مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
زمستان 1390، دوره سوم، شماره یازدهم، صفحه 22-15

بررسی میزان فراوانی ژن TEM-1 در سویه های *E. coli* جدا شده از نمونه های کلینیکی در شهرستان دامغان

علی اکبر شعبانی[1]، مرتضی ابراهیمی ورکیانی[2]، سید سهیل آقایی[2]، رضا نصر[1]

1. مر کز تحقیقات و گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، ایران.
2. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، ایران.

نویسنده مسؤول: دکتر علی اکبر شعبانی. مر کز تحقیقات و گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، ایران.
aashebani@yahoo.com

دریافت: 90/10/12 پذیرش: 90/12/21

چکیده

زمینه و هدف: اخیرا باکتری های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف **(Extended Spectrum Beta Lactamases)** که توانایی هیدرولیز اکثر آنتی بیوتیک های بتالاکتام را دارند، در سراسر جهان شیوع زیادی یافته اند و به عنوان یک مشکل اساسی در درمان عفونت های باکتریایی مطرح هستند. از مهمترین بتالاکتامازهای وسیع الطیف پلاسمیدی در باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه و به خصوص در *E. coli* ، محصول ژن *TEM-1* می باشد که نقش مهمی در مقاومت سویه های *E. coli* به داروهای بتالاکتام دارد و با توجه به نقش این باکتری، در عفونت های بیمارستانی، بر آن شدیم تا نقش این ژن باکتریایی را در بروز مقاومت های دارویی در ایزوله های با کتری فوق در دامغان مورد بررسی قرار دهیم.

روش بررسی: پس از جمع آوری و انتقال **70** نمونه کلینیکی به آزمایشگاه، نوع باکتری جدا سازی ومورد شناسایی مجدد و دقیق قرار گرفتند، و با توجه به استانداردهای **CLSI**، با استفاده از روش **Combined Disk** باکتری های تولید کننده آنزیم بتالاکتامازهای وسیع الطیف ، شناسایی و سپس فراوانی ژن **TEM-1** در آنان، با روش **PCR**، مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: از **70** نمونه *E. coli* جدا شده **27** نمونه**(38/57 %)** مولد آنزیم های بتالاکتاماز و از بین نمونه های *E. coli* مولد آنزیم های بتالاکتاماز، **10** نمونه**(37/04 %)** دارای ژن **TEM-1** بودند.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه ژن **TEM-1**، **37/04** درصد از بتالاکتامازهای وسیع الطیف را در باکتری های *E. coli* جدا شده در دامغان را، کد می نماید. همچنین این یافته ها اهمیت ژن **TEM-1** را در هیدرولیز داروهای بتالاکتام و به خصوص سفالوسپورین های با طیف بالا را در میان سویه های *E. coli* در شهرستان دامغان نشان می دهد. شناسایی این ژن وتعیین پراکندگی آن می تواند روند تشخیص و درمان بیماران را، سرعت بخشید.

واژه های کلیدی: انتروباکتریاسه، بتالاکتامازهای وسیع الطیف**/ (ESBLS)**، ژن **TEM-1**

www.SID.ir

مقدمه

اشریشیاکلی یکی از 5 گونهٔ موجود در جنس اشریشیا از تیرهٔ اشریشیه و از خانوادهٔ انتروباکتریاسه می باشد، این باکتری برای اولین بار در سال 1885 توسط Dr. Van Theodore Escherich شناسایی و نامگذاری گردید (1). *اشریشیا کلی* معمولترین عامل عفونتهای ناشی از گر م منفی ها می با شد. اعضای خانواده انتروباکتریاسه، بتالاکتامازهایی را تولید می کنند که توسط پلاسمیدها کد می شوند. از جمله مهمترین این بتالاکتامازها می توان TEM، SHV و CTX-M را نام برد. این آنزیم ها که با نام بتالاکتامازهای وسیع الطیف (Extended Spectrum Beta Lactamases) شناخته می شوند ، قادر به تخریب سفالوسپورین های با طیف اثر وسیع مانند سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سفتازیدیم می باشند. آنزیم های بتالاکتامازی بر اساس معیارهای مختلفی همچون طیف هیدرولیزکنندگی آنزیم(Vmax) ، خواص اسیدی و بازی ، محل حضورشان در داخل و یا خارج سلول ، میزان حساسیت در برابر مهارکننده های آنزیم های بتالاکتامازی ، مکان ژنتیکی آنزیم (پلاسمیدی ، کروموزومی یا اینتگرونی) ، تمایل اتصال(Km) ، وزن مولکولی پروتئین ها و توالی آمینواسیدی پروتئین طبقه بندی می شوند.

TEM-1 معمولترین فرم بتالاکتاماز در باکتری های خانواده انتروباکتریاسه می باشد که عامل بیش از 90 درصد مقاومت سویه های *E. coli* به آمپی سیلین قلمداد می گردد. این آنزیم اولین آنزیم بتالاکتامازی بود که از *E. coli* جدا شده از کشت خون یک بیمار یونانی به نام Temoniera یافت شد و به همین دلیل به این نام، نامگذاری شد. پس ازاینکه اولین آنزیم TEM(TEM-1) در سال 1960 گزارش شد، تا کنون آنزیم های بتالاکتاماز مختلفی شناسایی شده، که اکثر این آنزیم های بتالاکتاماز دارای فعالیت بتالاکتامازی وسیع الطیف می باشند(2). تا کنون بیش از 130 نوع آنزیم TEM شناسایی شده که، از نظر جایگزینی اسیدهای آمینه مختلف در جایگاه فعال آنزیم بتالاکتاماز TEM-1 با هم تفاوت دارند. تفاوت فوق باعث به وجود آمدن انواع مختلفی از بتالاکتامازهای نوع TEM گردیده است. درمان عفونتهای ناشی از سویه هایی از باکتریها ، که قادر به تولید آنزیم های بتا لاکتاماز وسیع الطیف کد شونده توسط پلاسمید باشند ، بسیار مشکل می باشد ، زیرا آنزیم هایESBL ، به باکتریهای فوق، مقاومت در برابر فعالیت باکتریسیدالی سفالوسپورینهای نسل سوم را اعطا می نماید(3و2). انتشار بتالاکتامازهای پلاسمیدی به توانایی اجزای قابل انتقال این ژن ها مرتبط است بطوریکه بسیاری از ژن های کد کننده این آنزیم ها به راحتی میان پلاسمیدها و بین ارگانیسم های مختلف قابل انتقال هستند. بتالاکتاماز TEM-1، اولین بتالاکتامازی بود که بوسیله پلاسمید در انتروباکتریاسه ها کد شد ولی سایر باکتریها از جمله *سودوموناس آئروژینوزا* ، *ویبریوکلرا* و نیز سویه های *هموفیلوس ها* و *نایسریاها* نیز قادر به تولید آن می باشند(۵،۶). بتالاکتامازهای وسیع الطیف عمدتا توسط دو جنس *Escherichia* و *Klebsiella* تولید می شوند، ولی سایر جنس های باکتری های روده ای نیز این آنزیم ها را تولید می کنند(۷،۸). امروزه گزارشات متعددی، حاکی از شیوع مقاومت های چندگانه دارویی با واسطه انواع مختلفESBL خصوصا آنزیم های تیپ SHV، TEM، و CTX-M در نقاط مختلف دنیا می باشد. این مطالعات مقاومت های چندگانه دارویی باکتریها را یکی از معضلات عمده پزشکی دانسته و بر لزوم بررسی و کنترل آنها تاکید دارند (۹،۱۰). جداسازی ژن مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف در *E. coli* های جدا شده از نمونه های بالینی، اطلاعات مفیدی ، درباره اپیدمیولوژی و پیشگیری فاکتورهای خطر دخیل در انتشار عفونت های ناشی از باکتری فوق ، و همچنین درمان آنها را فراهم می آورد. در باکتری های گرم منفی، آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) (Extended Specterum β-lactamases) که توانایی هیدرولیز پنی سیلین ها ، سفالوسپورین های وسیع الطیف ، مونوباکتام ها و کرباپنم ها را دارا می باشند ، در فضای پری پلاسمیک قرار می گیرند و قبل از اینکه آنتی بیوتیک ها ی فوق الذکر بتوانند به رسپتور خودشان متصل شوند ، این آنزیم ها به آنها حمله کرده و آنها را غیرفعال می کنند. در پاتوژن های گرم منفی ، تولید بتالاکتامازها به عنوان مهمترین علت مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای بتالاکتام تلقی می شوند (2) . با توجه به شیوع متفاوت، برخی از این آنزیم ها در نواحی مختلف دنیا (۳،۴) ، برای مثال، فراوانی ژن TEM-1 در بین سویه های +ESBL در

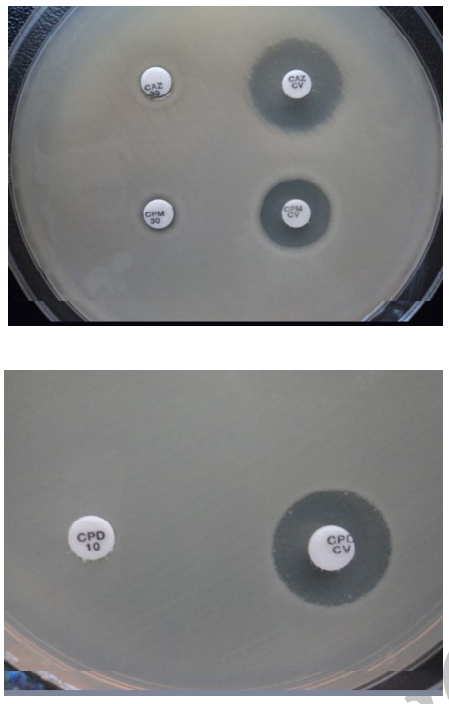
Archive of SID

www.SID.ir

نقاط مختلف دنیا متفاوت و متغیر، از 4/7%،(در ایالت برکلی آمریکا سال 1997) تا 84/6% (هنگ کنگ سال 2005)،گزارش شده است (17-11). درمان عفونتهای ناشی از این میکرو ارگانیسم ها نیازمند تجویز آنتی بیوتیک های وسیع الطیف می باشد ، این امر به ویژه در بیماران با ضعف سیستم ایمنی و همچنین در بیماران بستری در بخش های مراقبت ویژه با مشکلات زیادی همراه است. به همین دلیل آزمایشگاه های میکروبیولوژی، نقش مهمی در شناسایی و گزارش باکتری های مولد این نوع بتالاکتامازها و سهولت در درمان مؤثر بیماران ایفا می کنند(۱۸،۱۹). علیرغم هزینه های بالای روش های ژنوتیپی در مقایسه با روش های فنوتیپی تشخیص مقاومت، نیاز به گسترش روش های مولکولی منجر به درمان مؤثر و سریع و جلوگیری از گسترش ایزوله های مقاوم باکتری ها، احساس می گردد و از آنجائیکه مطالعات مشابه در ایران کمتر انجام شده و الگوی مقاومت سویه های باکتریایی بویژه با مکانیسمESBL در منطقه ما نامشخص می باشد، قصد داریم در این مطالعه فراوانی ژن بتالاکتاماز TEM-1 در ایزوله های *E. coli* تولیدکننده بتالاکتاماز های وسیع الطیف در شهرستان دامغان را مورد بررسی قرار دهیم.

روش بررسی

در مطالعه حاضر،70 باکتری *E. coli* جدا شده از نمونه های بالینی بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاههای بیمارستان رضایی و درمانگاه شهید چراغیان دامغان که پس از انجام تست های تائیدی بیوشیمیایی به عنوان *E. coli* مورد تایید قرار گرفتند، به منظور بررسی تولید ESBLs به روش Combination disk method و با توجه به استانداردهای CLSI، مورد بررسی قرار گرفتند. سپس نمونه هایی که مولد ESBLs بودند، از نظر وجود ژن بتالاکتاماز TEM-1 به روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. در روش Combination disk method از دیسک های 30 میکروگرمی سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفپیم و سفپودوکسیم در مجاورت دیسک های ترکیبی آنها با 10 میکروگرم کلاولانیک اسید(Mast) در محیط مولر هینتون آگار(Merck) استفاده شد. مواردی که در آنها قطر منطقه عدم رشد در اطراف دیسک حاوی کلاوولانیک اسید به میزان 5 میلی متر یا بیشتر از منطقه عدم رشد در اطراف دیسک فاقد کلاوولانیک اسید بیشتر بودند، تست مثبت و به عنوان سویه مولد ESBLs در نظر گرفته شدند(شکل 1)(18).



شکل 1. تست تایید فنوتیپی به منظور شناسایی نمونه های +ESBL

استخراج DNA پلاسمیدی به روشBoiling: مراحل استخراج DNA به روش Boiling عبارتند از : ابتدا از محیط آگار ساده و تازه(24 ساعته) مانند محیط TSA (Triptose Soy Agar)(Merck) یک کلنی برداشته و در محیط LB (Luria Broth)(Merck) تلقیح کرده و سپس آنها را به مدت 18 تا 24 ساعت در حرارت 37 درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس محیط های کشت حاوی باکتری را یکنواخت کرده و سپس به کمک سمپلر، 1000میکرولیتر از آنها را در داخل اپندورف های استریل ریخته سپس اپندورف ها را با دور 1500rpm - 1300 و به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. در این مرحله مایع رویی را بیرون ریخته و با استفاده از سمپلر 500 میکرولیتر از TE buffer (10 Tris میلی مولار و 1 EDTA میلی مولار) به رسوب موجود در ته اپندورف اضافه کرده و به خوبی ورتکس نموده تا سوسپانسیون

Archive of SID

www.SID.ir

یکنواختی به دست آید. مجددا اپندورف ها را در دور 1300rpm در دمای اتاق، به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ کرده دوباره مایع رویی را بیرون ریخته و مرحله قبل مجددا تکرار گردید. نمونه ها را در دور 1300 rpm در دمای اتاق، به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ نموده و مایع رویی را بیرون ریخته این بار رسوب حاصله را در 500 میکرولیتر بافر TE RNase حل کرده و سپس سوسپانسیون ها را در آب 100 درجه سانتی گراد به مدت 13 دقیقه جوشید. سپس نمونه ها را در دور 13000-15000 rpm در دمای اتاق، به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ نموده مقداری از فاز رویی را که حاوی DNA ی باکتری است را با سمپلر و به آرامی کشیده و در داخل اپندورف های استریل ریخته بعد از استخراج DNA، به وسیله اسپکتروفتومتر uv-visible غلظت DNA را تعیین گردید(30ng/µl). (DNA های استخراج شده در دمای 10- درجه سانتی گراد نگهداری شدند)(۲۰،۲۱).

PCR نمونه ها: انجام PCR با استفاده از روش تهیه مخلوط اصلی یا Master mix صورت گرفت. زیرا با استفاده از این روش از تلف شدن و هدر رفتن وقت و نیز معرف ها جلوگیری شده، دقت عمل افزایش یافته، موارد انتقال معرف ها کاهش یافته و در نتیجه امکان آلودگی کمتر می شود. پس از به دست آوردن مقادیر ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR، به منظور تهیه مخلوط اصلی یا Master mix، مقدار ترکیبات مورد نیاز از مواد مختلف برای کلیه نمونه ها محاسبه و مخلوط گردید. (مواد مورد نیاز و مقدار آنها برای انجام واکنش PCR در مورد یک نمونه در جدول 1 آمده است. کلیه مواد از شرکت سیناژن تهیه شدند). لازم به ذکر است که به منظور اطمینان از فقدان آلودگی در انجام واکنش PCR، از کنترل مثبت (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603) و کنترل منفی (*Escherichia coli* ATCC 35218) به همراه نمونه های مورد بررسی در PCR استفاده شد.

جدول 1. مواد مورد نیاز و مقدار آنها برای انجام واکنش PCR

ردیف	ماده مصرفی مورد نظر	حجم(میکرو لیتر)
1	آب دوبار تقطیر	18/05
2	کلرور منیزیوم	0/75
3	دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات	0/5
4	بافر PCR	2/5
5	پرایمر جلویی با غلظت 10 میکرومول	1
6	پرایمر عقبی با غلظت10 میکرومول	1
7	آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت	0/2
8	DNA الگو با غلظت30 نانوگرم در میکرولیتر	1

(پرایمرهای مورد استفاده که توسط شرکت سیناژن ساخته شدند در جدول 2 آورده شده است).

جدول 2. توالی پرایمرهای مورد استفاده

Primer Name	Sequence of primer (5′ - 3′)	Amplicon Size
TEM-1	F: 5′-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA-3′ R: 5′-GACAGTTACCAATGCTTAATCA-3′	1080 bp

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام شد : یک سیکل 5 دقیقه ای در 95 درجه سانتیگراد تحت عنوان واسرشت سازی اولیه (initial denaturation) 30 سیکل شامل مراحل واسرشت شدن (denaturation) 1 دقیقه در 94 درجه سانتیگراد، اتصال (annealing) 1 دقیقه در 52 درجه سانتیگراد، طویل شدن (extension) 1/5 دقیقه در 72 درجه سانتیگراد و نهایتا یک سیکل 10 دقیقه ای در 72 درجه سانتیگراد تحت عنوان طویل شدن نهایی(Terminal extension) (۲۲،۲۳).

الکتروفورز محصولات PCR: پس از اتمام زمان PCR، به منظور بررسی محصولات، از الکتروفورز ژل آگاروز 1 درصد استفاده شد. 2 میکرولیتر از نمونه های PCR شده همراه با Loading Buffer، در کنار مارکر وزن مولکولی، با ولتاژ 90 ولت الکتروفورز شدند. ژل با استفاده از اتیدیوم

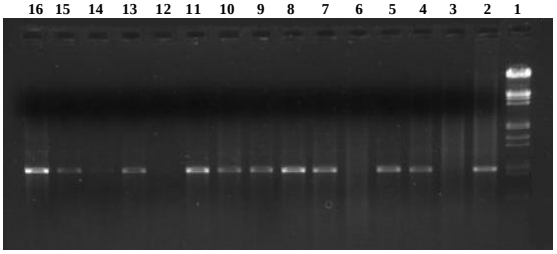
Archive of SID

www.SID.ir

بروماید رنگ آمیزی شد. حضور باند در منطقه 1080bp مارکر وزن مولکولی نشانه تکثیر شدن قطعه مورد نظر و در نتیجه وجود ژن مقاومت *TEM-1* در سویه باکتریایی مورد نظر می باشد(20).

یافته ها

در این مطالعه 70 نمونه *E. coli* تشخیص داده و جدا شده در این 2 مرکز آزمایشگاهی، پس از انجام تست های تاییدی بیوشیمیایی، به عنوان *E. coli* تایید گردیدند. 100 درصد نمونه ها، نمونه های ادرار بودند. از 70 نمونه مورد بررسی، 52 نمونه (74/28%) مربوط به زنان و 18 نمونه (25/72%) مربوط به مردان بود. از 70 بیمار مورد بررسی از لحاظ سنی، 4 بیمار(5/72%) در محدوده سنی 0 تا 15 سال، 44 بیمار (62/85%) در محدوده سنی 16 تا 30 سال و 22 بیمار (31/43%) در محدوده سنی بالای 30 سال قرار داشتند. پس از انجام تست های تاییدی فنوتیپی مشخص شد که از مجموع 70 نمونه تحت بررسی، 27 نمونه (38/58%) $ESBL^+$ و43 نمونه(61/42%) $ESBL^-$ بودند. نتایج به دست آمده پس از انجام واکنش PCR نشان داد که از مجموع 27 نمونه (38/58%) $ESBL^+$، 10 نمونه (37/04%) دارای ژن بتالاکتاماز *TEM-1* و 17 نمونه (62/96%) فاقد ژن بتالاکتاماز *TEM-1* بودند. وجود باند 1080bp که موید سویه باکتریایی واجد ژن بتالاکتاماز TEM-1 می باشد مجموعا در 37/04 درصد از نمونه ها مشاهده شد(شکل2).



شکل 2. ژل آگاروز محصول PCR مربوط به ژن TEM-1 . (1) : مارکر وزن مولکولی (1 kb) . (2) : کنترل مثبت (3) : کنترل منفی . (۴،۵،۷،۸،۹،۱۰،۱۱،۱۳،۱۶،۱۵) : سویه های دارای ژن مقاومت TEM-1 . (۶،۱۲،۱۴) : سویه های فاقد ژن TEM-1

بحث

بتالاکتامازهای وسیع الطیف اغلب پلاسمیدی بوده و از آنجائیکه این پلاسمیدها به راحتی در میان انواع مختلفی از باکتری ها بویژه در خانواده انتروباکتریاسه انتقال می یابند، تجمیع ژن های مقاوم منجر به ایجاد سویه هایی با مقاومت دارویی چندگانه می گردد، یعنی در واقع پلاسمیدها به دلیل اینکه همانندسازی مستقل از کروموزوم دارند و همانندسازی آنها وابسته به تقسیم سلول و تقسیم کروموزوم نمی باشد، به تعداد زیاد در داخل سلول همانند سازی کرده و در صورت انتقال به سایر سویه ها، مقاومت آنتی بیوتیکی بوجود می آید. شناسایی ESBL ها از اروپا آغاز گردید، زیرا ظاهرا از آنتی بیوتیک های بتالاکتام وسیع الطیف به میزان زیادی جهت درمان بیماران استفاده می گردیده، اما طولی نکشید که بتالاکتامازهای وسیع الطیف در آمریکا و آسیا نیز شناسایی گردیدند. میزان شیوع ESBL در میان باکتری های خانوادهٔ انتروباکتریاسه از کشوری به کشور دیگر و از بیمارستانی به بیمارستان دیگر متفاوت است(24). شیوع ایزوله های واجد ژنوتیپ TEM-1 در برخی مطالعات انجام شده، متفاوت گزارش شده اند. برای مثال در تحقیقات انجام شده، فراوانی ژن TEM-1 در بین سویه های $ESBL^+$ در تایوان در سال 2008 (88/6 %)، در اسپانیا در سال 2008 (68 %)، در ایتالیا در سال 2006(100 %)، در تایوان در 2006(83/5 %)، در هنگ کنگ در سال 2005(84/6 %)، در ایتالیا در سال 2002(25/7 %) و در کره در سال 2005(75 %) از سویه های $ESBL^+$ حاوی ژن TEM-1 بوده است (41-11و17و25-27). در مطالعه ای که در سال 2002 در ایتالیا و بر روی سویه های بیمارستانی باکتری *E. coli* انجام شد، میزان شیوع ژن TEM-1 در حدود 56/4 درصد گزارش شد(28). در مطالعه ای که در سال 1997 در چندین بیمارستان ایالت برکلی آمریکا انجام شد، 4/7 درصد از باکتری های *E. coli* جدا شده آنزیم بتالاکتاماز تولید می کردند که میزان قابل توجهی از این مقدار مربوط به آنزیم TEM-1 گزارش شد(21). در یک بررسی در سال 2005، میزان شیوع ژن TEM-1 در نمونه های *E. coli* جداسازی شده از بیمارستانی در ترکیه مورد بررسی قرار گرفت و این مقدار در حدود 52/7

Archive of SID

www.SID.ir

درصد گزارش گردید(27). در تحقیقات دیگری که توسط Song و همکارانش در سال 2007 انجام شد مشخص شد که از 125 نمونه مورد بررسی، 80 نمونه (64 %) دارای آنزیم TEM-1 بودند(29). در ایران نیز بررسی هایی در این زمینه انجام شده است. مطالعه خانم هایده مبین و همکاران در طول یک دوره یک ساله، که بر روی32 سویه *E.coli* جدا شده از بیماران بستری در بخش های مراقبت های ویژه (ICU) بیمارستان امام رضای تبریز، انجام شد، نشان دادکه 93/7% سویه ها ، تولید کننده ESBLو 87/5% آنها bla TEM gene بودند، علاوه بر آن، نمونه های تولید کننده ESBL ، با کلونیزاسیون ، بسیار بالا همراه می باشد ، که این امر بسیار هشدار دهنده می باشد(32). در سال 1386 در مطالعه ای میزان فراوانی ژن TEM-1 در سویه های *E. coli* جدا شده از بیمارستان شهرکرد مورد بررسی قرار گرفت که این میزان در حدود 48/7 درصد می باشد(30). در سال 1386 در مطالعه ای که در مرکز باکتری شناسی دانشگاه الزهرا(ص) اصفهان انجام شد، میزان فراوانی ژن TEM-1 در سویه های *E. coli* شناسایی شده در حدود 84/6 درصد گزارش شد(31). مطالعه آقای دکتر سلطان دلال و همکاران که بر روی 188 سویه *E.coli* جدا شده از عفونت ادراری بیماران بستری در بیمارستانهای تبریز انجام شد، نشان دادکه 43/6% (82) سویه ها ، تولید کننده بودند(33)، در مطالعه حاضر فراوانی ژن TEM-1 در بین نمونه های $ESBL^+$ مورد بررسی قرار گرفت که مشخص شد 37/04 درصد از نمونه های فنوتیپ مثبت($ESBL^+$) دارای ژن TEM-1 می باشند. با بررسی انجام شده بر روی نتایج این تحقیق و سایر مطالعات انجام شده در نقاط مختلف دنیا مشخص شد که فراوانی ژن TEM-1 در این تحقیق نسبت به اکثر کشورها (تایوان، هنگ کنگ، اسپانیا، ایتالیا، کره، ترکیه و غیره) کمتر و نسبت به برخی از کشورهای دیگر(آمریکا)، بیشتر بوده است. مقایسه نتایج به دست آمده در این تحقیق با تحقیقات دیگری که در ایران انجام شده، نشان می دهد که نتایج به دست آمده در این تحقیق نسبت به تحقیقات دیگر(زمان زاد و همکاران در سال 1386 در شهرکرد، و همچنین مسجدیان و همکاران در اصفهان درسال 1386) کمتر می باشد. همچنین با توجه به نتایج به دست آمده در سایر تحقیقات انجام شده در این زمینه در ایران به این نتیجه می رسیم که فراوانی ژن TEM-1 در برخی از این تحقیق ها، اگر چه نسبت به برخی کشورها (تایوان، ایتالیا، هنگ کنگ و غیره) کمتر می باشد ولی نباید فراموش کرد که این فراوانی ها نسبت به اکثر کشورهای دیگر (آمریکا، اسپانیا، کره، ترکیه و غیره)، بیشتر بوده و این امر بسیار ناخوشایند می باشد چرا که نشان دهنده میزان بالای مقاومت ارگانیسم های تولیدکننده ESBL که عامل عفونت هستند، به آنتی بیوتیک های مختلف می باشد. بر اساس نتایج این مطالعه ژن بتالاکتاماز TEM-*1* بیش از 37/04 درصد از بتالاکتامازهای وسیع الطیف را در باکتری *E. coli* کد می نماید. همچنین این یافته ها اهمیت آنزیم *TEM-1* را در هیدرولیز داروهای بتالاکتام و به خصوص سفالوسپورین های با طیف بالا را در میان سویه های *E. coli* در شهرستان دامغان نشان می دهد. بنابراین توصیه می شود شناسایی این ژن در سویه های *E. coli* جدا شده از نمونه های کیلینیکی در آزمایشگاه های میکروبیولوژی، بیشتر مورد توجه قرار گیرد. این اقدام می تواند باعث سرعت بخشیدن به روند تشخیص و درمان بیماران گردد.

نتیجه گیری

مقاومت به داروهای بتالاکتام و مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم یک معضل جدی و رو به افزایش است . یافته ها ی چنین مطالعاتی بر ضرورت اتخاذ راهکارهای عملی در مورد تجویز منطقی داروها ، ضرورت تجهیز آزمایشگاهها به روشهای تشخیصی(فنوتیپی، تکنیکهای مولکولی،...) جهت شناسایی و تعیین نوع مقاومت ژنتیکی، برآورد میزان شیوع سویه های مقاوم باکتریها. و انخاذ تدابیر لازم جهت درمان بیماران و کنترل مقاومت در باکتریها تاکید می نماید .

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از جناب آقای دکتر قلی پور بینوندی از بیمارستان رضایی ، و سرکار خانم شاهی از درمانگاه شهید چراغیان دامغان به جهت همکاری و مساعدتشان در جمع آوری نمونه ها و جناب آقایان غلامحسین ایراجیان(M.Sc) و صدرالهی از مرکز آموزش عالی علمی-کاربردی رسول

Archive of SID

www.SID.ir

اکرم(ص)، دامغان، به جهت همکاری و مساعدتشان در استفاده از آزمایشگاه مرکز فوق جهت انجام آزمون های میکروبی نمونه ها و مر کز تحقیقات و گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان بدلیل مساعدت در انجام کارهای مولکولی و همچنین سرکار خانم دکتر راضیه نظری از دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم به دلیل تصحیح پایان نامهء فوق ابراز می دارند.

References

1. Mlynarczyk G, Mlynarczyk A, Bilewska A, Dukaczewska A, Golawski C, Kicman A. *Effectiveness of the method with cefpirome in detection of extended-spectrum beta-lactamases in different species of gram-negative bacilli.* Med Dosw Mikrobiol. 2006; 58(1): 59- 65.
2. Medeiros AA. *β-Lactamases* . Br Med Bull. 1984; 40: 18-27.
3. Jacoby GA, Medeiros AA. *More extendedspectrum β-lactamases.* Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35: 1697-1704.
4. Knothe H, Shah P, Kremery V. *Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens.* Infec. 1983; 11: 315-317.
5. George A, Jacoby MD, Munoz LS. *The New Beta lactamases.* N Engl J Med. 2005; 352(4): 380-391.
6. Thew M. *Plasmid mediated β-lactamases of gram-negative bacteria. distribution and properties.* J Antimicrob Chemother. 1979; 5: 349-358.
7. Bush KA, Jacoby GA, Medeiros AA. *A functional classification scheme for beta lactamases and its correlation with molecular structures.* Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39: 1211-1233.
8. Skippen I, Shemko M, Turton J, Kaufmann ME, Palmer C, Shetty N. *Epidemiology of infections caused by extended spectrum beta lactamase producing Escherichia coli and Klebsiella spp.: a nested case-control study from a tertiary hospital in London.* J Hosp Infect. 2006; 64(2): 115-123.
9. Magdalena T, Fritz H, Herbert H. *Survey and Molecular Genetics of SHV beta lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: Two Novel Enzymes, SHV-11 and SHV-12.* Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41(5): 943-949.
10. Palucha, A Mikiewics B, Hryniewicz W. *Concurrent outbreaks of ESBL producing organism of the family Entrobacteriaceae in a Warsaw Hospital.* J Antimicrobiol Chemother. 1999; 44(4): 489-499.
11. Aragon LM, Mirelis B, Miro E, Mata C, Gomez L, Rivera A, Coll P, Navarro F. *Increase in β-lactame resistant Proteus mirabilis strains due to CTX-type and CMY-type as well as new VEB and inhibitor resistant TEM-type β-lactamase.* Antimicrob Agent Chemother. 2008; 61: 1029-1032.
12. Endimiani A, Luzzaro F, Brigante G, Perilli M, Lombardi G, Amicosante G, Rossolini G M, Toniolo A. *Escherichia coli Bloodstream Infections.* Risk Factors and Treatment Outcome Related to the Expression of Extended Spectrum β-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2005; P: 2598-2605.
13. Ho pl, Ho AYM, Chow kh, Wong RCW, Duan RS, Ho WL, Mak GC, Ysang KW, Yam WC, Yuen KY. *Occurrence and molecular analysis of Extended Spectrum β-Lactamases producing Enterobacteriaceae in Hong Kong, 1999-2002.* J Antimicrob Chemother. 2005; 55: 840-845.
14. Park YJ, Lee S, Kim YR, Oh EJ, Woo GJ, Lee K. *Occurrence of Extended Spectrum β-Lactamases among Korean isolates of Echerichia coli.* J Antimicrobial Chemother. 2005; 10: 1093-1099.
15. Patzer JA, Dzierzanowska D, Pawinska A, Turner PJ. *High activity of meropenem against Gram negative bacteria from a pediatric intensive Care Unit, 2001-2005.* Int J Antimicrob Agents. 2007. Ian 24
16. Tasli H, Hakki BI. *Molecular characterization of TEM and SHV derived ESBL in hospital based Enterobacteriaceae in Turkey.* Jpn. J Infect Dis. 2005; 58: 162-167.
17. Wu LT, Wu HJ, Chung JG, Chuang YC, Cheng KC, Yu WL. *Dissemination of Enterobacteriaceae isolates harboring TEM β-lactamases at 2 hospitals in Taiwan.* Diagn Microbiol and Infect Dis. 2006; 54: 89-94.
18. Livermore DM, Woodford N. *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. Health Protection Agency. June 2004.
19. Schiappa DA, Haiden MK, Matushek MG, Hashemi FN, Sullivan J, Miyashiro KY. *Ceftazidime resistant Klebsiella pneumonia and Escherichia coli bloodstream infection: a case-control and molecular epidemiologic investigation.* J Infect Dis. 1996; 174: 529-536.
20. Dzierzanowska D, Coller L, Bellais S. *Molecular Cloning*. 2001; 3:pp: Al-A7.
21. Kado Cl, liu ST. *Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids.* J Bacteriol. 1981; 145(3): 1365-1373.
22. Geha DJ, Uhl JR, Gustaferro CA. *Multiplex PCR for identification of Methicilin resistant Staphylococci in the clinical laboratory.* J Clin Microbiol. 1994; 32(7): 1768-1772.
23. Rasheed JK, Tenover FC. *Detection and characterization of antimicrobial resistance genes in bacteria.* In: Murray, P.R. Baron, E.J. Jorgensen, J.H. Editors. Manual of Clin microbiol. 8th ed. Washington DC. 2003; pp: 1196-1212.

Archive of SID

www.SID.ir

24. Franceschini N, Perilli M, Segatore B, Setacci Amicosante G, Mazzariol A. *Ceftazidime and aztreonam resistance in Providencia stuartii: characterization of a natural TEM derived extended spectrum beta-lactamase, TEM-60.* Antimicrob Agents
25. Andrea MMD, Nucleo E, Luzzaro F, Giani T, Migliavacca R, Vailati F, Kroumova V, Pagani L, Rossolini GM. *Survey and Molecular Genetics of TEM betalactamases in Enterobacteriaceae in Northern Italy.* Antimicrob Agents Chemother. 2006; pp: 618-624.
26. Pagani L, Migliavacca R, Pallecchi L, Matti C, Giacobone E, Amicosante G, Romero E, Maria G, Rossolini. *Emerging Extended Spectrum β-Lactamases in Echerichia coli.* J Clin Microb. 2002; P: 1549-1552.
27. Wu JJ, Chenb HM, Koc WC, Wua HM, Tsaid SH, Yan JJ. *Prevalence of Extended Spectrum β-Lactamases in Echerichia coli in a Taiwanese university hospital, 1999 to 2005, identification of a novel TEM-1 enzyme.* Diagn Microbiol and Infect Dis. 2008; 60: 169-175.
28. Perilli M, Dellamico E, Segatore B, Rosaria M. *Molecular characterization of ESBLs production by nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from Italian Nationwide Survey.* J Clin Microbiol. 2002; 40(2): 611-614.
29. Song W, Bae IK, Lee CH, Lee SH, Jeong SH. *Detection of Extended spectrum β-lactamases by using boronic acid as an Amp-C β-lactamase inhibitor in clinical isolates of Klebsiella spp. and Escherichia coli.* J Cli Microbiol. Feb 14 2007.
30. Zamanzad B, Nafisi M, Karimi A, Deyhim B. *A Survey Frequency of TEM-1 Gene In Escherichia coli, Klebsiella pneumonia And Enterobacter Strains Producing Extended Spectrum β-Lactamases Isolated From Clinical Specimens In Hospital Shahrkord By PCR Method.* J of Hamedan University of Medical Sciences. 2007; pp:19-25.
31. Masjedian F, Valahi F, Talebi A, Rastegar lari A. *A Survey Molecular Resistance to Extended Spectrum Antibiotics In Escherichia coli And Klebsiella pneumonia.* J of Iranian Medical Microbiology. 2007; pp: 27-34.
32. Mobin H, Nahaei MR, Por nor M, Mobasher AR, Sadegi J. *A Survey of Prevalence of Extended Spectrum Beta, Lactamases enzymes (SHV/CTX-M/TEM types) in Escherichia Coli strains Isolated from patients of Imam-Reza hospitals in Tabriz, Iran.* Quernary J. of Microbeshenasi Danesh, 2009, 1st Edition. pp: 33-38.
33. Soltan Dallal M M, Mobasseri G, Fallah Mehrabadi J, Eshraghian MR, Rastegar Lari A , Molla Aghamirzaei H, Sabbaghi A , Azarsa M. *Detection of CTX-M-1 beta lactamase gene in Escherichia coli isolated from clinical samples by Polymerase Chain Reaction (PCR).* Tehran University Medical J. 2011; 69(1); 16-21.

Archive of SID

www.SID.ir