



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته میکروب شناسی پزشکی

عنوان:

بررسی الگویی مقاومت آنتی بیوتیکی و پروفایل ژن های ویروالانس
سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بخش های مختلف بیمارستان های آموزشی
اردبیل در سال ۱۳۹۸

نگارش:

سید علی بازقندی

استاد راهنما:

دکتر فرزاد خادمی

اساتید مشاور:

دکتر محسن ارزنلو

دکتر هادی پیری دوگانه

شماره پایان نامه:

۰۶۷

دی ماه ۱۴۰۰

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی آذربایجان

بسمه تعالی

گواهی اصالت پایان نامه

اینجانب *مسئول قفسه* دانشجوی مقطع *کارشناسی ارشد* رشته *فیزیولوژی*
دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تایید می‌نمایم که :

- این پایان نامه بر اساس نتایج بررسیها/ تحقیقات انجام یافته توسط اینجانب تحت راهنمای خانم آقای دکتر *فراخانی* بوده و بوسیله خودم انشا گردیده است و در صورت استفاده از نتایج پژوهش‌ها و یا آثار دیگران بلافاصله به مرجع مورد استفاده استناد شده است و در قسمت منابع و مأخذ مشخصات مرجع به طور کامل ذکر گردیده است.
- مسئولیت صحت مطالب مندرج در این پایان‌نامه به طور کامل با اینجانب است.
- این پایان نامه قبلاً برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم سطح، پایین‌تر یا بالاتر) در سایر دانشگاه‌ها و موسسات آموزش عالی ارائه نشده است.
- کتب، حقوق مادی و معنوی این پایان‌نامه و هر گونه، متصل مستخرج از آن اعم از مقالات، چاپ کتاب و تیت اختراع به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تعلق دارد و هرگونه استفاده از اطلاعات و یا نتایج، واگذاری اطلاعات به افراد دیگر، چاپ، تکثیر، نسخه‌برداری، ترجمه و اقتباس از این پایان‌نامه بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه علوم پزشکی اردبیل ممنوع است.
- کلیه مقالات مستخرج از این پایان‌نامه تحت نام دانشگاه علوم پزشکی اردبیل (Ardabil University of Medical sciences) به عنوان وابستگی نویسنده اول یا مسئول و با اطلاع و اجازه تمامی اساتید راهنما و مشاور به چاپ رسیده یا خواهد رسید.
- چنانچه در هر مقطع زمانی، خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن را می‌پذیرم و دانشگاه مجاز است با اینجانب مطابق با ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت برخورد قانونی، هیچ گونه ادعایی نخواهم داشت.

نام و نام خانوادگی دانشجو

امضا و تاریخ

- بدینوسیله اصالت و صحت نتایج این پایان‌نامه مورد تایید اینجانب،
.....استاد/اساتید راهنما می‌باشد.

نام و نام خانوادگی استاد/اساتید راهنما

امضا و تاریخ

Handwritten signature and date: 1398/10/18

با درود فراوان به روح پر فتوح پدر بزرگوارم

تقدیم به پدر و مادرم

که از نگاهشان صلابت

از رفتارشان محبت

واز صبرشان ایستادگی را آموختم

تقدیم به همسرم

اسطوره زندگیم، پناه خستگیم و امید بودم

بر خود واجب می‌دانم از استاد فرزانه **جناب آقای دکتر فرزاد خادمی** که به عنوان استاد راهنما در مراحل مختلف این پایان‌نامه همواره با سعه صدر و گشاده رویی در کنار من بودند و در طول مدت تحصیل از راهنمایی‌های اخلاقی و علمی ایشان بهره جسته‌ام تشکر و قدردانی نمایم.

جناب آقای دکتر محسن ارزنلو و جناب آقای دکتر هادی پیری دوگانه به عنوان اساتید مشاور مسئولیت سنگینی را قبول زحمت فرمودند: و مطمئناً بدون حمایت‌ها، راهنمایی‌ها و روحیه بخشی این دو عزیز، انجام بخش مهمی از این رساله میسر نمی‌شد. بدین وسیله از بزرگواری، حسن سلوک و حمایت بی دریغشان تشکر کرده و برای هر دو عزیز طول عمر توام با سربلندی را آرزومندم

فهرست مقالات منتشر شده از پایان نامه (در صورت وجود)

1. Bazghandi SA, Arzanlou M, Peeridogaheh H, Vaez H, Sahebkar A, Khademi F. Prevalence of Virulence Genes and Drug Resistance Profiles of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Clinical Specimens. Jundishapur Journal of Microbiology. 2021 Aug 31;14(8): e118452.
2. Bazghandi SA, Safarirad S, Arzanlou M, Peeri-Dogaheh H, Ali-Mohammadi H, Khademi F. Prevalence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in Ardabil. J Ardabil Univ Med Sci. 2021;20(2):280–6. Persian. doi: 10.52547/jarums.20.2.280.
3. Namaki M, Habibzadeh S, Vaez H, Arzanlou M, Safarirad S, Bazghandi SA, Sahebkar A, Khademi F. Prevalence of resistance genes to biocides in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Molecular Biology Reports. (2021). <https://doi.org/10.1007/s11033-021-07032-2>.
4. Bazghandi SA, Safarirad S, Khademi F. Prevalence of MDR, XDR and PDR *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimens in Ardabil (2020-2021). (Congress Abstract)
5. Submission of the nucleotide sequences in the GenBank database (the accession numbers: OK146924 to OK146931).

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده	۱
فصل اول: مقدمه	
۱-۱ مقدمه	۳
۱-۲ اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق	۶
۳-۱ اهداف و فرضیات طرح	۷
۱-۳-۱ هدف کلی طرح	۷
۲-۳-۱ اهداف اختصاصی طرح	۷
۳-۳-۱ فرضیات	۸
۴-۱ تعریف واژه های اختصاصی	۹
فصل دوم: بررسی متون	
۱-۲ مبانی نظری	۱۱
۱-۱-۲ تاریخچه سودوموناس آئروژینوزا	۱۱
۲-۱-۲ طبقه بندی سودوموناس آئروژینوزا	۱۲
۳-۱-۲ خصوصیات عمومی سودوموناس آئروژینوزا	۱۳
۴-۱-۲ ژنتیک باکتری سودوموناس آئروژینوزا	۱۴
۵-۱-۲ ساختمان آنتی ژنیک	۱۵
۶-۱-۲ متابولیسم	۱۵
۷-۱-۲ خصوصیات بیوشیمیایی	۱۶
۸-۱-۲ بیوفیلم	۱۶

- ۱۸-۹-۱-۲ فاکتورهای ویروالانس باکتری درگیر در بیماریزایی ۱۸
- ۱۸-۱-۹-۱-۲ فاکتورهای بیماریزای سطح سلولی ۱۸
- ۱۹-۱-۹-۱-۲ فلاژل ۱۹
- ۱۹-۱-۹-۱-۲ پیلی ۱۹
- ۲۰-۱-۹-۱-۲ لیپوپلی ساکارید ۲۰
- ۲۱-۱-۹-۱-۲ آلرژینات ۲۱
- ۲۲-۲-۹-۱-۲ فاکتورهای بیماریزایی ترشحاتی ۲۲
- ۲۲-۱-۲-۹-۱-۲ پیوسیانین ۲۲
- ۲۲-۲-۲-۹-۱-۲ پیووردين ۲۲
- ۲۳-۱-۲-۹-۱-۲ آلکالین پروتئاز ۲۳
- ۲۳-۴-۲-۹-۱-۲ پروتئاز IV ۲۳
- ۲۳-۵-۲-۹-۱-۲ الاستاز ۲۳
- ۲۴-۶-۲-۹-۱-۲ فسفولپاز C ۲۴
- ۲۴-۷-۲-۹-۱-۲ رامنولپید ها ۲۴
- ۲۵-۸-۲-۹-۱-۲ اگزوتوکسین A ۲۵
- ۲۵-۳-۹-۱-۲ سیستم ترشحاتی تیپ ۳ ۲۵
- ۲۶-۱۰-۱-۲ بیماریزایی سودوموناس آئروژینوزا ۲۶
- ۲۷-۱۱-۱-۲ عفونت های سودوموناس آئروژینوزا ۲۷
- ۲۷-۱-۱۱-۱-۲ باکتری می ۲۷
- ۲۸-۲-۱۱-۱-۲ عفونت های دستگاه تنفسی ۲۸
- ۲۸-۳-۱۱-۱-۲ عفونت استخوان و مفاصل ۲۸
- ۲۹-۴-۱۱-۱-۲ عفونت دستگاه ادراری ۲۹
- ۳۰-۵-۱۱-۱-۲ عفونت گوش ۳۰
- ۳۰-۶-۱۱-۱-۲ عفونت چشم ۳۰
- ۳۰-۷-۱۱-۱-۲ عفونت پوست و بافت نرم ۳۰

- ۳۱ ۸-۱۱-۲-۲ سیستمیک فیبروزیس و سایر عفونت ها
- ۳۱ ۱۲-۱-۲ اپیدمیولوژی
- ۳۲ ۱۳-۱-۲ تشخیص
- ۳۲ ۱۴-۱-۲ درمان بیماری های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا
- ۳۳ ۱۵-۱-۲ آنتی بیوتیک ها
- ۳۴ ۱-۱۵-۱-۲ آنتی بیوتیک های غیر بتا-لاکتام
- ۳۴ ۱-۱-۱۵-۲-۲ آمینوگلیکوزید ها
- ۳۵ ۲-۱۵-۱-۲ آنتی بیوتیک های بتا_لاکتام
- ۳۵ ۱-۲-۱۵-۲-۲ پنی سیلین ها
- ۳۶ ۲-۲-۱۵-۲-۲ سفالوسپورین ها
- ۳۷ ۳-۲-۱۵-۲-۲ کارباپنم ها
- ۳۷ ۴-۲-۱۵-۲-۲ مونوباکتام ها
- ۳۸ ۱۶-۱-۲ مقاومت آنتی بیوتیکی
- ۳۸ ۱-۱۶-۱-۲ مکانیسم های مقاومت
- ۴۰ ۲-۲ پروفایل ژن های بیماریزای سودوموناس آئروژینوزا
- ۴۳ ۳-۲ مطالعات خارج کشوری
- ۴۶ ۴-۲ مطالعات داخل کشوری

فصل سوم: مواد و روش کار

- ۵۰ ۱-۳ تهیه و جمع آوری نمونه
- ۵۰ ۲-۳ مواد، وسایل و دستگاه های مورد استفاده

۵۰ ۱-۲-۳ محیط های کشت مورد نیاز
۵۱ ۲-۲-۳ مواد مورد استفاده
۵۱ ۳-۲-۳ وسایل مورد نیاز
۵۲ ۴-۲-۳ دستگاه های مورد نیاز
۵۳ ۳-۳ محلول های مورد استفاده
۵۳ ۱-۳-۳ سرم فیزیولوژی
۵۴ ۲-۳-۳ استاندارد ۰/۵ مک فارلند
۵۴ ۳-۳-۳ بافر TBE
۵۵ ۴-۳-۳ محلول کاری پرایمر
۵۵ ۴-۳ روش های جداسازی و شناسایی ایزوله ها
۵۵ ۱-۴-۳ جداسازی
۵۶ ۲-۴-۳ بررسی مستقیم
۵۶ ۱-۲-۴-۳ رنگ آمیزی گرم
۵۷ ۳-۴-۳ تست های بیوشیمیایی
۵۷ ۱-۳-۴-۳ تست اکسیداز
۵۸ ۲-۳-۴-۳ تست کاتالاز
۵۹ ۳-۳-۴-۳ تست اوره آز
۶۰ ۴-۳-۴-۳ تست اکسیداسیون - فرمنتاسیون
۶۰ ۵-۳-۴-۳ تست TSI
۶۱ ۶-۳-۴-۳ تست IMViC
۶۲ ۵-۳ تایید ژنوتیپی سویه ها
۶۳ ۶-۳ ذخیره سازی نمونه های تأیید شده سودوموناس آئروژینوزا
۶۴ ۷-۳ تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک آگار دیفیوژن
۶۵ ۸-۳ تکثیر و ردیابی پروفایل ژن های بیماریزا

۶۶.....	۱-۸-۳ پرایمر های مورد استفاده در مطالعه
۶۸.....	۹-۳ تهیه DNA الگو
۶۸.....	۱-۹-۳ استخراج DNA کروموزومی به روش جوشاندن
۶۹.....	۲-۹-۳ ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده
۷۰.....	۳-۹-۳ الکتروفورز محصولات PCR

فصل چهارم: نتایج

۷۲.....	۱-۴ تعیین هویت سویه های سودوموناس آئروژینوزا
۷۲.....	۲-۴ ویژگی بیماران و نمونه ها
۷۳.....	۳-۴ پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی
۷۵.....	۴-۴ پروفایل ژن های بیماریزا

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۸۱.....	۱-۵ بحث
۸۶.....	۲-۵ محدودیت های مطالعه
۸۷.....	۳-۵ نتیجه گیری
۸۸.....	۵-۵ پیشنهادات
۹۰.....	منابع
۹۸.....	ضمایم

فهرست اشکال، جداول و نمودارها

- شکل ۳-۱ تولید پیگمان سبز رنگ توسط سودوموناس آئروژینوزا ۵۶
- شکل ۳-۲ رنگ آمیزی گرم سودوموناس آئروژینوزا ۵۷
- شکل ۳-۳ تست اکسیداز ۵۸
- شکل ۳-۴ تست کاتالاز ۵۸
- شکل ۳-۵ تست اوره آز ۵۹
- شکل ۳-۶ تست اکسیداسیون ۶۰
- شکل ۳-۷ تست TSI و IMViC در سودوموناس آئروژینوزا ۶۲
- جدول ۳-۱ توالی پرایمر های جهت شناسایی سودوموناس آئروژینوزا ۶۳
- شکل ۳-۸ تایید ژنوتیپی سودوموناس آئروژینوزا ۶۳
- شکل ۳-۹ سویه استاندارد ATCC 27853 سودوموناس آئروژینوزا ۶۵
- جدول ۳-۲ پرایمر های استفاده شده ۶۶
- جدول ۳-۳ محتوای واکنش PCR برای ژن های مورد مطالعه ۶۷
- جدول ۳-۴ برنامه تکثیر ژن های مورد مطالعه در واکنش PCR ۶۷

شکل ۳-۱۰ دستگاه نانو درآپ	۶۹
شکل ۳-۱۱ مراحل الکتروفورز	۷۱
شکل ۴-۱ بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن	۷۴
جدول ۴-۱ بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های سودوموناس آئروژینوزا	۷۴
جدول ۴-۲ مشخصات ایزوله های جدا شده از بیمارستان	۷۸
شکل ۴-۲ نتایج الکتروفورز محصولات PCR	۷۹
شکل ۴-۳ نمونه ای از توالی سکانس شده ژن <i>ToxA</i> با استفاده از نرم افزار Chromas	
..... pro	۸۰

اختصارات:

TSI: Triple Sugar Iron Agar

PCR: Polymerase Chain Reaction

LPS: Lipopolysaccharide

PLC: Phospolipase

PLC-H: Phospolipase Hemolytic

PLC-N: Phospolipase Non Hemolytic

EXOS: Exo enzyme S

CTX: Cytotoxin

CFU: Colony Forming Unite

بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و پروفایل ژن های ویروالانس سودوموناس
آئروژینوزا جدا شده از بخش های مختلف بیمارستان های آموزشی اردبیل در سال

۱۳۹۸

چکیده

زمینه: مقاومت دارویی و ژن های فاکتورهای ویروالانس دو عامل کلیدی برای کلونیزاسیون سودوموناس آئروژینوزا در محیط هایی با فشار آنتی بیوتیکی بالا مانند بیمارستان ها و ایجاد عفونت های بیمارستانی هستند. هدف از این مطالعه بررسی شیوع مقاومت دارویی و پروفایل ژن های ویروالانس سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بخش های مختلف بیمارستان های اردبیل است.

مواد و روش ها: در این مطالعه، در مجموع تعداد ۸۴ سویه بالینی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران بستری شده در بیمارستان های اردبیل جمع آوری شد و با استفاده از تست های تشخیصی استاندارد آزمایشگاهی، سویه های باکتری بررسی و وارد مطالعه گردید. حساسیت آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن تعیین شد. برای شناسایی پروفایل ژن ها از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز یا PCR استفاده شد.

یافته ها: بیشترین و کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب مربوط به تیکاراسیلین-کلاوولانات با (۹۴ درصد) و دوریپنم با (۳۳/۳ درصد) تعیین شد. علاوه بر این، فراوانی سویه های مقاوم به چند دارو (MDR) هم ۵۵/۹ درصد تعیین شد. قابل ذکر است که شیوع ژن های فاکتور های ویروالانس به شرح زیر بود: ژن *algD* ۸۴/۵ درصد، ژن *lasB* ۸۶/۹

درصد، ژن *plcH* ۸۶/۹ درصد، ژن *plcN* ۸۶/۹ درصد، ژن *exoU* ۵۶ درصد، ژن *exoS* ۵۱/۲ درصد، ژن *toxA* ۸۱ درصد، ژن *nanI* ۱۳/۱ درصد و ژن *pilB* ۳۳/۳ درصد. در این مطالعه، ارتباط معنی داری بین مقاومت به برخی آنتی بیوتیک ها و شیوع ژن های فاکتورهای ویروالانس در سودوموناس آئروژینوزا مشاهده شد.

نتیجه گیری: نتایج ما شیوع بالایی از مقاومت آنتی بیوتیکی، به ویژه سویه های MDR، و ژن های مرتبط با فاکتورهای ویروالانس را در سویه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا در بیمارستان های اردبیل نشان داد. به دلیل مقاومت کم باکتری در برابر آنتی بیوتیک های دورپینم، جنتامایسین و توبرامایسین در این مطالعه، این آنتی بیوتیک ها برای درمان عفونت های ناشی از سویه های بسیار مقاوم و بیماریزای سودوموناس آئروژینوزا در شهر توصیه می شوند.

کلمات کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی بیوتیکی، فاکتورهای ویروالانس