

بررسی حضور ژن بتالاکتاماز در آبسه‌های پری‌اپیکال دندان شیری در کودکان

دکتر قاسم انصاری*، دکتر میترا طبری**

چکیده

سابقه و هدف: مقاومت باکتری‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک مصرفی یک مشکل عمده در کنترل عفونت‌های دندانی است. مقاومت چندارویی در بین باکتری‌های گرم منفی بی‌هوازی که نقش مهمی را در ایجاد علائم و نشانه‌های کلینیکی بیماری پالپ و پری‌رادیکولار بازی می‌کنند، از آنزیم‌های تغییر دهنده باکتریال و ترشح آنزیم بتالاکتاماز ناشی می‌باشد. این میکروارگانیسم‌های گرم منفی قادرند از باکتری‌های حساس به پنی‌سیلین با آزاد کردن آنزیم بتالاکتاماز در حفره دندانی محافظت کنند. این مطالعه با هدف تعیین حضور ژن تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز در کلیه میکروارگانیسم‌های موجود در آبسه‌های ادنتوژنیک دندان‌های شیری کودکان انجام گردید.

مواد و روشها: در تحقیق تجربی - مشاهده‌ای حاضر در مجموع ۴۰ کودک با فاصله سنی ۱۰-۴ سال از میان مراجعین به بخش کودکان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انتخاب شدند. این کودکان هیچ‌گونه بیماری سیستمیک نداشته و حداقل به مدت دو هفته قبل از نمونه‌گیری، هیچ‌گونه آنتی‌بیوتیک دریافت نکرده بودند. کلیه بیماران انتخاب شده حداقل یک دندان مبتلا به آبسه قابل مشاهده کلینیکی همراه با سابقه درد طی روزهای اخیر داشتند. از تکنیک دقیق و سریع *polymerase chain reaction* برای تأیید حضور ژن بتالاکتاماز به عنوان عامل ایجاد رقابت در برابر ترکیبات پنی‌سیلین دارای حلقه بتالاکتام استفاده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون *chi-square* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: با بررسی نمونه‌های تهیه شده و طبق اطلاعات به دست آمده از داده‌های جمع‌آوری شده حضور ژن بتالاکتاماز در ۶۳/۲٪ نمونه‌ها مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به وجود ژن بتالاکتاماز در بیش از نیمی از نمونه‌ها به نظر می‌رسد به منظور کنترل ایجاد سوش‌های مقاوم باید در تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها در کلینیک دقت بیشتری نمود.

کلید واژگان: آنزیم بتالاکتاماز، PCR، آبسه‌های دندانی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۲/۲۱ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۸۵/۷/۲ تاریخ تأیید مقاله: ۱۳۸۵/۸/۹

مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دوره ۲۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۶، ۲۵۴-۲۵۰

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌های حاوی حلقه بتالاکتام طیف وسیعی از داروهای آنتی‌بیوتیکی را تشکیل می‌دهند. بتالاکتام‌ها آخرین مرحله ساخت دیواره میکروبی را مهار کرده، تأثیر باکتریسیدال خود را از این راه اعمال می‌کنند (۱).

وقوع عفونت‌های ادنتوژنیک، دوره و درمان آنها به پاسخ ایمنی بیماران و عوامل میکروبی و محیطی بستگی دارد. باکتری‌های بی‌هوازی به طور شایعی عفونت‌های دندانی کودکان را سبب می‌شوند (۳).

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها مانند پری‌وتلاملانینوژنیک‌ها و

بیش از دو دهه است که مقاومت استافیلوکوک اورئوس و گروه باکترئید فراژلیس در مقابل پنی‌سیلین شناخته شده است (۱،۲). مقاومت استافیلوکوک‌ها در مقابل پنی‌سیلین‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز مانند متی‌سیلین و اگزاسیلین، مقاومت پنوموکوک‌ها در مقابل پنی‌سیلین‌ها به وسیله تغییر در پروتئین‌های بانده شونده به پنی‌سیلین، مقاومت انتروکوکسی‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتید مثل ونکومايسين و مقاومت چندارویی در بین باکتری‌های گرم منفی ناشی از آنزیم‌های تغییر دهنده باکتریال (*modifying*) و طیف گسترش یافته بتالاکتاماز ناشی می‌باشد (۳).

E-mail: bujdent@yahoo.co.uk

* نویسنده مسئول: دانشیار گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

** استادیار گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل.

و بعد بوسیله پویدون- آیداین ضد عفونی شد و سپس به وسیله پنبه استریل خشک گردید. نمونه‌گیری از آبسه پری‌رادیکولار دندان‌های شیری با سوراخ کردن قله آبسه به وسیله سوند استریل و جمع‌آوری ترشحات به کمک لوله موئینه توسط رزیدنت دندانپزشکی کودکان انجام گرفت. سپس محتوای جمع‌آوری شده در لوله‌های ۱/۵ میلی‌متری از طریق شستشو با سرم فیزیولوژی تخلیه شده و برای انجام تست (PCR) polymerase chain reaction در فریزر نگهداری شد. در هنگام آزمایش پس از تخلیه DNA، لوله‌های PRC جهت انجام واکنش PCR در بخش ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی آماده شدند. به این منظور از مواد زیر استفاده می‌شد:

- ۱- DNA هدف (Template DNA) که در این مطالعه باکتری‌های موجود در آبسه بودند.
 - ۲- بافر 10×PCR (شامل 200mm Tris - Hcl, 500 mm KCl) به میزان ۵ میکرولیتر
 - ۳- مخلوط ۴ دزاکسی ریبونوکلوئید سه فسفات (dNTPS) به میزان ۰/۵ میکرولیتر
 - ۴- کلورور منیزیم به میزان ۱/۵ میکرولیتر (فلز mg کوفاکتور آنزیم Taq پلیمرز است).
 - ۵- آنزیم Taq DNA Polymerase به میزان ۰/۵ میکرولیتر
 - ۶- آغازگر (پرایمر اختصاصی) به میزان ۲ میکرولیتر
- توالی اولیگونوکلوئیدهای بکار رفته در آغازگرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن بتالاکتاماز به صورت زیر بود (۷).

5' GTA TGG TTC TCA ACA TTT TCG T3'
5' ACC AAA GCT TAA TCA GTG AGG CA3'
۷- آب مقطر دیونیزه: که مقدار آن براساس غلظت DNA تنظیم شد به طوری که حجم نهائی واکنش ۵۰ میکرولیتر باشد.

مواد فوق در لوله انجام واکنش ریخته شده و پس از قرار دادن لوله‌های آماده شده در دستگاه ترموسیکلر برنامه جدول ۱ به دستگاه داده شد.

جدول ۱- برنامه‌ریزی دستگاه ترموسیکلر

denaturation	Annealing	Extension
۳۰ °C به مدت ۹۴	۳۰ °C به مدت ۶۰	۳۰ °C به مدت ۷۲
ثانیه	ثانیه	ثانیه

پورفیروموناس ژنژیوالیس و سایر باکتری‌های black pigmented آنزیم بتالاکتاماز تولید می‌کنند (۱،۲). این ارگانیزم‌ها در مقابل پنی‌سیلین مقاوم هستند و می‌توانند از باکتری‌های حساس به پنی‌سیلین با آزاد کردن آنزیم بتالاکتاماز در محدوده آبسه محافظت کنند (۱). این گونه‌ها، باکتری‌های غالب در فلور دهان هستند که بیشترین شیوع را در عفونت‌های حفره دهان و اطراف آن دارند و نیز وسیع‌ترین طیف مقاومت نسبت به عوامل آنتی‌میکروبیال در آنها مشاهده شده است (۴). درمان عفونت‌های بی‌هوازی از طریق کندی رشد این میکروارگانیزم‌ها، ماهیت پلی‌میکروبیال آنها و افزایش مقاومت باکتری‌های بی‌هوازی در مقابل داروهای آنتی‌باکتریال سنجیده و ارزیابی و در نتیجه اعمال می‌شود (۵).

در حال حاضر پنی‌سیلین به عنوان داروی انتخابی برای درمان آبسه‌های دندانی مطرح می‌باشد اما با افزایش مقاومت این گونه‌ها به پنی‌سیلین، کاربرد این دارو نیز با محدودیت مواجه شده است (۱۲-۶). هدف از تحقیق حاضر، بررسی وجود ژن تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز در سوش‌های میکروبی نمونه‌برداری شده از آبسه‌ها و تولید کننده آنزیم عفونت‌های بی‌هوازی با منشاء دندانی در کودکان بود.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی - مشاهده‌ای، نمونه‌های مورد بررسی از میان دندان‌های مبتلا به آبسه‌های پری‌رادیکولار در گروه دندان‌های شیری کودکان ۱۰-۴ ساله‌ای که در طی سال تحصیلی ۷۸-۷۹ به بخش کودکان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. در مجموع ۴۰ بیمار در این مطالعه شرکت داده شدند. بیماران انتخاب شده، تاریخچه بیماری سیستمیک نداشته و هیچکدام از آنها در هنگام نمونه‌گیری و طی دو هفته قبل از نمونه‌گیری آنتی‌بیوتیک دریافت نکرده بودند.

تورم به صورت کلینیکی در بافت نرم دندان مبتلا مشاهده می‌شد و سابقه درد طی روزهای اخیر ذکر می‌گردید. پس از تکمیل پرسش‌نامه، سطح مخاط دهان در ناحیه مبتلا ایزوله

بحث

با توجه به اینکه پنی سیلین به عنوان داروی انتخابی برای درمان آبسه‌های دندان‌های طی سالهای طولانی مطرح بوده است، به دلیل افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها در مقابل خانواده پنی سیلین، کاربرد این دارو نیز با محدودیت مواجه شده است. بنابراین به نظر می‌رسد به منظور کنترل ایجاد سوش‌های مقاوم باید بر روی تجویز و ترکیب آنتی‌بیوتیک‌ها بررسی و دقت بیشتری نمود. در ضمن با بررسی سوش‌های میکروبی می‌توان از طریق مطالعاتی چون مطالعه حاضر بر میزان تأثیرپذیری آنها از آنتی‌بیوتیک‌های در دسترس اطلاع حاصل نمود (۱۴-۷).

با توجه به درصد بالای ژن تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز موجود در آبسه‌های ادنتوژنیک دندان شیری مورد بررسی (۶۳/۲٪ نمونه‌ها) در مطالعه حاضر و با استناد به آنچه مقاومت در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های گروه پنی سیلین تلقی می‌شود می‌توان توضیحی علمی در این زمینه ارائه داد.

Brook و همکاران (۱۹۹۱) در مطالعه‌ای به منظور تعیین حضور میکروارگانیسم‌های هوازی و بی‌هوازی آبسه‌های پری‌اپیکال، از آبسه‌های ادنتوژنیک ۲۹ بیمار و با روش آسپیراسیون، نمونه‌برداری انجام دادند. ۱۱ نفر از بیماران آنها درمان‌های آنتی‌میکروبیال را قبل از نمونه‌گیری دریافت کرده بودند. پس از انجام کشت، رشد باکتری در ۳۲ مورد و ارگانیسم‌های تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز در ۳۳٪ موارد مشاهده شد (۷).

این در حالی است که در مطالعه حاضر همان‌طور که اشاره شد در ۶۳/۲٪ موارد آنزیم فوق حضور داشت. علت تفاوت فوق و بالاتر بودن میزان ژن تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز در این مطالعه را می‌توان به برتری و دقت تکنیک PCR نسبت به روش کشت و نیز از بین رفتن تعدادی از نمونه‌ها که طی انتقال به لابراتوار در تکنیک کشت پیش می‌آید، مربوط دانست (۲۰-۱۵، ۱۰-۸).

Brook (۱۹۹۵) با مطالعه بر روی نمونه‌های به دست آمده از آبسه‌ها، عفونت‌های ریوی و گوش، زخم‌های عفونی، پری کرونیت و سینوزیت در ۴۱۸ کودک دریافت که از ۲۰۳۳ نمونه ایزوله، ۵۰۴ مورد مربوط به پورفیروموناس و پروتلا بوده که در ۲۸٪ آنها تولید بتالاکتاماز مشاهده شده

در ضمن عمل ترموسیکلینگ در ۳۰ چرخه تکرار شد. البته در شروع هر برنامه یک دناتوراسیون اولیه با دمای 94°C به مدت ۵ دقیقه و در پایان هر برنامه یک extension نهایی با دمای 72°C به مدت ۵ دقیقه وجود داشت.

به منظور کنترل انجام واکنش PCR از نمونه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی در هر سری واکنش استفاده شد. نمونه‌های کنترل مثبت، نمونه‌هایی بودند که قبلاً حضور میکروارگانیسم در آنها محرز شده بود و نمونه‌های کنترل منفی آنهایی بودند که به جای DNA هدف در آنها از آب استفاده شده بود. لازم به ذکر است که زمان هر کدام از مراحل و همچنین درجه حرارت annealing برای آغازگر اختصاصی به صورت تجربی بدست آمد.

البته حدود آنها قبلاً به وسیله نرم‌افزارهای طراحی پرایمر مانند DNAsis و Oligo مشخص شده بود. بعد از انجام واکنش، محصول PCR روی ژل آگاروز حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز و سپس در دستگاه image analyzer قرار داده شد تا به کمک نور UV با طول موج ۲۵۴ یا ۳۱۲ نانومتر بندهای تشکیل دهنده DNA قابل رویت شوند. در پایان بندهای تشکیل شده با DNA Marker ۱۰۰ bp ساخت شرکت Roche Molecular Biochemical مقایسه شدند. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آزمون $\chi^2 - \text{square}$ انجام گردید.

یافته‌ها

در بررسی‌های انجام شده با تکنیک PCR بر روی ۴۰ نمونه تهیه شده از آبسه مربوط به دندان‌های شیری مورد آزمایش، حضور ژن تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز در ۶۳/۲٪ موارد تأیید شد. این امر با توجه به دقت تکنیک PCR با قابلیت اطمینان بالا می‌تواند بیانگر وجود مشکل مطرح شده باشد. میانگین سنی بیماران مورد مطالعه ۷/۱ سال و از نظر جنسی ۴۷٪ پسر و ۵۳٪ دختر بودند. هرچند تفاوتی از لحاظ میزان ژن تولید کننده در نمونه‌های میکروارگانیسم پیدا شده در دو گروه دیده نشد، این تفاوت در گروه‌های سنی مختلف نیز تفاوتی معنی‌دار نشان نداد و در مجموع بین دندان‌های آسیای متفاوت اول و دوم شیری هم این تفاوت معنی‌دار نبود.

ضمن مقاومت میکروبی در مواردی بیشتر از درصد ذکر شده در مطالعات می‌باشد که این به نوبه خود به این دلیل است که غیر از تولید آنزیم بتالاکتاماز مکانیسم‌های دیگری نیز برای مقاومت میکروب‌ها در مقابل عوامل بتالاکتام وجود دارند که در نتیجه مقاومت میکروبی را سبب می‌شوند.

نتیجه‌گیری

- وجود ژن کنترل کننده تولید آنزیم بتالاکتاماز در نمونه‌های مورد بررسی دیده شد.
- درصد بالای حضور ژن مذکور (۶۳/۲٪) نشان‌دهنده میزان تأثیر آن در امکان ایجاد مقاومت میکروبی است.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از زحمات آقای دکتر بهرام کاظمی به لحاظ توصیه‌ها و مشاوره‌های ارزشمند میکروبیولوژی ایشان تقدیر می‌گردد.

References

1. Aldridge KE: Anaerobes in polymicrobial surgical infections. Incidence, pathogenicity and antimicrobial resistance. Eur J Surg 1994;573:31-37.
2. Brook I, Calhoun L, Yocum P: Betalactamase producing isolates of bacteroides species from children. Antimicrob Agent Chemother 1980;18:164-166.
3. Anderson JA, Roberts MW: Antimicrobials In: Pinkham JR, Cassamassimo PS, Mctigue DJ, Fields HW, Nowak A: Pediatric Dentistry, infancy through adolescence. 4th Ed. WP Saunders Co. 2004;Chap9:106-107.
4. Hedberg M, Nord CE: Betalactam resistance in anaerobic bacterias: a review. J Chemother 1996;8:3-16.
5. Finegold SM: Anaerobic bacteria in human disease. Academic Press 1997;New York (Miscellaneous).
6. Xiang YZ, Florence B, Danielle S, Maries D, Laurent G: Emergence of clinical isolates of E-Coli producing TEM-1 derivates of OXA – 1 Beta lactamase conferring resistance to betalactamase inhibitors. Antimicrob Agent Chemother 1994;38:1085-1089.
7. Brook I, Frazier EH, Cher ME: Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. Oral Microbiol Immunol 1991;6:123-125.
8. Spijkervet FK, Vissink A, Raghoobra GM: The odontogenic abscess, aetiology and involvement in the orofacial region. Ned Tijdschr Tandheelkd 2004;111:120-127.
9. Brook I: Prevotella and Porphyromonas infections in children. J Med Microbiol 1995;42:340-347.
10. Jousimies SHR: Updates on the taxonomy and the clinical and laboratory characteristics of pigmented anaerobic gram negative rods. Clin Infect Dis 1995;20(Suppl 2):187-191.

است (۹). Jousimies (۱۹۹۵) گزارش کرد که تولید بتالاکتاماز در میان گونه‌های پری‌وتلا ۵۰-۳۰٪ بیشتر از گونه‌های پورفیروموناس بوده است (۱۰).
Fukui و همکاران (۱۹۹۷) مطالعه‌ای باکتریولوژیک بر روی سه آبسه دهانی باز انجام دادند و در هنگام نمونه‌گیری سعی کردند که نمونه‌ها با فلور نرمال دهان و بزاق آلوده نشوند. تمامی نمونه‌ها در ساعت پس از نمونه‌گیری به محیط کشت هوازی و بی‌هوازی انتقال داده شدند. در مجموع ۱۴-۵ نمونه هوازی و بی‌هوازی به دست آمد. در هر سه مورد گونه‌های مناسب شامل *prevotella inter media* streptococcus SPP و سایر گونه‌های *prevotella* بود. تمام شش گونه ایزوله شده *prevotella* توانایی تولید آنزیم بتالاکتاماز را داشته و جزء میکروارگانیزم‌های مقاوم در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های دارای حلقه بتالاکتاماز بودند (۱۱).
قابل ذکر است که در این تحقیق حضور ژن بتالاکتاماز به طور کلی بررسی شده است که ممکن است متعلق به هر میکروارگانیزی موجود در محدوده آبسه دندان باشد.

11. Fukui K, Kato N, Tanaka K, Kato H, Watanabe K, Tatematsu N: Bacteriological study of oral open abscesses. *Kansenshogaku Zasshi* 1997;71:1226-1231.
12. Chan Y, Chan CH: Antibiotic resistance of pathogenic bacteria from odontogenic infections in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2003;36:105-110.
13. Sandor GK, Low DE, Judd PL, Davidson RJ: Antimicrobial treatment options in the management of odontogenic infections. *J Can Dent Assoc* 1998;64:508-514.
14. Brook I: Anaerobic infection in children. *Adv Pediatr* 2000;47:395-437.
15. Kirkwood KL: Update on antibiotics used to treat orofacial infections. *Alpha Omegan* 2003;96:28-34.
16. Jones RN: Clinical use of beta – lactamase inhibitors in combination with extended spectrum penicillins. *Am J Health Syst Pharm* 1995;52(Suppl22):S29-S33.
17. Karlowsky J, Ferguson J, Zhanel G: A review of commonly prescribed oral antibiotics in general dentistry. *J Can Dent Assoc* 1993;59:292-294,297-300.
18. Eckert AW, Hohne C, Schubert J: Pathogen spectrum and resistance status of exclusively anaerobic odontogenic infections. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2000;4:153-158.
19. Kuriyama T, Nakagawa K, Karasawa T, Saiki Y, Yamamoto E, Nakamura S: Past administration of beta – lactam antibiotics and increase in the emergence of beta-lactamase-producing bacteria in patients with orofacial odontogenic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89:186-192.
20. Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Nakamura S, Yamamoto E: Antimicrobial susceptibility of major pathogens of orofacial odontogenic infections to 11 beta-lactam antibiotics. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17:285-289.

Archive of SID