

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 بتالاکتامها 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 اشریشیا، سالمونلا، شیگلا و یرسینیا می باشد (۲۱). کلبسیلا پنومونیه و کلبسیلا اکسی توکا عامل عفونت های اکتسابی 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

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 داشته‌اند. اولین ارگانسیم‌های مولد این بتالاکتامازها در ایزوله‌هایی به صورت 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 می‌گیرند. 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 سفنازیدیم دارند (۱۳). *CTX-M* ها روی ژن‌های 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 بتالاکتاماز درصد بالایی از آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در پزشکی را به خود اختصاص می‌دهند. امروزه این بتالاکتامازها قادرند علاوه بر سفالوسپورین‌های محدوداثر و پنی‌سلین‌ها، 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،

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. به همین 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 به طور معمول برای درمان بیماری‌های ناشی از گونه‌های کلبسیلا، مورد استفاده قرار می‌گیرند، از خانواده داروهای بتالاکتاماز می‌باشند که از طریق "مهار سنتز دیواره سلولی" عمل می‌نمایند (۸). فراوان‌ترین و مهم‌ترین مکانیسم مقاومت به داروهای بتالاکتاماز، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشد که ژن‌های این نوع مقاومت‌های دارویی بیش‌تر 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 بتالاکتاماز 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 به طوری که 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 به لحاظ عملکردی هنگامی شروع شد که سفالوسپورین‌ها از پنی‌سلین‌ها

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 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، سفنازیدیم، 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 سوبه های مولد ESBLs، از روش دیسک ترکیبی محصول شرکت MAST انگلستان استفاده شد. سوبه 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 37°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).

ایمی پنم و سیپروفلوکساسین بررسی شد و به ترتیب $1/57/57$ ، $6/31/31$ ، $6/78/78$ 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 ارگانسیم 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 سوبه 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 کلبسیلاپنومونیه تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف در شهر تهران مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

جمع آوری نمونه و ایزوله های مورد بررسی

تعداد ۱۷۶ ایزوله کلبسیلاپنومونیه، 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

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 اندازه‌گیری 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.

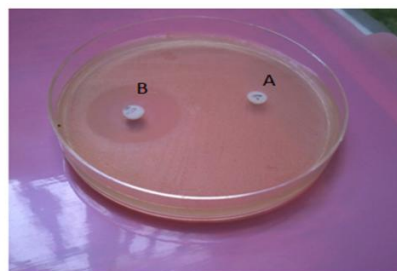
برای تهیه پرایمرها (۱۰) پرایمرها توالی پرایمرهای مورد استفاده (جدول ۱) جهت ساخت تحویل شرکت پیشگام شد. پرایمرها پس از طراحی به صورت لیوفیلیزه دریافت شدند. برای تهیه محلول ذخیره بر طبق دستورالعمل (برگه آنالیز) همراه پرایمر عمل شد.

جدول ۱: اطلاعات پرایمرهای مورد استفاده

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

PCR نمونه‌ها

در این مطالعه ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس آماده شرکت امپلیکون، ۱ میکرولیتر پرایمر forward *CTX-M* و ۱ میکرولیتر پرایمر reverse *CTX-M*، 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 پژوهش‌های 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 سویه‌های کلبسیلا مولد ESBLs (سفو تاکسیم/کلونیک B: (سفو تاکسیم). A: در محیط مولر هینتون آگار اسید)

استخراج DNA

برای استخراج DNA به روش 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 ۲۰۰ μ آب مقطر استریل حل شد. با استفاده از شیکر آن قدر نمونه‌ها shake شد تا این‌که کاملاً حل شوند.

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

سپس میکروتیوب‌ها به مدت 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.

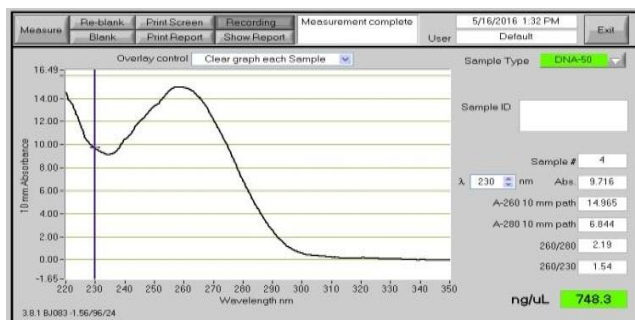
در این مرحله پس از استخراج، جهت تأیید ژنوم اندازه‌گیری کمی و کیفی انجام گرفت؛ در اندازه‌گیری کمی با استفاده از

از ۱۷۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه 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/کلوانیک‌اسید (شرکت Mast انگلستان) در محیط مولر هینتون آگار MERCK محاسبه گردید.

تصویر (۲) نتیجه کمی ژنوم استخراج شده باکتری کلبسیلا پنومونیه را نشان می‌دهد. ۷۴۸ نانوگرم بر میکرولیتر غلظت DNA به دست آمده است. هم‌چنین 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 می‌باشد 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* می‌باشند. تعدادی از نمونه‌های ثبت دارای این ژن همراه با کنترل مثبت و کنترل منفی به‌طور جداگانه PCR شد (تصویر ۴).



شکل ۲: نتیجه کمی ژنوم استخراج شده

یک سیکل ۵ دقیقه‌ای در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (Initial denaturation)، 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.

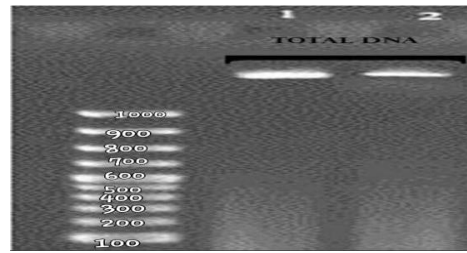
الکتروفورز

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 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 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.

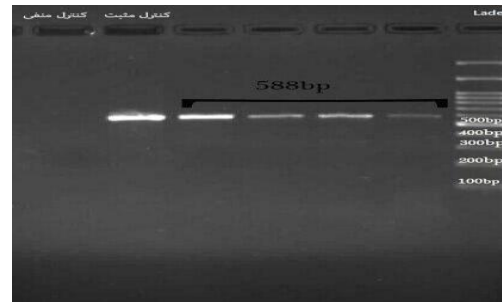
یافته‌ها

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 ایمپنیم (۶/۰۶٪) مشاهده گردید.

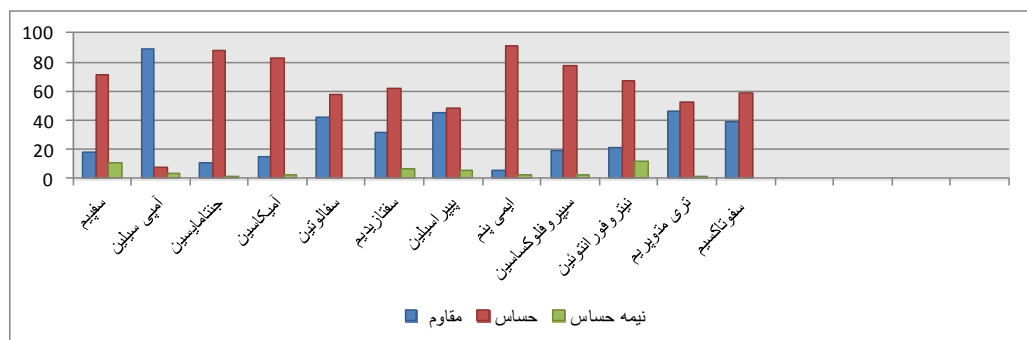
ایزوله‌های مقاوم و غیرمقاوم به هر آنتی‌بیوتیک نیز به‌صورت حساس و نیمه حساس گزارش شد که در نمودار (۱) نشان داده شده است.



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 گرگان انجام شد مقاومت به ایمی پنم دیده نشد (۵).

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

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

در مطالعه‌ای که در اصفهان انجام گرفت، مقاومت در کلبسیلا پنومونیه نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفوتاکسیم، آمیکاسین، ایمی پنم و سیپروفلوکساسین بررسی شد و به ترتیب ۵۷/۱٪، ۳۱/۶٪، ۰٪، 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

تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی دوره هشتم شماره سی ام - شناسایی مولکول ...

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، شیلا. ۱۳۹۰. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه های کلبسیلا پنومونیا مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف 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 ابر، مجتبی. ۱۳۸۹. فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی وسیع‌الطیف گروه *AmpC (DHA, MOX)* و *TEM* به روش PCR در ایزوله‌های بالینی اشیریشیاکلی. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۶۸، ۶، ۳۱۵-۳۲۰.
۳. قوطاسلو، رضا، اشلقی T بهناز. ۱۳۹۲. بیوفیلیم 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، ۱۴۸-۱۵۲، ۳.
۵. مسجدیان جزئی، فرامرزی، والهی، فرحناز، طالبی، اردشیر، رستگارلاری، عبدالعزیز. ۱۳۸۶. بررسی ملکولی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف در اشیریشیاکلی 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. Tzouveleki, 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.