

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت دریافت مدرک کارشناسی ارشد میکروبی شناسی پزشکی

عنوان:

**بررسی فراوانی اینتگرون های کلاس 1 و 2 در اشریشیاکلی های مقاوم به  
چند دارو جدا شده از عفونت های دستگاه ادراری و بررسی تنوع ژنتیکی  
ایزوله ها با استفاده از روش ERIC-PCR**

اساتید راهنما:

سرکار خانم دکتر رقیه تیمورپور

جناب آقای دکتر محسن ارزنلو

استاد مشاور:

جناب آقای دکتر مجید اسمعیلی زاد

نگارش و پژوهش:

سهیلا برزگر

تقدیم به

پدر و مادر عزیز و مهربانم

که در سختی‌ها و دشواری‌های زندگی همواره یآوری دلسوز و فداکار و  
پشتیبانی محکم و مطمئن برایم بوده‌اند.

و به خواهران عزیز و برادر گرامیم

## تقدیر و تشکر:

از استاد گرامیم سرکار خانم دکتر تیمورپور بسیار سپاسگزارم چرا که بدون راهنمایی های ایشان تامین این پایان نامه ممکن نبود.

از جناب آقای دکتر ارزنلو و جناب آقای دکتر پیری و جناب آقای دکتر محمدی به دلیل یاری ها و راهنمایی های بی چشمداشت ایشان که بسیاری از سختی ها را برایم آسان تر نمودند.

از مسئولان آزمایشگاه جناب آقای متولی، جناب آقای نوروزی و جناب آقای آذغانی و سرکار خانم ارجمند صمیمانه تشکر می نمایم.

و با سپاس صمیمانه از همکلاسی های ارجمندم خانم خاوندی، خانم هوشیار، آقای منوچهری، آقای نیک خو و خانم کشاورزبان و سایر دوستان عزیز.

## چکیده:

### بررسی فراوانی اینتگرون های کلاس 2و1 در *اشرشیا کلی* های مقاوم به چند دارو جدا شده از عفونت های دستگاه ادراری و بررسی تنوع ژنتیکی ایزوله ها با استفاده از روش ERIC-PCR

**سابقه و هدف:** مقاومت به آنتی بیوتیک ها در طی چند سال گذشته افزایش یافته و به سطحی رسیده است که در آینده برای بیماران خطر جدی محسوب می شود. اینتگرون ها به عنوان سیستم های جذب و بیان ژن های مقاومت در گسترش مقاومت دارویی نقش دارند. هدف از این مطالعه تعیین شیوع اینتگرون های کلاس 1 و 2 در *اشرشیا کلی* های جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به بیمارستان های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل و تعیین ارتباط حضور اینتگرون ها با مقاومت چند دارویی و تعیین تنوع ژنتیکی ایزوله ها با روش ERIC-PCR می باشد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه مقطعی توصیفی، تعداد 163 نمونه *اشرشیا کلی* از بیماران با عفونت ادراری جدا گردید. گونه *اشرشیا کلی* با استفاده از تست های بیوشیمیایی و مولکولی تایید شد. حساسیت این ایزوله ها به 12 آنتی بیوتیک رایج در درمان عفونت های دستگاه ادراری با روش دیسک دیفیوژن و براساس دستورالعمل CLSI بررسی گردید. مقاومت چند دارویی و تولید آنزیم های ESBL و AmpC با استفاده از دیسک های تشخیصی به صورت فنوتیپی و مولکولی بررسی گردید. با استفاده از روش PCR حضور ژن های اینتگرون 1 و 2 و همچنین حضور ژنهای *SHV*، *CTX-M* و *TEM* در رابطه با تولید آنزیم های ESBLs بررسی شد. در انتها تنوع ژنتیکی ایزوله ها با استفاده از روش ERIC-PCR آنالیز گردید.

**یافته ها:** از مجموع 163 نمونه مورد بررسی تعداد 138 نمونه (84.7٪) مقاومت MDR داشتند. کمترین میزان مقاومت به آنتی بیوتیک نیتروفورانثوئین با 1.2٪ مقاومت و بیشترین میزان مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین با 89.6٪ مقاومت به دست آمد. شیوع اینتگرون 1 در 39.9٪ از نمونه ها و اینتگرون 2 در 14.1٪ از نمونه ها به دست آمد. اینتگرون کلاس 3 در هیچ کدام از نمونه ها شناسایی نشد. ارتباط معنی داری بین حضور اینتگرون ها و مقاومت چند دارویی مشاهده شد. همچنین ارتباط معنی داری بین اینتگرون کلاس 1 و مقاومت به آنتی بیوتیک تری متوپریم-سولفامتاکسازول، اینتگرون کلاس 2 و مقاومت به آنتی بیوتیک های تری متوپریم-سولفامتاکسازول و سیپروفلوکسازین مشاهده شد. از 163 نمونه تعداد 76 نمونه تولید کننده آنزیم های ESBL بودند و میزان شیوع ژن *SHV*، *CTX-M* و *TEM* مرتبط با تولید ESBLs به ترتیب 16.0، 1.8، 14.1 درصد می باشد.

**نتیجه گیری:** یافته های به دست آمده نشان داد که میزان مقاومت چند دارویی افزایش یافته و باید سیاست های استفاده از آنتی بیوتیک ها تغییر یابد. میزان مقاومت به آنتی بیوتیک ایمپینم نسبت به مطالعات قبلی افزایش یافته است. همچنین با توجه به ارتباط معنی دار بین حضور اینتگرون ها و مقاومت به آنتی بیوتیک ها این عناصر در گسترش مقاومت دارویی نقش دارند. آمیکاسین و نیتروفورانثوئین موثرترین دارو ها بر علیه ایزوله ها بودند.

**واژه های کلیدی:** *اشرشیا کلی*، UTI، مقاومت چند دارویی، اینتگرون

## فهرست مطالب

فصل اول: طرح تحقیق .....	Error! Bookmark not defined.
1-1 مقدمه و بیان مسئله .....	Error! Bookmark not defined.
1-2 تعریف واژه ها .....	Error! Bookmark not defined.
1-3 اهداف و فرضیات .....	Error! Bookmark not defined.
1-3-1 هدف کلی .....	Error! Bookmark not defined.
1-3-2 اهداف اختصاصی .....	Error! Bookmark not defined.
1-3-3 اهداف فرعی .....	Error! Bookmark not defined.
1-3-4 اهداف کاربردی .....	Error! Bookmark not defined.
1-4 فرضیات یا سوالات تحقیق .....	Error! Bookmark not defined.
فصل دوم: کلیات و بررسی متون .....	Error! Bookmark not defined.
2-1 انتروباکتریاسه .....	Error! Bookmark not defined.
2-2 ویژگی های مشترک خانواده انتروباکتریاسه .....	Error! Bookmark not defined.
2-3/اشرشیا کلی .....	Error! Bookmark not defined.
2-3-1 تاریخچه .....	Error! Bookmark not defined.
2-3-2 مورفولوژی .....	Error! Bookmark not defined.
2-4/اشرشیا کلی اوروپاتوژنیک .....	Error! Bookmark not defined.
2-4-1 فاکتور های ویروانس/اشرشیا کلی اوروپاتوژنیک .....	Error! Bookmark not defined.
2-5 عفونت های مجاری ادراری .....	Error! Bookmark not defined.
2-6 مقاومت آنتی بیوتیکی .....	Error! Bookmark not defined.
2-6-1 مقاومت چند دارویی .....	Error! Bookmark not defined.
2-7 اینتگرون .....	Error! Bookmark not defined.
2-7-1 ساختار کلی اینتگرون ها .....	Error! Bookmark not defined.
2-8 آنتی بیوتیک های $\beta$ -لاکتام .....	Error! Bookmark not defined.
2-9 آنزیم های $\beta$ -لاکتاماز .....	Error! Bookmark not defined.

<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	β-لاکتاماز های وسیع الطیف
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	انواع ESBLs
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	تایپینگ مولکولی
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	تایپینگ نمونه ها با استفاده از روش ERIC-PCR
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	بررسی متون
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	مطالعات در جهان
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	مطالعات در ایران
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	<b>فصل سوم: شیوه اجرای تحقیق</b>
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	مواد، وسایل و دستگاه های مورد استفاده
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	محیط های کشت مورد استفاده
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	مواد مورد استفاده
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	وسایل مورد استفاده
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	لیست دستگاه های مورد استفاده
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	نوع مطالعه
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	تهیه و جمع آوری نمونه
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	شناسایی بیوشیمیایی سویه ها
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	ذخیره سازی نمونه های تأیید شده /شرشیاکلی
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی به روش Disk Agar Diffusion
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	روش تهیه محلول استاندارد نیم مک فارلند
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	ارزیابی فنوتیپی تولید آنزیم های β-لاکتاماز وسیع الطیف
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	تعیین سویه های تولید کننده AmpC القایی
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	روش PCR برای شناسایی ژن های مورد بررسی
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	استخراج DNA کروموزومی
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	تهیه Tris-cl 100 mM
<b>Error! Bookmark not defined.</b> .....	آماده سازی پرایمر

3-11	شناسایی ژن 16SrRNA برای تایید سویه ها به عنوان /شرشیاکلی
3-12	محاسبه دمای اتصال (Anneling)
3-13	الکتروفورز محصولات PCR
3-13-1	تهیه بافر TBE 10x
3-14	شناسایی ژنهای اینتگرون با استفاده از PCR
3-15	بررسی ژن های <i>TEM</i> ، <i>SHV</i> ، <i>CTX-M</i> در نمونه های تولید کننده ESBLs
3-16	تایپینگ نمونه ها با استفاده از روش ERIC-PCR
3-17	آنالیز آماری
فصل چهارم: نتایج	
4-1	نتایج اطلاعات دموگرافیک
4-2	تایید نهایی سویه های /شرشیاکلی اوروپاتوژن
4-2-1	ژن 16SrRNA
4-3	نتایج تعیین الگوی حساسیت جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیک های مورد بررسی
4-4	فراوانی اینتگرون ها
4-4-1	نتایج توالی یابی ژن های اینتگرون I و II
4-4-1-1	نتایج حاصل از BLAST توالی اینتگرون I با توالی موجود در Genbank
4-4-1-2	نتایج حاصل از BLAST توالی اینتگرون II با توالی موجود در Genbank
4-5	میزان فراوانی سویه های تولید کننده ESBLs
4-6	فراوانی ژن های بتالاکتاماز وسیع الطیف
4-7	نتایج تایپینگ سویه ها با استفاده از روش ERIC-PCR
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری	
5-1	بحث
5-2	نتیجه گیری و پیشنهادات
5-3	محدودیت ها



## فهرست جداول:

- جدول 1-3 پرایمر مورد استفاده برای ژن 16SrRNA ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 2-3 پرایمر های مورد استفاده برای شناسایی اینتگرون 2، 1 و 3 ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 3-3 پرایمر های ژن های *TEM*، *SHV*، *CTX-M* ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 4-3 پرایمر مورد استفاده برای ERIC-PCR ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 1-4 بررسی وجود رابطه معنی دار بین سن خانم ها و آقایان مورد مطالعه ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 2-4 تعداد نمونه های اخذ شده از بیمارستان امام خمینی و بوعلی ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 3-4 درصد فراوانی سویه های MDR ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 4-4 رابطه بین اینتگرون ها و MDR ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 5-4 رابطه بین نوع مراجعه و MDR ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 6-4 رابطه بین نوع بیمارستان و MDR ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 7-4: نتایج الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های مورد بررسی با روش دیسک آگار دیفیوژن ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 8-4 میزان درصد فراوانی و فراوانی انتگرون ها ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 9-4 رابطه بین اینتگرون 1 و محل اخذ نمونه ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 10-4 رابطه بین اینتگرون 2 و محل اخذ نمونه ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 11-4 رابطه بین حضور اینتگرون 1 و سن بیماران ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 12-4 رابطه بین حضور اینتگرون 2 و سن بیماران ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 13-4 ارتباط فراوانی اینتگرون ها با جنسیت بیماران ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 14-4: فراوانی آنزیم های ESBLs ..... **Error! Bookmark not defined.**
- جدول 15-4 فراوانی مقاومت به آنتی بیوتیک سفوکسیتین ..... **Error! Bookmark not defined.**

## فهرست اشکال:

تصویر 1-2 ساختار عمومی اینتگرون ها و مکانیسم نو ترکیبی کاست های ژنی ..... **Error! Bookmark not defined.**

تصویر 1-3 کلونی های اشرشیاکلی بر روی محیط EMB و MAC آگار ..... **Error! Bookmark not defined.**

تصویر 2-3 رشد سویه های اشرشیاکلی بر روی محیط های تشخیصی افتراقی ..... **Error! Bookmark not defined.**

تصویر 3-3: بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک آگار دیفیوژن ..... **Error! Bookmark not defined.**

تصویر 4-3: تست های فنوتیپی تشخیص تولید آنزیم ESBLs ..... **Error! Bookmark not defined.**

تصویر 5-3: تست تشخیصی تولید آنزیم AmpC ..... **Error! Bookmark not defined.**

تصویر 1-4: نمونه تصویری از ژن 16SrRNA محصول PCR بر روی ژل آگارز 1.2/ ..... **Error! Bookmark not defined.**

تصویر 2-4 توالی ژن 16SrDNA ..... **Error! Bookmark not defined.**

تصویر 3-4: نتایج الکتروفورز محصول Multiplex PCR برای بررسی ژن *IntI 1,2* بر روی ژل آگاروز 1.2/ ..... **Error! Bookmark not defined.**

تصویر 4-4 توالی ژن *IntI1* ..... **Error! Bookmark not defined.**

تصویر 5-4 توالی ژن *IntI2* ..... **Error! Bookmark not defined.**

تصویر 6-4: نمونه تصویر ژن *TEM* محصول PCR بر روی ژل آگارز ..... **Error! Bookmark not defined.**

تصویر 7-4: نمونه ای از تصویر حاصل از الکتروفورز محصول PCR برای شناسایی ژنهای *SHV* و *CTX-M* ..... **Error! Bookmark not defined.**

تصویر 8-4: الکتروفورز محصولات ERIC-PCR بر روی ژل آگارز 1.5/ ..... **Error! Bookmark not defined.**

## فهرست نمودارها:

- نمودار 1-4: نمودار دایره ای فراوانی سویه های MDR ..... **Error! Bookmark not defined.**
- نمودار 2-4: نتایج الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های مورد بررسی بر اساس درصد ..... **Error! Bookmark not defined.**
- نمودار 3-4: نمودار دایره ای فراوانی اینتگرون های 1 و 2 ..... **Error! Bookmark not defined.**
- نمودار 4-4: منحنی گروماتوگرام توالی ژن *IntI1* ..... **Error! Bookmark not defined.**
- نمودار 5-4: منحنی گروماتوگرام توالی ژن *IntI2* ..... **Error! Bookmark not defined.**
- نمودار 6-4: فراوانی ژن های مولد ESBLs ..... **Error! Bookmark not defined.**
- نمودار 7-4: دندروگرام نمونه های اینتگرون مثبت ..... **Error! Bookmark not defined.**
- نمودار 8-4: دندروگرام نمونه های اینتگرون مثبت ..... **Error! Bookmark not defined.**

