مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۶، شماره ۴، زمستان ۹۵، صفحات ۲۲۲ تا ۲۲۸

Original Article

بررسی وجود ژن های مقاوم به تتراسایکلین(TetA, TetB) در پروتئوس، انتروباکتر، و کلبسیلای جدا شده از نمونه‌های ادرار

مریم سهرابی فرد[۱]، فاطمه نوربخش[۲]، آمنه الیکایی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا
[۲]استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا
[۳]استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا

چکیده

سابقه و هدف: *امروزه مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها در میان باکتری‌های پاتوژن موضوعی است که پزشکان سراسر دنیا را با مشکلات فراوانی مواجه کرده است، ازجمله در درمان عفونت های دستگاه ادراری (UTI) که یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در تمام گروه‌های سنی است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی وجود ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین در خانواده انتروباکتریاسه جدا شده از نمونه‌های ادرار بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی، تعداد ۲۳۰ نمونه مشکوک به عفونت ادراری از بیماران جدا شد. سپس توسط تست‌های بیوشیمیایی مورد آزمایش قرار گرفت و با انجام تست‌های آنتی بیوگرام برای آنتی بیوتیک‌های مختلف میزان مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی به دست آمد. سپس DNA پلاسمیدی استخراج شد و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ژن‌های کدکننده مقاومت به تتراسایکلین (TetA، TetB) بررسی شدند.*

یافته‌ها: *در نمونه‌های ادراری، ۱۲۰ باکتری به عنوان باکتری مورد نظر در این تحقیق جدا شدند که ۸۸ مورد کلبسیلا، ۲۰ مورد پروتئوس و ۱۲ مورد انتروباکتر بودند.در بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای تتراسایکلین، در کلبسیلا حساسیت ۳۸/۳۳٪ و مقاومت۳۴/۹۹٪، در انتروباکتر حساسیت ۶/۶۶٪ و مقاومت ۳/۳۳٪ و در پروتئوس حساسیت ۲/۵٪ و مقاومت ۱۴/۱۶٪ به دست آمد. ۲۵ مورد ژن کد کننده tetA و ۳۶ مورد ژن کد کننده tetB کشف شد.*

نتیجه‌گیری: *مقایسه بین نتایج کشت و PCR برای ژن‌های TetA و TetB نشان می‌دهد که روش PCR نتایج تست‌های آنتی بیوگرام را تایید می‌کند، ولی برای رسیدن به نتایج دقیق‌تر، باید ژن‌های دیگر کد کننده مقاومت به تتراسایکلین مورد مطالعه قرار گیرند.*

واژگان کلیدی: *مقاومت به تتراسایکلین، TetA، TetB، کلبسیلا، انتروباکتر، پروتئوس، PCR.*

مقدمه

امروزه یکی از مشکلات مطرح و قابل توجه بهداشت جهانی، افزایش شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی پاتوژن‌ها در جمعیتهای مختلف انسانی و حیوانی است. عامل اصلی افزایش مقاومت باکتری‌های پاتوژنیک، استفاده بیش از حد آنتی بیوتیک‌ها است و این امر منجر به پیدایش و انتشار پاتوژن‌های مقاوم و ژن‌های مقاومت در آنها می‌شود. در جمعیت‌های انسانی و حیوانی، آنتی بیوتیک‌ها به منظور درمان و جلوگیری از بیماری های عفونی استفاده می‌شوند (۱). اعضای خانواده انتروباکتریاسه به عنوان یکی از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شوند. گزارشات مختلفی از سراسر جهان مبنی بر نقش مهم آن در ایجاد عفونت‌های جدی از جمله عفونت‌های دستگاه ادراری، دستگاه تنفس،

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده زیست شناسی، گروه میکروبیولوژی، فاطمه نوربخش (**email**: niloofar_noorbakhsh@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۴/۹/۲۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۵/۱/۲۵

پوست، بافت نرم و خون در بخش‌های مختلف بیمارستانی به ویژه بخش مراقبت ویـژه وجـود دارد (۲). عفونـت ادراری بـا وجود باکتری در ادرار یا بـاکتریوری و وجـود علایـم بـالینی بدون توجه به تعداد باکتری در ادرار مشخص می‌شـود و بـه دو دسته عفونت ادراری فوقانی و تحتانی تقسـیم مـی‌شـوند. عفونت ادراری فوقانی همان پیلونفریت اسـت، در حـالی کـه عفونـت‌هـای ادراری تحتـانی شـامل سیسـتیت، اورتریـت و پروستاتیت هستند. عفونت‌های سیستم ادراری می‌توانند هم زمان چند محل را گرفتار کنند. به طور مثال، در بسـیاری از موارد پیلونفریت به همراه درگیری مثانـه و سیسـتیت اسـت (۱). در بین انتروباکتریاسه‌های مقاوم بـه آنتـی بیوتیـک‌هـا، سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین از فراوانی بـالایی برخـوردار هستند. این آنتی بیوتیک به دلیل قیمت پایین و کـم بـودن اثرات جانبی آن کاربرد وسیعی در درمان عفونت های دامی و انسانی دارد (۳). شـیوع مقاومـت بـه تتراسـایکلین، نشـانگر مناسبی برای ارزیابی ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک است و ارزیابی اپیدمیولوژی مولکولی سویه‌های مقاوم بـه چنـد دارو می‌تواند موجب دقت در تجویز داروهای مناسب و جلـوگیری از شیوع سویه‌های مقاوم شود (۴). وجود ژن‌هـای مقـاوم در باکتری‌ها با کسب ژن Tet همراه است (۵). درحال حاضر، ۳ مکانیسم مقاومت به تتراسـایکلین شـناخته شـده اسـت: ۱- پـروتئین‌هـای حفاظـت ریبـوزومی: پـروتئین‌هـای حفاظـت ریبوزومی پروتئین‌های سیتوپلاسمی هستند که ریبوزوم‌ها را از اثر تتراسایکلین محافظت می‌کنند و مقاومـت بـه داکسـی سایکلین و مینوسایکلین ایجاد مـی‌کننـد. ایـن پـروتئین‌هـا نسـبت بـه پـروتئین‌هـای افلاکـس مقاومـت بیشـتری بـه تتراسایکلین در باکتری‌ها ایجاد می‌کنند، به جز TetB (۶،۷). ۲- غیر فعال سازی آنزیمی تتراسـایکلین: ژن tetX مقاومـت تتراسـایکلین را بـه واسـطه غیـر فعـال سـازی آنزیمـی تتراسایکلین کد مـی‌کنـد. ژن TetX بـه علـت ارتبـاطش بـا erm(F)، که ژن متیلاز rRNA را کد می‌کند، کشف شد (۸). ۳- پروتئین‌های افلاکس: ژن‌های افلاکس tet برای پروتئین-های مرتبط با غشا کد می‌شوند،که تتراسـایکلین را از سـلول خارج می‌کنند. خارج کردن تتراسایکلین، غلظت ماده داخـل سلول را کاهش داده و بنـابراین ریبـوزوم‌هـا را درون سـلول محافظت می‌کند. ژن‌های افلاکس در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی وجود دارند (۹). هدف از ایـن تحقیـق، بررسـی وجـود ژن‌هـای مقـاوم بـه تتراسـایکلین در خـانواده انتروباکتریاسه (*انتروباکتر*، *پروتئوس* و *کلبسیلا*) جدا شـده از نمونه‌های ادرار بود.

مواد و روشها

این مطالعه به صورت مقطعی ـ توصیفی از اول مهـر مـاه سـال ۱۳۹۳ تا ۷ مرداد ۱۳۹۴ انجام شد. تعداد ۲۳۰ نمونـه مشـکوک به عفونت ادراری از بیمارستان‌های الغدیر، ارتش، هاشمی نژاد و شریعتی در شهر تهران مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های ادرار بـه روش میداسـتریم (قسـمت میـانی جریـان ادرار) در ظـرف استریل جمع آوری شدند و با استفاده از لـوپ اسـتریل بـر روی محیط بلاد آگار و EMB کشت داده شدند و بعـد از ۲۴ سـاعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلـونی‌هـا شـمارش شدند و نمونه‌هایی که تعداد کلنی رشد کرده آنها برابر با بیش از 10^5 بـود، از نظـر عفونـت ادراری مثبـت تلقـی و آزمـایش‌هـای بیوشـیمیایی، ماننـد سـیمون سـیترات، اوره آز، لایـزین دکربوکسـیلاز، SIM (انـدول، حرکـت، H_2S)، TSI، MR و VP انجام شدند.

تست حساسیت آنتی بیوتیکی

بـرای تعیـین تسـت حساسـیت آنتـی بیـوتیکی، سوسپانسـیون استاندارد معادل نیم مـک فارلنـد تهیـه شـد. سـوآپ اسـتریلی آغشته به این سوسپانسیون شد و بر روی محیط مـولر هینتـون آگـار کشـت داده شـد و آنتـی بیوتیـک‌هـای تتراسـایکلین، اریترومایسین، استرپتومایسـین، تیکارسـیلین، سفتریاکسـون، و سفوکسیتین بر روی آن قرار گرفت. پـس از ۲۴ تـا ۷۲ سـاعت، قطر هاله طبق جدول استاندارد CLSI فنوتیپ مقاومـت تعیـین شد و به سه دسته حساس (S)، نیمه حسـاس (I) و مقـاوم (R) دسته بندی شدند.

بررسی مولکولی مقاومت به تتراسایکلین

در مرحلـه بعـد، اسـتخراج DNA پلاسـمیدی بـه کمـک کیـت Vivantis انجام گرفت و آماده انجام PCR شد. پرایمرهای مـورد استفاده از مقالـه قبلـی (۲۳) طراحـی شـد و کـد تـوالی آن در جدول ۱ آورده شده است. واکنش PCR به کمک کیت سـیناژن انجام گرفت. مواد مورد استفاده و غلظت مورد نیاز در جـدول ۲ آمده است.

برنامه ریزی دستگاه ترموسـایکلر بـرای ژن TetA در۳۵ سـیکل حرارتی شامل دمای دناتوراسیون اولیـه ۹۴ درجـه بـه مـدت ۵ دقیقه، دمای دناتوراسیون ۹۵ درجه به مدت ۳۰ دقیقـه، دمـای اتصال پرایمر ۴۵ درجه به مدت ۱ دقیقه ۱۵ ثانیه، دمای تکثیـر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. برنامه ریـزی دسـتگاه ترموسایکلر برای ژن TetB هم مانند TetA انجـام شـد، بـه جـز دمای اتصال پرایمر کـه در ۴۵ درجـه سـانتی‌گـراد بـه مـدت ۱

دقیقه انجام شد. سپس محصول PCR در ژل آگارز ۲ درصد قرار گرفت، با 6x Loading رنگ آمیزی شد و تحت اشعه UV عکس برداری شد. از مارکر ۱۰۰BP تولید شرکت سیناژن برای شناسایی محصول PCR استفاده شد. برای تحلیل داده‌های آماری در این مطالعه از نرم افزار STSSVersion20 استفاده شد.

جدول۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده ژن TetA و TetB

ژن		پرایمر
TetA	F	GCTACATCCTGCTTGCCTTC
	R	GCATAGATCGCCGTGAAGAG
TetB	F	TCATTGCCGATACCACCTCAG
	R	CCAACCATCATGCTATTCCATCC

جدول ۲. جدول مقادیرموردنیازبرای**PCR**

حجم مورد استفاده	مواد مورد نیاز
5mM	10X Buffer
2mM	$MgCl_2$
1mM	dNTP
2 (P_S)& 2 (P_{AS})mM	Primers
0.5mM	Taq Polymerase
1mM	DNA Tamplate
11.5mM	H_2O (D.W)

یافته‌ها

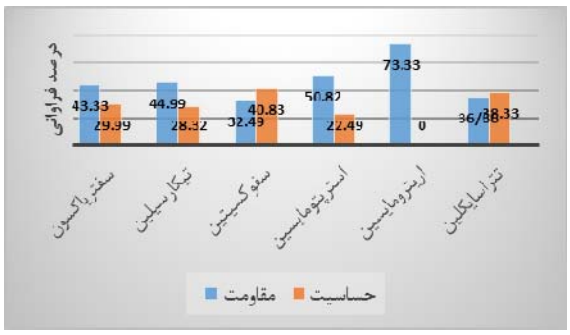
تعداد ۲۳۰ نمونه مشکوک به عفونت ادراری از بیمارستان‌های الغدیر، ارتش، هاشمی نژاد و شریعتی شهر تهران مورد بررسی قرار گرفتند. پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی، ۱۲۰ مورد از آنها مورد تائید قرار گرفتند که از بین آنها، ۸۸ مورد متعلق به کلبسیلا، ۲۰ مورد پروتئوس و ۱۲ مورد آنها انتروباکتر بودند. از کل نمونه‌های جدا شده، ۸۶ مورد از زنان و ۳۴ مورد از مردان جداسازی شد.

نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی

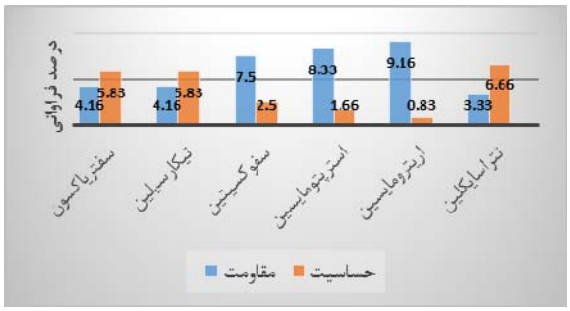
نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن برای ۱۲۰ ایزوله انجام شد. نتایج نشان داد که بالاترین میزان مقاومت در برابر تتراسایکلین برای ایزوله‌های کلبسیلا در ۴۴ (۳۶/۶۶٪) مورد (نمودار ۱)، و سپس برای انتروباکتر در ۴ (۳۳/۳۳٪) مورد(نمودار ۲) و برای پروتئوس در ۱۷ (۱۴/۱۶٪) مورد (نمودار ۳) بود.

نتایج حاصل از تکنیک‌های مولکولی

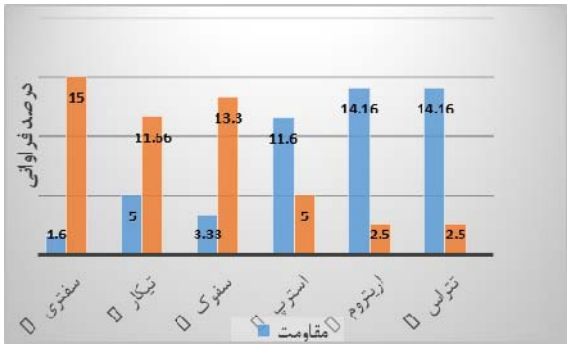
در این مطالعه با استفاده از تکنیک PCR، ۱۲۰ ایزوله برای وجود ژن‌های مقاوم به TetA و TetB مورد بررسی قرار گرفتند.



نمودار ۱. درصد مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیک‌ها در کلبسیلا از ۱۲۰ نمونه جدا شده.



نمودار۲. درصد مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیک‌ها در انتروباکتر از ۱۲۰ نمونه جدا شده.

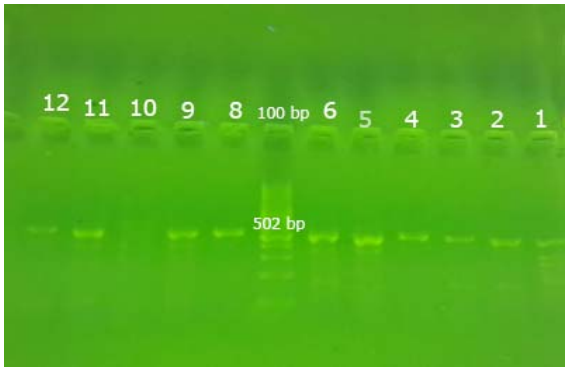


نمودار ۳. درصد مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیک‌ها در پروتئوس از ۱۲۰ نمونه جدا شده

ژن کد کننده TetA باندی حدود ۵۰۲ جفت باز (شکل ۱) ایجاد می‌کند. از ۱۲۰ نمونه مورد مطالعه، ۲۵ مورد دارای ژن TetA بودند که در انتروباکتر ۲ مورد (۱/۶۶درصد)، در پروتئوس ۵ مورد (۴/۱۶ درصد)، و در کلبسیلا ۱۸ مورد (۱۵ درصد) شناسایی شدند(نمودارهای ۴ و ۵). در کل، فراوانی ژن‌های مقاوم به tetA ۲۰/۸۳٪ بود.

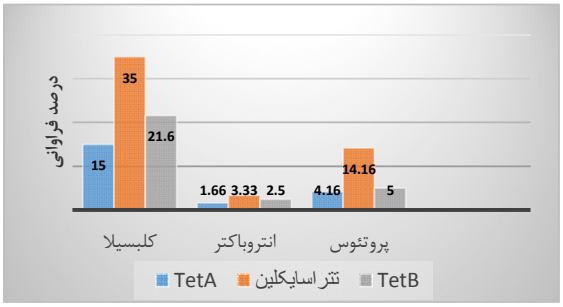
ژن کد کننده TetB باندی حدود ۲۰۶ جفت باز (شکل ۲) ایجاد می‌کند. از ۱۲۰ نمونه مورد مطالعه، ۳۶ مورد دارای ژن TetB بودند که در انتروباکتر ۳ مورد (۲/۵ درصد)، در پروتئوس ۶ مورد (۵ درصد)، و در کلبسیلا ۲۷ مورد (۲۲/۵

درصد) مشاهده شد(نمودارهای ۴ و ۵). در کل، فراوانی ژن های مقاوم به tetB ۳۰ درصد بود.همچنین نتایج نشان داد فقط در پروتئوس فنوتیپ و ژنوتیپ مقاومت به تتراسایکلین مشابه است (نمودار ۶).



شکل ۱. محل قرارگیری باند ژن TetA. Lane7: DNA Ladder، Lane9: 100bp Plus، Lane10: کنترل مثبت، Lane: کنترل منفی، Sample :1-6,8,11,12

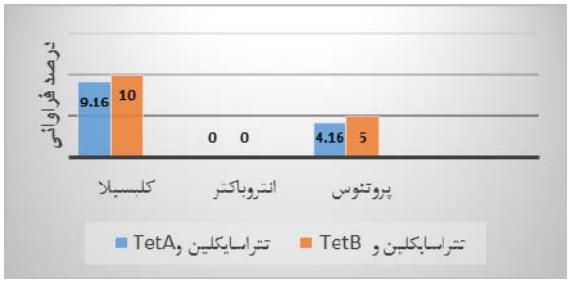
شکل ۲. محصول PCR محل قرارگیری باند ژن TetB. Lane 7: مارکر 100bp plus، Lane 6,8: کنترل مثبت، Lane 1: کنترل منفی، Lane 2-5,9-12: Sample.



نمودار ۴. مقایسه درصد TetA و TetB و مقاومت تتراسایکلین در ۱۲۰ باکتری.

بحث

سراج و همکارانش در سال ۱۳۸۱ دراهواز بر روی نمونه‌های کلبسیلا، انتروباکتر و پروتئوس جدا شده از نمونه های ادرار مطالعه‌ای انجام دادند و بر اساس نتایج آنها، کلبسیلا در زنان ۸۷/۱۴ درصد و در مردان ۸۷/۱۴ درصد، انتروباکتر در زنان ۱۰۰درصد و در مردان ۵۷/۹۸، پروتئوس در زنان ۵۰ درصد و در مردان ۵۰ درصد گزارش شد (۱۰). لنگری زاده و همکارانش، در فاصله زمانی یک ساله، از مجموع ۷۶۵۵ نمونه ادرار بررسی شده در شهر تبریز، ۷۲ مورد کلبسیلا پنومونیه ایزوله کردند. مقاومت آنتی بیوتیکی آنها با روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. بر اساس نتایج حاصل، میزان مقاومت ایزوله ها به شرح زیر بود: آموکسی سیلین ۹۱/۶۸٪، کوتریموکسازول ۹۵/۸۳٪، نیتروفورانتوئین ۹۴/۴۴٪، سفتازیدیم ۸۰/۵۵٪، جنتامایسین ۷۳/۶٪، تتراسایکلین ۷۲/۲۲٪، سیپروفلوکساسین ۴۳/۰۵٪، و ایمی‌پنم ۲۰/۸۳٪ (۱۱).



نمودار ۵. دارا بودن مقاومت تتراسایکلین وژن کدکننده TetA و TetB به طور همزمان.

نمودار ۶. مقایسه فنوتیپ و ژنوتیپ.

مولازاده و همکارانش، در سال ۱۳۹۲-۱۳۹۱ بر روی مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌های گرم منفی جدا شده از بیماران بستری مبتلا به عفونت مجاری ادراری در بخش‌های مختلف بیمارستان ولی عصر شهرستان فسا مطالعه‌ای انجام دادند. در

این مطالعه، از ۲۰۸۹۵ نمونه ارسالی، ۲۴۸۴ مورد کشت مثبت مشاهده شد، یعنی ۱۱/۸۸٪ باکتری‌های گرم منفی عامل عفونت ادراری بودند که از این میان، ۶۴/۶٪ اشرشیا کلی و ۲۳/۸٪ کلبسیلا بودند. درصد مقاومت پاتوژن‌های گرم منفی به تتراسایکلین در اشرشیا کلی ۶۲/۱٪، کلبسیلا ۶۸/۴٪، انتروباکتر ۴۰٪، پسودوموناس ۱۰۰٪، پروتئوس ۱۰۰٪، و پرووِیدنسیا ۱۰۰٪ گزارش شد (۱۲). قانع و همکارانش، بر روی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌های گرم منفی جدا شده از فاضلاب‌های بیمارستانی اسلامشهر مطالعه ای انجام دادند. از ۳۲۰ نمونه جدا شده، بیشترین فراوانی را باسیل های گرم منفی داشتند (باسیل های گرم منفی ۶۲/۵٪ و باسیل‌های گرم مثبت ۳۴/۴٪) که در این میان بیشترین باکتری جدا شده اشرشیا کلی بود. مقاومت آنتی بیوتیکی تتراسایکلین در بین آنتی‌بیوتیک های بررسی شده به این ترتیب گزارش شد: کلبسیلا پنومنیه ۴/۵۰٪، پروتئوس ولگاریس ۶۶/۵٪، اشرشیا کلی ۲۰/۶٪، و انتروباکتر ۶۰٪ (۱۳). سلطان دلال و همکارانش، در مطالعه‌ای که بر روی ۳۰۰ نمونه کلبسیلا از ۱۲۰۰ بیمار بستری شده در بیمارستان امام خمینی انجام دادند، تست حساسیت دارویی را با استفاده از روش دیسک گذاری برای ۱۲ آنتی‌بیوتیک انجام دادند. فراوانی گونه‌ها به این شرح گزارش شد: کلبسیلا پنمونیه ۹۴٪، اکسی توکا ۴٪، اوزنه ۱٪، و رینو اسکلروماتیس ۱٪. نمونه‌های جمع آوری شده به ترتیب فراوانی از ادرار، خلط، واژن، زخم، مدفوع و خون جدا شدند. به طور کلی، درصد مقاومت تمام گونه‌های کلبسیلا نسبت به آموکسی سیلین ۹۷٪، سفالوتین ۳۹٪، جنتامایسین ۳۰٪، کلیستین ۵۵٪، نالیدیکسیک اسید ۲٪، کلرامفنیکل ۲۶٪، کانامایسین ۱۷٪، تتراسایکلین ۲۸٪، نیتروفورانتوئین ۴۴٪، ایمی پنم و سفتازیدیم ۲٪ و آمیکاسین بدون مقاومت مشاهده شد (۱۴). واعظ و همکارانش، در مطالعه‌ای در زمینه عفونت‌های خونی بر روی ۱۲۹ نمونه کشت مثبت خون، بیشترین پاتوژن جدا شده از کشت خون را استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی (۳۴/۵٪) و اشرشیا کلی (۲۹/۵٪) و کمترین آن را پروتئوس ولگاریس (۱/۶٪) تشکیل می‌دادند. عفونت‌های ناشی از گرم منفی‌ها در این بیمارستان، ۱/۵ برابر گرم مثبت‌ها بود. بیش‌ترین مقاومت نسبت به پنی سیلین (۷۳/۶٪)، آمپی سیلین (۶۶/۶٪)، و تتراسایکلین (۵۸/۹٪) و بیشترین حساسیت نسبت به جنتامایسین (۶۸/۳٪) و ایمی پنم (۶۵/۹٪) مشاهده شد (۱۵). مشایخی و همکارانش، ۱۲۱ نمونه ادرار را از مبتلایان به عفونت ادراری بستری در بیمارستان بقیه الله تهران جدا کردند و میزان مقاومت آنتی بیوتیکی را بررسی کردند. از ۵۱ نمونه متعلق به پسران، ۱۹ نمونه و از میان ۷۰ نمونه متعلق به دختران، ۴۷ نمونه حاوی اشرشیاکلی بودند که مقاومت بالایی نسبت به آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین (۶۹/۶٪)، آمپی سیلین (۶۹/۶٪) و نورفلوکساسین (۶۳/۶٪) مشاهده شد. همین طور،حضور ژن‌های مقاومت نیز در آنها به روش PCR بررسی شد و فراوانی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین (TetA و TetB) ۸۳/۲ درصد بود (۱۶).کاراتولی و همکارانش، در سال ۲۰۰۱حدود ۹۳ و ۵۸ گونه سالمونلا SPP را به ترتیب از طیور و خوک جدا کردند. ۲۴ گونه سالمونلای ایزوله شده از طیور، همزمان به استرپتومایسین و تتراسایکلین مقاومت نشان دادند و ۲۳ گونه فقط به تتراسایکلین و ۱۱ گونه فقط به استرپتومایسین مقاوم بودند. از گونه‌های ایزوله شده از خوک، ۲۹ تا هم‌زمان به تتراسایکلین و استرپتومایسین مقاوم بودند. گونه‌های مقاوم سالمونلا به وسیله PCR برای حضور ژن‌های tetA, tetB, tetG و aadlA آنالیز شدند. در بین گونه‌های مقاوم به تتراسایکلین و استرپتومایسین ایزوله شده از طیور، ۱۰۰٪ برای ژن‌های tetA, tetB, tetG و aadlA منفی بودند. از گونه‌های مقاوم به تتراسایکلین ایزوله شده از خوک، ۱۸/۸٪ برای ژن tetA و ۳۲/۱٪ برای ژن tetB مثبت بودند و هیچ کدام برای ژن tetG مثبت نبودند (۱۷).

Rather و همکارانش، در سال ۲۰۱۲، باسیلوس سرئوس‌های موجود در غذا را جدا کردند و با استفاده از روش PCR ژن‌های تتراسایکلین (TetA و TetB) را مورد بررسی قرار دادند. مقاومت فنوتیپیک به تتراسایکلین در ۳۹ مورد از ۱۱۸ ایزوله غذایی مشاهده شد. در بین ایزوله‌های مقاوم فنوتیپیکی، ژن TetA در ۳۶ مورد از ایزوله‌های غذایی، و ژن TetB در ۱۲ ایزوله غذایی مشاهده شد (۱۸). سرشار و همکارانش، در سال ۱۳۸۹ از ۴۵۰ نمونه مدفوع جدا شده از کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال از بیمارستان‌های شیراز، تعداد ۷۷ ایزوله اشرشیا کلی جدا کردند. بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به تتراسایکلین (۸/۵۵٪) بود. در میان ایزوله-های مقاوم به تتراسایکلین، ۳۸ ایزوله (۴/۸۸٪) دارای ژن‌های Tet بودند که در ۳۳ سویه (۷/۷۶٪) ژن TetA، ۲۷ سویه (۷/۶۲٪) ژن TetB و ۶ سویه (۹/۱۳٪) ژن TetC تشخیص داده شد. Sandalli و همکارانش، در سال ۲۰۱۰، ژن‌های مقاوم به تتراسایکلین را در تعدادی از باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه مقاوم به تتراسایکلین مورد بررسی قرار دادند. در ۵۲ ایزوله انتروباکتر مقاوم به تتراسایکلین که از آب رودخانه در منطقه شمال شرق دریای سیاه ترکیه به دست آمد، ژن‌های TetA، TetB، TetC، TetD و TetE را مورد

ارزیابی قرار دادند. مقاومت توسط TetA در ۸ مورد (۱۵/۳٪) و TetB در ۱۰مورد (۱۹/۲٪) بود و تنها در یک مورد (۱/۹٪) از آنها هر دو ژن TetA و TetB یافت شد. ژن‌های TetC، TetD یا TetEدر نمونه‌های جدا شده وجود نداشت (۱۹). در مطالعه حاضر، از ۲۳۰ نمونه جمع آوری شده مبتلا به عفونت ادراری، ۱۲۰ نمونه (کلبسیلا، انتروباکتر و پروتئوس) جداسازی شد و مقاومت به تتراسایکلین در باکتری کلبسیلا (۳۶/۶۶٪، در باکتری انتروباکتر ۳۳/۳۳٪ و در باکتری پروتئوس ۱۴/۱۶٪ مشاهده شد. میزان مقاومت به تتراسایکلین با تفکیک جنسیت برای ایزوله های کلبسیلا در زنان ۳۲/۹۵٪ و در مردان ۱۷/۰۴٪، در باکتری انتروباکتر در زنان ۸/۳۳٪ و در مردان ۲۵٪ و در باکتری پروتئوس در زنان ۷۵٪ و در مردان ۱۵٪ مشاهده شد. ژن‌های مقاوم به tetA در انتروباکتر ۲ مورد (۱۶/۶درصد)، در پروتئوس ۵ مورد (۲۰ درصد)، در کلبسیلا ۱۸ مورد (۲۰/۴۵ درصد) بود. در کل ژن‌های مقاوم به tetA در ۲۰/۸۳ درصد موارد شناسایی شد. ژن‌های مقاوم به tetB در انتروباکتر ۳ مورد (۲۵ درصد)، در پروتئوس ۶ مورد (۳۰ درصد)، و در کلبسیلا ۲۷ مورد (۲۹/۵۴ درصد) مشاهده شد. در کل ژنهای مقاوم به tetB در ۳۰ درصد موارد شناسایی شد. از این مطالعه نتیجه گیری می‌شود که بیشترین تعداد باکتری جدا شده از عفونت ادراری کلبسیلا است و بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش را دارد. نتیجه کلی که می‌توان از این بررسی گرفت این است که ما در روش کربی بایر یا دیسک دیفیوژن، میزان بالاتری از مقاومت را شاهد هستیم، اما با گذاشتن PCR این مقدار کاهش چشمگیری پیدا کرده است. پس می توان گفت نمی‌توان فقط با دو ژن TetA و TetB به میزان مقاومت تتراسایکلین پی برد، بلکه به مطالعات وسیع‌تر و بررسی ژن‌های دیگر که در ایجاد مقاومت دخیل هستند نیاز است تا بتوان به یک جمع بندی نهایی رسید و باید بررسی کرد که کدامیک از ژن‌ها به نتایج فنوتیپی نزدیک‌تر است. همچنین از نظر وجود ژن TetAو TetB، بالاترین درصد ژن کد کننده مقاومت در باکتری کلبسیلا مشاهده شد و سپس پروتئوس و در نهایت انتروباکتر بودند. نتایج بدست آمده از مطالعات فنوتیپی و ژنوتیپی با یکدیگر یکسان نیستند، البته در مورد پروتئوس درصد مقاومت به تتراسایکلین و درصد مجموع TetA و TetB نزدیک به هم است، ولی در مورد دو باکتری دیگر صدق نمی‌کند. در پایان می‌توان نتیجه گرفت که تنها با دو ژن TetA و TetB نمی‌توان حساسیت و مقاومت به تتراسایکلین را تعیین کرد، بلکه باید ژن‌های دیگر مقاومت مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه پرسنل آزمایشگاه بیولوژی مولکولی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران که در انجام این پژوهش همکاری نمودند، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES

1. Hematti Y, ed. Pathogen bacteria in human. 1st ed. Tehran: Jahad Daneshgahi (Shahid Beheshti University) Co.; 1997. P:155-57. [in Persian]

2. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Mprse SA, Mietzner TA, eds. Medical microbiology. 25th ed. Philadelphia: The McGraw-Hill; 2010. P.219.

3. Garcia PG, Silva VL, Diniz C G. Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic Escherichia coli in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. J Microbiol 2011; 49: 46-52.

4. Gow SP, Waldner CL, Harel J, Boerlin P. Associations between antimicrobial resistance genes in fecal generic Escherichia coli isolates from cow-calf herds in Western Canada. App Environ Microb 2008;47:3658-66.

5. Dancer SJ, Shears P, Platt DJ. Isolation and characterization of coliforms from glacial ice and water in Canada's high arctic. J Appl Microbiol 1997;82:597-609.

6. Sanchez-Pescador R, Brown JT, Roberts M, Urdea MS. Homology of the TetM with translational elongation factors: implications for potential modes of tetM conferred tetracycline resistance. Nucleic Acids Res. 1988; 16: 1218.

7. Taylor DE, Chau A. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40:1-5.

8. Speer BSL, Bedzyk A, Salyers A. Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two Bacteroides transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase. J Bacteriol 1991;173:176-83.

9. Paulsen IT, Brown MH, Skurray RS. Proton-dependent multidrug efux systems. Microbiol Rev 1996;60:575-608.

10. Henriques IS, Fonseca F, Alves A, Saavedra MJ, Correia A.Tetracycline-resistance genes in gram-negative isolates from estuarine waters. Lett Appl Microbiol. 2008;47:526-33.

11. Saraj M S, Mowla K, Ghorbani A, Etemadi A, Cheraghy M, Mahmoodlo A, et al . Identification of outpatient urinary pathogens and antibiotic susceptibility pattern in Ahwaz, Iran 2002-2003. Yafteh 2005;6:41-47.

12. Langarizadeh N, Ahangarzadeh Rezaee M, Aghazadeh M, Hassani A. Comparison of Klebsiella pneumoniae with multiple drug-resistance outbreak in children and adults who visit medical and traning centres in Tabriz. Zanjan Biological Science Journal 2010;12:9-17.

13. Molazade A, Shahi A, Najafipour S, Mobasheri F, Norouzi F, Abdollahi Kheirabadi S, et al . Antibiotic resistance pattern of bacteria causing urinary tract infections in children of Fasa during the years 2012 and 2014. JFUMS 2015;4:493-99.

14. Soltan Dalal MM, Miremadi SA, Sharify Yazdi MK, Rastegar Lari AA,Rajabi Z, Avadis Yans S. Antimicrobial resistance trends of Klebsiella Spp. isolated from patients in Imam Khomeini Hospital. TUMJ 2011;6:275-81.

15. Vaez H, Khosravi S, Soleymani E. Antibiotic resistance pattern of common etiological agents of bloodstream infections isolated from patients. Iran J Med Microbiol 2012;5:52-8.

16. Mashayekhi F. Molecular characterization and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. Iran J Biotech 2014;12:32-40.

17. Rather MA, Aulakh RS, Gill JP, Mir AQ, Hassan MN. Detection and sequencing of plasmid encoded tetracycline resistance determinants (tetA and tetB) from food–borne Bacillus cereus isolates Asian Pac J Trop Med 2012;5:709-12.

18. Sandalli C, Sevim A, Ozgumus OB. Characterization of tetracycline resistance genes in tetracycline resistant Enterobacteriaceae obtained from a coliform collection. World J Microbiol Biotechnol 2010;26:2099-103.