مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم، شماره سی ام - بهار۱۳۹۷

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

شناسایی مولکولی‌ژن‌های کدکننده بتالاکتاماز *CTX-M* در *کلبسیلا پنومونیه‌های* ایزوله شده از بیماران مراجعه کننده به مناطق مختلف شهر تهران

نیلوفر شاملو[1]، سعید ذاکر بستان آباد*[1]، رضامیرنژاد[2]

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، پرند، ایران
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله،تهران، ایران

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 17:15 +0430 on Saturday August 18th 2018

چکیده

سابقه و هدف: بتالاکتاماز *CTX-M* به‌عنوان یک مکانیسم مقاومت در مقابل بتالاکتام‌ها در پاتوژن‌های گرم منفی شناخته شده است. هدف تعیین ژن *CTX-M* در *کلبسیلاپنومونیه* مولد ESBL در مناطق مختلف شهر تهران به روش مولکولی PCR است.

مواد و روش‌ها: ۱۷۶ ایزوله *کلبسیلاپنومونیه* جداسازی و تعیین هویت شدند. مقاومت باکتری‌ها نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تعیین شد. سپس در سویه‌های مولد ESBL، وجود ژن *CTX-M* با روش مولکولی PCR بررسی شد.

یافته‌ها: در تست فنوتیپی تأییدی ۵۶/۸۱ ٪ ایزوله‌ها ESBL بودند و فراوانی ژن *CTX-M* برابر ۲۸ ٪ بود. بیش‌ترین میزان مقاومت، مربوط به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۲۴/۸۹٪) و کم‌ترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم (۶/۰۶٪) بود.

بحث: ژن‌های بتالاکتاماز *CTX-M* شیوع بالایی در ایزوله‌های مولد ESBL دارد؛ لذا اعمال ابزارهای مناسب کنترل عفونت و راهکارهای مناسب درمانی در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های مورد مطالعه برای جلوگیری از انتشار آن‌ها ضروری است.

واژه‌های کلیدی : *کلبسیلا پنومونیه*، بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، ژن*CTX-M*، واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مرازی

مقدمه

کلبسیلا، باسیلی گرم‌منفی متعلق به خانواده *انتروباکتریاسه* است که دارای رابطه ژنتیکی به‌نسبت نزدیکی با سایر جنس‌های این خانواده نظیر *اشریشیا*، *سالمونلا*، *شیگلا* و *یرسینیا* می‌باشد (۲۱). *کلبسیلا پنومونیه* و *کلبسیلا اکسی توکا* عامل عفونت‌های اکتسابی از بیمارستان هستند و در ایجاد حالت‌های التهابی عفونت‌های سیستم تنفسی شرکت دارند (۲۵). در صورت عدم کنترل و گسترش روز افزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی با افزایش گونه‌های باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک روبرو می‌شویم 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 گران‌تر و در عین حال با عوارض بیش‌تر برای درمان و افزایش خطر مرگ

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

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 17:15 +0430 on Saturday August 18th 2018

و میر بیماران می‌شود. می‌توان با کنترل عوامل مستعد کننده و زمینه ساز مقاومت آنتی‌بیوتیکی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به حداقل برساند (۳). درمان اختصاصی و واحدی برای بیماری‌های ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* وجود ندارد و نیز اکثر آن‌ها به بسیاری از داروها مقاوم هستند. به‌همین دلیل جهت درمان‌های اختصاصی به تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی نیاز دارند. تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی نقش مهمی در درمان صحیح بیماران و جلوگیری از افزایش مقاومت میکروبی و کاهش هزینه‌های بیماران خواهد داشت. در حال حاضر داروهایی که به‌طور معمول برای درمان بیماری‌های ناشی از گونه‌های کلبسیلا، مورد استفاده قرار می‌گیرند، از خانواده داروهای بتالاکتام می‌باشند که از طریق "مهار سنتز دیواره سلولی" عمل می‌نمایند (۸). فراوان‌ترین و مهم‌ترین مکانیسم مقاومت به داروهای بتالاکتام، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشد که ژن‌های این نوع مقاومت‌های دارویی بیش-تر از طریق پلاسمیدهای مزدوج و طی مکانیسم‌های مختلف از جمله کانژوگاسیون از یک باکتری به باکتری دیگر منتقل می‌شوند (۱۹). در واقع این آنزیم‌ها که سرین پروتئاز هستند، با اتصال به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و با ایجاد پیوند کووالان، و با تخریب پیوند آمیدی موجب غیرفعال شدن این داروها می‌شوند. آنزیم‌های بتالاکتاماز در باکتری‌ها بسیار متنوع هستند و در پاسخ به فشار انتخابی آنتی‌بیوتیک، مدام در حال موتاسیون و یا جایگزینی اسیدهای آمینه به‌ویژه در جایگاه فعال آنزیم هستند به‌طوری‌که باعث ظهور انواع جدیدی از بتالاکتامازهای با طیف گسترده (ESBL) شده‌اند (۷). ESBLs دسته‌ای از آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشند که اهمیت ویژه‌ای در درمان ضد میکروبی دارند. میزان تولید ESBLs در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه در سراسر جهان متفاوت می‌باشد. آنزیم‌های بتالاکتاماز به دو صورت مولکولی (Ambler) و عملکردی (۱۱) طبقه‌بندی می‌شوند (۲۶). طبقه‌بندی این آنزیم‌ها به‌لحاظ عملکردی هنگامی شروع شد که سفالوسپورینازها از پنی‌سلینازها متمایز شدند. بتالاکتاماز طیف گسترده به‌لحاظ مولکولی در گروه A و به‌لحاظ عملکردی در گروه ۲ قرار دارند (۹).

در طول دهه گذشته بتالاکتامازهای *CTX-M* گسترش سریع جهانی داشته‌اند. اولین ارگانیسم‌های مولد این بتالاکتامازها در ایزوله‌هایی به‌صورت اپیدمیک یا اسپورادیک، در مناطق دور از هم (آلمان، آرژانتین و فرانسه) در اوایل ۱۹۹۰ تشخیص داده شد (۱۷). این آنزیم‌ها در کلاس مولکولی A بتالاکتامازها قرار می-گیرند.گسترش افقی ژن‌های این بتالاکتاماز در میان سویه‌های مشابه یا متفاوت اعضای انترباکتریاسه توسط پلاسمیدها صورت می‌گیرد .

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

برخی مطالعه‌ها، شیوع سویه‌های مقاوم به سفالوسپورین‌های با طیف اثر وسیع را با واسطه ESBLs در ایزوله‌های اشریشیا و کلبسیلا مجزا شده از بیماران بخش مراقبت‌های ویژه بین ۲۴-۳۸ درصد ذکر نموده‌اند و این در حالی است که آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام درصد بالایی از آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در پزشکی را به خود اختصاص می‌دهند. امروزه این بتالاکتامازها قادرند علاوه‌بر سفالوسپورین‌های محدودالاثر و پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف و منوباکتام را نیز هیدرولیز کنند (۱۲،۱۵،۲۳). در یک مطالعه که در مرکز بین‌المللی 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 ژن‌های *CTX-M* (۳۴/۱٪) گزارش شد (۶). در مطالعه‌ای که در اصفهان انجام گرفت، مقاومت در *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، آمیکاسین،

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 17:15 +0430 on Saturday August 18th 2018

ایمی‌پنم و سیپروفلوکساسین بررسی شد و به‌ترتیب ۵۷/۱٪، ۳۱/۶٪، ۰٪، ۷۸/۶٪ گزارش شد (۱).

امروزه گزارش‌های متعدد حاکی از شیوع این نوع مقاومت در اقصی نقاط دنیا بوده و مؤید یک مشکل جهانی است. این مطالعه‌ها مقاومت‌های چند دارویی باکتری‌ها را یکی از معضلات عمده پزشکی دانسته و بر لزوم بررسی و کنترل آن‌ها تأکید دارند (۲۰،۲۲). درمان عفونت با این دسته از ارگانیسم‌ها نیازمند تجویز آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف بوده و به‌ویژه در بیماران با ضعف سیستم ایمنی و در بخش‌های مراقبت‌های ویژه با مشکلات عدیده‌ای همراه است. لذا آزمایشگاه‌های میکروب شناسی نقش مهمی در شناسایی و گزارش باکتری‌های مولد این نوع بتالاکتامازها و تسهیل در درمان مؤثر بیماران ایفا می‌کنند (۲۴،۱۹). در هر حال علی‌رغم هزینه‌های بالای روش‌های ژنوتیپی در مقایسه با روش‌های فنوتیپی تشخیص مقاومت، گسترش روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR منجر به درمان مؤثر و سریع‌تر آنان و جلوگیری از گسترش ایزوله‌های مقاوم باکتری‌ها می‌گردد. لذا از آنجائی‌که مطالعه‌های مشابه در ایران کم‌تر انجام شده و الگوی مقاومت سویه‌های باکتریایی مسئول عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه با مکانیسم ESBLs در منطقه ما نامشخص است، در مطالعه حاضروجود ژن بتالاکتاماز *CTX-M* در ایزوله‌های بیمارستانی کلبسیلاپنومونیه تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در شهر تهران مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

جمع‌آوری نمونه و ایزوله‌های مورد بررسی

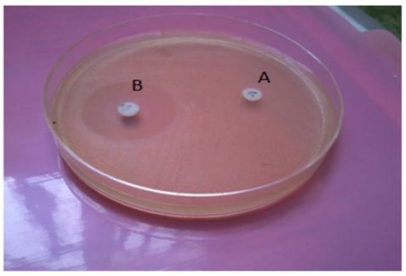
تعداد ۱۷۶ ایزوله کلبسیلاپنومونیه، از بیمارستان‌های مختلف شهر تهران و آزمایشگاه مسعود از دی ماه ۱۳۹۵ تا تیرماه ۱۳۹۶ جمع‌آوری شدند. ابتدا نمونه‌های بالینی توسط آزمایش‌های میکروب شناسی و بیوشیمیایی مربوط به شناسایی گونه کلبسیلاپنومونیه مانند کشت بر روی محیط TSI، آزمایش اندول و تست حرکت (کشت بر روی محیط SIM)، MR-VP، سیترات و اوره‌آز مورد بررسی قرار گرفتند.

آنتی‌بیوگرام و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

آزمون آنتی‌بیوگرام و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفپیم، آمپی‌سیلین، جنتامایسین، آمیکاسین، سفالوتین، سفتازیدیم، پیپراسیلین، ایمی‌پنم، سیپروفلوکساسین، سفوتاکسیم، نیتروفورانتوئین و تری‌متوپریم شرکت MAST انگلستان به روش دیسک دیفیوژن با متد استاندارد کربی بوئر بر اساس دستورالعمل مؤسسه استانداردهای بین‌المللی آزمایشگاهی (CLSI) انجام شد.

جهت بررسی فنوتیپی سویه‌های مولد ESBLs، از روش دیسک ترکیبی محصول شرکت MAST انگلستان استفاده شد. سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام با استفاده از دیسک‌های ترکیبی سفوتاکسیم/کلاولانیک 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 ^{o}C تولید ESBLs از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵ میلی‌متر یا بیش‌تر در اطراف دیسک ترکیبی سفوتاکسیم/کلاونیک‌اسید در مقایسه با دیسک سفوتاکسیم مشخص گردید (تصویر۱).

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 17:15 +0430 on Saturday August 18th 2018



شکل۱: دیسک فنوتیپی تأییدی جهت شناسایی سویه‌های *کلبسیلا* مولد ESBLs
(سفوتاکسیم/کلاونیک B:(سفوتاکسیم). A: در محیط مولر هینتون آگار اسید)

استخراج DNA

برای استخراج DNA به‌روش boiling نیاز به کلنی‌هایی از کشت تازه (۲۴ ساعته) است، به این منظور نمونه‌هایی که در آزمون فنوتیپی به هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم بودند، برای استخراج DNA کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و رشد ایزوله‌های مورد نظر آماده استخراج شدند. ابتدا ۳ تا ۵ کلنی از هر نمونه داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر حاوی ۲۰۰λ آب مقطر استریل حل شد. با استفاده از شیکر آن قدر نمونه‌ها shake شد تا این‌که کاملا حل شوند.

ویال‌ها به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه، داخل بن ماری جوش (۱۰۰ درجه سانتی‌گراد)، قرار داده شد به‌طوری‌که سطح آب جوش دو سوم میکروتیوب را در برگیرد.

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

در این مرحله پس از استخراج، جهت تأیید ژنوم اندازه‌گیری کمی و کیفی انجام گرفت؛ در اندازه‌گیری کمی با استفاده از نانودراپ غلظت نمونه DNA به کمک جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر نسبت به ۲۳۰و۲۸۰ مورد سنجش قرار داده شد. در اندازه‌گیری کیفی نمونه DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۰۸ درصد الکتروفورز مشاهده گردید.

استخراج به این روش به‌صورت 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 (جدول۱) جهت ساخت تحویل شرکت پیشگام شد. پرایمرها پس از طراحی به‌صورت لیوفیلیزه دریافت شدند. برای تهیه محلول ذخیره بر طبق دستورالعمل (برگه آنالیز) همراه پرایمر عمل شد.

جدول۱: اطلاعات پرایمرهای مورد استفاده

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

PCR نمونه‌ها

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

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام شد:

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 17:15 +0430 on Saturday August 18th 2018

یک سیکل ۵ دقیقه‌ای در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (Initialdenaturation)، سپس ۳۰ سیکل شامل مرحله واسرشت شدن (denaturation) ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال (annealing) ۱ دقیقه در ۶۱ درجه سانتی‌گراد و مرحله طویل شدن (Extention) ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت یک سیکل ۵ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

الکتروفورز

برای انجام الکتروفورز محصول‌های PCR از ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده شد. میزان ۱/۵ گرم پودر آگارز را در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر TBE 0.5X حل کرده و بعد از حرارت دادن و خنک‌شدن 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 به‌ترتیب در چاهک‌های 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.

یافته‌ها

نتایج دیسک‌گذاری برای هر دیسک آنتی‌بیوتیک به‌طور جداگانه در ۱۷۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیا بررسی شد. در این پژوهش بیش‌ترین میزان مقاومت، مربوط به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۸۹/۰۲٪) و کم‌ترین درصد مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک ایمی-پنم (۶/۰۶) مشاهده گردید.

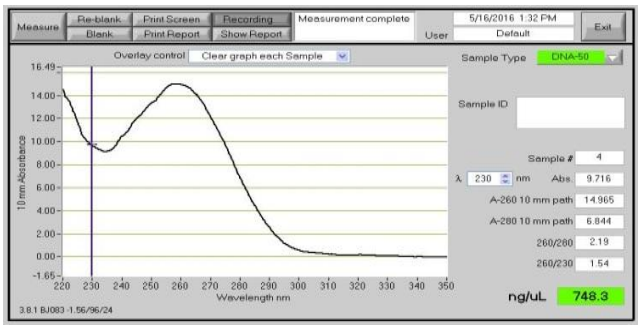
ایزوله‌های مقاوم و غیرمقاوم به هر آنتی‌بیوتیک نیز به‌صورت حساس و نیمه حساس گزارش شد که در نمودار (۱) نشان داده شده است.

از ۱۷۶ ایزوله *کلبسیلاپنومونیه* ۱۰۰ ایزوله (۵۶/۸۱٪) توانایی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز را داشتند. تولید ESBL از طریق افزایش قطر هاله به اندازه ۵ میلی‌متر یا بیش‌تر در اطراف دیسک سفوتاکسیم/کلاولانیک‌اسید (شرکت Mast انگلستان) در محیط مولرهینتون آگار MERCK محاسبه گردید.

تصویر(۲) نتیجه کمی ژنوم استخراج شده باکتری *کلبسیلاپنومونیه* را نشان می‌دهد. ۷۴۸ نانوگرم بر میکرولیتر غلظت DNA به‌دست آمده است. هم‌چنین نسبت ۲۶۰/۲۸۰ نشان دهنده عدم آلودگی DNA به‌دست آمده است.

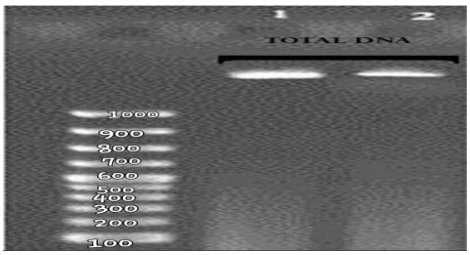
(تصویر۳) نتایج کیفی DNA حاصل از استخراج ژنوم باکتری *کلبسیلاپنومونیه* از محیط کشت با استفاده از روش جوشاندن می‌باشد که این نتایج نشان دهنده این است که total DNA از باکتری به‌درستی استخراج شده است.

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* می‌باشند. تعدادی از نمونه‌های ثبت دارای این ژن همراه با کنترل مثبت و کنترل منفی به‌طور جداگانه PCR شد (تصویر۴).

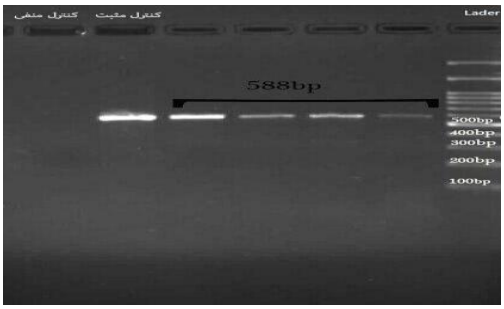


شکل ۲: نتیجه کمی ژنوم استخراج شده

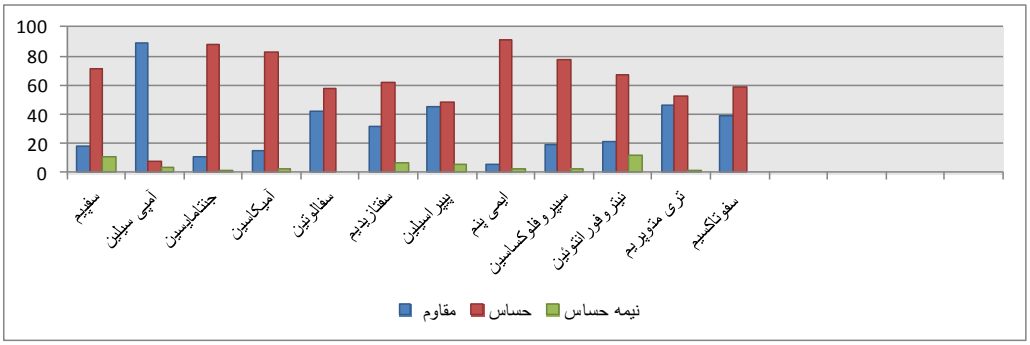
Downloaded from ncmbjpiau.ir at 17:15 +0430 on Saturday August 18th 2018



شکل ۳: نتیجه کیفی ژنوم استخراج شده



شکل ۴: برخی از نمونه‌های حاوی ژن *CTX-M*



نمودار ۱: نتایج تست آنتی بیوگرام

بحث

در مطالعه‌ای که در اصفهان انجام گرفت، مقاومت در *کلبسیلاپنومونیه* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، آمیکاسین، ایمی‌پنم و سیپروفلوکساسین بررسی شد و به‌ترتیب ۵۷/۱٪، ۳۱/۶ ۰٪، ۷۸/۶٪ گزارش شد (۱).

در مطالعه‌ای که در گرگان انجام شد مقاومت به ایمی‌پنم دیده نشد (۵).

در مطالعه‌ای دیگر مقاومت تمام گونه‌ها نسبت به جنتامایسین ۳۰٪ ، ایمی‌پنم ۲٪ تعیین گردید (۲).

تفاوت در میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در مطالعه‌های پیشین می‌تواند به‌دلیل تفاوت در نوع درمان بیماران مورد مطالعه بوده باشد که مصرف زیاد برخی آنتی‌بیوتیک‌ها در این بیماران باعث

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 17:15 +0430 on Saturday August 18th 2018

افزایش چشم‌گیر مقاومت به این نوع آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. با این حال در این مطالعه‌های حساس‌ترین آنتی‌بیوتیک نیز مانند مطالعه حاضر، ایمی‌پنم گزارش شده است و در واقع مؤثرترین می‌باشد.

در یک مطالعه که در مرکز بین‌المللی چنای بر روی ۲۰۰ ایزوله تولیدکننده ESBL انجام شد، میزان فراوانی ژن *CTX-M* ۴۵٪ گزارش گردید. Jemima et al 2008, در مطالعه‌ای دیگر که روی ایزوله‌های *کلبسیلاپنومونیه* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های 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 ایزوله‌های باکتری‌های روده‌ای در کلمبیا ۴۷/۹٪ (۲۷) و در فرانسه ۲۵٪ گزارش شد (۱۸). در استرالیا ۳۳٪ از سویه‌های *انترباکترویاسه* مولد ESBLs دارای ژن *CTX-M* گزارش شده‌اند (۱۴).

هم‌چنین مطالعه‌های داخلی نشان می‌دهد که فراوانی ژن *CTX-M* از ۱۴/۲۸٪ تا ۲۲/۵٪ در کل سویه‌های *انتروباکتریاسه* متفاوت است (۱۷)؛ که این فراوانی کمابیش با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

نتایج مطالعه حاضر با مطالعه‌هایی که در نقاط مختلف ایران انجام شده است با بعضی مطالعه‌ها هم‌سویی و با بعضی دیگر تفاوت وجود دارد که وجود این تفاوت‌ها ممکن است به‌دلیل سطح بهداشت افراد منطقه، تفاوت در روش نمونه‌گیری، تفاوت منطقه جغرافیایی و رژیم غذایی باشد. لذا اختلاف در فراوانی ژن-های مقاومت را باید در حضور سایر ژن‌ها مولد مقاومت جستجو کرد که در مناطق مختلف از وفور متفاوتی برخوردارند که باعث تفاوت فنوتیپی و ژنوتیپی در سطح سویه‌های مقاوم این باکتری می‌گردد. این تنوع ژن‌های مقاومت در تمام باکتری‌های خانواده *انترباکتریاسه* نیز صدق می‌کند و باعث تفاوت نتایج فنوتیپی و ژنوتیپی در سطح ایزوله‌های مقاوم این باکتری ها می‌گردد. به-علاوه تنوع روش‌های ژنوتیپی مورد استفاده در تحقیقات مختلف نیز می‌تواند از دلایل این اختلاف نتایج باشد. به‌نظر می‌رسد که مصرف خودسرانه و بیش از حد دارو به‌ویژه در محیط بیمارستان از سویی با افزایش مقاومت دارویی و فرایند کانژوگاسیون که در انتقال ژن‌های بتالاکتامازهای پلاسمیدی نقش اساسی دارد و به رشد فزاینده و مقاومت‌های دارویی می‌انجامد از سوی دیگر در انتقال مقاومت بین سویه‌های بیمارستانی و جامعه دخیل بوده است.

نتیجه‌گیری

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

رعایت بهداشت بیماران، تغییر در استراتژی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و ایجاد شرایط استریل در بخش هایی که بیماران در آن به مدت طولانی بستری می‌شوند از عوامل مهمی هستند که می‌تواند تا حدودی در کنترل این گونه میکروارگانیسم‌ها ایفای نقش نماید. یافته‌های به‌دست آمده در این مطالعه، از یک طرف ضرورت اتخاذ تدابیر عملی در مورد تجویز منطقی داروها را ایجاب نموده و از طرف دیگر اهمیت بهره‌وری از روش‌های تشخیصی جدید و روش‌های مولکولی در زمینه تشخیص و شناسایی الگوی مقاومت در هر منطقه در باکتری ها را گوش‌زد می‌نماید.

پیشنهاد می‌شود که در مطالعه‌های بعدی در این زمینه تعداد نمونه‌های بیش‌تری از بیماران را مورد بررسی قرار دهند و هم-چنین مطالعه را محدود به بیمارستان‌های یک شهر ننمایند تا جواب‌های دقیق و قانع کننده‌تری به دست بیاید.

سپاسگزاری

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 می‌شود.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 17:15 +0430 on Saturday August 18th 2018

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 17:15 +0430 on Saturday August 18th 2018

منابع

۱. جلال پور، شیلا. ۱۳۹۰. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه های کلبسیلا پنومونیا مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف جداشده 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 ابدر، مجتبی. ۱۳۸۹. فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی وسیع الطیف گروه *AmpC (DHA, MOX)* و *TEM* به روش PCR در ایزوله‌های بالینی اشریشیاکلی. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۶۸، ۶، ۳۱۵-۳۲۰.

۳. قوطاسلو، رضا.، اشلقیT بهناز. ۱۳۹۲. بیوفیلم پسودوموناس ایروژینوزا و روش‌های پیشگیری و درمان‌های 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، احمدرضا. ۱۳۹۳. تشخیص مولکولی ژن بتالاکتاماز *blaCTX-M*در سویه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های بالینی. مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، ۲۴، ۳، ۱۴۸-۱۵۲.

۵. مسجدیان جزی، فرامرز.، والهی، فرحناز.، طالبی، اردشیر، رستگارلاری، عبدالعزیز . ۱۳۸۶. بررسی ملکولی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های 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., Medeires, 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. Prevanlence 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 enterobactericeae 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 soutn 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., Mikiewics, 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 l and kanamycin resistance among porcine *Escherichia coli* in Ontario. Journal of antimicrobial chemotherapy, 58, 1, 173-177.
26. Tzouvelekis, 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.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 17:15 +0430 on Saturday August 18th 2018