دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکترای حرفه‌ای رشته پزشکی

عنوان:

بررسی مولکولی مقاومت به فلوروکینولون‌ها در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آنروژیلوزا در اردبیل

نگارش:

کیهان معرفی

استاد راهنما:

دکتر فرزاد خادمی

اساتید مشاور :

دکتر محسن ارزنلو

دکتر هادی پیری دوگاهه

دی ماه ۱۴۰۰

شماره پایان‌نامه:

۰۹۴۱

بسم الله الرحمن الرحيم

تقدیم

به اندیشه‌های پویا و جستجوگر

به دستان پرتلاش

به ذهنی همیشه آموزنده و آموزش دهنده

به قلبی مهربان و پر امید

به انسانی درستکار و سخت کوش

به شما اساتید عزیز که مرا در تهیه و تدوین این پایان نامه راهنمایی و یاری نمودید.

تقدیم به پدر و مادرم

که الفبای انسانیت و چگونه زیستن را به من آموختند

فهرست مقالات منتشر شده از پایان نامه

- Khademi F, Maarofi K, Arzanlou M, Peeri-Dogaheh H, Sahebkar A. Which missense mutations associated with DNA gyrase and topoisomerase IV are involved in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates resistance to ciprofloxacin in Ardabil?. Gene Reports. 2021 Sep 1;24:101211. [https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101211].
- ثبت توالی نوکلئوتیدی ژن *gyrA* در NCBI [MW446506 تا MW446535]
- ثبت توالی نوکلئوتیدی ژن *gyrB* در NCBI [MW465352 تا MW465381]
- ثبت توالی نوکلئوتیدی ژن *parC* در NCBI [MW623053 تا MW623082]
- ثبت توالی نوکلئوتیدی ژن *parE* در NCBI [MW485005 تا MW485034]

فهرست مطالب

عنوان .....صفحه

چکیده ۱

فصل اول: مقدمه ۳

۱ -۱- مقدمه ۴

۲ -۱- اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق ۷

۳ -۱- اهداف و فرضیات ۷

۱ -۳ -۱- هدف کلی ۷

۲ -۳ -۱- اهداف اختصاصی ۸

۴ -۱- سؤالات تحقیق ۸

۵ -۱- تعریف واژه ها ۹

فصل دوم: بررسی متون ۱۰

۱ -۲- مبانی نظری ۱۱

۱ -۱ -۲- سودوموناس آئروژینوزا ۱۱

۲ -۲- تاریخچه ۱۱

۳ -۲- فاکتورهای بیماریزایی ۱۴

۱-۳ -۲- ادهسین ها ۱۴

۲ -۳ -۲- کپسول پلی ساکاریدی (آلژینات) ۱۵

۳ -۳ -۲- لیپو پلی ساکارید ۱۶

۴-۳ -۲- فاکتورهای بیماریزای خارج سلولی ۱۶

۴ -۲- اپیدمیولوژی ۱۷

۵ -۲- مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۱۹
۱ -۵ -۲- پمپ‌های ایفلاکس ۲۰
۲ -۵ -۲- کانال‌های پورین ۲۱
۳ -۵ -۲- تولید آنزیم ۲۲
۶ -۲- فلوروکینولون ها ۲۳
۷ -۲- سیپروفلوکساسین ۲۵
۸ -۲- بررسی متون ۲۵
۱ -۸ -۲- مطالعات در ایران ۲۵
۲ -۸ -۲- مطالعات در جهان ۲۷
فصل سوم: مواد وشیوه اجرای تحقیق ۳۰
۱ -۳- محیط‌های کشت مورد استفاده ۳۱
۲ -۳- مواد مورد استفاده ۳۱
۳ -۳- وسایل مورد استفاده ۳۲
۴ -۳- دستگاه‌های مورد استفاده ۳۲
۵ -۳- محلول‌های مورد استفاده ۳۳
۱ -۵ -۳- سرم فیزیولوژی ۳۳
۲ -۵ -۳- استاندارد ۰/۵ مک فارلند ۳۴
۳ -۵ -۳- بافر TBE ۳۴
۴ -۵ -۳- محلول کاری پرایمر ۳۵
۶-۳- نوع مطالعه ۳۵
۷ -۳- تهیه و جمع‌آوری نمونه ۳۵

۸ -۳- روش گردآوری اطلاعات ۳۶
۹ -۳- روش‌های جداسازی و شناسایی ایزوله‌ها ۳۶
۱ -۹ -۳- جداسازی ۳۶
۲ -۹ -۳- بررسی مستقیم ۳۷
۳ -۹ -۳- تست‌های بیوشیمیایی ۳۸
۱۰ -۳- ذخیره سازی نمونه‌های تأیید شده *سودوموناس آئروژینوزا* ۴۴
۱۱ -۳- تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک آگار دیفیوژن ۴۵
۱۲ -۳- تکثیر و ردیابی ژن‌های *GYRA*، *GYRB*، *PARC* و *PARE* ۴۵
۱-۱۲ -۳- تهیهٔ DNA الگو ۴۶
۲ -۱۲ -۳- نحوه تکثیر ژن‌های *gyrA*، *gyrB*، *parC* و *parE* ۴۷
۳ -۱۲ -۳- پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه ۴۷
۴ -۱۲ -۳- الکتروفورز محصولات PCR ۴۹
۱۳ -۳- تایپینگ نمونه‌ها با استفاده از روش ERIC-PCR ۵۰
۱۴ -۳- الکتروفورز محصولات ERIC-PCR ۵۲
۱۵ -۳- تجزیه و تحلیل توالی ژن ها ۵۲
۱۶ -۳- آنالیز آماری ۵۳
۱۷ -۳- ملاحظات اخلاقی ۵۳
فصل چهارم: نتایج ۵۴
۱ -۴- نتایج اطلاعات دموگرافیک ۵۵
۲ -۴- ردیابی ژن‌های *GYRA*، *GYRB*، *PARC* و *PARE* در سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین ۵۶
۳ -۴- ردیابی جهش‌های نقطه‌ای در ناحیه QRDR ژن *GYRA* ۵۶

۴ -۴- ردیابی جهش‌های نقطه‌ای در ناحیه QRDR ژن GYRB ۵۹
۵ -۴- ردیابی جهش‌های نقطه‌ای در ناحیه QRDR ژن PARC ۵۹
۶ -۴- ردیابی جهش‌های نقطه‌ای در ناحیه QRDR ژن PARE ۶۲
۷ -۴- تایپینگ سویه‌ها با روش ERIC-PCR ۶۲
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ۶۴
۱ -۵- بحث ۶۵
۲ -۵- محدودیت ها ۶۸
۳ -۵- نتیجه‌گیری ۶۹
۴ -۵- پیشنهادات ۷۰
منابع ۷۱

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۳ توالی پرایمرهای مورد استفاده در شناسایی مولکولی *سودوموناس آئروژینوزا* ۴۳

جدول ۴-۳ برنامه تکثیر ژن‌های مورد مطالعه در واکنشPCR ۴۹

جدول ۵-۳ محتوای واکنش ERIC-PCR برای ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به سیپروفلوکساسین ۵۱

جدول ۶-۳ برنامه تکثیر توالی ژن های تکرار شونده ERIC در واکنش ERIC-PCR ۵۱

جدول ۷-۳ توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش ERIC-PCR ۵۲

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

شکل ۱ -۳ تولید پیگمان سبز رنگ توسط *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط سیتریماید آگار ۳۷

شکل ۲-۳ رنگ آمیزی گرم باسیل‌های گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* ۳۸

شکل ۳- ۳ تست اکسیداز مثبت در *سودوموناس آئروژینوزا* ۳۹

شکل ۴-۳ تست کاتالاز مثبت در *سودوموناس آئروژینوزا* ۳۹

شکل ۵-۳ تست اوره آز مثبت در *سودوموناس آئروژینوزا* ۴۰

شکل ۶-۳ تست اکسیداسیون مثبت در *سودوموناس آئروژینوزا* ۴۱

شکل ۷-۳ تست TSI و IMVIC در *سودوموناس آئروژینوزا* ۴۳

شکل ۸-۳ تایید ژنوتیپی *سودوموناس آئروژینوزا*. ستون ۱، ۲ و ۳: ژن *PAI*؛ ستون M: سایز مارکر (۱۰۰BP) ۴۴

شکل ۱-۴ نتایج الکتروفورز محصولات PCR در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به سیپروفلوکساسین بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون ۱: ژن *GYRB*؛ ستون ۲: ژن *PARC*؛ ستون ۳: ژن *PARE*؛ ستون ۴: ژن *GYRA*؛ ستون ۵: کنترل منفی؛ ستون M: سایز مارکر (۱۰۰BP) ۵۶

شکل ۲-۴ ردیابی جهش‌های نقطه‌ای در ناحیه QRDR ژن *GYRA* ۵۷

شکل ۳-۴ گراف حاصل از توالی یابی در ناحیه QRDR ژن *GYRA* ۵۸

شکل ۴-۴ تغییرات در سطح اسیدآمینه در زیر واحد GyrA ۵۸

شکل ۵-۴ گراف حاصل از توالی یابی در ناحیه QRDR ژن *GYRB* ۵۹

شکل ۶-۴ ردیابی جهش‌های نقطه‌ای در ناحیه QRDR ژن *PARC* ۶۰

شکل ۷-۴ گراف حاصل از توالی یابی در ناحیه QRDR ژن *PARC* ۶۰

شکل ۸-۴ تغییرات در سطح اسید آمینه در زیر واحد ParC ۶۱

شکل ۹-۴ مقاسیه چند نمونه از توالی‌های اسید آمینه زیر واحدهای GyrA آنزیم DNA ژیراز و ParCآنزیم توپوایزومراز IV در ایزوله‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین *سودوموناس آئروژینوزا* با سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1. (A)تغییرات اسید آمینه Thr83Ile و Asp87Asn در زیر واحد GyrA در آنزیم DNA ژیراز و (B) تغییرات اسید آمینه Ser87Leu، Ser87Trp و Ala88Pro در زیر واحد ParC در آنزیم توپوایزومراز IV. توالی‌های متفاوت با رنگ قرمز نشان داده شده است.....۶۱

شکل ۱۰-۴ گراف حاصل از توالی یابی در ناحیه QRDR ژن *parE* ۶۲

شکل ۱۱-۴ دندروگرام الگوهای ERIC-PCR روابط ژنتیکی بین ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به سیپروفلوکساسین را نشان می‌دهد. ایزوله‌های با بیشتر از ۸۰ درصد شباهت، سویه‌های مربوط به یک کلونی در نظر گرفته شدند. ۶۳

اختصارات:

ADP: Adenosine diphosphate

Asn:Aapargine

Asp:Aspartate

DNA: deoxyribonucleic acid

Gyr: gyrase

MDR: Multidrug Resistant

MEX:Multidrug efflux system

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

TSB: Trypticase Soy Broth

MHA: Muller Hinton Agar

CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute

CFU: Colony Forming Unite

ERIC: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

MIC:Minimum inhibitory concentration

Par: Pseodoautosomal Region

PCR: Polymerase Chain Reaction

RND: Resistance Nodulation Division

TBE:Tris Borate EDTA

XDR:Extended detection and response

بررسی مولکولی مقاومت به فلوروکینولون‌ها در ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* در اردبیل

چکیده

زمینه: سیپروفلوکساسین یکی از مؤثرترین آنتی بیوتیک ها در برابر عفونت های *سودوموناس آئروژینوزا*[1] است. بااین‌حال، شیوع جدایه های *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به سیپروفلوکساسین در جهان در حال افزایش است.

هدف: در مطاعه حاضر، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ، مکانیسم مقاومت به سیپروفلوکساسین و همچنین روابط کلونال در بین سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به سیپروفلوکساسین در اردبیل بررسی شد.

مواد و روش ها: با استفاده از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی، در مجموع ۸۴ جدایه *سودوموناس آئروژینوزا* از نمونه‌های بالینی در بیمارستان‌های شهر اردبیل جمع‌آوری شد. مقاومت این باکتری به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت. DNA ژنومی با روش جوشاندن استخراج شد. تکثیر ژن‌های *gyrA*، *gyrB*، *parC* و *parE* و تجزیه و تحلیل جهش‌های ژنی و تغییرات در سطح اسیدآمینه از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR[2]) و سنجش توالی[3] انجام شد. سرانجام، تنوع ژنتیکی جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به سیپروفلوکساسین با روش تایپینگ ERIC-PCR[4] تعیین شد.

یافته‌ها: میزان مقاومت *سودوموناس آئروژینوزا* به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین ۴۸/۸٪ بود. همچنین شایع ترین جهش‌ها در مناطق QRDR ژن‌های هدف شامل، Thr83Ile و Asp87Asn

[1] Pseudomonas aeruginosa
2 Polymerase Chain Reaction
3 Sequencing
4 Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction

در زیر واحد GyrA و Ser87Leu و Ser87Trp در زیر واحد ParC بود. هیچ تغییر اسید آمینه ای در زیر واحدهای GyrB و ParE در جدایه های *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به سیپروفلوکساسین وجود نداشت. علاوه بر این، سویه های مورد بررسی در این مطالعه به ۳۴ نوع الگوی ERIC-PCR تقسیم شدند که از این میان، نوع ۲۷ شایع ترین ژنوتیپ بود.

نتیجه‌گیری: مقاومت سودوموناس آئروژینوزا به سیپروفلوکساسین در مطالعه ما بالا بود و جهش های بدمعنا در مقاومت به سیپروفلوکساسین دخیل بودند از این رو پایش مستمر مقاومت سیپروفلوکساسین همراه با ژنوتیپ ایزوله های مقاوم و شناسایی سایر مکانیسم های مقاومت برای مدیریت بهتر عفونت های سودوموناس آئروژینوزا توصیه می شود.

واژه‌های کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، موتاسیون، سیپروفلوکساسین