مجله‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دوره‌ی ۱۹، شماره‌ی ۷۷، زمستان ۱۳۹۰، صفحات ۵۳ تا ۶۱

فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف و گروه CTX-M-I در سویه‌های اشریشیا کلی جدا شده از عفونت‌های ادراری به دو روش فنوتیپی و PCR در خوی، ایران

دکتر محمدکاظم شریفی یزدی[۱]، محمدآذرسا[۲]، دکتر محمد حسن شیرازی[۱]، دکتر عبدالعزیز رستگار لاری[۳]، دکتر پرویز اولیاء[۴]، دکتر جلیل فلاح مهرآبادی[۵]، هدروشا ملاآقامیرزایی[۶]، آیلار صباغی[۶]، فرناز شامکانی[۷]، گلناز مبصری[۶]، روناک بختیاری[۶]، دکتر محمد مهدی سلطان دلال[۸]

نویسنده‌ی مسؤول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده‌ی بهداشت، بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی soltanirad34@yahoo.com

دریافت: ۸۹/۱۲/۱۰ پذیرش: ۹۰/۵/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: *مهم‌ترین عامل مقاومت به سفالوسپورین‌ها باکتری‌های اشریشیا کلی تولید کننده‌ی بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) می‌باشد. طی دهه‌ی اخیر آنزیم‌های نوع CTX-M در اروپا، کانادا و آسیا شایع‌ترین نوع را در میان بتالاکتامازهای وسیع الطیف به خود اختصاص داده‌اند. لذا هدف از این مطالعه بررسی شیوع باکتری‌های اشریشیا کلی تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف و نیز گروه CTX-M-I به روش مولکولی می‌باشد.*

روش بررسی: *در این مطالعه طی ٦ ماه ٤٠٠ نمونه ادرار از بیماران بستری و سرپایی بیمارستان‌های خوی جمع‌آوری و ۱۸۸ ایزوله اشریشیا کلی توسط آزمایش های بیوشیمیایی تایید شدند. در مرحله بعد تست تعیین حساسیت نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک منتخب توسط روش دیسک آگار دیفیوژن انجام شد. سپس با استفاده از روش دیسک ترکیبی و سینرژیسم دوبل، سویه‌های تولید کننده ESBL شناسایی گردیدند. در نهایت باستفاده از روش PCR سویه‌های تولید کننده آنزیم‌های گروه CTX-M-I مشخص شدند.*

یافته‌ها: *نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که از کل ۱۸۸ ایزوله‌ی اشریشیاکلی ۵۶ (۲۹/۸٪) ایزوله تولید کننده ESBL می‌باشند. همه ایزوله‌ها به ایمی پنم حساس بودند. طی روش PCR نیز مشخص شد که از این میان ٤٩ (۸۷/۵٪) ایزوله تولیدکننده آنزیم‌های گروه CTX-M-I هستند.*

نتیجه‌گیری: *نتایج این مطالعات نشان داد که حدود ۳۰٪ اشریشیاکلی‌ها تولید کننده ESBL هستند. با توجه به ضرورت روش‌های مولکولی در شناسایی ESBL، به استفاده از روش‌های مولکولی در اینگونه تحقیقات توصیه می‌شود.*

واژگان کلیدی: اشریشیا کلی، بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، CTX-M-1، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

۱- دکترای تخصصی میکروب‌شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- دکترای تخصصی میکروب شناسی، استاد مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴- دکترای تخصصی میکروب شناسی، استاد دانشگاه شاهد
۵- دکترای تخصصی میکروب شناسی، استادیار انستیتو بیوانفورماتیک تهران
۶- کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۷- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز واحد بین الملل (ارس)
۸- دکترای تخصصی میکروب شناسی، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

بـه‌دلیـل اسـتفاده‌ی گـسترده از آنتـی‌بیوتیـک‌هـای بتالاکتـام، طـی چنـد دهـه‌ی اخیـر بتالاکتامازهـای مختلـف ظـاهر شـده انـد. بتالاکتامازهـای وسـیع الطیـف [Extended Spectrum B-lactamases (ESBLs)] آنزیم‌هـایی هستند که بـه‌وسـیله‌ی باسـیل‌هـای گـرم منفـی تولیـد شـده، قادر بـه بـازکردن حلقـه‌ی بتالاکتـام اکـسی مینـو بتالاکتـام‌هـا (Oximino- β-lactams) از قبیل نسل سوم سفالوسپورین‌هـا می‌باشند. این آنزیم‌ها به وسیله‌ی ممانعت کننده‌های بتالاکتاماز از قبیل کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می‌شـوند (١). بتالاکتامازهـا بـه دو صـورت مولکـولی (Ambler) و عملکـردی (Bush- Jacoby- Medeiros) طبقـه‌بنـدی می‌شوند. بتالاکتامازهای وسیع الطیف بـه لحـاظ مولکـولی در کلاس A و به لحاظ عملکردی در گروه 2be قرار دارند (٢). این آنزیم‌ها معمولا بر روی پلاسـمید قـرار داشـته، بیـشتر در کلبسیلا پنومونیه، اشریشیاکلی و دیگر باسیل‌هـای گـرم منفـی یافت می‌شوند (٣). باکتری اشریشیاکلی یکـی از عوامـل مهـم عفونت‌های ادراری در انسان می‌باشد. مقاومت اشریشیاکلی به اکسی مینوسفالوسپورین‌هـا (Oxyimino-Cephalosporins) از قبیل سفتازیدیم و سفوتاکسیم در اثـر تولیـد بتالاکتامازهـای وسیع الطیف رخ می‌دهـد (٤). بتالاکتامازهـای وسـیع الطیـف ابتدا در دهـه ١٩٨٠ تـشخیص داده شـدند کـه بیـشتر از نـوع TEM و SHV بودند. این آنـزیم‌هـا در نتیجـه جهـش‌هـای نقطه‌ای (Point Mutation) از آنزیم‌های اصلی فاقد فعالیت وسیع الطیف ایجاد شـده‌انـد (٥). خـانواده‌ی CTX-M بـرای اولین بار در سال ١٩٨٩ از آلمان گزارش شد و سپس در نقاط مختلـف جهـان گـسترش پیـداکرد. ایـن آنـزیم بیـشتر در اشریشیاکلی و کلبـسیلا پنومونیـه گـزارش شـده امـا در سـایر انتروباکتریاسه نیز یافت می‌شود (٦). طی دهه‌ی اخیـر ESBL های نوع CTX-M جایگزین نوع TEM و SHV در اروپا، کانادا، آسیا و افریقا شده، شایع‌تـرین نـوع ESBL را در ایـن نواحی تشکیل می‌دهند (١١-٧). بتالاکتامازهای وسـیع الطیـف گروه CTX-M بـه‌خـاطر فعالیـت بیـشتر علیـه سفوتاکـسیم نسبت به سفتازیدیم از دیگر گروه‌های ESBL ماننـد TEM و SHV متمایز می‌شوند. برخلاف نامشان بعـضی از اعـضای این گروه سفتازیدیم را بسیار سریع‌تر از سفوتاکسیم هیدرولیز می‌کنند (١٢). این آنزیم‌ها بر اساس تغییرات اسید آمینه به پنج گـروه اصـلی (CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9, CTX-M25) تقسیم می‌شوند (٢). تاکنون بیش از ٤٠ نوع آنـزیم CTX-M شناسایی شده است که آنزیم‌هـای CTX-M-2 ، CTX-M-3 و CTX-M-14 بیـشترین انتـشار را در سراسـر جهـان بـه خـود اختصاص داده‌اند (١٢). طی بررسی‌هایی که در سال‌های اخیر در ایـران انجـام شـده، بتالاکتامازهـای وسـیع الطیـف نـوع CTX-M افزایش پیدا کرده‌اند و بیـشترین شـیوع CTX-M مربوط به گروه CTX-M-I می‌باشد (١٦-١٣). هدف از ایـن مطالعه بررسی فراوانی ESBL و نیـز گـروه CTX-M-I در اشریشیاکلی ایزوله شده از عفونت ادراری بود.

روش بررسی

ایـن مطالعـه‌ی توصـیفی بـر روی ٤٠٠ نمونـه‌ی ادرار از بیمـاران مبـتلا بـه عفونـت ادراری بـستری و سـرپایی بیمارستان‌های شهید مدنی و قمربنی هاشم خـوی و نیـز یـک آزمایشگاه تشخیص طبی در طی ٦ ماه از آبان ماه سـال ١٣٨٨ تا فروردین ١٣٨٩ انجام پذیرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شـده بر روی محیط کشت انتخابی Eosin Methylene Blue Agar (EMB) کشت داده شدند. سپس با استفاده از تـست‌هـای بیوشـیمیایی نظیـر TSI، سـیمون سـیترات، اوره آز، MR/VP، SIM و لیـزین دکربوکـسیلاز تعیـین هویـت گردیدنـد. کلنـی‌هـای مربـوط بـه ایزولـه‌هـای *E.coli* در Skim Milk Broth در ٧٠- درجـه‌ی سـانتی‌گـراد ذخیـره شـدند تـا در مراحـل بعدی از ایـن ایزولـه‌هـا اسـتفاده شـود. بـه پیـشنهاد سـازمان CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)، بـه

منظور شناسایی اولیه‌ی ارگانیسم‌های تولید کننده‌ی ESBL، از آزمون دیسک آگار دیفیوژن [Disk Agar Diffusion (DAD)] استفاده گردید (٤). الگوی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن با دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۱/۲۵ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، آموکسی سیلین (۳۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم) و استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم) که از شرکت Mast تهیه شده بودند، انجام پذیرفت. هرگونه کاهش حساسیت در این سویه‌ها می‌تواند گواهی بر وجود این مقاومت باشد. برای این منظور، به پیشنهاد سازمان جهانی CLSI از آزمون Combined disk استفاده شد (۱۷). در این آزمون همانند الگوی روش DAD غربالی، پس از تهیه محیط مولرهینتون آگار، سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند به طور کامل در محیط مذکور پخش شد. سپس دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم-کلاولانیک اسید (۳۰-۱۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) و سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید (۳۰-۱۰ میکروگرم) به فاصله‌ی حداقل ۲/۵ سانتی‌متر از یکدیگر بر روی محیط قرار گرفتند. پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، هاله‌ی عدم رشد اطراف دیسک‌های حاوی کلاولانیک اسید نسبت به بدون کلاولانیک اسید سنجیده شد. به‌طوری که اگر هاله‌ی عدم رشد اطراف دیسک سفتازیدیم-کلاولانیک اسید بزرگ‌تر یا مساوی ۵ میلی‌متر نسبت به سفتازیدیم به تنهایی باشد و یا اینکه هاله‌ی عدم رشد اطراف دیسک سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید بزرگ‌تر یا مساوی ۳ میلی‌متر نسبت به سفوتاکسیم به تنهایی باشد، سویه‌ی مورد نظر را می‌توان بر طبق ضابطه‌ی CLSI، به‌عنوان مولد ESBL در نظر گرفت (۱۷). DNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده‌ی کیت (Bioneer) استخراج شد. سپس محصول استخراج بر روی ژل آگارز برده شد و پس از الکتروفورز و اطمینان از سالم بودن محصول DNA، جهت PCR استفاده گردید. جهت طراحی پرایمر از توالی‌های مربوط به ژن‌های گروه CTX-M-I در باکتری اشریشیا کلی که در بانک ژن ثبت شده بود، استفاده گردید. توالی‌های موجود با استفاده از برنامه‌ی MEGA 4 Multiple-Alignment همتراز شدند. سپس نواحی مشترک در زیر خانواده‌ها مشخص گردید و طراحی پرایمر با استفاده از برنامه Generunner انجام شد. به منظور اطمینان از عملکرد اختصاصی این پرایمرها از برنامه‌ی BLAST در NCBI استفاده گردید. توالی پرایمرهای مذکور به شکل زیر می‌باشد.

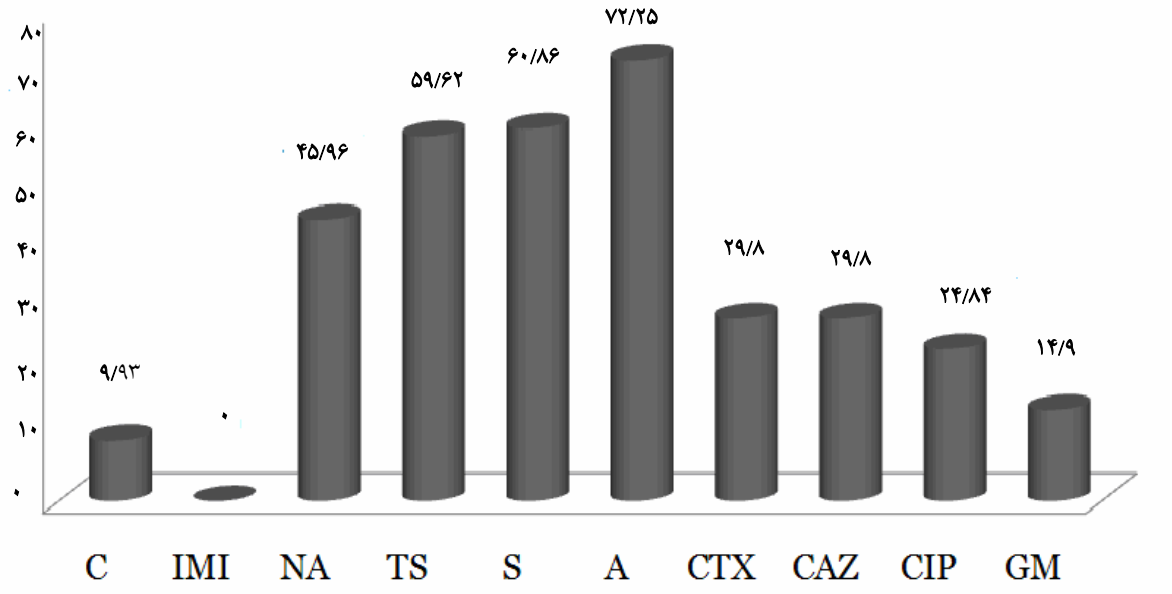
CTX-M-I (group 1)
F :5'- CGTGGCGATGAATAAGCTG-3'
R :5'- GGTGGTATTGCCTTTCATCC-3'

در این فرآیند DNA استخراج شده به همراه پرایمرهای مربوط به ژن‌های گروه CTX-M-I در سویه‌های غربال مثبت، در مخلوط واکنش ترکیب شده و جهت تکثیر DNA، PCR صورت گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (50 mM، MgCl2 1.5 µl، 2.5 µl بافر 10x، 10 mM، dNTP 1 µl، 1 µl پرایمر 50 Pmol/µl از هرکدام، (5 U/µl) Taq DNA polymerase 1.5 µl، DNA ۲ µl الگو 50 Pmol/µl و 14.5 µl H2O) در طی ٤٠ سیکل، تحت برنامه‌ی زمانی ترموسایکلر شامل: مرحله‌ی اولیه‌ی باز شدن دو رشته DNA به مدت سه دقیقه در دمای ٩٤ درجه‌ی سانتی‌گراد، مرحله‌ی باز شدن دو رشته به مدت یک دقیقه در دمای ٩٤ درجه‌ی سانتی‌گراد، مرحله اتصال پرایمرها به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۹ درجه‌ی سانتی‌گراد، مرحله طویل شدن رشته‌ی هدف به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و مرحله طویل شدن نهایی به مدت ده دقیقه در دمای

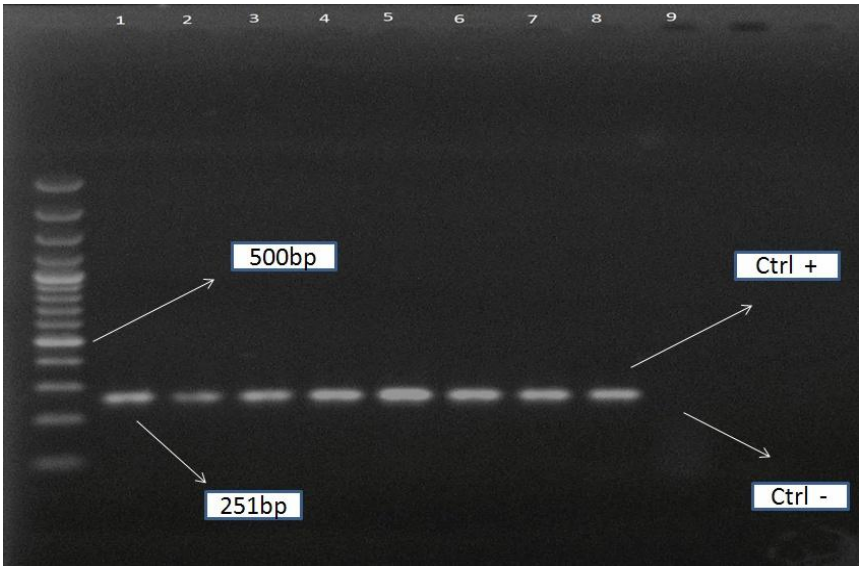
۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. قطعه‌ی مورد نظر از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز فراوان سازی شده، محصولات ۲۵۱bp بعد از الکتروفورز بر روی ژل آگارز، مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس محصول الکتروفورز از روی ژل استخراج گردید و جهت سکانسینگ ارسال شد. محصول سکانسینگ با استفاده از فرمت FASTA همتراز (Alignment) شد که در نهایت تشابه بالایی (۸۸/۵ درصد) با ژن اصلی مشاهده شد که این امر صحت طراحی پرایمرها و تکثیر درست و مناسب قطعه‌ی مورد نظر در طی روند PCR را نشان می‌دهد.

یافته ها

از ۴۰۰ نمونه‌ی ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری مورد بررسی، ۱۸۸ سویه‌ی *E.coli* جدا و توسط آزمون‌های بیوشیمیایی تایید شدند. بر اساس نتایج حاصل از آزمون غربالی DAD، ۵۶ (۲۹/۸ درصد) سویه به‌عنوان تولید کننده ESBL مطرح شدند. در طی آزمون سینرژیسم دوبل کل ۵۶ سویه‌ی به‌عنوان تولیدکننده‌ی نهایی ESBL تایید شدند. نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک انتخاب شده نیز در نمودار ۱ نشان داده شده است. در این آزمون هیچ سویه‌ی مقاومی نسبت به ایمی پنم مشاهده نشد. در طی روش PCR که بر روی ۵۶ سویه ESBL انجام شد، مشخص شد که از این میان ۴۹ (۸۷/۵ درصد) سویه‌ی تولیدکننده آنزیم‌های گروه CTX-M-I هستند (شکل ۱).



نمودار ۱: بررسی میزان مقاومت نسبت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک منتخب. C: کلرامفنیکل، IMI: ایمی پنم، NA: نالیدیکسیک اسید، TS: کوتریموکسازول، S: استرپتومایسین، A: آموکسی سیلین، CTX: سفوتاکسیم، CAZ: سفتازیدیم، CIP: سیپروفلوکساسین، GM: جنتامایسین.



شکل ۱: ژل آگارز حاوی نمونه‌های PCR حاصل از تکثیر ژن‌های گروه CTX-M-I. سمت چپ مارکر bp ۱۰۰، ۱ تا ۷: ایزوله‌های مثبت، ۸: کنترل مثبت، ۹: کنترل منفی.

بحث

ESBL ها اغلب توسط پلاسمید منتقل می‌شوند و این پلاسمیدها علاوه بر ژن‌های ESBL، ژن‌های مقاومت به دیگر کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی را نیز باخود حمل می‌کنند. این پلاسمیدها به سهولت بین سویه‌ها و نیز گونه‌های مختلف از باسیل‌های گرم منفی روده‌ای منتقل می‌شوند (۱۸). با توجه به شیوع بالای ESBL ها (٦٤ درصد) در تهران نسبت به کشورهای مختلف جهان، احتمالا یکی از مهم‌ترین دلایل این قضیه، مصرف خودسرانه و بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در ایران می‌باشد (۲۰و۱۹). باتوجه به شیوع ۲۹/۸ درصدی آنزیم‌های ESBL در این مطالعه در مقایسه با شیوع ٦٤ درصدی که از تهران گزارش شده، شیوع این نوع از آنزیم‌ها درخوی نسبت به تهران کمتر می‌باشد اما شیوع ۸۷/۵ درصدی گروه CTX-M-I قابل توجه می‌باشد (۱۹ و ۱۳). در سال‌های اخیر آنزیم CTX-M به‌عنوان شایع‌ترین نوع ESBL از اروپا، آمریکای شمالی و آسیا گزارش شده و انواع تیپ‌های مختلف از این نوع آنزیم شناسایی شده‌اند (۲۱و۷). در غرب تولید ESBL در آنتروباکتریاسه از ۵ تا ۵۲ درصد ودر دیگر کشورهای آسیایی از ۱۰ تا ٤٦/٥ در صد متفاوت است (٤). درهندوستان CTX-M با شیوع ۸۵/٤ درصد رایج‌ترین ESBL بوده، همه‌ی CTX-M های گزارش شده به گروه CTX-M-I تعلق داشته است، CTX-M-3 شایع‌ترین آن‌ها می‌باشد (۲۲). در ایتالیا نیز شیوع CTX-M به‌طور کامل متعلق به گروه CTX-M-I می‌باشد که انواع CTX-M-15 و CTX-M-1 به ترتیب با شیوع ۳۰ و ٦۰ درصدی بیشترین موارد را تشکیل می دهد (۲۳). در آرژانتین و ژاپن CTX-M-2 و CTX-M-3 بیشتر از همه شیوع دارند (۲۵ و ۲٤). در ایران نیز مطالعات پراکنده‌ای در مورد ESBL ها صورت گرفته که ناکافی بوده، نیاز به مطالعات بیشتر در نقاط مختلف جغرافیایی از کشورمان می‌باشد. مطالعات در مورد گروه CTX-M نیز کمتر بوده، بیشتر محدود به شهر تهران

می‌شود. در مطالعه‌ی میر صالحیان و همکاران که از روش‌های DAD و PCR استفاده شد از ۱۵۰ ایزوله آنتروباکتریاسه، ۵۹/۳ درصد به‌عنوان تولید کننده‌ی ESBL تعیین شدند که به ترتیب کلبسیلا پنومونیه، اشریشیاکلی و آنتروباکتر بیشترین موارد را شامل می‌شدند. در این مطالعه بتالاکتاماز TEM با شیوع ۵۵/۵ درصد به عنوان رایج‌ترین نوع ESBL شناخته شد (۲۶). در مطالعه‌ی شاهچراغی و همکاران که با استفاده از روش‌های DAD و PCR بر روی ۲۰۰ سویه‌ی اشریشیاکلی از نمونه‌های بالینی مختلف انجام شد، ۵۲/۵ درصد دارای ژن ESBL بودند که از میان آن‌ها ۲٤ درصد دارای ژن TEM و ٦ درصد دارای ژن SHV بودند (۲۷). در مطالعه‌ی میرزایی و همکاران که بر روی ۱٦۰ ایزوله اشریشیا کلی وبا روش PCR انجام شد، ۳۷/۸ درصد از ایزوله‌ها دارای ژن CTX-M بودند که گروه CTX-M-I با شیوع ۳۵/۷۸ درصد بالاترین شیوع را به خود اختصاص می‌داد (۱۳). در مطالعه‌ی سلطان دلال و همکاران که با روش DAD و PCR بر روی ۲۰۰ ایزوله اشرشیا کلی انجام گرفت، ٦٤ درصد از ایزوله‌ها تولید کننده‌ی ESBL بودند. ژن های TEM و SHV به‌ترتیب ۵۷/۸ درصد و ۵/۵ درصد گزارش شدند (۲۸ و ۱۹). مطالعات فوق نشان می‌دهد باکتری‌های اشریشیا کلی تولید کننده‌ی ESBL به‌طور روز افزون در حال زیاد شدن هستند. در این میان بتالاکتامازهای نوع CTX-M با سرعت بیشتری در حال ازدیاد هستند و در بین بتالاکتامازهای CTX-M نیز گروه CTX-M-I شیوع بسیار بالایی دارد.

نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که باکتری‌های اشریشیاکلی تولید کننده‌ی ESBL در سراسر ایران پراکنده‌اند و به لحاظ اپیدمیولوژی نیاز به تحقیقات بیشتری می باشد. شیوع آنزیم‌های نوع CTX-M در میان کشورهای مختلف از جمله ایران همواره رو به افزایش است. جهت کنترل این آنزیم‌ها نیاز به شناسایی کامل آن‌ها و نیز تجویز مناسب داروی‌های بتالاکتام می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله نتیجه‌ی طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۱۰۳۵۰مورخ ۱۳۸۹/٤/۱٦ می‌باشد.

References

1- Bradford PA. Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14: 933-51.

2- Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum b-lactamase-producing Organisms. *J Hospital Infection*. 2009.73: 345-54.

3- Emery CL, Weymouth LA. Detection and clinical significance of extended- spectrum β-lactamases in a tertiary-care medical center. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 2061-7.

4- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum b-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18: 657-86.

5- Raveh D, Yinnon AM, Broide E, Rudensky B. Susceptibilities of ESBL-producing enterobacteriaceae to ertapenem, meropenem and piperacillin-tazobactam with and without clavulanic acid. *Chemotherapy*. 2007; 53: 185-9.

6- Matthew M. Plasmid-mediated b-lactamase of gram-negative bacteria: properties and distribution. *J Antimicrob Chemother*. 1979; 5: 349-58.

7- Hanna E, Sidjabat, David L, et al. Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates at a tertiary medical center in western Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 4733-39.

8- Khalaf NG, Eletreby MM, Hanson ND. Characterization of CTX-M ESBLs in *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Cairo, Egypt. *BMC Infectious Diseases*. 2009; 4: 84.

9- Moubareck C, Daoud Z, Hakime NI, et al. Countrywide spread of community- and hospital-acquired extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-15)-producing Enterobacteriaceae in Lebanon. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 3309-13.

10- 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.

11- Poirel L, Decousser JW, Nordmann P. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a bla(CTX-M) beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003, 47: 2938-45.

12- Bonnet R. Growing group of extended spectrum b-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 1-14.

13- 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; 1: 10-7.

14- Bameri Z, Chitsaz M, Owlia P. Detection of CTX-M- lactamases in isolated *klebsiella pneumoniae*. *Iran J Pathol*. 2010; (5); 137-42.

15- Nasehi L, Shahcheraghi F, Sadat Nikbin V, Nematzadeh S. PER, CTX-M, TEM and SHV beta-lactamases in clinical isolates of *klebsiellapneumoniae* isolated from Tehran, Iran. *Iran J Basic Medi Scie*. 2010; 13: 111-8.

16- Soltan Dalal MM, Mobasseri G, Fallah Mehrabadi J, et al. Detection of CTX-M-1 beta lactamase gene in escherichia coli isolated from clinicall samples by using polymerase chain reaction (PCR) method. *Tehran Uni Med J*. 2011; 69: 16-21.

17- Petroni A, Corso A, Melano R, et al. Plasmidic extended-spectrum β-lactamases in *Vibrio cholerae* O1 ELTor isolates in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(5): 1462-8.

18- Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. *Am J Med*. 2006; 119: S20-8.

19- Soltan Dallal MM, Molla Aghamirzaei H, Fallah Mehrabadi J. Molecular detection of TEM

and AmpC(Dha, mox) broad spectrum β-lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli*: PCR method. *Tehran Uni Med J*. 2010; 68: 872-7.

20- AL-Jasser MA. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): a global problem. *Kuwait Med J*. 2006; 38: 171-85.

21- Canton R, Coque TM. The CTX-M b-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*. 2006; 9: 466-75.

22- Goyal A, Prasad K.N, Prasad A, Gupta S, Ghoshal U, Ayyagari A. Extended spectrum β-lactamases in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* & associated risk factors. *Indian J Med Res*. 2009; 129: 695-700.

23- Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, et al. CTX-M-type extended-spectrum β-lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 2700-6.

24- Petroni A, Corso A, Melano R, et al. Plasmidic extended-spectrum β-lactamases in *Vibrio cholerae* O1 ELTor isolates in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46: 1462-8.

25- Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. A preliminary survey of extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol Lett*. 2000; 184: 53-6.

26- Mirsalehian A, Akbari-Nakhjavani F, Peymani A, Kazemi B, Jabal Ameli F, Mirafshar SM. Prevalence of extended spectrum β-Lactamase-producing enterobacteriaceae by phenotypic and genotypic methods in intensive care units in Tehran, Iran. *Daru*. 2008; 16: 169-73.

27- Shahcheraghi F, Nasiri S and Naviri H. Evalouation of presence the bla-SHV and bla-TEM β-Lactamase genes in clinical isolates resistant *Escherichia coli* to antibiotics from Tehran hospital. *Iran J Med Microbiol*. 1386; 1: 1-8.

28- Soltan Dallal MM, Sabbaghi A, Fallah Mehrabadi J, et al. Evaluation of presence the bla-SHV and bla-AmpC (CITM, FOX) β-lactamase genes in clinical isolates of *Escherichia coli*. *J of Med Council*. 2010. 28: 269-76.

The Frequency of Extended Spectrum Beta Lactamase and CTX M-I of Escherichia Coli Isolated from the Urine Tract Infection of Patients by Phenotypic and PCR Methods in the City of Khoy in Iran

Sharifi Yazdi MK[1], Azarsa M[2], Shirazi MH[2], Rastegar Lari A[3], Owlia P[4], Fallah Mehrabadi J[5], Molla Aghamirzaei H[2], Sabbaghi A[2], Shamkani F[6], Mobasseri G[2], Bakhtiari R[2], Soltan Dallal MM[2,3]

[1]Dept. of Laboratory, Faculty Paramedical Sciences, Tehran University of Medical Sciences. Tehran, Iran

[2]Devision of Microbiology, Dept. of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[3]Antimicrobial Resistant Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran Iran.,

[4]Dept. of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran .

[5]MARS Bioinformatics Institute, Tehran, Iran.

[6]Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, International Units(ARAS), Iran

Corresponding Author: Soltan Dallal MM, Division of Microbiology, Dept. of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

E-mail: soltanirad34@yahoo.com

Received: 1 Mar 2011 **Accepted:** 1 Aug 2011

Background and Objective: The production of Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBLs) by *Escherichia coli is* the main cause of resistance to Cephalosporins. In the past decade, CTX-M enzymes have become the most prevalent ESBLs in Europe, Canada, and Asia. In this study, the frequency of ESBL-producing *E.coli* and molecular detection of the CTX-M-I group was investigated.

Materials and Methods: A total of 400 urine samples were collected from both hospitalized and out-patients in Khoy's hospitals between November 2009 and April 2010. Out of these samples, 188 were identified as *E.coli* by standard biochemical tests. The antibiotic Susceptibility tests to 10 antibiotics were performed by the-disk-agar diffusion (DAD) method. ESBL production was screened by phenotypic test that including disk diffusion agar and combined disk as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Screened isolates were investigated by PCR assay for detection of CTX-M-I group genes.

Results: The results show that out of 188 *E.coli* isolates identified, 56 (29.8%) were producing ESBls by phenotypic test. All isolates were sensitive to imipenem. Overall, 49 (87.5%) isolates were confirmed as CTX-M-I producer by PCR.

Conclusion: The results of this study showed that about 30% of the identified *E.coli* were producing ESBl. Therefore, we recommend to use molecular methods in such researches.

Keywords: E.coli, Extended Spectrum Beta Lactamase, CTX-M-I, Antimicrobial resistance