مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری
دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
صفحات ۷۲- ۵۵

Online ISSN: ٤٤٩٣-٢٤٧٦
Print ISSN: ٢٠٢٠-٢٥٣٨
www.irijournals.com

ردیابی ژن‌های مقاومت آمینوگلیکوزیدی *AAC(3)-II-AAC(6)-I* در سویه‌های کلبسیلاپنومونیه جمع‌آوری شده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های شهر سمنان

فرحناز بینشیان [۱]، شیوا میر کلانتری [۲]، محبوبه طیاری [۳]

[۱] هیئت‌علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان

[۲] هیئت‌علمی دانشگاه ایران

[۳] کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

چکیده

کلبسیلا پنومونیه از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی کسب‌شده در جامعه می‌باشد. مقاومت چند دارویی در بین سویه کلبسیلا پنومونیه افزون می‌باشد. ازآنجایی‌که شیوع مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی به دلیل انتقال مقاومت در میان باکتری‌ها توسط عناصر قابل‌انتقال نظیر ترانسپوزون ها و پلاسمید ها است لذا ردیابی مسیرهای انتقال مقاومت در بین باکتری‌های مختلف بسیار مهم است. هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینو گلیکوزیدی با روش دیسک دیفیوژن و ردیابی ژن‌های مقاومت *AAC(3)II,AAC(6)I* با استفاده از روش *PCR* بود. درطی سال ۱۳۹۴-۱۳۹۵ تعداد ۸۰ سویه کلبسیلا پنومونیه از بیمارستان‌های شهر سمنان جمع‌آوری گردید. تست‌های بیوشیمیایی جهت تعیین هویت سویه‌ها انجام شده الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن تعیین گردید و روش *PCR* جهت ردیابی ژن‌های مقاومت انجام گردید. رنج سنی بیماران ۱۵ روز تا ۹۲ سال بوده که ۱۸/۲ درصد از بیماران مرد و ۶۲/۵ درصد زن بودند.۸۱/۸ درصد از سویه‌ها از ادرار و ۴/۵ درصد از خلط و ۱/۱ درصد از خون جداسازی شدند. تعداد ۳۰./۷ درصد از بیماران سرپایی و ۶۳/۶ درصد از بیماران بستری بودند. از بین سویه‌ها استرپتومایسین ۴۹ درصد و آزترونام ۴۸ درصد و سفتریاکسون ۴۷ درصد و کانامایسین ۳۴ درصد و ارتاپنم ۱۰ درصد و کلیستین ۲ درصد و نئومایسین ۲ درصد مقاوم بودند؛ و درصد همزمانی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به ترتیب نئومایسین ۱/۲۵ درصد، استرپتومایسین ۴۸/۷۵ درصد، کانامایسین ۳۳/۷۵ درصد، نئومایسین-استرپتومایسین ۴ درصد، استرپتومایسین – کانامایسین ۲۴ درصد، نئومایسین –کانامایسین ۵ درصد، نئومایسین –کانامایسین- استرپتومایسین ۱/۲۵ درصد مشاهده می‌شود. شیوع ژن *AAC(3)II* در بین سویه‌ها با

مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری
دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
صفحات ۷۲- ۵۵

Online ISSN: ٤٤٩٣-٢٤٧٦
Print ISSN: ٢٠٢٠-٢٥٣٨
www.irijournals.com

مقاومت چندگانه ۴۳/۷۵ درصد و شیوع ژن *AAC(6)I* با مقاومت چندگانه ۴۶/۲۵ درصد بودند. ژن‌های *(AAC(3)-II,AAC(6')-I)* شیوع بالایی در بین ایزوله‌ها داشتند که با تجویز مناسب آنتی‌بیوتیک می‌توان از شیوع مقاومت بیشتر جلوگیری نماید. استفاده از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی به‌طور هم‌زمان اطلاعات کاملی از مقاومت آمینو گلیکوزیدی در اختیار ما قرار داد.

واژه‌های کلیدی: کلبسیلاپنومونیه، ژن *AAC(3)-II*، ژن *AAC(6)- I*، مقاومت آمینو گلیکوزیدی

مقدمه

باکتری کلبسیلا پنومونیه یک باسیل گرم منفی روده ی و از اعضا خانواده انتروباکتریاسه می باشد و جزیی از میکروفلور طبیعی بدن انسان را تشکیل می دهد حدود یک سوم افراد سالم ناقل روده ای این میکروب هستند و امروزه به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب و یکی از مهم ترین باکتری‌های دخیل در عفونت‌های بیمارستانی مطرح می باشند (ندا سلیمانی و همکاران ۱۳۹۵).

باکتری‌ها برای زنده ماندن و ادامه حیات، با تغییر شرایط محیطی، خود را با شرایط جدید وفق می دهند. توانایی تغییر ژنتیکی در باکتری‌ها برای تکامل لازم است و از طریق سه مکانیسم اتفاق می افتد. مکانیسم اول *microevolutionary* نام دارد که درواقع جهش نقطه ای است که درحد تغییر یک جفت نوکلئوتید است، دومین مکانیسم *macroevolutionary* است که بازآرایی بخش های زیادی از *DNA* است و سومین مکانیسم کسب *DNA* خارجی از طریق پلاسمید، باکتریوفاژ، زنجیره منفرد از *DNA* و قطعات ژنتیکی با قابلیت جابه جا شدن از باکتری‌های دیگر می باشد (*Mandell GL,2010*).

عفونت‌های برونشی- ریوی به ویژه پنومونی ناشی از کلبسیلا پنومونیه خطرناک بوده بیشتر در افراد ضعیف و ناتوان و افراد دایم الخمر دیده می شود. خلط بسیار لزج بوده ودارای رنگ آجری است. سویه‌های کلبسیلا گاهی اوقات در انسان سبب برونکوپنومونی شدید و جراحات مزمن تخریب کننده همراه با ایجاد آبسه های چندگانه و متعدد در ریه ها می شود. چنین جراحاتی معمولا در ارتباط با تیپ های ۱-۵ کپسولی می باشد. به عنوان یک پاتوژن در انسان به خاطر ایجاد عفونت در بیماران بستری در بیمارستان مطرح می باشد. سپسیس در اثر زخم های متعاقب عمل جراحی رخ داده و باعث مرگ شماری از بیماران می شود (*podshchun r,u11mam 1998*).

باکتری‌ها برای زنده ماندن و ادامه حیات، با تغییر شرایط محیطی، خود را با شرایط جدید وفق می دهند. توانایی تغییر ژنتیکی در باکتری‌ها برای تکامل لازم است و از طریق سه مکانیسم اتفاق می افتد. مکانیسم اول *microevolutionary* نام دارد که درواقع جهش نقطه ای است که درحد تغییر یک جفت نوکلئوتید است، دومین مکانیسم *macroevolutionary* است که بازآرایی بخش های زیادی از *DNA* است و سومین مکانیسم کسب *DNA* خارجی از طریق پلاسمید، باکتریوفاژ، زنجیره منفرد از *DNA* و قطعات ژنتیکی با قابلیت جابه جا شدن از باکتری‌های دیگر می باشد (*Mandell GL,2010*).

انتقال پلاسمید بین بیماران و در بین باکتری‌های یک بیمار منجر به انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی می شود. مطالعه انجام شده در سال ۱۹۸۱ نشان داد شیوع یک پلاسمید در ۹ بیمار، از دو بیمارستان مختلف، که مبتلا به گونه های متفاوت انتروباکتریاسه مقاوم به جنتامایسین بودند، یکسان بود (*Knight S, 1981*).

مطالعه دیگر که در سال ۲۰۰۹ انجام شد نشان داد که از نمونه های بالینی یک بیمار در دوره ای ۵ ماهه ۳ گونه از خانواده انتروباکتریاسه جداسازی شد، که هر ۳ گونه دارای قطعات یکسان پلاسمیدی برای یک آنزیم محدود کننده خاص بود (*Sidjabat HE, 2009*).

اولین پژوهش ها روی باسیل های این گروه به تحقیقات کلبس دانشمند آلمانی درسال ۱۸۸۰ برمیگردد. این دانشمند باکتری را در ریه بیمارانی که از پنومونی درگذشته بودند مشاهده کردند از سال ۱۸۸۳ تا ۱۸۸۶ تحقیقات تالامون و فرانکل اجازه دادکه این میکروب از پنوموکک مجزا شود زیرا در اوایل غالبا باسیل فراندر و پنوموکک یک میکروب به حساب می آمد (*kimsy,parkyj,yujk,kimhs 2007*). از خصوصیات کلنی باکتری که به تشخیص بسیار کمک می کند موکوییدی بودن کلنی ها است. این کلنی ها در محیط های گلوکز دار بزرگتر می باشد (*PODSCHUN R,U11MAM U 1998*)کلبسیلا

بی حرکت، اندول منفی، متیل رد منفی، وژس پروسکوئر مثبت، سیترات مثبت، اوره از مثبت، گاز منفی، لیزین دکربوکسیلاز مثبت، لیپاز منفی، و تخمیرکننده اکثر قندها همراه با ایجاد گاز و مصرف سیمون سیترات و مالونات به عنوان تنها منبع کربن می باشد (*Podchun r,u11mam u 1998*) .

عفونت‌های برونشی- ریوی به ویژه پنومونی ناشی از کلبسیلا پنومونیه خطرناک بوده بیشتر در افراد ضعیف و ناتوان و افراد دایم الخمر دیده می شود. خلط بسیار لزج بوده ودارای رنگ آجری است. سویه‌های کلبسیلا گاهی اوقات در انسان سبب برونکوپنومونی شدید و جراحات مزمن تخریب کننده همراه با ایجاد آبسه های چندگانه و متعدد در ریه ها می شود. چنین جراحاتی معمولا در ارتباط با تیپ های ۱-۵ کپسولی می باشد. به عنوان یک پاتوژن در انسان به خاطر ایجاد عفونت در بیماران بستری در بیمارستان مطرح می باشد. سپسیس در اثر زخم های متعاقب عمل جراحی رخ داده و باعث مرگ شماری از بیماران می شود (*podshchun r,u11mam 1998*). کلونیزاسیون در دستگاه تنفسی بسیار متداول عفونت‌های ادراری ناشی از این باکتری پس از استفاده از سوند ادراری گزارش شده است. عفونت‌های عمومی –سپتی سمی است و باکتریمی ناشی از کلبسیلا ممکن است باعث ایجاد شوک سمی شده و در این گونه موارد میزان مرگ و میر زیاد می شود. مننژیت ناشی از این باکتری اغلب به دنبال تروما و برخی از کلبسیلا پنومونیه باعث بیماری های سپتیک متنوعی در حیوانات می شوند تیپ های ۱ و ۲ معمولا برای موش زمانی که به صورت داخل صفاق تزریق می گردد بیماری زا بوده در حالی که سایر تیپ ها به‌طور کلی برای موش ها یا ویرولانس نیستند یا ویرولانس کمی دارند بعد از تزریق زیرجلدی دوز پایین از یک سویه دارای ویرولانس به موش ها حیوانات ظرف ۱۲ تا ۷۲ ساعت می میرند در بررسی پس از مرگ وجود اگزوما در محل غده لنفاوی متورم و طحال بزرگ شده قابل رویت بوده و باسیل های کپسول دار در خون و احشا دیده می شود (حقیقی ل.باکتری روده ی، ۱۳۸۳).

آمینوگلیکوزیدها:

ژن aac(3), aac(6):

ترکیب یک آمینوگلیکوزید با یک عامل ضد دیواره مانند بتالاکتام یا گلیکوپپتیدها ایجاد اثر هم افزایی روی جدایه های حساس نموده و می‌تواند در درمان عفونت ها موثر باشد مقاومت اکتسابی به آمینوگلیکوزیدها هم در باکتری‌های گرم منفی و هم در باکتری‌های گرم مثبت گزارش شده است. سه مکانیسم مقاومت شامل در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو و کاهش در نفوذپذیری دارو و غیرفعال سازی آنزیماتیک دارو و مسئول مقاومت به آمینوگلیکوزیدها است (*Minegeot*و همکاران، ۱۹۹۹). از این بین غیرفعال سازی آنزیماتیک آمینوگلیکوزیدها توسط آنزیم های تغییر دهنده آن ها اصلی ترین مکانسیم مقاومت به این داروها در باکتری‌های گرم منفی است. سویه‌های مقاوم توانایی تغییر در ساختار بیوشیمیایی آمینوگلیکوزید را توسط آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها *AME* دارا هستند سویه‌های تولید کننده *AMEs* اثر هم افزایی بین آمینوگلیکوزیدها و عوامل ضد دیواره ای گوناگون را از بین می برند (*murreay be* و همکاران، ۱۹۹۹).

اپیدمیولوژی باکتری‌ها:

انتروباکتریاسه:

انتروباکتریاسه شامل گروه بزرگی از باکتری‌ها می باشند که به‌طور وسیع در طبیعت پراکنده هستند. این باکتری‌ها در روده انسان و حیوانات، خاک، آب، میوه، گیاهان و غیره وجود دارند. به دلیل زندگی آن ها در روده انسان و حیوانات به باسیل های انتریک یا روده ای معروفند. اکثر انتروباکتریاسه ها به‌طور طبیعی در دستگاه گوارش وجود دارند و به عنوان پاتوژن فرصت طلب عمل می کنند(*Adibfar P, 2001*) .پاتوژن‌های فرصت طلب واجد فاکتورهای ویرولانس قوی بوده که عفونت‌های جدی ایجاد می کنند. در بین این گروه پاتوژن‌های مهم انسان مانند *کلبسیلا* وجود دارد که ایجاد عفونت می کند (*Forbes BA, 2007*) این باکتری‌ها باسیل گرم منفی با قطر حدود ۰/۵ تا ۲ میکرومتر و طول ۲ تا ۴ میکرومتر، بی هوازی اختیاری اند که در شرایط بی هوازی گلوکز را تخمیر کرده، سیتوکروم اکسیداز منفی بوده، نیترات را به نیتریت احیا می کنند هنگامی که متحرک اند(*Walker T.S,1390*).

کلبسیلا:

یک باسیل بی هوازی اختیاری و یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه است؛ که ساکن روده انسان و حیوانات می باشد به خوبی روی محیط های ساده رشد می کند، متحرک بوده و دارای فلاژل پری تریش می باشد. لاکتوز را تخمیر می کند و حالت موکوییدی روی محیط می دهد. این باکتری دارای فعالیت لیزین دکربوکسیلاز بوده و می‌تواند استات را به عنوان تنها منبع کربن استفاده نماید. همچنین قادر به هیدرولیز تریپتوفان و تولید اندول می باشد. باکتری *klebsiella* نام آن از اسم *EdvinKlebs* میکروبیولوژیست آلمانی در قرن ۱۹ گرفته شده است. امروزه این باکتری بهترین سویه مورد استفاده در مطالعات علمی است.

*با*سیل گرم منفی فاقد اسپور می باشد. قطری در حدود ۰/۵ میکرومتر و ۱ تا ۳ میکرومتر طول دارد. برخی دارای کپسول لایه لعابی است، اکثر آنها متحرک بوده و دارای فلاژل های پری تریش هستند. اکثر آنها دارای پیلی هستند، که دارای قدرت هماگلوتیناسیون بوده و در دو نوع حساس به مانوز(تیپ ۱) و مقاوم به مانوز(تیپ ۲) می باشند. پیلی تیپ ۱ وجود دارد. وجود پیلی در بیماری زایی باکتری نقش دارد، بدین صورت که در اتصال باکتری به سطوح مخاطی و اپیتلیال مجاری ادرار دخالت دارد.

سلول باکتری مانند سایر سلول های زنده از سه قسمت اصلی، پوشش سلولی، سیتوپلاسم و هسته تشکیل شده اند. در بعضی از باکتری‌ها ممکن است ضمائمی از فلاژل، کپسول و پیلی نیز وجود داشته باشد. پوشش باکتری‌ها از دیواره سلولی و غشاء سیتوپلاسمی تشکیل شده است. اطراف برخی از باکتری‌های کپسول دار و بدون کپسول لایه ژلاتینی از جنس پلی ساکارید وجود دارد که لایه لعابی نامیده می شود(*Adibfar P,2001*).

ساختمان مخصوص دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی:

این ساختمان از لحاظ فیزیکی و شیمیایی به مراتب پیچیده تر از باکتری‌های گرم مثبت است و از لیپید، پروتئین و پلی ساکارید ساخته شده است. در این ساختمان اسیدهای تیکوئیک وجود ندارد. ساختمان مخصوص در این باکتری‌ها شامل سه لایه می شود که در خارج لایه موکوپپتید قرار دارند و عبارتند از:

۱- لایه لیپوپروتئین:

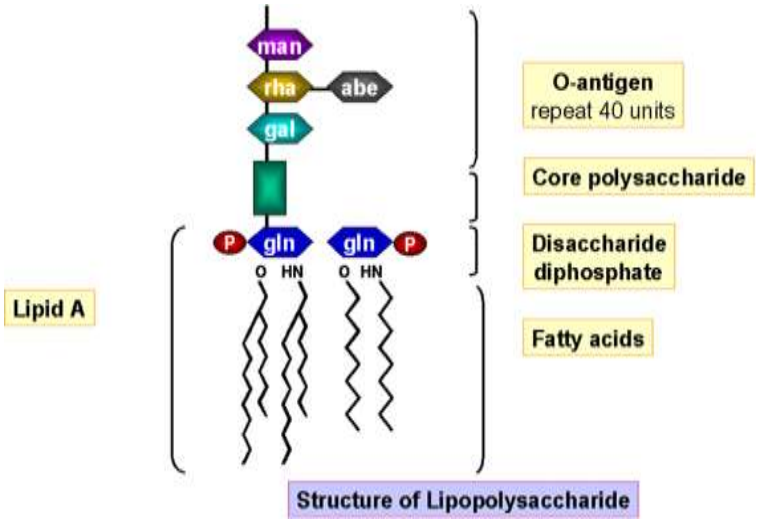
که موکوپپتید را به غشای خارجی متصل می کند *(Adibfar P,2001)*.

۲- غشای خارجی[1]:

غشای خارجی مانند غشای سیتوپلاسمی به صورت سه لایه است و ماده اصلی تشکیل دهنده آن فسفولیپید است. این ساختار فعالیت های محیطی باکتری‌های گرم منفی را کنترل می کند، به عنوان مثال دسترسی بعضی از مولکول ها را به دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی محدود می نماید و تنها به مولکول هایی اجازه ورود به سلول می دهد که قدرت عبور از کانال های غشای خارجی را داشته باشند. همچنین این غشاء دارای گیرنده هایی است که چسبیدن باکتری به سطح سلول میزبان را تحت تأثیر قرار می دهد. علاوه بر این، باکتری را در برابر عمل فاگوسیتوز نیز محافظت می کند.

۳- لیپوپلی ساکارید[2]:

سه ناحیه متمایز از یکدیگر در *LPS* وجود دارد (شکل ۱-۱)، این نواحی به نام های آنتی ژن *O*، ناحیه میانی و لیپید *A* خوانده می شود *(Walker T.S,2011)*.



شکل ۱-ساختمان *LPS*

محصولات باکتریایی موثر در ویرولانس:

۱- ادهزین ها:

پیلی از مهمترین فاکتورهای ویرولانس کلبسیلا است، زیرا باعث اتصال کلبسیلا به مخاط می گردد. بیش از ۸۰٪ گونه های کلبسیلا که به عنوان عامل پیلونفریت شناخته شده اند، دارای فیمبریه *P* هستند که به گلیکولیپیدهایی که حاوی واحدهای دی ساکاریدی گالاکتوز باشند، متصل می شود.

[1]-*Outer membrane*
[2] - *LPS*

۲- کپسول:

کپسول موجود در کلبسیلا پلی ساکاریدی است که تمام سطح سلول را می پوشانند و مقاومت باکتری را بر علیه بسیاری از مکانیسم های دفاعی میزبان فراهم می کند کپسول خارج سلولی برای بیماری زایی ضروری است.

۳- پیلی یا فیمبریه:

فمبریه برامدگی روی سطح باکتری هستند که عامل چسبیدن ارگانیسم به دستگاه تنفسی - دستگاه معدی –روده ی و سلول های موکوزی سیستم ادراری است.

۴- سیدرفورها:

بسیاری از باکتری‌ها برای به دست اوردن آهن مورد نیازشان در بدن میزبان مواد شلاته کننده آهن با وزن مولکولی پایین و افینیتی بالا به نام سیدروفورها را ترشح می کنند که قادرست به شکل رقابتی آهن متصل به پروتیین را جذب می نماید سیدروفورها شامل دوگروه انتروباکتین و ایروباکتین است.

۵-توکسین ها:

سوش های تولید کننده ی انتروتوکسین از بیماران مبتلا به نواحی گرمسیری جدا شدند. این توکسین مشابه با توکسین های LTو ST در اشرشیاکلی است. در سوش های کلبسیلا پنومونیه تولید انتروتوکسین وابسته به پلاسمید است.

پاتوژنز عفونت‌های فرصت طلب:

ارگانیسم های کلبسیلا به تعداد زیاد در روده هر انسانی یافت می شوند و از طریق آلودگی های مدفوعی پخش می شوند. مطالعات نشان داده است که در بیماران بستری شده، به دنبال افزایش پروسه های تهاجمی، شیوع عفونت ها کلبسیلا پنومونیه هم افزایش می یابد. به عنوان مثال در بیماران ضعیف و ناتوان به‌طور روتین از طریق دست آلوده به کلبسیلا پنومونیه با وسایلی مثل کاتتر آلوده می شوند. در بین فاکتورهای خطر برای توسعه مننژیت ناشی از کلبسیلا پنومونیه در نوزادان می‌توان زایمان تروماتیک، تولد نارس، کاهش وزن هنگام تولد و استفاده از وسایل آلوده به کلبسیلا پنومونیه درطی زایمان را نام برد *(Walker T.S,2011)*.

پاتوژنز بیماری:

عفونت‌های مجاری ادراری و تنفسی کلبسیلا پنومونیه کسب‌شده از جامعه به‌طور کلی به وسیله عفونت‌های خودی ایجاد می شوند واغلب موارد در خانم ها اتفاق می افتد*(Walker T.S,2011)* .

خواص بیوشیمیک:

کلبسیلا گلوکز و اکثر قندها را تجزیه کرده و ایجاد گاز می کند. این باکتری اندول منفی به جز اکسی توکا مثبت، *MR* منفی، *VP* مثبت، سیترات مثبت، *H2S* مثبت، اوره مثبت، حرکت منفی، لاکتوز مثبت و اکسیداز مثبت می باشد. برخی از آنها لاکتوز را به کندی یا اصلاً تخمیر نمی کنند *(Adibfar P,2011)*

اپیدمیولوژی:

چند ساعت بعد از تولد، باکتری‌های گروه کلی فرم در روده جایگزین و مستقر می گردند. تا موقعی که این باکتری‌ها در روده باشند ناراحتی ایجاد نمی کنند ولی به محض ورود به نقاط دیگر بدن ایجاد عفونت می کنند. سرایت از راه گرد و خاک و هوای آلوده بیمارستان نیز امکان دارد. درحال حاضر باکتری‌های کلی فرم مسئله بزرگی را در رابطه با عفونت‌های بیمارستانی ایجاد نموده اند. باید درنظر داشت که اکثر این باکتری‌ها به عنوان فرصت طلب عمل نموده و تنها هنگامی قادر به ایجاد بیماری هستند که به دلایلی فرصت مناسب برای آنها پدید آید. در بیمارستان ها این باکتری‌ها توسط پرسنل، وسایل، ابزار تزریقات و غیره منتقل می گردند. به همین جهت برای پیشگیری، رعایت کامل بهداشت، از قبیل شستشوی دست قبل از عمل به صورت کامل و دقیق، دقت در استریل نمودن وسایل، به کار گرفتن روش های صحیح ضدعفونی و غیره ضروری می باشد.

تشخیص:

جهت جدا کردن *klebsiella* از نمونه های بالینی مختلف مانند ادرار، خون، زخم، خلط، مایعات بدن و غیره نمونه برداری انجام شده و به آزمایشگاه ارسال می گردد.

آزمایش مستقیم:

پس از تهیه گسترش و رنگ آمیزی گرم نمونه را زیر میکروسکوپ از نظر خصوصیات کلی باسیل مورد بررسی قرار می دهیم.

کشت:

جهت کشت از محیط های مختلف مانند بلادآگار و محیط های افتراقی مانند مک کانکی آگار و ائوزین متیلن بلو آگار و غیره استفاده می شود. این باکتری به علت تخمیر قند لاکتوز و تولید اسید فراوان کلنی با رنگ صورتی موکوییدی بر روی محیط ائوزین متیلن بلو ایجاد می کند. باکتری‌های جدا شده را باید از روی خصوصیات بیوشیمیایی و سرولوژیکی مورد شناسایی قطعی قرار داد *(Adibfar P,2001)*.

آنتی‌بیوتیک ها

یکی از مهمترین پیشرفت های قرن بیستم، کشف آنتی‌بیوتیک ها بود. گرچه درمان های اولیه با برخی از داروهای ضد میکروبی شیمیایی تا حدودی موثر بود، لیکن کاربرد آنها عموماً محدود به بیماری های اندکی می شد.

آنتی‌بیوتیک‌های باکتریوسیدال باکتری‌های را می کشند، اما باکتریواستاتیک ها تنها سبب متوقف شدن رشد باکتری‌ها می گردند. به صورت ایده آل تمامی آنتی‌بیوتیک ها باید کشنده باشند، لیکن ثابت شده است که آنتی‌بیوتیک‌های بازدارنده رشد نیز تا حدود زیادی مفید می باشند، زیرا متوقف کردن رشد، زمان و فرصت لازم را برای از بین بردن عوامل عفونی در اختیار سیستم ایمنی قرار می دهد*(Walker T.S,2011)*.

آنتی‌بیوتیک ها دارای ۴ دسته اصلی براساس مکانیسم عمل می باشند:

۱- آنتی‌بیوتیک‌هایی که روی پوشش سلولی موثرند.

۲- آنتی‌بیوتیک‌هایی که از ساخته شدن پروتئین ها ممانعت به عمل می آورند.

۳- آنتی‌بیوتیک‌هایی که روی سنتز و ساختمان اسیدهای نوکلئیک موثرند.

۴- آنتی متابولیت ها.

به‌طور معمول آنتی‌بیوتیک‌های گروه اول و سوم باکتریوسیدال بوده، در گروه دوم آنتی‌بیوتیک‌های بازدارنده و یا کشنده جای گرفته و گروه چهارم آنتی‌بیوتیک‌های بازدارنده رشد می باشند*(Walker T.S,2011)*.

آنتی‌بیوتیک‌های مهارکننده سنتز دیواره سلولی:

بدون تردید، آنتی‌بیوتیک‌هایی که برسنتز دیواره سلولی تأثیر می گذارند از مهمترین آنتی‌بیوتیک ها می باشند. این آنتی‌بیوتیک ها شامل آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام (کارباپنم ها، سفالوسپورین ها، سفامایسین ها، مونوباکتام ها و پنی سیلین ها)، آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی تئیکوپلانین و وانکومایسین، باسیتراسین و سیکلوسرین می باشند. در ساخته شدن دیواره سلولی، واحدهای دی ساکاریدی ان- استیل گلوکز آمین و ان- استیل مورامیک اسید *(GlcNAc-MurNAc)* به مولکول حامل لیپیدی باکتوپرونول درغشای سیتوپلاسمی متصل می گردند. برای جایگزین شدن دی ساکاریدهای جدید در دیواره سلولی، آنزیم های اتولیتیک وارد عمل شده و دیواره سلولی را در نواحی خاصی باز می کنند. باکتوپرونول، قطعه *GlcNAc-MurNAc* را به ناحیه رشد در پپتیدوگلیکان منتقل می کند. در مرحله بعد آنزیم های ترانس پپتیداز تقاطع عرضی بین پپتیدهای *GlcNAc-MurNAc* جدید و *GlcNAc-MurNAc* موجود در دیواره را ایجاد می کنند. در همین حال، لیپید حامل باکتوپرونول دوفسفاته، یک فسفات خود را ازدست داده و به صورت مونوفسفات در می آید که درنتیجه قادر به دریافت و انتقال یک واحد جدید از *GlcNAc-MurNAc* می گردد.

PCR[۳]:

سال ها پیش در سال ۱۹۷۱، *Khorana*و همکارانش، روشی را برای همانند سازی یک ناحیه از *DNA* دو رشته ای، با استفاده از دو پرایمر که انتهای *3´* آنها به سمت یکدیگر طراحی شده بود، گزارش کردند.

ایده استفاده از این خاصیت به صورت چرخه های تکراری در یک واکنش تکثیر، تا ۱۲ سال بعد طول کشید. این روش توسط *KaryMull s* یکی از محققین شرکت *Cetus* کشف شد و اولین آزمایش های عملی در این شرکت انجام شد(*Karimi M,1383*). *PCR* از نظر اصولی تشابه زیادی به همانندسازی *DNA* و درواقع برگرفته از آن است. در این تکنیک اصول همانندسازی *DNA* در داخل سلول تقلید و تکرار می شود.

این تکنیک، تمام مشکلات پیشین در بیولوژی مولکولی را که ناشی از عدم دسترسی به مقادیر زیاد *DNA* یکسان بود، را برطرف کرد. تکنیک *PCR*، شامل سیکل های تکرار شونده ای است که درآن به کمک یک سری پرایمر و با کمک آنزیم از روی یک *DNA* الگو، همانندسازی انجام می گیرد. این پرایمرها، مکمل بخش هایی از دو رشته *DNA* هدف هستند. پرایمرها زمانی که دو رشته به وسیله حرارت واسرشته شود، با کاهش دما در مرحله بعد، به توالی های خاص مکمل خود می چسبند.

[3]-*Polymerase Chain Reaction*

برای شکستن هر باند $A=T$، ۲°C و برای شکستن هر باند، $G=C$ ۴°C حرارت لازم است که به آن در اصطلاح دمای ذوب TM[۴] گویند. دو رشته DNA از هم باز می شوند و چون غلظت پرایمر به قدر کافی است، وصل شدن پرایمر به مکملش انرژی خواه نیست و به راحتی به مکمل های خود متصل می شود.

مزایای PCR:

یکی از مزایای بزرگ PCR، توانایی آن در تکثیر یک ناحیه مشخص DNA از یک الگوی اولیه بسیار پیچیده مانند DNA ژنومی می باشد. این تکنیک یک وسیله بسیار منعطف در تحقیقات علمی می باشد و تمامی آزمایشگاه های تحقیقاتی زیست شناسی PCR را بصورت روزمره بکار می برند(*Karimi M,2004*).

سابقه پژوهش

-در سال ۲۰۰۱ *josephw.chow* و همکاران تعداد ۲۵۰ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه جداشده از نمونه های بیمارستان‌های ایالت غربی آمریکا جمع‌آوری نمودند. در بررسی ژن که ۵۶ درصد آن *AAC (6)* گزارش گردید.

۲- در سال ۲۰۰۱ *TAKASHIIDA* و همکاران از ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه و *Ecoli* جمع‌آوری شده از بیماران بیمارستان‌های ژاپن که مقاومت به توبرامایسین و جنتامایسین داشتند ۸,۹ درصد آن دارای ژن *AAC(6)* گزارش شدو ۹۷ در صد آن ها دارای مقاومت آمینوگلیکوزیدی می باشد.

۳- در سال ۲۰۰۶ *SOHINAKRARI* و همکاران ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه جدا شده از ۱۱ بیمارستان تونس که در برابر کارباپنم مقاوم بودند را بررسی کردند.

۴- در سال ۲۰۰۹ *Ling mia* و همکاران تعداد ۲۳۵ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه از نمونه های مقاوم بیمارستان تایوان جمع‌آوری نمودند از نمونه های مقاوم که ۴۳ درصد آن به آمیکاسین مقاوم بودند. در بررسی ژن *aac*۵۶ درصد گزارش شد.

۵-در سال ۲۰۱۰ *Bhattacharjee* و همکاران تعداد ۱۳۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه از نمونه های مقاوم جمع‌آوری شده از بیماران بیمارستان‌های ترکیه را از نظر وجود *ESBL* مورد بررسی قرار دادند؛ که ژن *aac6* و *aac3*. گزارش شد.

۶- در سال ۲۰۱۱ *farzam karimi* و همکاران از ۲۵۰ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه جمع‌آوری شده از بیماران بیمارستان‌های ایران را مورد بررسی قرار دادندکه مقاومت آنتی‌بیوتیکی جنتامایسین ۴۳ درصد و آمیکاسین ۳۸ درصد می باشد از ژن مورد بررسی شده ۳۶ درصد *AAC(6)* گزارش شد.

۷- در سال ۲۰۱۲ *Tomae kito* و همکاران از ۱۴۴ نمونه بالینی از بیماران بیمارستان ژاپن ۸۹ ایزوله دارای ژن *AAC(6)* یافت شد.

۸- در سال ۲۰۱۲ *Bamidele ,tolu* و همکاران تعداد ۵۴ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه و اشرشیا کلی از نمونه های مقاوم بیمارستان جنوب غربی نیاگارا مورد بررسی قرار گرفت که ۱۰,۵۴ درصد دارای ژن *AAC(6)* و ۱۸,۵ درصد دارای ژن *AAC (3)* یافت شد.

۹- در سال ۲۰۱۲ *U.OVER* و همکاران تعد اد ۶۹۶ ایزوله بالینی کلبسیلا و اشرشیا کلی جمع‌آوری شده از نمونه های بیماران بیمارستان‌های ترکیه که در بررسی ژن ۱۶,۶ درصد , *AAC(6)* و ۲۹,۳ در صد آن *AAC(3)* گزارش گردید.

[4] *Temperature Melting*

۱۰- در سال ۲۰۱۳ *BJQrgc.haldorsen* و همکاران در میان ایزوله‌های اشرشیا کلی در بیمارستان‌های نروژ افزایش شیوع مقاومت سفالوسپورین دیده شد. ژن *AAC(6)* و *AAC(3)* در ایزوله‌ها یافت شد.

۱۱- در سال ۲۰۱۳ *KETH D.GREEN* و همکاران تعداد ۲۴۵ ایزوله بالینی از بیمارستان‌های سطح شهر میشیگان جمع‌آوری شده ۴۰ در صد از *AAC(6)* گزارش گردید.

۱۲- در سال ۲۰۱۴ *Xinyingxae* و همکاران از ۲۹۹ سویه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه جمع‌آوری شده از مراکز بیمارستان‌های ترکیه ۱۴,۴ درصد دارای ژن *AAC(6)* گزارش گردید.

۱۳- در سال ۲۰۱۴ *Lunie* و همکاران از ۱۳۷ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه در بیمارستان‌های شهر بومانی. جمع‌آوری شده که ژن *AAC(3)* ۷۸ درصد گزارش گردید..

۱۴- در سال ۲۰۱۴ شهین نجار پیرایه و همکاران از ۷۲ ایزوله بالینی جدا شده ازکلبسیلا پنومونیه جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های تهران ۴۲,۵ درصد دارای *AAC(6)* و ۳۵۰۱ درصد *AAC(3)* می باشد.۷۱ درصد دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی می باشد.

۱۵- در سال ۲۰۱۴ سیدمحسن سیدپور و همکاران از ۷۹ سویه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری دربیمارستان کرج ۵۰ درصد آن دارای ژن *AAC(6)* گزارش گردید.

۱۶- در سال ۲۰۱۵ *caigianling* و همکاران از ۱۶۲ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه در بیمارستان‌های چین با استفاده از روش کربی –بایر دیسک دیفیوژن و تعیین توالی مورد بررسی قرار گرفت به‌طور کلی ۴۷,۵ درصد از ایزوله‌ها دارای *ESBL* هستند که ۱۱,۱ درصد آن *AAC(3)* و ۶,۳ درصد آن *AAC(6)* گزارش گردید..

۱۷- در سال ۲۰۱۶ *PAK.LENGO* و همکاران از ۱۸۸ ایزوله بالینی اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه از نمونه خون بیمارستان‌های هنگ کنگ جمع‌آوری نمودند به‌طور کلی ۹۱ درصد آن ژن *AAC(6)* و ۱۲,۲ درصد *AAC(3)* را گزارش گردید /.

۱۸ - در سال ۱۳۹۰ جلال پورشیلا و همکاران تعداد ۲۵۰ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه از بیماران بستری و سرپایی بیمارستان‌های تهران جمع‌آوری گردید از این تعداد به ترتیب ۶۴ درصد و ۲۲ درصد و ۹۰ درصد و ۶۵ درصد و ۷۸ درصد براساس نتایج انتی بیوگرام در برابرآمپی سیلین. سفتازیدیم. سفوتاکسیم. سفپیم. امیکاسین. مقاومند. گزارشی از ژن *aac6* و *aac3* دیده نشد.

۱۹- در سال ۱۳۹۴ شهرزاد توانانیا و همکاران تعداد ۱۰۰ ایزوله بالینی اشرشیاکلی جمع‌آوری شده از بیماران بستری و سرپایی جمعآوری شده از بیمارستان‌های اصفهان که ۹۵,۷ درصد آن به کلیندامایسین و ۹۴,۷ درصد به لینکومایسین و ۹۳,۵ به ریفامپین و ۲۸,۱ درصد به استرپتومایسین و ۲۷ درصد به جنتامایسین و ۷,۴ درصد یه کاناماسین مقاومند. مقاومت‌های چندگانه آمینوگلیکوزیدی را شامل می شود.

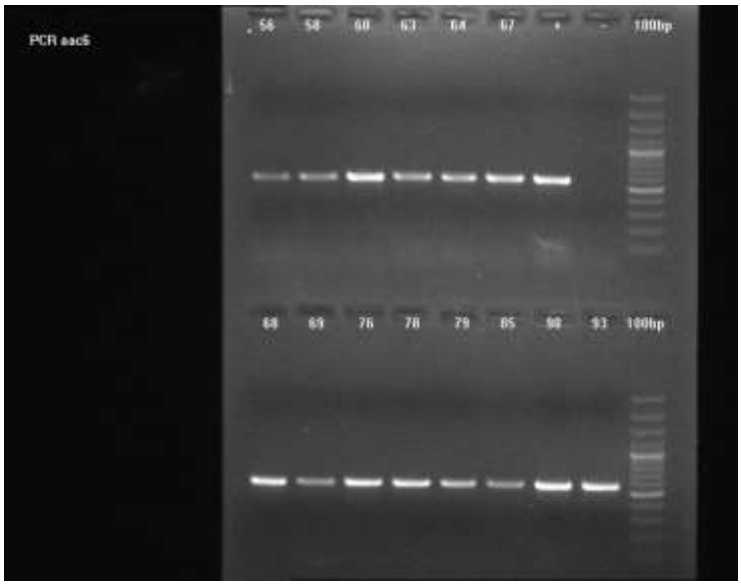
روش کار:

این مطالعه به صورت توصیفی- تحلیلی بوده که طی سال های ۹۴ و ۹۵ انجام شده است. جامعه مورد مطالعه در این تحقیق، از میان کلیه بیماران بستری بخش های بالینی و مراجعین سرپایی مبتلا به عفونت انتخاب شد. مکان مطالعه بیمارستان شفاو کوثر و امیر شهرستان سمنان بود، که طی سال های ۹۴ و ۹۵ انجام شده است. نمونه بالینی مورد بررسی ادرار و خون و خلط

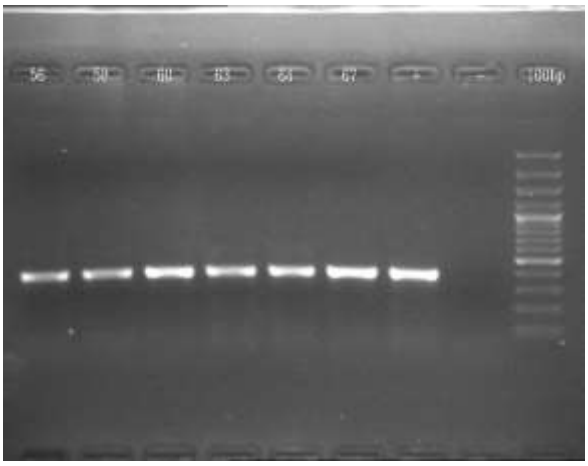
می باشد، که از بیماران بستری و سرپایی جمع‌آوری شد. اطلاعات بیماران از برنامه *HIS* بیمارستان استخراج، و در جدول ۱ وارد شد. سپس اطلاعات جمع‌آوری شده با نرم افزار *SPSS Version 16* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

جدول ۱- بررسی همزمانی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی

آنتی‌بیوتیک	درصد مقاومت
نئومایسین	٪۱/۲۵
استرپتومایسین	٪۴۸/۷۵
کانامایسین	٪۳۳/۷۵
نئومایسین- استرپتومایسین	٪۴
نئومایسین- کانامایسین	٪۵
استرپتومایسین- کانامایسین	٪۲۴
نئومایسین- استرپتومایسین- کانامایسین	٪۱/۲۵

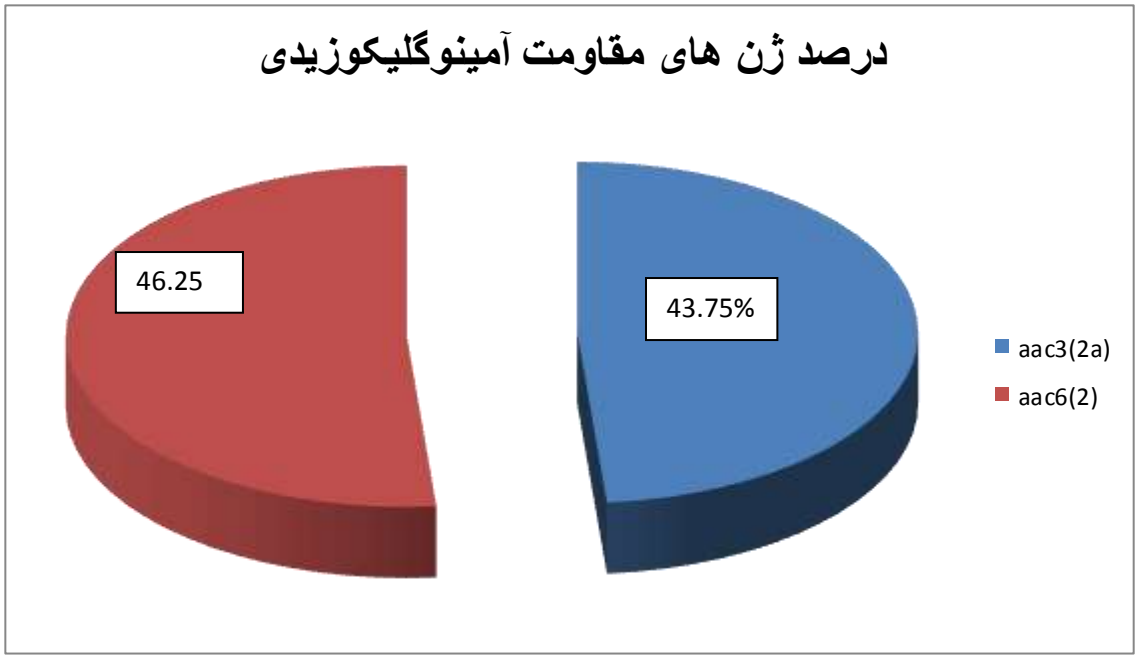


تصویر ۱- آنالیز محصول *PCR aac6*



تصویر ۲- آنالیز محصول *PCR aac3*

نمودار ۱-درصد ژن‌های مقاومت آمینوگلیکوزیدی



بحث و نتیجه گیری

کلبسیلا پنومونیه پاتوژن فرصت طلب و مهمی است که اغلب باعث عفونت‌های دستگاه ادراری وذات الریه در افراد دچارنقص ایمنی می گردد پس از اشرشیاکلی آن را شایع ترین علت سپتی سمی های گرم منفی وعفونت‌های بیمارستانی می دانند.

ترکیب یک آمینوگلیوکوزید با یک عامل ضد دیواره مانند بتالاکتام یا گلیکوپپتیدها ایجاد اثر هم افزایی روی جدایه های حساس نموده و می‌تواند در درمان عفونت ها موثر باشد مقاومت اکتسابی به آمینوگلیکوزیدها هم در باکتری‌های گرم منفی و هم در باکتری‌های گرم مثبت گزارش شده است سه مکانیسم مقاومت شامل تغییر در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو و غیرفعال سازی آنزیماتیک دارو و مسئول مقاومت به آمینوگلیکوزیدها است (*Mingetio1999*).

از این بین غیرفعال سازی آنزیماتیک آمینوگلیکوزیدها توسط آنزیم های تغییردهنده آن ها اصلی ترین مکانیسم مقاومت به این دارو ها در باکتری‌های گرم منفی است. سویه‌های مقاوم توانایی تغییر در ساختار بیوشیمیایی آمینوگلیکوزیدها را توسط آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها *AME* دارا هستند ژن مقاومت *aac(6)*, *aac(3)*از جمله ژن‌های تغییر دهنده آمینوگلیکوزید ها است.

آمینوگلیکوزید ها با وجود داشتن عوارض جانبی و مشکلاتی که در ارتباط با افزایش مقاومت میکرواورگانیسم ها نسبت به این داروها دارد همچنان در درمان عفونت‌های باکتریایی با ارزش هستند. معمول ترین مکانیسم مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه تغییر آن ها توسط آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزید ها است به صورتی که این آنتی‌بیوتیک ها دیگر قادر به اتصال به ریبوزوم سلول نیستند.

ژن‌های رمزکننده این آنزیم ها توسط پلاسمید یا کروموزوم حمل شده و اغلب توسط عناصر ژنتیک قابل‌انتقال نظیر ترانسپوزون ها انتقال می یابد. (*2003 Bellagi*).

ژنوم باکتری کاملا تغییر پذیر است علاوه بر اضافه شدن و حذف ژن‌های موجود در کروموزوم فنوتیپ باکتری با از دست دادن یا کسب پلاسمید ها تغییر می یابد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌ها از طریق پلاسمید های *R*منتقل می‌شود. (*2003 chousm*).

شیوع یک خصوصیت از طریق انتقال پلاسمید انتقال افقی بهتر از انتقال یک کلون باکتریایی خاص اتفاقی می افتد موجب بروز پدیده مقاومت در باکتری‌های دارنده این پلاسمید می شود (*shahidam2001*).

در این تحقیق ژن‌های مقاومت آمینوگلیکوزیدی *aac(3)*و *aac(6)*با استفاده از روش *PCR* بررسی شد. در مطالعه حاضر مشاهده شد که ۴۹ درصد از جدایه ها به استرپتومایسین مقاوم بودند و پس از آن بیشترین مقاومت به ترتیب آزترونام ۴۸ درصد و سفتریاکسون ۴۷ درصد و کانامایسین ۳۴ درصد و ارتاپنم ۱۰ درصد کلیستین ۲ درصد و نئومایسین ۱/۲۵ درصد مشاهده شد.

بر روی ۲۴۹ جدایه اشرشیاکلی و کلبسیلا جدا شده از نمونه های. بالینی انسان ۸۳/۳ درصد از جدایه ها نسبت به جنتامایسین مقاوم گزارش شد. (*HO 2011*).

. از سایر مطالعات و مطالعه حاضر مشاهده می شود می‌تواند به دلیل تفاوت در منطقه جغرافیایی یا تفاوت در تعداد جدایه های مورد آزمایش باشد که نیاز به بررسی بیشتر دارد از سوی دیگر برای اثبات افز ایش شیوع مقاومت به آمینوگلیکوزیدها لازم است مطالعه حاضر به صورت سالیانه مجددا در همین مرکز تکرار شود. نتایج حاصل از *PCR* نشان داد که *aac(3)*۴۳/۷۵ درصد و *aac(6)*.۴۶/۲۵ در صد را دارا می باشد.

۱۷ درصد از جدایه های حیوانی و ۳۳ درصد از جدایه ها انسانی دارای ژن مقاومت *aac(3)*بودند. (*Maynard 2010*).

۷۶ جدایه اشرشیاکلی مقاوم به جنتامایسین و کلبسیلا ۶۳/۱۵ درصد از ایزوله‌های ژن *aac(3)*را حمل می کردند.

بروی ۴۵ جدایه از نمونه های بالینی انسان که همه نمونه ها مقاوم و بیشترین مقاومت به ترتیب کانامایسین ۸۰ درصد، توبرامایسین ۷۱ درصد، آمیکاسین ۵۳ درصد، جنتامایسین ۳۱ درصد و ژن *aac(6)* در ۴۴ درصد از جدایه ها بررسی شد. (ازاده حداد سبزوار ۱۳۹۵)

از ۲۵۰ جدایه اشرشیاکلی از نمونه های بالینی انسان که ۳۴ نمونه از ۲۵۰ نمونه مقاوم والگوی حساسیت آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ۸۲ درصد، توبرامایسین ۹۶ درصد، کانامایسین ۸۲ درصد، آمیکاسین ۸ درصد، نتیل میسین ۳۰ درصد بررسی شد. ژن *aac(3)*در سویه ۵۴,۸۳ درصد شناسایی شد؛ و ۵۰ درصد از باکتری دارای مقاومت هم‌زمان کانامایسین، توبرامایسین و جنتامایسین ژن *aac(3)*را داشتند. (ندا سلیمانی ۱۳۹۴)

در مطالعه برروی ۲۰۰ جدایه کلبسیلا پنومونیه از نمونه های بالینی که ۶۷ نمونه مقاوم *pcr* و بررسی شد با پرایمر *aac(3)* که مورد تحقیق قرار گرفته که ۷۹ درصد ژن *aac(3)* و ۳۷,۹ د رصد ژن *aac(6)* مشاهده شد. (*Paulchryistoffrf 2011*)

برروی ۱۸۵ جدایه کلبسیلا پنومونیه از بیمارستان‌های ایران که همه ی نمونه ها مقاوم با همان پرایمر ژن *aac(6)* مورد تحقیق قرار گرفته که ۷۷ نمونه از این گونه مولد *ESBL* که شامل ۶۰ درصد ژن *CTX1*و ۴۲ درصد ژن *CTX2* و ۷۰ درصد ژن *aac(6)* می باشد. (احسان شمس ۱۳۹۵)

برروی ۵۹ جدایه ایزوله بالینی انسان از ۳ بیمارستان تهران تمام سویه‌ها حاوی ژن *aac(6)*و *aph(3)*به ترتیب ۶۰ درصد و ۶۵ درصد دیده شد ژن *aac(6)*و سپس ژن *aph(3)* بیشترین ژن موثر در ایجاد مقاومت به جنتامایسین و بقیه آمینوگلیکوزیدی دارد سویه‌های فاقد این ژن ها به تمامی آمینوگلیکوزیدها تست شده دراین مطالعه حساس بودند به دلیل حضور ژن *aac(6)*و *aph(3)*اغلب سویه‌های مقاوم به جنتامایسین به سایر آمینوگلیکوزیدها مقاوم می باشند. (محمد فیض آبادی *2010*).

تعداد ۲۳۵ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه از نمونه های مقاوم بیمارستان تایوان جمع‌آوری نمودند از نمونه های مقاوم که ۴۳ درصد آن به آمیکاسین مقاوم بودند. در بررسی ژن *aac(3)*۵۶ درصد گزارش شد. (*Ling ma* و همکاران *2009*)

از ۲۵۰ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه از ۷ بیمارستان در ایران که مقاومت آنتی‌بیوتیکی جنتامایسین ۴۳ درصد و آمیکاسین ۳۸ درصد می باشد از ژن مورد بررسی شده ۳۶ درصد *AAC(6)*گزارش شد. (*farzamkarimi* و همکارا *2011*).

تعداد ۵۴ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه و اشرشیا کلی از نمونه های مقاوم بیمارستان‌های جنوب غربی نیاگارا مورد بررسی قرار گرفت که ۱۰,۵۴ درصد دارای ژن *AAC(6)*و ۱۸,۵ درصد دارای ژن *AAC (3)*یافت شد. (*Bimidele Tule* وهمکاران *2007*).

تعد اد ۶۹۶ ایزوله بالینی کلبسیلا و اشرشیا کلی جدا شده از بیمارستان‌های ترکیه که در بررسی ژن ۱۶,۶ درصد , *AAC(6)* و ۲۹,۳ در صد آن *AAC(3)*گزارش گردید. (*u.over* و همکاران *2012*).

از ۱۸۸ ایزوله بالینی اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه از نمونه خون بیمارستان‌های هنگ کنگ جمع‌آوری نمودند به‌طور کلی ۹۱ درصد آن ژن *AAC(6)*و ۱۲,۲ درصد *AAC(3)*را گزارش گردید. (*Pak lengo* و همکاران *2016*).

رنج سنی بیماران ۱۵ روزتا ۹۲ سال بوده که ۱۸۰۲ درصد از بیماران مرد و ۶۲,۵ درصد زن بودند.۸۱۰۸ درصد از سویه‌ها از ادرار و ۴۵ درصد از خلط و ۱,۱ درصد از خون جداسازی شدند. تعداد ۳۰,۷ درصد از بیماران سرپایی و ۶۳۰۶ درصد از بیماران بستری بودند. از بین سویه‌ها استرپتومایسین ۴۹ درصد و آزترونام ۴۸ درصد و سفتریاکسون ۴۷ درصد و کانامایسین ۳۴ درصد و ارتاپنم ۱۰ درصد و کلیستین ۲ درصد و نئومایسین ۱/۲۵ درصد مقاوم بودند؛ و درصد همزمانی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی نئومایسین ۱/۲۵ درصد، استرپتومایسین ۴۸/۷۵ درصد، کانامایسین ۳۳/۷۵ درصد، نئومایسین _استرپتومایسین ۴ درصد؛استرپتومایسین –کانامایسین ۲۴ درصد، نئومایسین- کانامایسین ۵ درصد، نئومایسین-کانامایسین-استرپتومایسین ۱/۲۵ درصد مشاهده می شود.. شیوع ژن *AAC(3)*در بین سویه‌ها با مقاومت چندگانه ۴۳,۷۵ درصد و شیوع ژن *AAC(6)* با مقاومت چندگانه ۴۶/۲۵ درصد بودند.

پیشنهادات

۱-با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه لازم می باشد تا وجود و فراوانی مقاومت به آمینوگلیکوزید ها در سویه‌های باکتریایی دیگر نیز مورد بررسی قرار گیرد.

۲-با توجه به این که ژن‌های دیگری نیز در ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی دخیل می باشند با بررسی این ژن ها می‌توان اطلاعات دقیق تری در مورد مکانیسم به دست آورد.

۳-با تایپینگ مولکولی سویه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزید می‌توان آنها را مورد بررسی قرار و منشا مقاومت را مشخص نمود.

منابع و ماخذ

۱. ادیب فر پ. ۱۳۸۰. میکروبشناسی پزشکی. ششم، تهران: موسسه فرهنگی انتشاراتی نور دانش، ۸۰۲ صفحه.

۲. آزاده حداد سبزوار. حسن عبدالله زاده، بررسی َشیوع ژن *le-aph(2)-aac(6)* در میان ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از بیمارستان مشهد، فروردین ۱۳۹۶.

۳. محمد مهدی فیض آبادی، سارا صیادی، لیلا شکرزاده، سپیده خطیبی، سارا غزوی، بررسی شیوع ژن‌های آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها در انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم در ایران ۱۳۹۵.

۴. مک فرسون م.ج، مولر اس.جی. ۱۳۸۳. *PCR* مبانی و کاربردهای آزمایشگاهی. مترجمین م کریمی، س زینلی، اول، تهران: اندیشه ظهور، ۳۵۹ صفحه.

۵. ندا سلیمانی، مرتضی ستاری، محمد علی برومند، بررسی مولکولی ژن *aac(c2)-aac(3)* در اشرشیاکلی های مقاوم به آمینوگلیکوزید جدا شده از ادرار (پاییز ۱۳۸۹).

۶. واکر اس. ۱۳۹۰. میکروبشناسی واکر. مترجمین ع بهادر و همکاران، چهارم، تهران: خسروی:دیباج، ۴۱۶ صفحه.

7. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect, 14 Suppl 1:144-53.

8. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. 2005. N Engl J Med, 352(4):380-91.

9. Kim J, Jeon S, Rhie H, Lee B, Park M, Lee H, et al. 2009. Rapid detection of extended spectrum β-lactamase (ESBL) for enterobacteriaceae by use of a multiplex PCR-based method. J Infect Chemother, 41: 181-4.

10. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. 2010. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier
11. Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, Mant D, Hay AD. 2010. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta- analysis. British Medical Journal,340:c2096
12. . Sidjabat HE, Silveira FP, Potoski BA, Abu-Elmagd KM, Adams-Haduch JM, Paterson DL, Doi Y. 2009.
13. Kim sy ,park yj , yu jk, kim hs , yoon jb, leek.prevalance and mechanism of decread suscepetibility to carbapeneme in klebseilla pnemoniae isolates.diagn 2007.
14. A Bhattacharjee, MR Sen, P Prakash, A Gaur, S Anupurba, G Nath. Observation on integron carriage among clinical isolates of Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum β-lactamase 2012.
15. Karimi A, Rahbar M, Fallah F, Navidinia M, MalekanMA. Detection of integrons elements and gene groupsencoding ESBLs and their prevalence in E.coli andKlebsiella isolated from urine samples by PCR method. Afr
16. J Microbiol Res. 2012; 6(8):1806- 9.
17. Feizabadi MM, Asadi S, Zohari M, Gharavi S,
18. Etemadi G. Genetic characterization of highlevel gentamicin-resistant strains of Enterococcus faecalis in Iran. Can J.2004
19. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43(4): 727–37/
20. Bellaaj Zouari A, Bollet C, Ben-Mahrez K. Characterization of the 3-N-aminoglycoside acetyltransferase gene aac(3)-IIa of a clinical isolate of Escherichia coli. Ann Microbiol. 2003; 53: 211-7.
21. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob Agents Chemother1999.
22. Murray BE. Diversity among multidrugresistant Enterococci. Emerg Infect Dis 1998;
23. Nicas TI, Iglewski BH. Isolation and characterization of transposon-induced mutants of Pseudomonas aeruginosa deficient in production of exoenzyme S. Infect Immun 1984;.
24. Vasil ML, Ochsner UA. The response of Pseudomonas aeruginosa to iron: genetics, biochemistry and virulence. Mol Microbiol 1999.
25. RC, Brousseau R, Masson L, Larivière S, Harel J. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal Escherichia coli isolates of animal and human origin. J Clin Microbiol 2006.
26. Bellaaj A, Bollet C, Ben-Mahrez K. Characterization of the 3-N-aminoglycoside acetyltransferase gene aac(3)-IIa of a clinical isolate of Escherichia coli. Ann Microbiol 2003;.
27. Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, Kang JH, Shin WS, Kang MW.
28. Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among Staphylococcus species. J Korean Med Sci 2003; 18.
29. Shahid M, Malik A. Resistance due to aminoglycoside modifying enzymes in
30. Pseudomonas aeruginosa isolates from burns patients. Indian J Med Res 2005; 122(4): 324-9.

31. Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology: focus on infection. Am Epidemiol 2001; 153(12): 1135-41.
32. Ho PL, Wong RC, Lo SW, Chow KH, Wong ,SS, Que TL. Genetic identity of
33. aminoglycoside- resistance genes in Escherichia coli isolates from human and animal sources. J Med Microbiol 2010.
34. Celebi A, Duran N, Ozturk F, Açk L, Aslan G, Aslantas O. Identification of clinic uropathogen Escherichia coli isolates by antibiotic susceptibility, plasmid and whole cell protein profiles. Adv Mol Biol 2007:.
35. Jakobsen L, Sandvang D, Jensen VF, Seyfarth AM, Frimodt-Møller N, Hammerum AM. Gentamicin susceptibility in Escherichia coli related to the genetic background: problems with breakpoints. Clin Microbiol Infect 2007:
36. 13(8): 830-2.
37. Caiqian Liang*, Bangrong Xing*, Xiaoyan Yang. Molecular epidemiology of aminoglycosides resistance on Klebsiella pneumonia in a hospital in China 2015.
38. Tomoe Kitaoa, Tatsuya Tadaa, Masashi Tanakab. Emergence of a novel multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa strain
39. producing IMP-type metallo-_-lactamases and AAC(6_)-Iae in Japan 2012.
40. Pak-Leung Ho a,*, Lai-Ming Leung. Prevalence of aminoglycoside modifying
41. enzyme and 16S ribosomal RNA methylase genes among aminoglycoside-resistant Escherichia coli 2016.
42. Lu Niea,b , YuemengLva, MinYuan.Geneti.basisofhighlevelaminoglycoside resistancein Acinetobacter baumannii from Beijing, China 2014.
43. JOSEPH W. CHOW,1,2* VIVEK KAK. Aminoglycoside Resistance Genes aph(2_)-Ib and aac(6_)-Im Detected Together in Strains of both Escherichia coli and Enterococcus 2014.
44. Yonghong Xiao1 and Yunjian Hu, The Major Aminoglycoside-Modifying Enzyme AAC(3)-II
45. Found in Escherichia coli Determines a Significant Disparity in Its Resistance to Gentamicin and Amikacin in China 2012.
46. Seyed Mohsen Seyedpour 1; Fereshteh Eftekhar. Quinolone Susceptibility and Detection of qnr and aac(6’)-Ib-cr Genes in Community Isolates of Klebsiella 2014.
47. PAUL CHRISTOFFER LINDEMANN. Aminoglycoside resistance in clinical Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates from Western Norway 2011.
48. Bin Li1,2., Yong Yi3., Analysis of Drug Resistance Determinants in Klebsiella pneumoniae Isolates from a Tertiary-Care Hospital in Beijing, China 2011.