

شناسایی مولکولی ژن های کدکننده بتالاکتاماز *CTX-M* در کلبسیلا پنومونیه های ایزوله شده از بیماران مراجعه کننده به مناطق مختلف شهر تهران

نیلوفر شاملو^۱، سعید ذاکر بستان آباد^{۲*}، رضامیرنژاد^۲

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، پرند، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بتالاکتاماز *CTX-M* به عنوان یک مکانیسم مقاومت در مقابل بتالاکتام ها در پاتوژن های گرم منفی شناخته شده است.

هدف تعیین ژن *CTX-M* در کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL در مناطق مختلف شهر تهران به روش مولکولی PCR است.

مواد و روش ها: ۱۷۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جداسازی و تعیین هویت شدند. مقاومت باکتری ها نسبت به دیسک های آنتی بیوتیکی

تعیین شد. سپس در سویه های مولد ESBL، وجود ژن *CTX-M* با روش مولکولی PCR بررسی شد.

یافته ها: در تست فنوتیپی تأییدی ۵۶/۸۱٪ ایزوله ها ESBL بودند و فراوانی ژن *CTX-M* برابر ۲۸٪ بود. بیشترین میزان مقاومت،

مربوط به آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۲۴/۸۹٪) و کمترین مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک ایمی پنم (۶/۰۶٪) بود.

بحث: ژن های بتالاکتاماز *CTX-M* شیوع بالایی در ایزوله های مولد ESBL دارد؛ لذا اعمال ابزارهای مناسب کنترل عفونت و راهکارهای

مناسب درمانی در بخش های مختلف بیمارستان های مورد مطالعه برای جلوگیری از انتشار آن ها ضروری است.

واژه های کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، ژن *CTX-M*، واکنش های زنجیره ای پلی مرازی

مقدمه

خانواده نظیر /شریشیا، سالمونلا، شیگلا و یرسینیا می باشد (۲۱).

کلبسیلا پنومونیه و کلبسیلا اکسی توکا عامل عفونت های

اكتسابی از بیمارستان هستند و در ایجاد حالت های التهابی

عفونت های سیستم تنفسی شرکت دارند (۲۵). در صورت عدم

کنترل و گسترش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی با افزایش

گونه های باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک روبرو می شویم که

این امر خود منجر به طولانی شدن دوره بیماری و به موازات آن

افزایش احتمال انتقال بیماری به سایر افراد جامعه، افزایش طول

مدت زمان بستری در بیمارستان، افزایش نیاز به داروهای گران تر

و در عین حال با عوارض بیش تر برای درمان و افزایش خطر مرگ

کلبسیلا، باسیلی گرم منفی متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است که دارای رابطه ژنتیکی به نسبت نزدیکی با سایر جنس های این

نویسنده مسئول :

گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، پرند، ایران

پست الکترونیکی: saeedzaker20@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۹

و میر بیماران می شود. می توان با کنترل عوامل مستعد کننده و زمینه ساز مقاومت آنتی بیوتیکی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی را به حداقل برساند (۳). درمان اختصاصی و واحدی برای بیماری های ناشی از کلبسیلا پنومونیه وجود ندارد و نیز اکثر آن ها به بسیاری از داروها مقاوم هستند. به همین دلیل جهت درمان های اختصاصی به تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی نیاز دارند. تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی نقش مهمی در درمان صحیح بیماران و جلوگیری از افزایش مقاومت میکروبی و کاهش هزینه های بیماران خواهد داشت. در حال حاضر داروهایی که به طور معمول برای درمان بیماری های ناشی از گونه های کلبسیلا، مورد استفاده قرار می گیرند، از خانواده داروهای بتالاکتام می باشند که از طریق "مهار سنتز دیواره سلولی" عمل می نمایند (۸). فراوان ترین و مهم ترین مکانیسم مقاومت به داروهای بتالاکتام، تولید آنزیم های بتالاکتاماز می باشد که ژن های این نوع مقاومت های دارویی بیش تر از طریق پلاسمیدهای مزدوج و طی مکانیسم های مختلف از جمله کانژوگاسیون از یک باکتری به باکتری دیگر منتقل می شوند (۱۹). در واقع این آنزیم ها که سرین پروتئاز هستند، با اتصال به آنتی بیوتیک های بتالاکتام و با ایجاد پیوند کووالان، و با تخریب پیوند آمیدی موجب غیرفعال شدن این داروها می شوند. آنزیم های بتالاکتاماز در باکتری ها بسیار متنوع هستند و در پاسخ به فشار انتخابی آنتی بیوتیک، مدام در حال موتاسیون و یا جایگزینی اسیدهای آمینه به ویژه در جایگاه فعال آنزیم هستند به طوری که باعث ظهور انواع جدیدی از بتالاکتامازهای با طیف گسترده (ESBL) شده اند (۷). ESBLs دسته ای از آنزیم های بتالاکتاماز می باشند که اهمیت ویژه ای در درمان ضد میکروبی دارند. میزان تولید ESBLs در باکتری های خانواده انتروباکتریاسه در سراسر جهان متفاوت می باشد. آنزیم های بتالاکتاماز به دو صورت مولکولی (Ambler) و عملکردی (۱۱) طبقه بندی می شوند (۲۶). طبقه بندی این آنزیم ها به لحاظ عملکردی هنگامی شروع شد که سفالوسپورینازها از پنی سلینازها

تمایز شدند. بتالاکتاماز طیف گسترده به لحاظ مولکولی در گروه A و به لحاظ عملکردی در گروه ۲ قرار دارند (۹). در طول دهه گذشته بتالاکتامازهای CTX-M گسترش سریع جهانی داشته اند. اولین ارگانیسم های مولد این بتالاکتامازها در ایزوله هایی به صورت اپیدمیک یا اسپورادیک، در مناطق دور از هم (آلمان، آرژانتین و فرانسه) در اوایل ۱۹۹۰ تشخیص داده شد (۱۷). این آنزیم ها در کلاس مولکولی A بتالاکتامازها قرار می گیرند. گسترش افقی ژن های این بتالاکتاماز در میان سویه های مشابه یا متفاوت اعضای انتروباکتریاسه توسط پلاسمیدها صورت می گیرد.

برخلاف بتالاکتامازهای SHV و TEM، بتالاکتامازهای CTX-M، اثر تخریبی بیشتری بر آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم و سفتریاکسون نسبت به سفتازیدیم دارند (۱۳). CTX-M ها روی ژن های بتالاکتاماز اکتسابی پلاسمید قرار دارند.

برخی مطالعه ها، شیوع سویه های مقاوم به سفالوسپورین های با طیف اثر وسیع را با واسطه ESBLs در ایزوله های اشریشیا و کلبسیلا مجزا شده از بیماران بخش مراقبت های ویژه بین ۲۴-۳۸ درصد ذکر نموده اند و این در حالی است که آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام درصد بالایی از آنتی بیوتیک های مصرفی در پزشکی را به خود اختصاص می دهند. امروزه این بتالاکتامازها قادرند علاوه بر سفالوسپورین های محدوداثر و پنی سیلین ها، سفالوسپورین های وسیع الطیف و منوباکتام را نیز هیدرولیز کنند (۱۲، ۱۵، ۲۳). در یک مطالعه که در مرکز بین المللی چنای بر روی ۲۰۰ ایزوله تولیدکننده ESBL انجام شد، میزان فراوانی ژن CTX-M (۴۵٪) گزارش گردید (۱۶). در تحقیقی دیگر که در ریاض عربستان انجام گردید به بررسی و فراوانی ژن و خصوصیات مولکولی ESBL در کلبسیلا پنومونیه پرداخته شد. در این مطالعه که ۴۰۰ ایزوله مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از PCR درصد ژن های CTX-M (۳۴/۱٪) گزارش شد (۶). در مطالعه ای که در اصفهان انجام گرفت، مقاومت در کلبسیلا پنومونیه نسبت به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم، آمیکاسین،

ایمی پنم و سیپروفلوکساسین بررسی شد و به ترتیب ۵۷/۱٪، ۳۱/۶٪، ۰/۰٪، ۷۸/۶٪ گزارش شد (۱).

امروزه گزارش های متعدد حاکی از شیوع این نوع مقاومت در اقصی نقاط دنیا بوده و مؤید یک مشکل جهانی است. این مطالعه ها مقاومت های چند دارویی باکتری ها را یکی از معضلات عمده پزشکی دانسته و بر لزوم بررسی و کنترل آن ها تأکید دارند (۲۰، ۲۲). درمان عفونت با این دسته از ارگاناسم ها نیازمند تجویز آنتی بیوتیک های وسیع الطیف بوده و به ویژه در بیماران با ضعف سیستم ایمنی و در بخش های مراقبت های ویژه با مشکلات عدیده ای همراه است. لذا آزمایشگاه های میکروب شناسی نقش مهمی در شناسایی و گزارش باکتری های مولد این نوع بتالاکتامازها و تسهیل در درمان مؤثر بیماران ایفا می کنند (۲۴، ۱۹). در هر حال علی رغم هزینه های بالای روش های ژنوتیپی در مقایسه با روش های فنوتیپی تشخیص مقاومت، گسترش روش های مولکولی مبتنی بر PCR منجر به درمان مؤثر و سریع تر آنان و جلوگیری از گسترش ایزوله های مقاوم باکتری ها می گردد. لذا از آنجائی که مطالعه های مشابه در ایران کم تر انجام شده و الگوی مقاومت سویه های باکتریایی مسئول عفونت های بیمارستانی به ویژه با مکانیسم ESBLs در منطقه ما نامشخص است، در مطالعه حاضر وجود ژن بتالاکتاماز *CTX-M* در ایزوله های بیمارستانی کلبسیلا پنومونیه تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف در شهر تهران مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

جمع آوری نمونه و ایزوله های مورد بررسی

تعداد ۱۷۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، از بیمارستان های مختلف شهر تهران و آزمایشگاه مسعود از دی ماه ۱۳۹۵ تا تیرماه ۱۳۹۶ جمع آوری شدند. ابتدا نمونه های بالینی توسط آزمایش های میکروب شناسی

و بیوشیمیایی مربوط به شناسایی گونه کلبسیلا پنومونیه مانند کشت بر روی محیط TSI، آزمایش اندول و تست حرکت (کشت بر روی محیط SIM)، MR-VP، سیترات و اوره آز مورد بررسی قرار گرفتند.

آنتی بیوگرام و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

آزمون آنتی بیوگرام و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیکی سفپیم، آمپی سیلین، جنتامایسین، آمیکاسین، سفالوتین، سفتازیدیم، پپراسیلین، ایمی پنم، سیپروفلوکساسین، سفوتاکسیم، نیتروفورانتوئین و تری متوپریم شرکت MAST انگلستان به روش دیسک دیفیوژن با متد استاندارد کربی بوئر بر اساس دستورالعمل مؤسسه استانداردهای بین المللی آزمایشگاهی (CLSI) انجام شد.

جهت بررسی فنوتیپی سویه های مولد ESBLs، از روش دیسک ترکیبی محصول شرکت MAST انگلستان استفاده شد. سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام با استفاده از دیسک های ترکیبی سفوتاکسیم/کلانولانیک اسید مورد مطالعه قرار گرفت. در محیط مولر هینتون آگار (MERCK) براساس روش دیسک دیفیوژن غربالگری صورت گرفت. پس از انکوباسیون به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دمای ۳۷ °C تولید ESBLs از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵ میلی متر یا بیش تر در اطراف دیسک ترکیبی سفوتاکسیم/کلانولانیک اسید در مقایسه با دیسک سفوتاکسیم مشخص گردید (تصویر ۱).

نانودراپ غلظت نمونه DNA به کمک جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر نسبت به ۲۳۰ و ۲۸۰ مورد سنجش قرار داده شد. در اندازه گیری کیفی نمونه DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۰۸ درصد الکتروفورز مشاهده گردید.

استخراج به این روش به صورت روزانه انجام گرفت و تمامی DNA استخراج شده ذخیره شد و در یخچال ۲۰- نگهداری شدند.

برای تهیه پرایمرها (۱۰) پرایمرها توالی پرایمرهای مورد استفاده (جدول ۱) جهت ساخت تحویل شرکت پیشگام شد. پرایمرها پس از طراحی به صورت لیوفیلیزه دریافت شدند. برای تهیه محلول ذخیره بر طبق دستورالعمل (برگه آنالیز) همراه پرایمر عمل شد.

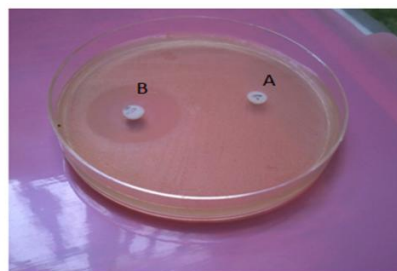
جدول ۱: اطلاعات پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی	طول قطعه	دمای TM
CTX-M	F: 5'- ACCGCCGATAATTCGACAT-3' R: 5'- GATATCGTTGGTGGTGCCATAA-3'	588bp	61
TEM	F: 5'-TTTCGTGTCGCCCTTATTC-3' R: 5'- ATCGTTGTCAGAAAGTAAGTTGG-3'	401bp	55/5

PCR نمونه ها

در این مطالعه ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس آماده شرکت امپلیکون، ۱ میکرولیتر پرایمر forward *CTX-M* و ۱ میکرولیتر پرایمر *CTX-M* reverse ، ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر و ۳ میکرولیتر از DNA استفاده شد. برای اطمینان از صحت انجام آزمایش، لازم به ذکر است که از کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 تهیه شده از مرکز پژوهش های علمی و صنعتی تهران و اشریشیاکلی ATCC 35218 تهیه شده از انستیتو پاستور ایران به عنوان کنترل مثبت و منفی به ترتیب استفاده گردید.

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام شد:



شکل ۱: دیسک فنوتیپی تأییدی جهت شناسایی سویه های کلبسیلا مولد ESBLs (سفوتاکسیم/کلونیک B: (سفوتاکسیم). A: در محیط مولر هینتون آگار اسید)

استخراج DNA

برای استخراج DNA به روش boiling نیاز به کلنی هایی از کشت تازه (۲۴ ساعته) است، به این منظور نمونه هایی که در آزمون فنوتیپی به هر یک از آنتی بیوتیک های بتالاکتام مقاوم بودند، برای استخراج DNA کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و رشد ایزوله های مورد نظر آماده استخراج شدند. ابتدا ۳ تا ۵ کلنی از هر نمونه داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتر حاوی ۲۰۰ μ آب مقطر استریل حل شد. با استفاده از شیکر آن قدر نمونه ها shake شد تا این که کاملاً حل شوند.

ویال ها به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه، داخل بن ماری جوش (۱۰۰ درجه سانتی گراد)، قرار داده شد به طوری که سطح آب جوش دو سوم میکروتیوب را در برگیرد.

سپس میکروتیوب ها به مدت ۱۰-۵ دقیقه، با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد و محلول رویی (سوپرناتانت) که حاوی DNA می باشد، برای انجام واکنش PCR به میکروتیوب استریل منتقل شد.

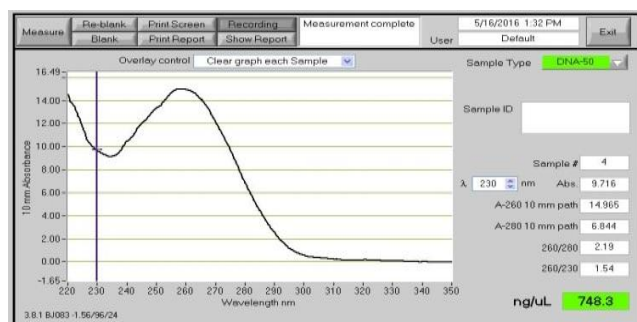
در این مرحله پس از استخراج، جهت تأیید ژنوم اندازه گیری کمی و کیفی انجام گرفت؛ در اندازه گیری کمی با استفاده از

از ۱۷۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه ۱۰۰ ایزوله (۵۶/۸۱٪) توانایی تولید آنزیم های بتالاکتاماز را داشتند. تولید ESBL از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵ میلی متر یا بیش تر در اطراف دیسک سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید (شرکت Mast انگلستان) در محیط مولر هینتون آگار MERCK محاسبه گردید.

تصویر (۲) نتیجه کمی ژنوم استخراج شده باکتری کلبسیلا پنومونیه را نشان می دهد. ۷۴۸ نانوگرم بر میکرولیتر غلظت DNA به دست آمده است. هم چنین نسبت ۲۶۰/۲۸۰ نشان دهنده عدم آلودگی DNA به دست آمده است.

(تصویر ۳) نتایج کیفی DNA حاصل از استخراج ژنوم باکتری کلبسیلا پنومونیه از محیط کشت با استفاده از روش جوشاندن می باشد که این نتایج نشان دهنده این است که total DNA از باکتری به درستی استخراج شده است.

با انجام آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی این ژن بر روی ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه ESBL مشخص شد که در مجموع ۲۸ (۲۸٪) ایزوله دارای ژن *CTX-M* می باشند. تعدادی از نمونه های ثبت دارای این ژن همراه با کنترل مثبت و کنترل منفی به طور جداگانه PCR شد (تصویر ۴).



شکل ۲: نتیجه کمی ژنوم استخراج شده

یک سیکل ۵ دقیقه ای در ۹۴ درجه سانتی گراد (Initial denaturation)، سپس ۳۰ سیکل شامل مرحله واسرشت شدن (denaturation) ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، مرحله اتصال (annealing) ۱ دقیقه در ۶۱ درجه سانتی گراد و مرحله طویل شدن (Extention) ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت یک سیکل ۵ دقیقه ای در ۷۲ درجه سانتی گراد.

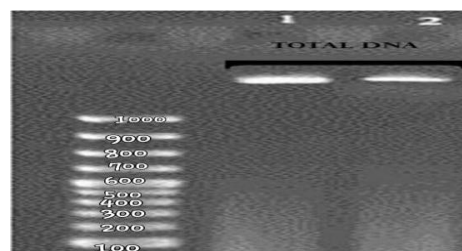
الکتروفورز

برای انجام الکتروفورز محصول های PCR از ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده شد. میزان ۱/۵ گرم پودر آگارز را در ۱۰۰ میلی لیتر بافر TBE 0.5X حل کرده و بعد از حرارت دادن و خنک شدن به میزان ۱۰ میکرولیتر (۱۰۰ μg/ml) safestain (برای رنگ آمیزی DNA) به آن اضافه شد. پس از مخلوط کردن، محلول داخل قالب ریخته و پس از بسته شدن ژل، از قالب خارج کرده و به داخل تانک الکتروفورز انتقال داده شد. مقدار سه میکرولیتر ladder را در چاهک اول و سپس ۶ میکرولیتر محصول PCR به ترتیب در چاهک های بعدی اضافه شد. برای انجام الکتروفورز، ولتاژ به مدت ۲ دقیقه روی ۱۰۰ ولت تنظیم گردید و سپس ۴۵ دقیقه روی ۸۵ ولت تنظیم شد، وقتی نمونه سه چهارم طول ژل را طی کرد، ژل از تانک خارج و با دستگاه ژل داک مورد مشاهده قرار داده و از ژل مربوطه عکس تهیه شد.

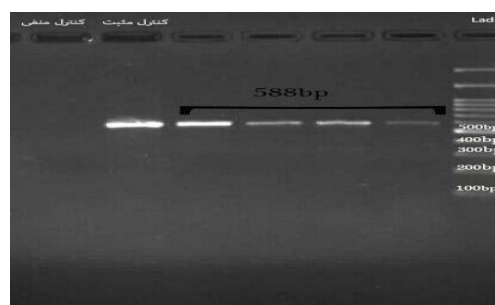
یافته ها

نتایج دیسک گذاری برای هر دیسک آنتی بیوتیک به طور جداگانه در ۱۷۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیا بررسی شد. در این پژوهش بیش ترین میزان مقاومت، مربوط به آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۸۹/۰۲٪) و کم ترین درصد مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک ایمی - پنم (۶/۰۶٪) مشاهده گردید.

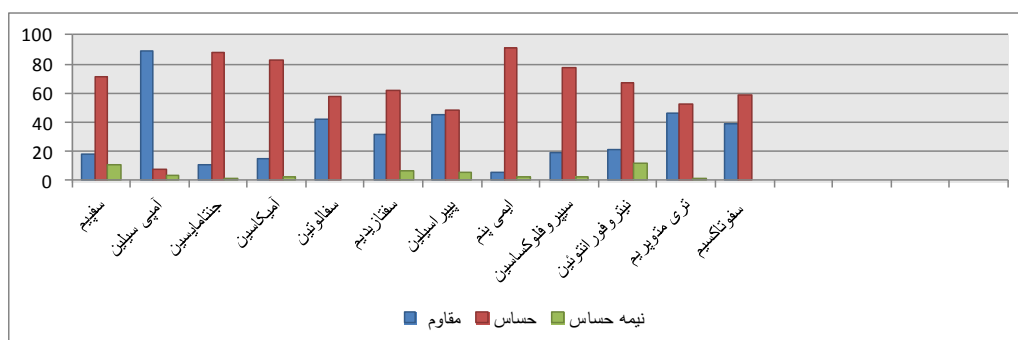
ایزوله های مقاوم و غیرمقاوم به هر آنتی بیوتیک نیز به صورت حساس و نیمه حساس گزارش شد که در نمودار (۱) نشان داده شده است.



شکل ۳: نتیجه کیفی ژنوم استخراج شده



شکل ۴: برخی از نمونه های حاوی ژن *CTX-M*



نمودار ۱: نتایج تست آنتی بیوگرام

بحث

در مطالعه ای که در گرگان انجام شد مقاومت به ایمپی پنم دیده نشد (۵).

در مطالعه ای دیگر مقاومت تمام گونه ها نسبت به جنتامایسین ۳۰٪، ایمپی پنم ۲٪ تعیین گردید (۲).

تفاوت در میزان مقاومت به آنتی بیوتیک ها در مطالعه های پیشین می تواند به دلیل تفاوت در نوع درمان بیماران مورد مطالعه بوده باشد که مصرف زیاد برخی آنتی بیوتیک ها در این بیماران باعث

در مطالعه ای که در اصفهان انجام گرفت، مقاومت در کلپسیلا پنومونیه نسبت به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم، آمیکاسین، ایمپی پنم و سیپروفلوکساسین بررسی شد و به ترتیب ۵۷/۱٪، ۳۱/۶٪، ۷۸/۶٪ گزارش شد (۱).

نیز می تواند از دلایل این اختلاف نتایج باشد. به نظر می رسد که مصرف خودسرانه و بیش از حد دارو به ویژه در محیط بیمارستان از سویی با افزایش مقاومت دارویی و فرایند کانژوگاسیون که در انتقال ژن های بتالاکتامازهای پلاسمیدی نقش اساسی دارد و به رشد فزاینده و مقاومت های دارویی می انجامد از سوی دیگر در انتقال مقاومت بین سویه های بیمارستانی و جامعه دخیل بوده است.

نتیجه گیری

در مجموع، بر اساس نتایج این مطالعه، مسأله مقاومت به داروهای بتالاکتام که امروزه بهترین و مؤثرترین آنتی بیوتیک های موجود و با طیف اثر وسیع در درمان بسیاری از بیماری های عفونی هستند، یک معضل جدی رو به پیشرفت است که بزودی جهت جایگزینی آن ها، به آنتی بیوتیک های جدید نیاز خواهیم داشت.

رعایت بهداشت بیماران، تغییر در استراتژی مصرف آنتی بیوتیک ها و ایجاد شرایط استریل در بخش هایی که بیماران در آن به مدت طولانی بستری می شوند از عوامل مهمی هستند که می تواند تا حدودی در کنترل این گونه میکروارگانیسم ها ایفای نقش نماید. یافته های به دست آمده در این مطالعه، از یک طرف ضرورت اتخاذ تدابیر عملی در مورد تجویز منطقی داروها را ایجاب نموده و از طرف دیگر اهمیت بهره وری از روش های تشخیصی جدید و روش های مولکولی در زمینه تشخیص و شناسایی الگوی مقاومت در هر منطقه در باکتری ها را گوش زد می نماید.

پیشنهاد می شود که در مطالعه های بعدی در این زمینه تعداد نمونه های بیش تری از بیماران را مورد بررسی قرار دهند و هم چنین مطالعه را محدود به بیمارستان های یک شهر نمایند تا جواب های دقیق و قانع کننده تری به دست بیاید.

سپاسگزاری

افزایش چشم گیر مقاومت به این نوع آنتی بیوتیک ها شده است. با این حال در این مطالعه های حساس ترین آنتی بیوتیک نیز مانند مطالعه حاضر، ایمی پنم گزارش شده است و در واقع مؤثرترین می باشد.

در یک مطالعه که در مرکز بین المللی چنای بر روی ۲۰۰ ایزوله تولیدکننده ESBL انجام شد، میزان فراوانی ژن *CTX-M* ۴۵٪ گزارش گردید. *Jemima et al 2008* در مطالعه ای دیگر که روی ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان های بعثت و امام رضای شهر تهران انجام شد، با بهره گیری از روش PCR متوجه شدند که ۴۳۰ نمونه (۸۶/۱۷٪) از ۴۹۹ نمونه شامل ژن *CTX-M* بودند (۴). فراوانی ژن *CTX-M* در ایزوله های باکتری های روده ای در کلمبیا ۴۷/۹٪ (۲۷) و در فرانسه ۲۵٪ گزارش شد (۱۸). در استرالیا ۳۳٪ از سویه های *انتروباکتریاسه* مولد ESBLs دارای ژن *CTX-M* گزارش شده اند (۱۴).

هم چنین مطالعه های داخلی نشان می دهد که فراوانی ژن *CTX-M* از ۱۴/۲۸٪ تا ۲۲/۵٪ در کل سویه های *انتروباکتریاسه* متفاوت است (۱۷)؛ که این فراوانی کمابیش با مطالعه حاضر هم خوانی دارد.

نتایج مطالعه حاضر با مطالعه هایی که در نقاط مختلف ایران انجام شده است با بعضی مطالعه ها هم سویی و با بعضی دیگر تفاوت وجود دارد که وجود این تفاوت ها ممکن است به دلیل سطح بهداشت افراد منطقه، تفاوت در روش نمونه گیری، تفاوت منطقه جغرافیایی و رژیم غذایی باشد. لذا اختلاف در فراوانی ژن های مقاومت را باید در حضور سایر ژن ها مولد مقاومت جستجو کرد که در مناطق مختلف از وفور متفاوتی برخوردارند که باعث تفاوت فنوتیپی و ژنوتیپی در سطح سویه های مقاوم این باکتری می گردد. این تنوع ژن های مقاومت در تمام باکتری های خانواده *انتروباکتریاسه* نیز صدق می کند و باعث تفاوت نتایج فنوتیپی و ژنوتیپی در سطح ایزوله های مقاوم این باکتری ها می گردد. به علاوه تنوع روش های ژنوتیپی مورد استفاده در تحقیقات مختلف

از پرسنل محترم و زحمتکش گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد
اسلامی واحد پرند و همچنین از پرسنل محترم مرکز تحقیقات
بیولوژی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... تشکر و قدردانی
می شود.

منابع

۱. جلال پور، شیدا. ۱۳۹۰. الگوی مقاومت آنتی-بیوتیکی در سویه های کلبسیلا پنومونیا مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری. مجله علوم پزشکی اصفهان، ۲۹، ۱۴۲، ۶۹۵-۷۰۶.
۲. سلطان دلان، محمدمهدی، ملا آقا میرزایی، هدروشا، فلاح مهر آبادی، جلیل، رستگار لاری، عبدالعزیز، صباغی، آیلار، اشراقیان، محمدرضا، صانعی، عاطفه، بختیاری، روناک، حنفی ایدر، مجتبی. ۱۳۸۹. فراوانی ژن های بتالاکتامازی وسیع الطیف گروه *AmpC (DHA, MOX)* و *TEM* به روش PCR در ایزوله های بالینی اشریشیاکلی. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۶۸، ۶، ۳۱۵-۳۲۰.
۳. قوطاسلو، رضا، اشلقی T بهناز. ۱۳۹۲. بیوفیلیم پسودوموناس ایروژینوزا و روش های پیشگیری و درمان های تازه آن. مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، ۱۲، ۹، ۷۵۴-۷۵۶.
۴. لشگری، نجمه، وند یوسفی، جلیل، سیادت، داور، شاهچراغی، فرشته، خسروی، مریم، وکیلی، حبیب، مشیری، ارفع، زنگنه، مهرانگیز، بهره مند، احمد رضا. ۱۳۹۳. تشخیص مولکولی ژن بتالاکتاماز *blaCTX-M* در سویه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه های بالینی. مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، ۲۴، ۱۴۸-۱۵۲، ۳.
۵. مسجدیان جزی، فرامرز، والهی، فرحناز، طالبی، اردشیر، رستگار لاری، عبدالعزیز. ۱۳۸۶. بررسی ملکولی مقاومت به آنتی-بیوتیک های وسیع الطیف در اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیا. مجله میکروب علوم پزشکی ایران، ۱، ۲، ۴۶-۳۷.
6. Al-Agamy, M., Shibl, A., Tawfik, A. 2009. Prevalance and molecular characterization of extended- spectrum-lactamases *Klebsiella pneumonia* in Riyadh, Saudi Arabia. Journal Of Antimicrob agents chemother, 29, 4, 253-257.
7. AL-Jaser, A. 2006. Extended-spectrum beta-lactamase a global problem. Kuwait Journal Of medical, 38, 3, 171-185.
8. Ambler, R. P. 1980. The structure of b-lactamases. Jurnal Of Philosophical ransactions of the Royal Society of London, 16, 289, 321-331.
9. Bennett, R. 2004. Growing group of extended-spectrum-lactamases: the *CTX-M* enzymes. Journal Of Antimicrbiol agents and chemtherapy, Antimicrob agents chemother, 1, 48, 1-14.
10. Bonventure, W., Juma, A., Samuel Kariuki, C., Peter, G., Waiyaki, Marion, A., Mutugi, D., Wallace, D., Bulimo, D. 2016. The prevalence of *TEM* and *SHV* genes among Extended-Spectrum Beta-Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. African Journal of Pharmacology and Therapeutics, Vol. 5, No. 1, Pp. 1-7.
11. Bush, K., Jacoby, G., Medeiros, A. 1995. A functional classification scheme for B-lactamases and its correlation with molecular structure. Journal Of Antimicrob agents chemother, 39, 6, 1211-1233.
12. Daoud, Z., Hakime, N. 2003. Prevalence and susceptibility pattern of ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general university hospital in Beirut, Lebanon. Journal Of Revista Espanola De Quimioterapia, 16, 2, 233-238.
13. Edelstein, M., pimkin, M., palagin, I., Edelstein, I., Stratchounski, L. 2003. Prevalence and Molecular Epidemiology of *CTX-M* extended-spectrum B-lactamase producing *Escherichia coli*. and *Klebsiella pneumonia* in Russian hospitals. Journal Of antimicrob agents chemother, 47, 12, 3724-3732.
14. Eisner, A., Fagan, E., Feieri, G., Kessler, H., Marth, E., Livermore, D. 2006. Emergence of enterobacteriaceae isolates producing *CTX-M* ESBL in Austria . Journal Of Antimicrob agents chemother, 50, 2, 785-787.
15. Jacoby, G A., Medeiros, A. 1991. More extended spectrum B-lactamases. Journal Of Antimicrob agents chemother, 35, 9, 1697-1704.
16. Jemima, S., Verghese, S. 2008. Molecular characterization of nosocomial *CTX-M* type B-lactamase producing Enterobacteriaceae form a tertiary care hospital in south India. Indian Journal Of medical microbiology, 26, 4, 365-368.
17. Karimi, A., Malekan, M., Fallah, F., Maham, S., Navidinia, M., Jahromi, M. 2012. Detection of integrin elements and group encoding ESBLs and their prevalence in *E. coli* and *Klebsiella* isolated form urine and stool samples of patients referred to Mofeed children hospital in Tehran by PCR method. Proceeding of the third Iranian Congress Of clinical microbiology shiraz, 6, 8, 1806-1809.

18. Kim, JK., Chung, DR., Wie, SH., Yoo, JH., Park, SW. 2009. Risk factor analysis of invasive liver abscess caused by the K1 serotype *Klebsiella pneumonia*. Journal Of Clinical Microbiology Infection Disease, 28, 1, 109-111.
19. Livermore, DM., Woodford, N. 2004. Guidance to Diagnostic Laboratories: laboratory Detection and Reporting of Bacteria With extended spectrum β -lactamases. Issued by Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory. Centre for Infections. Journal Of Health Protection Agency, <http://www.evaluations-standards.org.uk>.
20. Magdalena, T., Fritz, H., Herbert, H. 1997. Survey and Molecular Genetics of *SHV* betalactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: Two Novel Enzymes, *SHV-11* and *SHV-12*. Journal Of Antimicrob agents chemother, 41, 5, 949-949.
21. Murray, PR., Holmes, B. and Aucken. 2005. Boriello SP : *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, and other Enterobacteriaceae. (10th Edition).
22. Palucha, A., Mikiewicz, B., Hryniewicz, W. 1999. Concurrent outbreaks of ESBL producing organism of the family Entrobacteriaceae in a Warsaw Hospital. Journal Of Antimicrob agents chemother, 44, 4, 489-499.
23. Patricia, A. 2001. ESBL in 21st century: Characterization, Epidemiology and Detection of this important resistance threat. Journal Of Clinical Microbiologu Review, 14, 4, 933-951.
24. Schiappa, DA., Haiden, MK., Matushek, MG., Hashemi, FN., Sullivan, J., Miyashiro, KY. 1996. Ceftazidime resistant *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* bloodstream infection: a case-control and molecular epidemiologic investigation. Journal of Infectious Diseases, 174, 529-536.
25. Travis, R., Gyles, C., Smit, R., McEwen, A., Friendship, R., Janeco, N. 2006. Chloramphenicol I and kanamycin resistance among porcine *Escherichia coli* in Ontario. Journal of antimicrobial chemotherapy, 58, 1, 173-177.
26. Tzouveleakis, L., Tzelepi, E., Tassios, P., Legakis, N. 2000. *CTX-M* type beta lactamases: emerging group of extended-spectrum enzymes. International journal of antimicrobial agents, 14, 2, 137-142.
27. Valonzuela, D., Silva, E., Mantilla, J., Reguero, M., Gonzalez, E., Pulido, I., Darlo, I. 2006. Detection of *CTX-M-15* and *CTX-M-2* in clinical isolates nterobactericeae in Bogota, Colombia. Journal Of Clinical Microbial, 44, 5, 1919-1920.