

## مطالعه و بررسی ژن مقاومت بتالاکتاماز TEM در اشریشیاکلی جدا شده از نمونه های

### اداراری از بیماران مراجعه کننده به درمانگاه رباط کریم

پروین موسوی<sup>۱</sup>، سعید ذاکر بستان آباد\*<sup>۱</sup>، رضا میرنژاد<sup>۲</sup>

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، پرند، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...

## چکیده

**سابقه و هدف:** به تازگی باکتری های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) که توانایی هیدرولیز اکثر آنتی بیوتیک های بتالاکتام را دارند، در سراسر جهان شیوع زیادی یافته اند و به عنوان یک مشکل اساسی در درمان عفونت های باکتریایی مطرح هستند. **مواد و روش ها:** در مطالعه حاضر، ۱۰۰ باکتری *E. coli* از نمونه های بالینی جدا شد و با توجه به استانداردهای CLSI و با استفاده از روش Combined Disk، باکتری های تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز شناسایی و سپس فراوانی ژن TEM با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته ها:** از ۱۰۰ نمونه *E. coli* جدا شده، ۶۰، نمونه مولد آنزیم بتالاکتاماز بودند و از این تعداد، ۴۸ نمونه (۸۰ درصد) دارای ژن TEM بودند.

**نتیجه گیری:** این یافته ها اهمیت ژن TEM را در هیدرولیز داروهای بتالاکتام در میان سویه های *E. coli* در شهرستان رباط کریم نشان می دهد. شناسایی این ژن و تعیین پراکندگی آن می تواند روند تشخیص و درمان بیماران را سرعت بخشد.

**واژه های کلیدی:** ESBL، *E. coli*، TEM

## مقدمه

باشد باعث مهار ترانس پپتیدازها و تخریب پپتید و گلیکان و در نتیجه دیواره سلول و به دنبال آن باکتری از بین می رود (۳۵). مکانیسم اصلی مقاومت باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک های بتالاکتام تولید بتالاکتاماز می باشد این آنزیم ها آنتی بیوتیک های بتالاکتام را قبل از این که به PBPs در غشای سیتوپلاسمی برسند هیدرولیز و غیر فعال می کنند. ژن بتالاکتاماز TEM معمولی ترین فرم بتالاکتاماز در باکتری های خانواده انتروباکتریاسه می باشد که عامل بیش از ۹۰ درصد مقاومت سویه های *E. coli* به آمپی سیلین قلمداد می گردد (۱۲). این آنزیم اولین آنزیم بتالاکتامازی بود که از *E. coli* جدا شده از کشت خون یک بیمار یونانی به نام Temoniera یافت شد و به همین دلیل به این نام، نامگذاری شد. پس از این که اولین آنزیم TEM در سال ۱۹۶۰ گزارش شد، تاکنون آنزیم های بتالاکتاماز مختلفی شناسایی شده، که اکثر این آنزیم های بتالاکتاماز دارای فعالیت بتالاکتامازی وسیع الطیف می باشند (۹).

اشریشیاکلی (*E. coli*) یکی از شایع ترین عامل باکتری های است که از عفونت های انسانی جدا شده و باعث عفونت دستگاه ادراری، گوارشی و مننژیت در نوزادان می شود. این باکتری یکی از پاتوژن های فرصت طلب گرم منفی بوده که به علت اکتساب پلاسمیدهایی کدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL)، به آنتی بیوتیک های بتالاکتاماز از جمله سفالوسپورین های وسیع الطیف مقاوم شده اند از این رو درمان عفونت های ناشی از این باکتری با مشکل روبرو شده است (۴). آنتی بیوتیک های بتالاکتام شامل پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها و منو باکتام ها و غیره می باشند که با اتصال به پروتئین باند شونده پنی سیلین (PBPs) که در دیواره سلولی باکتری می

## نویسنده مسئول:

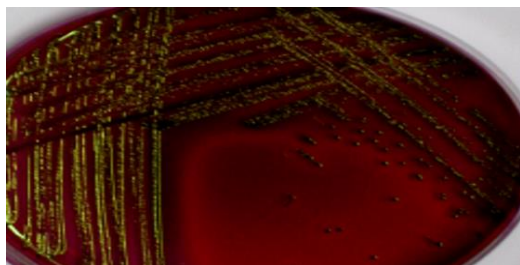
گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، پرند، ایران  
پست الکترونیکی: saeedzaker20@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۶

نمونه‌ها روی محیط کشت انتخابی EMB agar کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $35 \pm 0.5$  درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شدند (۸).

حضور کلنی‌های دارای جلای سبز فلزی، بیان‌گر حضور *E. coli* می‌باشد. (شکل ۱)



شکل ۱: ایجاد جلای سبز رنگ توسط باکتری *E. coli*

بعد از مشاهده جلای فلزی در محیط کشت EMB، کلنی‌های باکتریایی، توسط تست‌های بیوشیمیایی نظیر TSI، سیمون سیترات، اوره آز، SIM، MR/VP مورد بررسی قرار گرفتند.

جهت تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی از روش دیسک دیفیوژن آگار (Kirby-Bauer disk diffusion method) استفاده شد. بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌ها نسبت به ۹ آنتی-بیوتیک در گروه‌های زیر صورت گرفت:

بتالاکتام‌ها: پنی‌سیلین‌ها شامل: آمپی‌سیلین (AM10 $\mu$ g)، سفالوسپورین‌ها شامل: سفازولین (CZ 30 $\mu$ g)، آمینوگلیکوزیدها: جنتامیسین (GM10 $\mu$ g) و آمیکاسین (AN30 $\mu$ g).

کینولون‌ها: نالیدیکسیک اسید (NA 30).

سولفانامیدها: کوتریموکسازول

محیط مورد استفاده در روش دیسکی، مولر هینتون است که باید pH آن بین ۷/۲-۷/۴ تنظیم شده باشد. در پلیت به قطر ۱۰۰ میلی‌متر حدود ۲۵-۳۰ میلی‌لیتر محیط مولر هینتون ریخته شد و قطر مورد نظر حاصل گردید. از محیط کشت برات کدورت نیم مک فارلند تهیه شده و به محیط کشت مولر هینتون انتقال داده شد و به‌طور کامل به‌وسیله سواب، محیط کشت به صورت متراکم کشت گردید به‌طوری‌که هیچ محلی در محیط از قلم نیفتد. بعد از کشت، دیسک‌های آنتی‌بیوگرام را که نیم ساعت قبل از تست بیرون یخچال قرار داده شده‌اند، انتخاب و بر روی محیط کشت انتقال داده شد. باید در نظر داشت که نحوه قرار دادن دیسک‌ها در محیط کشت مولر هینتون، به‌صورت دایره‌ای است و فاصله این دیسک‌ها از هم دیگر حدود ۱۲ میلی‌متر باشد و باید از دیواره پلیت هم

تاکنون بیش از ۱۳۰ نوع آنزیم *TEM* شناسایی شده که از نظر جایگزینی اسیدهای آمینه مختلف در جایگاه فعال آنزیم بتالاکتاماز با هم تفاوت دارند. تفاوت فوق باعث به‌وجود آمدن انواع مختلفی از بتالاکتامازهای نوع *TEM* گردیده است (۱۳). درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌هایی از باکتری‌ها، که قادر به تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف کدشونده توسط پلاسمید باشند، بسیار مشکل می‌باشد. این مسئله یکی از بحران‌های موجود در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری-هاست. انتقال و انتشار سریع ارگانسیم‌هایی که قادر به تولید آنزیم‌های مذکورند، باعث بالا رفتن میزان عفونت‌های ادراری مربوط در سراسر دنیا شده است. لذا بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تحقیق پیرامون ژن بتالاکتامازی *TEM* در نمونه-های ادراری *E. coli* از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۴۷). در پاتوژن‌های گرم منفی، تولید بتالاکتاماز مهم‌ترین علت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام تلقی می‌شوند (۹). فراوانی ژن *TEM* در بین سویه‌های *ESBL*، از ۴/۷٪ (در ایالت برکلی آمریکا سال ۱۹۹۷) تا ۸۴/۶٪ (هنگ‌کنگ سال ۲۰۰۵) گزارش شده است. با توجه به شیوع متفاوت این آنزیم-ها در نواحی مختلف دنیا درمان عفونت‌های ناشی از این میکروارگانسیم‌ها نیازمند تجویز آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف می‌باشد. این امر به‌ویژه در بیماران با ضعف سیستم ایمنی و هم‌چنین در بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه با مشکلات زیادی همراه است. به‌همین دلیل آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی، نقش مهمی در شناسایی و گزارش باکتری‌های مولد این نوع بتالاکتامازها و سهولت در درمان مؤثر بیماران ایفا می‌کنند. همان‌طور که گفته شد از مهم‌ترین بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف پلاسمیدی در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه و به‌خصوص در *E. coli* محصول ژن *TEM* می‌باشد که نقش مهمی در مقاومت سویه‌های *E. coli* به داروهای بتالاکتام دارد و با توجه به نقش این باکتری، در عفونت‌های ادراری، بر آن شدیم تا نقش این ژن باکتریایی را در بروز مقاومت‌های دارویی در ایزوله‌های باکتری فوق در رباط‌کریم مورد بررسی قرار دهیم.

## مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر نمونه‌ها به مدت پنج

ماه از بین کسانی که با داشتن علائم عفونت ادراری مانند سوزش و تکرر ادرار به درمانگاه رباط‌کریم مراجعه کردند و به تشخیص پزشک معالج برای بررسی به آزمایشگاه ارجاع داده شدند، جمع آوری شد.

درجه داخل ترموبلاک قرار گرفت. دوباره به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید و مایع رویی به تیوپ جدید منتقل شد. مایع رویی حاوی DNA استخراج شده دردمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۳۵).

**واکنش PCR:** بعد از استخراج DNA از یک جفت پرایمر اختصاصی برای تعیین حضور ژن بتالاکتاماز TEM با توالی زیر استفاده شد:

جدول ۱: توالی پرایمر اختصاصی

target Gene	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Size (bp)
TEM	TTTGTGTCGCCCTATTCC	ATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGG	۳۱۰

مواد مورد نیاز و مقدار آن‌ها برای انجام واکنش PCR به شرح زیر می‌باشد:

DNA الگو: ۰/۵ میکرولیتر،

مستر میکس: ۱۲/۵ میکرولیتر

پرایمر فوروارد و ریورس (۱۰ پیکومول بر میکرولیتر): ۱

میکرولیتر،

آب دو بار تقطیر: ۱۱/۵ میکرولیتر

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه

ترموسایکلر به شرح زیر انجام شد:

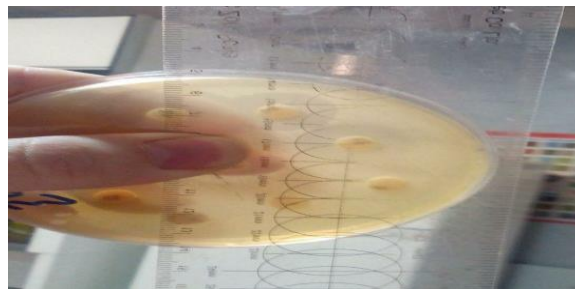
مراحل PCR	دما برحسب درجه	زمان	تعداد چرخه
واسرشت اولیه	۹۴°C	۱۰ دقیقه	۱
واسرشت شدن	۹۴°C	۱ دقیقه	۳۰
اتصال	۵۵/۵°C	۱ دقیقه	
گسترش	۷۲°C	۴۵ ثانیه	
گسترش نهایی	۷۲°C	۵ دقیقه	۱

### الکتروفورز

بعد از اتمام PCR و تکثیر ژن، برای بررسی محصول‌های PCR از الکتروفورز ژل آگاز یک درصد استفاده شد و به منظور رنگ-آمیزی محصول‌های PCR از DNA safe stain استفاده شده است. مقایسه اندازه محصول‌های PCR با استفاده از DNA مارکر ۱۰۰bp صورت گرفته است. حجم محصول‌های PCR که به داخل چاهک‌های آگاز ریخته شده ۵ میکرولیتر بوده است. حضور باند در منطقه ۳۹۰bp مارکر وزن مولکولی نشانه تکثیر شدن قطعه مورد نظر و در نتیجه وجود ژن مقاومت TEM در سویه باکتری مورد نظر می‌باشد.

**یافته‌ها:** در مطالعه حاضر به مدت پنج ماه از بین ۲۵۳ بیمار مراجعه کننده به درمانگاه رباط کریم، نمونه ادرار ۱۰۰ نفر پس-

فاصله داشته باشند. بعد از قرار دادن دیسک‌ها، در پلیت را بسته و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، انکوبه گردیدند. بعد از دوره انکوباسیون پلیت زیر چراغ بررسی می‌گردد. آن‌گاه می‌بایست قطر هاله عدم رشد را با خطکش اندازه‌گیری شود (شکل شماره ۲) و با استفاده از جدول استاندارد CLSI تست آنتی‌بیوگرام برای هر یک از آنتی-بیوتیک‌ها، به صورت حساس (Susceptible)، مقاوم (Resistant) و یا نیمه حساس (Intermediate) گزارش نمود.



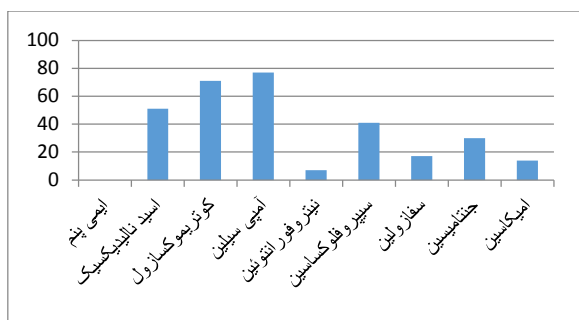
شکل ۲: هاله عدم رشد

بدین صورت که اگر در اطراف برخی از دیسک‌ها هاله روشن وجود داشت نشان دهنده حساس بودن باکتری به آن دیسک است و باید حساس گزارش شود، اگر در اطراف بعضی از دیسک‌ها هیچ گونه هاله‌ای نبود در این حالت باکتری را باید نسبت به آن دیسک مقاوم گزارش کرد و اگر هیچ‌یک از حالات فوق مشاهده نشد، در این صورت نیمه حساس گزارش می‌شود (۲).

جهت بررسی فنوتیپی سویه‌های مولد *ESBLs*، از روش دیسک ترکیبی استفاده شد. سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام با استفاده از دیسک‌های ترکیبی سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید و سفوتاکسیم به تنهایی مورد مطالعه قرار گرفت. در محیط مولر هینتون آگار براساس روش دیسک دیفیوژن غربال‌گری صورت گرفت. پس از انکوباسیون به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دمای ۳۵°C تولید *ESBLs* از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵ میلی‌متر یا بیش‌تر در اطراف دیسک ترکیبی سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید در مقایسه با دیسک سفوتاکسیم مشخص گردید (۱۸).

### استخراج DNA (روش جوشاندن)

باکتری در لوله‌های حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت LB به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس نمونه به مدت ۵ دقیقه با دور ۷۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. بعد از خارج نمودن مایع رویی، رسوب حاصله را با ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر آمپولی مخلوط کرده و نمونه‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰



نمودار ۲: نتایج سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک

از ۱۰۰ ایزوله *E. coli* تعداد ۶۰ ایزوله توانایی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز را داشتند. یعنی ۶۰ درصد نمونه‌ها *ESBL* مثبت بودند.

### نتایج PCR:

فرایند PCR بر روی DNA های استخراج شده به منظور تکثیر قطعاتی به طول ۳۹۰bp با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی برای ژن *TEM* انجام شد. لازم به ذکر است که با استفاده از برنامه BLAST این اطمینان حاصل گشت که این پرایمرها می‌توانند طیف وسیعی از این ژن را پوشش دهند. همچنین به منظور اطمینان از فقدان آلودگی در انجام واکنش PCR از کنترل منفی:

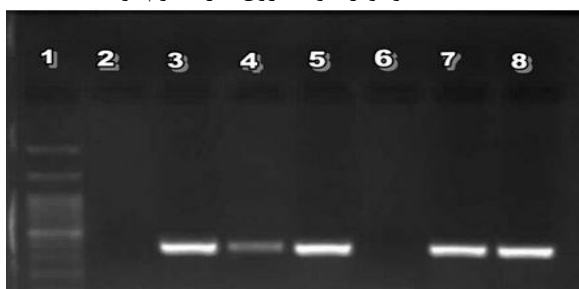
*Escherichia coli* ATCC (35218)

و کنترل مثبت:

*Klebsiella pneumoniae* ATCC( 700603)

به همراه نمونه‌های مورد بررسی در PCR استفاده شد.

در طی روش PCR بر روی ۶۰ ایزوله *E. coli* که تولید آنزیم بتالاکتاماز کردند، مشخص گردید که از این میان ۴۸ ایزوله (۸۰ درصد) دارای ژن *TEM* می‌باشند (شکل شماره ۳). ژن *TEM* در ایزوله‌هایی مشاهده شد که نسبت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین مقاوم بودند. همچنین این ایزوله‌ها، علاوه بر آنتی بیوتیک آمپی سیلین به آنتی بیوتیک‌های سفپروفلوکساسین، اسید نالیدیکسیک و کوتریموکسازول نیز مقاوم بودند.



شکل ۳: ژل آگاروز محصول PCR مربوط به ژن *TEM*

شماره ۱: مارکر وزن مولکولی (1 kb)، شماره ۲: کنترل منفی، شماره ۳: کنترل مثبت، شماره ۴، ۵، ۷، ۸: واجد ژن *TEM*، شماره ۶: فاقد ژن *TEM*

از کشت بر روی محیط EMB، کلنی مثبت بودند که پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی به عنوان باکتری *E. coli* تأیید شدند.

نتایج حاصل از آنتی بیوگرام، ایزوله‌های اشریشیاکلی، نسبت به آنتی بیوتیک‌های مصرفی در جدول ۲ مشخص گردیدند

جدول ۲: نتایج آنتی بیوگرام ایزوله‌های *E. coli* جمع آوری شده

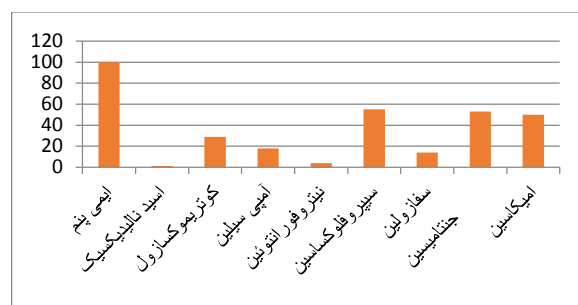
نوع آنتی بیوتیک	حساس	نیمه حساس	مقاوم
ایمی پنم	۱۰۰	۰	۰
اسید نالیدیکسیک	۱	۴۸	۵۱
کوتریموکسازول	۲۹	۰	۷۱
آمیکاسین	۵۰	۳۸	۱۴
آمپی سیلین	۱۸	۵	۷۷
نیتروفورانتوئین	۴	۸۹	۷
سفازولین	۱۴	۶۹	۱۷
سیپروفلوکساسین	۵۵	۴	۴۱
جنتامیسین	۵۳	۱۷	۳۰

۷۷ درصد از ایزوله‌های اشریشیاکلی، به آنتی بیوتیک آمپی-سیلین مقاوم بودند.

تمام ایزوله‌های *E. coli* جداسازی شده حداقل به یک آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند و ۵۸ درصد از ایزوله‌ها دارای مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی بودند (مقاومت به ۲ تا ۷ آنتی بیوتیک).

بررسی نتایج حاصل از آنتی بیوگرام ایزوله‌ها، نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج مصرفی در مراکز کلینیکی، نشان می‌دهد که ایزوله‌های اشریشیاکلی، علاوه بر آنتی بیوتیک آمپی سیلین به-طور هم‌زمان، مقاومت بالایی را نسبت به آنتی بیوتیک‌های کوتریموکسازول و اسید نالیدیکسیک و سفپروفلوکساسین نشان دادند و همچنین نشان می‌دهد همه ایزوله‌ها به ایمی پنم حساس می‌باشند.

در نمودارهای شماره ۱ و ۲ نتایج تست آنتی بیوگرام جداگانه ترسیم شده است.



نمودار ۱: نتایج سویه‌های حساس به آنتی بیوتیک

## بحث:

شناسایی *ESBL* ها از اروپا آغاز گردید، زیرا به ظاهر از آنتی-بیوتیک‌های بتالاکتام وسیع‌الطیف به میزان زیادی جهت درمان بیماران استفاده می‌گردیده، اما طولی نکشید که بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف در آمریکا و آسیا نیز شناسایی گردیدند. میزان شیوع *ESBL* در میان باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه از کشوری به کشور دیگر و از بیمارستانی به بیمارستان دیگر متفاوت است (۱۸).

هدف از انجام این مطالعه، شناسایی و بررسی فراوانی ژن *TEM* در ایزوله‌های *E. coli* جدا شده از ادرار بود. بدین منظور ۱۰۰ ایزوله *E. coli* جداسازی شدند و از نظر حضور ژن *TEM* و رابطه این ژن با مقاومت‌های چندگانه آنتی‌بیوتیکی مورد مطالعه قرار گرفتند. از ۱۰۰ ایزوله *E. coli* مورد مطالعه و ۵۸ درصد از ایزوله‌ها، دارای مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی بودند. هم‌چنین حدود ۱۰۰ درصد از ایزوله‌های مورد مطالعه دارای مقاومت حداقل به یک آنتی‌بیوتیک بودند. در طی چند دهه گذشته سویه‌های مختلف *E. coli* به‌طور فزاینده‌ای نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاوم شده‌اند و ظهور مقاومت‌های چندگانه آنتی‌بیوتیکی در *E. coli* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر، به یک مسئله بهداشتی نگران کننده برای مسئولین بهداشتی در کشورهای در حال توسعه مبدل گردیده است. افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است به علت استفاده بدون کنترل از مواد ضد میکروبی در محصول‌های غذایی حیوانات و یا استفاده غیر اصولی از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌ها باشد (۳۷).

در مطالعه حاضر، تست آنتی‌بیوگرام، برای آنتی‌بیوتیک‌های رایج مصرفی که برای درمان عفونت‌های مجاری ادراری در مراکز کلینیکی استفاده می‌شوند، انجام شد. نتایج این بررسی نشان داد که از ۱۰۰ ایزوله *E. coli* که مورد مطالعه قرار گرفتند، ۶۰ ایزوله *ESBL* مثبت بودند و ژن *TEM*، با استفاده از روش PCR در ۴۸ ایزوله (۸۰٪) از بین ایزوله‌های مقاوم، مشاهده گردید.

کاتولی و همکارانش در سال ۲۰۰۴، ۸۷ ایزوله *E. coli* را در طی یک سال مطالعه و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی از بیماران مبتلا به التهاب مثانه و عفونت مجاری ادراری از مراکز کلینیکی شهر شیراز، جمع‌آوری و خالص‌سازی کردند که فراوانی (۵۵٪) آن کم‌تر از فراوانی به‌دست آمده از مطالعه حاضر بود (۳۰).

در سال ۲۰۰۱ لی و همکارانش در طی دو سال مطالعه که بر روی بیماران مبتلا به عفونت ادراری پرداختند و ۱۲۲ ایزوله *E. coli* را توسط تست‌های بیوشیمیایی جمع‌آوری کردند (۳۴). از نظر فراوانی با مطالعه حاضر مطابقت نداشت. هم‌چنین، مهرگان و همکارانش در سال ۲۰۰۸، در کشور ایران در طی یک سال مطالعه بر روی بیماران بستری در بیمارستان میلاد تهران، ۲۰۱ ایزوله *E. coli* را جمع‌آوری کردند که فراوانی آن بیش‌تر از مطالعه حاضر بود (۵).

تفاوت موجود در فراوانی ایزوله‌های *E. coli* را می‌توان به تفاوت در مدت زمان مطالعه و تفاوت از نظر منطقه جغرافیایی دانست.

در مطالعه حاضر، حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای تمامی ایزوله‌های *E. coli* نسبت به ۹ نوع آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در مراکز کلینیکی، برای درمان بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری، مورد بررسی قرار گرفت. درصد مقاومت نسبت به آنتی-بیوتیک‌های ایمپنم، آمیکاسین، اسید نالیدیکسیک، کوتریموکسازول، آمپی‌سیلین، نیتروفوران‌توئین، جنتامیسین، سفازولین، سیپروفلوکساسین، به ترتیب ۰، ۱۴، ۵۱، ۷۱، ۷۷، ۷، ۳۰، ۱۷، ۴۱ گزارش گردید.

در مطالعه حاضر همه ایزوله‌های *E. coli* نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمپنم حساس بودند ولی بیش‌ترین درصد مقاومت (۷۷٪) در بین ایزوله‌های *E. coli* مربوط آمپی‌سیلین بود.

آل آگامی در سال ۲۰۱۰ در کشور عربستان، درصد شیوع مقاومت را برای آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین، کوتریموکسازول، جنتامیسین، آمیکاسین، سفازولین، نیتروفوران‌توئین، سیپروفلوکساسین، به ترتیب ۸۳، ۹۰، ۶۲، ۴۲، ۲۹، ۲۱، ۵، ۲۴ درصد گزارش کرد. هم‌چنین در این مطالعه، همه ایزوله‌ها نسبت به ایمپنم حساس بودند و بیش‌ترین درصد مقاومت در ایزوله‌های *E. coli* مربوط به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین است (۸). این مطالعه از نظر فراوانی ایمپنم و دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها در ایزوله‌ها با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. دزا و همکارانش در سال ۲۰۰۱، درصد مقاومت در ایزوله‌های *E. coli* را نسبت به کوتریموکسازول، ۳۳ درصد و نسبت به سیپروفلوکساسین ۲۲ درصد گزارش کردند (۱۶). که مقایسه این مطالعه با مطالعه حاضر نشان می‌دهد که مقاومت آنتی-بیوتیکی با گذشت زمان رو به افزایش است.

کارلوسکی و همکارانش در سال ۲۰۰۹، در صد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول، نیتروفوران‌توئین، سیپروفلوکساسین را در بین ایزوله‌های *E. coli* به ترتیب ۷۸،

۹۶، ۸۱ درصد گزارش کردند (۲۸). این مطالعه از نظر فراوانی درصد مقاومت برای آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول و پیدایش مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها، با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. گلدستین و همکارانش در سال ۲۰۰۰، در ایزوله‌های اش‌ریشیاکلی، درصد مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفازولین، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، کوتریموکسازول و جنتامیسین، به ترتیب ۹۹، ۹۱/۹، ۹۸/۳، ۷۸/۲، ۹۸/۴ درصد گزارش کردند (۲۰).

در سال ۲۰۰۸، کالجلگ و همکارانش، درصد مقاومت را برای ایزوله‌های *E. coli* نسبت به کوتریموکسازول، آمپی‌سیلین، جنتامیسین به ترتیب ۳۳، ۴۰، ۱ درصد گزارش کردند (۳۲). مقایسه مطالعه‌های ذکر شده با مطالعه حاضر نشان می‌دهد که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مصرفی در درمان عفونت ادراری با گذشت زمان، رو به افزایش است.

سلطان دلال و همکارانش در سال ۲۰۱۰، درصد مقاومت را در ایزوله‌های *E. coli* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، آمیکاسین، نالیدیکسیک اسید، کوتریموکسازول، آمپی‌سیلین، سفنازیدیم، سیپروفلوکساسین، جنتامیسین به ترتیب ۱۴/۹، ۰، ۶۵، ۸۱/۹۸، ۴۳/۴۷، ۵۵/۹، ۲۸/۵۸ گزارش کردند (۳). درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های اشاره شده در این مطالعه کمابیش با مطالعه حاضر مطابقت داشت. هم‌چنین در این مطالعه همه ایزوله‌ها به ایمپنم حساس بودند و بیش‌ترین درصد مقاومت در بین ایزوله‌های *E. coli* مربوط به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بود که با مطالعه حاضر مطابقت داشت.

کرن و همکارانش در سال ۲۰۰۰، درصد مقاومت را در بین ایزوله‌های *E. coli* نسبت به کوتریموکسازول، ۵۰ درصد و نسبت به آمپی‌سیلین ۴۷ درصد و نسبت به نیتروفوران‌توئین ۳ درصد گزارش کردند (۳۳). در این مطالعه نیز مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها وجود داشت ولی در مقایسه با مطالعه حاضر، می‌توان گفت که مقاومت آنتی‌بیوتیکی، با گذشت زمان در حال افزایش است.

در مطالعه حاضر، بیش‌تر ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به‌طور هم‌زمان به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول و نالیدیکسیک اسید مقاومت ایجاد کردند که می‌تواند به دلیل پیدایش مقاومت چندگانه در بین ایزوله‌های مقاوم *E. coli* به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین باشد. در مطالعه حاضر همه ایزوله‌های *E. coli* به آنتی‌بیوتیک ایمپنم حساس بودند.

در مطالعه آل آگامی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ بیش‌تر ایزوله‌ها مقاوم به هر دو آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و کوتریموکسازول بودند و نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمپنم حساس بودند که با مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت.

در مطالعه سلطان دلال و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در بیش‌تر ایزوله‌ها مقاومت به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول همراه با مقاومت به آمپی‌سیلین و نالیدیکسیک اسید گزارش گردید. هم‌چنین همه ایزوله‌های *E. coli* به ایمپنم حساس بودند. این مطالعه با مطالعه حاضر مطابقت داشت.

روی و همکارانش در سال ۲۰۱۲ طی تحقیقی بر روی نمونه‌های اش‌ریشیاکلی جدا شده از مواد غذایی دریایی، بیش‌ترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (۳۰/۱۷) مشاهده کردند؛ به‌علاوه فراوانی ژن *TEM* (۲۴/۱۴) گزارش شد (۴۲).

هم‌چنین در مطالعه دیگری که در کره جنوبی (۲۰۰۵) انجام گرفت، ۷۸٪ نمونه‌های اش‌ریشیاکلی دارای ژن *TEM* بودند (۱۱).

در تحقیقات دیگری که توسط سانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۷ انجام شد مشخص شد که از ۱۲۵ نمونه مورد بررسی، ۸۰ نمونه (۶۴ درصد) دارای آنزیم *TEM* بودند (۴۶).

در ایران نیز بررسی‌هایی در این زمینه انجام شده است. مطالعه خانم‌هایده مبین و همکاران در طول یک دوره یک-ساله، که بر روی ۳۲ سویه جدا شده از بیماران بستری در بخش‌های مراقبت‌های ویژه *E. coli* بیمارستان امام رضای تبریز انجام شد، نشان داد که ۹۳/۷ درصد سویه‌ها، تولیدکننده *ESBL* و ۸۷ درصد *bla TEM gene* بودند (۶).

در سال ۱۳۸۹ در مطالعه‌ای میزان فراوانی ژن *TEM* در سویه‌های *E. coli* جدا شده از بیمارستان شهرکرد مورد بررسی قرار گرفت که این میزان ۴۸ درصد می‌باشد. در سال ۱۳۸۶ در مطالعه‌ای که در مرکز باکتری شناسی دانشگاه الزهرا اصفهان انجام شد میزان فراوانی ژن *TEM* سویه‌های *E. coli* شناسایی شده در حدود ۸۴ درصد گزارش شد.

مطالعه آقای دکتر سلطان دلال و همکاران که بر روی ۱۸۸ سویه *E. coli* جدا شده از عفونت ادراری بیماران بستری در بیمارستان‌های تبریز انجام شد، نشان داد که ۴۳/۶ درصد ژن *TEM* بودند.

در مطالعه حاضر فراوانی ژن *TEM* در بین نمونه‌های *ESBL+* که مورد بررسی قرار گرفت ۸۰ درصد دارای ژن *TEM* می‌باشند. با بررسی‌های انجام شده بر روی نتایج این تحقیق و

باتوجه به این که این مطالعه برای اولین بار در شهرستان رباط- کریم برای ژن *TEM* در باکتری های *E.coli* جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری صورت گرفته است از این مطالعه نمی توان به عنوان مرجعی مناسب جهت مقایسه نتایج با سایر مطالعه هایی که در کشورهای بزرگ از لحاظ مقایسه ای و معنی دار بودن نتایج و بیان این مطلب که آیا در کشور ایران، شیوع این مقاومت، روند صعودی و یا نزولی را در طی این چند سال از خود نشان داده است، استفاده نمود. لذا پیشنهاد بر این است که مطالعه ای جامع در تمامی استان های کشور ایران انجام شود تا از نتایج این طرح به عنوان رفرنسی برای مقایسه نتایج مطالعه ها استفاده شود.

### سپاسگزاری:

با تشکر از مسئولین مرکز تحقیقات دانشگاه بقیه ... که امکانات لازم را جهت انجام آزمایشات در اختیار ما قرار دادند. و هم چنین با تشکر از مسئولین آزمایشگاه درمانگاه مهر پرند و رباط کریم که ما را در جمع آوری نمونه ها یاری کردند.

سایر مطالعه های انجام شده در نقاط مختلف دنیا مشخص شد که فراوانی ژن *TEM* در این تحقیق نسبت به اکثر کشورها بیش تر بوده است. مقایسه نتایج به دست آمده در این تحقیق با تحقیقات دیگری که در ایران انجام شده، نشان می دهد که نتایج به دست آمده در این تحقیق نسبت به تحقیقات دیگر (زمان زاد و همکاران در سال ۱۳۸۶ در شهرکرد (۴۹)، و هم-چنین مسجedian و همکاران در اصفهان در سال ۱۳۸۶ کم تر می باشد (۷). هم چنین با توجه به نتایج به دست آمده در سایر تحقیقات انجام شده در این زمینه در ایران به این نتیجه می رسیم که فراوانی ژن *TEM* در برخی از این تحقیق ها، اگر چه نسبت به برخی کشورها کم تر می باشد ولی نباید فراموش کرد که این فراوانی ها نسبت به اکثر کشورهای دیگر، بیش تر بوده و این امر بسیار ناخوشایند می باشد چرا که نشان دهنده میزان بالای مقاومت ارگانسیم های تولیدکننده *ESBL* که عامل عفونت هستند، به آنتی بیوتیک های مختلف می باشد. بر اساس نتایج این مطالعه ژن بتالاکتاماز *TEM* ۸۰ درصد از بتالاکتامازهای وسیع الطیف را در باکتری *E. coli* کد می نماید هم چنین این یافته ها اهمیت آنزیم *TEM* را در هیدرولیز داروهای بتالاکتام و به خصوص سفالوسپورین های با طیف بالا را در میان سویه های *E. coli* در شهرستان رباط کریم نشان می دهد. بنابراین توصیه می شود شناسایی این ژن در سویه های *E. coli* جدا شده از نمونه های کلینیکی در آزمایشگاه های میکروبیولوژی، بیش تر مورد توجه قرار گیرد. این اقدام می تواند باعث سرعت بخشیدن به روند تشخیص و درمان بیماران گردد.

### نتیجه گیری

مقاومت به داروهای بتالاکتام و مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم یک معضل جدی و رو به افزایش است. یافته های چنین مطالعه هایی بر ضرورت اتخاذ راهکارهای عملی در مورد تجویز منطقی داروها، ضرورت تجهیز آزمایشگاه ها به روش های تشخیصی (فنوتیپی، تکنیک های مولکولی، ...) جهت شناسایی و تعیین نوع مقاومت ژنتیکی، برآورد میزان شیوع سویه های مقاوم باکتری ها اتخاذ تدابیر لازم جهت درمان بیماران و کنترل مقاومت در باکتری ها تأکید می نماید .

### پیشنهادها

### منابع

- ۱- آموزگار، م.، زرینی، غ.، میکروبیولوژی پره اسکات. ویرایش هفتم، خانه زیست شناسی، ۱۳۸۸، صفحات: ۱۶۰-۱۷۷.
- ۲- انوری نژاد، م.، اینتگرون و الگوهای ژنتیکی E.coli مقاوم به کینولون ها در عفونت های ادراری، ششمین کنگره میکروبی شناسی بالینی ایران و اولین کنگره بین المللی میکروبی شناسی بالینی، ۱۳۹۱. ۵۵: ۳۹-۶۵
- ۳- سلطان دلالت، م.، رستگار، ع.، تعیین ژن بتالاکتاماز CTX-M- در فرم ایزوله اشریشیاکلی از نظر بالینی نمونه های پلیمریزاسیون (PCR). ۲۰۱۱، ۳۹: ۱۶-۷۱
- ۴- شاه چراغی فاطمه، نصیری ساری، ارزیابی حضور blaSHV و blaTEM ژن های موجود در انسولین بالقوه Escherichia coli مقاوم به آنتی بیوتیک از بیمارستان تهران. مجله میکروبیولوژی ۱۳۸۶؛ ۱: ۸-۱
- ۵- مهرگان ه.، شیوع Escherichia coli تولید کننده بتالاکتاماز طیف گسترده در بیمارستان ترمیمی مراقبت های ویژه در تهران، مجله بین المللی، ۲۰۰۸، ۳۱: ۱۴۷-۱۵۱
- ۶- مبین هایده. بررسی میزان شیوع طیف تشدید شده، آنزیم های بتالاکتاماز (انواع SHV / CTX-M / TEM) در اشریشیاکلی تهران مجله میکروبی بالینی، ۲۰۱۰، ۴۲: ۲۰-۲۵
- ۷- مسجدیان، ف.، بررسی مقاومت مولکولی به گسترش طیف آنتی بیوتیک ها در اشریشیاکلی و کلیسیلا پنومونی. ج از پزشکی ایرانی میکروبیولوژی. ۲۰۰۷: ۳۶: ۲۷-۳۴

- 8- Al-Agamy M. Molecular resistance mechanisms to older antimicrobial agents in *Escherichia coli* isolates, African Microbiol Journal., 2012; 6(1): 106-111
- 9- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1980;289(1036):321-31..
- 10- Bien J., Sokolova O., Bozko P, Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage, International Journal Nephrology, 2012 68:1-15.
- 12- Burcu B, Acik L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended spectrum  $\beta$ -lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. Afr J Microbiol Res. 2010; 4: 650-654.
- 13- Bennett, R. Growing group of extended-spectrum-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob agents and chemotherapy, Antimicrob agents chemother. 2004 1(48): 1-14
- 14- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Mprse SA, Mietzner TA. Medical Microbiology. United States. 25th ed, The McGraw-Hill Companies, 2010; Chapter 15, Page 219
- 15- Calbo E, Roman V, Xercavins M, et al. Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harboring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. J Antimicrob Chemother. 2006; 57: 780-783.
- 16- Daza R., Gutierrez J, Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community acquired urinary tract infections, International Journal Antimicrobial Agents., 2001; 18: 211-215
- 17- Foxman B, Epidemiology of urinary tract infections incidence and morbidity and economic costs, J Dis Microbiol, ., 2008; 49:53-70.
- 18- Franceschini N, Perilli M, Segatore Amicosante G, Mazzariol A. Cefazidime and aztreonam resistance in *Providencia stuartii*: characterization of a natural TEM derived xtended spectrum beta-lactamase, TEM-60. Antimicrob Agents production by nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from Italian Nationwide Survey. J Clin Microbiol. 2002; 40(2): 611-614
- 19- Gad G., Mohamed H., Ashour H., Aminoglycoside resistance rates, phenotypes and mechanisms of gram negative bacteria from infected patients in Egypt, J Plos One, 2011; 6(2): 17-24
- 20- Goldstrein F.W Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community acquired urinary tract infections in France, J Eur Clin Microbiol Infect Dis, ., 2000;9(2): 112-117
- 21- George, A., Jocoby, M. and Munoz, L The New Beta lactamases. New england journal medicine, . 2005; 352(4): 380-391.
- 22- Hu Y., Coates A.R., Transposon mutagenesis identifies genes wich control antimicrobial drug tolerance in stationary phase *Escherichia coli*, FEMS Microbiol Lett, 2005;243: 117-124..
- 23- Hummer E., Kochen., Urinary tract infection in adult general practice patients, British Journal of General Practice, 2002; 52: 752-761.
- 24- Hosseini-mazinani SM, Eftekhar F, Milani M. Characterization of  $\beta$ -lactamase from urinary isolated of *Escherichia coli* in Tehran. Iran Biomed J. 2007; 11: 95-99
- 25- Httriewicza K., Szycpa k., Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from urinary tract infection in Poland, J Antimicrob Agents Chemother Journal, 46: 70-76. infection, Antimicrob Agents Chemother, 2001,47(3): 1002-1009
- 26- Liosa M., Coll M., Gmis F., Cruz F., Bacterial conjugation: Two – step mechanism for DNA transport, Molecular Microbiology Journal. 2002;45(1): 4-8.

- 27- Jabry R., Role of conjugative plasmides in antibiotic resistance between two strains of *Escherichia coli*, *J Eng & Tech*, 2008; 26(11): 1429-1434.
- 28- Karlowsky J.A., Simner P., Wiens L., Simner P., Adam H., et al., Antimicrobial resistance in urinary tract pathogens in Canada from 2007 to 2009, *Antimicrob Agents Chemoter*, 2011;55(7): 3169-3175.
- 29-Knote, H., Shah, P., Krcmery, V., Natal, M. Mitsuhshi cefoxitin, cefamandole and sefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 1983;11: 315-317.
- 30- Katouli M., Brauner A., Haghighi L., Kaijser B., Muratov V., Virulence characteristics of *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in young adults in Iran, *Elsevier Journal*, 2005;50: 312-321
- 31-Karlowsky J.A., Simner P., Wiens L., Simner P., Adam H., et al., Antimicrobial resistance in urinary tract pathogens in Canada from 2007 to 2009, *Antimicrob Agents Chemoter*, 2011;55(7): 3169-3175.
- 32- Koljalg S., Trusaluk K., Vainumae I., Stsepetova J., Mikelsaar M., Persistence of *Escherichia coli* clones and phenotype and genotypic antibiotic resistance in recurrent urinary tract infections in childhood, *J Clin microbial*, 2009;47(1): 99-105.
33. Kado CI, Liu ST. *Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids*. *Bacteriol*. 1981; 145(3): 1365-1373
34. Lee J.C, Oh Y., Cho J., Park C., Yang S., et al., The prevalence of trimethoprim resistance conferring dihydrofolate reductase gene in urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea, *Antimicrob Agents Chemoter*, 2001; 47: 599-6
35. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8(4):557-84.
- 36-Magdalena T, Fritz H, Herbert H. *Survey and Molecular Genetics of SHV beta lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: Two Novel Enzymes, SHV-11 and SHV-12*. *Antimicrob Agents Chemoter*. 1997; 41(5): 943-949..
- 37-Moellering RC Jr, Eliopoulos GM, Sentochnik DE. The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemoter*. 1989 Sep; 24 Suppl A: 1-7.
- 38-Nordmann, P., Poirel, L., Toleman, M. A., Walsh, T. R. Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2011; 52(0): 141-144
- 39-Pillai, SD., Widmer, KW., Maciorowski, KG., Ricke, SC., *Antibiotic resistance profiles of Escherichia coli isolated from rural and urban environments*. *J. Environ. Sci. Health*, 1997, 32, P:1665-75.
- 40- Pagani L, Migliavacca R, Pallecchi L, Matti C, Giacobone E, Amicosante G, Romero E, Maria G, Rossolini. *Emerging Extended Spectrum beta Lactamases in Echerichia coli*. *J Clin Microb*. 2002; P: 1549-1552.
- 41- Park YJ, Lee S, Kim YR, Oh EJ, Woo GJ, Lee K. *Occurrence of Extended Spectrum beta-Lactamases among Korean isolates of Echerichia coli*. *J Antimicrobial Chemoter* 2005; 10: 1093-1099.
- 42- Ryu SH, Park SG, Choi SM, Hwang YO, Ham HJ, Kim SU, Lee YK, Kim MS, Park GY, Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. *Int J Food Microbiol* 2012;152:14-8.
- 43- Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, et al. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum beta- lactamases among clinical isolates of *Escheirchia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. *J Antimicrobl Chemoter*. 2005; 56: 698-702.
- 44-Perez, F., Hanson, N. Detection of plasmid-mediated ampc-lactamase Genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 2002; 40: 2153-2162.
- 45- Schito GC, Naber K, Botto H, et al. The ARES study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. *Int Antimicrob Agents*. 2009; 34: 407-13
- 46- Song W, Bae IK, Lee CH, Lee SH, Jeong SH. *Detection of Extended spectrum beta lactamases by using boronic acid as an Amp-C beta-lactamase inhibitor in clinical isolates of Escherichia coli in Korea*, *Antimicrob Agents Chemoter*, 2008; 47: 599-6f
- 47-Thew M. Plasmid mediated beta-lactamases of gram-negative bacteria. distribution and properties. *J Antimicrob Chemoter*. 1979; 5: 349-358 *Klebsiella spp. and Escherichia coli*. *J Cli Microbiol*. Feb 14 2007.
- 48-Van den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E., *Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans*. *Int1. J Antimicrob Agents* 2000, 14, P: 327-335
- 49-Zamanzad B, Nafisi M, Karimi A, Deyhim B. *A Survey Frequency of TEM-1 Gene In Escherichia coli, Klebsiella pneumonia And Enterobacter Strains Producing Extended Spectrum beta-Lactamases Isolated From Clinical Specimens In Hospital Shahrkord By PCR Method*. *J of Hamedan University of Medical Sciences*. 2007; pp:19-25.
- 50-Zamperi S, Rusmah Y, Rusmah M. Eextended spectrum beta- lactamases producing *Escherichia coli* from a tertiary hospital in Malaysia: emergence of CTX- M- type beta- lactamases variation. *Research of Microbiology*. 2008; 125: 1-5.

