دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده پزشکی

گروه میکروب شناسی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی

عنوان:

شناسایی فنوتیپیک و ژنوتیپیک آنزیم های کارباپنماز در *E. coli* های ایزوله شده از عفونت‌های ادراری بدست آمده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستانهای وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، سال 1396

استاد راهنما:

دکتر هادی پیری دوگاهه

استاد مشاور:

دکتر محسن ارزنلو

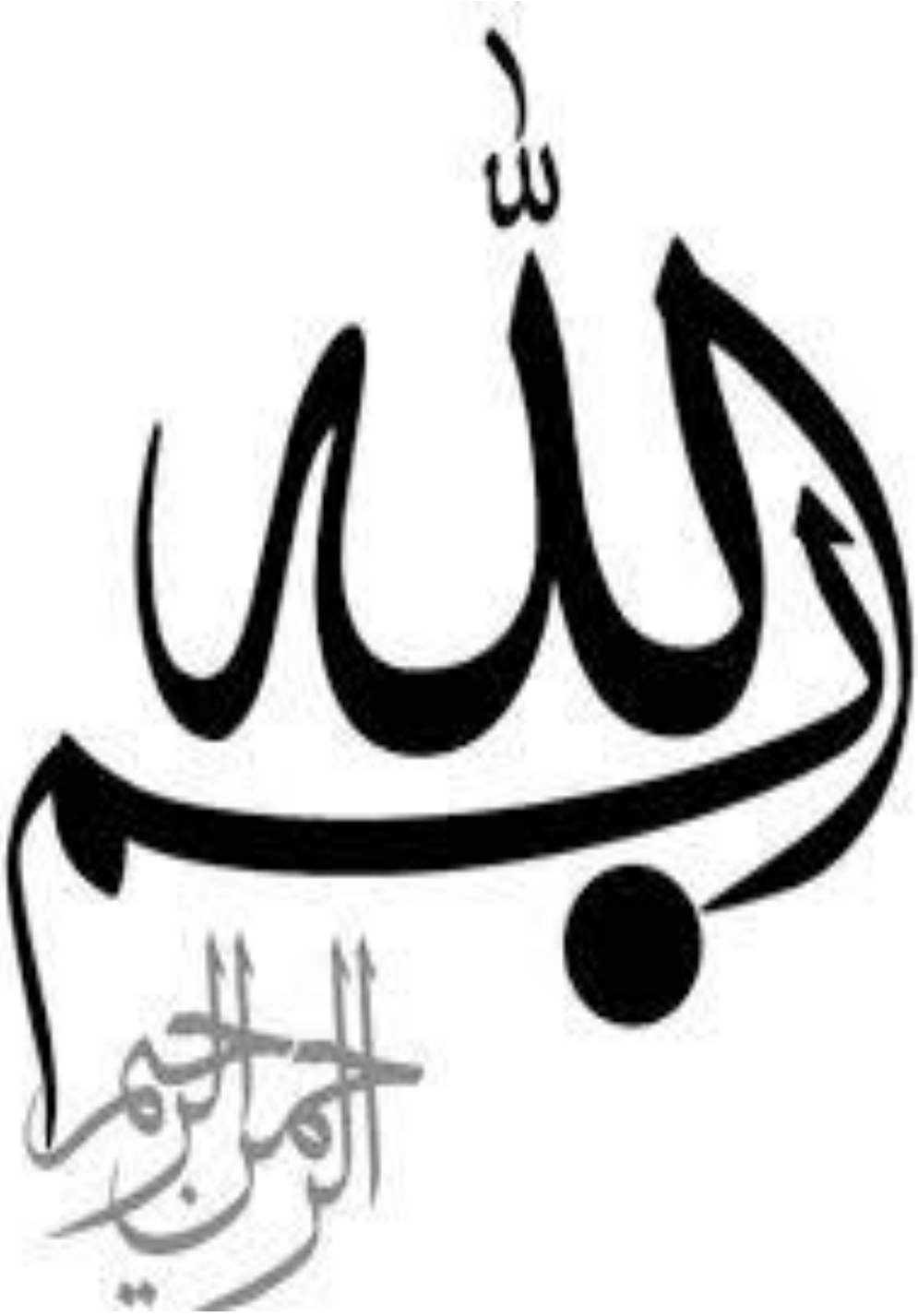
نگارش:

شبنم خاوندی

بهمن 97

شماره پایان نامه

049


بسم الله
الرحمن الرحيم

سپاس و تقدیر:

تقدیم به
پدر، مادر وهمسر مهربانم
که در سختی‌ها و دشواری‌های زندگی همواره یاوری دلسوز و فداکار و پشتیبانی محکم و مطمئن برایم بوده‌اند.

تقدیم به او که آموخت مرا تا بیاموزم
اساتید گرامی جناب آقای دکتر پیری و جناب آقای دکتر ارزنلو

شناسایی فنوتیپیک و ژنوتیپیک آنزیم های کارباپنماز در *E. coli* های ایزوله شده از عفونت‌های ادراری بدست آمده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستانهای وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، سال 1396

چکیده

سابقه و هدف: عفونت مجاری ادراری یکی از عفونت‌های شایع بخصوص در دستگاه مجاری ادراری فوقانی می‌باشد. با توجه به اهمیت باکتری‌های یوروپاتوژنیک و شیوع آن در کودکان، مقاومت این ارگانیسم‌ها به بتالاکتامازها به یکی از مسائل مهم در دنیا تبدیل شده است. بیشترین شیوع باکتری در عفونت ادراری به *اشرشیا کلای* و *کلبسیلا پنومونیه* تعلق دارد. بتالاکتامازهایی که کارباپنم ها را هیدرولیز می کنند، بتالاکتامازهای قدرتمندی هستند که می توانند تقریبا همه ی بتالاکتام ها را هیدرولیز کنند. با توجه به انتقال افقی ژن‌های مقاومت از جمله کارباپنمازها بین باکتری‌ها وهمچنین, با توجه به نقش اشرشیا کلای در ایجاد عفونت‌های ادراری در بیمارستان‌ها و جامعه, اهمیت این مسئله ما را بر آن داشت که مطالعه حاضر را انجام دهیم.

مواد و روش ها: به مدت 6 ماه نمونه ادرار افراد مراجعه کننده و دارای عفونت ادراری به بیمارستان‌های آموزشی اردبیل، به همراه اطلاعات جمع آوری شده مانند اطلاعات مربوط به فاکتورهای زمینه ساز مرتبط با مقاومت به کارباپنم ها، از بیماران واجد شرایط، جمع آوری شد. پس از تشخیص قطعی نمونه ها (n=200) به عنوان *E. coli*، جهت غربالگری اولیه باکتری های مقاوم به کارباپنم, تست های تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی صورت گرفتند. به منظور شناسایی آنزیم های کارباپنماز به روش های فنوتیپی, تست های CIM و Carba NP انجام شدند و به روش ژنوتیپی تست PCR برای هر کدام از ژن ها انجام شد. جهت تعیین ارتباط کلونال بین سویه هایی که مقاوم به کارباپنم بودند, ERIC-PCR انجام گرفت. همچنین به منظور تعیین فراوانی کلون O25-ST131, برای همه ی نمونه های جمع آوری شده, PCR انجام شد و جهت اطمینان از نتایج, با استفاده از محصول PCR چندین نمونه, تعیین توالی صورت گرفت.

یافته ها: طی بررسی‌های انجام شده به روش آنتی بیوگرام، 33٪ مقاوم و 64٪ حساس و 3٪ نیمه حساس به آنتی بیوتیک ایمی پنم و 100٪ نمونه‌ها حساس به آنتی بیوتیک مروپنم بودند همچنین طبق نتایج MIC، 37٪ از نمونه‌ها مقاوم و 57٪ حساس و 6٪ نیمه حساس نسبت به آنتی بیوتیک ایمی پنم گزارش شد.

در این مطالعه, وجود ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی (KPC, NDM, IMP, OXA) با روش PCR به اثبات نرسید و ایجاد مقاومت با سایر مکانیسم‌های مقاومتی مثل کاهش نفوذ پذیری، تغییر پروتئین هدف و ... در باکتری را نشان می‌دهد.

100٪ نمونه هایی که فاقد ژن‌های کارباپنماز بودند در تست‌های CIM و Carba NP test نتایج منفی داشتند.

نتایج PCR ژن O25-ST131 نشان دهنده ی فراوانی 99 درصدی این کلون در بین *E. coli* های جمع آوری شده بود.

با نتایج بدست آمده از ERIC-PCR که برای سویه‌های مقاوم به کارباپنم انجام شده بود مشخص شد که استرین‌ها در 39 کلاستر با درصد تشابه 80، طبقه بندی می‌شوند.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده از تحقیق ما نشان داد که مقاومت به ایمی پنم در منطقه ی مورد مطالعه در حد قابل توجهی بالا است؛ و به دلیل عدم ردیابی ژن های کارباپنماز، می توان گفت مقاومت به دلیل موتاسیون هایی است که باعث کاهش نفوذ دارو به ارگانیسم و یا افزایش خروج آن می شوند. و براساس فراوانی ایزوله های انتروباکتریاسه های جمع آوری شده می توان گفت *اشرشیا کلای* بیشترین عامل عفونت ادراری در بین نمونه های بدست آمده از بیمارستان های شهرستان اردبیل، در بین بیماران دارای عفونت ادراری می باشد.

واژه‌های کلیدی: *اشرشیا کلای*، کارباپنماز، عفونت دستگاه ادراری

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول:طرح تحقیق

1-1- مقدمه..... **Error! Bookmark not defined.**

1-2- بیان مسئله..... **Error! Bookmark not defined.**

1-3- تعریف واژه‌های کلیدی..... **Error! Bookmark not defined.**

1-4- اهداف..... **Error! Bookmark not defined.**

1-4-1 هدف کلی..... **Error! Bookmark not defined.**

1-4-2- اهداف اختصاصی..... **Error! Bookmark not defined.**

1-4-3- اهداف کاربردی..... **Error! Bookmark not defined.**

1-5- فرضیات طرح..... **Error! Bookmark not defined.**

فصل دوم:بررسی متون

2-1- مبانی نظری..... **Error! Bookmark not defined.**

2-1-1- عفونت ادراری Urinary Tract Infection (UTI) **Error! Bookmark not defined.**

2-1-2- انتروباکتریاسه..... **Error! Bookmark not defined.**

2-1-3-تاریخچه..... **Error! Bookmark not defined.**

2-1-4- مشخصات اشریشیا کلای..... **Error! Bookmark not defined.**

2-1-5- جایگاه اشریشیا کلای در بدن..... **Error! Bookmark not defined.**

2-1-6- نقش *اشریشیا کلای* در بیماری زایی..... **Error! Bookmark not defined.**

2-1-7- فاکتورهای بیماری زایی..... **Error! Bookmark not defined.**

2-1-7-1- ادهزین..... **Error! Bookmark not defined.**

2-1-7-2- آنتی ژن‌های فاکتور کلونیزاسیون (CFA)..... **Error! Bookmark not defined.**

2-1-7-3- فیمبریه تیپ 1..... **Error! Bookmark not defined.**

2-1-7-4- ادهزین‌های غیر فیمبریال(AFA)..... **Error! Bookmark not defined.**

2-1-7-5- پیلی P..... **Error! Bookmark not defined.**

2-1-7-6- تاژک..... **Error! Bookmark not defined.**

2-1-7-7- کپسول..... **Error! Bookmark not defined.**

2-1-7-8- لیپو پلی ساکارید(LPS) ..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-7-9- توکسین..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-7-10- شیگا توکسین(SXT)..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-7-11- توکسین حساس به حرارت(LT)..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-7-12- توکسین مقاوم به حرارت(ST)..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-7-13- همولایزین A (Hly A)..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-7-14- سیدروفور..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-8- بیماری‌های بالینی..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-8-1- بیماری‌های داخل روده ای..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-8-2- بیماری‌های خارج روده ای..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-8-3- سایر بیماری ها..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-9- آنتی بیوتیک..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-9-1- بتالاکتام..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-9-1-1- ساختمان شیمیایی بتالاکتام..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-9-1-2 انواع آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-10- مکانیسم مقاومت به بتالاکتام ها..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-10-1- مکانیسم کاهش نفوذپذیری..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-10-2- سیستم ایفلاکس..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-10-3- تغییر در پروتئین متصل شونده به پنی سیلین(PBP) **Error! Bookmark not defined.**
2-1-10-4- بتالاکتاماز..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-11- طبقه بندی بتالاکتامازها..... **Error! Bookmark not defined.**
2-1-12- درمان اشرشیا کلای..... **Error! Bookmark not defined.**
2-2- مطالعات جهان..... **Error! Bookmark not defined.**
2-3- مطالعات ایران..... **Error! Bookmark not defined.**

فصل سوم:شیوه اجرای تحقیق

3-1- مواد، وسایل و دستگاه های مورد استفاده 46
3-1-1- محیط کشت های مورد استفاده 46

3-1-2- مواد مورد استفاده 46
3-1-3- دستگاه های مورد استفاده 47
3-1-4- وسایل مورد استفاده 48
3-2- محلول های مورد استفاده 49
3-2-1- سرم فیزیولوژی 49
3-2-2- استاندارد نیم مک فارلند 49
3-2-3- بافر TBE 50
3-2-4- محلول کاری پرایمرها 50
3-2-5- محلول های مورد استفاده در Carba NP test 50
3-3- نوع پژوهش 51
3-4- جمعیت مورد مطالعه 51
3-5 -نمونه برداری و روش نمونه گیری 51
3-6- روش گردآوری اطلاعات 51
3-7- ملاحظات اخلاقی 51
3-8- روش انجام طرح 52
3-8-1- شناسایی باکتری مورد مطالعه 52
3-8-1-1- رنگ آمیزی گرم 53
3-8-1-2- تست اکسیداز 53
3-8-1-3- تست‌های تاییدی گالری جهت شناسایی اشرشیا کلای 53
3-8-1-4- Polymerase Chain Reaction برای ژن 16S rRNA 53
3-8-2- تست‌های فنوتیپی جهت تشخیص کارباپنمازها 54
3-8-2-1- تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی 54
3-8-2-2- تعیین حداقل غلظت مهاری آنتی بیوتیک 54
3-8-2-3- تست Carbapenem Inactivation Method 56
3-8-2-4- The Carba NP test 57
3-8-2-4-1- مواد و محلول های مورد استفاده در تست 57
3-8-2-4-2- روش انجام تست 57

3-8-2-4-3- تفسیر تست 58
3-8-3- تست‌های ژنوتیپی..... 58
3-8-3-1- تست واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR) برای ردیابی ژن‌های کارباپنماز..... 58
3-8-3-1-1- استخراج DNA..... 59
3-8-3-1-2-پرایمرها..... 59
3-8-3-1-3-محلولهای مورد استفاده و مراحل کار در واکنش PCR..... 60
3-8-3-1-4-ارزیابی محصول PCR روی ژل آگارز..... 62
3-8-3-2- متد ERIC-PCR برای تعیین ارتباط مولکولی *E. coli*های ایزوله شده..... 63
3-8-3-2-1- استخراج DNA..... 63
3-8-3-2-2-پرایمرها..... 63
3-8-3-2-3-محلول‌های مورد استفاده..... 63
3-8-3-2-4- برنامه ی دماها و زمان‌های هر مرحله از واکنش ERIC-PCR..... 63
3-8-3-2-5- ارزیابی محصول PCR روی ژل آگارز..... 64
3-8-3-3- Polymerase Chain Reaction برای ردیابی کلون O25-ST131..... 64
3-8-3-3-1-استخراجDNA 64
3-8-3-3-2- پرایمرها..... 64
3-8-3-3-3- محلول‌های مورد استفاده..... 65
3-8-3-3-4- برنامه ی دماها و زمان‌های هر مرحله از واکنش PCR جهت ردیلبی ژن O25b 65
3-8-3-3-5- ارزیابی محصول PCR روی ژل آگارز..... 65
3-9-آنالیز آماری..... 65

فصل چهارم:نتایج

4-1- یافته‌های زمینه ای..... 67
4-2- نتایج آنتی بیوگرام..... 68
4-3- نتایج حداقل غلظت مهاری آنتی بیوتیک(MIC)..... 68
4-4- نتایج CIM..... 70
4-5- نتایج Carba NP test..... 70
4-6- نتایج روش واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR)..... 70

4-7- نتایج ERIC-PCR 74
4-8- نتایج PCR ژن O25-ST131 76

فصل پنجم:بحث و نتیجه گیری

5-1- بحث 80
5-2- نتیجه گیری 84
5-3- پیشنهادات 85
فهرست منابع 86
چکیده انگلیسی 95

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول 2-1- طبقه بندی علمی اشرشیا کلای (21). ..... **Error! Bookmark not defined.**
جدول2-2- جایگاه هدف آنتی بیوتیک‌ها در سلول هدف..... **Error! Bookmark not defined.**
جدول 3-1-توالی پرایمرها جهت شناسایی 16S rRNA و ژن‌های کاربا‌پنماز..... 59
جدول 3-2- برنامه دماها و زمانهای هر مرحله از واکنش PCR برای ژنهای16S rRNA, bla_{KPC}،
bla_{IMP}، bla_{NDM} و bla_{OXA}..... 61
جدول 3-3 - پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده در واکنش ERIC-PCR باکتری E. coli..... 63
جدول 3-4- برنامه ی دماها و زمان‌های ERIC-PCR..... 63
جدول 3-5- پرایمرهای اختصاصی برای شناسایی E. coli O25b-ST131..... 64
جدول 3-6-برنامه دماها و زمان‌های هر مرحله از واکنش PCR جهت ردیلبی کلون O25-ST131... 65
جدول 4-1- جدول فراوانی ایزوله‌های اشرشیاکلی جمع آوری شده از بیمارستان‌های شهر اردبیل به
تفکیک اطلاعات مورد بررسی قرار گرفته..... 67
جدول 4-2- جدول نتایج حداقل غلظت مهاری آنتی بیوتیک (MIC) ایمی پنم در غلظت‌های مختلف
آنتی بیوتیکی..... 69

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل2-1-ساختمان شیمیائی آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام ها..... **Error! Bookmark not defined.**
شکل 4-1- تعیین MIC ایمی پنم به روش آگار دایلوشن (غلظت‌های 0/125 تا بیشتر از 128) 69
شکل 4-2-Carba NP test برای شناسایی سویه‌های تولیدکننده ی کارباپنماز 70
شکل4-3- نتایج PCR، 16S rRNA در نمونه‌های مورد مطالعه..... 71
شکل 4-4- نتیجه ی PCR ژن bla_{OXA} در نمونه های مورد مطالعه 71
شکل 4-5- نتیجه ی PCR ژن bla_{OXA} در نمونه های مورد مطالعه 72
شکل 4-6- نتیجه ی PCR ژن bla_{OXA} در نمونه های مورد مطالعه 72
شکل 4-7- نتیجه ی PCR ژن bla_{OXA} در نمونه های مورد مطالعه 73
شکل 4-8- نتایج REIC-PCR 74
شکل4-9- نتایج PCR ژن O25b. طول باند 347 bp است. از مارکر 100bp استفاده شده است..... 76
شکل4-10- نتایج مربوط به تعیین توالی ژن O25-ST131..... 77

فهرست نمودار

عنوان **صفحه**

نمودار 4-1- نتایج آنتی بیوگرام برای نمونه‌های مورد مطالعه..... 68
نمودار 4-2- نتیجه ی آنالیز الگوهای ERIC-PCR با نرم افزار GelCompar II 77

فهرست اختصارات

UTI: Urinary tract infection
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA: Deoxyribonucleic acid
ml: Milliliter
OD: Optical density
PCR: Polymerase Chain Reaction
µl: Microliter
ESBLs: Extended spectrum beta-lactamases
E.coli: Escherichia coli
MDR: Multiple Drug Resistant
MIC: Minmum inhibitory concentration
bla: beta lactamase
ATCC: American Type Culture Collection
ST: Sequence Typing