

## Phenotypic and molecular detection of TEM, PER, and VEB beta-lactamases in clinical strains of *Escherichia coli*

Eslami M(M.Sc)<sup>1</sup>, Najar Peerayeh S(Ph.D)<sup>1\*</sup>

1- Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 1 March 2012 , Accepted: 25 May 2010

### Abstract

**Background:** TEM, PER, and VEB are extended-spectrum betalactamase (ESBL) enzymes that are capable of hydrolyzing penicillins, cephalosporins, and aztreonam. The aim of this study was to determine the prevalence of ESBL producing *E.coli* and molecular evaluation of TEM, PER, and VEB  $\beta$ -lactamases among *E.coli* strains.

**Materials and Methods:** A total of 200 clinical strains of *E.coli* were isolated from clinical specimens and their antibiotic susceptibility was determined by disk diffusion method. ESBL production was determined using the combined disk method with CAZ and CTX with clavulanic acid and alone. Minimum concentration inhibition (MIC) for CAZ and CTX with clavulanic acid and alone was determined by agar dilution method. Finally, PCR with specific primers was used for determining the presence of bla<sub>TEM</sub>, bla<sub>PER</sub>, and bla<sub>VEB</sub> genes.

**Results:** Combined disk method confirmed 94 strains (47%) to be ESBL producing *E.coli*. Of the 94 ESBL producing strains, 36 samples had MIC=16, 44 samples had MIC between 32-256, and 10 samples had MIC $\geq$ 512 for ceftazidime, whereas 8 samples had MIC=16, 68 samples had MIC between 32-256, and 21 samples had MIC $\geq$ 512 for cefotaxime. The frequency of TEM was 44%; however, bla<sub>PER</sub> and bla<sub>VEB</sub> genes were not detected by PCR among ESBL producing isolates.

**Conclusion:** The results indicated that the high percentage of ESBL producing *E.coli* is 47% and PCR method showed a high frequency of TEM enzyme, but PER and VEB betalactamase were not found among them.

**Keywords:** Beta-lactamase, Combined disk, ESBL, *Escherichia coli*

\*Corresponding author:

Address: Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
Email: najarp\_s@modares.ac.ir

## تشخیص فنوتیپی و ملکولی بتالاکتامازهای TEM، PER و VEB در سویه‌های بالینی اشریشیاکلی

مجید اسلامی<sup>1</sup>، شهین نجار پیرایه<sup>2\*</sup>

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باکتری شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

2- دانشیار، گروه باکتری شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 89/12/11 تاریخ پذیرش: 90/3/4

### چکیده

**زمینه و هدف:** آنزیم‌های بتالاکتاماز TEM، VEB و PER از آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف هستند که قادر به هیدرولیز پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و آزترئونام می‌باشند. هدف از این بررسی تعیین فراوانی اشریشیاکلی‌های تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف و ارزیابی مولکولی بتالاکتامازهای TEM، PER و VEB در سویه‌های باکتری اشریشیاکلی بود. **مواد و روش‌ها:** تعداد 200 سویه اشریشیاکلی از نمونه‌های کلینیکی جدا شد و حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها با روش دیسک دیفیوژن تعیین گردید. تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف با استفاده از روش دیسک ترکیبی و با آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و سفنازیدیم همراه با کلولانیک اسید و به تنهایی تعیین گردید و حداقل غلظت مهار کنندگی سفنازیدیم و سفوتاکسیم همراه با کلولانیک اسید و به تنهایی با استفاده از روش رقیق سازی آگار مشخص شد. در نهایت حضور ژن‌های  $bla_{TEM}$ ،  $bla_{VEB}$  و  $bla_{PER}$  با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توسط روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراسی تعیین گردید.

**یافته‌ها:** با آزمون دیسک ترکیبی 94 سویه (47 درصد) تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بودند. از بین 94 سویه تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف حداقل غلظت مهار کنندگی برای سفنازیدیم در 36 نمونه 16، در 44 نمونه 256-32 و در 10 نمونه  $\geq 512$  و حداقل غلظت مهار کنندگی برای سفوتاکسیم در 8 نمونه 16، در 68 نمونه 256-32 و در 21 نمونه  $\geq 512$  مشخص شد. فراوانی آنزیم TEM 44 درصد به دست آمد، اما در سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف ژن‌های کد کننده آنزیم‌های PER و VEB شناسایی نشد.

**نتیجه‌گیری:** تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در سویه‌های مورد مطالعه، 47 درصد است و روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراسی فراوانی بالایی از آنزیم TEM را نشان داد ولی آنزیم‌های PER و VEB خوشبختانه هنوز در سویه‌های مورد بررسی مشاهده نمی‌شوند.

**واژگان کلیدی:** بتالاکتاماز، دیسک ترکیبی، بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، اشریشیاکلی

\*نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه باکتری شناسی

Email: najarp\_s@ Modares.ac.ir

## مقدمه

کشف آنتی‌بیوتیک‌ها و تولید و گسترش آنتی‌بیوتیک‌های جدید و رواج استفاده از آنها در درمان بیماری‌های عفونی باکتریایی، باعث به وجود آمدن مقاومت‌های باکتریایی نسبت به مواد ضد باکتریایی شد. مکانیسم‌های مقاومت باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مختلف و متفاوت هستند؛ یکی از این مکانیسم‌ها تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز در باکتری‌هاست (1). این آنزیم‌ها از طریق هیدرولیز هسته مرکزی در آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام باعث غیر فعال شدن آنها می‌شوند (2). بتالاکتامازها وسیع‌الطیف (Extended-Spectrum Betalactams= ESBL) از بتالاکتامازهای کلاس A بوده که سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف با یک زنجیر جانبی اکسیمیون (Oximino) را هیدرولیز می‌کنند و باعث بروز مقاومت باکتریایی به پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های نسل اول، نسل دوم، نسل سوم و آرترونوم به جز سفامایسین‌ها یا کارباپنم به وسیله هیدرولیز این آنتی‌بیوتیک‌ها را دارند و توسط مهارکننده‌های بتالاکتاماز مانند کلوالانیک اسید مهار می‌شوند (3).

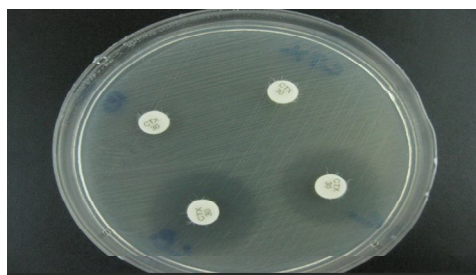
اشریشیاکلی یکی از باکتری‌هایی است که قادر به تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف می‌باشد (4). این باکتری عضو اصلی خانواده انتروباکتریاسه و عامل بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی از قبیل گاستروانتریت، مننژیت نوزادی، سپسیس و عفونت‌های ادراری شناخته شده است. اشریشیاکلی شایع‌ترین باسیل گرم منفی جدا شده از موارد بالینی بوده و هم‌چنین علت بیش از 80 درصد از موارد عفونت‌های دستگاه ادراری اکتسابی در جامعه به علاوه عفونت‌های کسب شده از بیمارستان می‌باشد. سویه‌های اشریشیاکلی از طریق چندین مکانیسم باعث مقاومت به بتالاکتام‌ها می‌شوند، که شامل تغییرات در پروتئین‌های غشای خارجی، تولید بیش از حد سفالوسپوریناز (کروموزومی و پلاسمیدی) یا تولید یک بتالاکتاماز وسیع‌الطیف می‌باشد (5). وجود ارگانسیم‌های تولید کننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در یک عفونت بالینی می‌تواند منجر

به شکست درمانی شود بنابراین انتخاب عامل دارویی ضد میکروبی بسیار مهم می‌باشد.

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف انواع مختلفی دارند که از آن جمله می‌توان به آنزیم‌های TEM، PER و VEB اشاره کرد. ژن‌های تولیدکننده این آنزیم‌ها به نام‌های *bla<sub>TEM</sub>*، *bla<sub>VEB</sub>* و *bla<sub>PER</sub>* جزو ژن‌هایی هستند که بر روی پلاسمید قرار گرفته‌اند. آنزیم بتالاکتاماز TEM اولین با در یک بیمار به اسم تمونیرا (Temoneira) شناسایی شد و یکی از مهم‌ترین بتالاکتامازهای پلاسمیدی در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه و از علل مهم بروز مقاومت‌های چند دارویی در عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. بیش از 130 آنزیم TEM در پسودوموناس آئروژینوزا شناسایی شده که بر علیه کاربونی سیلین فعال هستند (6).

آنزیم PER اولین بار در سال 1993 در یک ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا از یک بیمار ترکیه‌ای در فرانسه تشخیص داده شد و در ترکیه شیوع بالایی داشته و عمدتاً در پسودوموناس آئروژینوزا و گونه‌های اسیتوباکتر بیان می‌شود، اگرچه در فرانسه، ایتالیا و بلژیک هم انتشار یافته است (7-17). این آنزیم هم بر روی کروموزوم باکتری و هم بر روی پلاسمید یافت شده است و با توجه به این که این آنزیم در باکتری‌های مختلفی گزارش شده است، لذا ژن این آنزیم بر روی عناصر قابل انتقال واقع شده است و قادر به هیدرولیز پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها می‌باشد و فعالیت آن توسط کلوالانیک اسید نیز مهار می‌شود. آنزیم VEB نیز برای اولین بار روی پلاسمید و اینتگرون ایزوله‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا از یک نوزاد 4 ماهه ویتنامی شناسایی شد که متعلق به بتالاکتاماز وسیع‌الطیف است. این آنزیم در تایلند، کویت، هند و چین نیز گزارش شده است و به نظر می‌رسد احتمالاً منشأ آنزیم‌های بتالاکتامازی VEB بیماران آسیایی باشند (5، 12، 18).

هدف از این مطالعه تعیین فراوانی اشریشیاکلی تولید کننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف و هم‌چنین ارزیابی ملکولی بتالاکتامازهای TEM، PER و VEB در باکتری اشریشیاکلی می‌باشد.



شکل 1. روش دیسک ترکیبی دیسک‌های 30 میکروگرم CTX در حضور کلانولانیک اسید 10 میکروگرم (ایجاد هاله عدم رشد) و بدون حضور آن

تعیین حداقل روش غلظت مهار کنندگی (Minimum Inhibitory concentration MIC) نیز به صورت رقیق سازی آگار نسبت به سفنازیدیم و سفوتاکسیم انجام شد. برای انجام آزمایش غلظت های 0/5 تا 512 میکروگرم بر میلی لیتر از هر کدام از آنتی بیوتیک ها تهیه گردید. نتایج این آزمایش در جدول 1 نشان داده شده است..

جدول 1. نتایج حداقل غلظت مهار کنندگی در سوبه‌های حساس و مقاوم به CAZ و CTX

MIC	مقاوم به CAZ	مقاوم به CTX	MIC	حساس به CAZ	حساس به CTX
16	36	8	<0/5	48	47
32	30	13	0/5	1	1
64	10	18	1	4	1
128	3	16	2	6	6
256	1	21	4	24	23
512	10	21	8	27	47

DNA باکتری با روش جوشاندن استخراج شد. بدین صورت که چندین کلونی از کشت شبانه (Overnight) باکتری، به اپندورف‌های 1/5 میلی متر که حاوی 200 میکرولیتر بافر TE بود منتقل و سوسپانسیونه شد. سپس این نمونه‌ها با 8000 دور در دقیقه به مدت 4 دقیقه سانتریفوژ و این مراحل دو مرتبه دیگر تکرار شد. بعد به مدت 10 دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شده و به مدت 5 دقیقه در یخ قرار گرفت (مرحله ذوب و انجماد). مرحله ذوب و انجماد نیز 3 بار تکرار شده و با 8000 دور در دقیقه

## مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، تعداد 200 سوبه باکتری اشریشیاکلی از نمونه‌های مختلف کلینیکی زخم، خون، بافت، ترشحات، ادرار و مدفوع از پنج بیمارستان شهر تهران (مرکز طبی کودکان، مرکز قلب تهران، بقیه ا...، میلاد و مهر) جمع‌آوری شد و با تست‌های بیوشیمیایی تأیید شد.

حساسیت آنتی‌بیوتیکی سوبه‌ها با روش انتشار دیسک (Kirby-Bauer) طبق توصیه CLSI نسبت به 14 آنتی بیوتیک سفوکسیتین 30 میکروگرم (FOX)، سفنازیدیم 30 میکروگرم (CAZ)، سفوتاکسیم 30 میکروگرم (CTX)، سفپیم 50 میکروگرم (CPM)، آزترئونام 30 میکروگرم (ATM)، اریترومایسین 15 میکروگرم (ERY)، جنتامایسین 10 میکروگرم (GM)، تتراسیکلین 30 میکروگرم (TE)، کوآموکسی کلاو 30 میکروگرم (SXT)، کوآموکسی سیلین 25 میکروگرم (AM)، ایمی‌پنم 10 میکروگرم (IPM)، آمیکاسین 30 میکروگرم (AN) و سیروفلوکساسین 30 میکروگرم (CP) تعیین گردید.

تولید آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف با استفاده از روش دیسک ترکیبی و با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و سفنازیدیم همراه با کلانولانیک اسید و به تنهایی تعیین گردید. از سوبه اشریشیاکلی با ATCC 25922 جهت کنترل روش‌های آنتی‌بیوگرام و دیسک ترکیبی استفاده شد. هدف از انجام آزمون دیسک ترکیبی جداسازی سوش‌های تولید کننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بود. در این تست از دیسک‌های سفنازیدیم 30 میکروگرم - CAZ + کلانولانیک اسید 10 میکروگرم و دیسک‌های سفوتاکسیم 30 میکروگرم CTX + کلانولانیک اسید 10 میکروگرم به همراه سفنازیدیم و سفوتاکسیم به تنهایی بود، بعد انکوباسیون به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی گراد، تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از طریق افزایش قطر هاله عدم رشد به اندازه 5 میلی متر  $\geq$  نسبت به سفنازیدیم و سفوتاکسیم در ترکیب هر کدام از آنها با کلانولانیک اسید نشان‌دهنده تولید بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بود (شکل 1).

### یافته‌ها

از 200 سویه اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های بالینی تحت بررسی 63 نمونه (31/5 درصد) مربوط به نمونه‌های ادرار، 38 نمونه (19 درصد) مدفوع، 35 نمونه (17/5 درصد) زخم، 28 نمونه (14 درصد) بافت، 21 نمونه (10/5 درصد) ترشحات و 15 نمونه (7/5 درصد) مربوط به خون بودند. میزان مقاومت سویه‌های بالینی جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به شرح ذیل بود:

سفتواکسیم 54 درصد، سفنازیدیم 41 درصد و سفوتاکسیم 42 درصد، سفپیم 36 درصد، آزترونام 39/5 درصد، اریترومايسين 93/5 درصد، جنتامایسین 36/5 درصد، تتراسایکلین 75 درصد، کوتریموکسازول 57 درصد، کوآموکسی کلاو 85 درصد، آموکسی‌سیلین 94/5 درصد، ایمی‌پنم 1/5 درصد، آمیکاسین 32/5 درصد و سیپروفلوکساسین 39 درصد و مقاومت متوسط نسبت به سفتواکسیم 15/5 درصد و برای سفنازیدیم و سفوتاکسیم 11 درصد به دست آمد. در بین 82 نمونه‌ای که مقاوم به سفنازیدیم بودند 22 نمونه (27 درصد) مربوط به نمونه‌های ادرار، 15 نمونه (18/5 درصد) زخم، 15 نمونه (18/5 درصد) بافت، 13 نمونه (15/5 درصد) مدفوع، 10 نمونه (12 درصد) ترشحات و 7 نمونه (8/5 درصد) مربوط به خون بودند و از 84 نمونه‌ای که مقاوم به سفوتاکسیم بودند 27 نمونه (32/5 درصد) مربوط به نمونه‌های ادرار، 19 نمونه (22/5 درصد) زخم، 15 نمونه (18 درصد) مدفوع، 7 نمونه (8 درصد) ترشحات، 13 نمونه (15/5 درصد) بافت و 3 نمونه (3/5 درصد) مربوط به خون بودند (جدول 4 و 5).

در آزمون دیسک ترکیبی افزایش قطر هاله عدم رشد به اندازه 5 میلی متر  $\geq$  نسبت به سفنازیدیم و سفوتاکسیم در ترکیب هر کدام از آنها با کلوالانیک اسید نشان‌دهنده تولید بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بود. با آزمون دیسک ترکیبی 94 سویه (47 درصد) تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بودند که این سویه‌ها برای بررسی ژن‌های بتالاکتامازی  $bla_{VEB}$  643 bp و  $bla_{PER}$  925 bp،  $bla_{TEM}$  850 bp مورد استفاده قرار گرفتند که در سویه‌های تولیدکننده

به مدت 4 دقیقه سانتریفوژ کرده و محلول رویی آن در یک اپندورف استریل جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز جمع‌آوری شد.

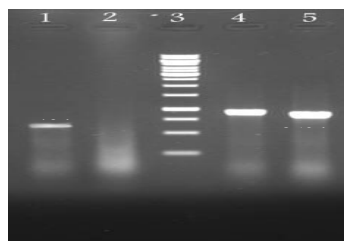
بررسی فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز TEM، PER و VEB با استفاده از پرایمرها و دمای ذکر شده در جدول 2 و 3 انجام گردید. 5 میکرولیتر از DNA استخراج شده به PCR Master mix با حجم نهایی 25 میکرولیتر (هر ویال حاوی 1 میکرولیتر Mgcl2 (از استوک 50 میلی‌مول)، 2 میکرولیتر بافر 10X، 2 میکرولیتر dNTP (از استوک 10 میلی‌مول)، 1 میکرولیتر از هر پرایمر (از mix primer 10 پیکومول)، 1 میکرولیتر آنزیم Taq Polymerase و 13 میکرولیتر آب) اضافه گردید و از مارکر 250 (ladder - سیناژن) جهت تأیید وزن مولکولی محصولات تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز استفاده و نتایج با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز 1 درصد بررسی شد.

### جدول 2. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	نام ژن
OT3	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG	TEM(F)
OT4	CCA ATG CTT AAT CAG TGA GG	TEM(R)
$bla_{PER}$	ATG AAT GTC ATT ATA AAA GC	PER(F)
$bla_{PER}$	AAT TTG GGC TTA GGG CAG AA	PER(R)
$bla_{VEB}$	CGA CTT CCA TTT CCC GAT GC	VEB(F)
$bla_{VEB}$	GGA CTC TGC AAC AAA TAC GC	VEB(R)

### جدول 3. شرایط مورد استفاده جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز

شماره	مراحل	زمان (دقیقه)	
		درجه حرارت (°C)	-
1	Initial denaturation	94	10/4
2	denaturation	94	1
3	Annealing	55/5	1
4	Extension	72	1
5	Final extension	72	5
6	Cycle number	30/35	



تصویر 2. آشکارسازی محصولات . واکنش زنجیره ای پلی مرز  
 باند 1: 643 bp  $bla_{VEB}$ , باند 2: کنترل منفی، باند 3: ladder  
 marker 250bp, باند 4: 925 bp  $bla_{PER}$ , باند 5  $bla_{TEM}$  850bp

### بحث

امروزه بتالاکتامازهای وسیع الطیف به عنوان یک مشکل بیماران بستری شده در بیمارستان در سراسر جهان شناخته شده اند. شیوع بتالاکتامازهای وسیع الطیف در بین گونه های بالینی کشورهای مختلف متفاوت است. باکتری های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف غالباً به چندین دسته آنتی بیوتیک مقاوم بوده و منجر به شکست درمانی و مشکلات جدی می شوند. باکتری های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف به عنوان یک تهدید کلینیکی مطرح بوده و موجب نگرانی پزشکان در درمان عفونت های ناشی از این ارگانیسم ها شده است (19). سویه های تولیدکننده این آنزیم ها مسئول عفونت های بیمارستانی طولانی مدت همراه با پیامدهای ناگواری هستند. با توجه به اهمیت اشریشیاکلی در عفونت های بیمارستانی بررسی حضور و تعیین مقاومت این باکتری در سویه های جدا شده از نمونه های مختلف نشان داد که مقاومت در این سویه ها بالا می باشد به طوری که مقاومت نسبت به سفنازیدیم و سفوتاکسیم در کل سویه ها به ترتیب 41 درصد و 42 درصد بود و مقاومت نسبت به ایمی پنم 1/5 درصد به دست آمد به دلیل این که ایمی پنم در کشور ما یک آنتی بیوتیک بیمارستانی بوده و بدون تجویز پزشک مصرف نمی شود، لذا مقاومت به این دارو در ایران نسبت به سایر کشورها پایین تر است. نتایج نشان می دهد که تولید آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف در سویه های مورد مطالعه بالا است (47 درصد)

بتالاکتاماز وسیع الطیف ژن تولید کننده آنزیم های بتالاکتامازی PER و VEB با PCR شناسایی نشد در حالی که 44 درصد از سویه های تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف دارای ژن تولید کننده بتالاکتامازی TEM بودند (تصویر 2). طبق نتایج به دست آمده 77 درصد (65 سویه) از 84 سویه مقاوم به سفوتاکسیم نسبت به سفنازیدیم نیز مقاوم بودند.

### جدول 4. الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی در سوش های بالینی اشریشیا کلی

ردیف	نام آنتی بیوتیک	درصد	
		مقاوم	حد واسط حساس
1	سفنازیدیم	41	4/5
2	سفوتاکسیم	42	6/5
3	سفپیم	36	7
4	سفوکسیتین	54	15/5
5	آزترئونام	39/5	15
6	جنتامایسین	36/5	12/5
7	اریترومایسین	93/5	6
8	تتراسایکلین	75	9/5
9	کوآموکسی کلاو	85	6/5
10	کوآتریموکسازول	57	4
11	آمپی سیلین	91	3/5
12	ایمی پنم	0/5	1/5
13	آمیکاسین	31	17
14	سیپروفلوکساسین	39	3

### جدول 5. درصد فراوانی مقاومت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه در سویه های مقاوم به CAZ و CTX

ردیف	نام آنتی بیوتیک	سفوتاکسیم	سفنازیدیم
		(CTX)	(CAZ)
1	سفپیم	77	69
2	سفوکسیتین	89	82
3	آزترئونام	83	71
4	جنتامایسین	39	46
5	اریترومایسین	94	90
6	تتراسایکلین	78	80
7	کوآموکسی کلاو	94	92
8	کوآتریموکسازول	67	63
9	آمپی سیلین	94	95
10	ایمی پنم	0	0
11	آمیکاسین	16	18
12	سیپروفلوکساسین	39	45

ولی آنزیم‌های PER و VEB هنوز در سویه‌های مورد مطالعه مشاهده نمی‌شوند. در بررسی‌ای که در سال 1385 توسط شاهچراغی و نصیری بین 196 سویه اشریشیاکلی جدا شده از بیمارستان‌های شهر تهران انجام گرفت شیوع بتالاکتاماز وسیع الطیف با روش‌های فنوتیپی دیسک دیفیوژن و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی سفتازیدیم با روش میکروبراث دایلوژن مورد بررسی قرار گرفتند نشان داد که 70/6 درصد سویه‌های مورد مطالعه بتالاکتاماز وسیع الطیف مثبت بودند (1). اما در سویه‌های مورد بررسی ما که با تست دیسک ترکیبی انجام گردید 47 درصد بتالاکتاماز وسیع الطیف مثبت شناخته شدند.

شاهچراغی و همکاران در تحقیقی دیگر 150 سویه کلبسیلا از نمونه‌های مختلف شامل ادرار، خلط، زخم و مایع مغزی نخاعی از 5 بیمارستان تهران ایزوله و جمع‌آوری کردند. برای تعیین مقاومت نمونه‌ها تست آنتی بیوگرام با روش دیسک دیفیوژن صورت گرفت. سپس حداقل غلظت مهارکنندگی سوش‌های جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم به روش میکرو دایلوژن تعیین شد. برای بررسی وجود بتالاکتامازهای وسیع الطیف در سویه‌های ایزوله شده از روش دیسک دیفیوژن استفاده گردید. نتایج به دست آمده به این صورت بود که میزان مقاومت کلبسیلا پنومونیه به کاربنی‌سیلین 94 درصد، پپراسیلین 55 درصد، سفوتاکسیم 32 درصد و سفتازیدیم 31 درصد بود. هیچ سوش مقاوم به ای‌می‌پنم دیده نشد.

در مطالعه‌ای که زمان زاد و همکاران فراوانی ژن TEM-1 در سویه‌های اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف ایزوله شده از نمونه‌های کلینیکی شهرکرد انجام دادند، 54/2 درصد دارای ژن مقاومت بتالاکتاماز TEM-1 بودند که در ایزوله‌های اشریشیاکلی 48/7 درصد گزارش شد (20).

شیوع ژن TEM-1 در یک مطالعه‌ای که در ترکیه و بر روی نمونه‌های باکتری‌های روده‌ای به دست آمده از بیمارستان انجام شد، 52/7 درصد برآورد گردید (21). این میزان در بررسی مشابهی در ایتالیا 56/4

درصد گزارش شده است (22). در حالی که در تایوان نگران‌کننده بوده و 81 درصد در سویه‌های اشریشیاکلی کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر گزارش شده است (23).

در برخی مطالعات در ایران مقاومت‌های دارویی در برابر سفالوسپورین‌های نسل سوم و بقیه داروهای طیف وسیع بررسی شده است. قناعت و صادقیان مقاومت 1261 باکتری بیماری‌زا در برابر سه داروی طیف وسیع سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین و سفتری‌زوکسیم بررسی شد که هر سه دارو اثر خوبی روی باسیل‌های گرم منفی داشتند (24). اما در اشریشیاکلی‌های مورد بررسی ما یک مقاومت تقریباً 40 درصد نسبت به سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین دیده شد. در مطالعه رستگارلاری و همکاران بر روی بیمارستان بستی مبتلا به عفونت ادراری ناشی از باسیل‌های گرم منفی نشان داده شد که باکتری‌های مختلف از جمله اشریشیاکلی 14 درصد در برابر سفتازیدیم مقاوم بودند (25). اما در سویه‌های مورد مطالعه ما از 84 سویه مقاوم به سفوتاکسیم 27 نمونه (32 درصد) و از 82 سویه مقاوم به سفتازیدیم 22 نمونه (26 درصد) مربوط به نمونه‌های ادراری بودند. مسجیدیان و همکاران با بررسی 148 سویه اشریشیاکلی با دو روش دیسک ترکیبی و دیسک دوگانه به ترتیب 51 درصد (76 مورد) و 70 درصد (49 مورد) را مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف گزارش نمودند. این محققین 50 درصد از سویه‌های اشریشیاکلی را دارای پلاسمیدهای مقاومت مربوط به آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف گزارش کردند (26).

در سایر کشورهای آسیایی نیز آمار مربوط به سویه‌های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف تفاوت بارزی با کشور ایران نداشته و اغلب به صورت طرح‌های تحقیقاتی پراکنده می‌باشند. برای مثال چئونگ و همکاران الگوی مقاومت 36243 سویه باکتریایی جدا شده از 6 بیمارستان عمومی کشور مالزی را بررسی نمودند که در این مطالعه، 5/5 درصد از سویه‌های اشریشیاکلی، 16/6 درصد از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و 6/8 درصد از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا در برابر سفتازیدیم مقاوم بودند. در

4. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(3):1089-94.
5. Poirel L, Naas T, Guibert M, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(3):573-81.
6. Jacoby GA, Muñoz-Price LS. The new beta-lactamases. *N Engl J Med*. 2005 252(4):380-91.
7. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1994;38(1):104-14.
8. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Dupont C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1993; 37(5):962-9.
9. Vahaboglu H, Dodanli S, Eroglu C, Ozturk R, Soyletir G, Yildirim I, et al. Characterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* strains: molecular epidemiology of PER-1-producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clone. *Journal of clinical microbiology*. 1996; 34(12): 2942-6.
10. Vahaboglu H, Coskuncan F, Tansel O, Ozturk R, Sahin N, Koksali I, et al. Clinical importance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal of medical microbiology*. 2001; 50(7): 642-5.
11. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P, Ambler Class A Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003; 47(8): 2385-92.
12. Claeys G, Verschraegen G. PER-1  $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit *J Antimicrob Chemother*. 2000; 45(6): 924-5.

این مطالعه تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف در سویه‌ها بررسی نشده بود. به صورت تخمینی 7-19 درصد اشریشیاکلی و 27-38 درصد گونه‌های کلبسیلا در کشور مالزی مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف اند (27). در مقایسه این 5/5 درصد مقاومت سویه‌های اشریشیاکلی بررسی شده در کشور مالزی با نتایج ما نشان می‌دهد که مقاومت نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم در کشور ما نسبتاً بالا بوده بنابراین باید در درمان بیماری‌های عفونی با این آنتی‌بیوتیک‌ها دقت زیادی نمود.

### نتیجه‌گیری

تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف به عنوان یک تهدید بزرگ در مصرف سفالوسپورین‌های وسیع الطیف به شمار می‌رود. بنابراین بایستی در انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب برای درمان عفونت‌هایی که مشکوک به ارگانیزم‌های تولیدکننده بتالاکتاماز هستند دقت نمود. همچنین سوش‌هایی که حساسیت آنها در برابر سفنازیدیم و سفوتاکسیم کاهش پیدا کرده است، باید از نظر داشتن ژن‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف مورد بررسی قرار گیرند و سویه‌های تحت درمان به صورت پیوسته بررسی شوند.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه تربیت مدرس تهران به دلیل تامین اعتبار این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایم.

### منابع

1. Shahcheraghi NV, Shoraj F. Evaluation existence of blaTEM and blaSHV Beta-lactamase genes in resistance antibiotic *Escherichia coli* strains isolated from clinical samples obtained from Tehran Hospitals. *Journal of Iran medical microbiology*. 1386;1(4):21-7. [Persian]
2. Ambler R. The Structure of beta Lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences*. 1980;289(1036):321-31.
3. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 1983;11(6):315-7.



13. Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;58(1):178-82.
14. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, Nucleo E, Pollini S, Spalla M, et al. Multifocal Detection of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing the PER-1 Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase in Northern Italy. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(6):2523-14.
15. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005;18(4):657-86.
16. Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989; 33(8): 1131-6.
17. Ellen DRAMY, Rudenskyb BB. Susceptibilities of ESBL-producing Enterobacteriaceae to ertapenem, meropenem and piperacillin-tazobactam with and without clavulanic acid. *Chemotherapy*. 2007;53:185-9.
18. Girlich D, Naas T, Leelaporn A, Poirel L, Fennewald M, Nordmann P. Nosocomial Spread of the Integron-Located veb-1—Like Cassette Encoding an Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *Clinical infectious diseases*. 2002;34(5):603-11.
19. Aubert D, Girlich D, Naas T, Nagarajan S, Nordmann P. Functional and Structural Characterization of the Genetic Environment of an Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase blaVEB Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Obtained in India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004; 48(9): 3284-90.
20. Zamanzad B, Daiham B, Nafisi M, Karimi A. Study of frequency TEM-1 gene in *E.coli*, *Klebsiella pneumonia* and *enterobacter* strains producing extended spectrum beta-lactamases in clinical sample shahrkord hospital with PCR. *hamedan med J*. 2007; 14(4):19-25.[Persian]
21. Tasli H, Bahar IH. Molecular characterization of TEM-and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based Enterobacteriaceae in Turkey. *Japanese journal of infectious diseases*. 2005; 58(3): 162-7.
22. Perilli M, Dell'Amico E, Segatore B, De Massis MR, Bianchi C, Luzzaro F, et al. Molecular Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases Produced by Nosocomial Isolates of Enterobacteriaceae from an Italian Nationwide Survey. *Journal of clinical microbiology*. 2002; 40(2): 611-4.
23. Ma L, Chang FY, Fung CP, Chen TL, Lin JC, Lu PL, Huang LY, Chang JC, Siu LK. Variety of TEM-, SHV-, and CTX-M-type beta-lactamases present in recent clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* from Taiwan. *Microb Drug Resist*. 2005;11(1):31-9.
24. Ghanaat SA. Microbial resistance to Hospital infections. *The Iranian Journal of otorhinolaryngology*. 2001; 13(27): 44-5.[Persian]
25. Rastgarlari MF, Salekmoghaddam A. laboratories Susceptibility of Ofloxacin with Ceftriaxon by Minimum Inhibitory C(MIC) method. *Arak medical university journal*. 2001;5(4):1-15.[Persian]
26. Masjedian Jazi F, Valehi F, Talebi A, Rastegar Lari A. Molecular evaluation of resistance to extended spectrum B-lactamases Producing *E.coli* and *K.pneumonia*. *Med Microbiol J Iran*. 2007; 1:27-34.
27. Cheong Y, Lim V, Jegathesan M, Suleiman A. Antimicrobial resistance in 6 Malaysian general hospitals. *The Medical journal of Malaysia*. 1994; 49(4): 260-5.