

بررسی ملکولی مقاومت به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف در اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه

فرامرز مسجدیان جزی^۱، فرحناز والهی^۱، اردشیر طالبی^۲، عبدالعزیز رستگارلاری^{۱*}

(۱) گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران
(۲) گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
نویسنده رابط: عبدالعزیز رستگارلاری، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
تلفن: ۸۸۰۵۸۶۴۹، lari@iums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۵/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۷/۲

چکیده:

زمینه و اهداف: ظهور مقاومت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام مربوط به پلاسمید کد کننده پنی سیلیناز است که به سرعت در بین نمونه های کلینیکی مربوط انتشار یافته است. پلاسمیدهای ESBL اجداد TEM-1، TEM-2، و SHV-1 هستند که هم اکنون با جهش نقطه ای در آن باعث بروز بیش از ۹۰ تیپ TEM و ۲۵ تیپ SHV شده است. در همین راستا مطالعه ای جهت بررسی فراوانی انواع پلاسمیدهای ESBL در سویه های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه انجام گرفته است.

روش بررسی: در این پژوهش تعداد ۲۵۳ نمونه (ادرار، خون، آسیت، زخم و تراشه) ارسالی به بخش باکتری شناسی بیمارستان الزهرا (ص) اصفهان کشت و مورد بررسی قرار گرفتند که در این میان ۱۴۸ سویه اشریشیا کلی و ۷۰ سویه کلبسیلا پنومونیه بوسیله تست های بیوشیمیایی شناسایی شدند. سپس با استفاده از روش دیسک ترکیبی و سینرژیزم دوپل سویه های تولید کننده آنزیم های ESBL شناسایی گردیدند. همچنین تعداد ۱۳ سویه اشریشیاکلی و ۱۰ سویه کلبسیلا پنومونیه با استفاده از کیت استخراج پلاسمید و بکار بردن پرایمرهای اختصاصی TEM-1 و SHV-1 توسط روش PCR، پلاسمید های TEM و SHV شناسایی گردیدند.

یافته ها: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در اشریشیاکلی ۱/۱٪ مقاومت کروموزومی و ۵۰٪ پلاسمیدی و در کلبسیلا پنومونیه ۱۲/۸٪ مقاومت کروموزومی و ۶۳٪ پلاسمیدی می باشد، در حالیکه بقیه نمونه ها حساس به سفالوسپورینهای وسیع الطیف بودند. نتایج حاصل از PCR نشان داد که از کل سویه های اشریشیا کلی مورد مطالعه ۸۴/۶٪ پلاسمید TEM و ۶۹/۲٪ دارای پلاسمید SHV و ۵۳/۸٪ از آنها دارای هر دو پلاسمید TEM و SHV بودند. در نمونه های کلبسیلا پنومونیه نیز ۸۰٪ پلاسمید SHV و ۸۰٪ دارای پلاسمید TEM و ۶۳٪ سویه ها دارای هر دو پلاسمید TEM و SHV بودند.

نتیجه گیری: با توجه به مقاومت بالای سویه ها به آنتی بیوتیک های بتالاکتام، ضرورت شناسایی کامل ESBL ها توسط آزمایشگاه، شناخت مکانیسم های مقاومت ESBL ها توسط پزشکان و استفاده از آنتی بیوتیک های دارای قدرت ممانعت کننده ی بتالاکتام در کاهش ظهور مقاومت بسیار موثرند.

کلید واژه ها: اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، ESBL، TEM-1، SHV-1

مقدمه:

ظهور مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام به سال های اولیه کشف مقاومت نسبت به اولین آنتی بیوتیک (پنی سیلین) برمی گردد اگرچه اولین بتالاکتاماز در باکتری اشريشیاکلی مشاهده شد که آنتی بیوتیک پنی سیلین را هیدرولیز می نمود(۱). ظهور مقاومت باکتری ها مربوط به پلاسمید کد کننده پنی سیلیناز است که به سرعت در بین بیشتر نمونه های کلینیکی این باکتری ها انتشار یافته است. در بسیاری از نژادهای باکتری های گرم منفی به طور طبیعی جهش های کروموزومی رخ می دهند (دانشمندان معتقدند این آنزیم در پروتئین های باند شونده به پنی سیلین ظاهر می شود). اولین پلاسمید مربوط به بتالاکتاماز در باکتری های گرم منفی TEM-1 می باشد که در سال ۱۹۶۰ در ایزوله های اشريشیاکلی جدا شده از کشت خون بیماران در یونان به دست آمد (۲). ESBLها شامل تعدادی آنزیم های موتاسیون یافته است؛ که اجازه هیدرولیز آنتی بیوتیک های بتالاکتام وسیع الطیف را می دهد (۳).

ESBL ها، در تقسیم بندی که توسط بوش (Bush)، جاکوبی (Jacoby)، و مدیروس (Medeiros) بر اساس پروفایل سوبسترا، ممانعت کنندگی و خصوصیات فیزیکی نظیر وزن ملکولی، نقطه ایزوالکتریک صورت گرفت، به چهار گروه اصلی از ۱ تا ۴ طبقه بندی شدند (۴).

ESBL گروه A، پلاسمید های مربوط به بتالاکتاماز بوده که فقط در باسیل های گرم منفی شرح داده شده اند و سبب هیدرولیز پنی سیلین، سفالوسپورین های با طیف کم و وسیع می شوند، بیشتر سویه های تولید کننده ESBL دارای موتانت های TEM-1، TEM-2 و SHV-1 از باکتری های اشريشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه می باشند.

ESBL گروه B شامل متالو پروتئازهایی هستند که قادر به هیدرولیز کرباپنم ها بوده و در باکتری هایی مانند سودوموناس آئروژینوزا و سراشیا مارسنس گزارش شده اند.

ESBL گروه C عموماً کروموزومی بوده و با فرکانس مقاومت بالا در میان آنتریباکتر کلوآکه گزارش شده است (۵).

ESBL گروه D، بتالاکتامازهای با قدرت هیدرولیز زیاد بر علیه اکسازولین و کلوکساسیلین بوده و اسید کلاوولانیک به طور ضعیف از فعالیت آنها جلوگیری می کند (۳و۶).

بیشتر آنچه که ما در مورد تکامل ESBLها می دانیم از مطالعات آنزیم های TEM و SHV است که در اصل موتانهای ساختمانی TEM-1، TEM-2 و SHV-1 هستند (۷). امروزه

بیش از ۹۰ تیپ TEM و بیش از ۲۵ تیپ SHV وجود دارد. تیپ های TEM و SHV ESBL ها اغلب در اشريشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه و به میزان کمتر در پروتئوس، پرویدنسیا و در دیگر گونه های آنتریباکتریاسیه نیز دیده می شوند (۸).

پلاسمیدی بودن TEM-1 و جهش نقطه ای در آن سبب انتشار این پلاسمید به سایر باکتری ها می شود، از این رو در طی چند سال گذشته TEM-1 در اعضای خانواده آنتریباکتریاسیه، سودوموناسیه، باکتری های هموفیلوس آنفلوانزا و نایسریا گنوره انتقال و انتشار یافت. از دیگر پلاسمیدهای بتالاکتام مشترک در کلبسیلا پنومونیه و اشريشیاکلی، SHV-1 بود که به صورت عمده به شکل کروموزومی در کلبسیلا پنومونیه و به صورت پلاسمیدی در اشريشیاکلی وجود دارد (۸ و ۹).

درمان بیماران مبتلا به عفونت های ناشی از ارگانسیم های تولید کننده ESBL غالباً به علت مقاومت متقاطع وسیعی که با سایر داروهای ضد میکروبی (از جمله آمینوگلیکوزیدها، کوتریموکسازول و فلوروکینولونها) دارند، همواره با مشکلات فراوانی همراه بوده است (۱۰). از آنجا که این ارگانسیم ها علاوه بر عدم پاسخ به آنتی بیوتیک وسیع الطیف، غالباً به سایر انواع آنتی بیوتیک ها نیز مقاومت نشان می دهند، لذا پیشنهاد می شود که این ایزوله ها از نظر محصولات ESBL مورد بررسی قرار گیرند و بر طبق استاندارد NCCLS به عنوان مقاوم به همه آنتی بیوتیک های بتالاکتام وسیع الطیف، بدون توجه به نتایج آزمایش تست حساسیت گزارش شوند (۱۱).

مواد و روش ها:

جداسازی و تشخیص باکتری: در طی مدت سه ماه از تعداد ۲۵۳ نمونه های (ادرار، خون، آسیت، زخم، تراشه...) ارسال شده به بخش باکتری شناسی مرکز پزشکی الزهرا (س) اصفهان پس از کشت و شناسایی بر اساس تست های افتراقی تعداد ۲۱۸ نمونه، ۱۴۸ سویه اشريشیاکلی و ۷۰ سویه کلبسیلا پنومونیه با استفاده از روش استاندارد تشخیصی و بیوشیمیایی تعیین گونه گردیدند (۱۲). آنگاه برای کلیه سویه های اشريشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به دیسک های سفوتاکسیم، سفتازیدیم، جتتامایسین، نالیدیکسیمک اسید، آمیکاسین و آمپی سیلین بر اساس استاندارد NCCLS و بر روی محیط مولر هیتتون آگار (شرکت مرک) انجام شد. کنترل کیفی دیسک های آنتی بیوتیک و روش کار با استفاده از سویه های استاندارد

TEM/F: 5'-GAA GAC GAA AGG GCC TCG TG-3'
TEM/R: 5'-GG T CTG ACA GTT ACC AAT GC-3'

و یک جفت پرایمر برای پلاسمید SHV با توالی

SHV/F: 5'-CGC CGG GTT ATT CTT ATT TGT CGC-3'
SHV/R: 5'-TCT TTC CGA TGC CGC CGC CAG TCA-3'

مورد استفاده قرار گرفت (۱۳) و محصول نهایی تکثیر با حضور قطعه ای با وزن ملکولی ۱۰۱۶ (SHV) و ۱۰۷۴ (TEM) نشان دهنده وجود این پلاسمیدها بود. واکنش PCR در حجم نهایی ۵ میکرولیتر انجام شد و ترکیب آن شامل آنزیم Taq polymerase، مخلوط دی اکسی نوکلئوتیدها و بافر به صورت آماده (کیت از شرکت سیناژن) بود (۱۴).

همچنین از سویه استاندارد ذکر شده در قبل بعنوان کنترل مثبت و منفی در این واکنش ها استفاده شد. سیکل زنجیره پلیمرز از دنا تورا سیون در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه شروع و به تعداد ۳۵ سیکل به صورت زیر ادامه یافت، ۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۵۵ درجه ۱ دقیقه، ۷۲ درجه ۱ دقیقه و در نهایت ۷۲ درجه با ۱۰ دقیقه پایان یافت (۱۳ و ۱۵).

محصول PCR با وزن ملکولی ۱۰۱۶ bp و ۱۰۷۴ bp بر روی آگارز ۱/۵٪ مورد الکتروفورز قرار گرفت و ژل آگارز با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و قطعات پلاسمید با استفاده از نور UV مشاهده شدند.

یافته ها:

از کل نمونه های مورد مطالعه، ادرار درصد غالب و پس از آن نمونه های خون، ترشحات ریوی، زخم، ترشحات چشمی و سایرین درصد پائین تری را به خود اختصاص دادند (جدول ۱). از میان سویه های جدا شده ۶۸٪ (۱۴۸ سویه) اشریشیاکلی و ۳۲٪ (۷۰ سویه) کلبسیلا پنومونیه تشکیل دادند (جدول ۲).

درصد سویه های دارای ESBL که توسط روش های دیسک ترکیبی و سینرژیسیم دوپل بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار انجام گرفت (شکل ۱)، ۷۶٪ (۵۱٪) سویه ها اشریشیاکلی و ۴۹٪ (۷۰٪) سویه ها کلبسیلا پنومونیه بودند (جدول ۳).

در آزمایش PCR برای تشخیص ژن TEM و SHV از تعداد ۱۳ سویه اشریشیاکلی و ۱۰ سویه کلبسیلا پنومونیه نشان داده شد که سویه های اشریشیاکلی ۸۴/۶٪ (۱۱ مورد) پلاسمید TEM و ۶۹/۲٪ (۹ مورد) دارای پلاسمید SHV و ۵۳/۸٪ (۷ مورد) دارای هر دو پلاسمید TEM و SHV بودند. در نمونه های کلبسیلا پنومونیه نیز ۸۰٪ (۸ مورد) پلاسمید SHV و ۸۰٪ (۸ مورد) دارای پلاسمید TEM و ۶۳٪ (۶ مورد) سویه ها واجد هر دو پلاسمید TEM و SHV بودند (جدول ۳ و شکل های ۱-۵).

E.coli-MG-1, VEB-1 و *E.coli*-501, CTX-M-15)

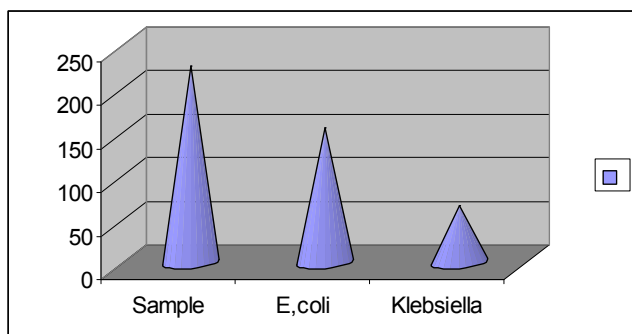
همچنین *Klebsiella pneumonia* RBDB=2, ITL-2 و *Klebsiella pneumonia* RBDB=3=ILT-3, CTX-M-19 انجام گرفت.

از مجموع ۲۱۸ سویه، ۱۲۵ سویه ایی که در روش دیسک دیفیوژن مقاوم به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم و سفنازیدیم بودند، از دو روش دیسک ترکیبی (Oxoid combining Disk method) و دیسک سینرژیسیم (Double Disk method) برای شناسایی ESBL استفاده شد.

چند کلنی از کشت خالص باکتری را در لوله حاوی محیط کشت مولر هیتون مایع کشت و با انکوبه نمودن در حرارت ۳۵ درجه غلظت کدورت بدست آمده برابر استاندارد ۰/۵ مک فارلند (۱ × ۱۰^۸ /ml) مقایسه شد، سپس توسط سوآپ استریل از سوپانسیون باکتری. بر روی محیط مولر هیتون آگار پخش گردید. برای روش سینرژیسیم دوپل یک عدد دیسک سفنازیدیم (۳۰ μg) را با یک دیسک سفوتاکسیم (۳۰ μg) در فاصله ۲۰ میلیمتری از یکدیگر قرار داده و یک عدد دیسک کوآموکسی کلاو (۱۰ μg) نیز در فاصله ۲۰ میلی متری از دو دیسک قبلی قرار داده شد (۸). و اثر سینرژیسیم بین دو دیسک سفوتاکسیم و سفنازیدیم با آموکسی کلاو بصورت فنوتیپی شناسایی و تعیین گردید. برای روش دیسک ترکیبی نیز از دیسک سفنازیدیم (۳۰ μg) و سفنازیدیم به همراه کلاوولونات (۱۰ μg) و سفوتاکسیم (۳۰ μg) و سفوتاکسیم (۳۰ μg) استفاده گردید و به فاصله ۲۰ میلی متری از یکدیگر قرار داده شدند. پس از ۱۶-۲۰ ساعت انکوباسیون قطر هاله عدم رشد بدست آمده با خط کش میلیمتری اندازه گیری و قطر مساوی یا بیشتر از ۵ میلیمتر بین هر سفالوسپورین به تنهایی یا سفالوسپورین به همراه کلاوولونات به عنوان باکتری تولید کننده ESBL بر طبق ضابطه NCCLS تعیین گردید.

جهت تهیه پلاسمید باکتری با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (شرکت سیناژن)، چند کلنی از باکتری را در ۱۰ میلی لیتر محیط مولر هیتون مایع کشت داده، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در حرارت ۳۵-۳۷ درجه سانتیگراد طبق دستورالعمل کیت مورد استفاده استخراج پلاسمید صورت گرفت. مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه استخراج شده پلاسمید را برای انجام عمل PCR برای هر سویه باکتری با استفاده از یک جفت پرایمر جهت تشخیص پلاسمید های TEM با توالی:

نمودار شماره ۱: مجموع کل نمونه های اشریشیاکلی و کلبسیلا



جدول شماره ۱: تعداد (درصد) انواع نمونه های بالینی مورد مطالعه

نوع نمونه	تعداد درصد
ادرار	۱۲۵ (۵۷/۴)
خون	۴۰ (۱۸/۳)
ترشحات ریوی	۱۰ (۴/۶)
زخم	۸ (۳/۷)
ترشحات چشم	۶ (۲/۸)
متفرقه	۲۹ (۱۳/۲)

شکل شماره ۱: تشخیص ESBL به روش سینرژیزم دوپل



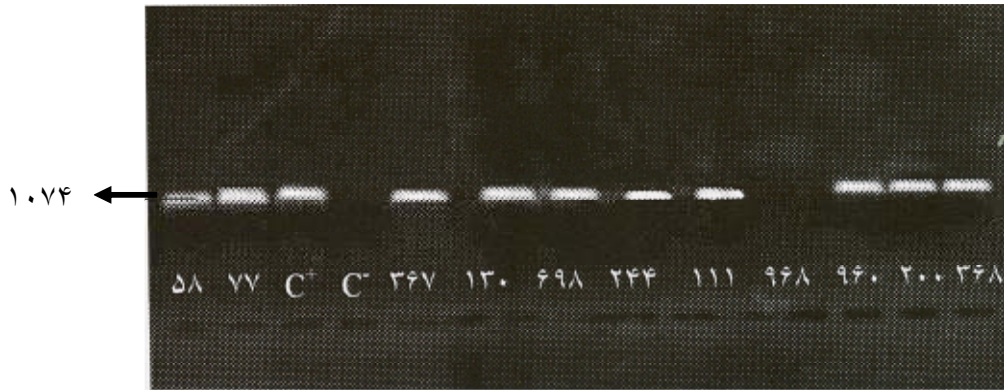
جدول شماره ۲: تعداد (درصد) ESBL در سویه های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه

سویه باکتری	پلاسمیدی	کروموزومی	حساس
اشریشیا کلی	۶۸ (۵۰٪)	۱۵ (۱۰/۱٪)	۶۵ (۴۳/۹٪)
کلبسیلا پنومونیه	۴۴ (۶۳٪)	۹ (۱۲/۸٪)	۱۷ (۲۴/۲٪)

جدول شماره ۳: نتایج آزمایش PCR سویه های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه

سویه باکتری	TEM+SHV	TEM	SHV
اشریشیا کلی	۷ (۵۳/۸٪)	۱۱ (۸۴/۶٪)	۹ (۶۹/۲٪)
کلبسیلا پنومونیه	۶ (۶۳٪)	۸ (۸۰٪)	۸ (۸۰٪)

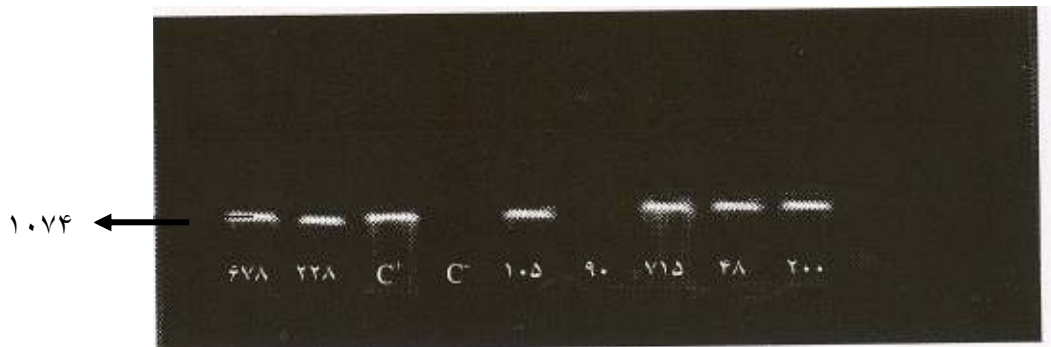
شکل ۲: ژل آگارز حاوی نمونه های PCR پلاسمید TEM در اشريشیاکلی



شکل ۳: ژل آگارز حاوی نمونه های PCR پلاسمید SHV در اشريشیاکلی



شکل ۴: ژل آگارز حاوی نمونه های PCR پلاسمید TEM در کلبسیلا پنومونیه



شکل ۵: ژل آگارز حاوی نمونه های PCR پلاسمید SHV در کلبسیلا پنومونیه



بحث:

در جهت کاهش هزینه های درمانی، شناسایی عوامل مهم و شایع بیماریزاهای بیمارستانی و تعیین الگوی دقیق مقاومت آنتی بیوتیکی در جهت کنترل شیوع اینگونه عوامل مربوط بنظر می رسد با توجه به این که اعضای خانواده آنتروباکتریاسیه عامل عمده عفونت های بیمارستانی و جامعه می باشند و برخی از آنها بعنوان اعضای فلور طبیعی سبب ایجاد عفونت های فرصت طلب می شوند لذا اتخاذ یک استراتژی نوین در درمان و تشخیص این سویه ها بنظر ضروری می رسد. درمان آنتی بیوتیکی این عفونت ها، که در سال های گذشته با آنتی بیوتیک های خانواده پنی سیلین به آسانی موثر بودند، متأسفانه امروزه با کسب انواع مقاومت ها و از جمله بروز مقاومت های ESBL ها مشکل و پر هزینه گردیده است (۱۶).

در مطالعه حاضر از مجموع ۲۱۸ سویه باکتری، ۱۴۸ سویه اشریشیاکلی (۶۸٪) و ۷۰ سویه کلبسیلا (۳۲٪) مورد بررسی قرار گرفتند. در این میان ۷۶ (۵۱٪) سویه اشریشیاکلی و ۴۹ (۷۰٪) سویه کلبسیلا پنومونیه دارای ESBL بودند مطالعه مشابهی در ۱۵ بیمارستان در ایالت برکلی آمریکا در سال ۱۹۹۷، نشان دهنده وجود ESBL در ۴۴٪ سویه های کلبسیلا پنومونیه و ۴۷٪ سویه های اشریشیاکلی بود (۱۷). در مطالعه مشابهی که در سال ۱۹۹۹ در چند بیمارستان در فرانسه انجام گرفت نشان داده شد که ۲۴٪ از سویه ها دارای ESBL بودند (۱۶). در مطالعه ای که در دانشگاه تهران صورت گرفته است، ۷۶٪ سویه های کلبسیلا پنومونیه دارای آنزیم ESBL بودند که نشان دهنده پتانسیل بالای بیماریزایی این سویه ها در بخش های مختلف بیمارستان می باشد (۲۲).

در این پژوهش در رابطه با سویه های مورد مطالعه در بخش ICU

از مجموع ۱۶ نمونه به دست آمده همگی (۱۰۰٪) دارای آنزیم ESBL بودند. در صورتیکه در مطالعه انجام شده در سال ۱۹۹۵ از نمونه های ارسال شده به بخش ICU بیمارستان های اروپا ۲۵-۲۰٪ سویه های کلبسیلا پنومونیه ESBL مثبت بوده اند اگر چه در فرانسه در حدود ۴۰-۳۰٪ گزارش شده است (۱۶). در مطالعه انجام شده در دانشگاه تهران بر روی ۱۵۰ نمونه تهیه شده از بخش ICU میزان ESBL در سویه های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه به ترتیب ۷۵ و ۴۹ درصد اعلام شده است. این اعداد نشانگر درصد بالای ESBL و روند صعودی آن در کشور ماست (۲۲).

در این مطالعه با روش PCR، ۸۰٪ دارای ژنوتیپ Ampa/TEM (۲۰٪) و ژنوتیپ SHV (Ampc) بدست آمده است. در مطالعات مشابهی که توسط Song و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام گرفته، در ۴۰ نمونه Ampc و در ۸۰ نمونه Ampa گزارش شده است (۱۵). در مطالعه ای دیگر، Patzer و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند درصد سویه های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه دارای ژن SHV (Ampc) از ۵۶٪ در سال ۲۰۰۱ به ۳۴٪ در سال ۲۰۰۵ کاهش یافته است (۱۷) درحالیکه نتایج پژوهش مشابه در ترکیه نشان می دهد ۵۲/۷٪ سویه های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه دارای پلاسمید TEM، ۷۴/۳٪ دارای پلاسمید SHV و ۳۲/۴٪ دارای هر دو پلاسمید بوده اند (۱۸).

بیمارانی که مبتلا به عوامل عفونت زهای تولید کننده ESBL هستند علاوه بر عدم درمان با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف غالباً به سایر انواع آنتی بیوتیک ها نیز مقاومت نشان می دهند. ESBL از اهمیت خاصی در استراتژی درمانی برخوردار بوده زیرا این موضوع به علت شکست های درمانی حاصل از تجویز آنتی بیوتیک بدون انجام تعیین حساسیت است که خود باعث شناسایی افزایش

تعیین دقیق ESBL ها از دو جهت دارای اهمیت است: ۱- ESBL ها در سطح جهان در حال افزایش اند ۲- افزایش تعداد ورودی باکتریها به بدن بیمار باعث ایجاد نژاد های تولید کننده ESBL می گردد (۲۰) زیرا دریافته اند که MIC بیشتر سفالوسپورین ها به طور شگرفی با افزایش دوز تلقیح از ۱۰^۵ به ۱۰^۷ افزایش می یابد (۲۲ و ۲۱).

نتیجه گیری:

رعایت بهداشت بیماران، تغییر در استراتژی مصرف آنتی بیوتیک و ایجاد شرایط استریل در بخش هایی که بیماران در آن بمدت طولانی بستری می شوند از عوامل مهمی هستند که می تواند تا حدودی در کنترل این گونه میکرواورگانسیم ها ایفای نقش نماید.

مرگ و میر، طولانی شدن زمان بستری و افزایش هزینه درمان می گردد. (۱۹ و ۴) پیشنهاد می شود که کلیه ایزوله ها، جهت تولید ESBL مورد بررسی و تایید قرار گیرند و بر طبق ضابطه NCCLS گزارش شوند و همچنین بدون توجه به نتیجه تست حساسیت به عنوان مقاوم نسبت به همه آنتی بیوتیک های بتالاکتام گزارش شوند (۱۱). اگر چه بعضی از نژادهای تولید کننده ESBL دارای مقاومت آشکار نسبت به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف می باشند ولی به صورت فنوتیپیک (In vitro) مقاوم نیستند (۲۰ و ۸). بنابراین برای آزمایشگاه تشخیصی مهم است که از باکتری هایی که MIC افزایش یافته نسبت به اکسی آمینو سفالوسپورین ها دارند، آگاه باشند و حتی اگر به عنوان حساس به آنتی بیوتیک گزارش شده باشند، حضور یک ESBL را پیشنهاد کنند از این رو آزمایشگاه ها باید به یک یا چند روش تعیین ESBL مجهز باشند.

فهرست مراجع :

1. Abraham E, chain, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin, *Nature* 1940; 146.
2. Fantin B, Pangon B, potel G, Caron f, Valee E, Vallois j M, Mohler j, et al. Activity of sulbactam in combination with ceftriaxone in vitro and in axperimental endocarditis caused by escherichia coli producing SHV-2 like beta lactamases , *Antimicrob Agent chemother* 1990; 34: 581-586.
3. Jarlier V, Nicolas MH, Fomier g, philippon A. Extended broad -spectrum β lactamases conferring transferable resistance to newer β lactam agents in Enterobacteriaceae : Hospital prevalence and susceptibility patterns, *Rev. Infect.Dis* 1988; 10: 867-878.
4. Mesa R J. Extended -spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage), *Journal of Antimicrobial chemotherapy* 2006; 58(1): 211-215.
5. Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A. Biochemical characteristics of extended broad specterum β -lactamases , *Infection* 1989; 17: 429-433
6. Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A. Afunctional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents chemother* 1995; 39: 1211-33.
7. Hitikhar A, Abdus S. Extended -Spectrum beta lactamases and bacterial resistance, *J. Med. Sci* 2002; 18(2): 151-155.
8. Tetsuya yagia, Hiroshi kurokawa, Naohiro Shibata, keigo Shibayama, yoshichika Arakawa. A preliminary survey of Extended - spectrum β -lactamase (ESBLs) in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherchia coli in japan. *Microbiology letters* march 2000; 184(1):53-56.
9. Sanders CC, Thomson K S, Bradford PA. Problemes with detection of β -lactam resistance among nonfastidious gram negative bacilli. *infect.Dis. Clin* 1993; 7: 411-425.
10. Vatopolous AC, Philipon A, Tzouvelekis L S, Komnion Z, legakis N J. Prevalence of a transferable SHV-5 type β -lactamases In clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherchia coli in Greece, *J. Antimicrob. Chemother* 1990; 26: 635-648.
11. wayne, pa. National committee for clinical standards .Methods for antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, National committee for clinical laboratory standards 2000.
12. Washington W J, Stephen A, William J, Elmer K, Gary P, Paul S, Gail W. *Koneman, colorl atlas and textbook of diagnostic Microbiology* 2006; Sixth Edition . 211-294.

13. Birmboim H C, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acid Res* 1979; 7: 1513-1523.
 14. Kado C I, Liu S T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol* 1981; 145: 1365-1373.
 15. Song W, Bae I K, Lee C H, Lee S H, Jeong S H. Detection of Extended 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; Feb. 14, [Epub ahead of print].
 16. Marty I, Jarlier V. Surveillance des bacteries multiresistantes: Justification, role du laboratoire, indicateurs, donnees francaises reentes, progress en Urlogie 1999; 9: 41-49.
 17. Patzer J A, Dzierzanowska D, Pawinska A, Turner P J. High activity of meropenem against Gram negative bacteria from a pediatric intensive Care Unit, 2001-2005. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2007; Jan 24, [Epub ahead of print].
 18. Tasli H, Bahar H. Molecular characterization of TEM and SHV derived ESBL in Hospital-Based Enterobacteriaceae in Turkey. *Jpn. J. Infect. Is* 2005; 58: 162-167.
 19. Tietz A, Bale and Francioli P. β -lactamases a spectre etendu: *Implication pour l'hygiene, hospitaliere* 2004; 11, Numero 4.
 20. Katstanis GP, Spargo J, Ferraro MJ, Sutton L, and Jacoby GA. Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended β -lactamases. *J. Clin. Microbiol* 1994; 32: 691-696.
 21. Karas JA, Pillay DG, Muckart D and Strum AW. Treatment failure due to Extended β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother* 1996; 57: 203-204.
۲۲. میر صالحیان، اکبر و همکاران بررسی فراوانی آنتروباکتریاسه تولید کننده بتا لاکتامازهای وسیع الطیف در بخش های مراقبت ویژه، مجموعه خلاصه مقالات هشتمین کنگره سراسری میکروبیشناسی ایران، صفحه ۱۵، ۱۳۸۵