظر می رسد که شباهت زیادی بین نسبت های تولید ESBLs در جمعیت های میکروبی در موقعیت های درمانی مورد مطالعه با کشورهای فقیر از لحاظ اقتصادی وجود دارد. ویلگاس معتقد است که دلایل این اختلاف فاحش ممکن است ناشی از: الف) شرایط اقتصادی اجتماعی ضعیفتر ؛ ب) بیمارستانهای شلوغ تر (اکثراً با نسبت های بالاتر بیمار به پرستار) ؛ ج) تجویز خودسرانهٔ آنتی بیوتیکها که در اغلب امریکای جنوبی، هند و پاکستان مستقیماً عرضه می شود ؛ بهداشت بیمارستانی ناقص که منجر به نسبتهای بالای کلونیزاسیون و عفونت با انواع کلبسیلا می شود باشد(۲۲).

فاکتورهای خطر متعددی برای اکتساب ارگانیسم های مولد ESBLs شناسایی شده است که شامل پذیرش در ICU ها، اقدامات جراحی اخیر، استفاده از کاتترها، کاتتریزاسیون مثانه، اقامت طولانی مدت در بیمارستان و استفاده قبلی از سفالوسپورین ها و/ یا آمینوگلیکوزیدها و اخیراً استفاده قبلی از فلورو کینولون می باشد(۲۴و۲۵). کدامیک از فاکتورهای خطر شناخته شده و هریک به چه نسبتی در اکتساب ایزوله های مولد ESBLs در بیمارستانهای مورد مطالعه سهیم هستند می تواند موضوع بررسی جداگانهٔ دیگری باشد.اختلاف قابل توجهی از نظر نسبت های تولید ESBLs در سه بیمارستان مورد مطالعه بنظر نمی رسد. بطوریکه فراوانی نسبی آن برای مرکز طبی کودکان ٪۶۱ ، امام خمینی ٪۵۹ و شهید مصطفی خمینی ٪۵۱ مشخص گردید این نشان می دهد احتمالاً شراط مشابهی از لحاظ الگوهای آنتی بیوتیک درمانی، فاکتورهای خطر و سیاست های کنترل عفونت در آنها وجود دارد. عدم شناسایی ESBLs در آزمایشگاههای بیمارستانهای مورد مطالعه چه مشکلاتی را سبب می شود؟ آنالیزهای MIC برای سفتازیدیم و سفتریاکسون بر پایهٔ معیارهای آنتی بیوگرام معمول و معیارهای شناسایی ESBLs (نمودارهای ۴ تا ۷) نشان می دهد که در مورد اشریشیا کلی تنها ٪۲۵ و ٪۳۰ ایزوله ها به ترتیب برای سفتازیدیم و سفتریاکسون مقاومت واضح نشان دادند. یعنی با معیارهای معمول آنتی بیوگرام که در آزمایشگاههای بیمارستانها متداول است، با استفاده از سفتازیدیم (در صورتیکه همهٔ شرایط آزمایش درست و استاندارد باشد)، ٪۳۰ از ایزوله های اشریشیا کلی (از کل) که تولید کننده ESBLs هستند و می بایست طبق توصیه های CLSI بعنوان مقاوم به همهٔ بتالاکتام ها و آزترئونام شناسایی و گزارش می شدند، شناسایی نشده اند و بخش زیادی از این مجموعه ایزوله ها احتمالاً بعنوان حساس گزارش شده اند. این وضعیت در مورد استفاده از سفتریاکسون به این گونه است که ٪۲۳ از کل ایزوله های اشریشیا کلی که دارای فنوتیپ +P بودند، بعنوان مقاوم به همهٔ بتالاکتام ها و آزترئونام شناسایی و گزارش نشده اند و احتمالاً در دسته بندی حساس یا غیر مقاوم قرارداده شده اند. این بحث را برای ایزوله های کلبسیلا پنومونیه نیز می توان در نظر گرفت. این همان علت اساسی و ضرورت تشخیص ESBLs است که برخی از ارگانیسم‌های مولد ESBL با بکار بردن نقطه های برش Break points متداول، نسبت به سفالوسپورینها حساس ظاهر می‌شدند. پژوهشگران نشان داده اند که زمانیکه از سفالوسپورینهایی در درمان بیماران مبتلا به عفونتهای خطرناک ناشی از مولدین ESBL استفاده می‌شود کهMIC هایی در گسترهٔ حد وسط و حتی گاهی MIC هایی در بازه ی حساس دارند میزان شکست درمانی بین ۴۲ تا ۱۰۰ درصد است. وقتیکه سفالوسپورینهای بکار رفته در عفونتهای خطرناک (باکتریمی، پنومونی اکتسابی از بیمارستان و پریتونیت) ناشی از ارگانیسم‌های مولد ESBL ، MICهای ۴ تا ۸ میکروگرم در میلی لیتر دارند میزان شکست بالای ۹۰ درصد است(۹، ۲۶و ۲۷). از نمودارهای ۴ تا ۷ توزیع این دسته ایزوله های بالینی و شدت مشکل را می توان استنتاج کرد. بنابراین اجرای تست شناسایی ESBLs در کنار آنتی بیوگرام برای ایزوله های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه و تفسیرو گزارش نتایج آنتی بیوگرام با توجه به نتایج آزمایش ESBL در بیمارستانهای مورد مطالعه با توجه به شیوع بالای ESBLs در آنها یک ضرورت اجتناب ناپذیر است.زمینه های ژنتیکی تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف درجمعیت میکروبی مورد مطالعه چیست؟ یا بتالاکتامازهای وسیع الطیف شایع درجمعیت میکروبی مورد مطالعه از کدام خانواده های ژنتیکی ESBLs هستند؟ از آنجاییکه محدهٔ امکانات این تحقیق فقط اجازه بررسی خانواده ژنتیکی شایع TEM را فراهم می کرد، لذا این سؤال بطور دقیق تر به این صورت مطرح می شود که ESBL های نوع TEM چه نسبتی از بتالاکتامازهای وسیع الطیف شایع درجمعیت میکروبی مورد مطالعه را تشکیل می دهند و بعنوان مکانیسم ژنتیکی زمینه ای تولید ESBLs مطرح می باشند. آزمایشهای PCR نشان داد که از ایزوله های فنوتیپ مثبت اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ٪۵۸ و ٪۳۴ بتالاکتامازهای وسیع الطیف خانوادهٔ TEM را تولید می کردند. سفتازیدیم و سفتریاکسون MICs برای این دسته از ایزوله های بالینی در بازهٔ ۱ تا ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر قرار داشت. عدم توزیع یکنواخت MICs برای این دسته ایزوله ها به این معنی است که آنها احتمالاً انواع دیگری از بتالاکتامازهای وسیع الطیف مانند CTX-M ، AmpC ، PER یا VEB را تولید می کنند، با این که ممکن است تیپ های متفاوتی از TEM شیوع دارند. بررسی بیشتر این موضوع را روشن خواهد کرد. همچنین توزیع MIC در ایزوله های TEM منفی اشریشیا کلی برای سفتازیدیم در بازهٔ mcg/ml ۱۲۸-۰/۱۲۵و برای سفتریاکسون در بازهٔ mcg/ml ۱۲۸-۰/۵بود. این وضعیت بازهم به این مفهوم است که احتمالاً مکانیسمهای ژنتیکی سایر بتالاکتامازهای وسیع الطیف غیر از TEM دخالت دارند. وضعیت مشابهی را برای ایزوله های کلبسیلا پنومونیه می توان تصور کرد.

چندین نکته در بارهٔ این نتایج قابل توجه است: ۱- همانند بسیاری از مطالعات ژنهای TEM در ایزوله های اشریشیا کلی در مقایسه با ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غالب هستند. ۲- کلبسیلا پنومونیه ظرفیت پذیرش ژنهای مقاومت ا ز سایر ارگانیسم ها را دارد. ۳- توزیع غیر یکنواخت MICs سفتازیدیم و سفتریاکسون در هر دسته حاکی از الف) احتمال تولید بتالاکتامازهای غیر از TEM در هر دو دسته؛ ب) احتمال تولید همزمان بیش از یک نوع بتالاکتاماز؛ ج) شیوع تیپهای متفاوت TEM و ج) تغییرات پورینی غشاء بیرونی مطرح می باشد.

نتیجه گیری

تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف درایزوله های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه در بیمارستانهای مرکز طبی کودکان، امام خمینی و شهید مصطفی خمینی تهران بسیار شایع است. در بخشی از این ایزوله های بالینی نوع بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف تولیدی از خانوادهٔ آنزیمهای TEM می باشد. درصد قابل توجهی از ایزوله های ESBL مثبت هر دو نوع ارگانیسم MIC هایی در محدوهٔ حساس یا غیر مقاوم به بعضی سفالوسپورین های نسل سوم را دارند. از آنجائیکه این قبیل ایزوله ها با آزمایشهای معمول آنتی بیوگرام بعنوان مقاوم به سفالوسپورین های نسل سوم قابل شناسایی نیستند، اجرای آزمایش های شناسایی ESBL ، اقدامات کنترل عفونت و پیاده سازی راهنماهای داخلی تجویز آنتی بیوتیک در بیمارستانهای مورد مطالعه ضروری می باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با پشتیبانی مرکز تحقیقات پزشکی دانشگاه و معاونت پژوهشی دانشکدهٔ پزشکی شاهد انجام شده است. پژوهشگران وظیفهٔ خود می دانند که سپاسگزاری خود را از هردو اعلام نمایند. همچنین وظیفهٔ خود می دانیم که صمیمانه از همکاریهای خانم ها: مینا عابدینی، دکتر هاله قرلباش، دکتر مریم عقدایی، دکتر صفورا صالحی و آقایان صادق منصوری، محسن میرزایی، زکریا بامری، علیرضا مطوایی، حسن شاهین در این پژوهش سپاسگزاری نماییم.

REFERENCES

1. Marra AR, Pereira CA, Castelo A, et al. Health and economic outcomes of the detection of Klebsiella pneumoniae-produced extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in a hospital with high prevalence of this infection. Int J Infect Dis 2006;10:56-60

2. Yan JJ, Hsueh PR, Lu JJ, et al. Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC enzymes among clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from seven medical centers in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:1861-4

3. Arpin C, Dubois V, Coulange L, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in community and private health care centers. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:3506-14

4. Potz NA, Hope R, Warner M, Johnson AP and Livermore DM. Prevalence and mechanisms of cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae in London and South-East England. J Antimicrob Chemother 2006;58:320-6

5. Apisarnthanarak A, Kiratisin P, Saifon P, Kitphati R, Dejsirilert S and Mundy LM. Clinical and molecular epidemiology of community-onset, extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli infections in Thailand: a case-case-control study. Am J Infect Control 2007;35:606-12

6. Tasbakan MI, Pullukcu H, Sipahi OR, et al. [Extended-spectrum beta-lactamase production and antimicrobial resistance patterns of Klebsiella pneumoniae strains isolated from nosocomial bacteremic patients: evaluation of the results of 2001-2005 period]. Mikrobiyol Bul 2008;42:1-7

7. Ramphal R, Ambrose PG. Extended-spectrum beta-lactamases and clinical outcomes: current data. Clin Infect Dis 2006;42 Suppl 4:S164-72

8. Schwaber MJ, Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother 2007;60:913-20

9. Paterson DL, Singh N, Gayowski T and Marino IR. Fatal infection due to extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli: implications for antibiotic choice for spontaneous bacterial peritonitis. Clin Infect Dis 1999;28:683-4

10. Wayne Pa. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th informational suplement. National committee for Clinical Laboratory Standards 2005.

11. Clinical and laboratory standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing: Fifteenth Informational supplement 2005; 25(1) 100-15.

12. Sutcliffe JG. Nucleotide Sequence of the Ampicillin Resistance Gene of Escherichia coli Plasmid pBR322. PNAS 1978;75:3737-41

13. Pitout JD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES and Sanders CC. beta-Lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, and Proteus mirabilis isolates recovered in South Africa. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:1350-4

۱۴. میرصالحیان اکبر، نخجوانی فرخ، پیمانی امیر، جبل عاملی فرشته، میرافشار محمد، حمیدیان محمد. بررسی فراوانی آنتروباکتریاسه تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در بخش‌های مراقبت ویژه، هشتمین کنگره سراسری میکروب‌شناسی اصفهان، خرداد ۱۳۸۵؛ ص ۱۵.

15. Mehrgan H, Rahbar M. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Int J Antimicrob Agents 2008;31:147-51

16. Shahcheraghi F, Moezi H and Feizabadi MM. Distribution of TEM and SHV beta-lactamase genes among Klebsiella pneumoniae strains isolated from patients in Tehran. Med Sci Monit 2007;13:BR247-250

17. Bush K. Extended-spectrum beta-lactamases in North America, 1987-2006. Clin Microbiol Infect 2008;14 Suppl 1:134-43

18. Moland ES, Hanson ND, Black JA, Hossain A, Song W and Thomson KS. Prevalence of newer beta-lactamases in gram-negative clinical isolates collected in the United States from 2001 to 2002. J Clin Microbiol 2006;44:3318-24

19. Goossens H, Grabein B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). Diagn Microbiol Infect Dis 2005;53:257-64

20. Hawkey PM. Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia. Clin Microbiol Infect 2008;14 Suppl 1:159-65

21. Bell JM, Turnidge JD and Jones RN. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacter cloacae in the Asia-Pacific region: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998 to 2001. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:3989-93

22. Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG and Casellas JM. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. Clin Microbiol Infect 2008;14 Suppl 1:154-8

23. Mathai D ,Rhomberg PR, Biedenbach DJ and Jones RN. Evaluation of the in vitro activity of six broad-spectrum beta-lactam antimicrobial agents tested against recent clinical isolates from India: a survey of ten medical center laboratories. Diagn Microbiol Infect Dis۷۷-۴۴:۳۶۷;۲۰۰۲

24. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother 2007;59:165-74

25. Canton R, Novais A, Valverde A, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect 2008;14 Suppl 1:144-53

26. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, 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 Clin Microbiol 2001;39:2206-12

27. Paterson DL, Yu VL. Extended-spectrum beta-lactamases: a call for improved detection and control. Clin Infect Dis 1999;29:1419-22

28. European Antimicrobial Resistance Surveillance System Annual Report 2005, On-going surveillance of S.pneumonuae, S. aureus, E. coli, E. faecalis, K. pneumoniae and P. aeruginosa, EARSS, Bilthoven, The Netherlands, October 2006.