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 چنددارویی 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 حفرهٔ 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 حلقهٔ 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

بیش از دو دهه است که مقاومت استافیلوکوک اورئوس و گروه باکتروئید فراژیلیس در مقابل پنی‌سیلین شناخته شده است(۱،۲). مقاومت استافیلوکک‌ها در مقابل پنی‌سیلین‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز مانند متی‌سیلین و اگزاسیلین، مقاومت پنوموکک‌ها در مقابل پنی‌سیلین‌ها به وسیله تغییر در پروتئین‌های باند شونده به پنی‌سیلین، مقاومت انتروکوکسی‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتید مثل ونکومایسین و مقاومت چنددارویی در بین باکتری‌های گرم منفی ناشی از آنزیم‌های تغییر دهندهٔ باکتریال (modifying) و طیف گسترش یافته بتالاکتاماز ناشی می‌باشد(۳).

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 پری‌وتلاملانینوژنیکا و

* نویسنده مسئول: دانشیار گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. E-mail:bujdent@yahoo.co.uk

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

Archive of SID

www.SID.ir

پورفیرومونـاس ژنژیـوالیس و سـایر باکتروئیـدهای black pigmented آنـزیم بتالاکتامـاز تولیـد مـی‌کننـد(۱،۲). ایـن ارگانیسم‌ها در مقابل پنی‌سیلین مقاوم هستند و می‌توانند از بـاکتری‌هـای حـساس بـه پنـی‌سـیلین بـا آزاد کـردن آنـزیم بتالاکتاماز در محدودهٔ آبسه محافظت کنند(۱). این گونـه‌هـا، باکتروئیدهای غالب در فلور دهان هستند که بیشترین شیوع را در عفونـت‌هـای حفـرهٔ دهـان و اطـراف آن دارنـد و نیـز وسیع‌ترین طیف مقاومت نسبت به عوامل آنتی‌میکروبیال در آنها مشاهده شده است(٤). درمان عفونت‌های بـی‌هـوازی از طریـق کنـدی رشـد ایـن میکروارگانیـسم‌هـا، ماهیـت پلی‌مایکروبیال آنها و افزایش مقاومت باکتری‌های بی‌هوازی در مقابل داروهای آنتی‌باکتریـال سـنجیده و ارزیـابی و در نتیجه اعمال می‌شود(٥).

در حال حاضر پنی‌سیلین بـه عنـوان داروی انتخـابی بـرای درمان آبسه‌هـای دنـدانی مطـرح مـی‌باشـد امـا بـا افـزایش مقاومت این گونه‌ها به پنی‌سیلین، کـاربرد ایـن دارو نیـز بـا محدودیت مواجه شده است(۱۲-٦). هدف از تحقیـق حاضـر، بررسـی وجـود ژن تولیـد کننـده آنـزیم بتالاکتامـاز در سوش‌های میکروبی نمونه‌برداری شده از آبسه‌هـا و تولیـد کننده آنـزیم عفونـت‌هـای بـی‌هـوازی بـا منـشاء دنـدانی 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 کودکـان ۱۰-٤ سـاله‌ای کـه در طـی سـال تحصیلی ۷۹-۷۸ بـه بخـش کودکـان دانـشکده دندانپزشـکی دانشگاه علوم پزشکی شـهید بهـشتی مراجعـه کـرده بودنـد، انتخاب شدند. در مجموع ٤۰ بیمـار در ایـن مطالعـه شـرکت داده شـدند. بیمـاران انتخـاب شـده، تاریخچـهٔ بیمـاری سیستمیک نداشته و هیچکدام از آنها در هنگام نمونه‌گیری و طی دو هفته قبل از نمونه‌گیری آنتی‌بیوتیـک دریافـت نکـرده بودند.

تورم به صورت کلینیکی در بافت نرم دنـدان مبـتلا مـشاهده می‌شد و سابقهٔ درد طی روزهای اخیر ذکر می‌گردید. پس از تکمیل پرسش‌نامه، سطح مخاط دهان در ناحیه مبـتلا ایزولـه و بعد بوسیله پویدون- آیداین ضـدعفونی شـد و سـپس بـه وسـیله پنبـه اسـتریل خـشک گردیـد. نمونـه‌گیـری از آبـسه پری‌رادیکولار دندان‌های شیری با سوراخ کردن قله آبسه به وسیله سوند استریل و جمع‌آوری ترشـحات بـه کمـک لولـه موئینه توسط رزیـدنت دندانپزشـکی کودکـان انجـام گرفـت. سپس محتوای جمع‌آوری شده در لوله‌های ۱/٥ میلـی‌متـری از طریق شستشو با سرم فیزیولـوژی تخلیـه شـده و بـرای انجام تـست polymerase chain reaction (PCR) در فریـزر نگهـداری شـد. در هنگـام آزمـایش پـس از تخلیـه DNA، لولـه‌هـای PRC جهـت انجـام واکـنش PCR در بخـش ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علـوم پزشـکی شـهید بهشتی آماده شدند. به این منظور از مواد زیر استفاده می‌شد:

۱- DNA هـدف (Template DNA) کـه در ایـن مطالعـه باکتری‌های موجود در آبسه بودند.

۲- بـافر PCR×10 (شـامل 200mm Tris – Hcl, 500 mm Kcl) به میزان ٥ میکرولیتر

۳- مخلوط ٤ دزاکسی ریبونوکلئوتید سـه فـسفاته (dNTPS) به میزان ۰/٥ میکرولیتر

٤- کلرور منیزیم به میزان ۱/٥ میکرولیتر (فلز mg کوفاکتور آنزیم Taq پلیمراز است).

٥- آنزیم Taq DNA Polymerase به میزان ۰/٥ میکرولیتر

٦- آغازگر (پرایمر اختصاصی) به میزان ۲ میکرولیتر

توالی اولیگونوکلئوتیدهای بکار رفتـه در آغازگرهـای مـورد اسـتفاده بـرای شناسـایی ژن بتالاکتامـاز بـه صـورت زیـر بود(۷).

5' GTA TGG TTC TCA ACA TTT TCG T3'
5' ACC AAA GCT TAA TCA GTG AGG CA3'

۷- آب مقطر دیونیزه: کـه مقـدار آن براسـاس غلظـت DNA تنظیم شد به طوری که حجـم نهـائی واکـنش ٥۰ میکرولیتـر باشد.

مواد فوق در لوله انجام واکنش ریخته شـده و پـس از قـرار دادن لوله‌های آمـاده شـده در دسـتگاه ترموسـیکلر برنامـهٔ جدول ۱ به دستگاه داده شد.

جدول ۱- برنامه‌ریزی دستگاه ترموسیکلر

Extension	Annealing	denaturation
۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه	٦۰ °C به مدت ۳۰ ثانیه	۹٤ °C به مدت ۳۰ ثانیه

Archive of SID
www.SID.ir

در ضمن عمل ترموسیکلینگ در ۳۰ چرخه تکرار شد. البته در شروع هر برنامه یک دناتوراسیون اولیه با دمای ۹٤ °C به مدت ۵ دقیقه و در پایان هر برنامه یک extension نهائی با دمای ۷۲ °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 درجهٔ 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 ۲٥٤ یا ۳۱۲ نانومتر بندهای تشکیل دهندهٔ DNA قابل رویت شوند. در پایان بندهای تشکیل شده با ۱۰۰ bp DNA Marker ساخت شرکت Roche Molecular Biochemical مقایسه شدند. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آزمون chi – square انجام گردید.

یافته‌ها

در بررسی‌های انجام شده با تکنیک PCR بر روی ٤۰ نمونه تهیه شده از آبسه مربوط به دندان‌های شیری مورد آزمایش، حضور ژن تولید کنندهٔ آنزیم بتالاکتاماز در ٦۳/۲٪ 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 ٤۷٪ 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.

بحث

با توجه به اینکه پنی‌سیلین به عنوان داروی انتخابی برای درمان آبسه‌های دندانی طی سالهای طولانی مطرح بوده است، به دلیل افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها در مقابل خانواده پنی‌سیلین، 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(۱٤-۷).

با توجه به درصد بالای ژن تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز موجود در آبسه‌های ادنتوژنیک دندان شیری مورد بررسی (٦۳/۲٪ نمونه‌ها) در مطالعه حاضر و با استناد به آنچه مقاومت در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های گروه پنی‌سیلین 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 ۳۹ 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 ٦۳/۲٪ 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 ٤۱۸ کودک دریافت که از ۲۰۳۳ نمونه ایزوله، ۵۰٤ مورد مربوط به پورفیرومونواس و پروتلا بوده که در ۳۸٪ آنها تولید بتالاکتاماز مشاهده شده

Archive of SID

www.SID.ir

اســـت(۹). Jousimies (۱۹۹۵) گـــزارش کـــرد کـــه تولیـــد بتالاکتاماز در میان گونه‌هـای پـری‌وتـلا ۵۰-۳۰٪ بیـشتر از گونه‌های پورفیرومونـاس بوده است(۱۰).

Fukui و همکاران (۱۹۹۷) مطالعه‌ای باکتریولوژیک بـر روی سه آبسه دهانی بـاز انجـام دادنـد و در هنگـام نمونـه‌گیـری سعی کردند که نمونه‌ها با فلور نرمال دهـان و بـزاق آلـوده نشوند. تمامی نمونـه‌هـا در سـاعت پـس از نمونـه‌گیـری بـه محـیط کـشت هـوازی و بـی‌هـوازی انتقـال داده شـدند. در مجموع ۱۴-۵ نمونه هوازی و بی‌هوازی به دست آمد. در هر سه مورد گونه‌های مناسب شـامل prevotella inter media streptococcus SPP و سایر گونه‌های prevotella بود. تمـام شـش گونـه ایزولـه شـده prevotella توانـایی تولیـد آنـزیم بتالاکتاماز را داشته و جزء میکروارگانیـسم‌هـای مقـاوم در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های دارای حلقهٔ بتالاکتاماز بودند(۱۱).

قابل ذکر است که در این تحقیق حـضور ژن بتالاکتامـاز بـه طور کلی بررسی شده است که ممکـن اسـت متعلـق بـه هـر میکروارگانیسمی موجود در محدودهٔ آبسه دنـدان باشـد. در ضمن مقاومت میکروبی در مـواردی بیـشتر از درصـد ذکـر شده در مطالعات می‌باشد که این به نوبه خود بـه ایـن دلیـل است که غیر از تولید آنزیم بتالاکتاماز مکانیسم‌های دیگـری نیز برای مقاومت میکروب‌ها در مقابل عوامل بتالاکتام وجود دارند که در نتیجه مقاومت میکروبی را سبب می‌شوند.

نتیجه‌گیری

- وجـود ژن کنتـرل کننـده تولیـد آنـزیم بتالاکتامـاز در نمونه‌های مورد بررسی دیده شد.
- درصـد بـالای حـضور ژن مـذکور (۶۳/۲٪) نـشان‌دهنـدهٔ میزان تأثیر آن در امکان ایجاد مقاومت میکروبی است.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از زحمات آقـای دکتـر بهـرام کـاظمی بـه لحـاظ توصیه‌ها و مشاوره‌هـای ارزشـمند میکروبیولـوژی ایـشان 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 (Miselaneous).
6. Xiang YZ, Florence B, Danielle S, Maries D, Launrent 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 adscess. Oral Microbiol Immunol 1991;6:123-125.
8. Spijkervet FK, Vissink A, Raghoebra GM: The odontogenic abscess, aetiology and involvement in the orofacial region. Ned Tijdschr Tandheedlhd 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.

Archive of SID
www.SID.ir

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

www.SID.ir