دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته میکروب شناسی

عنوان:

بررسی فراوانی اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ در ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

نگارش:

پرستو عاشوری

اساتید راهنما:

دکتر رقیه تیمورپور

دکتر هادی پیری دوگاهه

اساتید مشاور:

دکتر بهنام محمدی قلعه‌بین

دکتر سهیلا رفاهی

آذر ماه ۱۴۰۰

شماره پایان نامه: ۰۵۹

پرودگارا

نه می‌توانم موهایشان را که در راه عزت من سفید شد، سیاه کنم و نه برای دست‌های پینه بسته‌شان که ثمره تلاش برای افتخار من است، مرهمی دارم. پس توفیقم ده که هر لحظه شکر گزارشان باشم و ثانیه‌های عمرم را در عصای دست بودنشان بگذرانم.

تقدیم به پدر عزیزم

کوهی استوار و حامی من در طول تمام زندگی

تقدیم به مادر مهربانم

سنگ صبوری که الفبای زندگی به من آموخت

تقدیم به برادر عزیزم

تکیه‌گاه من در مواجهه با مشکلات، وجودش شادی‌بخش و صفایش مایه آرامش من است

با سپاس و تشکر ویژه از اساتید عزیز

و دلسوزم:

سرکار خانم دکتر رقیه تیمورپور

جناب آقای دکتر هادی پیری دوگاهه

جناب آقای دکتر بهنام محمدی قلعه‌بین

سرکار خانم دکتر سهیلا رفاهی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده:..... ۱

فصل اول مقدمه

۱-۱ مقدمه ۴

۱-۲ تعریف واژه‌ها ۷

۱-۳ اهداف و فرضیات طرح ۸

۱-۳-۱ هدف کلی طرح ۸
۱-۳-۲ اهداف اختصاصی طرح ۸
۱-۳-۳ اهداف کاربردی ۹
۱-۳-۴ فرضیات یا سؤالات تحقیق ۹

فصل دوم بررسی متون

۲-۱ مبانی نظری ۱۱

۲-۱-۱ اسینتوباکتر ۱۱
۲-۱-۱ تاریخچه ۱۱
۲-۱-۳ مورفولوژی و خصوصیات بیوشیمیایی ۱۳
۲-۱-۴ شناسایی گونه‌های اسینتوباکتر ۱۳
۲-۱-۵ زیستگاه و اپیدمیولوژی ۱۵
۲-۱-۶ فاکتورهای بیماری‌زایی ۱۸
۲-۱-۶-۱ کپسول ۱۹
۲-۱-۶-۲ سیدروفور ۲۰
۲-۱-۶-۳ بیوفیلم ۲۱
۲-۱-۶-۴ OMP ۲۲
۲-۱-۶-۵ لیپوپلی‌سکارید ۲۳
۲-۱-۶-۶ PBP ۲۳
۲-۱-۶-۷ فسفولیپازD و فسفولیپازC ۲۴
۲-۱-۶-۸ وزیکول‌های غشای خارجی ۲۴

۲-۱-۷ عفونت های اسینتوباکتر بومانی ۲۵
۱-۷-۱-۲ مننژیت ۲۵
۲-۷-۱-۲ عفونت‌های خون ۲۵
۳-۷-۱-۲ عفونت مجاری ادراری ۲۶
۴-۷-۱-۲ اندوکاردیت ۲۶
۵-۷-۱-۲ پنومونی کسب شده از بیمارستان ۲۷
۶-۷-۱-۲ پنومونی کسب شده از جامعه ۲۷
۷-۷-۱-۲ عفونت پوست، بافت نرم و استخوان ۲۷
۸-۷-۱-۲ سایرعفونت‌ها ۲۸
۲-۱-۸ درمان ۲۹
۱-۸-۱-۲ داروهای خط اول برای سویه‌های حساس ۲۹
۲-۸-۱-۲ داروهای جایگزین برای درمان سویه‌های مقاوم: ۳۰
۱-۲-۸-۱-۲ پلی‌میکسین ۳۰
۲-۲-۸-۱-۲ ماینوسایکلین ۳۱
۳-۲-۸-۱-۲ تایگ سایکلین ۳۱
۳-۸-۱-۲ درمان ترکیبی ۳۲
۲-۱-۹ عفونت‌های بیمارستانی ۳۳
۲-۱-۱۰ اینتگرون ۳۵
۱-۱۰-۱-۲ اینتگرون کلاس۱ ..... ۳۷
۲-۱۰-۱-۲ اینتگرون کلاس۲ ..... ۳۸
۳-۱۰-۱-۲ اینتگرون کلاس۳ ..... ۳۹
۴-۱۰-۱-۲ سایت نوترکیب اختصاصی ۴۰
۵-۱۰-۱-۲ سایت گیرنده ۴۱
۲-۱-۱۱ کاست‌های ژنی ۴۲
۱-۱۱-۱-۲ ساختار کاست‌های ژنی ۴۳
۲-۱۱-۱-۲ بیان کاست‌های ژنی ۴۴
۲-۱-۱۲ کینولون‌ها ۴۶
۱-۱۲-۱-۲ ساختار کینولون‌ها ۴۸
۲-۱۲-۱-۲ مکانیسم های فعالیت ۵۰
۳-۱۲-۱-۲ مکانیسم‌های مقاومت ۵۰
۴-۱۲-۱-۲ جهش در ژن‌های کروموزومی ۵۱
۵-۱۲-۱-۲ کسب پلاسمیدهای حامل ژن‌های مقاومت ۵۲
۱-۵-۱۲-۱-۲ Qnr ۵۲
۲-۵-۱۲-۱-۲ aac(6′)-Ib-cr ۵۲
۳-۵-۱۲-۱-۲ qep ۵۳
۲-۱-۱۳ تایپینگ مولکولی ۵۳
۱-۱۳-۱-۲ تایپینگ نمونه‌ها با استفاده از روش ERIC-PCR ۵۴

۲-۲ مطالعات در جهان ۵۵

۲-۳ مطالعات در ایران ۶۵

فصل سوم مواد و روش کار

۳-۱ گروههای مورد مطالعه ۷۴

۳-۱-۱ حجم نمونه و روش نمونه گیری ۷۴

۳-۲ روش گردآوری اطلاعات ۷۵

۳-۳ محاسبات آماری ۷۵

۳-۴ مواد، وسایل و دستگاه‌های مورد استفاده ۷۵

۳-۴-۱ محیط کشت‌های مورد استفاده ۷۵

۳-۴-۲ مواد مورد استفاده ۷۶

۳-۴-۳ دستگاه‌های مورد استفاده ۷۹

۳-۴-۴ وسایل مورد استفاده ۸۰

۳-۵ محلول‌های مورد استفاده ۸۱

۳-۵-۱ سرم فیزیولوژی ۸۱

۳-۵-۲ استاندارد ۰/۵ مک فارلند ۸۱

۳-۵-۳ بافرTBE ۸۳

۳-۵-۴ محلول‌کاری پرایمرها ۸۳

۳-۶ روش جداسازی و شناسایی ایزوله‌ها ۸۳

۳-۶-۱ شناسایی بیوشیمیایی سویه‌ها ۸۳

۳-۶-۲ ذخیره‌سازی نمونه‌های تایید شده اسینتوباکتر ۸۶

۳-۷ تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک آگار دیفیوژن ۸۷

۳-۷-۱ MIC ۸۸

۳-۷-۲ تهیه آنتی بیوتیک‌ها ۸۹

۳-۷-۳ توزین پودرهای آنتی بیوتیک ۸۹

۳-۷-۴ محیط کشت ۹۰

۳-۷-۵ آماده‌سازی و نحوه تلقیح نمونه بر روی محیط ۹۱

۳-۷-۶ تعیین MIC ۹۲
۳-۸ روش استخراج DNA کروموزومی ۹۳
۳-۹ شناسایی ژن RECو AB-ITS برای تایید جنس وگونه اسینتوباکتر ۹۴
۳-۱۰ تکثیر ژن‌های مورد مطالعه ۹۶
۳-۱۱ تایپینگ نمونه‌ها با استفاده از روش ERIC-PCR ۹۹
۳-۱۲الکتروفورز محصولات PCR ۱۰۰
۳-۱۳ آنالیز آماری ۱۰۱
۳-۱۴ جدول متغیرها ۱۰۲
۳-۱۵ ملاحظات اخلاقی ۱۰۲

فصل چهارم نتایج

۴-۱ نتایج اطلاعات دموگرافی ۱۰۳
۴-۱-۱ فراوانی متغیرها ۱۰۳
۴-۱-۲ بررسی رابطه بین متغیرهای اندازه‌گیری شده ۱۰۹
۴-۲ تایید نهایی جنس و گونه سویه‌های اسینتوباکتر ۱۱۵
۴-۳ نتایج تعیین الگوی حساسیت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی ۱۱۶
۴-۴ نتایج تعیین MIC سیپروفلوکساسین ۱۲۰
۴-۵ فراوانی اینتگرون‌ها ۱۲۲
۴-۶ نتیجه بررسی جهش در ژن‌های GYRA و PARC ۱۲۵
۴-۷ نتیجه بررسی ژن‌های AAC(6′)-IB-CR , QNRA, QEPA ۱۲۵
۴-۸ نتایج تایپینگ ERIC PCR ۱۳۱

فصل پنجم بحث و نتیجه گیری

۵-۱ بحث ۱۳۴
۵-۲ محدودیت‌های مطالعه ۱۴۰
۵-۳ نتیجه‌گیری ۱۴۱
۵-۴ پیشنهادات ۱۴۲
منابع
ضمایم
۶-۱ پرسشنامه ۱۵۵

فهرست اشکال، جداول و نمودارها

شکل ۱-۲ قسمت '۵ حفاظت شده ۳۶

شکل ۲-۲ ساختمان اینتگرون کلاس۱..... ۳۸

شکل ۳-۲ ساختمان پایه کینولون‌ها..... ۴۹

شکل ۱-۳ رشد کلنی‌های *اسینتوباکتر بومانی* بر روی محیط EMB آگار ۸۴

شکل ۲-۳ رشد سویه‌های *اسینتوباکتر* بر روی محیط OF از سمت راست (منفی)، سمت چپ (مثبت) ... ۸۵

شکل ۳-۳ رشد سویه‌های *اسینتوباکتر* بر روی محیط‌های تشخیصی افتراقی به‌ترتیب از سمت راست به چپ محیط SIM (حرکت منفی، H2S منفی و اندول منفی)، محیط سیمون سیترات (سیترات مثبت)، محیط TSI (ALK/ALK). ۸۵

شکل ۴-۳ تست اوره‌آز: A, B, E,F, G, SH, H (اوره آز مثبت)، C (اوره‌آز منفی)..... ۸۶

شکل ۵-۳ تصاویر آمایش تعیین MIC آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین..... ۹۲

جدول ۱-۳ توالی پرایمرهای استفاده شده در تکثیر ژن REC و AB-ITSR ۹۴

جدول ۲-۳ مواد استفاده شده در واکنش MULTIPLEX PCR برای تکثیر ژن‌ها ۹۵

جدول ۳-۳ برنامه تکثیر ژن‌های *REC* و *AB-ITS* در واکنشMUTIPLEX PCR..... ۹۵

جدول ۴-۳ توالی پرایمرهای استفاده شده در تکثیر ژن‌های مورد مطالعه ۹۷

جدول ۵-۳مواد استفاده شده در واکنش PCR برای تکثیر ژن‌های مورد مطالعه..... ۹۸

جدول ۶-۳ برنامه تکثیر ژن‌های مورد مطالعه ۹۸

جدول ۷-۳ برنامه تکثیر ژن‌کاست اینتگرون کلاس۱ (*AADA1*) ۹۹

جدول ۸-۳ پرایمر مورد استفاده برای ERIC-PCR ۹۹

جدول ۹-۳ مواد استفاده شده در واکنش ERIC-PCR ۱۰۰

جدول ۱۰-۳ برنامه تکثیر ژن ERIC PCR ۱۰۰

جدول ۱۱-۳ متغیرها ۱۰۲

جدول۱-۴ فراوانی نوع نمونه‌های مورد مطالعه ۱۰۳

نمودار ۱-۴ نمودار میله ای توزیع فراوانی نوع نمونه های مورد مطالعه ۱۰۴

جدول ۲-۴ فراوانی جنسیت بیماران مبتلا به عفونت‌های اسینتوباکتر بومانی ۱۰۴

جدول ۳-۴ میانگین سن بیماران مبتلا به عفونت‌های اسینتوباکتر بومانی ۱۰۵

جدول ۴-۴ فراوانی مدت زمان بستری بیماران مبتلا به عفونت‌های اسینتوباکتر بومانی ۱۰۵

جدول ۵-۴ فراوانی بخش بستری بیماران مورد مطالعه ۱۰۷

نمودار ۳-۴ توزیع فراوانی بخش های بیمارستان ۱۰۷

جدول ۶-۴ فراوانی بیماری‌های زمینه‌ای و سابقه استفاده از سوند در بیماران مبتلا به عفونت‌های اسینتوباکتر بومانی ۱۰۸

جدول ۷-۴ میانگین سن بیماران مبتلا به عفونت‌های اسینتوباکتر بومانی ۱۰۹

جدول ۸-۴ ارتباط بین جنسیت بیماران مبتلا به عفونت‌های اسینتوباکتر بومانی و مدت زمان بستری ۱۱۰

نمودار ۴-۴ ارتباط بین جنسیت بیماران مبتلا به عفونت‌های اسینتوباکتر بو.مانی و مدت زمان بستری (P-VALUE<0.001) ۱۱۰

جدول ۹-۴ ارتباط بین مدت زمان بستری بیماران مورد مطالعه و بیماری فشار خون ۱۱۱

نمودار ۵-۴ ارتباط بین مدت زمان بستری بیماران مورد مطالعه و بیماری فشار خون (RHO=0.57, P-VALUE<0.001) ۱۱۲

جدول ۱۰-۴ ارتباط بین مدت زمان بستری بیماران مبتلا به عفونت‌های اسینتوباکتر و بخش بیمارستان ۱۱۳

نمودار ۶-۴ ارتباط بین مدت زمان بستری بیماران مبتلا به عفونت‌های اسینتوباکتر بومانی و بخش بیمارستان (P-VALUE<0.001) ۱۱۴

شکل ۱-۴ نتایج الکتروفورز محصول MUTIPLEX PCR برای شناسایی ژن‌های *REC* و *AB-ITS* ، ستون ۱: LADDER 100BP ، ستون ۲تا ۷ : *REC* (425 BP) و *AB-ITS* (208 BP)..... ۱۱۵

جدول۱۱-۴درصد فراوانی سویه های MDR ۱۱۶

جدول ۱۲-۴ رابطه بین اینتگرون کلاس ۱ و سویه‌های MDR..... ۱۱۷

جدول ۱۳-۴ رابطه بین اینتگرون کلاس ۲ و سویه‌های MDR..... ۱۱۷

جدول ۱۴-۴ رابطه بین سویه‌های MDR و بخش‌های بستری بیماران مبتلا به عفونت‌های اسینتوباکتر ۱۱۸

جدول ۱۵-۴ نتایج الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های مورد بررسی با روش دیسک آگار دیفیوژن ۱۱۹

جدول۱۶-۴ محدوده MIC سیپروفلوکساسین ۱۲۱

جدول ۱۷-۴ نتیجه تعیین MIC سیپروفلوکساسین ۱۲۲

شکل ۲-۴ نتایج الکتروفورز محصول PCR برای بررسی اینتگرون‌ها، ستون ۱: LADDER 100 BP ، ستون ۲: کنترل منفی، ستون ۳و۴ : *INT*1 (436 BP) و *INT*2 (788 BP) ۱۲۳

جدول ۱۸-۴ فراوانی اینتگرون‌ها ۱۲۳

شکل ۳-۴ اینتگرون کلاس ۱ ثبت شده این تحقیق در سایت NCBI ۱۲۴

شکل ۴-۴ ژن *AADA1* ثبت شده این تحقیق در سایت NCBI ۱۲۴

شکل ۴-۵ الکتروفورز محصول PCR برای شناسایی ژن‌های *INT*1 ، *GYRA* ، *PARC* و *AADA*1 ، ستون ۱و۶: LADDER 100BP ، ستون ۲تا۵: *INT*1 (436 BP) ، *GYRA* (541 BP) ، *PARC* (919 BP) و *AADA*1 (1100 BP) ۱۲۶

شکل ۴-۶ الکتروفورز محصول PCR برای بررسی ژن *AAC(6′)-IB-CR* ، ستون ۱: LADDER 100 BP ، ستون ۲تا۴ : ژن *AAC(6′)-IB-CR* (500 BP) ۱۲۷

شکل ۴-۷ نتیجه توالی‌یابی ژن *GYRA* در نرم‌افزار CHROMAS PRO ۱۲۷

شکل ۴-۸ توالی نوکلئوتیدی دارای جهش در ژن *GYRA* ۱۲۸

شکل ۴-۹ نتیجه توالی‌یابی ژن *PARC* در نرم افزار CHROMAS PRO ۱۲۸

شکل ۴-۱۰ توالی نوکلئوتیدی ژن *PARC* دارای جابه‌جایی G 206 E ۱۲۹

شکل ۴-۱۱ نتیجه توالی‌یابی ژن *PARC* فاقد جهش در نرم افزار CHROMAS PRO ۱۳۰

شکل ۴-۱۲ توالی نوکلئوتیدی ژن *PARC* فاقد جهش ۱۳۰

شکل ۴-۱۳ الکتروفورز محصولات ERIC-PCR ، ستون ۱ : LADDER 100 BP ، ستون ۲تا ۱۱ : سویه‌های مورد بررسی برای تایپینگ ۱۳۲

شکل ۴-۱۴ دندروگرام تشابه ژنومی سویه‌های اسینتوباکتر بومانی ۱۳۳

اختصارات:

ICU: Intensive Car Unit

ORF: Open Reading Frame

CS: Core Site

ICS: Inverse Core Site

CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

بررسی فراوانی اینتگرون‌های کلاس ۱ و ۲ در ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

چکیده:

زمینه: *اسینتوباکتر بومانی* یک کوکوباسیل گرم منفی و فرصت طلب است. این پاتوژن فرصت طلب مشکلات فراوانی را به دلیل مقاومت بالا ایجاد کرده است و به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه در سراسر جهان در نظر گرفته می‌شود. مطالعات مقاومت دارویی در این باکتری نشان داده است که تعدادی از ژن‌های مقاومت بر روی اینتگرون‌ها قرار دارند.

هدف: هدف از این مطالعه بررسی فراوانی اینتگرون‌های کلاس ۱ ، ۲ و ارتباط آن‌ها با مقاومت دارویی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی و توصیفی-تحلیلی ، تعداد ۱۰۰ ایزوله *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های امام خمینی و بوعلی شهر اردبیل طی سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۸ مورد بررسی قرار گرفت. بعد از تعیین هویت ایزوله‌ها با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها با روش دیسک دیفیوژن تعیین و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) سیپروفلوکساسین با روش آگار دایلوشن بر طبق پروتکل‌های CLSI مشخص گردید. بررسی حضور اینتگرون‌های کلاس ۱، ۲، ۳ و کاست ژنی مربوط به اینتگرون کلاس ۱ (*aadA1*) با تکنیک PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. علاوه بر این، در این مطالعه حضور جهش در ژن‌های *gyrA* ، *parC* و ژن‌های مقاومت به کینولون‌ها

aac(6')-Ib-cr , *qnrA*, *qepA* با روش PCR بررسی شد. رابطه ژنتیکی ایزوله‌ها با به‌کارگیری روش ERIC-PCR مشخص شد.

یافته‌ها: در این مطالعه میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها بین ۷۸٪-۱۰۰٪ بود. بیشترین میزان مقاومت در سفازولین ۱۰۰٪ ، سیپروفلوکساسین ۹۹٪ ، ایمیپنم ۹۹٪ ، سفوتاکسیم ۹۸٪ ، مروپنم ۹۸٪ ، سفتازیدیم ۹۷٪ ، سفپیم ۸۹٪ و به نسبت کم‌تر جنتامایسن ۸۲٪ ، آمیکاسین ۷۸٪ و بیشترین میزان حساسیت در پلی‌میکسین B (۱۰۰٪) مشاهده شد. ۹۹٪ از سویه‌ها MDR بودند. اینتگرون کلاس ۱ نسبت به اینتگرون کلاس ۲ فراوانی بیشتری را در بین سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* نشان داد. اینتگرون کلاس ۱ و ۲ به‌ترتیب ۷۰٪ و ۲۱ ٪ مشاهده شد، اما اینتگرون کلاس ۳ در هیچ‌یک از سویه‌ها مشاهده نشد. بین سویه‌های MDR و اینتگرون کلاس ۱ (P-valu=0.243) ، اینتگرون کلاس ۲ (P-valu=0.915) ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد. کاست ژنی اینتگرون کلاس ۱ (*aadA1*) در ۷۰ سویه‌ای که حامل اینتگرون کلاس ۱ بودند، مشاهده شد. بر اساس نتایج MIC، ۹۸٪/۹ از سویه‌ها مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. از ۶ سویه *اسینتوباکتر بومانی* که در محدوده MIC≥1024 µg/ml سیپروفلوکساسین بودند، یک جهش با جایگزینی منفرد (S83L) در ژن *gyrA* مشاهده شد، اما هیچ جهشی در ژن *parC* مشاهده نشد. ژن *aac(6')-Ib-cr* در ۲ سویه شناسایی شد، اما ژن‌های *qnrA* و *qepA* در هیچ سویه‌ای یافت نشد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های به‌دست آمده نشان داد که میزان مقاومت چند دارویی افزایش یافته است، هم‌چنین شیوع بالای اینتگرون‌ها در بین ایزوله‌های بالینی مشاهده شد. ارتباط معنی‌داری بین اینتگرون کلاس ۱، ۲ و مقاومت چند دارویی مشاهده نشد. پلی‌میکسین B

موثرترین دارو علیه ایزوله‌ها بود. یافته‌های ما ضرورت نظارت مداوم بر مقاومت‌ها، رعایت دستورالعمل‌های بهداشتی و تجویز دوز مناسب داروها جهت جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم را نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: *اسینتوباکتر بومانی*، عفونت‌های بیمارستانی، اینتگرون، PCR