

Detection of Extended Spectrum Beta Lactamases on Class I Integron in *Escherichia coli* Isolated from Clinical Samples

Samane Mohebi¹,
Hossien Hossieni Nave²,
Amin Norouzi¹,
Mohammadreza Kandehkar Gharaman²,
Majid Taati Moghadam¹

¹ Msc Student in Microbiology, Kerman Medical Students Research Committee, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

² PhD Student in Microbiology, School of Medicine, Kerman University of Medical sciences, Kerman, Iran

(Received, December 10, 2015 ; Accepted April 11, 2016)

Abstract

Background and purpose: Extended spectrum beta lactamases (ESBLs) are important causes of multidrug resistance (MDR) *Escherichia coli*. ESBL genes are usually located on conjugative plasmids or on integron structures. The aim of this study was to detect ESBLs on class I integron in *Escherichia coli* isolated from clinical samples.

Materials and methods: A descriptive cross-sectional study was performed in which 60 isolates of *E. coli* were collected from two hospitals in Kerman, Iran during three months. The isolates were identified using standard microbiological and biochemical techniques. Antibiotic susceptibility pattern of isolates was determined by disk agar diffusion method. ESBL-producing *E. coli* was determined using phenotypic double disc test. Then, Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect *intI*, *bla*-TEM, *bla*-SHV, and *bla*-CTX-M genes. Data analysis was done in SPSS applying Chi-square test.

Results: The highest and lowest rates of antibiotic sensitivities in isolated *E. coli* were found to amikacin and imipenem (3.3%) and ampicillin (66.6%), respectively. Multidrug resistance was detected in 43.3% of the samples. 45% of isolates were identified as ESBL producers. Prevalence of *bla*-TEM, *bla*-CTX-M and *bla*-SHV genes were 74.07%, 69.9%, and 7.4%, respectively. Class I integron was detected in 60% of the isolates.

Conclusion: In this study, we observed a significant association between ESBL and class I integron which confirms that ESBLs were located on integron class I and easily transferred into bacteria.

Keywords: *E. coli*, ESBL, class 1 integrons

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(138): 66-76 (Persian).

بررسی وجود آنزیم های بتالاکتامازهای وسیع الطیف بر روی اینتگرون کلاس I در اشرشیاکلی جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان های کرمان

سمانه محبی^۱
حسین حسینی نوه^۲
امین نوروزی^۱
محمدرضا کنده کار قهرمان^۲
مجید طاعنی مقدم^۱

چکیده

سابقه و هدف: بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)، به عنوان گروهی از آنزیم های بتالاکتاماز، از عوامل مهم مقاومت دارویی چندگانه در اشرشیاکلی می باشند. ژن های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف معمولاً بر روی پلاسمیدها یا اینتگرون ها قرار دارند. هدف از این مطالعه، بررسی وجود آنزیم های بتالاکتامازهای وسیع الطیف بر روی اینتگرون کلاس I در اشرشیاکلی جدا شده از نمونه های بالینی بوده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی مقطعی طی ۳ ماه، ۶۰ نمونه اشرشیاکلی از بیماران بستری در دو بیمارستان آموزشی کرمان (افضلی پور و شفاء) جمع آوری و جدایه ها توسط آزمایش های میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی تایید شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن آگار و تولید آنزیم های ESBL با استفاده از روش Double disc تعیین گردید. در نهایت حضور ژن های *bla-TEM*، *bla-SHV*، *bla-CTX-M* و *intI* توسط PCR شناسایی شدند. آنالیز اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون Chi-square انجام گرفت.

یافته ها: براساس یافته های به دست آمده، بیش ترین و کم ترین درصد حساسیت، به ترتیب مربوط به آمیکاسین و ایمپنم (۳/۳ درصد) و آمپی سیلین (۶۶/۶ درصد) بود. از مجموع ۶۰ نمونه، ۴۳/۳ درصد جدایه ها دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند. از مجموع ۶۰ جدایه، ۴۵ درصد از جدایه ها تولید کننده ESBL بودند. فراوانی ژن های *bla-CTX-M*، *bla-TEM* و *bla-SHV* در جدایه های اشرشیاکلی به ترتیب ۷۴/۰۷ درصد، ۶۹/۹ درصد و ۷/۴ درصد بودند. در این مطالعه ۶۰ درصد جدایه ها دارای اینتگرون کلاس I بودند.

استنتاج: در این مطالعه ارتباط معنی داری بین اینتگرون کلاس I و آنزیم های ESBLs مشاهده شد که این ارتباط می تواند نشان دهنده حضور ژن های ESBLs بر روی اینتگرون کلاس I و انتقال سریع این ژن ها در باکتری باشد.

واژه های کلیدی: اشرشیاکلی، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، اینتگرون کلاس I، کرمان

مقدمه

آنتی بیوتیک های بتالاکتام مانند پنی سیلین، در سراسر جهان تجویز می شوند (۱). اما در سال های اخیر، تعداد متنوعی از بتالاکتامازهای جدید شناسایی شده اند

سفالوسپورین ها، مونوباکتام و کارباپنم ها در اغلب موارد

E-mail: Majidtaati1367@yahoo.com

مؤلف مسئول: مجید طاعنی مقدم - کرمان: دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۲. دانشجوی دکتری باکتری شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۹/۲۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱/۲۳

که ظاهراً در پاسخ به استفاده بالینی از کلاس های جدید آنتی بیوتیک بتالاکتام به طور هشدار دهنده ای با افزایش مقاومت همراهند (۲). این آنزیم ها، دفاع عمده باکتری های گرم منفی در برابر آنتی بیوتیک بتالاکتام و مهم ترین عامل مقاومت می باشند. بتالاکتامازها آنزیم های باکتریایی هستند که با غیر فعال کردن و هیدرولیز ترکیبات بتالاکتام، باعث بی اثر شدن ترکیبات آنتی بیوتیک می شوند (۳). اگرچه بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) توصیف شده در طیف وسیعی از اتروباکتریاسه و پseudomonas از نقاط مختلف دنیا گزارش شده اند، اما آن ها اغلب در *کلبسیلا پنومونیه* و *اشریشاکلی* شناسایی شدند (۴). درمان عفونت های حاصل از باکتری های مولد این آنزیم ها بسیار مشکل است، چون از یک سو باعث مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورین ها می شوند و از سوی دیگر بسیاری از ژن های ESBL بر روی پلاسمیدهای بزرگی (بیش از ۱۰۰ کیلو باز) قرار دارد که همزمان حامل ژن های مقاومت به سایر عوامل ضد میکروبی مثل آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل، سولفونامیدها و تتراسایکلین نیز هست (۵). اگرچه ژن های کد کننده آنزیم های ESBL بر روی یک پلاسمید قابل انتقال قرار دارند، اما بیش تر ژن های ESBL که اخیراً شناسایی شده اند، به طور مکرر در ساختارهایی مانند اینتگرون یافت شده اند. بنابراین ژن های ESBL می توانند بر روی اینتگرون ها قرار گیرند و به راحتی توسط این عناصر ژنتیکی گسترش پیدا کنند (۶).

اینتگرون ها عناصر ژنتیکی هستند که شامل تعدادی ژن و محل ویژه الحاق برای سیستم نو ترکیبی هستند که آن ها را قادر می سازد تا کاست های ژنی متحرک را به دست بیاورند و انتقال افقی آن ها در بین باکتری ها یکی از مهم ترین راه های انتشار ژن های مقاومت می باشد (۷). هم چنین مطالعات مختلف نشان می دهند که مقاومت چند دارویی در باکتری ها به صورت قابل ملاحظه ای در ارتباط با وجود اینتگرون ها و کاست های ژنی می باشند (۸، ۷). اینتگرون کلاس I، شایع ترین اینتگرون در بین باکتری های

گرم منفی می باشد که ناحیه محافظت شده ۳' آن حاوی ژن هایی است که سبب مقاومت به ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی و سولفونامیدها می شود. برای تشخیص حضور اینتگرون کلاس I، محققین از دو ناحیه به عنوان نواحی هدف برای شناسایی در باکتری ها استفاده کرده اند. یکی از این نواحی، ژن آنزیم اینتگراز است که هدف خوبی برای شناسایی اینتگرون کلاس I در نمونه و هم چنین تشخیص کلاس اینتگرون های موجود می باشد. یکی دیگر از نواحی مورد استفاده، ناحیه متغیر در بین دو ناحیه حفاظت شده در ساختار اینتگرون ها است. ناحیه متغیر اینتگرون ها محل قرارگیری کاست های ژنی می باشد که توسط دو ناحیه حفاظت شده CS-۳' و CS-۵' احاطه شده اند (۸). از آنجایی که اطلاعات محدودی در زمینه ارتباط آنزیم های ESBL با اینتگرون ها وجود دارد، هدف از این مطالعه بررسی نقش با اهمیت آنزیم های ESBL بر روی اینتگرون کلاس I می باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه و شناسایی باکتری: در این مطالعه به روش توصیفی مقطعی طی مدت ۳ ماه، جدایه های اشریشاکلی از بیمارستان های افضل پور و شفا شهر کرمان از نمونه های بالینی شامل ادرار، خون، زخم و برونش از بیماران بستری و سرپایی جداسازی شد و به بخش میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه کرمان انتقال داده شد و سپس با توجه به روش های استاندارد تشخیصی و بیوشیمیایی شامل TSI، SIM، MR-VP، سیترات و اوره شناسایی گردیدند (۹).

تست تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های جدا شده با پیروی از دستورالعمل CLSI (Clinical and laboratory standard institute) و با استفاده از روش دیسک دیفیوژن انجام شد و آنتی بیوتیک های مورد استفاده شامل دیسک های ایمی پنم (۱۰ μg)، سفنازیدیم (۳۰ μg)،

جنتامایسین ($10 \mu\text{g}$)، نالیدیکسیک اسید ($30 \mu\text{g}$)، کوتریموکسازول ($1/25/23/75 \mu\text{g}$)، سفتریاکسون ($30 \mu\text{g}$)، سفوتاکسیم ($30 \mu\text{g}$)، آمپی سیلین ($10 \mu\text{g}$)، آمیکاسین ($30 \mu\text{g}$) و سیپروفلوکساسین ($5 \mu\text{g}$) بودند که از شرکت Himedia هند خریداری شد (۱۰).

شناسایی بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)

برای شناسایی جدایه‌های تولیدکننده ESBLs از تست تاییدی فنوتیپی شامل دیسک‌های ترکیبی سفنازیدیم/کلاولانیک اسید ($30/10 \mu\text{g}$) در مقایسه با سفنازیدیم ($30 \mu\text{g}$) و سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید ($30/10 \mu\text{g}$) در مقایسه با سفوتاکسیم ($30 \mu\text{g}$) که از شرکت Himedia هند خریداری شد، استفاده شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، نمونه‌های تولیدکننده ESBLs دارای قطر هاله عدم رشد به اندازه ۵ میلی‌متر یا بیش‌تر در اطراف دیسک‌های سفنازیدیم/کلاولانیک اسید در مقایسه با سفنازیدیم و یا سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید در مقایسه با سفوتاکسیم بودند. PCR جهت شناسایی ژن‌های *bla-TEM* *intI* و *bla-SHV* پس از تعیین جدایه‌هایی که از نظر فنوتیپی مثبت بودند، DNA نمونه‌های شناسایی شده به عنوان ESBLs با استفاده از روش جوشاندن جداسازی شد که در این روش، مقداری از کلنی‌های باکتری اشرشیاکلی به داخل یک اپندورف حاوی ۱ میلی‌لیتر آب مقطر انتقال داده و یک سوسپانسیون به وجود آمد و سپس اپندورف حاوی سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد و بعد از آن در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاوی DNA مورد نظر

بوده که جهت انجام PCR استفاده گردید. در این روش با استفاده از کیت Master mix (شرکت آمپیکون دانمارک)، PCR انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده و هم‌چنین اندازه باندهای محصولات بر روی ژل الکتروفورز بر اساس رفرنس در جدول شماره ۱ ذکر گردیده است.

جهت انجام PCR در حجم نهایی، ۲۵ میکرولیتر در لوله‌های اپندورف از مخلوط کردن ۱۲/۵ میکرولیتر ماستر میکس، ۳ میکرولیتر از DNA باکتری، ۱۰ pmol از پرایمر مورد نظر و حجم مناسبی از آب مقطر استریل استفاده شد و هم‌چنین واکنش PCR طبق برنامه‌ای که در جدول شماره ۲ قرار دارد، انجام گردید (۹). پس از انجام آزمایش PCR، محصولات PCR در ژل ۱/۵ درصد در TBE بافر به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰ الکتروفورز گردید. برای رنگ آمیزی ژل، آن را به مدت ۱۵ دقیقه در تانک حاوی اتیدیوم بروماید قرار داده و سپس نتایج توسط دستگاه Geldocument مشاهده شدند. از سویه/سیتو باکتر بومانی TMU1 به ترتیب برای کنترل مثبت ژن‌های *intI* و هم‌چنین از سویه کلبسیلا پنومونیه سویه ATCC 700603 به عنوان سویه کنترل مثبت تولیدکننده ژن *bla-SHV* و *bla-CTXM* از سویه اشرشیاکلی ATCC 35218 به عنوان کنترل مثبت ژن *bla-TEM* استفاده گردید و هم‌چنین از سویه اشرشیاکلی ATCC 25922 به عنوان سویه کنترل منفی در این مطالعه استفاده شد.

آنالیز اطلاعات

پس از جمع آوری داده‌ها، اطلاعات مربوط به هر جدایه باکتری، وارد نرم افزار SPSS-22 شد و با استفاده از آزمون آماری Chi-square رابطه بین اطلاعات آنالیز گردید. سطح معنی‌داری، کم‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرها دمای آنیلینگ و محل قرارگیری ژن‌ها بر روی ژل آگاروز

ژن	توالی پرایمر	باند محصول (bp)	TM(°)	رفرنس
<i>bla-SHV</i>	F: TCAGCGAAAAACACCTTG R: TCCCGCAGATAAATCACC	۴۷۱	۵۶	۱۱
<i>bla-TEM</i>	F: GAGTATTCACATTTCCGTGTC R: TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	۸۶۱	۵۹	۱۱
<i>bla-CTXM</i>	F: CGCTTTGCGATGTGCAG R: ACCGCGATATCGTTGGT	۵۵۰	۵۹	۱۲
<i>intI</i>	F: CAGTGACATAAGCCTGTTC R: CCCGAGGCATAGACTGTA	۱۶۰	۵۵	

جدول شماره ۲: شرایط نهایی مطلوب برای دستیابی به بهترین نتیجه PCR

شرایط تکثیر	دما (سانتی گراد)	زمان (ثانیه)
واشرشگی اولیه	۹۵	۳۰۰
واشرشگی	۹۵	۳۵
ژن <i>intI</i>	۵۵	
ژن <i>bla-TEM</i>	۵۹	۴۰
ژن <i>bla-SHV</i>	۵۶	
ژن <i>bla-CTX-M</i>	۵۹	
گسترش	۷۲	۴۰
گسترش پایانی	۷۲	۳۰۰

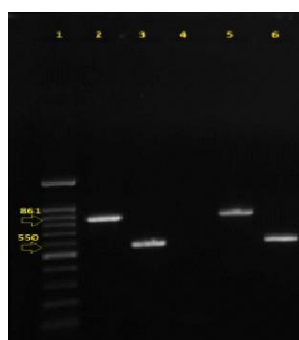
یافته ها

در این مطالعه از ۶۰ جدایه اشرشیاکلی، ۵۴ (۹۰ درصد) جدایه ها از بیماران مبتلا به عفونت ادراری و میزان جدایه جداسازی شده از خون، زخم و برونش به ترتیب ۲ (۳/۴ درصد)، ۱ (۱/۶ درصد) و ۳ (۵ درصد) بودند. با توجه به نتایج به دست آمده از آنتی بیوگرام، بیش ترین مقاومت نسبت به آمپی سیلین (۶۶/۶ درصد) وجود داشت و هم چنین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های کوتریموکسازول (۶۰ درصد)، نالیدیسیک اسید (۴۳/۳ درصد)، سفتریکسون (۴۳/۳ درصد)، در سطح قابل توجهی بود. کم ترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین و ایمپنم (۳/۳ درصد) مشاهده شد که این آنتی بیوتیک ها موثر ترین آنتی بیوتیک ها علیه جدایه های اشرشیاکلی می باشد. حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین (۷۵ درصد)، جنتامایسین (۸۸/۳ درصد)، سفتریاکسون (۶۱/۶ درصد)، سفوتاکسیم (۵۵ درصد) و سفنازیدیم (۵۵ درصد) نیز در سطح بالایی می باشد. جدول شماره ۳ جزئیات به دست آمده از نتایج آنتی بیوگرام را نشان می دهد. هم چنین آنالیز اطلاعات آنتی بیوگرام نشان داد که الگوی مقاومت در نمونه ها جداسازی شده از ادرار، خون، زخم و مایعات برونش با هم متفاوت می باشد. نتایج آنتی بیوگرام نشان می دهد که ۲۶ جدایه (۴۳/۳ درصد) اشرشیاکلی حداقل به سه خانواده آنتی بیوتیکی مقاوم (Multi Drug Resistance) بودند. جدول شماره ۴ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و تعداد جدایه های MDR را نشان می دهد. هم چنین نتایج تست دیسک ترکیبی جهت شناسایی فنوتیپی جدایه های

ESBLs نشان داد که ۲۷ جدایه (۴۵ درصد) به طور فنوتیپی تولید کننده ESBLs بودند. بعد از انجام تست های فنوتیپی جهت شناسایی جدایه های تولید کننده آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف، PCR برای جدایه های فنوتیپی مثبت نشان داد که تمامی جدایه هایی که از لحاظ فنوتیپی تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف بودند، دارای حداقل یک ژن از سه ژن *bla-TEM*، *bla-SHV* و *bla-CTXM* بودند. بیش ترین شیوع در جدایه های تولید کننده ESBLs، ژن *bla-TEM* به خود اختصاص داد که ۲۰ جدایه (۷۴/۰۷ درصد) از ۲۷ جدایه تولید کننده ESBLs، تولید کننده این ژن بودند و کم ترین شیوع را ژن *bla-SHV* که در ۲ جدایه ها (۷/۴ درصد) مشاهده شد و ۱۷ جدایه (۶۹/۹ درصد) دارای ژن *bla-CTXM* بودند و هم چنین هیچ کدام از جدایه های تولید کننده ESBLs، به طور همزمان دارای هر سه ژن به *bla-TEM*، *bla-SHV* و *bla-CTXM* نبودند (تصاویر شماره ۱ و ۲).

جدول شماره ۳: درصد مقاومت به آنتی بیوتیک در جدایه های اشرشیاکلی و انواع نمونه های بالینی

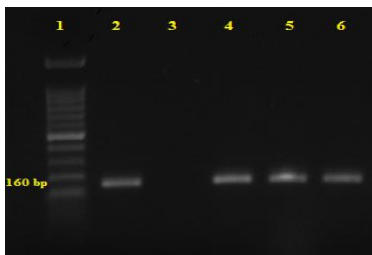
آنتی بیوتیک	ادرار (درصد)	خون (درصد)	زخم (درصد)	برونش (درصد)	کل نمونه ها
					حساس (درصد)
					نیمه حساس (درصد)
					مقاوم (درصد)
ایمپنم	۱۳/۳	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۹۳/۳
آمیکاسین	۳/۳	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۹۵
آمپی سیلین	۵۸/۳	۱/۶	۱/۶	۵/۰	۳۰
سیپروفلوکساسین	۲۱/۶	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۷۵
جنتامایسین	۱۱/۶	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۸۸/۳
سفتریکسون	۳۳/۳	۰/۰	۰/۰	۳/۳	۶۱/۶
سفنازیدیم	۲۸/۳	۰/۰	۰/۰	۳/۳	۵۵
نالیدیسیک اسید	۲۸/۳	۱/۳	۰/۰	۳/۳	۴۸/۳
سفوتاکسیم	۳۵	۰/۰	۰/۰	۳/۳	۵۵
کوتریموکسازول	۶۰	۱/۶	۱/۶	۳/۳	۳۵



تصویر شماره ۱: نشان دهنده وجود ژن *bla-TEM* (۸۶۱ bp) و *bla-CTXM*

از آنتی بیوتیک ها نظیر سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین، سفوتاکسیم، کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید و آمپی سیلین در جدایه های تولید کننده ESBLs نسبت به جدایه های فاقد آنزیم ESBLs بسیار بالاتر می باشد. از طرفی رابطه معنی داری بین جدایه های تولید کننده ESBLs و مقاومت MDR وجود داشت ($p=0/02$).

بررسی فراوانی اینتگرون کلاس I در ۶۰ جدایه اشرشیاکلی نشان داد که ۳۶ جدایه (۶۰ درصد) دارای اینتگرون کلاس I بودند (تصویر شماره ۳) و ارتباط معنی داری بین حضور اینتگرون کلاس I و مقاومت در سویه های MDR وجود نداشت ($p=0/7$). اما ارتباط معنی داری بین اینتگرون کلاس I و آنزیم های ESBLs مشاهده شد ($p=0/3$) که از ۳۶ جدایه ای که از نظر آنزیم ESBLs مثبت بودند، ۲۰ جدایه دارای اینتگرون کلاس I بودند.

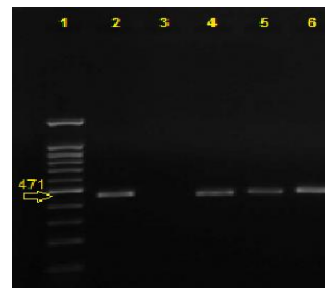


تصویر شماره ۳: نشان دهنده باندهای ژن *intI* (۱۶۰ bp) می باشد. چاهک شماره ۱ مارکر (۱۵۰-۱۰۰ bp)، چاهک شماره ۳ سویه کنترل منفی، چاهک شماره ۲ سویه کنترل مثبت و چاهک شماره ۴، ۵ و ۶ جدایه های بالینی دارای ژن *intI* می باشند

جدول شماره ۵: میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف در جدایه های ESBLs فاقد ESBLs

آنتی بیوتیک	جدایه های فاقد ESBLs (درصد)	جدایه های تولید کننده ESBLs (درصد)	سطح معنی داری
ایمی پنم	۰/۰ درصد	۷/۴ درصد	۰/۰۷
آمیکاسین	۰/۰ درصد	۷/۴ درصد	۰/۵
آمپی سیلین	۴۵/۴ درصد	۸۸/۸ درصد	۰/۰۰۱
سیپروفلوکساسین	۳ درصد	۴۸/۱ درصد	۰/۰۰۲
جنتامایسین	۰/۰ درصد	۲۵/۹ درصد	۰/۰۰۲
سفتراکسون	۰/۰ درصد	۷۷/۷ درصد	۰/۰۰۰
سفنازیدیم	۳ درصد	۱۰۰ درصد	۰/۰۰۰
نالیدیکسیک اسید	۱۸/۱ درصد	۷۷/۷ درصد	۰/۰۸
سفوتاکسیم	۳ درصد	۱۰۰ درصد	۰/۰۰۰
کوتریموکسازول	۲۹/۳ درصد	۸۱/۴ درصد	۰/۰۰۵

(۵۵۰ bp) می باشد. چاهک شماره ۱ مارکر (۱۵۰-۱۰۰ bp)، چاهک شماره ۴ سویه کنترل منفی، چاهک شماره ۲ و ۳ سویه کنترل مثبت و چاهک شماره ۵ و ۶ جدایه های بالینی دارای ژن های *bla-TEM* و *bla-CTXM* می باشند.



تصویر شماره ۲: نشان دهنده باندهای ژن *bla-SHV* (۴۷۱ bp) می باشد. چاهک شماره ۱ مارکر (۱۵۰-۱۰۰ bp)، چاهک شماره ۳ سویه کنترل منفی، چاهک شماره ۲ سویه کنترل مثبت و چاهک شماره ۴، ۵ و ۶ جدایه های بالینی دارای ژن *bla-SHV* می باشند.

جدول شماره ۴: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های MDR اشرشیاکلی

ردیف	تعداد	الگوی مقاومت
۱	۲	AM, SXT, CTX, CRO, NA, CIP, IPM, GM, CAZ
۲	۲	AM, SXT, CTX, CRO, NA, CIP, GM, AN, CAZ
۳	۱	AM, CTX, CRO, NA, CIP, IPM, GM, CAZ
۴	۱	AM, SXT, CTX, CRO, NA, CIP, CAZ
۵	۲	AM, SXT, CTX, CRO, NA, CIP, GM, CAZ
۶	۲	AM, SXT, CTX, CRO, NA, CIP, CAZ
۷	۱	AM, SXT, CTX, CRO, CIP, IPM, CAZ
۸	۱	AM, SXT, CTX, CRO, NA, IPM, CAZ
۹	۵	AM, SXT, CTX, CRO, NA, CAZ
۱۰	۲	AM, SXT, CTX, CRO, AN, CAZ
۱۱	۳	AM, SXT, CTX, CRO, CAZ
۱۲	۳	AM, SXT, NA
۱۳	۱	SXT, CIP, IPM

AM: آمپی سیلین، SXT: کوتریموکسازول، CTX: سفوتاکسیم، CRO: سفتریاکسون، NA: نالیدیکسیک اسید، CIP: سیپروفلوکساسین، IPM: ایمی پنم، GM: جنتامایسین، CAZ: سفنازیدیم، AN: آمیکاسین

جدول شماره ۵: نشان می دهد که مقاومت به تمامی آنتی بیوتیک ها در جدایه های تولید کننده ESBLs بیش تر از جدایه های فاقد ESBLs می باشد و هم چنین رابطه معنی داری بین جدایه های تولید کننده ESBLs و مقاومت به جنتامایسین، سفالوسپورین ها، آمپی سیلین، سفنازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین در این مطالعه مشاهده شد (جدول شماره ۴). مقاومت به بعضی

بحث

در جهت کاهش هزینه‌های درمانی و شناسایی عوامل مهم بیماری‌زا در بیمارستان و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جهت کنترل شیوع این عوامل، اتخاذ یک استراتژی نوین در درمان و تشخیص این سویه‌ها ضروری می‌باشد. درمان این عفونت‌ها، که در سال‌های گذشته به آسانی با آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین قابل درمان بودند، متأسفانه امروزه با کسب انواع مقاومت‌ها از جمله تولید آنزیم‌های ESBLs و کاست‌های ژنی بیماری‌زا نظیر اینتگرئون‌ها، دارای درمانی مشکل و پرهزینه شده‌اند (۱۴). در این مطالعه بیشترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین وجود داشت و هم‌چنین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول، نالیدیسیک اسید و سفتریکسون در سطح قابل توجهی بود. کم‌ترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین و ایمپنم مشاهده شد که این آنتی‌بیوتیک‌ها موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها علیه گونه‌های اشرشیاکلی می‌باشد. هم‌چنین در این مطالعه مقاومت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها در جدایه‌های ESBLs بیش‌تر از جدایه‌های فاقد ESBLs می‌باشد. مطالعات زیادی در ایران و سایر نقاط جهان انجام شده که مشابه نتایج به دست آمده از این مطالعه می‌باشد که در این میان می‌توان به مطالعه‌ای که توسط مهرگان و همکاران در تهران انجام شد اشاره کرد که این محققین گزارش کردند که موثرترین آنتی‌بیوتیک علیه جدایه‌های اشرشیاکلی، ایمپنم می‌باشد و مقاومت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها به خصوص در سفالوسپورین‌ها، در جدایه‌های تولیدکننده ESBLs بیش‌تر از جدایه‌های فاقد ESBLs بود که این نتایج مشابه با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد (۱۵). هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط بهروزی و همکاران در کرج انجام شد، بیش‌ترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین گزارش شد، اما مقاومت به سفالوسپورین‌ها در جدایه‌های اشرشیاکلی بالاتر از نتایج به دست آمده از این مطالعه بود (۱۶).

در مطالعه‌ای که توسط Hassan و همکاران انجام شد، این محققین نیز بیش‌ترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و بیش‌ترین حساسیت را نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمپنم گزارش کردند که این نتایج مشابه با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد (۱۷).

در مطالعه‌ای که Hawser و همکاران نیز انجام دادند، میزان حساسیت به ایمپنم در جدایه‌های اشرشیاکلی از تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بیش‌تر بود و هم‌چنین مقاومت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها در جدایه‌های اشرشیاکلی همانند نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر در جدایه‌های تولیدکننده ESBLs بیش‌تر از جدایه‌های فاقد ESBLs گزارش شد (۱۸). هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط Jain و همکاران انجام شد، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در جدایه‌های تولیدکننده ESBLs بیش‌تر از جدایه‌های فاقد ESBLs می‌باشد که مشابه با نتایج مطالعه حاضر است (۱۹).

نتایج آنتی‌بیوگرام نشان می‌دهد که ۲۶ جدایه (۴۳/۳ درصد) اشرشیاکلی، MDR بودند. در مطالعه‌ای که توسط Rezaee و همکاران در تبریز انجام شد، ۸۴/۲ درصد از جدایه‌های اشرشیاکلی، MDR بودند که این میزان فراوانی جدایه‌های MDR بسیار بالاتر از نتایج به دست آمده از این مطالعه می‌باشد و نشان می‌دهد فراوانی این ایزوله‌ها در نقاط مختلف متفاوت است (۲۰). اما در مطالعه‌ای که توسط Ho و همکاران در مالزی انجام شد، ۴۶ درصد از جدایه‌های اشرشیاکلی دارای مقاومت MDR بودند که این میزان از فراوانی مشابه با نتایج به دست آمده از این مطالعه است (۲۱).

نتایج PCR نشان داد ۲۷ جدایه (۴۵ درصد) تولیدکننده ESBLs بودند. بیش‌ترین شیوع را در جدایه‌های تولیدکننده ESBLs، ژن *bla-TEM* به خود اختصاص داد که ۲۰ جدایه (۷۴/۰۷ درصد) از ۲۷ جدایه تولیدکننده ESBLs، تولیدکننده این ژن بودند و کم‌ترین شیوع را ژن *bla-SHV* داشت که در ۲ جدایه (۷/۴ درصد) مشاهده شد و ۱۷ جدایه (۶۹/۹ درصد) دارای ژن *bla-CTX-M*

بودند. در مطالعه‌ای که توسط مهرگان و همکاران انجام شد، ۶۷/۲ درصد از جدایه‌های اشرشیاکلی تولیدکننده ESBLs بودند که این میزان شیوع، بیش‌تر از نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر می‌باشد. در پژوهشی که توسط جزایری و همکاران در سمنان انجام شد، ۱۷/۴۵ درصد جدایه‌های اشرشیاکلی تولیدکننده ESBLs بودند که این میزان شیوع، پایین‌تر از مطالعه حاضر می‌باشد (۲۲). هم‌چنین Pakzad و همکاران نشان دادند که ۲۸ درصد جدایه‌های اشرشیاکلی دارای ESBLs بودند (۲۳). Hassan و همکاران میزان شیوع ESBLs را در جدایه‌های اشرشیاکلی ۵۴ درصد گزارش کردند (۱۷). از طرفی در ژاپن، Suzuki و همکاران نشان دادند که ۸۴ درصد جدایه‌های اشرشیاکلی تولیدکننده آنزیم ESBLs می‌باشند (۲۳). هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط Jain و همکاران انجام شد، نشان دادند که ۶۳/۳ درصد جدایه‌های اشرشیاکلی تولیدکننده ESBLs بودند (۱۹). در مطالعه منوچهری و همکاران که در سال ۲۰۱۵ انجام شد، اعلام کردند که ۶۰ درصد جدایه‌های اشرشیاکلی، دارای بتالاکتاماز CTXM بوده است (۲۴).

در مطالعه دیگری که توسط رضایی و همکاران در سال ۲۰۱۵ صورت گرفت، فراوانی ESBLs را در جدایه‌های اشرشیاکلی ۳۰/۵ درصد گزارش کردند که TEM با شیوع ۴۹ درصد بیش‌ترین شیوع را به خودش اختصاص داد و SHV و CTXM ترتیب ۴۴ درصد و ۲۸ درصد شیوع داشتند که همانند مطالعه حاضر، بیش‌ترین فراوانی را TEM به اختصاص داده است (۲۵). نتایج به دست آمده از این مطالعات نشان می‌دهد که شیوع آنزیم‌های ESBLs در نقاط مختلف جهان و حتی در نقاط مختلف یک کشور متفاوت است و گزارش‌ها نشان‌دهنده افزایش این آنزیم‌ها در چند سال گذشته می‌باشد.

بررسی فراوانی ژن اینتگرون کلاس I در این مطالعه نشان داد که ۳۶ جدایه (۶۰ درصد) اشرشیاکلی دارای این ژن بودند. در مطالعه‌ای که ژاپنی و همکاران در جنوب ایران در سال ۱۳۸۷ انجام دادند، ۴۴/۸ درصد از

جدایه‌های اشرشیاکلی دارای ژن اینتگرون بودند که تا حدودی به مطالعه حاضر نزدیک می‌باشد (۲۶). هم‌چنین در سال ۱۳۹۰، رضایی و همکاران در غرب ایران فراوانی اینتگرون کلاس I را در جدایه‌های اشرشیاکلی ۲۲/۰۵ درصد گزارش کردند که این میزان فراوانی پایین‌تر از نتایج مطالعه حاضر می‌باشد (۲۰). در مطالعه‌ای که توسط نجیبی و همکاران در تهران (۱۳۹۱) انجام شد، نشان دادند که ۸۲ درصد جدایه‌های اشرشیاکلی دارای اینتگرون کلاس I بودند (۲۷). در سال ۱۳۹۲، رنجبران و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی جدایه‌های اشرشیاکلی انجام دادند، مشخص کردند که ۸۶ درصد جدایه‌ها دارای اینتگرون کلاس I بودند که این میزان فراوانی بالاتر از نتایج به دست آمده از این مطالعه است (۲۸). در سایر نقاط جهان، مطالعات زیادی در زمینه فراوانی اینتگرون‌ها در باکتری‌ها صورت گرفته است. در مطالعه‌ای که توسط Kang و همکاران در کره انجام شد، ۳۳ درصد از نمونه‌های بالینی اشرشیاکلی دارای اینتگرون کلاس I بودند (۲۹). هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط Mathai و همکاران در هند انجام شد، ۳۶/۲ درصد جدایه‌های اشرشیاکلی دارای اینتگرون کلاس I بودند (۳۰). در مالزی، Ho و همکاران طی بررسی که بر روی جدایه‌های اشرشیاکلی انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که ۳/۱ درصد آن‌ها دارای اینتگرون کلاس I بودند که بسیار پایین‌تر از نتایج به دست آمده از این مطالعه می‌باشد (۲۱).

مطالعات فوق در زمینه فراوانی ژن اینتگرون نشان می‌دهد که فراوانی اینتگرون بر اساس توزیع جغرافیایی این ژن‌ها در شهرهای مختلف ایران و کشورهای مختلف متفاوت می‌باشد که در برخی نقاط جغرافیایی، فراوانی اینتگرون کم‌تر از مطالعه حاضر است، اما در برخی نقاط جغرافیایی، فراوانی اینتگرون بالاتر از نتایج به دست آمده از این مطالعه است و این می‌تواند زنگ خطری برای افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشد.

در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین اینتگرون کلاس I و آنزیم‌های ESBLs مشاهده شد که این

این مطالعه شیوع بالای آنزیم های ESBLs و اینتگرون کلاس I در اشرشیاکلی جدا شده از نمونه های بالینی نشان می دهد که به کارگیری سیاست هایی جهت کنترل عفونت های ناشی از این باکتری ها بسیار با اهمیت است. هم چنین به دلیل مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها، ظهور این عوامل بیماریزا باعث مشکلات فراوان در درمان و ایجاد عفونت های مقاوم قابل انتقال در میان باکتری ها شده است، بنابراین آزمایشگاه های میکروب شناسی تشخیصی، باید تکنیک های مناسبی برای شناسایی این عوامل بیماریزا داشته باشند. در نهایت پیشنهاد می شود با انجام مطالعات مولکولی و اپیدمیولوژی در زمینه شیوع و شناسایی آنزیم های ESBLs و اینتگرون ها و ارتباط این ژن ها با عفونت ها تا حدودی بتوان از عوارض این عوامل بیماریزا جلوگیری نمود.

سپاسگزاری

در این مطالعه مراتب قدردانی و تشکر خود را از کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به دلیل حمایت مالی و اجرایی اعلام می داریم.

References

1. Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M. Escherichia coli sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant E. coli infections in the United States. Clin Infect Dis 2010; 51(3): 286-294.
2. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. Clin Infect Dis 1997; 24(Suppl 1): S19-45.
3. Bush K. New beta -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis 2001; 32(7): 1085-1089.
4. Ambler RP, Coulson AF, Frère JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, et al. A standard

ارتباط می تواند نشان دهنده حضور ژن های ESBLs بر روی اینتگرون کلاس I و انتقال سریع این ژن ها در باکتری اشرشیاکلی باشد. مطالعات زیادی توسط محققین صورت گرفته است که مشابه با نتایج به دست آمده از این مطالعه و تایید کننده حضور ژن های ESBLs بر روی اینتگرون ها می باشد. Machado, Stürenburg و همکاران طی مطالعه ای که انجام دادند، مشخص کردند که جایگاه ژن های ESBLs بر روی اینتگرون می باشد و رابطه معنی داری بین حضور ژن های ESBLs و اینتگرون وجود دارد (۳۲،۳۱). اما برخلاف نتایج به دست آمده از این مطالعات، Ho و همکاران رابطه معنی داری بین ژن های ESBLs و اینتگرون مشاهده نکرده اند و در مطالعه ای که توسط Kang و همکاران انجام شد، این محققین به حضور ژن های ESBLs بر روی پلاسמיד اشاره نموده اند که این یافته ها با نتایج به دست آمده از این مطالعه مطابقت ندارد (۲۹،۲۱).

در نهایت می توان نتیجه گرفت که ژن های ESBLs می تواند بر روی اینتگرون قرار گیرد و به آسانی در باکتری های گرم منفی نظیر اشرشیاکلی منتقل شوند. در

- numbering scheme for the class A beta-lactamases. Biochem J 1991; 276(Pt 1): 269-270.
5. Perilli M, Celenza G, De Santis F, Pellegrini C, Forcella C, Rossolini GM, et al. E240V substitution increases catalytic efficiency toward ceftazidime in a new natural TEM-type extended-spectrum beta-lactamase, TEM-149, from Enterobacter aerogenes and Serratia marcescens clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(3): 915-919.
6. Machado E, Cantón R, Baquero F, Galán JC, Rollán A, Peixe L, et al. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. Antimicrob

- Agents Chemother 2005; 49(5): 1823-1829.
7. Yan H, Li L, Zong M, Alam MJ, Shinoda S, Shi L. Occurrence and characteristics of class1 and 2 integrons in clinical bacterial isolate from patients in south China. J Health Sci 2010; 56(4): 442-450.
8. Ramírez MS, Piñeiro S. Argentinian Integron Study Group, Centron D. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(2): 699-706.
9. Koneman EW. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 24th Informational Supplement. M100-S24 2014; 34(1): 1-226.
11. Zaniani FR, Meshkat Z, Naderi Nasab M, Khaje-Karamadini M, Ghazvini K, Rezaee A, et al. The prevalence of TEM and SHV genes among extended-spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Iran J Basic Med Sci 2012; 15(1): 654-660.
12. Dutour C, Bonnet R, Marchandin H, Boyer M, Chanal C, Sirot J. CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14 beta-lactamases from Enterobacteriaceae isolated in France. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(2): 534-537.
13. Yan ZQ, Shen DX, Cao JR, Chen R, Wei X, Liu LP, et al. Susceptibility patterns and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from three military hospitals in China. Int J Antimicrob Agents 2010; 35(3): 269-273.
14. Marty L, Jarlier V. Surveillance des bactéries multirésistantes: justification, rôle du laboratoire, indicateurs, données françaises récentes. Pathologie et Biologie 1998; 46(4): 217-226.
15. Mehrgan H, Rahbar M. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Int J Antimicrob Agents 2008; 31(2): 147-151.
16. Behrooz A, Rahbar M, Yousefi JV. Frequency of extended spectrum beta-lactamase (ESBLs) producing *Escherichia coli* and *klebsiella pneumonia* isolated from urine in an Iranian 1000-bed tertiary care hospital. Afr J Microbiol Res 2010; 4(9): 881-884.
17. Hassan SA, Jamal SA, Kamal M. Occurrence of multidrug resistant and ESBL producing *E. coli* causing urinary tract infections. Journal of Basic and Applied Science 2011; 7(1): 39-43.
18. Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Badal RE, Hsueh PR, Paterson DL. Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(8): 3280-3284.
19. Jain A, Roy I, Gupta MK, Kumar M, Agarwal SK. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria in septicemic neonates in a tertiary care hospital. J Med Microbiol 2003; 52(5): 421-425.
20. Rezaee MA, Sheikhalizadeh V, Hasani A. Detection of integrons among multi-drug resistant (MDR) *Escherichia coli* strains isolated from clinical specimens in northern west of Iran. Braz J Microbiol 2011; 42(4): 1308-1313.
21. Ho WS, Balan G, Puthuchear S, Kong BH, Lim KT, Tan LK, et al. Prevalence and characterization of multidrug-resistant and

- extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from pediatric wards of a Malaysian hospital. *Microb Drug Resist* 2012; 18(4): 408-416.
22. Moghadas AJ. Prevalence of extended-spectrum beta lactamase positive and multidrug resistance pattern of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates, Semnan, Iran. *Iran J Microbiol* 2009; 1(1): 49-53.
 23. Suzuki S, Shibata N, Yamane K, Wachino J, Ito K, Arakawa Y. Change in the prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(1): 72-79.
 24. Manouchehri M, Ahanjan M. Detection of CTX beta-lactamase Gene in *Escherichia Coli* Isolated from Urinary Tract Infection Using Polymerase Chain Reaction. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 25(129): 36-45 (Persian).
 25. Rezai MS, Salehifar E, Rafiei A, Langae T, Rafati M, Shafahi K, et al. Characterization of Multidrug Resistant Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* among Uropathogens of Pediatrics in North of Iran. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 309478.
 26. Japoni A, Gudarzi M, Farshad S, Basiri E, Ziyaeyan M, Alborzi A, et al. Assay for integrons and pattern of antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* strains by PCR-RFLP in Southern Iran. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61(1): 85-88.
 27. Najibi S, Bakhshi B, Fallahzad S, Pourshafie MR, Katouli M, Sattari M, et al. Distribution of class 1 integrons among enteropathogenic *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 2012; 58(5): 637-643.
 28. Ranjbaran M, Zolfaghari M, Japoni-Nejad A, Amouzandeh-Nobaveh A, Abtahi H, Nejad M, et al. Molecular investigation of integrons in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infections. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2013; 23(105): 20-27 (Persian).
 29. Kang HY, Jeong YS, Oh JY, Tae SH, Choi CH, Moon DC, et al. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55(5): 639-644.
 30. Mathai E, Grape M, KRONVALL G. Integrons and multidrug resistance among *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in southern India. *Apmis* 2004; 112(3): 159-164.
 31. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 2003; 47(4): 273-295.
 32. Machado E, Ferreira J, Novais Â, Peixe L, Cantón R, Baquero F, et al. Preservation of integron types among Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003). *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(6): 2201-2204.