دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ کارشناسی ارشد رشته باکتری شناسی پزشکی

عنوان: بررسی تحمل به بیوسایدهای ضدمیکروبی در ایزوله های انتروکوکوس فکالیس و فاسیوم جدا شده از نمونه های انسانی و محیطی اردبیل در سال ۱۳۹۸

نگارش:

مالک نمکی

استاد راهنما:

دکتر محسن ارزنلو

اساتید مشاور:

دکتر هادی پیری دوگاهه-دکتر رقیه تیمورپور

مرداد ۱۴۰۰

شماره پایان نامه: ۰۵۷

تقدیم و سپاس ازسه وجود مقدس:

آنان که ناتوان شدند تا ما به توانایی برسیم...

موهایشان سپید شد تا ما روسفید شویم...

و عاشقانه سوختند تا گرمابخش وجود ما و روشنگر راهمان باشند...

پدرانمان

مادرانمان

استادانمان

با سپاس و تشکر ویژه از اساتید عزیز

و دلسوزم:

جناب آقای دکتر محسن ارزنلو

جناب آقای دکتر هادی پیری دوگاهه

سرکار خانم دکتر رقیه تیمورپور

فهرست مطالب

عنوان صفحه

چکیده: ۱

فصل اول مقدمه ۳

(۱-۱) مقدمه ۴

(۱-۲) اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق ۱۰

(۱-۳) اهداف و فرضیات طرح ۱۱

(۱-۳-۱) هدف کلی طرح ۱۱
(۱-۳-۲) اهداف اختصاصی طرح ۱۲
(۱-۳-۳) فرضیات ۱۳

(۱-۴) تعریف واژه های اختصاصی ۱۴

فصل دوم بررسی متون ۴

(۲-۱) مبانی نظری ۲

(۲-۱-۱) تاریخچه انتروکوک ها ۲
(۲-۱-۲) طبقه بندی انتروکوک ها ۳
(۲-۱-۳) خصوصیات عمومی انتروکوک ها ۴
(۲-۱-۴) تشخیص مولکولی جنس انتروکوکوس ۵
(۲-۱-۵) روشهای میکروبشناسی آزمایشگاهی برای جداسازی انتروکوک ها ۵
(۲-۱-۶) زیستگاه ۷
(۲-۱-۷) فاکتورهای ویرولانس انتروکوک ها ۸
(۲-۱-۷-۱) ضمایم سطحی سلول باکتریایی ۸
(۲-۱-۷-۱-۱) مواد مجتمع کنند(AS) ۹
(۲-۱-۷-۱-۲) پروتئین سطحی انتروکوکی ۱۰
(۳-۱-۷-۱-۲) ادهزین متصل به کلاژن ۱۰
(۲-۱-۷-۲) لیپوتیکوئیک اسید ۱۱

(۲-۱-۷-۳) کپسول ۱۱
(۲-۱-۷-۴) فرومون ۱۲
(۲-۱-۷-۵) آنتی ژن A انتروکوکوس فکالیس ۱۲
(۲-۱-۷-۶) فاکتورهای ترشحی ۱۲
(۲-۱-۷-۶-۱) سیتولیزین ۱۲
(۲-۱-۷-۶-۲) پروتئاز(ژلاتیناز) ۱۳
(۲-۱-۷-۶-۳) هیالورونیداز ۱۴
(۲-۱-۷-۶-۴) سرین پروتئاز ۱۴
(۲-۱-۸) عفونت‌های انتروکوکی ۱۵
(۲-۱-۸-۱) باکتریمی ۱۶
(۲-۱-۸-۲) اندوکاردیت ۱۷
(۲-۱-۸-۳) عفونت ادراری ۱۷
(۲-۱-۸-۴) عفونت‌های زخم و بافت ۱۸
(۲-۱-۸-۵) عفونت‌های لگن و داخل شکمی ۱۹
(۲-۱-۸-۶) مننژیت ۱۹
(۲-۱-۸-۷) عفونتهای زخم و بافت ۲۰
(۲-۱-۹) مقاومت آنتی‌بیوتیکی در انتروکوک ها ۲۰
(۲-۱-۹-۱) مقاومت چند دارویی ۲۱
(۲-۱-۱۰) بیوسایدهای ضدمیکروبی ۲۱
(۲-۱-۱۰-۱) فرمالدهید ۲۲
(۲-۱-۱۰-۲) بنزآلکونیوم کلرید ۲۳
(۲-۱-۱۰-۳) تریکلوسان ۲۳
(۲-۱-۱۰-۴) کلرهگزیدین دی گلوکونات ۲۴
(۲-۱-۱۱) اهمیت بیوسایدهای ضدمیکروبی ۲۵
(۲-۱-۱۲) مکانیسم های مقاومت به بیوسایدهای ضدمیکروبی ۲۶
(۲-۱-۱۳) عوامل ژنتیکی افزایش تحمل به بیوسایدهای ضدمیکروبی ۲۷
(۲-۱-۱۴) تایپینگ مولکولی انتروکوک ها ۲۷
(۲-۱-۱۴-۱) ERIC-PCR ۲۹
(۲-۲) مطالعات جهان ۲۹
(۲-۳) مطلعات ایران ۳۶
فصل سوم مواد و روش کار ۹
(۳-۱) گروههای مورد مطالعه ۱۷

(۳-۱-۱) حجم نمونه و روش نمونه گیری ۱۷
(۳-۲) روش گردآوری اطلاعات ۱۸
(۳-۳) محاسبات آماری ۱۸
(۳-۴) مواد، وسایل و دستگاه‌های مورد استفاده ۱۸
(۳-۴-۱) محیط کشت‌های مورد استفاده ۱۸
(۳-۴-۲) مواد مورد استفاده ۱۹
(۳-۴-۳) دستگاه‌های مورد استفاده ۲۱
(۳-۴-۴) وسایل مورد استفاده ۲۲
(۳-۵) محلول‌های مورد استفاده ۲۳
(۳-۵-۱) سرم فیزیولوژی ۲۳
(۳-۵-۲) استاندارد ۰/۵ مک فارلند ۲۴
(۳-۵-۳) بافر TBE ۲۵
(۳-۵-۴) محلول‌های ذخیره بیوسایدهای ضدمیکروبی ۲۵
(۳-۵-۵) محلول‌کاری پرایمرها ۲۷
(۳-۶) روش جداسازی و شناسایی ایزوله‌ها ۲۸
(۳-۶-۱) جداسازی ۲۸
(۳-۶-۱-۱) بررسی مستقیم ۲۸
(۳-۶-۱-۱-۱) رنگ آمیزی گرم ۲۸
(۳-۶-۲) تست های بیوشیمیایی ۲۹
(۳-۶-۲-۱) تست کاتالاز ۲۹
(۳-۶-۲-۲) فنیل الکل آگار (PEA) ۳۰
(۳-۶-۲-۳) تست هیدرولیز PYR ۳۰
(۳-۶-۲-۴) تست هیدرولیز اسکولین ۳۱
(۳-۷) تایید مولکولی ایزوله‌ها ۳۱
(۳-۸) ذخیره‌سازی ایزوله‌های تائید شده انتروکوک ۳۲
(۳-۹) تکثیر و ردیابی ژن‌های مورد مطالعه ۳۲
(۳-۹-۱) PCR ۳۳
(۳-۹-۲) تهیه DNA الگو ۳۳
(۳-۹-۲-۱) ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۳۳

(۳-۹-۳) نحوه تکثیر ژن‌های مورد مطالعه ۳۴
(۳-۹-۴) پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن های مورد مطالعه ۳۵
(۳-۱۰) تایپینگ مولکولی ایزوله‌ها ۳۸
(۳-۱۱) الکتروفورز محصول PCR..... ۴۰
(۳-۱۲) تعیین MIC ایزوله های انتروکوک به بیوسایدهای ضدمیکروبی ۴۲
(۳-۱۲-۱) تهیه بیوسایدهای ضدمیکروبی..... ۴۲
(۳-۱۲-۱-۱) توزین و محاسبه ی غلظت بیوسایدهای ضدمیکروبی ۴۲
(۳-۱۲-۲) تعیین MIC به روش رقت در آگار ۴۵
(۳-۱۲-۲-۱) محیط کشت..... ۴۶
(۳-۱۲-۲-۲) آماده سازی نمونه تلقیحی ۴۸
(۳-۱۲-۲-۳) گرمخانه گذاری پلیت‌ها ۴۸
(۳-۱۲-۲-۴) قرائت پلیت‌ها و تعیین MIC ۴۹
(۳-۱۳) تعیین میزان ECOFF
(۳-۱۴) آنالیز آماری
فصل چهارم نتایج..... ۱۷
(۴_۱) تعیین هویت مولکولی و توضیع فراوانی ایزوله های انتروکوک به تفکیک منبع جداسازی..... ۲
(۴_۲) نتایج MIC به روش آگار دایلوشن..... ۴
(۴-۲-۱) نتایج تعیین MIC ترکیب فرمالدهید ۵
(۴-۲-۲) نتایج تعیین MIC ترکیب بنزآلکونیوم کلرید ۸
(۴-۲-۳) نتایج تعیین MIC ترکیب تریکلوسان..... ۱۱
(۴-۲-۴) نتایج تعیین MIC ترکیب کلرهگزیدین دی گلوکونات ۱۴
(۴_۳) مقایسه MIC_{90} ،MIC_{50} و ECOFF بیوسایدهای ضدمیکروبی انتروکوکوس فکالیس با انتروکوکوس فاسیوم..... ۱۶
(۴_۴) ردیابی ژن‌های کدکننده عوامل تحمل به بیوسایدهای ضدمیکروبی ۱۷
(۴_۵) نتایج تعیین ژنهای عامل تحمل به بیوسایدهای ضدمیکروبی و ارتباط آن با میزان MIC ۲۱

(۴_۶) تایپینگ مولکولی ایزوله‌ها با استفاده از روش ERIC- PCR ۲۷

فصل پنجم بحث و نتیجه گیری.....۱

(۵_۱) بحث..... ۳

(۵_۲) نتیجه گیری.....۱۰

(۵_۳) پیشنهادات ۱۰

(۴-۵) محدودیت های مطالعه: ۱۱

منابع.....۱۱

ضمایم ۹

فهرست اشکال، جداول و نمودارها

شکل (۲-۱) تصویر مولکولی ترکیب فرمالدهید ۲۲

شکل (۲-۲) تصویر مولکولی ترکیب بنزآلکونیوم کلرید ۲۳

شکل (۲-۳) تصویر مولکولی ترکیب تریکلوسان ۲۳

شکل (۲-۴) تصویر مولکولی ترکیب کلرهگزیدین دی گلوکونات.....۲۴

شکل (۱-۳) تصویر آزمایش تولید کاتالاز - تشکیل حباب بیانگر نتیجه مثبت می‌باشد. ۲۹

شکل (۳-۲) تصویرآزمایش هیدرولیز اسکولین. ۳۱

جدول (۳-۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده در ردیابی ژنهای *DDLE.FAECALIS* و *DDLE.FAECIUM* ۳۲

جدول (۳-۲) توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن های عوامل تحمل به بیوسایدهای ضدمیکروبی. ۳۶

جدول (۳-۳) محتوای واکنش PCR برای تکثیر ژن‌های مورد مطالعه. ۳۷

جدول (۳-۴) برنامه تکثیر ژن‌های مورد مطالعه در واکنش PCR. ۳۷

جدول (۳-۵) مواد استفاده شده در واکنش PCR برای واکنش ERIC-PCR. ۳۸

جدول (۳-۶) برنامه تکثیر واکنش ERIC-PCR.....۳۹

شکل (۳-۳) تصویر آمایش تعیین MIC بیوسایدهای ضدمیکروبی.....۴۹

شکل (۴-۱) تصویر نمونه‌ای از نتیجه آزمایش PCR . M؛ مارکر وزن مولکولی، ۱؛ ژن *DDLE.FAECIUM* و ؛ ژن *DDLE.FAECALI*.....۳

جدول (۴-۱) فراوانی توزیع ایزوله‌های انتروکوکوس فاسیوم و فکالیس جدا شده بر حسب منابع.....۴

جدول (۴-۲) MIC ترکیب فرمالدهید در ایزوله های انتروکوکوس فکالیس.....۶

جدول (۴-۳) MIC ترکیب فرمالدهید در ایزوله های انتروکوکوس فاسیوم.....۶

جدول (۴-۴) MIC ترکیب بنزآلکونیوم کلرید در ایزوله های انتروکوکوس فکالیس.....۹

جدول (۴-۵) MIC ترکیب بنزآلکونیوم کلرید در ایزوله های انتروکوکوس فاسیوم.....۹

جدول (۴-۶) MIC ترکیب تریکلوسان در ایزوله های انتروکوکوس فکالیس ۱۲

جدول (۴-۷) MIC ترکیب تریکلوسان در ایزوله های انتروکوکوس فاسیوم ۱۳

جدول (۴-۸) MIC ترکیب کلرهگزیدین دی گلوکونات در ایزوله های انتروکوکوس فکالیس ۱۵

جدول (۴-۹) MIC ترکیب کلرهگزیدین دی گلوکونات در ایزوله های انتروکوکوس فاسیوم۱۵

شکل(۴-۲) نمونه تصویر ژل الکتروفورز-محصولات PCR ژن ها عامل تحمل به بیوسایدهای ضد میکروبی.....۱۹

جدول (۴-۱۰) فراوانی ژن های مورد مطالعه در ایزوله های انتروکوکوس فکالیس ۲۰

جدول (۴-۱۱) فراوانی ژن های مورد مطالعه در ایزوله های انتروکوکوس فاسیوم ۲۰

جدول (۴-۱۲) پروفایل ژنی ایزوله های انتروکوکوس فکالیس.....۲۲

جدول (۴-۱۳) پروفایل ژنی ایزوله های انتروکوکوس فاسیوم.....۲۵

شکل (۴-۳) نمونه‌ای از تصویر ژل محصول ERIC-PCR ۲۸

شکل (۴-۴) دندروگرام تشابه ژنومی سویه های انتروکوکوس فاسیوم ۲۹

شکل (۴-۵) دندروگرام تشابه ژنومی سویه های انتروکوکوس فکالیس ۳۰

شکل ۱. نمونه‌ای از توالی‌های باز شده ژن *GASP 65* به وسیله نرم‌افزار CHROMAS PRO ۲

شکل۲. نمونه‌ای از مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدهای زنجیره فوروارد ژن *GASP 65* با ژن اصلی در NCBI.....۲

شکل ۴. نمونه‌ای از مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدهای زنجیره فوروارد ژن *QAC A/B* با ژن اصلی در NCBI.....۲

شکل ۳. نمونه‌ای از توالی‌های باز شده ژن *QAC A/B* به وسیله نرم‌افزار CHROMAS PRO ۲

شکل ۶. نمونه‌ای از مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدهای زنجیره فوروارد ژن *QAC EV1* با ژن اصلی در NCBI.....۲

شکل ۵. نمونه‌ای از توالی‌های باز شده ژن *QAC EV1* به وسیله نرم‌افزار CHROMAS PRO ۲

شکل ۸. نمونه‌ای از مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدهای زنجیره فوروارد ژن *SIG V* با ژن اصلی در NCBI.....۲

شکل ۷. نمونه‌ای از توالی‌های باز شده ژن *SIG V* به وسیله نرم‌افزار CHROMAS PRO....۲

شکل ۱۰. نمونه‌ای از مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدهای زنجیره فوروارد ژن *EME A* با ژن اصلی در NCBI.....۲

شکل ۹. نمونه‌ای از توالی‌های باز شده ژن *EME A* به وسیله نرم‌افزار CHROMAS PRO .۲

شکل ۱۱. سه عدد از ژن های ثبت شده این تحقیق در سایت NCBI ۲

نمودار (۴-۱) مقایسه MIC_{90} و MIC_{50} بیوسایدهای ضدمیکروبی انتروکوکوس فکالیس با انتروکوکوس فاسیوم.....۱۷

نمودار (۴-۲) مقایسه پروفایل ژنی با MIC_{90} ایزوله های انتروکوکوس فکالیس ۲۴

نمودار (۴-۲) مقایسه پروفایل ژنی با MIC_{90} ایزوله های انتروکوکوس فکالیس ۲۶

اختصارات:

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

TSB: Trypticase Soy Broth

MHA: Muller Hinton Agar

CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute

PCR: Polymerase Chain Reaction

CFU: Colony Forming Unite

VRE: Vancomycin-Resistant Enterococci

ERIC: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

QAC: quaternary ammonium compounds

ECOFF: Biocides Epidemiological cutoff values

بررسی تحمل به بیوسایدهای ضدمیکروبی در ایزوله های انتروکوکوس فکالیس و فاسیوم جدا شده از نمونه های انسانی و محیطی اردبیل در سال ۱۳۹۸

چکیده:

مقدمه و هدف: انتروکوکها از شایعترین علل عفونتهای بیمارستانی در سراسر جهان هستند. از بیوسایدهای ضد میکروبی به طور گسترده ای در بیمارستان ها برای کنترل رشد میکروارگانیسم ها در سطوح مختلف استفاده می شود. هدف از این مطالعه تعیین تحمل نسبت به چهار بیوساید رایج ضد میکروبی شامل فرمالدئید (FOR) ، کلرید بنزالکونیوم (BZC) ، تریکلوزان (TRE) و کلرهگزیدین دی گلوکونات (CHDG) ، در ایزوله های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از منابع مختلف در اردبیل بود. علاوه بر این، فراوانی ژن های مرتبط با تحمل بیوسایدها (BTA genes)، *qacA / B*، *qacED1* ، *emeA*، *sigV* و *gasp65* و رابطه ژنتیکی احتمالی بین ایزوله ها بررسی شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه ، در مجموع ۲۲۲ ایزوله انتروکوکوس فکالیس و ۴۲۵ ایزوله انتروکوکوس فاسیوم که قبلاً طی دوره ی بین سالهای ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸ از منابع بالینی و غیر بالینی جمع آوری شده بود، وارد مطالعه گردید. حداقل غلظت مهاری (MIC) عوامل بیوساید با استفاده از روش رقت در آگار تعیین شد. مقادیر کات آف اپیدمیولوژیک (ECOFFs) بیوساید ها با استفاده از قانون ۹۵٪ تعیین شد. ژن های BTA با استفاده از تست PCR شناسایی شدند.

رابطه ژنتیکی بین ایزوله های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم با بکارگیری روش ERIC-PCR مشخص شد.

یافته ها: ECOFF برای CHDG، BZC، TRE و FOR به ترتیب برای هر دو گونه ۸ میکروگرم در میلی لیتر ، ۱۶ میکروگرم در میلی لیتر ، ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر و ۵۱۲ میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد. بر اساس مقادیر MIC90 ، میزان تحمل به سطوح بالای بیوسایدها در میان ایزوله های جدا شده از منابع مختلف به شکل معناداری متفاوت بود. ژنهای BTA ، *qacA / B*، *qacED1* ، *emeA*، *sigV* و *gasp65* به ترتیب در ۱۹/۴ ٪ ، ۱۹/۸ ٪، ۴۲/۸ ٪، ۸۹/۶ ٪ و ۷۰/۲ ٪ از ایزوله های انتروکوکوس فکالیس و ۱۰/۳ ٪ ، ۱۷/۲ ٪ ، ۲۷/۷ ٪، ۴۲/۲ ٪ و ۸۲/۸ ٪ از ایزوله های انتروکوکوس فاسیوم شناسایی شد. بر اساس الگوی توزیع ژنهایBTA ، ۱۴ و ۱۸ پروفایل مختلف بین ایزوله های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم شناسایی شد. به طور کلی، ایزوله های حامل حداقل یکی از ژنهای BTA مقادیر MIC_{90} بالاتری را در مقایسه با ایزوله های فاقد هیچکدام از ژن BTA نشان دادند. با این حال هیچ ارتباط واضحی بین مقادیر MIC_{90}و حمل پروفایل خاصی از ژنهای BTA مشهود نبود.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه می تواند به عنوان بخشی از یک مطالعه جهانی برای تعیین نقطه شکست مقاومت در برابر بیوسیدها مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فاسیوم، بیوساید های ضـدمیکروبی، ژن های مرتبط با تحمل بیوسایدها ، کات آف اپیدمیولوژیک