دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه دکتری حرفه‌ای پزشکی

عنوان:

بررسی مقاومت به فلوروکینولون‌ها دربین ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل در سال ۱۳۹۹

نگارش:

پیمان جوهری

اساتید راهنما:

دکتر رقیه تیمورپور

دکتر جعفر محمدشاهی

اساتید مشاور:

دکتر هادی پیری دوگاهه

دکتر مجید اسمعیلی زاد

مهر ۱۴۰۱

شماره پایان‌نامه: ۰۹۸۱

بسم الله الرحمن الرحيم

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است;
به پاس قلب‌های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می‌گراید;
و به پاس محبت‌های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند;
این مجموعه را به پدر و مادر عزیزم تقدیم می‌کنم.

سپاس گزاری

بر خود واجب می‌دانم از استادان راهنما سرکار خانم دکتر تیمورپور و جناب آقای دکتر محمدشاهی که به عنوان استادان 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.

فهرست اختصارات

PCR: Polymerase Chain Reaction

CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute

MIC: Minimum inhibitory concentration

PMQR: plasmid-mediated quinolone resistance

QRDR: quinolone resistance determining regions

ESBL: extended-spectrum beta-lactamases

MDR: multi drug resistance

CRKP: carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae

COPD: chronic obstructive pulmonary diseases

UTI: urinary tract infection

KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemase

CPS: Capsular polysaccharides

LPS: Lipopolysaccharides

EMB agar: Eosin-methylene blue agar

TSI agar: Triple Sugar Iron agar

NDM-1: New Delhi metallo-ß-lactamase-1

VAP: Ventilator-associated Pneumonia

فهرست مندرجات و ضمایم

عنوان **صفحه**

چکیده ۱

۱-مقدمه ۴

۱-۱-مقدمه و بیان مسئله ----------۴

۱-۲-اهداف طرح: ----------۶

۱-۲-۱-هدف کلی طرح..... ۶

۱-۲-۲-اهداف اختصاصی طرح:..... ۶

۱-۳-سوالات طرح: ----------۶

۱-۴-تعریف واژه های اختصاصی: ----------۶

۲-مروری بر متون..... ۹

۲-۱-کلیات ----------۹

۲-۱-۱-کلبسیلا پنومونیه ۹

۲-۱-۲- فاکتورهای بیماری زای در گونه های کلبسیلا ۱۳

۲-۱-۳-تست های شناسایی کلبسیلا پنومونیه ۱۴

۲-۱-۴-مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۵

۲-۲-پیشینه تحقیق:----------۱۹

۳-مواد و روش کار..... ۲۲

۳-۱-نوع مطالعه:---------- ۲۲

۳-۲-جامعه آماری و روش نمونه گیری: ---------- ۲۲

۳-۳-متغیر ها:---------- ۲۳

۳-۴-روش تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی آماری:------Error! Bookmark not defined.

۳-۵-ملاحظات اخلاقی: ---------- ۲۳

۳-۶-طرح مطالعه ---------- ۲۴

۳-۷-جداسازی باکتری از نمونه ها---------- ۲۴

۳-۸-شناسایی فنوتیپیک ایزوله های کلبسیلا پنومونیه ---------- ۲۴

۳-۹-بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن---------- ۲۵

۳-۱۰-تعیین حداقل غلظت مهاری با روش آگار دایلوشن (MIC) ---------- ۲۷

۳-۱۰-۱-استخراج DNA کروموزومی ۲۹

۳-۱۰-۲-تهیه Tris-Hcl 100 mM..... ۲۹

۳-۱۰-۳-آماده سازی پرایمر ۳۰

۳-۱۰-۴-محاسبه دمای اتصال(Anneling)..... ۳۰

۳-۱۰-۵-الکتروفورز محصولات PCR..... ۳۱

۳-۱۰-۶- تهیه بافرTBE 10x ۳۲

۳-۱۰-۷-شناسایی موتاسیون در ژن های gyrA,parC و ارزیابی ژنهای مقاومت به کینولون با واسطه پلاسمید (PMQR) ۳۲

۴-یافته‌ها ۳۵

۴-۱-جمع آوری نمونه ها ---------- ۳۵

۴-۲-نتایج تست های فنوتیپی و مولکولی---------- ۳۵

۴-۲-۱-تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به تفکیک نوع نمونه..... ۳۵

۴-۲-۲-تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به تفکیک جنس..... ۳۶

۴-۳-میزان مقاومت ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به آنتی بیوتیک های مختلف به روش دیسک دیفیوژن---------- ۳۶

۴-۴-نتایج MIC سیپروفلوکسازین برای ایزوله های کلبسیلا پنومونیه ---------- ۳۷

۴-۵-نتیجه بررسی جهش در ژن‌های gyrA و parC---------- ۳۹

۴-۶-نتیجه بررسی ژن‌های aac(6′)-Ib-cr , qnrA, qepA---------- ۴۲

۵-بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادات ۴۶
۵-۱-بحث ---------- ۴۶
۵-۲-محدودیت‌های مطالعه: ----------۵۰
۵-۳-نتیجه گیری کلی: ----------۵۱
۵-۴-پیشنهادات: ---------- ۵۲
۶-منابع: ۵۴

فهرست جداول، اشکال و نمودارها

شکل۱-۲-کلبسیلا پنومونیه در نوترینت آگار ۹
جدول ۱-۳-جدول متغیرات ۲۳
جدول ۲-۳-مشخصات کلی آنتی بیوتیک های استفاده شده و معیارهای بررسی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی بر اساس CLSI..... ۲۶
جدول ۳-۳-مواد لازم برای واکنش PCR ۳۱
جدول ۴-۳- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن های gyrA, parCو PMQR..... ۳۲
جدول ۱-۴-تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به تفکیک نوع نمونه ۳۵
جدول ۲-۴-تعداد ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به تفکیک جنس ۳۶
جدول ۳-۴-میزان مقاومت ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به آنتی بیوتیک های مختلف به روش دیسک دیفیوژن ۳۶
شکل ۱-۴-نمونه ای از نتایج آنتی بیوگرام برای ایزوله های کلبسیلاپنومونیه ۳۷
جدول ۴-۴-محدوده MIC سیپروفلوکساسین..... ۳۸
شکل ۳-۴-تصویر آمایش تعیین MIC آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین..... ۳۹
شکل ۴-۴-نتیجه alighnment توالی هالی خوانش شده با توالی رفرانس در بانک ژن..... ۴۰
شکل ۵-۴-الکتروفورز محصول PCR برای بررسی ژن gyrA ۴۱
شکل ۶-۴-الکتروفورز محصول PCR برای بررسی ژن parC..... ۴۲
جدول ۵-۴-فراوانی ژنهای PMQR..... ۴۳
شکل ۷-۴-نتیجه توالی یابی ژن aac(6′)-Ib-cr با نرم افزار chromas v.2.6.4 ..... ۴۳
شکل ۸-۴-الکتروفورز محصول PCR برای بررسی ژن aac(6′)-Ib-cr ۴۴

بررسی مقاومت به فلوروکینولون‌ها در بین ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل در سال ۱۳۹۹

چکیده

زمینه: کلبسیلا پنومونیه از عوامل مهم عفونت بیمارستانی و یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده پنومونی مرتبط با ونتیلاتور می‌باشد. به غیر از پنومونی این باکتری می‌تواند عامل طیف گسترده‌ای از عفونت‌ها مانند عفونت زخم، کوله سیستیت، مننژیت، سپتی‌سمی، استئومیلیت، اسهال و عفونت ادراری باشد. مقاومت آنتی بیوتیکی یکی از چالش های مهم درمان عفونت ناشی از باکتری‌ها از جمله کلبسیلا پنومونیه میباشد.

هدف: در طی پژوهش حاضر مقاومت به فلوروکینولون‌ها دربین ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی-توصیفی ۱۰۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* در سال ۹۹ از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل جدا گردید. از روش‌های بیوشیمایی و مولکولی برای تعیین هویت ایزوله‌ها استفاده گردید. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن براساس دستورالعمل CLSI تعیین شد و ایزوله‌های دارای مقاومت چندگانه شناسایی گردید. حداقل غظت مهارکنندگی (MIC) سیپروفلوکسازین با روش آگار دایلوشن مشخص و موتاسیون در ژن‌های gyrA , parC و حضور ژن‌های مقاومت مانند accA ، qnr و qepA با روش PCR بررسی گردید.

یافته‌ها: ۴۳٪ (n=43) ایزوله ها نسبت به سیپروفلوکسازین مقاوم بودند. رنج MIC سیپروفلوکسازین بین ۰.۵ µg/mL تا بالای ۱۰۲۴ µg/mL بود که ۴ ایزوله (۴٪) MIC بالای ۱۰۲۴ µg/mL داشتند.

این ایزوله‌ها (MIC > ۱۰۲۴ µg/mL)از نظر موتاسیون در ژن‌های gyrA , parC مورد بررسی قرار گرفتند. در بررسی موتاسیون در gyrA ، تغییر اسید آمینه از از سرین به ایزولوسین در موقعیت ۸۳ مشاهده گردید در حالی که هیچ موتاسیونی در ژن parC مشاهده نگردید. در ۱۰ ایزوله (۱۰٪) ژن مقاومت accA شناسایی گردید در حالی که در هیچ کدام از ایزوله ها ژن‌های مقاومت qnr , qepA مشاهده نگردید.در این مطالعه ۴۹٪ از ایزوله‌ها، سویه‌های دارای مقاومت چندگانه بودند که بالاترین میزان مقاومت به سفازولین (۶۶٪) و سفوتاکسیم (۶۶٪) مشاهده گردید. مروپنم و آمیکاسین با میزان حساسیت ۷۶٪ و ۶۹٪ موثرترین عوامل ضد میکروبی بر روی جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* بودند.

نتیجه‌گیری: سیپروفلوکسازین داروی موثری بر ضد عفونت‌های ادراری پیچیده ، پیلونفریت ، عفونت زخم و عفونت‌های تنفسی میباشد. در این مطالعه ۴۹٪ از ایزوله‌ها ایزوله ها دارای مقاومت چند گانه بودند که میزان بالایی است. همچنین در این مطالعه فراوانی بالای ژن aac (6')-Ib-cr مشاهده گردید. از آنجایی که این ژن روی پلاسمید قرار دارد به راحتی بین سویه های *کلبسیلا پنومونیه* منتقل شده و منجر به گسترش مقاومت نسبت به فلوروکینولون ها میشود.

واژگان کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، سیپروفلوکسازین ، عفونت بیمارستانی