

## بررسی فراوانی ژن TEM-1 در سویه های اشريشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر تولید کننده بتالاکتاماز های وسیع الطیف ایزوله شده از نمونه های کلینیکی بیمارستان های آموزشی شهر کرد 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 که عامل بیش از ۹۰ درصد مقاومت سویه های اشريشیاکلی به داروهای بتالاکتام و از علل مهم بروز مقاومتیهای چند گانه دارویی در عفونتهای بیمارستانی می باشد. در این مطالعه فراوانی ژن بتالاکتاماز TEM-1 در ایزوله های بیمارستانی باکتریهای روده ای تولید کننده بتالاکتاماز های وسیع الطیف به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**روش کار:** در مطالعه توصیفی تحلیلی حاضر ۸۳ ایزوله از باکتریهای روده ای تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف شامل سویه های اشريشیاکلی ، کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر که از نمونه های کلینیکی بیمارستانهای آموزشی شهر کرد جدا شده بودند به روش PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی ژن بتالاکتاماز TEM-1 و بمنظور تعیین فراوانی ژن TEM-1 مورد بررسی قرار گرفتند. محصولات نهایی روی ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز و از نظر وجود باند ۱۰۷۹ جفت بازی مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز آماری یافته های پژوهش با آزمون مجذور کای انجام گرفت.

**نتایج:** از مجموع باکتری های مورد آزمایش ، ۴۵ ایزوله (۵۴/۲٪) دارای ژن مقاومت بتالاکتاماز TEM-1 بودند. توزیع فراوانی این ژن در ایزوله های مورد بررسی تفاوت چشمگیری را نشان نداد ( $p > 0.05$ ) بطوریکه این میزان در گونه های انتروباکتر ۶۲/۵ درصد و در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه و اشريشیاکلی بترتیب ۵۸/۳ و ۴۸/۷ 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 باکتریها در مجموعه آزمایشات 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 :

جدیدی از آنزیم ها به نام بتالاکتامازهای با طیف وسیع ESBLs (Extended Spectrum Beta Lactamases) معرفی شدند که قادر به تخریب سفالوسپورین های با طیف اثر وسیع مانند سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سفنازیدیم بودند. TEM-1 معمول ترین فرم بتالاکتاماز

اعضای خانواده باکتریهای روده ای بتا لاکتامازهایی را تولید می نمایند که توسط پلاسمیدها کد می شوند از نمونه این بتالاکتامازها می توان از TEM-1، TEM-2 و SHV-1 نام برد. در اواسط دهه ۱۹۸۰ گروه

\* 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

بیمارستانی باکتریهای روده ای انجام شد ۵۶/۴٪ گزارش شد (۱۲). در مطالعه دیگری ۵۸٪ از سویه های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف دارای ژن TEM-1 شناسایی 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 مزبور در 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 ارگانسیم ها نیازمند تجویز آنتی بیوتیکهای وسیع الطیف بوده و بویژه در بیماران با ضعف سیستم ایمنی و در بخش های مراقبتهای ویژه با مشکلات عدیده ای همراه است. لذا آزمایشگاه های میکروشناسی نقش مهمی در شناسایی و گزارش باکتریهای مولد این نوع بتالاکتامازها و تسهیل 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 حاضر وجود ژن بتالاکتاماز TEM-1 در ایزوله های بیمارستانی اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و آنتروباکتر 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 آنتروباکتر 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 تأییدی 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

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 و TEM-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 ۲۸-۳۴ درصد ذکر نموده اند و این در حالی است که آنتی بیوتیکهای گروه بتالاکتاماز در صد 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 (۳-۴). 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 ارگانسیمهای مختلف قابل انتقال هستند. بتالاکتاماز TEM-1، اولین بتالاکتامازی بود که بوسیله پلاسمید در آنتروباکتریاسه ها کد شد ولی سایر باکتریها از جمله پseudomonas آئروژینوزا، ویبریوکلا و نیز سویه های هموفیلوس ها و نایسریاها نیز قادر به تولید آن می باشند (۵،۶).

بتالاکتامازهای وسیع الطیف عمدتاً در دو جنس کلبسیلا و اشریشیا تولید می شوند و سایر جنس های باکتریهای روده ای در رتبه های بعدی قرار دارند (۷-۹). 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-1 بوده 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 بر روی سویه های

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 پلیمرز، Master mix تهیه شد و سپس یک میکرولیتر DNA 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 ۳۰ سیکل شامل مرحله واسرشت شدن (denaturation) یک دقیقه در ۹۴°C، مرحله اتصال (annealing) یک دقیقه در ۵۲°C و مرحله طولیل شدن (extension) ۱/۵ دقیقه در ۷۲°C و نهایتاً یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه (Terminal extension). توالی پرایمرهای مورد استفاده که براساس رفرانسه‌های ۲۱-۲۳ انتخاب گردیدند در جدول ۱ ذکر گردیده اند.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR

اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر	ژن
۱۰۷۹	5'-ATAAAATTCCTTGAAGACGAAA-3' 5'-GACAGTTACCAATGCTTAATCA-3'	bla <sub>TEM-1</sub>
۴۷۹	5'-GGAATCAAATGAATGACGGGGGC-3' 5'-CGG GATCCAGGCCCGGGAACGTATTAC-3'	16S rRNA

در مطالعه حاضر بمنظور اطمینان از انجام چرخه PCR در نمونه‌هایی 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 S rRNA، قطعه محصول (bp) (base pair) ۴۷۹ و پرایمرهای ژن بتالاکتاماز TEM-1 قطعه ۱۰۷۹ bp را تکثیر می‌دهند. پس از اتمام زمان PCR، بمنظور بررسی محصولات حاصله از الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریل آمید ۶ درصد استفاده شد. ۲ میکرولیتر از نمونه‌های PCR شده در کنار مارکر ۱۰۰ bp 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 ۱۰۷۹ bp این مارکر موید تکثیر شدن قطعه مورد نظر و سویه مقاوم باکتری است. کلیه مراحل PCR نمونه‌ها بر اساس

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

استخراج DNA پلاسمیدی: یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری مورد نظر را در محیط کشت Trypticase 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 میلی‌لیتر از TE buffer (۴۰ Tris میلی مولار و Na-EDTA دو میلی مولار با pH = ۷/۹) مخلوط شده و ۲ میلی‌لیتر از بافر لیز کننده (۵۰ Tris-base میلی مولار) و SDS (سدیم دو سیل 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. نمونه‌ها مجدداً سانتریفوژ شدند تا سه لایه مجزا تشکیل دهند.

۰/۵ میلی‌لیتر از فاز آبی رویی با اتانول خالص و سرد آگیری شد تا تدریجاً رشته‌های سفید رنگ DNA ظاهر شدند. پس از تبخیر شدن اتانول در دمای اتاق ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به DNA خشک شده اضافه شد.

بمنظور بررسی کمی DNA 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) چهار میلی مولار، اسید استیک ۰/۱ مولار و EDTA یک میلی مولار با pH = ۸) تهیه کرده و سپس ۵ میکرولیتر نمونه به چاهک‌های ژل در قسمت کاتد، منتقل شد. الکتروفورز با ولتاژ ۵ (V/cm) برقرار گردید.

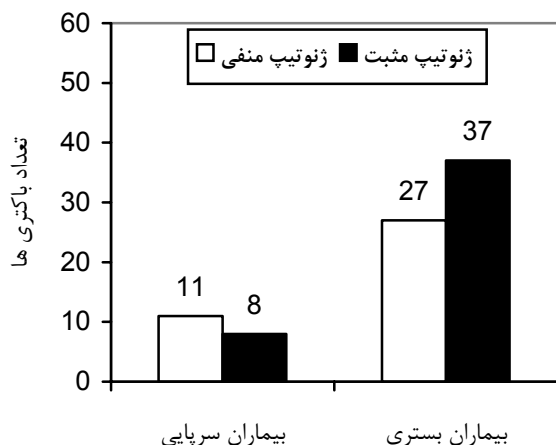
ژل با محلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و DNA استخراج شده باکتریها بصورت نوارهایی روشن زیر نور ماورا بنفش مشاهده شد. کلیه مراحل استخراج DNA بر اساس دستور العمل ارائه شده در فرانس ۲۰ انجام گرفت.

PCR نمونه‌ها: مواد واکنش از شرکت ژن فن آوران - ایران تهیه گردید. با ۲ میکرولیتر  $MgCl_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر بافر

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 نمونه‌ها نیز مشخص نمود که در بیماران بستری و سرپایی بترتیب ۵۷/۸ و ۴۲/۱ درصد سویه‌های فنوتیپ مثبت، این مقاومت را از طریق ژن بتالاکتاماز TEM-1 کسب کرده و واجد چنین ژنوتیپ مقاومتی بودند. آزمون آماری نشان داد که فراوانی انتروباکتریاسه‌های ژنوتیپ مثبت در بیماران بستری در بیمارستان در مقایسه با بیماران سرپایی تفاوت معنی‌دار داشت ( $P < 0.05$ ) (نمودار ۱).



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

در بیماران بستری، سویه‌های انتروباکتر با ۷۱/۴ درصد و در بیماران سرپایی سویه‌های کلبسیلا با ۳۷/۵ درصد بیشترین ایزوله‌های واجد ژن بتالاکتاماز TEM-1 را تشکیل می‌دادند. الگوی PCR نمونه‌ها در تصویر ۱ نشان داده شده است.

### بحث:

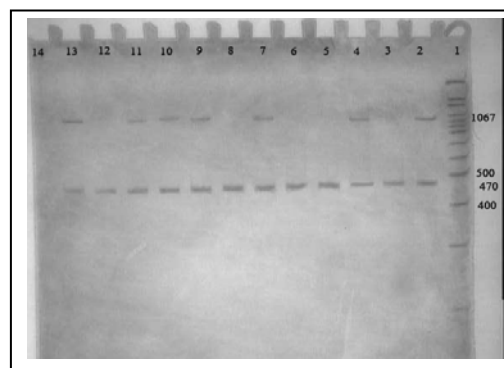
نتایج نشان داد که از مجموعه ۸۳ باکتری ایزوله شده، اشریشیاکلی با ۳۹ ایزوله فراوانترین باکتری و پس از آن کلبسیلا و انتروباکتر به ترتیب با ۳۶ و

دستور عمل‌های ارائه شده در فرانسهای ۲۳-۲۱ انجام شد. آنالیز آماری یافته‌های پژوهش با آزمون مجذور کای انجام گرفت.

### نتایج:

از مجموع انتروباکتریاسه‌های مجزا شده از نمونه‌های کلینیکی، ۸۳ ایزوله مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بودند که در این مرحله مورد بررسی قرار گرفتند. این ایزوله‌ها شامل ۳۹ ایزوله (۴۷٪) اشریشیاکلی، ۳۶ ایزوله (۴۳/۴٪) کلبسیلا پنومونیه و ۸ ایزوله (۹/۶٪) انتروباکتر بودند.

وجود باند ۱۰۷۹ جفت‌بازی که ایزوله واجد ژن بتالاکتاماز TEM-1 را مشخص می‌کرد مجموعاً در ۵۴/۲ درصد ایزوله‌ها مشاهده شد (تصویر ۱).



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

باند ۱۰۷۹ bp مربوط به قطعه ژن TEM-1 و باند ۴۷۹ bp مربوط به قطعه ژن 16S rRNA می‌باشد.

شماره ۱: مارکراندازه ۱۰۰ bp

شماره ۲: سوش کنترل مثبت (سوش کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603 واجد ژن TEM-1)

شماره ۳: سوش کنترل منفی (سوش اشریشیاکلی ATCC 35218 فاقد ژن TEM-1)

شماره‌های ۴ تا ۱۳: سویه‌های باکتری جدا شده از بیماران شماره‌های ۴، ۷، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۳: سویه‌های ژنوتیپ مثبت (دارای ژن مقاومت)

شماره‌های ۵، ۶، ۸ و ۱۲: سویه‌های ژنوتیپ منفی (فاقد ژن مقاومت) شماره ۱۴: کنترل منفی PCR (آب مقطر)

این میزان در ایزوله‌های انتروباکتر ۶۲/۵ درصد و در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه و اشریشیاکلی بترتیب ۵۸/۳ و ۴۸/۷ درصد بدست آمد ( $P > 0.05$ ) (جدول ۲).

ارزیابی نتایج PCR نمونه‌ها نیز مشخص نمود که در بیماران بستری و سرپایی بترتیب ۵۷/۸ و ۴۲/۱ درصد سویه‌های فنوتیپ مثبت، این مقاومت را از طریق ژن بتالاکتاماز TEM-1 کسب کرده‌اند. به نظر می‌رسد که مصرف خودسرانه و بیش از حد دارو بویژه در محیط بیمارستان از سوی با افزایش مقاومت دارویی و فرایند کنژوگاسیون که در انتقال ژنهای بتالاکتامازهای پلاسمیدی نقش اساسی دارد و به رشد فزاینده مقاومت‌های دارویی می‌انجامد از سوی دیگر در انتقال مقاومت بین سویه‌های بیمارستانی و جامعه دخیل بوده است.

در ظهور مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها که سالانه هزینه‌های گزافی به سیستم‌های بهداشتی کشورها تحمیل می‌کند علاوه بر مصرف نابجای آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از اقدامات تهاجمی درمانی، بیماران دچار نقص ایمنی و عدم رعایت نکات عملی در زمینه کنترل عفونت نیز نقش مهمی را ایفا می‌نمایند.

### نتیجه نهایی:

در مجموع، بر اساس نتایج این مطالعه، مساله مقاومت به داروهای بتالاکتام و مقاومت به سفالوسپورینهای نسل سوم که امروزه بهترین و مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌های موجود و با طیف اثر وسیع در درمان بسیاری از بیماری‌های عفونی هستند، یک معضل جدی رو به پیشرفت است که بزودی جهت جایگزینی آنها، به آنتی‌بیوتیک‌های جدید نیاز خواهیم داشت. همچنین ژن TEM-1 در این مطالعه در بیش از نیمی از سویه‌های مقاوم باکتری‌های روده‌ای شناسایی گردید. این یافته‌ها از یک طرف ضرورت اتخاذ تدابیر عملی در مورد تجویز منطقی داروها را ایجاب نموده و از طرف دیگر اهمیت بهره‌وری از روش‌های تشخیصی جدید و متد‌های مولکولار در زمینه تشخیص مناطق ژنی موجد مقاومت در باکتری‌ها را گوشزد می‌نماید. بنابر این با توجه به انتشار سویه‌های انتروباکتریاسه تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در نمونه‌های بالینی اخذ شده از بیماران بستری و سرپایی، ضروریست تا با تجهیز آزمایشگاه‌ها به روش‌های تشخیص فنوتیپی مقاومت و تکنیک‌های سریع و دقیق مولکولی در شناسایی و تعیین نوع مقاومت ژنتیکی، میزان شیوع سویه‌های مقاوم باکتری‌ها را مورد ارزیابی قرار داده و تدابیر لازم جهت درمان بیماران و کنترل مقاومت در باکتری‌ها را به‌مورد اجرا گذاشت.

۸ ایزوله قرار داشتند. در مطالعه حاضر ۵۴/۲ درصد انتروباکتریاسه‌های فنوتیپ مثبت، دارای ژن TEM-1 تشخیص داده شدند.

شیوع ایزوله‌های واجد ژنوتیپ TEM-1 در برخی مطالعات بین ۵۲/۷ و ۵۶/۴ درصد ایزوله‌های فنوتیپ مثبت گزارش شده است (۱۱،۱۲). اسپانو و همکاران (۱۳) نیز با بررسی انتروباکتریاسه‌های مجزا شده از نمونه‌های بالینی، شیوع ژن TEM-1 را در ۵۸ درصد ایزوله‌های واجد فنوتیپ ESBLs گزارش دادند که آمار ذکر شده تا حدود زیادی با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. گزارشات دیگر، فراوانی این ژن را در سویه‌های بیمارستانی اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه به میزان ۱۹/۶ و ۸۱ درصد (۱۰،۱۴) ذکر نموده‌اند که نمایانگر طیف بسیار وسیعی از تظاهر ژن مزبور در این گروه از باکتری‌ها می‌باشد.

از دیدگاه نوع باکتری‌های مولد ESBLs، مطالعات متعدد بیشترین فراوانی این سویه‌ها را در ایزوله‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه گزارش کرده‌اند (۲،۱۰،۱۴) که با نتایج این مطالعه شباهت دارد. در مطالعه اسپانو و همکاران (۱۳)، ۵۸ درصد ایزوله‌های فنوتیپ مثبت، واجد ژن TEM-1 بودند که فراوانترین آنها را سویه‌های پروتئوس با ۹۸ درصد و سپس پروویدنسیا، کلبسیلا، انتروباکتر بترتیب با فراوانی ۹۲/۵، ۷۵ و ۴۸/۸ درصد و کمترین فراوانی ژنوتیپی را در سویه‌های اشریشیاکلی با ۳۶ درصد گزارش دادند که از نظر نوع باکتری‌های مجزا شده با نتایج حاصل از تحقیق ما متفاوت می‌باشد. مطالعات گسترده بیانگر این واقعیت هستند که بیان فنوتیپ ESBLs در نتیجه تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف پلاسمیدی گروه A می‌باشد که بوسیله ژنهای متعددی از جمله TEM-1، SHV-1، CTX-M و... کد می‌شوند (۱۴) لذا اختلاف در شیوع موارد فنوتیپ مثبت و ژنوتیپ مثبت را باید در حضور سایر ژنهای مولد مقاومت بتالاکتامازی گروه A جستجو کرد که در مناطق مختلف نیز از وفور متفاوتی برخوردارند. همچنین این تنوع ژنهای مقاومت در تمام باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه نیز صدق می‌کند و باعث تفاوت نتایج فنوتیپی و ژنوتیپی در سطح سویه‌های مقاوم این باکتری‌ها میگردد (۱۵)، بعلاوه تنوع روش‌های ژنوتیپی مورد استفاده در تحقیقات مختلف نیز می‌تواند از دلایل این اختلاف نتایج باشد.

**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:**

- Olomouc. Klin Microbiol Infekc Lek. 2005; 11(1): 20-24.
- 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.
- 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.
- Spanu T, Luzzar F, Perilli M, Amicosante G. Occurrence of extended spectrum  $\beta$ -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.
- Ma L, Chang FY, Fung CP, Chen TL, Lin JC, Lu PL, et al. Variety 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.
- Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W. Concurrent outbreaks of ESBL producing organism of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw Hospital. J Antimicrobiol Chemother 1999; 44(4): 489-99.
- 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
- 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.
- Livermore DM, Woodford N. Guidance to Diagnostic Laboratories: laboratory Detection and Reporting of Bacteria With extended spectrum  $\beta$ -lactamases. Issued by Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory. Centre for Infections. Health Protection Agency. June 2004. <http://www.evaluations-standards.org.uk>
- 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].
- 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.
- Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35: 1697-1704.
- 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.
- Patricia A. ESBL in 21st century: Characterization, Epidemiology and Detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 2001; 14(4): 933-951.
- George A, Jacoby MD, Munoz LS. The New Beta lactamases. N Engl J Med. 2005; 352(4): 380-391.
- Thew M. Plasmid mediated  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria: distribution and properties. J Antimicrob Chemother. 1979; 5: 349-358.
- 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.
- 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.
- Franceschini N, Perilli M, Segatore B, Setacci, Amicosante G, Mazzariol A. Cefazidime 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.
- Kesselov M, Kolar M, Sauer P, Koukalova D, Petzelova J, Vagnerova I, et al. Molecular biology Characteristics of ESBL Klebsiella pneumoniae collected in the neonatal unit of the Teaching Hospital in

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, Gustaferrero CA. Multiplex PCR for identification of Methicillin-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.