

بررسی الگوی پلاسمیدی و مقاومت آنتی بیوتیکی اشریشیا کلی جدا شده از عفونت ادراری بیماران سرپایی

علیسا اکیا^۱، حکیم قیصری^۲، قباد محمدی^۳، مهرداد خدادوست^۴

۱. استادیار میکروب شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات عفونت های بیمارستانی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. (مؤلف مسؤول)، تلفن

ثابت: ۰۸۳-۴۲۷۴۶۱۸@yahoo.com. akya359

۲. دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۳. استادیار، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۴. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آبادان، ایران، آبادان.

چکیده

زمینه و هدف: اشریشیا کلی شایعترین ارگانسم عامل عفونت مجاری ادراری (UTI) میباشد و UTI ناشی از ایزوله های اشریشیا کلی مقاوم به آنتی بیوتیکها در حال افزایش است. بسیاری از ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی به وسیله پلاسمیدها کد می شوند. در این مطالعه محتوای پلاسمیدی ایزوله های اشریشیا کلی جدا شده از عفونتهای ادراری بررسی شد.

روش بررسی: تعداد ۲۰۰ ایزوله اشریشیا کلی از نمونه ادرار بیماران سرپایی مبتلا به UTI با استفاده از کشت و تستهای بیوشیمیایی جدا شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی آنها با روش دیسک دیفیوژن تعیین شد و تولید ESBL با روش دبل دیسک مشخص گردید. پلاسمید آنها با استفاده از کیت استخراج و پلاسمیدهای جدا شده با دو آنزیم *HindIII* و *BamH1* هضم آنزیمی شدند و الگوی پلاسمیدها و اندازه آنها با الکتروفورز و مارکرهای DNA مشخص گردید.

یافته ها: کل ۲۰۰ جدایه اشریشیا کلی به ایمی پنم حساس بودند در حالی که ۸۰/۷ درصد از جدایه ها نسبت به آمپی سیلین مقاومت نشان دادند. مقاومت در برابر کوتریموکسازول، سیپروفلوکساسین، تویرامایسین و آزترونام به ترتیب ۳۶/۹۹، ۵۷/۴۹، ۲۳/۳۵ و ۲۲/۵ درصد بود. تعداد ۱۶۶ جدایه (۸۳٪) حاوی پلاسمید بودند که اندازه آنها غالباً " در محدوده ۱۵ تا ۲۴Kb بود.

نتیجه گیری: نتایج نشانگر مقاومت آنتی بیوتیکی بالای ایزوله های اشریشیا کلی است و بین وجود پلاسمید و داشتن ESBL یک ارتباط قوی مشاهده شد، که بیانگر نقش پلاسمید در ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی به گروه های مختلف آنتی بیوتیکی بخصوص سفالوسپورینها در این باکتری می باشد. همچنین وجود شباهت در الگوی پلاسمیدی ایزوله ها به نحوی بیانگر انتقال و گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی است.

کلید واژه: اشریشیا کلی، عفونت مجاری ادراری، مقاومت آنتی بیوتیکی، پلاسمید

وصول مقاله: ۹۳/۳/۱۹ اصلاحیه نهایی: ۹۳/۹/۲۵ پذیرش: ۹۳/۱۰/۱

مقدمه

عفونت مجاری ادراری (urinary tract infection=UTI) یکی از شایع ترین عفونت های باکتریایی است و دومین عفونت شایع و از علل عمده مراجعه بیماران به بیمارستانها می باشد (۱). بطوریکه سالیانه در آمریکا ۱۵۰ میلیون نفر به عفونت ادراری مبتلا و سالانه ۶ میلیارد دلار صرف درمان آن میشود (۳ و ۲). در میان همه عوامل باکتریایی یورپاتوزن در بیماران سرپایی و بستری، *Escherichia coli* شایعترین ارگانیزم عامل عفونت است (۴ و ۳). با توجه به نقش باکتری *E. coli* به عنوان عامل اصلی عفونت ادراری، شناخت الگوی حساسیت آن نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف اهمیت دارد. میزان حساسیت باکتریهای جدا شده از بیماران به آنتیبیوتیکها در مناطق مختلف متفاوت است که می تواند نتیجه تفاوت در الگوی مصرف و نوع آنتی بیوتیک ها در هر منطقه باشد (۵). با توجه به افزایش جهانی مقاومت های دارویی در میان یورپاتوزن ها به خصوص *E. coli* نوع آنتیبیوتیک انتخابی برای درمان تجربی UTI در حال حاضر یک چالش است (۸-۶). بر اساس نتایج مطالعات انجام شده ژن های مقاومت غالباً "روی عناصر خارج کروموزومی به خصوص پلاسمیدها قرار دارند. همچنین ژن های مولد بتالاکتامازهای طیف گسترده (Extended spectrum beta lactamase=ESBL) معمولاً بر روی پلاسمید های قابل انتقال قرار دارند و اغلب پلاسمید های حاوی این نوع ژن ها، ژن های مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها را نیز با خود حمل می کنند. به دلیل انتقال پلاسمیدهای کد کننده ESBL در میان باکتری های خانواده انتروباکتریاسه، مقاومت بالای دارویی در میان این گروه از باکتریها از جمله *E. coli* مشاهده شده است (۱۰ و ۹). از اینرو شناسایی الگوی مقاومت ایزوله ها و تعیین الگوی پلاسمیدی آنها جهت بررسی های اپیدمیولوژیکی، کنترل و درمان مناسب عفونت ادراری حائز اهمیت می باشد (۱۲ و ۱۱). لذا این مطالعه جهت بررسی الگو و محتوای پلاسمیدی

جدایه های *E. coli* و ارتباط آنها با مقاومت های آنتی بیوتیکی انجام شد.

روش بررسی

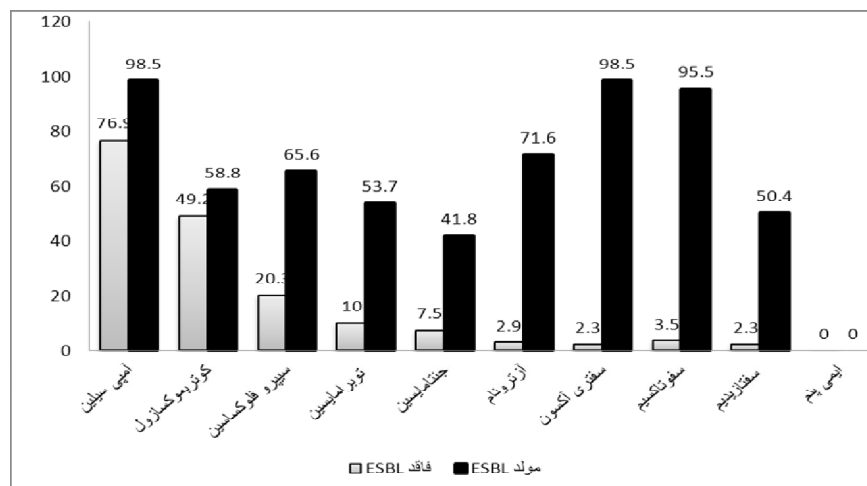
در این مطالعه توصیفی ۲۰۰ نمونه باکتری های *E. coli* جدا شده از ادرار بیماران سرپایی مبتلا به UTI ارجاع شده به وسیله پزشکان به کلینیک ویژه دانشگاه علوم پزشکی و آزمایشگاه مرکزی شهر کرمانشاه، جمع آوری و در شرایط آسپتیک و در داخل جعبه یخی به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی کرمانشاه منتقل شد و روی بلاد آگار، مک کانکی و EMB کشت داده شدند (۱). تمام نمونه های عفونت ادراری بیماران وارد مطالعه شدند با این شرط که عفونت ادراری به صورت وجود تعداد 10^5 و یا بیشتر باکتری اشریشیاکلی در هر میلی لیتر حجم ادرار (midstream) در افرادی که از نظر بالینی مشکوک به عفونت ادراری بودند در نظر گرفته شد. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی با روش Disk diffusion طبق دستور CLSI انجام و از میان سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک های بتالاکتام، آزمایش دیسک ترکیبی (Combined disk) برای تشخیص فنوتیپی سویه های مولد ESBL انجام شد (۱۳). در این تست از دیسک های سفنازیدیم ($30 \mu\text{g}$) همراه کلانولانیک اسید ($10 \mu\text{g}$) و دیسک های سفوتاگسیم ($30 \mu\text{g}$) همراه اسید کلانولانیک ($10 \mu\text{g}$) به همراه سفنازیدیم و سفوتاگسیم بدون کلانولانیک اسید استفاده شد، که محصول شرکت MAST (انگلستان) بودند. انکوباسیون به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد و تولید ESBLs با افزایش قطر هاله عدم رشد به اندازه $\geq 5 \text{mm}$ در دیسک های حاوی کلانولانیک اسید نسبت به دیسک های بدون کلانولانیک اسید مشخص شد. از سویه استاندارد (ATCC 25922 *E. coli*) جهت کنترل فرآیند ها استفاده شد. برای استخراج پلاسمید، باکتری ها را در محیط لوریا برات (LB)

بعدی پلاسمید های طبیعی (از جمله فرم آزاد، پیچ خورده، فوق پیچ خورده) ممکن است یک پلاسمید برش نخورده بیش از یک باند در الکتروفورز ایجاد نماید. داده های حاصل با استفاده از شاخصهای آمار توصیفی (میانگین، درصد و ...) بررسی شدند.

یافته ها

از مجموع ۲۰۰ بیمار، ۱۷۶ نفر مونث (۸۸ درصد) و ۲۴ نفر (۱۲ درصد) مذکر بودند و میانگین سنی بیماران $37/5 \pm 21$ سال بود. نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها در نمودار ۱ نشان داده شده است. تعداد ۹۳ جدایه (۳۸/۷۵ درصد) به سه یا بیشتر از سه آنتی بیوتیک مقاوم (Multi drug resistant) بودند و ۱۸ جدایه (۷/۵ درصد) به تمام آنتی بیوتیک های مورد بررسی حساسیت نشان دادند. تعداد ۵۹ جدایه (۲۹/۵ درصد) از نظر فنوتیپی تولید کننده ESBL بودند. گروه سنی بیماران ۵۰ سال به بالا بیشترین فراوانی ESBL را به خود اختصاص داده بود (نمودار ۱).

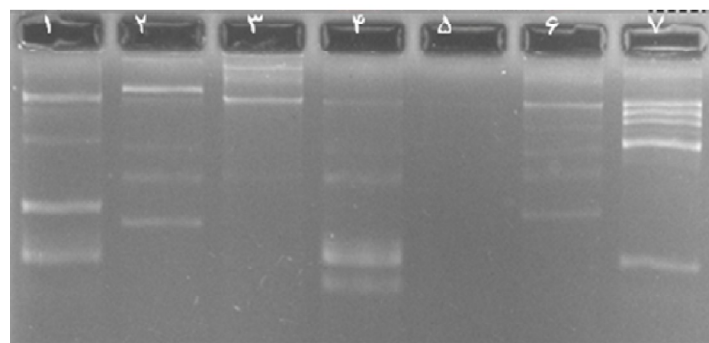
کشت داده شد و پس از یک شب انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد، باکتری ها به وسیله سانتریفیوژ رسوب و سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. سپس با استفاده از کیت جدا سازی پلاسمید شرکت سیناکلون (ایران) و کیت GF-1 شرکت Vivantis (مالزی) پلاسمید باکتری ها جدا شد. پلاسمیدهای جدا شده در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد زیر صفر نگهداری شد. ابتدا برای وجود یا عدم وجود پلاسمید و نیز تعداد احتمالی انواع پلاسمید ها در یک ایزوله، محتوای پلاسمیدی استخراج شده بررسی گردید و سپس پلاسمید با آنزیم برش داده شد تا اندازه و الگوی باندهای آن مشخص شود. برای تخمین اندازه پلاسمید، از مارکر DNA و الکتروفورز استفاده شد. جهت برش آنزیمی پلاسمیدها از دو آنزیم *HindIII* (سیناکلون، ایران) و *BamH1* (Thermo Scientific, England) استفاده گردید، بعد از برش آنزیمی پلاسمیدها، روی ژل آگارز الکتروفورز و الگوی برشی آنها با یکدیگر مقایسه گردید. لازم به ذکر است که به دلیل شکلهای مختلف سه



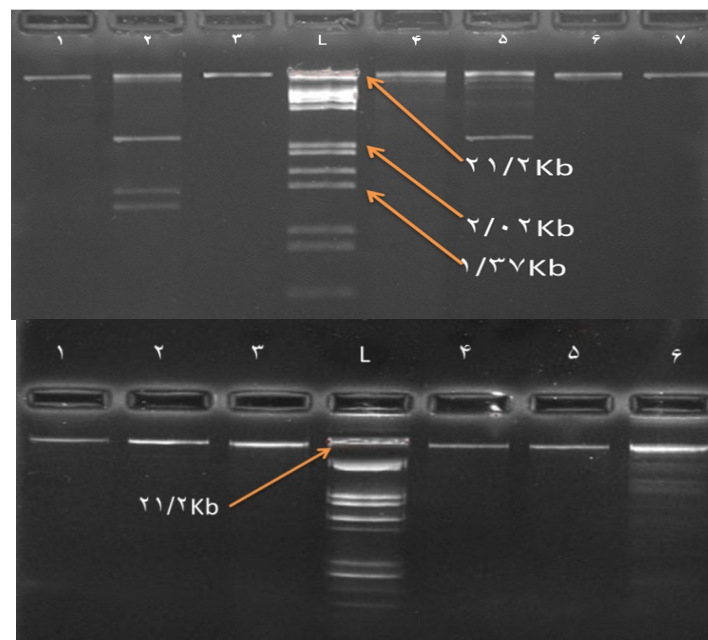
نمودار ۱: مقایسه مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های اشریشیا کلی مولد ESBL و فاقد ESBL

نمونه پلاسمید که تحت برش آنزیمی قرار گرفت، ۶۰/۷۲ نمونه‌ها دارای یک الگوی پلاسمیدی بودند (شکل ۲). در این الگوی غالب اندازه پلاسمیدها در حدود ۲۰ Kb بود (جدول ۱). از طرفی ۲۴/۷۲ درصد از نمونه‌های پلاسمیدی شباهت کمی با هم داشتند و ۱۴/۵۶ درصد از نمونه‌ها دارای الگوی پلاسمیدی متفاوت بودند.

از ۲۰۰ جدایه اشریشیا کلی، ۱۶۶ نمونه (۸۳ درصد) حاوی پلاسمید بودند. پلاسمیدهای برش نخورده روی ژل آگاروز از ۱ تا ۱۰ باند متفاوت ایجاد کردند (شکل ۱). از طرفی ۴۵ درصد ایزوله‌های حاوی پلاسمید ESBL مثبت بودند. از نمونه‌های مورد بررسی ۳۱ جدایه (۱۸/۶۷ درصد) دارای سه نوع پلاسمید، ۶۰ جدایه (۳۶/۱ درصد) دو نوع پلاسمید و ۶۹ جدایه (۴۱/۵ درصد) یک نوع پلاسمید داشتند. از ۱۶۶



شکل ۱: الکتروفورز پلاسمیدها بدون برش. شماره ۱ تا ۷ پلاسمیدهای جدا شده از ۷ ایزوله است



شکل ۲: الکتروفورز پلاسمیدهای برش خورده. پلاسمیدها در حدود ۲۰ Kb باند داده اند و شباهت قابل توجهی در الگوی پلاسمیدی آنها مشاهده می شود. شماره های ۱-۷ پلاسمید برش خورده و L مارکر (لاندا) است.

جدول ۱: اندازه تقریبی پلاسمیدها و میانگین تعداد باندهای آنها در ایزوله ها

درصد ایزوله های حاوی پلاسمید	اندازه تقریبی پلاسمید (Kb)	میانگین تعداد باندها بر اثر برش با آنزیم BamHI
۱/۴	<۴۵	۸/۵
۴/۵	۳۵-۴۴	۵
۷/۱	۲۵-۳۴	۳
۸۰/۲	۱۵-۲۴	۲
۴/۷	۵-۱۴	۳
۲/۱	۵<	۲

بحث

از نظر ترکیب جنسی بیماران، اکثریت بیماران را افراد مونث تشکیل می دادند و تنها نزدیک به ده درصد بیماران افراد مذکر بودند. این تفاوت بین میزان ابتلای دو جنس با مطالعات سایر محققین در نقاط مختلف دنیا همخوانی دارد و ناشی از وضعیت آناتومیکی مجرای ادراری در خانمها میباشد (۱۵ و ۱۴). میانگین سنی بیماران در حدود میانسانی بود که به نظر می رسد به دلیل فعالیت جنسی و همچنین بارداری خانم ها در این محدوده سنی باشد.

در بین جدایه ها، مقاومت به گروه پنی سیلین ها بسیار بالا بود که با نتایج سایر مطالعات در ایران تطابق دارد. در مناطق مختلف ایران مقاومت از ۸۰ تا ۹۹ درصد را برای پنی سیلینها گزارش کردند (۱۸-۱۶). در هندوستان ۷۵ درصد و در کره جنوبی مقاومت ۶۰ درصد نسبت به پنی سیلین ها مشاهده شده است (۲۰ و ۱۹). در کشور های توسعه یافته نیز مقاومت به پنی سیلین ها وجود دارد، اما نسبت به کشور های در حال توسعه کمتر است. به طوریکه در یونان مقاومت نسبت به پنی سیلین ها حدود ۵۰ درصد گزارش شده است (۲۱). مقاومت جدایه ها نسبت به کوتریموکسازول هم بالا بود و با نتایج مطالعات دیگر در ایران، با گزارش میزان مقاومت از ۵۵ تا ۶۲/۳۲ درصد به این آنتی بیوتیک، مشابهت دارد (۲۲ و ۱۸ و ۱۷). مطالعه ای در ترکیه در سال ۲۰۰۶ حدود ۶۱ درصد مقاومت را نسبت به این آنتی بیوتیک

تعیین کرد (۲۳). برخی مطالعات میزان مقاومت بالاتری گزارش کرده اند. به طور مثال در مطالعه ای در هندوستان بر روی اشیریشیا کلی، مقاومت ۸۲ درصد نسبت به سولفونامیدها گزارش شده است (۲۴). در مطالعه ما مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم از جمله سفتریاکسون، سفوتاکسیم و سفنازیدیم در ایزوله های مولد ESBL خیلی بالا بود. البته در مطالعات قبلی در ایران میزان مقاومت را برای ایزوله های با و بدون ESBL بطور کلی گزارش کرده اند که میزان آنها کمتر است (۲۷-۲۵). این مقاومت بالا نسبت به سفالوسپورینها هشدار برای استفاده بی رویه از این آنتی بیوتیکهای طیف گسترده است.

درصد نسبتاً بالایی از ایزوله ها تولید کننده ESBL بودند که با نتایج دیگر تحقیقات صورت گرفته روی ایزوله های بیماران سرپایی در ایران قابل مقایسه است. مطالعات انجام شده در ایران بیشتر روی ایزوله های بیمارستانی و جدا شده از بیماران بستری صورت گرفته که درصد بالاتری از آنها مولد ESBL بوده اند. بطوریکه در مطالعه ای در تبریز ۴۳/۶ از ایزوله های بیمارستانی مولد ESBL بودند (۲۵). جلالپور در اصفهان در ایزوله های بیماران سرپایی ۱۷ درصد و برای بیماران بستری ۵۸ درصد ESBL تعیین نمود (۲۸). در مطالعه میر صالحیان و همکاران ۲۵/۲۵ درصد از سویه های اشیریشیا کلی در بیماران بستری مولد ESBL بودند (۲۷). مطالعه دیگری در ۱۳۸۷ ایزوله های مولد ESBL در

بیماران بستری و سرپایی را ۲۷/۱ درصد گزارش نمود (۲۹). به نظر میرسد میزان ایزوله های مولد ESBL بیماران سرپایی در این مطالعات با نتایج کار ما همخوانی دارد. در این تحقیق درصد بالایی از ایزوله های اشریشیا کلی حاوی پلاسمید بودند و اکثر آن ها دو یا سه نوع پلاسمید داشتند که این خود یک زنگ خطر برای گسترش مقاومت های آنتی بیوتیکی است. در تحقیقات انجام گرفته بر روی ایزوله های عفونت دستگاه ادراری در ایران نیز نتایج مشابهی حاصل شده است. به طوری که در مطالعه ای در سال ۱۳۸۸ در تبریز ۹۰ درصد از ایزوله ها حاوی پلاسمید گزارش شد (۳۰). در کشورهای دیگر هم نتایج مشابه بدست آمده است. مثلاً در تحقیقی در نروژ، ۸۷/۵ درصد از ایزوله های اشریشیا کلی حاوی پلاسمید بودند (۳۱). در پژوهش دیگری در ۱۹۹۵ در کشور کره جنوبی که بر روی ایزوله های عفونت ادراری انجام شد، ۷۲ درصد سویه ها حاوی پلاسمید بودند (۳۲). نتایج مطالعه ما نشان داد که ایزوله های دارای پلاسمید برای تمام گروه های آنتی بیوتیکی مقاومت بسیار بالاتری در مقایسه با ایزوله های فاقد پلاسمید داشتند. این تفاوت مقاومت نسبت به سفالوسپورین های نسل سوم بارزتر از سایر آنتی بیوتیکها بود که بیانگر کد شدن ژنهای مقاومت به این آنتی بیوتیکها بوسیله پلاسمید می باشد. در تایید این موضوع، در ایزوله های دارای پلاسمید، فراوانی ایزوله های مولد ESBL بالاتر بود که نشان دهنده حمل این ژنهای بوسیله پلاسمید میباشد. درمورد وجود بیش از یک نوع پلاسمید در یک ایزوله مطالعات انجام شده بر روی ایزوله های اشریشیا کلی تعداد پلاسمیدها را از ۱ تا ۷ عدد گزارش نمودند که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد (۳۲ و ۳۰). در مورد اندازه پلاسمید مطالعات متعددی در ایران و سایر نقاط جهان انجام گرفته است. بطوریکه در مطالعه ای

در تبریز اندازه پلاسمید از ۰/۹ تا ۲۱Kb تعیین شد که تقریباً مشابه یافته های مطالعه ما میباشد. در تحقیقی در فرانسه اندازه پلاسمیدها از ۱/۵ تا ۵۴Kb گزارش شده است (۳۳) و در مطالعه دیگری اندازه پلاسمیدها از ۲ تا ۲۲ Kb تعیین شد (۳۴). نتایج این مطالعات با یافته های مطالعه ما همخوانی دارد. وجود الگوی پلاسمیدی مشابهی در بیشتر ایزوله ها نشان دهنده ارتباط اپیدمیولوژیک ایزوله ها است که در مطالعات دیگر به آن اشاره شده است (۳۵).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشانگر مقاومت آنتی بیوتیکی بالای ایزوله های اشریشیا کلی است اما هنوز نسبت به امی پنم حساسیت کامل وجود دارد که برای موارد مقاومت به سایر داروها گزینه مناسبی است. از طرفی ارتباط قوی بین وجود پلاسمید و داشتن ESBL مشاهده شد که بیانگر نقش پلاسمید در ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی به گروه های مختلف آنتی بیوتیکی بخصوص سفالوسپورینها در این باکتری می باشد. همچنین الگوی پلاسمیدی مشابهی در بیشتر ایزوله های اشریشیا کلی جدا شده از عفونت ادراری بیماران سرپایی شناسایی شد که نشان دهنده ارتباط اپیدمیولوژیک آنها است. همچنین این شباهت در الگوی پلاسمیدی به نحوی بیانگر انتقال و گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی در جامعه است.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر گرفته از پایان نامه دانشجوی دکترای داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه میباشد و هزینه آن بوسیله دانشگاه فراهم شده است.

Reference

1. Mahon CR, Lehman D C, Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology. 4th ed. China, Sanders & Elsevier, 2011; 884-890
2. Gonzalez C.M, Schaeffer A.J. Treatment of urinary tract infection: what's old, what's new, and what works. World J Urol 1999;17:372-8.

3. Gupta K, Hooten TM, Stamm WE. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. *Ann Intern Med* 2001; 135:41-50.
4. Blomgran R, Zheng L, Stendahl O. Uropathogenic *Escherichia coli* triggers oxygen-dependent apoptosis in human neutrophils through the cooperative effect of type 1 fimbriae and lipopolysaccharide. *Infect Immun* 2004; 72:4570-8.
5. Garau J, Xercavis M, Rodriguez M. Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. *Antimicrob Agents and Chemother* 1999; 43:2736-41.
6. Gupta K, Scholes D, Stamm WE. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women: *JAMA* 1999; 281:736-8.
7. Butler CC, Hillier S, Roberts Z. Antibiotic-resistant infections in primary care are symptomatic for longer and increase workload: outcomes for patients with *Escherichia coli* UTIs. *Bri J Gen Pract* 2006; 56:686-92.
8. Kern MB, Klemmensen T, Fridmodt-Møller N, Skirrow MB. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteremia and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. *JAC* 2002; 50: 513-6.
9. Rodriguez-Bano J, Alcalá JC, Cisneros JM. Community infections caused by extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med*. 2008; 168: 1897–1902.
10. Apisarnthanarak A, Kiratisin P, Mundy LM. Predictors of mortality from community-onset bloodstream infections due to extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29: 671–4.
11. Duttaroy B, Mehta S. Extended spectrum beta lactamases (ESBL) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Indian J Pathol Microbiol* 2005; 48: 45-8.
12. Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, Brigante G, Perilli M, Amicosante G, et al. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2700-6.
13. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011; 31:M100-S21.
14. Zilevica A. Hospital acquired and community acquired uropathogens modeling of infection. *Bioautomation* 2005; 3: 63-7.
15. Nicolle LE. Epidemiology of urinary tract infection. *Infect Med*. 2001; 18:153-62.
16. Mirsalehian A, Jabalameli F, Mirafshar SM, Bazarjani F, Gorjipor A, Goli HR. Determination of antimicrobial resistance patterns and extended spectrum β lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Tehran University Medical Journal* 2008; 66: 373-8.
17. Farshad Sh, Anvarinejad M, Mehrabi Tavana A, Japoni A, Hoseini M, Shahidi M. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection in children. *Journal of Jahrom University of Medical Sciences* 2009; 7: 1- 6.
18. Mokhtarian H, Ghahramani M, Nourzad H. A study of antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection. *Ofogh Danesh J Gonabad Uni Med Sci* 2006; 12: 3-7.
19. Akram M, Shahid M, Khan A. Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in J N M C Hospital Aligarh: India. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2007; 4:1-7.
20. Lee SJ, Lee DS, Choe HS, Suk SB, Eui KM, Cho YH, et al. Antimicrobial resistance in community-acquired urinary tract infections: results from the Korean Antimicrobial Resistance Monitoring System. *J Infect Chemother*. 2011; 17:440–6.

21. Mantadakis E, Tsalkidis A, Panopoulou M, Pagkalis S, Tripsianis G, Falagas M, et al. Antimicrobial susceptibility of pediatric uropathogens in Thrace: Greece. *Int Urol Nephrol*. 2011; 43:549–55.
22. Nakhimghadam M, Moshrefi SH. Determination of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections. *Sabzevar University J Med Sci*. 2005; 4: 228-33.
23. Wolff O, MacLennan C. Evidence behind the WHO guidelines: hospital care for children: what is the appropriate empiric antibiotic therapy in uncomplicated urinary tract infections in children in developing countries? *J Trop Pediatr* 2007; 53: 150-2.
24. Tankhiwale SS, Jalgaonkar VS, Atimad S, Hassani U. Evolution of extended spectrum of beta lactamase in urinary isolates. *Ind Med Res* 2004; 120:553-6.
25. Soltan Dallal MM, Azarsa M, Shirazi MH, Rastegar Lari A, Owlia P, Fallah Mehrabadi J, et al. The prevalence of extended-spectrum beta-lactamases and CTX-M-1 producing *Escherichia coli* in urine samples collected at Tabriz city Hospitals. *Tehran Univ Med J* 2011; 69:273-8.
26. Mirsalehian A, Jabalameli F, Mirafshar SM, Bazarjani F, Gorji por A, Goli HR. Determination of antimicrobial resistance patterns and extended spectrum B lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Tehran Univ Med J* 2008; 66: 373-8.
27. Tashkori M, Farokhnia M, Zia Sheikholeslami N, Mirzaei T, Yosefi H, Mokhtari F et al. Evaluation of Producing Extended Spectrum β -lactamase among Isolated *Escherichia coli* from Patients Suffering from Urinary Tract Infections: Short Report. *JRUMS* 2011; 10:62-8.
28. Jalalpoor S, Mobasherizadeh S. Frequency of ESBLs in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized and out-patients with urinary tract infection in selective centers in Esfahan (2009-2010). *RJMS* 2011; 18:7-16.
29. Shahcheraghi F, Nasiri S, 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* 2007; 1:1-8.
30. Sadeghi J, Nahaee M, Asgharzadeh M. Plasmid Profiles of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in hospitalized and outpatients in the Imam Khomeini Medical center. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services* 2009; 1: 33-9.
31. Vorland LH, Carlson K, Aalen O. Antibiotic resistance and small R plasmids among *Escherichia coli* isolates from outpatients' urinary tract infections in Northern Norway. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27: 107-113.
32. Woo-Joo K, Hee-Jin J, Hyun-Jin P, Min-Ja K, Seung-chull P. Application of ribotyping for molecular epidemiologic study of *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Korean J Infect Dis*. 1995; 27: 505-17.
33. Malkawi HI, Youssef MT. Antibiotic susceptibility testing and plasmid profiles of *Escherichia coli* isolated from diarrheal patients. *J Trop Pediatr* 1998; 44: 128-32.
34. Tsen HY, Chi WR. Plasmid profile analysis for enterotoxigenic *Escherichia coli* and detection of heat stable enterotoxin I (ST1) gene by Polymerase Chain Reaction. *J Food and Drug Analysis* 1996; 4: 215-22.
35. Suljagic V, Cobeljic M. Reliability of plasmid profile analysis in the identification of epidemic strains of bacteria causing an outbreak of intestinal infections. *Vojnosanit Pregl*. 2001; 58: 615-20.