

## بررسی فنوتیپی و مولکولی بتالاکتامازهای وسیع الطیف PER در ایزوله‌های ادراری انتروباکتریاسه در مشهد

سحر نادری فر<sup>۱</sup>، محبوبه نخعی مقدم<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروب شناسی، قم، ایران  
<sup>۲</sup> استادیار میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، گروه زیست شناسی، مشهد، ایران  
نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، گروه زیست شناسی، مشهد  
پست الکترونیک: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

وصول: ۱۳۹۰/۸/۴ اصلاح: ۱۳۹۰/۱۱/۹ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۱۷

### چکیده

**زمینه و هدف:** تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز توسط باکتری‌ها به‌ویژه نوع *Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL)* یکی از مشکلات بهداشتی و درمانی در سطح دنیاست. شیوع این آنزیم‌ها در نواحی جغرافیایی مختلف و با زمان تغییر می‌کند. هدف از انجام این تحقیق، تعیین شیوع باکتری‌های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در میان ایزوله‌های ادراری انتروباکتریاسه و ردیابی ژن *bla<sub>PER</sub>* در دو بیمارستان منتخب مشهد بوده است.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه‌ی توصیفی مقطعی، تعداد ۱۰۰ ایزوله انتروباکتریاسه از نمونه‌های ادراری بیماران بستری و سرپایی بیمارستان‌های قائم و ۱۷ شهریور مشهد از تاریخ ۱۳۸۹/۸/۱۵ تا ۱۳۸۹/۱۰/۱۵ جمع‌آوری و با آزمایشات بیوشیمیایی-اقتراقی شناسایی شدند. ایزوله‌ها از نظر حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها آزمایش شدند. سپس از نظر تولید *ESBL* به وسیله‌ی آزمایش دیسک دوتایی و آزمایش تأییدی مطابق دستورالعمل *CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute)* مورد بررسی قرار گرفتند. شناسایی مولکولی ژن *bla<sub>PER</sub>* با استفاده از پرایمر اختصاصی و تکنیک واکنش زنجیره پلیمرز انجام شد.

**یافته‌ها:** از ۱۰۰ باکتری جدا شده، تعداد ۲۷ ایزوله (۲۷٪) مولد بتالاکتاماز بودند که همگی فاقد ژن *bla<sub>PER</sub>* روی پلاسمید بودند. مقاومت باکتری‌های مولد بتالاکتاماز نسبت به آمپی‌سیلین، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفالوتین بیشتر از انواع فاقد بتالاکتاماز بود ( $p < 0/05$ ). درصد بیشتری از این باکتری‌ها در مقایسه با انواع فاقد بتالاکتاماز مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های غیر بتالاکتام جنتامایسین، کوتریموکسازول و نیتروفورانتوین بودند که اختلاف برای جنتامایسین و کوتریموکسازول معنی‌دار بود ( $p < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان می‌دهد که تولید بتالاکتاماز در باکتری‌های جدا شده در جامعه‌ی مورد بررسی شیوع نسبتاً بالایی دارد. ژن *bla<sub>PER</sub>* در میان باکتری‌های جدا شده یافت نشد، بنابراین تولید بتالاکتاماز در میان این ایزوله‌ها مربوط به سایر انواع بتالاکتاماز است.

**واژه‌های کلیدی:** انتروباکتریاسه، بتالاکتام، بتالاکتاماز وسیع الطیف تیپ *PER*

### مقدمه

همراه نباشد و حتی با ظهور و شیوع ایزوله‌های جدید به دامنه‌ی این بیماری‌ها افزوده شود [۲]. به طوری که با وجود اقداماتی که تاکنون برای تولید مواد ضد میکروبی وسیع الطیف انجام شده است، کماکان موضوع بروز و شیوع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به خصوص، مقاومت باکتری‌های گرم منفی یکی از موانع اساسی برای درمان قطعی بیماری‌های عفونی محسوب می‌شود. باکتری‌های

به محض توسعه و گسترش داروهای ضد باکتریایی، باکتری‌ها نیز روش‌های مختلف مقاومت را بروز دادند [۱]. با وجود تلاش‌های بسیاری که برای ریشه‌کنی بیماری‌های عفونی صورت گرفته است، اما تغییر رفتار میکروارگانیسم‌ها از جنبه‌های مختلف موجب شده که ریشه‌کنی بسیاری از این عوامل میکروبی با موفقیت کافی

## روش کار

جداسازی و شناسایی باکتری‌ها: در این مطالعه توصیفی مقطعی، باکتری‌ها از آبان تا دی ماه ۱۳۸۹ در دو بیمارستان دانشگاهی قائم و ۱۷ شهریور مشهد جمع‌آوری شدند و روش نمونه برداری متوالی بود. در مجموع ۱۰۰ باکتری از انواع خانواده انتروباکتریاسه از نمونه‌های ادراری که با نظر پزشک به آزمایشگاه ارجاع داده شده بودند، جدا شد. نمونه‌ها مربوط به بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها و بیماران سرپایی مراجعه کننده به آزمایشگاه‌ها در مدت زمان انجام تحقیق بودند. باکتری‌هایی به عنوان عامل عفونت ادراری در نظر گرفته شدند که به تعداد  $10^4$  یا  $10^5$  باکتری در هر میلی‌لیتر ادرار جدا شدند. انواع انتروباکتریاسه با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی (آزمایش‌های اکسیداز، اندول، متیل‌رد، و گس پروسکایر، سیترات، تولید گاز، تولید سولفید هیدروژن، تخمیر قند، لیزین دکربوکسیلاز و اوره) شناسایی شدند. جنس و گونه باکتری‌ها با استفاده از کیت میکروژن (Microgen GNA-ID System - کشور انگلستان) شناسایی و تأیید شد.

سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی و شناسایی فنوتیپی تولید بتالاکتاماز: آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش کربای بایر و مطابق با استانداردهای CLSI انجام گرفت [۸]. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده از شرکت MAST Diagnostics (ساخت کشور انگلستان) تهیه شدند و عبارت بودند از: سفنازیدیم ( $30 \mu\text{g}$ , CAZ)، سفالوتین ( $30 \mu\text{g}$ , CF)، آمپی‌سیلین ( $10 \mu\text{g}$ , AP)، سفوتاکسیم ( $30 \mu\text{g}$ , CTX)، آمیکاسین ( $30 \mu\text{g}$ , K)، نیتروفورانئوتوئین ( $30 \mu\text{g}$ , NI)، نالیدیکسیک‌اسید (NA)، جنتامایسین ( $10 \mu\text{g}$ , G)، کوتریموکسازول ( $25 \mu\text{g}$ , SXT) و ایمپنم ( $10 \mu\text{g}$ , IMI). برای شناسایی ایزوله‌های مولد بتالاکتاماز از آزمایش هم‌افزایی دیسک دوتایی (Double disk test) مطابق استانداردهای CLSI استفاده شد [۹]. بعد از گذاشتن پلیت در گرمخانه  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، گسترش هاله‌ی مهاری از ناحیه‌ی دیسک سفوتاکسیم ( $30 \mu\text{g}$ , CTX) به طرف آگمنتین ( $20/10 \mu\text{g}$ ) به عنوان باکتری مولد ESBL در نظر گرفته

تولیدکننده‌ی بتالاکتامازهای وسیع الطیف به واسطه‌ی هیدرولیز بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مانند پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و آزترونام‌ها معضلات عدیده‌ای را در درمان عفونت‌های خطرناک ناشی از این باکتری‌ها به وجود آورده‌اند [۳]. ظهور مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به سال‌های اولیه‌ی کشف مقاومت نسبت به اولین آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین) بر می‌گردد و اولین بتالاکتاماز در باکتری اش‌ریشیا کلی مشاهده شد [۲]. ظهور مقاومت باکتری‌ها اغلب مربوط به پلاسמיד سویه‌های تولیدکننده‌ی پنی‌سیلیناز است که به سرعت در بین ایزوله‌های کلینیکی انتشار می‌یابد [۴]. پلاسמידهای ESBL<sup>۱</sup> اجداد TEM-1، TEM-2 (اولین بار از بیماری به نام تمورینا<sup>۲</sup> جدا شد و TEM نامیده شد) [۵] و SHV-1 (به علت محل فعال متغیر سولفیدریل<sup>۳</sup> به این نام خوانده شده است) [۵] هستند که هم‌اکنون با ایجاد جهش‌های نقطه‌ای در این ژن‌ها انواع زیادی از آن‌ها حاصل شده‌اند [۶]. با توجه به مقاومت روزافزون باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها که به نظر می‌رسد در هر منطقه‌ی گوی خاص خود را دارد، لزوم بررسی‌های جدید در رابطه با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مشهود است. شناسایی الگوی مقاومت بتالاکتامی انتروباکتریاسه و نیز شیوع ایزوله‌های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف از نظر درمان عفونت با داروی مناسب، اهمیت دارد و می‌تواند از شکست درمان جلوگیری نماید.

بتالاکتامازهای نوع PER<sup>۴</sup> اولین بار از سودوموناس ائروجینوزا گزارش شدند و در تعداد کمی از جوامع از انتروباکتریاسه گزارش شده‌اند [۷]. از آن جایی که مطالعه‌ی ای‌مبنی بر بررسی وجود بتالاکتاماز نوع PER در میان انتروباکتریاسه‌های شهر مشهد نیافتیم، هدف این تحقیق تعیین شیوع انتروباکتریاسه‌های ادراری مولد ESBL در دو بیمارستان منتخب شهر مشهد، ردیابی ژن پلاسمدی *bla*<sub>PER</sub> در میان آن‌ها و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها بوده است.

- 1- Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase
- 2- Temoniera
- 3- Sulfhydryl variable active site
- 4 - *Pseudomonas* extended resistance

رضایت آگاهانه، رازداری و غیره) مربوط به تحقیقات بر روی نمونه‌های بالینی بیماران مد نظر قرار گرفت.

#### یافته‌ها

از ۱۰۰ نمونه ادراری جمع‌آوری شده، ۵۷ نمونه مربوط به بیماران سرپایی و ۴۳ نمونه مربوط به بیماران بستری در بیمارستان بودند. گونه‌های باکتریایی شناسایی شده در میان ایزوله‌های انتروباکتریاسه عبارت بودند از: اشریشیا کلی (۶۵٪)، کلبسیلا پنومونیه (۱۹٪)، یرسینیا spp (۷٪)، انتروباکتر کلوآکه<sup>۱</sup> (۵٪)، پروتئوس میرابیلیس (۲٪)، سیتروباکتر دایورسوس<sup>۲</sup> (۱٪)، سالمونلا گالیناروم<sup>۳</sup> (۱٪).

بین باکتری‌های جدا شده در مجموع ۲۷ ایزوله (۲۷٪) تولید کننده بتالاکتاماز و ۷۳ ایزوله (۷۳٪) فاقد بتالاکتاماز بودند که از ۲۷ ایزوله مولد بتالاکتاماز، ۱۲ ایزوله از بیماران بستری و ۱۵ ایزوله از بیماران سرپایی جدا شدند. بدین ترتیب شیوع باکتری‌های مولد بتالاکتاماز در بین باکتری‌های جدا شده از بیماران بستری و سرپایی به ترتیب ۲۷/۹٪ و ۲۶/۳٪ بود. به دنبال انجام واکنش زنجیره پلیمرز هیچکدام از ایزوله‌های انتروباکتریاسه ژن *bla*<sub>PER</sub> را در پلاسמיד نداشتند. جدول ۲، ایزوله‌های ESBL مثبت و منفی را به تفکیک گونه‌ی باکتریایی نشان می‌دهد. همان‌طور که در جدول مشخص است، درصد بیشتری از باکتری‌های کلبسیلای

شد [۹]. سپس آزمایش تأییدی تولید بتالاکتاماز با استفاده از دیسک سفنازیدیم (30 µg) و دیسک حاوی سفنازیدیم و کلاوولانیک اسید (30/10 µg) بر روی محیط مولر هینتون آگار مطابق استانداردهای CLSI انجام شد. بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت اگر قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک حاوی کلاوولانات و سفنازیدیم حداقل ۵ میلی‌متر بیشتر از دیسک حاوی سفنازیدیم به تنهایی بود، آزمایش مثبت در نظر گرفته شد [۹،۱۰].

بررسی وجود ژن پلاسמידی *bla*<sub>PER</sub>: بعد از کشت باکتری‌ها در محیط لوریبرتانی (Biomark هندوستان) حاوی ۱۰۰ میکروگرم آمپی‌سیلین، DNA پلاسמידی با استفاده از کیت mini Kit-5 Prime (آمریکا) استخراج شد. برای تکثیر ژن *bla*<sub>PER</sub> از پرایمر سفارش داده شده در شرکت متابیون آلمان و ترموسایکلر Kyratec (ساخت کشور کره) مطابق با شرایط نشان داده شده در جدول ۱ استفاده شد [۱۱]. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۲ درصد در کنار مارکر استاندارد با باندهای ۱۰۰ جفت بازی الکتروفورز و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند. باندهای DNA با استفاده از اشعه ماورای بنفش دستگاه ترانس لومیناتور مورد ارزیابی قرار گرفت. از سودوموناس دارای ژن *bla*<sub>PER</sub> که از انستیتو پاستور تهران دریافت شد، به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

جدول ۱: پرایمرها و شرایط مورد استفاده برای ردیابی ژن *bla*<sub>PER</sub>

تعداد چرخه‌ها	طول شدن	اتصال	واسرشت	اندازه قطعه (bp)	۳' - توالی - ۵'	پرایمر
۳۰	۶۰ ثانیه در ۷۲°C	۳۰ ثانیه در ۴۸°C	۳۰ ثانیه در ۹۴°C	۹۲۴	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA ATGAATGTCATTATAAAAAGC	PER-F PER-R

جدا شده در مقایسه با اشریشیا کلی دارای بتالاکتاماز وسیع‌الطیف هستند. تمامی گونه‌های یرسینیا و پروتئوس دارای بتالاکتاماز بودند، اما برای تعیین واقعی شیوع

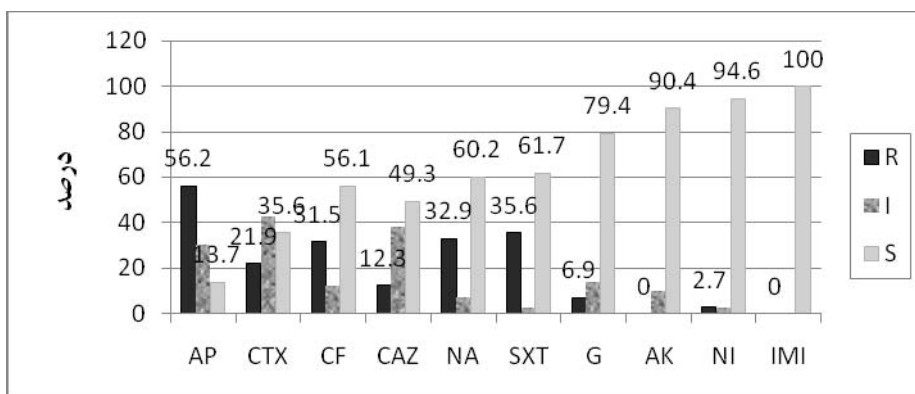
نهایتاً تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS16 انجام شد و برای آنالیز آماری الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها بین ایزوله‌های ESBL<sup>+</sup> و ESBL<sup>-</sup> از آزمون کای دو استفاده شد. نتایج با  $p < 0.05$  به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. همچنین ملاحظات اخلاقی

- 1- *Enterobacter cloacae*
- 2- *Citrobacter diversus*
- 3- *Salmonella gallinarum*

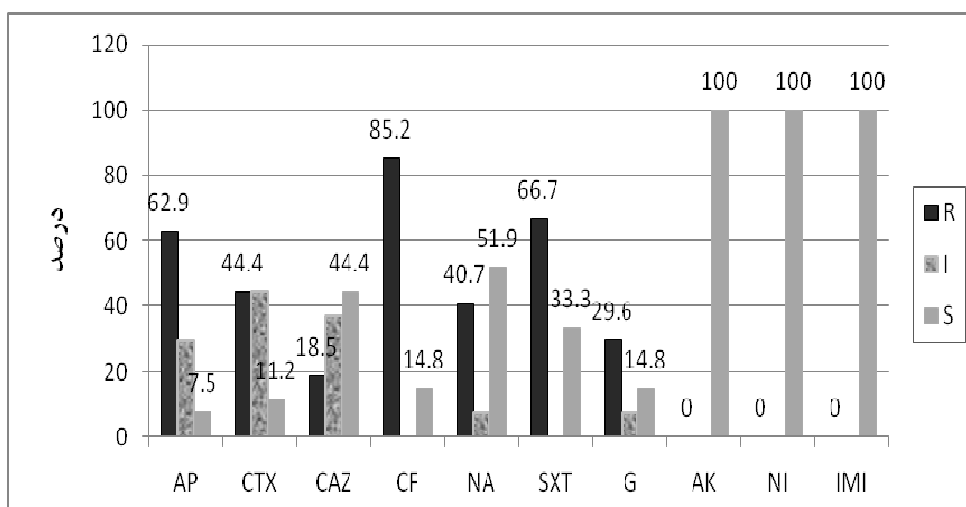
جدول ۲: ایزوله‌های ادراری انتروباکتریاسه  $ESBL^+$  و  $ESBL^-$  بر اساس گونه باکتریایی

تعداد (درصد) باکتری های $ESBL^+$ بین باکتری های همان گونه		گونه باکتریایی
$ESBL^-$	$ESBL^+$	
۵۷ (۹۰/۵)	۸ (۱۲/۳)	اشریشیا کلی
۱۰ (۵۲/۶)	۹ (۴۷/۴)	کلبسیلا پنومونیه
-	۷ (۱۰۰)	یرسینیا spp
-	۲ (۱۰۰)	پروتئوس میرابیلیس
-	۱ (۱۰۰)	سالمونلا گالیناروم
۵ (۱۰۰)	-	انتروباکتر کلوآکه
۱ (۱۰۰)	-	سیتروباکتر دایورسوس

نمودار ۱: توزیع فراوانی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های  $ESBL^+$  (n=27)



نمودار ۲: توزیع فراوانی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های  $ESBL^-$  (n=73)



بودند [۱۳]. در این تحقیق مشابه تحقیق حاضر شیوع باکتری‌های مولد ESBL بین ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه بیشتر از اشریشیا کلی بود. در تحقیق دیگری از مجموع ۲۵۰ ایزوله ادراری در یک بیمارستان در دهلی (شامل ۱۸۸ اشریشیا کلی و ۶۲ باکتری کلبسیلا پنومونیه) تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف به میزان ۵۶٪ در بین باکتری‌های اشریشیا کلی و ۵۲٪ در بین باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه گزارش شده است [۱۴]. شیوع ESBL در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه در فرانسه کمتر از ۱٪ گزارش شده است [۱۵]. درصد تولید ESBL در کلبسیلا پنومونیه در برخی کشورهای آسیایی از جمله کره ۴/۸٪، تایوان ۸/۵٪ و هنگ کنگ ۱۲٪ گزارش شده است [۱۶]. در ژاپن درصد مقاومت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام بر اثر تولید بتالاکتاماز بسیار پائین و در بررسی انجام شده در ۱۹۶ مرکز درمانی واقع در این کشور مشخص گردید که کمتر از ۰/۱٪ باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه آنزیم بتالاکتاماز تولید می‌کنند [۱۷]. در اروپا شیوع تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف در میان ایزوله‌های انتروباکتریاسه از کشوری به کشوری دیگر فرق می‌کند [۱۹، ۱۸]. در یک گزارش [۱۹] از ۱۷ کشور مختلف در سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۲، تولید بتالاکتاماز بین ایزوله‌های اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و گونه‌های انتروباکتر به ترتیب ۵/۴، ۱۸/۲ و ۸/۸ درصد و میزان تولید این آنزیم در میان انواع انتروباکتریاسه ۱۰/۵٪ و بیشترین شیوع در مصر (۳۸/۵٪) و یونان (۲۷/۴٪) و کمترین شیوع در هلند (۲٪) و آلمان (۲/۶٪) ذکر شده است [۱۹]. همانطوری که مشخص است، تولید بتالاکتاماز در بسیاری از کشورهای توسعه یافته کمتر از جامعه مورد مطالعه است. در مطالعه‌ی حاضر، مقاومت به سفالوتین، سفوتاکسیم و سفنازیدیم در میان کل ایزوله‌های انتروباکتریاسه به ترتیب ۴۶، ۲۸ و ۱۴ درصد و در میان سویه‌های مولد بتالاکتاماز ۸۵/۲، ۴۴/۴ و ۱۸/۵ درصد به دست آمد. بدین ترتیب مقاومت به سفالوتین بیشتر از بقیه آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام بود. تمامی ایزوله‌ها در تحقیق حاضر حساس به ایمی‌پنم بودند. کیفر<sup>۲</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۵

بتالاکتاماز بین این باکتری‌ها نیاز به جداسازی تعداد بیشتری از آن هاست.

بر اساس نتایج به دست آمده باکتری‌های مولد بتالاکتاماز به طور معنی‌داری مقاومت بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام نشان دادند ( $p < 0/05$ ). در میان آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مورد آزمایش بیشترین مقاومت نسبت به سفالوتین (۸۵/۲٪) و کمترین مقاومت نسبت به سفنازیدیم (۱۸/۵٪) بود.

نمودار ۱ و ۲ نتایج آزمایشات حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های  $ESBL^+$  و  $ESBL^-$  را نشان می‌دهد. مقاومت به آنتی بیوتیک‌های غیر بتالاکتام در میان باکتری‌های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف از صفر (ایمی پنم، نیتروفوران‌توبین و آمیکاسین) تا ۴۴ درصد (کوتریموکسازول) بود. لازم به ذکر است که تمامی باکتری‌های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک ایمی پنم حساس بود.

در بین آنتی بیوتیک‌های غیر بتالاکتام مورد آزمایش، درصد بیشتری از باکتری‌های مولد بتالاکتاماز مقاوم به کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید و جنتامیسین بودند که اختلاف برای کوتریموکسازول و جنتامیسین معنی‌دار بود ( $p < 0/05$ ).

#### بحث

در این مطالعه از ۱۰۰ نمونه‌ی ادرار مورد بررسی ۲۷ ایزوله انتروباکتریاسه مولد ESBL جدا شد و ۹/۵٪ از باکتری‌های اشریشیا کلی و ۴۷/۴٪ از کلبسیلا پنومونیه‌های جدا شده دارای آنزیم بتالاکتاماز بودند. شیوع باکتری‌های مولد بتالاکتاماز بین باکتری‌های کلبسیلا جدا شده بیشتر از اشریشیا کلی بود. در گزارش منتشر شده در سال ۱۳۸۹ توسط فیض‌آبادی و همکاران ۶۹/۷٪ جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه از بیمارستان لبافی‌نژاد تهران دارای ESBL بودند که ۶۱/۷٪ آن‌ها مقاومت نسبت به سفنازیدیم را نشان دادند [۱۲]. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۵، داتری<sup>۱</sup> و همکاران در هند انجام دادند، از میان ۱۸۷ ایزوله‌ی اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه‌ی مورد بررسی، ۵۳ (۲۹/۱٪) ایزوله مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف

در اغلب مطالعات به ویژه کشورهای توسعه یافته، درصد شیوع ESBL و نیز درصد مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها کمتر از ایران است و مقایسه‌ی آمار به‌دست آمده با کشورهای مختلف لزوم توجه و نظارت بر عدم گسترش مقاومت دارویی در جامعه مورد نظر را خاطر نشان می‌سازد. غربالگری باکتری‌های مولد ESBL و درمان مناسب بیماران با داروهایی مثل ایمپنم می‌تواند از اهمیت بسیار زیادی برخوردار باشد و آزمایش معمول حساسیت آنتی‌بیوتیکی در بیمارستان‌ها روش مناسبی برای تشخیص این نوع مقاومت نیست.

از مهم‌ترین محدودیت‌های تحقیق محدودیت زمانی در انجام تحقیق و نیز مراجعه بعضی از افراد برای معاینه عمومی و تعیین سلامتی به آزمایشگاه بیمارستان‌ها بود که به عنوان بیمار سرپایی پذیرش می‌شدند.

#### نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان دهنده‌ی بالا بودن شیوع باکتری‌های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در بین بیماران جامعه‌ی مورد بررسی بود که درصد شیوع آن در بین بیماران بستری نسبت به بیماران سرپایی کمی بیشتر بود. هیچکدام از باکتری‌های جدا شده ژن پلاسمیدی *bla<sub>PER</sub>* را نداشتند و تولید بتالاکتاماز می‌تواند مربوط به سایر تیپ‌های بتالاکتاماز باشد.

#### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای مهرداد هاشمی، دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی که در انجام آنتی‌بیوگرام و آزمایشات مولکولی همکاری نمودند، صمیمانه قدردانی می‌شود.

در برزیل شیوع ESBL و مقاومت به سفوتاکسیم و سفنازیدیم را در میان کلبسیلا پنومونیه و اشریشیا کلی به ترتیب ۵۱/۹٪ و ۱۴/۶٪ گزارش کردند که تمامی باکتری‌های اشریشیا کلی و ۹۹/۲٪ ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه (۰/۸٪ بینابینی) حساس به ایمپنم بودند [۲۰]. در ویتنام در سال ۲۰۰۱ میلادی، در بین ۱۳۰۹ ایزوله بیمارستانی اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و پروتئوس میرابیلیس، مقاومت به سفوتاکسیم، سفوپرازون و سفنازیدیم به ترتیب ۳۰٪، ۱۵/۹٪ و ۲۶٪ گزارش شده است و ۵/۶٪ ایزوله‌ها مقاوم به ایمپنم بودند [۲۱].

طبق نتایج بدست آمده شیوع باکتری‌های مولد بتالاکتاماز در بین باکتری‌های جدا شده از بیماران بستری و سرپایی به ترتیب ۲۷/۹٪ و ۲۶/۳٪ بود. شیوع بین افراد بستری کمی بیشتر از افراد سرپایی بود، ولی اختلاف چندان بارز نبود. میزان شیوع باکتری‌های مولد ESBL بسته به ناحیه (حتی از بیمارستانی به بیمارستان دیگر) و زمان ممکن است متفاوت باشد [۵]. بخصوص هنگام وقوع همه‌گیری، شیوع در بین بیماران بستری در بیمارستان می‌تواند بطور ناگهانی افزایش یابد و از بیماران سرپایی به میزان قابل توجهی بیشتر باشد که شاید در زمان انجام تحقیق در مراکز مورد بررسی چنین رخدادی را نداشته ایم.

در تحقیق حاضر هیچ یک از ایزوله‌های مولد بتالاکتاماز طیف وسیع حامل ژن *bla<sub>PER</sub>* در پلاسمید نبودند. در یک تحقیق در آرژانتین (سال ۲۰۰۳ میلادی) از ۳۹ باکتری مولد ESBL، ۹ ایزوله (۲۳/۰۸٪) حامل ژن *bla<sub>PER-2</sub>* بودند که این ژن در باکتری‌های انتروباکتر کلوآکه، انتروباکتر ائروژنز و کلبسیلا پنومونیه یافت شد [۲۲]. شیوع ژن *bla<sub>PER</sub>* در تحقیق شاهچراغی و همکاران (در سال ۲۰۱۰) در باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه در تهران ۷/۵٪ گزارش شده است [۲۳]. هیچکدام از باکتری‌های اشریشیا کلی جدا شده از شش بیمارستان تهران در سال ۱۳۸۵ ژن *bla<sub>PER</sub>* را نداشتند [۲۴] و در این تحقیق ۴۸/۰۸٪ ایزوله‌های اشریشیا کلی بتالاکتاماز طیف وسیع تولید می‌کردند که ۵۹/۲٪ به سفنازیدیم، ۶۵/۶٪ به سفوتاکسیم و ۴۰/۷۴٪ به جنتامایسین مقاوم بودند [۲۴].

## References

1. Tenover FC, Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria, *Am J Med* 2006; 119: S3–S10.
2. Davies J, Davies D, Origins and evolution of antibiotic resistance, *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; 74: 417-33.
3. Yagi T, Wachino JI, Kurokawa H, “et al”, Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C  $\beta$ -Lactamase-Producing *K. pneumoniae* and *E. Coli*, *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2551-58.
4. Betina, V, The chemistry and biology of antibiotics, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1983: 98-112.
5. Bradford PA, Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat, *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-51.
6. Paterson DL, Ko WC, Gottberg VA, “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.
7. Shahcheraghi F, Nikbin V, Shuraj F, Molecular detection of PER, TEM, SHV and VEB in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from specimens wounds in two hospitals from Tehran by PCR (in Persian), *Iranian J Basic Med Sci* 2007; 1: 21-7[Persian]
8. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI document M100-S20.
9. Umadevi S, Kandhakumari G, Joseph NM, “et al”, Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of ESBL producing gram negative bacilli, *J Clin Diagn Res* 2011; 5: 236-9.
10. Jorgensen JH, McElmeel ML, Fulcher LC, Zimmer BL, Detection of CTX-M-Type extended-spectrum beta-lactamase (ESBLs) by testing with MicroScan overnight and ESBL confirmation panels, *J Clin Microbiol* 2010; 48: 120–3.
11. Shahcheraghi F, Nasiri S, Noveiri H, The survey of genes encoding  $\beta$ -lactamases, in *E. coli* resistant to  $\beta$ -lactam antibiotics, *Iranian J Basic Med Sci* 2010; 13: 230-7[Persian]
12. Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, “et al”, Distribution of *bla*(TEM), *bla*(SHV), *bla*(CTX-M) genes among clinical isolates of *K. pneumoniae* at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran, *Microb Drug Resist* 2010; 16: 49-53[Persian]
13. Duttaroy B, Mehta S, Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in clinical isolates of *K. pneumoniae* and *E. coli*, *Indian J Pathol Microbiol* 2005; 48: 45-8.
14. Malhotra VL, Khandpur N, Dass A, Mehta G, Prevalence of extended spectrum beta- lactamases producing clinical isolates from patients of urinary tract infection in a tertiary care hospital in Dehli, *J Commun Dis* 2008; 40: 269-72.
15. Coque TM, Baquero F, Caton R, Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe, *Eurosurveillance* 2008; 13: 47.
16. Ling TK, Xiong J, Yu Y, Lee CC, Ye H, Hawkey PM, Multicenter antimicrobial susceptibility survey of gram-negative bacteria isolated from patients with community-acquired infections in the People's Republic of China, *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 374-8.
17. Yagi T, Krukawa H, Shibata N, Shibayama K, Arkawa Y, A preliminary survey of extended spectrum beta-lactamases in clinical isolated of *K. pneumoniae* and *E. coli* in Japan, *FEMS Microbiol* 2000; 184: 53-6.
18. AL- Jasser AM, Extended spectrum beta-lactamases (ESBLs): a global problem, *Kuwait Med J* 2006; 38: 171-85.
19. Bouchillon SK, Johnson BM, Hoban DJ, “et al”, Determining incidence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 Centres from 17 countries: the PEARLS study 2001 -2002, *INT J antimicrob Agents* 2004; 24:119-24.
20. Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C, “et al”, Antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003, *Braz J Infect Dis* 2005; 9: 216-24.
21. Cao V, Lambert T, Nhu DQ, “et al”, Distribution of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam, *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3739-43.
22. Quinteros M, Radice M, Gardella N, “et al”, Microbiology study group extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals, *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2864-7.
23. Nasehi L, Shahcheraghi F, Nikbin V, Nematzadeh S, PER, CTX-M, TEM and SHV beta-lactamases in clinical isolates of *K. pneumoniae* isolated from Tehran, Iran, *Iranian J Basic Med Sci* 2010; 13: 111-18[Persian]

## Original Article

## Phenotypic and molecular detection of PER extended spectrum $\beta$ -lactamases in urinary Enterobacteriaceae isolates in Mashhad

Naderifar S<sup>1</sup>, Nakhaei Moghaddam M<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup>M.Sc of Microbiology, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor of Microbiology, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

**\*Corresponding Author:**  
Department of Biology, Mashhad  
Branch, Islamic Azad University,  
Mashhad, Iran  
E. mail: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

### Abstract

**Background & Objectives:** Production of  $\beta$ -lactamases especially extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) by bacteria is one of the emerging health problems in the world. The prevalence of these enzymes varies greatly within different geographical areas and is changing over time. The purpose of this study was to determine the prevalence of ESBL producing bacteria among the urinary Enterobacteriaceae isolates and detection of *bla*<sub>PER</sub> gene from two selected hospitals in Mashhad.

**Material & Methods:** In this cross-sectional study, 100 Enterobacteriaceae isolates were collected from urine samples of inpatient and outpatient referred to 17-Shahrivar and Qaem hospitals from November 2010 to January 2011. Bacteria were identified by differential biochemical tests. Isolated bacteria were evaluated for antibiotic susceptibility. Double-disk approximation and phenotypic confirmation tests of ESBL production were performed according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) guidelines. Molecular detection of *bla*<sub>PER</sub> gene was carried out by polymerase chain reaction using specific primers.

**Results:** Out of 100 bacterial isolates, 27 (27%) were ESBL producers without plasmid mediated *bla*<sub>PER</sub> gene. Resistance to ampicillin, cefotaxime, ceftazidime and cephalothin among ESBL producing isolates was higher than non-producers ( $p < 0.05$ ). ESBL producers in comparison with non-producers were resistant to gentamicin, co-trimoxazole, and nitrofurantoin and there was significant difference for resistance to gentamicin and co-trimoxazole ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Results shows that ESBL production among Enterobacteriaceae isolates in the studied community is relatively high; *bla*<sub>PER</sub> gene was not found among isolated strain; therefore, production of  $\beta$ -lactamase is related to other types of ESBLs among isolated Enterobacteriaceae.

**Key words:** Enterobacteriaceae,  $\beta$ -lactam, Extended spectrum  $\beta$ -lactamase type PER

Submitted: 2011 Oct 26

Revised: 2012 Jan 29

Accepted: 2012 Apr 5