

بررسی میزان شیوع ژن *ctx-M9* در سویه‌های ایشریشیاکلی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در شهرستان سنندج

نشیمیل دباغیان¹، کامبیز داوری²، ساکو میرزایی³

تاریخ دریافت 1394/10/15 تاریخ پذیرش 1394/12/12

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامازی، مهم‌ترین عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام در میان باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. امروزه شاهد افزایش روزافزون عفونت‌های ناشی از آن‌ها در جهان هستیم. ژن *ctx-M9* عامل مقاومت بتالاکتامازی می‌باشد. لذا هدف از این بررسی تعیین فراوانی ایشریشیاکلی‌های تولیدکننده ESBL و ارزیابی مولکولی بتالاکتاماز *CTX-M9* توسط PCR بود. **مواد و روش کار:** در مجموع 260 نمونه ادراری از مراکز درمانی شهرستان سنندج جمع‌آوری شده، پس از کشت بر روی محیط EMB آگار در دمای 37 درجه به مدت 24 ساعت و انجام تست‌های بیوشیمیایی برای تأیید از بین 260 نمونه، 100 ایزوله ایشریشیاکلی جداسازی می‌باشد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها با روش Disk Diffusion و تولید آنتی‌بیوم‌های ESBL با استفاده از روش Combined Disk تعیین گردید. در نهایت حضور ژن *ctx-M9* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توسط PCR شناسایی شد.

یافته‌ها: میزان مقاومت دارویی سویه‌های جدا شده نسبت به 11 آنتی‌بیوتیک به دست آمد. از 100 سویه مورد بررسی، با آزمون Combined Disk 27 سویه (27 درصد) تولیدکننده آنتی‌بیوم ESBL بودند. پس از طی پروسه PCR برای شناسایی ژن *ctx-M9*، از 27 سویه بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، 10 ایزوله (37 درصد) حاوی ژن مورد نظر بوده است.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به شیوع رو به افزایش سویه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مورد مطالعه و گزارش‌های مختلف از سایر کشورها، استفاده از پروتکل درمانی مناسب براساس تعیین الگوی آنتی‌بیوگرام سویه‌ها، اکیداً توصیه می‌شود. نتایج PCR درصد بالای مقاومت بتالاکتامازی را در بین سویه‌های ایشریشیاکلی نشان می‌دهد. بنابراین شناسایی ژن *ctx-M9* و بررسی میزان شیوع آن می‌تواند روند تشخیص و درمان بیماران را، سرعت بخشد. **کلیدواژه‌ها:** ایشریشیاکلی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بتالاکتام *ctx-M9*

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره دوم، ص 105-99، اردیبهشت 1395

آدرس مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران، تلفن: 09181701506

Email: K.Microbiology@gmail.com

مقدمه

همین دلیل درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری با مشکل روبرو شده است (1). افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین باکتری‌های بیماری‌زای شایع، تهدید جدی برای کنترل بیماری‌های عفونی می‌باشد (2). مقاومت باکتریایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و انتشار جهانی سویه‌های مقاوم یکی از مشکلات علم پزشکی است. در بین آنتی‌بیوتیک‌ها، بتالاکتام‌ها فراوان‌ترین و متنوع‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده هستند (3). مکانیسم اصلی مقاومت

ایشریشیاکلی¹ یکی از شایع‌ترین عامل باکتریایی 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 به علت اکتساب پلاسمیدهایی که کدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف هستند، به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از جمله سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف مقاوم شده‌اند. به

¹ دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران

² استادیار، دکترای تخصصی میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران (نویسنده مسئول)

³ استادیار، دکترای تخصصی بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران

¹ E.coli

درجه ذخیره شدند، تا در مراحل بعدی از این سویه‌ها استفاده شود (تمامی محیط‌های کشت از شرکت PRONADISA اسپانیا تهیه گردید). پس از تأیید وجود E.coli به پیشنهاد سازمان Clinical Laboratory Standards institute (CLSI) and به منظور غربال‌گری اولیه ارگانسیم‌های تولیدکننده ESBL، از آزمون دیسک آگار دیفیوژن (DAD) Disk Agar Diffusion استفاده گردید. در این روش پس از تهیه محیط مولر هینتون آگار سوسپانسیون میکروبی استاندارد با غلظت نیم مک فارلند (0.5 McFarland standard) تهیه گردید. 15 دقیقه پس از پخش کردن کامل سوسپانسیون میکروبی بر روی محیط مذکور، دیسک‌های سفتریاکسون (30 میکروگرم)، پمپراسیلین (100 میکروگرم)، پمپراسیلین/تازوباکتام (100/10 میکروگرم)، جنتامایسین (10 میکروگرم)، آمیکاسین (30 میکروگرم)، ایمپینیم (10 میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (5 میکروگرم)، کاربنی سیلین (10 میکروگرم)، سفپییم (30 میکروگرم) که از شرکت PRONADISA اسپانیا تهیه شده بودند، به فاصله حداقل 2/5 cm از یکدیگر، بر روی محیط مذکور قرار گرفتند. پس از انکوباسیون 24 ساعته در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، با استفاده از خط کش، قطر هاله رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری و با استانداردهای جهانی (CLSI) مقایسه شده و طبق دستورالعمل شرکت سازنده دیسک‌ها، نمونه‌های موردنظر به صورت مقاوم (R)، نیمه حساس (I) و حساس (S) گزارش گردیدند. 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. در این آزمون همانند الگوی روش دیسک آگار دیفیوژن پس از تهیه محیط مولر هینتون آگار، سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند (حاوی $1/5 \times 10^8$ باکتری) به‌طور کامل در محیط مذکور پخش شد. سپس دیسک‌های سفتازیدیم (30 میکروگرم)، سفتازیدیم-کلاولانیک اسید (30-10 میکروگرم)، سفوتاکسیم (30 میکروگرم) و سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید (30-10 میکروگرم)، به فاصله حداقل 2/5 سانتی‌متر از یکدیگر بر روی محیط قرار گرفتند. پس از 24 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های حاوی کلاولانیک اسید نسبت به بدون کلاولانیک اسید سنجیده شد. به‌طوری‌که اگر هاله عدم رشد اطراف دیسک سفتازیدیم-کلاولانیک اسید بزرگ‌تر یا مساوی پنج میلی‌متر نسبت به سفتازیدیم به‌تنهایی باشد و یا این‌که هاله عدم رشد اطراف دیسک

باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های کلاس بتالاکتام، تولید آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است. این آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را قبل از اینکه به پروتئین‌های باندشونده به پنی‌سیلین² در غشای سیتوپلاسمی برسند، هیدرولیز و غیرفعال می‌کنند(4). بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف³ دسته‌ای از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌باشند که اهمیت ویژه‌ای در درمان ضد میکروبی دارند(5).

در بین انواع مقاومت‌های تولیدشده به‌وسیله باکتری‌ها، انواعی که توانایی تولید آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف (ESBL) را دارند، از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند(6). ژن‌های اصلی کدکننده ESBLs به‌گروه‌های SHV، TEM، CTXM و SHV متعلق می‌باشند(7). بتالاکتام‌های CTX-M به‌طور فزاینده‌ای در ایشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه شایع هستند. این آنتی‌بیوتیک‌ها براساس تغییرات اسیدآمین به پنج گروه اصلی، CTX-M1، CTX-M2، CTX-M8، CTX-M9، CTX-M25 تقسیم می‌شوند. منشأ بعضی از این آنتی‌بیوتیک‌ها از ژن‌های کروموزومی *Kluyvera spp* از باکتری‌های محیطی می‌باشد که ژن‌های مربوطه در درون پلاسמיד وارد شده و سپس به باکتری‌های پاتوژن منتقل شده‌اند. بتالاکتام‌ها به دو صورت مولکولی (Ambler) و عملکردی (Bush-Jacoby) (Medeiros طبقه‌بندی می‌شوند(4).

تیپ‌های CTX-M2 و CTX-M3 در سراسر جهان شیوع یافته و در کشورهای مختلف از جمله آرژانتین، تیپ‌های غالب هستند. تا به حال بیش از 50 نوع CTX-M شناسایی شده است. در طی بررسی‌هایی که در سال‌های اخیر در ایران انجام شده آنتی‌بیوتیک‌های ESBL خصوصاً CTX-M افزایش پیدا کرده‌اند. بیشترین شیوع CTX-M مربوط به زیرگروه CTX-M1 بوده و بقیه زیرگروه‌ها با شیوع نداشته و یا درصد کمی را تشکیل می‌دهند(8,9).

مواد و روش کار

در یک دوره یک‌ساله از مهرماه 1393 تا شهریور 1394 تعداد 260 نمونه ادرار از بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و بیمارستان‌های شهرستان سنندج جمع‌آوری شد و بر روی محیط‌های کشت انتخابی EMB⁴، بلاد آگار و نوترینت آگار کشت داده شدند. سپس توسط تست‌های بیوشیمیایی از قبیل سیمون سترات، لیزین، دکربوکسیلاز، اوره‌آز، MR/VP⁵، SIM⁶ و TSI⁷ که بر روی کلنی‌ها انجام گرفت، 100 سویه E.coli شناسایی گردید. کلنی‌های مربوط به سویه‌های ایشریشیاکلی در TSB⁸ و در 70-

⁶ Sulfide Indole Motility Medium

⁷ Triple Sugar Iron Agar

⁸ Tryptic soy broth

² Penicillin Binding Protein (PBP)

³ Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL)

⁴ Eosin Methylene Blue Agar

⁵ Methyl Red and Voges-Proskauer

16 ساعت OD باکتری‌ها با اسپکتروفوتومتر قرائت شد ($A_{600}=1$). سپس از 1 الی 2 میلی‌لیتر از کشت شبانه برای استخراج DNA ژنومی باکتری استفاده شد و استخراج DNA طبق پروتکل کیت Gene All کشور آلمان انجام شد. به‌منظور اطمینان از عملکرد اختصاصی پرایمرها از برنامه blast در NCBI استفاده گردید. توالی پرایمرهای مذکور طبق جدول شماره 1 می‌باشد.

سفو تاکسیم - کلادولانیک اسید بزرگ‌تر یا مساوی 3 mm نسبت به سفو تاکسیم به‌تنهایی باشد، سویه موردنظر را می‌توان بر طبق ضابطه CLSI، به‌عنوان ESBL در نظر گرفت.

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) ابتدا ایزوله‌های ذخیره‌شده در TSB بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند، از هر باکتری یک تک کلنی در محیط مایع LB broth کشت داده شد و به‌صورت شبانه در انکوباتور شیکردار انکوبه شد. پس از 12 الی

جدول (1): توالی پرایمر مورد استفاده در مطالعه

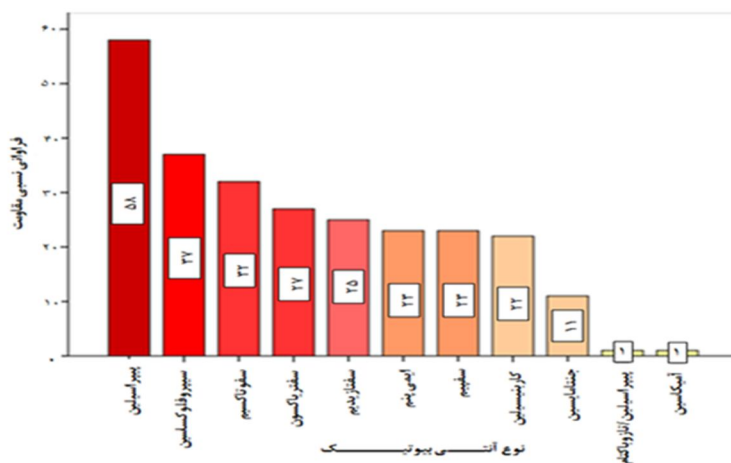
پرایمر	توالی پرایمر	وزن محصول	تعداد چرخه	رفرنس
CTX-M9/F	5'-GATTGACCGTATTGGGAGTTT-3'	909bp	30	10
CTX-M9/R	5'-TATTGAGAGTTACAGCCCTTCG-3'	909bp	30	10

سانتی‌گراد و مرحله طولی شدن نهایی به مدت ده دقیقه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد انجام شد. قطعه موردنظر از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی مرز فراوان سازی شده و محصولات بعد از الکتروفورز بر روی ژل آگارز 2 درصد، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها

در این مطالعه مقطعی - تحلیلی 260 نمونه ادرار بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمانی شهرستان سنندج جمع‌آوری و پس از جداسازی توسط آزمون‌های بیوشیمیایی، 100 نمونه به‌عنوان E.coli تأیید شدند. براساس نتایج حاصل از آزمون غربالی دیسک آگار دیفیوژن، 27 (27درصد) سویه به‌عنوان تولیدکننده ESBL مطرح شدند. نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت نسبت به 11 آنتی‌بیوتیک انتخاب‌شده نیز در نمودار 1 نشان داده شده است. در طی PCR که بر روی 27 سویه منتخب انجام شد، مشخص شد که از این میان 10 سویه (37درصد) تولیدکننده CTX-M9 می‌باشد (شکل 1).

در این فرآیند DNA استخراج‌شده به همراه پرایمرهای مربوط به ژن‌های گروه CTX-M9 در سویه‌های غربال مثبت، در مخلوط واکنش ترکیب‌شده و جهت تکثیر DNA، PCR صورت گرفت. مخلوط اصلی واکنش PCR با حجم نهایی 25 میکرولیتر شامل 2 میکرولیتر کلرید منیزیم، 2/5 میکرولیتر بافر PCR، 0/5 میکرولیتر dNTPs، 17/3 میکرولیتر آب مقطر، 2 میکرولیتر پرایمر رفت‌وبرگشت CTX-M9 (از هر کدام 1 میکرولیتر) و 0/1 میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز بود و نهایتاً یک میکرولیتر DNA الگو به هر یک از ویال‌ها اضافه گردید (کلیه مواد از شرکت فرمنتاز کشور آلمان تهیه گردید). توالی پرایمر و دماهای مورد استفاده بر طبق مطالعات محققین انتخاب گردید. واکنش PCR طی 30 سیکل، تحت برنامه زمانی ترموسایکلر شامل: مرحله اول باز شدن دو رشته DNA به مدت 4 دقیقه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد، مرحله باز شدن دو رشته به مدت 45 ثانیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال پرایمرها به مدت 50 ثانیه در دمای 50 درجه سانتی‌گراد، مرحله طولی شدن رشته هدف به مدت 4 دقیقه در دمای 72 درجه



نمودار (۱): توزیع مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مورد بررسی در این مطالعه



شکل (۱): ژل آگارز حاوی نمونه‌های PCR حاصل از تکثیر ژن‌های گروه CTX-M9، M: مارکر 100bp، 1: کنترل مثبت، 2: کنترل منفی، نمونه‌های 3، 4، 5، 6، 9 و 11: ایزوله‌های مثبت

93 نمونه، 72 نمونه (77/4 درصد) به وسیله PCR، CTX-M مثبت بودند (15). Pak- Leung Ho در هنگ‌کنگ به بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی وسیع‌الطیف در ایشریشیاکلی و کلبسیلا با بررسی 46 نمونه ایشریشیاکلی و هشت نمونه کلبسیلا پنومونیه توانستند باکتری‌های مولد ESBL را شناسایی کنند، که از بین 46 نمونه، هشت جدایه ایشریشیاکلی و از بین هشت جدایه کلبسیلا پنومونیه، چهار مورد مولد ESBL بودند، که توانستند انواع CTX-M9، CTX-M24، CTX-M14 را شناسایی کنند و همچنین ژن‌های TEM1b و TEM1c و نیز SHV در این نمونه‌ها مشاهده شد (16). در مطالعه دیگری که توسط بن و همکاران که در سال 2009 به صورت مطالعه چندمرکزی انجام شد، مشخص گردید عفونت‌های ناشی از باکتری‌های تولیدکننده ESBL متعلق به خانواده‌ی انتروباکتریاسه رو به افزایش بوده و با مرگ‌ومیر بالاتری همراه هستند. افزایش شیوع CTX-M در سراسر جهان به دلیل عفونت‌های ناشی از آن‌ها نگران کننده است. در مطالعه بن مطالعه اپیدمیولوژیک 6 مرکز غیر بیمارستانی در اروپا، آسیا و آمریکا شمالی تجزیه و تحلیل گردید و ریسک فاکتورها نیز بررسی شدند. در این مطالعه از مجموع 983 بیمار که 90/5 درصد E. coli، 6/9 درصد کلبسیلا پنومونیه و 2/5 درصد پروتئوس میریبیلیس که شایع‌ترین نوع ESBL، CTX-M با 65 درصد موارد بود. از مهم‌ترین ریسک فاکتورهای ابتلا، مصرف روزافزون آنتی‌بیوتیک‌ها بدون انجام تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی، مدت طولانی تحت درمان بودن، طولانی شدن زمان بستری در بیمارستان و سن بالای 65 سال بودند. در این مطالعه نتیجه‌گیری شده بود که با توجه به شایع بودن

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه از 100 نمونه مورد بررسی 76 نمونه (76 درصد) مربوط به زنان و 24 نمونه (24 درصد) مربوط به مردان می‌باشد که این نشان می‌دهد، شیوع عفونت ادراری در شهرستان سنج در میان زنان بیشتر از مردان می‌باشد. از 100 نمونه مورد بررسی از لحاظ سنی، 19 نمونه (19 درصد) در محدوده سنی 0 تا 15 سال، 10 نمونه در محدوده سنی 15 تا 25 سال، 34 نمونه (34 درصد) در محدوده 25 تا 40 سال، 20 نمونه (20 درصد) در محدوده 40 تا 60 سال و 17 نمونه (17 درصد) بیشتر از 60 سال سن داشتند. پس از انجام تست‌های تاییدی فنوتیپی مشخص شد که از مجموع 100 نمونه مورد بررسی 27 نمونه (27 درصد) ESBL⁺ و 73 نمونه (73 درصد) ESBL⁻ بودند. نتایج به دست آمده پس از انجام واکنش PCR نشان داد که از مجموع 27 نمونه (27 درصد) ESBL⁺، 10 نمونه دارای ژن بتالاکتاماز CTX-M9 و 17 نمونه (17 درصد) فاقد ژن بتالاکتاماز CTX-M9 بودند.

اولین آندمی CTX-M در آمریکای لاتین و اروپای شرقی گزارش شده است، اما پس از سال 2000 گزارش‌های فراوانی از گسترش این ژن به کشورهای اروپای غربی مانند فرانسه، انگلستان، یونان، اسپانیا و حتی مغولستان ارائه شد (11-13). در سال‌های اخیر آنزیم CTX-M به عنوان شایع‌ترین نوع ESBL به خصوص در اروپا و آمریکای شمالی گزارش شده است و انواع تیپ‌های مختلف این آنزیم شناسایی و معرفی شده‌اند (14). در مطالعه‌ای که توسط Shahid و همکارانش انجام شد، شیوع ژن blactx-M را در 93 نمونه ایشریشیاکلی مورد بررسی قرار دادند و مشخص کردند که از

مقاومت بتالاکتامازی را در بین سویه‌های ایشریشیاکلی نشان می‌دهد. همچنین این یافته‌ها اهمیت ژن CTX-M9 را در داروهای بتالاکتام و به‌خصوص سفالوسپورین‌های با طیف بالا را در میان سویه‌های E.coli در شهرستان سنندج را نشان داد. شناسایی این ژن و تعیین پراکندگی آن می‌تواند روند تشخیص و درمان بیماران را، سرعت بخشید. از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به جمع‌آوری نمونه‌های ادراری به دلیل محدود بودن تعداد آزمایشگاه‌ها در سطح شهر سنندج اشاره نمود. این مشکل با افزایش تعداد آزمایشگاه‌های بیمارستان‌ها و همکاری کارشناسان آزمایشگاه برطرف می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج جهت فراهم آوردن تجهیزات لازم و همکاری صمیمانه در پیش برد مراحل عملی تحقیق و هم‌چنین از کلیه شرکت‌کنندگان در مطالعه قدردانی و تشکر می‌نمایند.

References:

1. Sanchez UM, Bello TH, Dominguez YM, Mella MS, Zemelman ZR, Gonzalez RG. Transference of extended-spectrum beta-lactamases from nosocomial strains of *Klebsiella pneumoniae* to other species of *Enterobacteriaceae*. *Rev Med Chil* 2006;134(4):415-20.
2. Al-Jasser AM. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): a global problem. *KMJ* 2006; 38(3): 171- 85.
3. Bronson JJ, Barrett JF. Quinolone, everminomycin, glycylcycline, carbapenem, lipopeptide and cephem antibacterials in clinical development. *Curr Med Chem* 2001; 8(14): 1775-93.
4. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect* 2009;73(4):345-54.
5. Tzouveleki LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type beta-lactamases: an

emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* 2000;14(2):137-42.

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

7. Malini AB, Sageerabano S, Kowsalya R, Sarkar G. The Occurrence of CTX-M3 Type Extended Spectrum Beta Lactamases among *Escherichia Coli* Causing Urinary Tract Infections in a Tertiary Care Hospital in Puducherry. *JCDR* 2012; 6(7): 1203-6.

8. 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.

9. Yu X, Susa M, Weile J, Knabbe C, Schmid RD, Bachmann TT. Rapid and sensitive detection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*

- from urine samples using a genotyping DNA microarray. *IJMM* 2007;297(6):417-29.
10. Lee SH, Kim JY, Lee SK, Jin W, Kang SG, Lee KJ. Discriminatory detection of extended-spectrum beta-lactamases by restriction fragment length dimorphism-polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* 2000;31(4):307-12.
 11. Yates C, Amyes S. Extended-spectrum beta-lactamases in nontyphoidal *Salmonella* spp. isolated in the UK are now a reality: why the late arrival? *JAC* 2005;56(2):262-4.
 12. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *JAC* 2007;59(2):165-74.
 13. Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, Brigante G, Perilli M, Amicosante G, et al. CTX-M-type extended-spectrum betalactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(8):2700-6.
 14. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006;9(5):466-75.
 15. Shahid M, Singhal M, Malik A, Shukla I, Khan HM. ESBLphenotypes and prevalent genotype of CTX-M type betalactamases in clinical isolates of *E.coli* in a North Indian tertiary care hospital. *Proceedings of MICROCON 2006. National Congress of Indian Association of Medical Microbiologists. Indian: 2006.P. 27-9.*
 16. 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.
 17. Ben- Ami, R., et al., A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta- lactamase- producing enterobacteriaceae in nonhospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2009; 49(5): 682-90.

STUDY ON THE PREVALENCE OF CTX-M9 GENE IN STRAINS OF ESCHERICHIA COLI TO BETA-LACTAM ANTIBIOTICS RESISTANT IN SANANDAJ CITY

Nashmil Dabaghian¹, Kambiz Davari^{2*}, Sako Mirzaei³

Received: 5 Jan, 2016; Accepted: 3 Mar, 2016

Abstract

Background & Aims: β -lactamase enzymes, the most important factor to antibiotic resistance among Gram-negative bacteria, is of beta-lactam family. Today, we experience increasing infection in the world and this is one of the emerging health problems in the world. CTX-M9 is a beta-lactamase resistance gene. The aim of this study was to determine the prevalence of ESBL producing Escherichia and molecular evaluation of CTX-M9 β -lactamase was amplified by PCR.

Materials & Methods: In a series 270 urine samples were collected from medical centers in the city of Sanandaj, the EMB-agar medium at 37 ° C for 24 hours and biochemical tests to confirm the 270 samples, 100 isolates of Escherichia coli was isolated. Antibiotic susceptibility using disk diffusion and ESBL enzymes were determined using the combined disk. The presence of CTX-M9 using specific primers was detected by PCR method.

Results: The drug-resistance of isolates to 11 antibiotics was obtained. 27 (27%) ESBLs producing strains were detected by using combined disc method on 100 strains. PCR used for the detection of CTX-M-9 gene showed that 10 (34%) out of 27 isolates contained such gene.

Conclusion: The rate of ESBLs producing strains in the present study and various reports from other countries is highly increasing, therefore, using an appropriate treatment protocol based on the antibiogram pattern of the strains is highly recommended. The results of PCR showed a high percentage of β -lactamase resistant E. coli strains. So identification of ctx-M9 genes and Prevalence of this Genes can accelerate diagnosing and treatment of patients.

Keywords: Escherichia coli, Antibiotic resistance, Ctx-M9 beta-lactam

Address: Department of Microbiology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

Tel: +989353710404

Email: K.Microbiology@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2016; 27(2): 105 ISSN: 1027-3727

¹ Master of Science Student in Microbiology, Islamic Azad University Sanandaj Branch, Sanandaj, Iran

² Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University Sanandaj Branch, Sanandaj, Iran (Corresponding Author)

³ Assistant Professor, Department of Biochemistry, Islamic Azad University Sanadaj Branch, Sanandaj, Iran