مقاله پژوهشی

بررسی فراوانی ژن TEM-1 در سویه های اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر تولید کننده بتالاکتاماز های وسیع الطیف ایزوله شده از نمونه های کلینیکی بیمارستان های آموزشی شهرکرد به روش PCR

دکتر بهنام زمان زاد * ، بهناز دیهم** ، دکتر محمدرضا نفیسی*** ، دکتر علی کریمی***، عفت فرخی****

دریافت : ۸۶/۴/۲۶ ، پذیرش : ۸۶/۱۰/۴

چکیده:

مقدمه و هدف: ژن بتالاکتاماز TEM-1 یکی از مهمترین بتالاکتاماز پلاسمیدی در باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه است کـه عامـل بیش از ۹۰ درصد مقاومت سویه های اشریشیاکلی به داروهای بتالاکتام و از علل مهـم بـروز مقاومتهـای چنـد گانـه دارویـی در عفونتهای بیمارستانی می باشد. در این مطالعه فراوانی ژن بتالاکتامـاز TEM-1 در ایزولـه هـای بیمارسـتانی باکتریهـای روده ای تولید کننده بتالاکتاماز های وسیع الطیف به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: در مطالعه توصیفی تحلیلی حاضر۸۳ ایزولـه از باکتریهـای روده ای تولیـد کننـده بتالاکتامازهـای وسـیع الطیـف شـامل سویه های اشریشیاکلی ، کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر که از نمونه های کلینیکی بیمارستانهای آموزشی شهرکرد جدا شده بودنـد به روش PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی ژن بتالاکتاماز TEM-1 و بمنظور تعیین فراوانی ژن TEM-1 مـورد بررسـی قرار گرفتند. محصولات نهایی روی ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز و از نظر وجود باند ۱۰۷۹ جفت بـازی مـورد بررسـی قـرار گرفتند. آنالیز آماری یافته های پژوهش با آزمون مجذور کای انجام گرفت.

نتایج: از مجموع باکتری های مورد آزمایش ، ٤٥ ایزوله(٥٤/٢٪) دارای ژن مقاومت بتالاکتاماز TEM-1بودند. توزیع فراوانی ایـن ژن درایزوله های مورد بررسی تفاوت چشمگیری را نشان نداد (p>۰/۰۵) بطوریکـه ایـن میـزان در گونـه هـای انتروبـاکتر۶۲/۵ درصد و درایزوله های کلبسیلا پنومونیه و اشریشیاکلی بترتیب ۵۸/۳ و ٤٨/٧ درصد بدست آمد.

نتیجه نهایی: براساس نتایج این مطالعه ژن بتالاکتاماز TEM-1 بیش از ۵۰ درصد بتالاکتامازهای وسیع الطیف را در خانواده باکتریهای روده ای کد می نماید، بنابراین توصیه می شود شناسایی این ژن در سویه های بیمارستانی این باکتریهـا در مجموعـه آزمایـشات روتین آزمایشگاه های میکروبیولوژی قرار گیرد. این اقدام میتواند باعث تسریع در روند تشخیص و درمان بیماران گردد.

کلید واژه ها : انتروباکتریاسه / بتالاکتامازهای وسیع الطیف / ژن بتالاکتاماز TEM-1

مقدمه :

اعضای خانواده باکتریهای روده ای بتا لاکتامازهایی را تولید می نمایند که توسط پلاسـمیدها کـد مـی شـوند از نمونه ایـن بتالاکتامازهـا مـی تـوان از TEM-1، TEM-2 و SHV-1 نـــام بـــرد. در اواســـط دهـــه ۱۹۸۰ گـــروه جدیدی از آنزیم ها به نام بتالاکتامازهای بـا طیـف وسـیع ESBLs (Extended Spectrum Beta Lactamases) معرفی شدند که قادر به تخریب سفالوسپورین های بـا طیـف اثـر وسـیع ماننـد سفوتاکـسیم، سفتریاکـسون و سـفتازیدیم بودنـــد. TEM-1 معمـــول تـــرین فـــرم بتالاکتامـــاز

* دانشیار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد(Bzamanzad@yahoo.com)

** کارشناس ارشد میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

*** استادیار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

**** کارشناس ارشد بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

Archive of SID

www.SID.ir

باکتریهای گرم منفی است که عامل بیش از ۹۰ درصد مقاومت سویه های اشریشیا کلی به آمپی سیلین قلمداد می گردد. با جایگزینی اسیدهای آمینه در جایگاه فعال آنزیم بتالاکتاماز TEM-1، انواع مختلفی از بتالاکتاماز TEM بوجود آمده بطوریکه تا کنون بیشتر از ۱۳۰ نوع آنزیم TEM مورد شناسایی قرار گرفته اند . شیوع برخی از این آنزیمها در نواحی مختلف دنیا متفاوت گزارش شده است برای مثال TEM-10، TEM-12 وTEM-26 شایعترین انواع این آنزیمها در آمریکای شمالی محسوب می شوند (۱،۲).

برخی مطالعات، شیوع سویه های مقاوم به سفالوسپورین های با طیف اثر وسیع را با واسطه ESBLs در ایزوله های اشریشیا و کلبسیلا مجزا شده از بیماران بخش مراقبتهای ویژه بین ۳۴-۲۸ درصد ذکر نموده اند واین در حالی است که آنتی بیوتیکهای گروه بتالاکتام درصد بالایی از آنتی بیوتیکهای مصرفی در پزشکی را به خود اختصاص می دهند. امروزه این بتالاکتامازها قادرند علاوه بر سفالوسپورینهای محدود الاثر و پنی سیلین ها، سفالوسپورینهای وسیع الطیف و منوباکتام را نیز هیدرولیز کنند(۴-۲). انتشار بتالاکتامازهای پلاسمیدی به توانایی اجزای قابل انتقال این ژنها مرتبط است بطوریکه بسیاری از ژنهای کد کننده این آنزیمها به راحتی میان پلاسمیدها و بین ارگانیسمهای مختلف قابل انتقال هستند. بتالاکتاماز TEM-1 ، اولین بتالاکتامازی بود که بوسیله پلاسمید در انتروباکتریاسه ها کد شد ولی سایر باکتریها از جمله پسودوموناس آئروژینوزا ، ویبریوکلرا و نیز سویه های هموفیلوس ها و نایسریاها نیز قادر به تولید آن می باشند(۵،۶).

بتالاکتامازهای وسیع الطیف عمدتا" در دو جنس کلبسیلا و اشریشیا تولید می شوند و سایر جنس های باکتریهای روده ای در رتبه های بعدی قرار دارند(۹-۷). مطالعات متعددی شیوع کلبسیلا پنومونیه مولد ESBLs را در عفونت های بیمارستانی با منشا باکتریهای روده ای گزارش کرده اند که در صد بالایی از این سویه ها دارای ژن TEM-1بوده اند(۱۰).

شیوع ژن TEM-1 در یک مطالعه که در ترکیه و بر روی نمونه های باکتریهای روده ای بدست آمده از محیط بیمارستان انجام شد ۵۲/۷ در صد برآورد گردید (۱۱). این میزان در بررسی مشابهی که در ایتالیا و برروی سویه های بیمارستانی باکتریهای روده ای انجام شد ۵۶/۴٪ گزارش شد (۱۲). در مطالعه دیگری ۵۸ ٪ از سویه های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف دارای ژنTEM-1شناسایی گردیدند(۱۳) . این میزان در بعضی از گزارشات روند نگران کننده ای را نیز نشان میدهد بطوریکه در مطالعه ای که در تایوان انجام شد ژن مزبوردر ۸۱ درصد سویه های بیمارستانی اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و آنتروباکتر گزارش گردید(۱۴).

امروزه گزارشات متعدد حاکی از شیوع این نوع مقاومت در اقصی نقاط دنیا بوده و مؤید یک مشکل جهانی است. این مطالعات مقاومت های چند دارویی باکتریها را یکی از معضلات عمده پزشکی دانسته و بر لزوم بررسی و کنترل آنها تاکید دارند(۱۵،۱۶). درمان عفونت با این دسته از ارگانیسم ها نیازمند تجویز آنتی بیوتیکهای وسیع الطیف بوده وبویژه در بیماران با ضعف سیستم ایمنی و در بخش های مراقبتهای ویژه با مشکلات عدیده ای همراه است. لذا آزمایشگاه های میکروبشناسی نقش مهمی در شناسایی و گزارش باکتریهای مولد این نوع بتالاکتامازها وتسهیل در درمان مؤثر بیماران ایفا می کنند(۱۷،۱۸). در هر حال علیرغم هزینه های بالای روشهای ژنوتیپی در مقایسه با روشهای فنوتیپی تشخیص مقاومت، گسترش روشهای مولکولی منجر به درمان مؤثر و سریعتر آنان و جلوگیری از گسترش ایزوله های مقاوم باکتریها می گردد. لذا از آنجائیکه مطالعات مشابه در ایران کمتر انجام شده و الگوی مقاومت سویه های باکتریایی مسئول عفونتهای بیمارستانی بویژه با مکانیسم ESBLs در منطقه ما نامشخص می باشد، در مطالعه حاضروجود ژن بتالاکتاماز TEM-1 در ایزوله های بیمارستانی اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر تولید کننده بتالاکتاماز های وسیع الطیف در شهر شهرکرد مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار:

در مطالعه توصیفی تحلیلی حاضر، ۸۳ ایزوله باکتری اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر مجزا شده از نمونه های بالینی بیماران بستری در بخش های داخلی و عفونی بیمارستان های آموزشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که در تست های تائیدی اولیه تعیین حساسیت ضد میکربی به روش Combination disk method مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف تشخیص داده شده بودند(۱۹) از نظر وجود ژن بتالاکتاماز TEM-1 به روش PCR مورد

Archive of SID

www.SID.ir

ارزیابی قرار گرفتند. درروش Combination disk method از دیسک های ۳۰ میکروگرمی سفتازیدیم در مجاورت دیسک مرکب آنها با ۱۰ میکروگرم کلاولانیک اسید (شرکت MAST انگلستان) در محیط مولر هینتون آگار (MERCK) استفاده شد . قطر منطقه عدم رشد حول دیسک مرکب به میزان حداقل ۵ میلی متر بیشتر از منطقه عدم رشد اطراف دیسک اول به عنوان سویه مولد ESBLs قلمداد گردید (۱۸).

استخراج DNA پلاسمیدی : یک میلی لیتراز سوسپانسیون باکتری مورد نظر را در محیط کشتTrypticase Soy Broth (MERCK) تهیه کرده و ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه انکوبه نمودیم. سپس نمونه در ۵۷۰۰ rpm به مدت ۷ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شدند. رسوب حاصله با یک میلی لیتر از TE buffer (Tris ۴۰ میلی مولار و Na-EDTA دو میلی مولار با pH = ۷/۹) مخلوط شده و ۲ میلی لیتر از بافر لیز کننده (Tris-base ۵۰ میلی مولار) و SDS (سدیم دو دسیل سولفونات با pH=۱۲/۵) بدان اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری°۶۰ سانتیگراد قرار گرفت (۲۰). پس از آن به میزان ۲ حجم از محلول فنل- کلروفرم به مایع درون لوله اضافه شد و مخلوط گردید. نمونه ها مجددا" سانتریفوژ شدند تا سه لایه مجزا تشکیل دهند.

۰/۵ میلی لیتر از فاز آبی رویی با اتانول خالص و سرد آبگیری شد تا تدریجا رشته های سفید رنگ DNA ظاهر شدند. پس از تبخیر شدن اتانول در دمای اتاق ۵۰ میکرولیترآب مقطر به DNA خشک شده اضافه شد.

بمنظور بررسی کمیDNA استخراج شده از الکتروفورز روی ژل آگاروز ۰/۷ درصد استفاده شد. بدین منظور پودر آگاروز ۰/۷ درصد را در بافر TAE (Tris-base چهل میلی مولار، اسید استیک ۰/۱ مولار و EDTA یک میلی مولاربا pH = ۸)تهیه کرده و سپس ۵ میکرو لیتر نمونه به چاهکهای ژل در قسمت کاتد، منتقل شد. الکتروفورز با ولتاژ ۵ (V/cm) برقرار گردید.

ژل با محلول اتیدیوم بروماید رنگ امیزی شد و DNA استخراج شده باکتریها بصورت نوارهایی روشن زیر نور ماورا بنفش مشاهده شد. کلیه مراحل استخراج DNA بر اساس دستور العمل ارائه شده در رفرانس۲۰ انجام گرفت.

PCR نمونه ها: مواد واکنش از شرکت ژن فن آوران- ایران تهیه گردید. با ۲ میکرولیتر $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۱۷ میکرولیتر آب مقطر، یک میکرولیتر پرایمر رفت TEM-1، یک میکرولیتر پرایمر برگشت TEM-1 و ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز، Master mix تهیه شدو سپس یک میکرولیترDNA اضافه گردید. سوش کنترل مثبت(Klebsiella pneumoniae) ATCC 700603 از مرکز پژوهشهای علمی و صنعتی تهران و سوش کنترل منفی (Escherichia coli ATCC 35218) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام شد: یک سیکل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد (initial denaturation) سپس ۳۰سیکل شامل مرحله واسرشت شدن (denaturation) یک دقیقه در۹۴°C ، مرحله اتصال (annealing) یک دقیقه در ۵۲ °C و مرحله طویل شدن(extension) ۱/۵ دقیقه در۷۲°C و نهایتا یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه(Terminal extension). توالی پرایمرهای مورداستفاده که براساس رفرانسهای۲۳-۲۱ انتخاب گردیدند در جدول ۱ ذکر گردیده اند.

جدول ۱ : توالی پرایمر های مورد استفاده در واکنش PCR

ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)
bla TEM-1	5 ' – ATAAAATTCTTGAAGACGAAA–3 '	۱۰۷۹
	5 ' – GACAGTTACCAATGCTTAATCA–3 '	
16S rRNA	5 – GGAATTCAAATGAATTGACGGGGGC-3 '	۴۷۹
	5 '–CGG GATCCCAGGCCCGGGAACGTATTCAC-3 '	

در مطالعه حاضر بمنظور اطمینان از انجام چرخه PCR در نمونه هایی که از نظر ژن بتالاکتاماز TEM-1 منفی بوده و در الکتروفورز نهایی نیز فاقد باند هستند، از پرایمرهای قطعه 16 S rRNA که در تمامی باکتریها یکسان است بعنوان کنترل داخلی، بهمراه پرایمرهای اختصاصی ژن بتالاکتاماز TEM-1 در یک واکنش PCR استفاده شد، که پرایمرهای 16 SrRNA، قطعه محصول(base pair) bp ۴۷۹ و پرایمرهای ژن بتالاکتاماز TEM-1 قطعه bp ۱۰۷۹ را تکثیر می دهند. پس از اتمام زمان PCR ، بمنظور بررسی محصولات حاصله از الکتروفورز روی ژل پلی اکریل آمید۶ درصد استفاده شد.۲ میکرولیتر از نمونه های PCR شده در کنار مارکر bp ۱۰۰ با ولتاژ ۲۱۰ ولت الکتروفورز شدند. رنگ آمیزی ژل را با استفاده از نیترات نقره ۰/۱ درصد انجام دادیم. حضور باند قوی در منطقه bp ۱۰۷۹ این مارکر موید تکثیر شدن قطعه مورد نظر و سویه مقاوم باکتری است. کلیه مراحل PCR نمونه ها بر اساس

Archive of SID

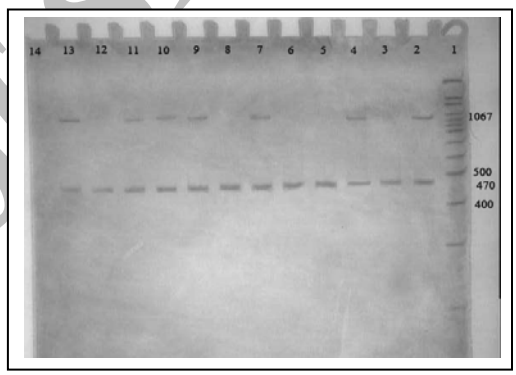
www.SID.ir

دستور العملهای ارائه شده در رفرانسهای۲۳-۲۱انجام شد. آنالیز آماری یافته های پژوهش با آزمون مجذور کای انجام گرفت.

نتایج :

از مجموع انتروباکتریاسه های مجزا شده از نمونه های کلینیکی ، ۸۳ ایزوله مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف بودند که در این مرحله مورد بررسی قرار گرفتند. این ایزوله ها شامل ۳۹ ایزوله(۴۷٪) اشریشیاکلی، ۳۶ ایزوله (۴۳/۴٪) کلبسیلا پنومونیه و ۸ ایزوله(۹/۶٪) انتروباکتر بودند.

وجود باند ۱۰۷۹ جفت بازی که ایزوله واجد ژن بتالاکتاماز TEM-1 را مشخص می کرد مجموعا در ۵۴/۲ درصد ایزوله ها مشاهده شد (تصویر ۱).



تصویر ۱: الگوی الکتروفورز محصولات PCR قطعات TEM-1 و 16S rRNA سویه های انتروباکتریاسه فنوتیپ مثبت.

باندbp ۱۰۷۹ مربوط به قطعه ژنTEM-1 و باندbp ۴۷۹ مربوط به قطعه ژنrRNA 16S می باشد.
شماره ۱: مارکراندازه bp ۱۰۰
شماره ۲: سوش کنترل مثبت (سوش کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 واجد ژن TEM-1)
شماره ۳: سوش کنترل منفی (سوش اشریشیا کلی ATCC 35218فاقد ژن TEM-1)
شماره های ۴ تا ۱۳: سویه های باکتری جدا شده از بیماران
شماره های ۴، ۷، ۹، ۱۰، ۱۱و ۱۳: سویه های ژنوتیپ مثبت(دارای ژن مقاومت)
شماره های ۵، ۶، ۸ و ۱۲: سویه های ژنوتیپ منفی(فاقد ژن مقاومت)
شماره ۱۴: کنترل منفی PCR (آب مقطر)

این میزان در ایزوله های انتروباکتر ۶۲/۵ درصد و در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه و اشریشیاکلی بترتیب ۵۸/۳ و ۴۸/۷ درصد بدست آمد (P>۰/۰۵) (جدول ۲).

جدول ۲ : فراوانی ژن بتالاکتاماز TEM-1 به تفکیک نوع باکتری مورد بررسی

ژنوتیپ ESBLs	اشریشیاکلی		کلبسیلا پنومونیه		انتروباکتر	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
مثبت	۱۹	۴۸/۷	۲۱	۵۸/۳	۵	۶۲/۵
منفی	۲۰	۵۱/۳	۱۵	۴۱/۷	۳	۳۷/۵
جمع	۳۹	۱۰۰	۳۶	۱۰۰	۸	۱۰۰

ارزیابی نتایج PCR نمونه ها نیز مشخص نمود که در بیماران بستری و سرپایی بترتیب۵۷/۸ و ۴۲/۱ درصد سویه های فنوتیپ مثبت، این مقاومت را از طریق ژن بتالاکتاماز-TEM1کسب کرده و واجد چنین ژنوتیپ مقاومتی بودند آزمون آماری نشان داد که فراوانی انتروباکتریاسه های ژنوتیپ مثبت در بیماران بستری در بیمارستان در مقایسه با بیماران سرپایی تفاوت معنی دار داشت (P< ۰/۰۵) (نمودار ۱).

نمودار ۱ : فراوانی ژن بتالاکتاماز TEM-1 در ایزوله های بیماران سرپایی و بستری

در بیماران بستری ،سویه های انتروباکتر با ۷۱/۴ درصد و در بیماران سرپایی سویه های کلبسیلا با ۳۷/۵ درصد بیشترین ایزوله های واجد ژن بتالاکتاماز TEM-1 را تشکیل می دادند. الگوی PCR نمونه ها در تصویر ۱ نشان داده شده است.

بحث:

نتایج نشان داد که از مجموعه ۸۳ باکتری ایزوله شده، اشریشیاکلی با ۳۹ ایزوله فراوانترین باکتری و پس از آن کلبسیلا و انتروباکتربه ترتیب با ۳۶ و

Archive of SID
www.SID.ir

۸ ایزولـه قـرار داشـتند. در مطالعـه حاضـر ۵۴/۲ درصـد انتروباکتریاسـه هـای فنوتیـپ مثبـت ، دارای ژنTEM-1 تشخیص داده شدند.

شیوع ایزوله های واجـد ژنوتیـپ TEM-1 در برخـی مطالعات بین ۵۲/۷ و ۵۶/۴ درصـد ایزولـه هـای فنوتیـپ مثبت گزارش شده است (۱۱،۱۲). اسپانو و همکاران (۱۳) نیز با بررسی انتروباکتریاسه های مجزا شده از نمونه هـای بالینی، شـیوع ژن TEM-1 را در ۵۸ درصـد ایزولـه هـای واجد فنوتیپ ESBLs گزارش دادند که آمار ذکر شده تـا حدود زیادی با نتایج این مطالعه مطابقـت دارد. گزارشـات دیگـر، فراوانـی ایـن ژن را در سـویه هـای بیمارسـتانی اشریـشیاکلی و کلبـسیلا پنومونیـه بـه میـزان ۱۹/۶ و ۸۱ درصد (۱۰،۱۴) ذکر نموده اند کـه نمایـانگر طیـف بـسیار وسیعی از تظاهر ژن مزبـور درایـن گـروه از باکتریهـا مـی باشد.

از دیدگاه نـوع باکتریهـای مولـد ESBLs ، مطالعـات متعدد بیشترین فراوانی ایـن سـویه هـا را در ایزولـه هـای اشریـشیا کلـی و کلبـسیلا پنومونیـه گـزارش کـرده انـد (۲،۱۰،۱۴) که با نتایج این مطالعه شباهت دارد. در مطالعه اسپانو و همکاران(۱۳)، ۵۸درصد ایزوله های فنوتیپ مثبت، واجد ژنTEM-1 بودند که فراوانترین آنهـا را سـویه هـای پروتئـوس بـا ۹۸ درصـد و سـپس پرووِیدنـشیا، کلبـسیلا، انتروباکتر بترتیب با فراوانـی ۹۲/۵ ، ۷۵ و ۴۸/۸ درصـد و کمترین فراوانی ژنوتیپی را در سویه های اشریشیاکلی بـا ۳۶ درصد گزارش دادند که از نظر نـوع باکتریهـای مجـزا شده با نتـایج حاصـل از تحقیـق مـا متفـاوت مـی باشـد. مطالعات گسترده بیـانگر ایـن واقعیـت هـستند کـه بیـان فنوتیپ ESBLs در نتیجـه تولیـد بتالاکتامازهـای وسـیع الطیف پلاسمیدی گروه A مـی باشـد کـه بوسـیله ژنهـای متعـددی از جملـهCTX-M, SHV-1, TEM-1 و. . . کـد می شوند (۱۴) لذا اختلاف در شیوع موارد فنوتیپ مثبـت و ژنوتیپ مثبت را باید در حضور سایر ژنهای مولد مقاومت بتالاکتامازی گروه A جستجو کرد که در منـاطق مختلـف نیز از وفور متفاوتی برخوردارند. همچنین این تنوع ژنهـای مقاومت در تمـام باکتریهـای خـانواده انتروباکتریاسـه نیـز صدق می کند و باعث تفاوت نتایج فنوتیپی و ژنوتیپی در سطح سویه های مقاوم این باکتریها میگردد (۱۵)، بعلاوه تنوع روشهای ژنوتیپی مورد استفاده در تحقیقات مختلـف نیز می تواند از دلایل این اختلاف نتایج باشد.

ارزیابی نتایج PCR نمونه ها نیز مشخص نمود کـه در بیماران بستری و سرپایی بترتیب۵۷/۸ و۴۲/۱ درصد سویه هـای فنوتیـپ مثبـت، ایـن مقاومـت را از طریـق ژن بتالاکتاماز1-TEMکسب کرده اند. به نظـر مـی رسـد کـه مـصرف خودسـرانه و بـیش از حـد دارو بـویژه در محـیط بیمارستان از سویی با افـزایش مقاومـت دارویـی و فراینـد کنژوگاسـیون کـه در انتقـال ژنهـای بتالاکتامازهـای پلاسمیدی نقش اساسی دارد و به رشد فزاینده مقاومتهای دارویی می انجامد از سوی دیگر در انتقـال مقاومـت بـین سویه های بیمارستانی و جامعه دخیل بوده است.

در ظهـور مقاومـت بـه آنتـی بیوتیکهـا کـه سـالانه هزینه های گزافـی بـه سیـستم هـای بهداشـتی کـشورها تحمیل می کند علاوه بر مصرف نابجـای آنتـی بیوتیکهـا، استفاده از اقدامات تهاجمی درمانی، بیماران دچار نقـص ایمنی و عدم رعایت نکات عملی در زمینه کنتـرل عفونـت نیز نقش مهمی را ایفا می نمایند.

نتیجه نهایی :

در مجمـوع، بـر اسـاس نتـایج ایـن مطالعـه، مـساله مقاومت‌به داروهای بتالاکتام و مقاومت به سفالوسپورینهای نسل سوم که امروزه بهترین و مؤثرترین آنتـی بیوتیکهـای موجود و با طیف اثر وسیع در درمان بسیاری از بیماریهای عفونی هستند، یک معضل جدی رو به پیشرفت اسـت کـه بزودی جهت جایگزینی آنها، به آنتی بیوتیکهای جدید نیاز خواهیم داشت. همچنـین ژن TEM-1 درایـن مطالعـه در بـیش از نیمـی از سـویه هـای مقـاوم باکتریهـای روده ای شناسایی گردید. این یافته ها از یک طرف ضـرورت اتخـاذ تدابیر عملی در مورد تجویز منطقی داروها را ایجاب نموده و از طرف دیگر اهمیت بهـره وری از روشـهای تشخیـصی جدید و متد های مولکولار در زمینه تشخیص مناطق ژنی موجد مقاومت در باکتریها را گوشزد می نماید. بنـابر ایـن با توجه به انتشار سویه هـای انتروباکتریاسـه تولیدکننـده بتالاکتامازهای وسیع الطیف در نمونـه هـای بـالینی اخـذ شده از بیماران بستری و سرپایی، ضروریست تا بـا تجهیـز آزمایشگاهها بـه روشـهای تـشخیص فنـوتیپی مقاومـت و تکنیکهای سریع و دقیق مولکـولی در شناسـایی و تعیـین نوع مقاومت ژنتیکـی ، میـزان شـیوع سـویه هـای مقـاوم باکتریهـا را مـورد ارزیـابی قـرار داده و تـدابیر لازم جهـت درمان بیماران و کنترل مقاومت در باکتریهـا را بـه مـورد اجرا گذاشت.

Archive of SID

www.SID.ir

سپاسگزاری :

بدین وسیله از مساعدت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی شهرکرد جهت تامین هزینه و امکانات و هماهنگی های لازمه در این مطالعه قدردانی می گردد.

منابع :

1. Knothe H, Shah P. Kremery V. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. Infection. 1983; 11: 315-7.
2. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35: 1697-1704.
3. Daoud Z, Hakime N. Prevalence and susceptibility pattern of ESBL producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in a general university hospital in Beirut, Lebanon. Rev Esp Quimioter. 2003; 16(2):233-238.
4. Patricia A. ESBL in 21st century: Characterization, Epidemiology and Detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 2001; 14(4): 933-951.
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. Thomas KS, Moland ES, Coudron PE. Occurrence and detection of extended spectrum beta- lactamases in members of the family Enterobacteriaceae at a Veterans Medical Center: seek and you may find. J Clin Microbiol 1997; 35: 2593-7.
9. 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 Chemother 1998; 42: 1459-1462.
10. Kesselov M, Kolar M, Sauer P, Koukalova D, Petrzelova J, Vagnerova I, et al. Molecular biology Characteristics of ESBL Klebsiella pneumoniae collected in the neonatal unit of the Teaching Hospital in Olomouc. Klin Microbiol Infekc Lek. 2005; 11(1): 20-24.
11. 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.
12. 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.
13. Spanu T, Luzzar F, Perilli M, Amicosante G. Occurrence of extended spectrum β-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: implications for resistance to betalactams and other antimicrobial drugs. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(1): 196-202.
14. Ma L, Chang FY, Fung CP, Chen TL, Lin JC, Lu PL, et al. Variaty of TEM, SHV and CTX types beta lactamase present in recent clinical isolated Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Entrobacter cloacae from Taiwan. Microb Drug Resist 2005; 11(1): 31-39.
15. 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): 489-99.
16. 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
17. Schiappa DA, Haiden MK, Matushek MG, Hashemi FN, Sullivan J, Miyashiro KY et al. Ceftazidime resistant Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli bloodstream infection: a case-control and molecular epidemiologic investigation. J Infect Dis 1996; 174: 529-536.
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. http://www.evaluations-standards.org.uk
۱۹. زمان زاد ب، نفیسی م ر، کریمی ع، دیهم ب. بررسی فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف در انتروباکتریاسه های ایزوله شده از نمونه های کلینیکی بیمارستانهای آموزشی شهرکرد به روش Combination disk method - ۱۳۸۵. [زیر چاپ].

Archive of SID

www.SID.ir

20. Kado CI, liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol 1981;145(3): 1365-1373.
21. 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.
22. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995; 8:557-584.
23. Rasheed JK, Tenover FC. Detection and characterization of antimicrobial resistance genes in bacteria. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, editors. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington, D.C. 2003: 1196-1212.

Archive of SID

www.SID.ir