جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۲ شماره‌های ۳و۴ پائیز و زمستان ۱۳۸۷، صفحات ۱۷-۹

# بررسی مولکولی ژن بتا لاکتاماز طیف گسترده تیپ SHV در ایزوله‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنمونیه* درنمونه های بالینی جدا شده از ۴ مرکزآموزشی و درمانی شهر تبریز

علیرضا مباشر کار جدی[۱] ، محمد رضا نهائی[۲و۳*] ، هایده مبین[۴]، مجید پرنور[۱] ، جاوید صادقی[۲]

۱) گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
۲) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۳) مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۴) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز
نویسنده رابط: محمد رضا نهائی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی و آزمایشگاه باکتریولوژی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۶۴۶۶۱ nahaeimr@tbzmed.ac.ir

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

## چکیده:

**زمینه و اهداف:** امروزه به دلیل استفاده گسترده از سفالوسپورین های نسل سوم، شاهد بروز انواع مقاومت دارویی نسبت به این آنتی بیوتیک ها هستیم. هدف از این مطالعه، تعیین الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن $bla_{SHV}$ در ایزوله های *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* از ٤ مرکز آموزشی و درمانی شهر تبریز (امام خمینی، سینا، شهدا و کودکان) بود.

**روش بررسی:** تعداد٤١ ایزوله *E. coli* و ٤٧ ایزوله *K. pneumoniae* از٤ مرکز آموزشی و درمانی شهر تبریز جمع آوری شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها به روش Kirby-Bauer آزمایش شد و از روش Combined disk test جهت انجام تست تائیدی استفاده گردید. نتایج با استانداردهای ( CLSI) *Clinical and laboratory standards institute* مقایسه‌و در نهایت ایزوله‌های ESBL مثبت، توسط روش PCR، از نظر ژن $bla_{SHV}$ بررسی شدند.

**یافته ها:** از ایزوله‌های *E. coli* و *K. pneumoniae* به ترتیب ۳۳ (۸۰/٤۹٪) و ۴۳ (۹۱/٤۸٪) ایزوله به سفتازیدیم و ۳۲ ( ۷۸/۰۵٪ )و ۴۲ (۸۹/۳۶٪) ایزوله به سفوتاکسیم مقاوم بودند. در *E. coli* ۴۰ (۹۷/٥٦٪) ایزوله ESBL مثبت و۷ (۱۷/۰۷٪) ایزوله حاوی ژن $bla_{SHV}$ بودند. از ٤٧ 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 سفالوسپورین های نسل سوم، انجام دقیق آنتی بیوگرام و پرهیز از تجویز بی رویه آنتی بیوتیک‌ها در عفونت های ناشی از ارگانیسم های تولید کننده ESBL، یک ضرورت اجتناب ناپذیر است.

**کلید واژه ها:** بتا لاکتاماز طیف گسترده، *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنمونیه*، واکنش زنجیره ای پلیمراز، ژن $bla_{SHV}$

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



## مقدمه :

از سال ۱۹۸۳ استفاده‌ی گسترده بالینی از اکسی ایمینوبتا لاکتام‌ها، به‌ویژه سفتازیدیم وسفوتاکسیم، موجب شد برخی از باکتری‌ها آنزیم‌هایی با واسطه پلاسمید( بتالاکتامازهای وسیع الطیف) تولید کنند و به اکسی ایمینو بتالاکتام ها مقاوم شوند (۱و۲). بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL ها) ابتدا در آلمان مشاهده شدند و از آن به بعد به سرعت در بین باکتری‌ها با تنوع قابل ملاحظه‌ای شیوع پیدا کردند(۲و۳). به نظر می رسد بتا لاکتامازهای خانواده SHV از سویه های کلبسیلا مشتق شده باشند. به طوریکه پیش ساز آنزیم هایSHV, SHV-1 عموماً در *کلبسیلا پنمونیه* یافت شده است(٤و٥). بتالاکتاماز SHV-1 برای نخستین بار توسط Pitton (۱۹۷۲) کشف و PIT-2 نامگذاری شد که طبق تقسیم بندی Bush بتالاکتاماز کلاس A محسوب می‌گردد(٦). ژن پیش ساز SHV ممکن است به صورت یک ژن کروموزومی در کلبسیلا ظاهر شده و سپس از راه های مختلف ژنتیکی به پلاسمیدها منتقل شده و از آن طریق در بین گونه های دیگر انترو باکتریا سه پخش شده باشد(٤و٧). به طوریکه آنالیز ترادف ژنومی *کلبسیلا پنمونیه* تائید کننده‌ی منشاء کروموزومی $bla_{SHV}$ می باشد(٨). اکثر ESBL ها شامل موتانت هایی از آنزیم های کلاسیک TEM وSHV همانند TEM-1، TEM-2 و SHV-1، با یک یا تعداد بیشتری اسیدهای آمینه جایگزین در اطراف سایت فعال آنزیم می باشند(٩). این تغییرات منجر به؛ هیدرولیز سفالوسپورین های وسیع الطیف ( سفتازیدیم و سفوتاکسیم ) و مونوباکتام ها( آزترونام ) می شود، و با وجود حساسیت به کلاولانات، مقاومت وسیعی به پنی سیلین ها، آزترونام، و سفالوسپورین ها ( به استثناء سفامایسین ها ) نشان می دهند (۱۳-۱۰). انواع ژن‌های $bla_{SHV}$ در ایزوله‌های مختلف باکتریایی مشاهده شده است و بین تعداد کپی ژن های کد کننده ESBL و سطح مقاومت آن ها رابطه وجود دارد(١٤). SHV-1 می تواند پنی سیلین و سفالوسپورین ها را هیدرولیز کند، اما قادر به هیدرولیز آنتی بیوتیک های وسیع الطیفی همانند اکسی ایمینوسفالوسپورین‌ها و مونوباکتام ها نیست. تداوم در استفاده از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف، موجب بروز $ESBL_S$ می‌شود که قادر به هیدرولیز این ترکیبات نیز می باشند(١٥).

*اشریشیا کلی و کلبسیلا پنمونیه* ، مهم ترین باکتری‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف تیپ SHV وTEM هستند. بتالاکتامازهای تیپ CTX-M به طور گسترده از طریق پلاسمیدهای حامل ESBL که فاقد TEM و SHV باشند، منتشر گردید و برای اولین بار در اواخر دهه‌ی ۱۹۸۰ در اروپا گزارش شد (۲و١٦). مقاومت باکتری‌های گرم منفی به آنتی بیوتیک های بتالاکتام طیف گسترده در در دو دهه‌ی گذشته به سرعت گسترش یافت. این مقاومت به طور عمده به پلاسمیدهای حاوی $ESBL_S$ نسبت داده می‌شود(١٧).

مطالعات اخیر، نشان دهنده گسترش و پراکندگی ژن $bla_{SHV}$ در نقاط مختلف جهان است. به طور مثال، سال ۲۰۰۳ در اسپانیا ۱۱٪(۱۸)، سال ۲۰۰۷ در هند ۷۵/۷٪(۱۹) ، سال ۲۰۰۸ در مالزی ۱۲/۵٪(۲۰) و نیز برخی مطالعات در ایران هم حاکی از شیوع و تنوع تیپ های مختلف بتالاکتامازهای طیف گسترده می باشد (۲۳-۲۱). برخی مطالعات، شیوع سویه های مقاوم به سفالوسپورین های طیف گسترده را با واسطه ESBLs در ایزوله های *اشریشیاکلی و کلبسیلا پنمونیه* جدا شده از بیماران بخش مراقبت‌های ویژه بین ۳٤-۲۸٪ ذکر نموده‌اند. این در حالی است که آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام درصد بالایی از آنتی بیوتیک‌های مصرفی در پزشکی را به خود اختصاص می دهند(۲٦-۲٤).تا به امروز حدود بیش از ۲۰۰ نوع $ESBL_S$ مختلف در جهان کشف شده که اکثر آنها در خانواده انتروباکتریاسه دیده شده اند(۲۷). به طور خلاصه مطالعات و گزارش های متعدد حاکی از شیوع و پراکنش این نوع مقاومت در اقصی نقاط دنیا بوده و موید یک مشکل جهانی است. این مطالعات مقاومت های چند دارویی باکتری ها را یکی از معضلات عمده پزشکی دانسته و بر لزوم بررسی و کنترل آن ها تأکید دارد(۲۸و۲۹). لذا از آنجائی که مطالعات مشابه در ایران کمتر انجام شده و الگوی مقاومت سویه های باکتریایی مولد عفونت های بیمارستانی با مکانیسم ESBLs در مناطق مختلف ایران در دسترس نیست، انجام تحقیقات در این زمینه ضروری و اجتناب ناپذیر می باشد. هدف از انجام این مطالعه، تعیین الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی و فراوانی ژن $bla_{SHV}$ در ایزوله های *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* از ٤ مرکز آموزشی و درمانی شهر تبریز ( امام خمینی، سینا، شهدا و کودکان ) بود.

## مواد و روش ها:

تعداد ٤١ ایزوله‌ی *E.coli* و ٤٧ ایزوله‌ی *K. pneomoniae* جدا شده از نمونه های ترشحات لوله تراشه، ادرار،

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد


خون، ترشحات برونش، خلط، زخم، مایع پلور و مدفوع از ٤ مرکز آموزشی و درمانی امام خمینی ، شهدا، سینا و کودکان شهر تبریز در یک دوره ی ٦ 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) ، سفتازیدیم (۳۰µg) ، آمیکاسین (۳۰µg)، ایمی پنم (۱۰µg)، آزترونام ( ۱۰µg)، سفوروکسیم(۳۰µg) ، پیپراسیلین / تازوباکتام(۱۰۰ µg/ ۳۰ µg) و سفپیم(۳۰µg) از شرکت Mast بودند.

برای شناسایی ایزوله‌های تولید کننده ESBLs از تست تأییدی استفاده شد(۳۱). دیسک‌های مورد آزمایش سفتازیدیم/ کلاولانیک اسید ( CAZ: 30µg/ CV:10µg ) و سفوتاکسیم/ کلاولانیک اسید ( CTX : 30µg/CV:10µg) به همراه سفوتاکسیم و سفتازیدیم هر کدام ۳۰ µg محصول شرکت Mast بودند. بعد از انکوباسیون به مدت ٢٤ ساعت در ۳۷° C ، تولید ESBLs از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵ میلی‌متر یا بیشتر در اطراف دیسک سفتازیدیم / 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 ٤٧١ bp تحت شرایط مندرج درجدول ۱ انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده به شرح ذیل بود:

**5´ - TCAGCGAAAAACACCTTG -3´**

**5´ – TCC CGCAGATAAATCACC -3´**

شایان ذکر است از سویه استاندارد *K. pneumoniae ATCC* 700603 جهت کنترل در آزمون PCR استفاده گردید. ازمارکر SMO323 (Ladder Fermantase) ۱۰۰bp جهت تأیید وزن مولکولی محصولات تکثیر شده توسط PCR استفاده شد. الکتروفورز محصولات PCR در ژل ۱/۱٪ آگارز به مدت ٦۰ 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 مشاهده‌شدند.

**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:

از ٤١ ایزوله‌ی *E. coli*، ٣٦ ایزوله ( ٨٧/٨٪ ) مقاوم بـه آزترونـام ، ٣٣ ایزوله ( ٨٠/٤٩٪ ) مقاوم به پیپراسیلین / تازوباکتـام، ٣٢ ایزولـه (٧٨/٠٥٪ ) مقـاوم بـه سفوتاکـسیم، سفوروکـسیم و سفتریاکـسون بودند. ٢٧ ایزوله( ٦٥/٨٥ ٪) مقاوم به سـفپیم و ٢ ایزولـه( ٤/٨٨٪ ) به آمیکاسین مقاومت نشان دادند. هیچ کدام از ایزوله هـا بـه ایمـی پـنم مقـاوم نبودنـد(جـدول ٢). از ٤١ ایزولـه *E.coli*، ٤٠ ایزولـه(٩٧/٥٦٪) ESBL مثبـت بودنـد(جـدول٣) و ٧ ایزولـه ( ١٧/٠٧٪ ) حاوی ژن $bla_{SHV}$ بودند(شکل١). لازم به ذکر اسـت که یک ایزولـه حـاوی ژن$bla_{SHV}$ شناسـایی‌گردیـد کـه آزمـایش ESBL آن منفی‌بود.

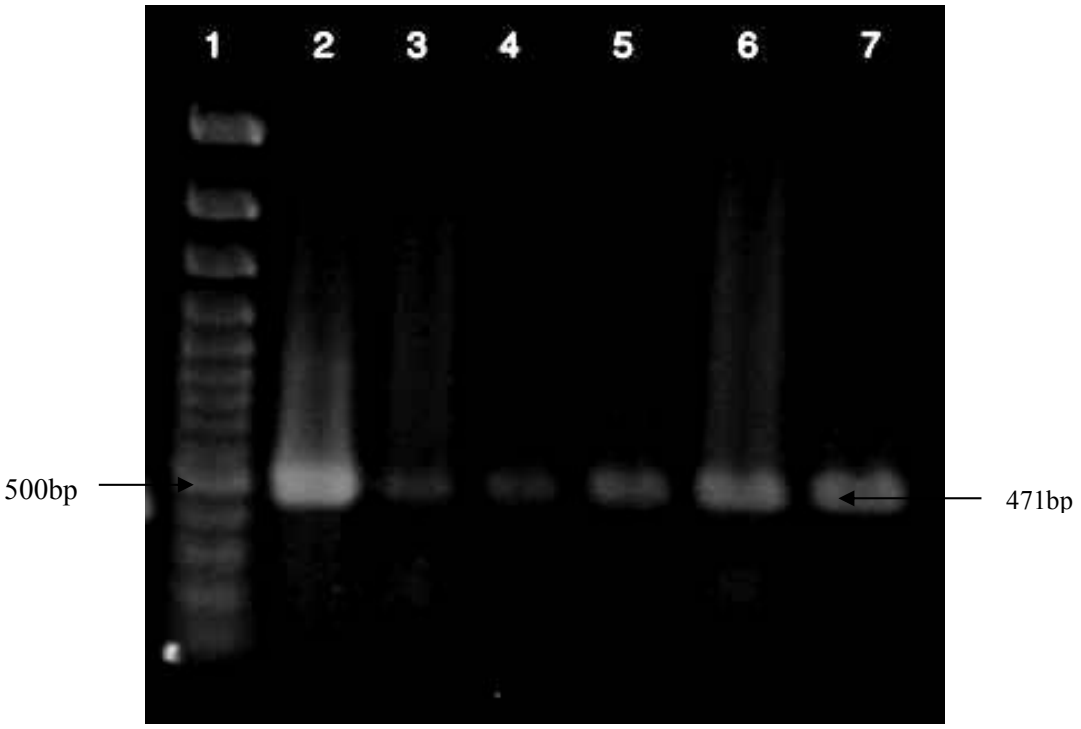
از بـین ٤٧ ایزولـه‌ی *K. pneumoniae* ، ٤٦ ایزولـه ( ٩٧/٨٧٪)مقاوم به سفوروکسیم، ٤٤ ایزولـه( ٩٣/٦٢٪ ) مقـاوم بـه سفتریاکـسون، ٤٣ ایزولـه ( ٩١/٤٨٪ ) مقـاوم بـه سـفتازیدیم، ٤٢ ایزوله (٨٩/٣٦٪) مقاوم به سفوتاکسیم، ٤١ ایزوله (٨٧/٢٣٪) مقـاوم به پیپراسیلین / تازوباکتـام و آزترونـام بودنـد. ٣٩ ایزولـه(٨٢/٩٨٪) مقـاوم بـه سـفپیم و همچنـین ٥ ایزولـه ( ١٠/٦٤٪ ) بـه آمیکاسـین مقاومت نشان دادند. هیچ کدام از ایزوله ها بـه ایمـی پـنم مقاومـت نشان ندادند (جدول ٢). از ٤٧ ایزوله مورد آزمـایش، ٤٦ ایزولـه (٩٧/٨٧٪ ) ESBL مثبت بود(جدول٣). همچنین مشخص شد کـه ١٢ ایزولـه ( ٢٥/٥٣ ٪) بعـد از انجـام آزمـایش PCR حـاوی ژن $bla_{SHV}$ بودند(شکل١).

**جدول ٢:** الگو های حساسیت آنتی بیوتیکی در ایزوله های *E. coli* و *K. pneumoniae* ( ٪ )

| باکتری | حساسیت/ مقاومت | پیپراسیلین/ تازوباکتام | ایمی پنم | آمیکاسین | سفپیم | سفوروکسیم | سفتازیدیم | سفتریاکسون | سفوتاکسیم | آزترونام |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *E. coli* | حساس | ٩/٧٦ | ١٠٠ | ٨٧/٨٠ | ١٤/٦٣ | ٤/٨٨ | ١٩/٥١ | ٢١/٩٥ | ١٧/٠٧ | ٤/٨٨ |
| | حد واسط | ٩/٧٥ | ٠ | ٧/٣٢ | ١٩/٥٢ | ١٧/٠٧ | ٠ | ٠ | ٤/٨٨ | ٧/٣٢ |
| | مقاوم | ٨٠/٤٩ | ٠ | ٤/٨٨ | ٦٥/٨٥ | ٧٨/٠٥ | ٨٠/٤٩ | ٧٨/٠٥ | ٧٨/٠٥ | ٨٧/٨٠ |
| *K. pneumoniae* | حساس | ٤/٢٦ | ١٠٠ | ٧٢/٣٤ | ٨/٥١ | ٠ | ٤/٢٦ | ٢/٥٠ | ٠ | ٢/١٣ |
| | حد واسط | ٨/٥١ | ٠ | ١٧/٠٢ | ٨/٥١ | ٢/١٣ | ٤/٢٦ | ٤/٢٥ | ١٠/٦٤ | ١٠/٦٤ |
| | مقاوم | ٨٧/٢٣ | ٠ | ١٠/٦٤ | ٨٢/٩٨ | ٩٧/٨٧ | ٩١/٤٨ | ٩٣/٦٢ | ٨٩/٣٦ | ٨٧/٢٣ |

**جدول ٣:** نتایج تست تاییدی (Combined disk)

| هاله ی توقف رشد | سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید (*K. pneumoniae*) | سفتازیدیم/کلاولانیک اسید (*K. pneumoniae*) | سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید (*E. coli*) | سفتازیدیم/کلاولانیک اسید (*E. coli*) |
|---|---|---|---|---|
| افزایش هاله | ٩٣/٦٢ | ٩٣/٦٢ | ٨٢/٩٢ | ٩٢/٦٨ |
| عدم افزایش هاله | ٦/٣٨ | ٦/٣٨ | ١٧/٠٨ | ٧/٣٢ |




**شکل ۱** : نمایش ایزوله‌های حاوی ژن $bla_{SHV}$ (bp ٤٧١ ) :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 اکسی ایمینو سفالوسپورین ها در اندازه‌ای برابر یا ۱۰درصد بیشتر از بنزیل پنی سیلین‌ها هستند(۳۳و۳٤). 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 اکسی ایمینوسفالوسپورین ها، به استثناء سفامایسین، فعال هستند. اکثر سویه های تولید کننده ESBL به سفوکسیتین و سفوتتان حساس می باشند(۹و۱۳). یکی از مهم ترین راهکارهای موفق در غلبه بر مقاومت بتالاکتامازها، استفاده از ممانعت کننده‌های آن ها است. این مکانیسم بر اساس فعالیت ممانعت کنندگی توسط اتصالات کووالانت به سایت فعال بتالاکتامازهای کلاس A صورت می‌پذیرد.تازوباکتام، سولباکتام وکلاولانیک‌اسید ، ممانعت کننده‌های بتالاکتاماز رایج مورد استفاده در بررسی‌های بالینی می‌باشند(۳٦).به علاوه، بزرگ شدن سایت فعال که منجر به افزایش فعالیت علیه سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف می‌شود، ممکن است به افزایش حساسیت ESBL ها 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 ۱۹۹۱تا ۱۹۹۵ محققان در بیمارستان Prnicess 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 آنتی بیوتیک شناخته شده است. به‌طوریکه شیوع ایزوله‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنمونیه* تولید کننده ESBL (ESBL های تیپSHV و TEM ) در ۱۹۹۷ در این کشور کمتر ازدرصد 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 جمع آوری شده بود، ۵۰درصد ایزوله‌ها را ESBL مثبت گزارش دادند. در بین این ایزوله‌ها ۲ تیپ جدید SHV-25 و SHV-26 شناسایی

گردید(۳۹). سه سال بعد (۲۰۰۳) در تحقیقی دراسپانیا، از ۵۱ ایزوله‌ی *اشریشیاکلی* که به آموکسی سیلین- کلاولانات مقاومت داشتند، ٤٠ ایزوله به سفوتاکسیم مقاوم بودند. از آنها، ٦ ایزوله (۱۱درصد) حاوی ژن $bla_{SHV}$ بودند(۱۸). در همین سال Ryoo و همکاران در بررسی روی نمونه‌های جمع آوری شده از ۱۲ بیمارستان در کره، دریافتند که ۲۳/۱درصد ایزوله‌های *اشریشیاکلی* و ۳۵/۹درصد ایزوله‌های *کلبسیلا پنمونیه*، ESBL مثبت هستند(٤٠). در سال ۲۰۰۵، ٦ ایزوله *کلبسیلا پنمونیه* در یکی از مراکز درمانی تحت نظر دانشگاه‌های زهیجیانگ چین مقاومت وسیع نسبت به آنتی بیوتیک‌ها نشان دادند. در بررسی با روش PCR مشخص شد که هر ٦ ایزوله حامل ژن های SHV هستند(٤١). در هندوستان (۲۰۰۷)، تحقیق Lal و همکاران فراوانی ژن SHV را، ۷۵/۷درصد نشان داد(۱۹). جالب توجه است که در مالزی در سال ۲۰۰۸ از ١٦ ایزوله‌ی *اشریشیاکلی*، ۲ ایزوله(۱۲/۵درصد) حامل ژن $bla_{SHV}$ گزارش شد(۲۰). در مطالعه‌ی حاضر بیشترین میزان مقاومت ایزوله‌های *E. coli* در برابر آزترونام(۸۷/۸ درصد) بود و بیشترین میزان مقاومت ایزوله های *K. pneumoniae* در برابر سفوروکسیم(۹۷/۸۷درصد) بود. ضمنا، همه ایزوله‌ها در برابر ایمی پنم حساس بودند. مقاومت ایزوله‌های *K. pneumoniae* نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم، سفتریاکسون و سفوتاکسیم قابل توجه بود که در مقایسه با مطالعات Nijssen (٤٢) و Jones (٤٣) که به ترتیب۱۸/۷ درصد و ۱۰ درصد گزارش نمودند، بسیار بالاتر است. بیش از ۹۷ درصد ایزوله‌های *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنمونیه* در مطالعه حاضر مولد آنزیم های ESBL هستند. همچنین به ترتیب ۱۷/۰۷ و ۲۵/۵۳درصد حاوی ژن $bla_{SHV}$ می‌باشند. مقایسه با نتایج مطالعات سایر کشورها نشان می دهد فراوانی و میزان شیوع ESBLها در نقاط مختلف جهان یکسان نیست. پراکندگی آنها در کشورها و حتی در شهرهای مختلف، متفاوت است(٤٤).

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 به‌خوبی روشن می‌سازد. لازم به ذکر است که تمایل هر کدام از تیپ‌های SHV به آنتی بیوتیک‌ها متفاوت است. به‌طوریکه میزان گرایش SHV-55 و SHV-5 به پنی سیلین‌ها بیشتر از SHV-1 است. همچنین SHV-55 میزان گرایش بالایی، در مقایسه با SHV-1، به نسل‌های اول، دوم و سوم سفالوسپورین‌ها، مونوباکتام‌ها و در بین نسل سوم در مقایسه با سفتازیدیم میزان جذب بالاتری به سفوتاکسیم دارد(٤٥). تفاوت در این عملکردها ممکن است ناشی از جایگزینی اسیدهای آمینه متفاوت در سایت فعال آنزیم باشد (٤٨-٤٦).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(٤٩).

## نتیجه گیری :

بتالاکتامازهای وسیع الطیف شیوع روز افزون دارند و نتایج مطالعه حاضر هم نشان از مقاومت بیشتر ایزوله ها برعلیه‌سفالوسپورین‌های نسل سوم دارد.حساسیت همه‌ی ایزوله‌های‌مورد مطالعه به ایمی پنم (۱۰۰درصد) وحساسیت اکثریت آن‌ها در برابرآمیکاسین (۸۷/۸درصدبرای *E.coli*و۷۲/۳٤درصد برای *K. pneumoniae*) و ارزشمند بودن این دارها ما را به توصیه‌های 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 تیپ‌های مختلف آنزیم SHV و سایر آنزیم های ESBL با روش‌های مولکولی دیگر از قبیل PCR-RFLP، REP-PCR و تعیین توالی(Sequencing) این ژن‌ها توصیه می‌شود.

## فهرست مراجع:


1. Knote H, Shah P, Krcmery V, Natal M, Mitsuhshi S. Transferable resistance to cefatoxime, cefoxitin, cefamandole and sefuroxime in clinical isolates of *K pneumoniae and Serratia marceseens. 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 Enterobacteriacae. *FEMS Microbiol Lett* (2003 ); **223**:147 151.
19. Lal p, Kapil A, Das KB, Sood S. Occurance *TEM* and *SHV* gene in extended-spectrom 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 ، شورج ف . بررسی مولکولی

بتالاکتامازهای PER ، VEB ، SHV و TEM در سویه های پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های زخم در دو بیمارستان تهران به روش PCR ، *مجله میکروب شناسی پزشکی ایران*، زمستان ۱۳۸۶، سال۱، شماره۴، صص۲۱ تا ۲۷.

۲۲. مبین ه ، نهایی م ر ، امیرمظفری ن ، مودب س ر ، مونسی ش ، صفائیان ف و همکاران . آنزیم بتالاکتاماز طیف گسترده (ESBL) گروه CTX-M در سویه های بالینی کلبسیلا پنمونیه جدا شده از بخش مراقبت های ویژه در بیمارستان های آموزشی شهر تبریز. *فصلنامه بیماری های 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 سویه های اشریشیاکلی، کلبسیلا پنمونیه و انتروباکتر تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف ایزوله شده از نمونه های کلینیکی بیمارستان های آموزشی شهرکرد به روش PCR، *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان* ، زمستان ۱۳۸۶ ، دوره۱۴، شماره ۴، صص۱۹ 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, Mikiewics 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: Ehrt 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 . Störnburg 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 $ser^{130}$ → 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 Bribane, 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-*

*Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2480-2485.
*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.
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.
49. Naiemi NA, Schipper K, Duim B, Bart A. Application of minimal sequence quality values