

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 محمد کاظم شریفی یزدی^۱، محمد آذرسا^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^۷، فرناز شامکانی^۷، گلناز مبصری^۸،
روناک بختیاری^۸، 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 ۶ ماه ۴۰۰ نمونه ادرار از بیماران بستری و سرپایی بیمارستان‌های خوی جمع‌آوری و ۱۸۸ ایزوله اشریشیا کلی توسط آزمایش‌های 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 سینرژیزم دوپل، سویه‌های تولید کننده ESBL شناسایی گردیدند. در نهایت با استفاده 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 اشریشیا کلی ۵۶ (۲۹/۸٪) ایزوله تولید کننده ESBL می‌باشند. همه ایزوله‌ها به ایمنی پنم حساس بودند. طی روش PCR نیز مشخص شد که از این میان ۴۹ (۸۷/۵٪) ایزوله تولید کننده آنزیم‌های گروه CTX-M-I هستند. نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعات نشان داد که حدود ۳۰٪ اشریشیا کلی‌ها 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 وسیع الطیف، CTX-M-I، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

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

مقدمه

به دلیل استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، طی چند دهه‌ی اخیر بتالاکتام‌های مختلف ظاهر شده‌اند. بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف [Extended Spectrum B-lactamases (ESBLs)] آنزیم‌هایی هستند که به وسیله‌ی باسیل‌های گرم منفی تولید شده، قادر به بازکردن حلقه‌ی بتالاکتام اکسی‌مینو بتالاکتام‌ها (Oximinob- β -lactams) از قبیل نسل سوم سفالوسپورین‌ها می‌باشند. این آنزیم‌ها به وسیله‌ی ممانعت‌کننده‌های بتالاکتاماز از قبیل کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می‌شوند (۱). بتالاکتام‌ها به دو صورت مولکولی (Ambler) و عملکردی (Bush- Jacoby- Medeiros) طبقه‌بندی می‌شوند. بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف به لحاظ مولکولی در کلاس A و به لحاظ عملکردی در گروه 2be قرار دارند (۲). این آنزیم‌ها معمولاً بر روی پلاسمید قرار داشته، بیشتر در کلبسیلا پنومونیه، اشریشیاکلی و دیگر باسیل‌های گرم منفی یافت می‌شوند (۳). باکتری اشریشیاکلی یکی از عوامل مهم عفونت‌های ادراری در انسان می‌باشد. مقاومت اشریشیاکلی به اکسی‌مینوسفالوسپورین‌ها (Oximinob-Cephalosporins) از قبیل سفنازیدیم و سفوتاکسیم در اثر تولید بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف رخ می‌دهد (۴). بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف ابتدا در دهه ۱۹۸۰ تشخیص داده شدند که بیشتر از نوع TEM و SHV بودند. این آنزیم‌ها در نتیجه جهش‌های نقطه‌ای (Point Mutation) از آنزیم‌های اصلی فاقد فعالیت وسیع‌الطیف ایجاد شده‌اند (۵). خانواده‌ی CTX-M برای اولین بار در سال ۱۹۸۹ از آلمان گزارش شد و سپس در نقاط مختلف جهان گسترش پیدا کرد. این آنزیم بیشتر در اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه گزارش شده اما در سایر انتروباکتریاسه نیز یافت می‌شود (۶). طی دهه‌ی اخیر ESBL های نوع CTX-M جایگزین نوع TEM و SHV در اروپا، کانادا، آسیا و آفریقا شده، شایع‌ترین نوع ESBL را در این

نواحی تشکیل می‌دهند (۷-۱۱). بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف گروه CTX-M به‌خاطر فعالیت بیشتر علیه سفوتاکسیم نسبت به سفنازیدیم از دیگر گروه‌های ESBL مانند TEM و SHV متمایز می‌شوند. برخلاف نامشان بعضی از اعضای این گروه سفنازیدیم را بسیار سریع‌تر از سفوتاکسیم هیدرولیز می‌کنند (۱۲). این آنزیم‌ها بر اساس تغییرات اسید آمینه به پنج گروه اصلی (CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9, CTX-M25) تقسیم می‌شوند (۲). تاکنون بیش از ۴۰ نوع آنزیم CTX-M شناسایی شده است که آنزیم‌های CTX-M-2، CTX-M-3 و CTX-M-14 بیشترین انتشار را در سراسر جهان به خود اختصاص داده‌اند (۱۲). طی بررسی‌هایی که در سال‌های اخیر در ایران انجام شده، بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف نوع CTX-M افزایش پیدا کرده‌اند و بیشترین شیوع CTX-M مربوط به گروه CTX-M-I می‌باشد (۱۶-۱۳). هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ESBL و نیز گروه CTX-M-I در اشریشیاکلی ایزوله شده از عفونت ادراری بود.

روش بررسی

این مطالعه‌ی توصیفی بر روی ۴۰۰ نمونه‌ی ادرار از بیماران مبتلا به عفونت ادراری بستری و سرپایی بیمارستان‌های شهید مدنی و قمر بنی هاشم خوی و نیز یک آزمایشگاه تشخیص طبی در طی ۶ ماه از آبان ماه سال ۱۳۸۸ تا فروردین ۱۳۸۹ انجام پذیرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده بر روی محیط کشت انتخابی Eosin Methylene Blue Agar (EMB) کشت داده شدند. سپس با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی نظیر TSI، سیمون سیترات، اوره آز، MR/VP، SIM و لیزین دکربوکسیلاز تعیین هویت گردیدند. کلنی‌های مربوط به ایزوله‌های *E. coli* در Skim Milk Broth در ۷۰-درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شدند تا در مراحل بعدی از این ایزوله‌ها استفاده شود. به پیشنهاد سازمان (Clinical and Laboratory Standards Institute) CLSI، به

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 هر کدام، 1.5 μl Taq DNA (5 U/μl)، 50 Pmol/μl DNA الگو و 50 μl H₂O 14.5) در طی ۴۰ سیکل، تحت برنامه‌ی زمانی ترموسایکلر شامل: مرحله‌ی اولیه‌ی باز شدن دو رشته DNA به مدت سه دقیقه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، مرحله‌ی باز شدن دو رشته به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، مرحله‌ی اتصال پرایمرها به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۹ درجه‌ی سانتی‌گراد، مرحله‌ی طویل شدن رشته‌ی هدف به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و مرحله‌ی طویل شدن نهایی به مدت ده دقیقه در دمای

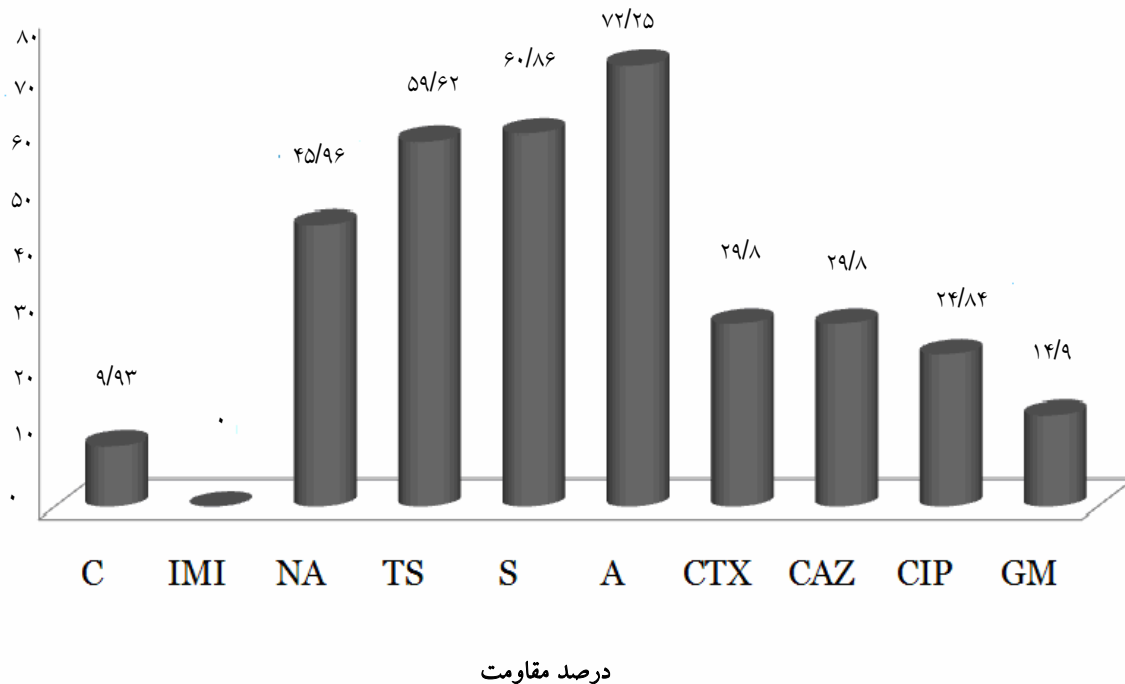
منظور شناسایی اولیه‌ی ارگانیزم‌های تولید کننده‌ی ESBL از آزمون دیسک آگار دیفیوژن [Disk Agar Diffusion (DAD)] استفاده گردید (۴). الگوی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن با دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۱/۲۵ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (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 مولر هینتون آگار، سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند به طور کامل در محیط مذکور پخش شد. سپس دیسک‌های سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفنازیدیم-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 ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، هاله‌ی عدم رشد اطراف دیسک‌های حاوی کلاولانیک اسید نسبت به بدون کلاولانیک اسید سنجیده شد. به طوری که اگر هاله‌ی عدم رشد اطراف دیسک سفنازیدیم-کلاولانیک اسید بزرگ‌تر یا مساوی ۵ میلی‌متر نسبت به سفنازیدیم 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، به عنوان مولد ESBL در نظر گرفت (۱۷). DNA

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 تولیدکننده ESBL مطرح شدند. در طی آزمون سینرژیسیم دوپل 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).

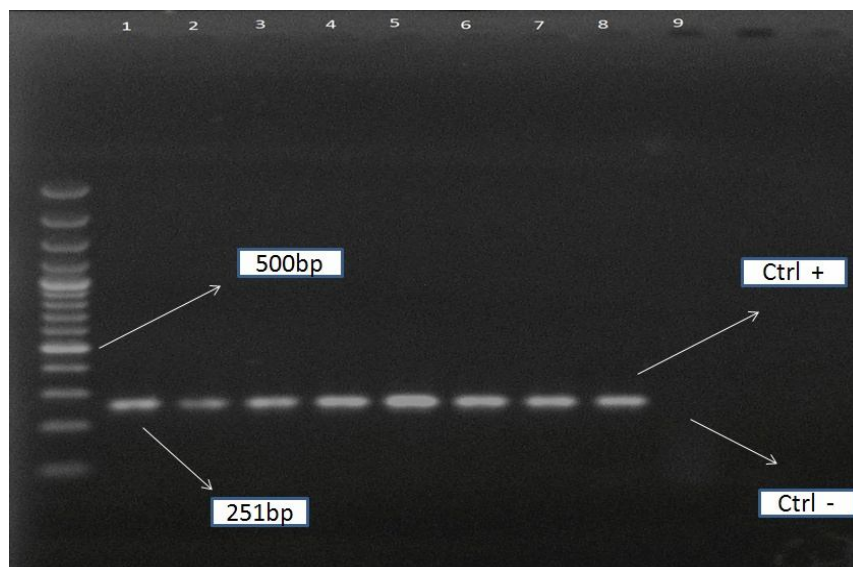
۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. قطعه‌ی مورد نظر از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز فراوان سازی شده، محصولات ۲۵۱ bp بعد از الکتروفورز بر روی ژل آگارز، مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس محصول الکتروفورز از روی ژل استخراج گردید و جهت سکانسینگ ارسال شد. محصول سکانسینگ با استفاده از فرمت FASTA همتراز (Alignment) شد 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.

یافته‌ها

از ۴۰۰ نمونه‌ی ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری مورد



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

گزارش شده و انواع تیپ‌های مختلف از این نوع آنزیم شناسایی شده‌اند (۷ و ۲۱). در غرب تولید *ESBL* در آنتروباکتریاسه از ۵ تا ۵۲ درصد در دیگر کشورهای آسیایی از ۱۰ تا ۶/۵ درصد متفاوت است (۴). در هندوستان *CTX-M* با شیوع ۸۵/۴ 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 ۶۰ درصدی بیشترین موارد را تشکیل می‌دهد (۲۳). در آرژانتین و ژاپن-*CTX-M-2* و *CTX-M-3* بیشتر از همه شیوع دارند (۲۵ و ۲۴). 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

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 (۶۴ درصد) در تهران نسبت به کشورهای مختلف جهان، احتمالاً یکی از مهم‌ترین دلایل این قضیه، مصرف خودسرانه و بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در ایران می‌باشد (۱۹ و ۲۰). با توجه به شیوع ۲۹/۸ درصدی آنزیم‌های *ESBL* در این مطالعه در مقایسه با شیوع ۶۴ 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

(۲۸ و ۱۹). مطالعات فوق نشان می‌دهد باکتری‌های اشیشیا 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 اشیشیاکلی تولید کننده‌ی ESBL در سراسر ایران پراکنده‌اند و به لحاظ اپیدمیولوژی نیاز به تحقیقات بیشتری می‌باشد. 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 ۱۰۳۵۰ مورخ ۱۳۸۹/۴/۱۶ 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 -

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، اشیشیاکلی 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 اشیشیاکلی از نمونه‌های بالینی مختلف انجام شد، ۵۲/۵ درصد دارای ژن ESBL بودند که از میان آن‌ها ۲۴ درصد دارای ژن TEM و ۶ درصد دارای ژن SHV بودند (۲۷). در مطالعه‌ی میرزایی و همکاران که بر روی ۱۶۰ ایزوله اشیشیا کلی و با 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 دلالت و همکاران که با روش DAD و PCR بر روی ۲۰۰ ایزوله اشیشیا کلی انجام گرفت، ۶۴ درصد از ایزوله‌ها تولید کننده‌ی ESBL بودند. ژن‌های TEM و SHV به‌ترتیب ۵۷/۸ درصد و ۵/۵ درصد گزارش شدند

- 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, Eleteby 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 β -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. Evaluation 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 MK¹, Azarsa M², Shirazi MH², Rastegar Lari A³, Owlia P⁴, Fallah Mehrabadi J⁵, Molla Aghamirzaei H², Sabbaghi A², Shamkani F⁶, Mobasseri G², Bakhtiari R², Soltan Dallal MM^{2,3}

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

²Division of Microbiology, Dept. of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

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

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

⁵MARS Bioinformatics Institute, Tehran, Iran.

⁶Dept. 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*