شناسایی ژن مقاومت بتالاکتاماز CTX-M-1 در اشریشیاکلی جدا شده از نمونه‌های بالینی با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

محمد مهدی سلطان دلال[۲و۱*]
گلناز مبصری[۳]، جلیل فلاح مهرآبادی[۴]
محمد رضا اشراقیان[۵]
عبدالعزیز رستگار لاری[۲]
هدروشا ملاآقامیرزایی[۱]
آیلار صباغی[۱]، محمدآذرسا[۱]

۱- گروه باتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.
۴- انستیتو بیوانفورماتیک، تهران، ایران.
۵- گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: تهران، گروه باتوبیولوژی، بخش میکروب‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران تلفن: ۸۸۹۹۲۹۷۱-۰۲۱
email: soltanirad34@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۰/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۱/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در میان ایزوله‌های بالینی، در اکثر مواقع ناشی از تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی است. در سال‌های اخیر، تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی با طیف وسیع (ESBLs) در میان ایزوله‌های بالینی به‌ویژه باکتری Escherichia coli شیوع فراوانی یافته و از آنجا که این بتالاکتامازها شامل چندین زیر خانواده می‌باشند، طراحی و استفاده از پرایمرهای یونیورسال به‌منظور شناسایی کامل این زیر خانواده‌ها می‌تواند مفید واقع شود. تولید آنزیم بتالاکتاماز در باکتری اشریشیا کلی مشکلات فراوانی را در درمان بیماران ایجاد نموده است. ژن CTX-M-1 عامل مقاومت بتالاکتامازی می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی میزان ژن CTX-M-1 در باکتری اشریشیا کلی می‌باشد. ***روش بررسی:*** در مجموع ۵۰۰ نمونه ادراری از بیمارستان‌های شهر تهران گردآوری شده؛ پس از کشت بر روی محیط EMB آگار در دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۲۴ ساعت و انجام تست‌های بیوشیمیایی برای تایید از بین ۵۰۰ نمونه ۲۰۰ ایزوله اشریشیا کلی جداسازی شد. بررسی حضور ژن CTX-M-1 با استفاده از روش PCR بر روی ایزوله‌هایی که در تست‌های تشخیصی Diffusion agar disk و Combined disk جداسازی شده بود انجام گرفت. ***یافته‌ها:*** از ۲۰۰ سویه مورد بررسی ۱۲۸ (۶۴٪) سویه مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بوده، پس از طی پروسه PCR برای شناسایی ژن CTX-M-1 نشان داد از ۱۲۸ سویه بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مثبت ۹۹ ایزوله (۷۷/۳۴٪) حاوی ژن مورد نظر بوده است. ***نتیجه‌گیری:*** نتایج حاصل شده از این مطالعه درصد بالای مقاومت بتالاکتامازی را در بین سویه‌های اشریشیا کلی نشان می‌دهد. این مسئله یک خطر عمومی جدی را خاطر نشان می‌سازد که باید همه اقدامات برای جلوگیری از این خطر صورت گیرد.

کلمات کلیدی: اشریشیا کلی، بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، CTX-M-1، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

مقدمه

اشریشیا کلی (E.coli) یکی از شایع‌ترین عامل باکتریای است که از عفونت‌های انسانی جدا شده و باعث عفونت دستگاه ادراری، گوارشی و مننژیت در نوزادان می‌شود. این باکتری یکی از پاتوژن‌های فرصت‌طلب بیمارستانی بوده که به‌علت اکتساب پلاسمیدهایی که کدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از جمله سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف مقاوم شده‌اند از این رو درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری با مشکل روبرو شده است.[۱] آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام شامل پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها و منوباکتام‌ها و غیره می‌باشند که با اتصال به پروتیین باند شونده به پنی‌سیلین (PBPs) کـه در دیـواره سلولی باکـتری می‌باشد باعث مهار ترانس پپتیدازها و تخریب پپتیدوگلیکان و در نتیجه دیواره سلول و به‌دنبال آن باکتری از بین می‌رود.[۲] مکانیسم اصلی مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام تولید بتالاکتاماز می‌باشد این آنزیم‌ها آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را قبل از این‌که به PBPs در غشای سیتوپلاسمی برسند هیدرولیز و غیر فعال می‌کنند. بتالاکتامازها به دو صورت مولکولی (Ambler) و عملکردی (Bush- Jacoby-Medeiros) طبقه‌بندی می‌شوند. طبقه‌بندی مولکولار ابتدا توسط Ambler در سال ۱۹۸۰، هنگامی که فقط سکانس چهار اسید آمینه از بتالاکتامازها شناخته شده بود، پیشنهاد گردید. بتالاکتامازها بر اساس ساختار اولیه به چهار کلاس مولکولی A تا D تقسیم می‌شوند.[۳و۴] کلاس D، C و A بتالاکتامازهای سرینی هستند و کلاس B شامل

Archive of SID
www.SID.ir

تیپ‌های حاوی روی می‌باشد کلاس A شامل پنی‌سیلینازهای کروموزومی در باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBL) را نیز در بر می‌گیرد، کلاس C تیپ AmpC را در بر می‌گیرد که سفالوسپورین‌ها را هیدرولیز نموده و به مهارکننده‌های بتالاکتامی مقاومند، کلاس D اگزاسیلینازها (OXA) می‌باشند، منشا پلاسمیدی دارند و با کلاولانیک اسید مهار نمی‌شوند و کلاس B متالوبتالاکتامازها می‌باشند که بتالاکتامازهای حاوی روی می‌باشند و در *سودوموناس آئروژینوزا* و *باکترویید فراژیلیس* یافت می‌شوند.[۳و۴] طبقه‌بندی بتالاکتامازها به لحاظ عملکردی هنگامی شروع شد که سفالوسپورینازها از پنی‌سیلینازها متمایز شدند و به چهار گروه عملکردی تقسیم می‌شوند.[۵و۶] گروه اول: سفالوسپورینازهایی که به خوبی توسط کلاولانیک اسید مهار نمی‌شوند و به کلاس مولکولار C تعلق دارند. گروه دوم: شامل پنی‌سیلیناز و سفالوسپورینز یا هر دو که به‌طور کلی توسط مهارکننده‌های بتالاکتاماز مهار می‌شوند و متعلق به کلاس مولکولار A یا D هستند. بتالاکتامازهای این گروه (TEM, SHV, CTX-M) همواره در حال افزایش هستند و بر اساس سوبسترای خود به چندین زیر گروه تقسیم می‌شوند. گروه سوم: متالوبتالاکتاماز بوده و از یون‌های روی برای تخریب حلقه بتالاکتام استفاده می‌کنند. این آنزیم‌ها قادر به هیدرولیز پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و کارباپنم‌ها هستند. کارباپنم‌ها توسط زیر گروه 2f نیز مهار می‌شوند. اعضای این گروه به کلاس مولکولار B تعلق دارند. گروه چهارم: پنی‌سیلیناز بوده و توسط کلاولانیک اسید مهار نمی‌شوند. این گروه به هیچ کلاس مولکولی تعلق ندارد. جدیدترین مطالعات بتالاکتامازها را به چهار گروه تقسیم می‌کند: ۱- بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، ۲- مشتقات بتالاکتامازهای کلاس A مقاوم به مهار کننده‌ها، ۳- بتالاکتامازهای AmpC مرتبط با پلاسمید، ۴- بتالاکتامازهای هیدرولیزکننده کارباپنم‌ها. بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBLs) دسته‌ای از آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشند که اهمیت ویژه‌ای در درمان ضد میکروبی دارند. این آنزیم‌ها قادر به هیدرولیز کامل اکسی مینو بتالاکتام‌ها که در ساختمان نسل سوم سفالوسپورین‌ها وجود دارد، می‌شود. این آنزیم‌ها ابتدا در دهه ۱۹۸۰ تشخیص داده شدند که بیشتر از نوع SHV, TEM بودند و در نتیجه جهش‌های نقطه‌ای از آنزیم‌های اصلی فاقد فعالیت وسیع‌الطیف ایجاد شده‌اند. خانواده CTX-M از ESBLها در سال ۱۹۸۹ برای اولین‌بار از آلمان گزارش شد و پس از آن در نقاط مختلف دنیا گسترش یافت. این آنزیم غالباً در اشرشیا کلی، کلبسیلا گزارش شده اما از سایر انتروباکتریاسه نیز دیده شده است.[۷] این خانواده از ESBLها به پنج گروه تقسیم می‌شوند: ۱- گروه CTX-M 1,3 شامل: CTX-M 1,3,10,12,15,22,23,28، ۲- گروه CTX-M 2 شامل: CTX-M 2,4,5,6,7,20، ۳- گروه CTX-M 8 شامل CTX-M 8، گروه CTX-M 9 شامل CTX-M 9,13,14,16,17,19,21,24,27، ۵- گروه CTX-M 25 شامل CTX-M 25. این بتالاکتامازها ارتباط ژنتیکی کمی با اعضاء بتالاکتامازهای TEM و SHV دارند و در عوض همانندی بالایی میان آنزیم کروموزومی AmpC (خصوصا KLU-1 و KLU-2) با آنزیم‌های CTX-M وجود دارد و نظریاتی دال بر هم مشتق بودن این آنزیم‌ها از یک گونه وجود دارد.[۸] بررسی‌های کینتیکی جدید نشان می‌دهد که آنزیم‌های CTX-M سفالوتین و سفالوریدین را بهتر از بنزیل پنی‌سیلین هیدرولیز می‌کنند، همچنین این آنزیم‌ها سفوتاکسیم را بیشتر از سفتازیدیم هیدرولیز می‌نمایند و غالباً میزان هیدرولیز سفتازیدیم در حدی نمی‌باشد که باعث مقاومت بالینی باکتری به این آنتی‌بیوتیک شود. حضور یک اسید آمینه سرین در موقعیت ۲۳۷ که در تمامی آنزیم‌های CTX-M وجود دارد نقش اساسی در طیف گسترده فعالیت بتالاکتامازی این آنزیم‌ها دارد.[۹]

روش بررسی

در این مطالعه ۵۰۰ نمونه بالینی شامل ادرار، مدفوع، خون که در طی شش ماه از مهر لغایت اسفند ۱۳۸۸ از بیمارستان‌های شهر تهران شامل مفید، امام خمینی، شریعتی، لبافی‌نژاد جمع‌آوری شده و پس از کشت بر روی محیط EMB آگار و انجام تست‌های بیوشیمیایی افتراقی نظیر TSI، سیمون سیترات، اوره آز، MR/ VP، SIM، لیزین دکربوکسیلاز آگار و با استفاده از جداول استاندارد، ایزوله‌های E.coli جداسازی گردیدند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی با انجام تست آنتی‌بیوگرام از طریق روش انتشار دیسک (Disk diffusion method) و با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک تهیه شده از شرکت MAST شامل: جنتامایسین (۱۰µg)، کوتریموکسازول (۱/۲۵µg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، ایمی‌پنم (۱۰µg)، سفتازیدیم (۳۰µg)، آموکسی‌سیلین (۳۰µg)، کلرامفنیکل

Archive of SID
www.SID.ir

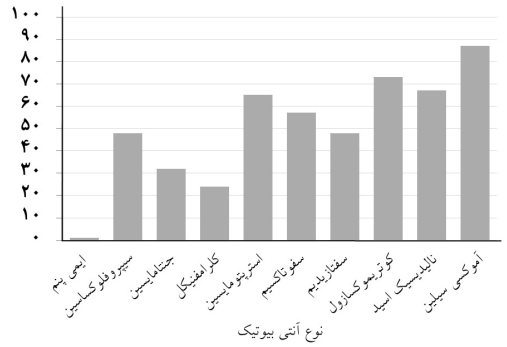
(۳۰µg)، استرپتومایسین (۱۰µg) تعیین گردید. باکتری‌های مقاوم به نماینده سفالوسپورین‌ها جهت بررسی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف با روش Combined disk، با استفاده از دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰µg)، سفتازیدیم + کلاوونیک اسید (۳۰µg–۱۰) و سفوتاکسیم (۳۰µg)، سفوتاکسیم + کلاوونیک اسید (۳۰µg–۱۰) تهیه شده از شرکت Mast مورد مطالعه قرار گرفت. تولید ESBL از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵mm یا بیشتر در اطراف دیسک سفتازیدیم- کلاوولانیک اسید و یا سفوتاکسیم- کلاوولانیک مشخص گردید. سپس برای انجام واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) ابتدا DNA را پس از کشت برروی محیط مولر هینتون آگار، بر اساس روش Boiling استخراج کرده و یک جفت پرایمر برای ژن بتالاکتامازی CTX-M-1 طراحی شده با توالی:

CTX- M-1/F :5'-CGTGGCGATGAATAAGCTG-3'
CTX- M-1/R :5- GGTGGTATTGCCTTTCATCC-3'

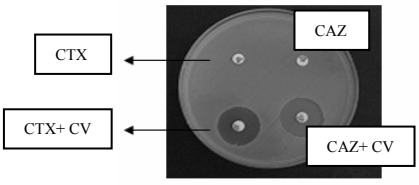
واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵µl شامل: ۵۰mM، ۱/۵µl $MgCl_2$، ۲/۵µl بافر 10x، ۱۰mM، ۱µl dNTP، ۱µl پرایمر ۵۰Pmol/µl از هر کدام، (۵U/µl)، ۱/۵µl Taq DNA polymerase، ۲µl DNA الگو ۵۰Pmol/µl و ۱۴/۵µl در طی ۴۰ سیکل، تحت برنامه زمانی ترموسایکلر شامل: مرحله اولیه باز شدن دو رشته DNA به‌مدت سه دقیقه در دمای ۹۴ °C، مرحله باز شدن دو رشته به‌مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ °C، مرحله اتصال پرایمرها به‌مدت یک دقیقه در دمای ۵۹ °C، مرحله طویل شدن رشته هدف به‌مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ °C و مرحله طویل شدن نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ °C انجام شد. قطعه مورد نظر از طریق واکنش زنجیره پلیمرازی فراوان‌سازی شده و یکی از نمونه‌ها که از نظر اندازه با سایز مورد نظر هماهنگی داشت برای توالی‌یابی به خارج از کشور فرستاده شد و پس از تایید صحت آن، به‌عنوان کنترل مثبت به‌کار گرفته شد. محصولات PCR، ۲۵۱bp بعد از الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

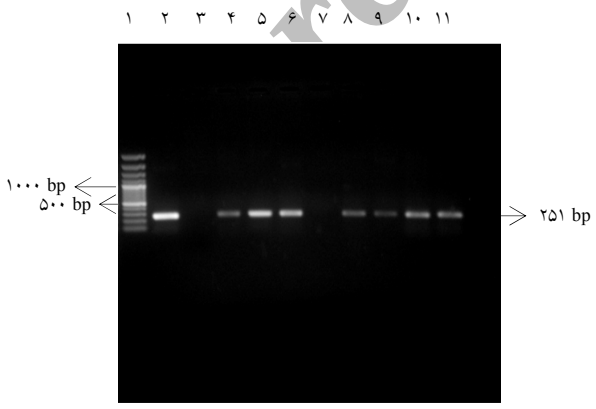
از ۲۰۰ نمونه مورد بررسی، ۱۲۵ (۶۲/۵٪) نمونه ادرار، ۴۸ نمونه (۲۴٪) مدفوع، ۱۸ (۹٪) نمونه خون، ۹ (۴/۵٪) از سایر نمونه‌ها بوده که پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی ۲۰۰ ایزوله اشریشیا کلی جداسازی شده که از آن‌ها برای تست انتشار دیسک استفاده می‌شود. نتایج حاصل از مقاومت دارویی به ۱۰ آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در روش انتشار دیسک در نمودار ۱ بیان شده است. نتایج حاصله از آزمایش Combined disk نشان داد که از میان ۲۰۰ ایزوله اشریشیا کلی ۱۲۸ (۷۹/۵٪) نمونه مولد بتا لاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌باشد (شکل ۱). قابل‌توجه است که بیشترین مولّدین آنزیم‌های بتالاکتامازی (۸۰٪) متعلق به نمونه‌های ادراری بوده است. در آزمایش PCR برای تشخیص ژن CTX-M-1 مشخص شد که ۹۹ (۷۷/۳۴٪) ایزوله اشریشیا کلی مولد ESBLs حاوی ژن مورد نظر بودند (شکل ۲).



نمودار-۱: مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مورد بررسی در این مطالعه



شکل-۱: تشخیص فنوتیپی مولدین ESBLs مثبت



شکل-۲: ژل آگارز حاوی نمونه‌های PCR ژن CTX-M-1 در اشریشیا کلی

۱: مارکر 100bp، ۲: کنترل مثبت برای bla- CTX-M، ۷و۳: کنترل منفی، ۱۱-۸و۶و۵و۴: ایزوله بالینی مثبت برای CTX-M

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف یکی از خطرهای جدی در درمان عفونت‌های دارای مقاومت چندگانه می‌باشد که از زمان کشف آن‌ها در سال ۱۹۸۰ به‌سرعت در سطح جهان گسترش یافته‌اند و به‌عنوان یکی از معضلات بهداشت عمومی خود را نمایان ساخته است و مهم‌ترین دلیل آن می‌تواند مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی باشد.[۱۰] تا اواخر سال ۱۹۹۹ اغلب ESBLهای جدا شده از بیماران شامل SHV و TEM بود اما در مطالعات اخیر، CTX-M بتالاکتاماز وسیع‌الطیف غالب جدا شده از بیماران می‌باشد و در سرتاسر جهان اعضاء انتروباکتریاسه حاوی ژن bla_{CTX-M} جداسازی می‌شود.[۱۱] ارایه گزارش‌های متفاوت از نواحی مختلف جغرافیایی بر نقش مطالعات منطقه‌ای و اختصاصی بروز مقاومت‌ها تأکید دارد. لذا با بررسی نمونه‌هایی از بیمارستان‌های شهر تهران و تعیین میزان فراوانی سویه‌های تولیدکننده آنزیم ESBL و شناسایی میزان نقش آنزیم CTX-M-1 در مقاومت به نسل سوم سفالوسپورین‌ها از اولویت‌های این تحقیق قرار گرفت. بررسی ما نشان می‌دهد که از میان ایزوله اشریشیا کلی ۱۶۱، (۷۹/۵٪) ۱۲۸ نمونه مولد ESBLs بوده که (۷۷/۳۴٪) ۹۹ مورد از آن‌ها حاوی ژن CTX-M-1 می‌باشد. همچنین ژن‌های TEM و SHV به‌ترتیب (۵۷/۸٪) ۷۴ و (۵/۵٪) ۷ حضور داشتند.[۱۳و۱۴] در مطالعات مشابهی، Pak- Leung Ho در هنگ‌کنگ در دانشگاه Pokfulam به‌بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی وسیع‌الطیف در اشریشیا کلی و کلبسیلا با بررسی ۴۶ نمونه اشریشیا کلی و هشت نمونه کلبسیلا پنومونیه با روش DDST توانستند باکتری‌های مولد ESBL را شناسایی کنند، که از بین ۴۶ نمونه، هشت اشریشیا کلی و از بین هشت نمونه کلبسیلا پنومونیه، چهار مورد مولد ESBL بودند. همچنین از میان این باکتری‌های مقاوم هفت مورد دارای پلاسمید CTX-M بودند، که توانستند انواع $CTX\text{-}M_{۹}$، $CTX\text{-}M_{۳۸}$، $CTX\text{-}M_{۲۴}$، $CTX\text{-}M_{۱۴}$ را شناسایی کنند و همچنین ژن‌های TEM1b و TEM1c و نیز SHV را در این نمونه‌ها مشاهده نمایند[۱۴]. Jonas Bonnedahl با مطالعه بر روی انتروباکتریاسه‌های دارای مقاومت وسیع‌الطیف در جنوب فرانسه به بررسی کلبسیلا پنومونیه و اشریشیا کلی در نمونه‌های بالینی پرداخت و با استفاده از نوارهای MIC و نیز با انجام PCR و با بررسی ژن‌های bla_{TEM}، bla_{SHV}، bla_{CTX-M} به این نتیجه رسید که ۴۷/۱٪ نمونه‌های دارای مقاومت نسبت به یک یا چند آنتی‌بیوتیک نظیر تتراسایکلین، آمپی‌سیلین و غیره داشته که از این میان ۹/۴٪ آن‌ها مولد آنزیم‌های ESBL بوده و ۶٪ از این گروه نیز حامل پلاسمید CTX-M می‌باشند.[۱۵] Shahcheraghi که بر روی ۲۰۰ سویه اشریشیا کلی از نمونه‌های بالینی مختلف مطالعه کرده با استفاده از تست‌های DAD و PCR نشان داد که ۵۲/۵٪ دارای ژن ESBL هستند که ۲۴٪ از سویه‌ها دارای ژن TEM و ۶٪ از سویه‌ها دارای ژن SHV بودند.[۱۶] Mirzaee، ۱۶۰ ایزوله اشریشیا کلی را از نظر تولید بتالاکتامازهای CTX-M با روش PCR بررسی کرد که ۳۷/۸٪ نمونه‌ها مثبت بودند. گروه CTX-M-1، ۳۵/۷۸٪ و گروه CTX-M-5، ۲/۱٪ از موارد مثبت را تشکیل می‌دادند.[۱۷] مطالعات وسیع‌تر و شناسایی انواع گونه‌ها و زیر گونه‌های آنزیم‌های بتالاکتامازی وسیع‌الطیف در شناسایی نوع آنتی‌بیوتیک‌های موثر در درمان عفونت‌های مقاوم و جلوگیری از گسترش مقاومت‌ها مفید و ثمربخش می‌باشد، همچنین شناسایی کلون‌های شایع باکتریایی می‌تواند در ارایه استراتژی‌های واحد درمانی و مدیریت بیمارستانی بر مقاومت‌ها موثر باشد.

References

1. Sanchez UM, Bello TH, Dominguez YM, Mella MS, Zemelman ZR, Gonzalez RG. Transference of extendedspectrumbeta-lactamases from nosocomial strains of Klebsiella pneumoniae to other species of Enterobacteriaceae. *Rev Med Chil* 2006;134(4):415-20.
2. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8(4):557-84.
3. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980;289(1036):321-31.
4. Medeiros A, Mayer K, Opal SM. Plasmid beta-lactamases. *Antimicrobiol Newsl*1988;5:61-5.
5. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases. *Res Microbiol* 2004;155(6):409-21.
6. Matthew M. Plasmid-mediated beta-lactamases of Gram-negative bacteria: properties and distribution. *J Antimicrob Chemother* 1979;5:349-58.
7. Bush K. Classification of b-lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1989;33(3):264–270.
8. Duttaroy B, Mehta S. Extended spectrum b lactamases (ESBL) in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. *Indian J Pathol Microbiol* 2005;48(1):45-8.
9. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008;14 Suppl 1:33-41.

Archive of SID
www.SID.ir

10. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;14 Suppl 1:144-53.
11. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006;9(5):466-75.
12. Soltan Dallal MM, Molla Aghamirzaei H, Fallah Mehrabadi J, Sabbaghi A, Rastegar Lari A, Eshraghian MR, et al. Molecular detection of TEM and AmpC (Dha, mox) broad spectrum β-lactamase in clinical isolates of Escherichia coli. *Tehran Uni Med J (TUMJ)* 2010;68(6):872-7.
13. Soltan Dallal MM, Sabbaghi A, Fallah Mehrabadi J, Molla Aghamirzaei H, Rastegar Lari AA, Eshraghian MR, et al. Evaluation of presence the bla-SHV and bla-AmpC (CITM, FOX) β-lactamase genes in clinical isolates of Escherichia coli. *J Med Council of Islamic Rep of Iran* 2010;28(3):269-76.
14. Ho PL, Wong RC, Chow KH, Yip K, Wong SS, Que TL. CTX-M type beta-lactamases among fecal Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates in non-hospitalized children and adults. *J Microbiol Immunol Infect* 2008;41(5):428-32.
15. Bonnedahl J, Drobni M, Gauthier-Clerc M, Hernandez J, Granholm S, Kayser Y, et al. Dissemination of Escherichia coli with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France. *PLoS One* 2009;4(6):e5958.
16. Shahcheraghi F, Nasiri S, Noveiri H. The survey of genes encoding beta-lactamases, in Escherichia Coli resistant to beta-lactam and non-beta-lactam antibiotics. *Iranian J Basic Med Sci* 2010;13(1):230-7.
17. Mirzaee M, Pourmand MR, Chitsaz M, Mansouri S. Antibiotic resistance to third generation cephalosporins due to CTX-M-type extended-spectrum β-lactamases in clinical isolates of Escherichia coli. *Iranian J Publ Health* 2009;38(1):10-7.

Archive of SID

www.SID.ir

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 1, April 2011: 16-21

Detection of CTX-M-1 beta lactamase gene in Escherichia coli isolated from clinical samples by Polymerase Chain Reaction (PCR)

Mohammad Mehdi Soltan Dallal PhD.[1,2*]
Golnaz Mobasseri MSc.[3]
Jalil Fallah Mehrabadi PhD.[4]
MohammadReza Eshraghian PhD.[5]
Abdolaziz Rastegar Lari PhD.[2]
Hedrosha Molla Aghamirzaei MSc.[1]
Aylar Sabbaghi MSc.[1]
Mohammad Azarsa MSc.[1]

1- Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Antimicrobial Resistant Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran.
4- MARS Bioinformatics Institute, Tehran, Iran.
5- Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Dept. of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-88992971
email: soltanirad34@yahoo.com

Received: January 18, 2011 Accepted: February 19, 2011

Abstract

Background: Resistance to beta-lactam antibiotics in clinical isolates frequently results from the production of β-lactamase enzymes. In recent years, the production of extended spectrum β-lactamases (ESBLs) and AmpC β-lactamase have greatly increased, especially in clinically isolated Escherichia coli. On the other hand, beta lactamase genes have several subfamilies and designing universal primers could be valuable in their detection. The beta-lactamase-producing E. coli which is resistant to beta-lactam antibiotics may pose a great risk to the patients. The CTX-M-1 gene is responsible for beta lactamase resistance. The purpose of this study was to find the percentage of CTX-M-1 carrying E. coli strains.

Methods: A total of 500 urine samples were collected from different hospitals in Tehran, Iran during September to February 2009. The samples were cultured on EMB agar and incubated at 37° C for 24 hours. Some biochemical tests were carried out on the isolated samples. The presence of CTX-M-1 gene was determined by PCR on the isolates already identified phenotypically by disk diffusion agar and combined disks.

Results: In general, 200 out of the initial 500 samples were identified as E. coli, among which 128 (79.5%) were ESBLs producing strains. PCR used for the detection of CTX-M-1 gene, showed that 99 (77.34%) out of 128 isolates contained such gene.

Conclusion: The results of this study showed a high percentage of β-lactamase resistant E. coli strains. This is a serious matter and would pose a public hazard and every step should be taken to avoid such hazard.

Keywords: *E. coli*, extended spectrum beta lactamase, CTX-M-1.

Archive of SID

www.SID.ir