دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه ی کارشناسی ارشد رشته میکروب شناسی پزشکی

عنوان:

بررسی میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های لینزولید وکوئینوپریستین-دالفوپریستین در ایزوله های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از منابع مختلف در اردبیل

نگارش:

فرشته حسن پور

استاد راهنما:

دکتر محسن ارزنلو

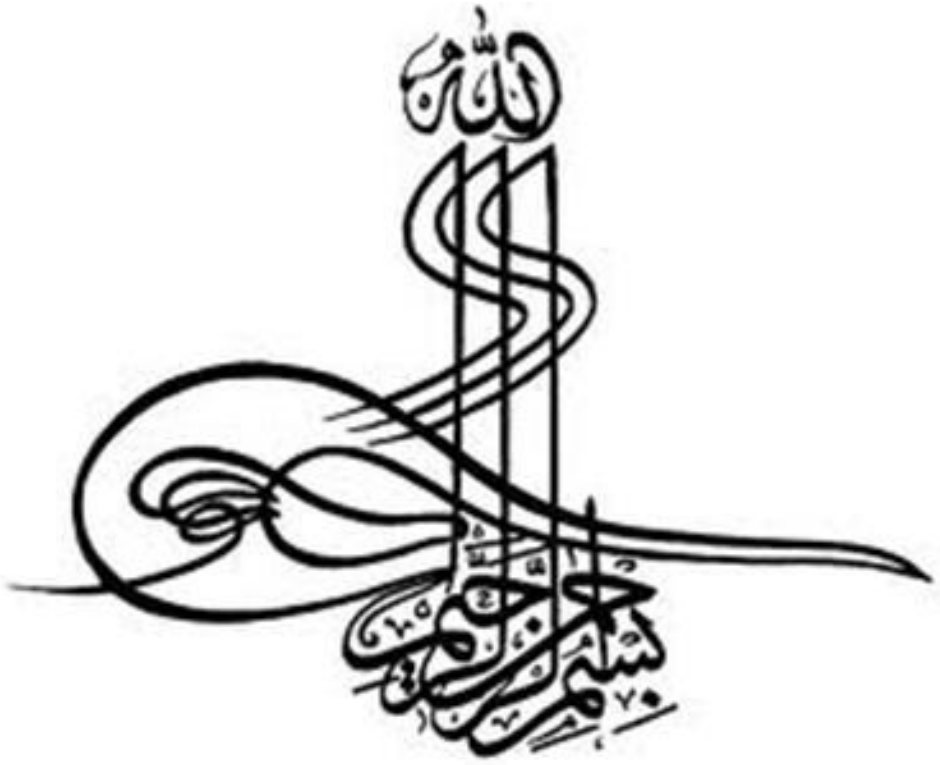
اساتید مشاور:

دکتر فرزاد خادمی

دکتر بهنام محمدی

شهریور ماه ۱۴۰۱

شماره پایان نامه: ۰۷۸



در ابتدا تشکر می‌کنم از استاد فرهیخته و فرزانه جناب آقای دکتر محسن ارزنلو که همواره راهنما و راه گشای نگارنده در اتمام و اکمال پایان نامه بوده اند.

همچنین از اساتید عزیز و محترم جناب آقای دکتر فرزاد خادمی و جناب آقای دکتر بهنام محمدی که مرا در تمام مراحل انجام این پژوهش یاری نموده اند، سپاس گزارم.

و تقدیر و تشکر از جناب آقای دکتر هادی هادی پیری دوگاهه برای تمامی حمایت ها و زحمات بی دریغشان.

این پایان نامه را ضمن تشکر و سپاس بیکران و در کمال افتخار و امتنان تقدیم می‌نمایم به:

محضر ارزشمند پدر و مادر عزیزم به خاطر همه ی تلاش های محبت آمیزی که در دوران های مختلف زندگی ام انجام داده اند و بامهربانی چگونه زیستن را به من آموخته اند.

برادر و خواهران مهربانم که وجودشان مایه آرامش و دلگرمی من می‌باشد.

و همسر عزیزم که در تمام طول تحصیل همراه و همگام من بوده است و با مهربانی وصبر وتحملش مشکلات را ه را برایم آسان نمود.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده..... ۱

فصل اول..... ۳

۱-۱ مقدمه و بیان مسئله..... ٤

۱-۲ اهداف و فرضیات..... ٦

۱-۲-۱ هدف کلی..... ٦

۱-۲-۲ اهداف اختصاصی..... ٦

۱-۲-۳ اهداف کاربردی..... ۷

۱-۲-٤ سؤالات تحقیق..... ۷

۱-۳ تعریف واژه های اختصاصی..... ۸

فصل دوم..... ۱۰

۲-۱ مبانی نظری..... ۱۱

۲-۱-۱ تاریخچه..... ۱۱

۲-۱-۲ تاکسونومی..... ۱۲

۲-۱-۳ فاکتورهای بیماری زایی..... ۱٤

۲-۱-۳-۱ ضمایم سطحی سلول باکتری..... ۱٤

۲-۱-۳-۲ فاکتورهای ترشحی..... ۱۶
۲-۱-۳-۳ فاکتورهای مؤثر در آنتی فاگوسیتوز..... ۱۸
۲-۱-٤ تشخیص مولکولی جنس انتروکوکوس..... ۱۹
۲-۱-٥ روش‌های میکروب‌شناسی آزمایشگاهی برای جداسازی انتروکوک ها..... ۱۹
۲-۱-٦ خصوصیات عمومی..... ۲۰
۲-۱-۷ زیستگاه..... ۲۱
۲-۱-۸ عفونت‌های انتروکوکی..... ۲۱
۲-۱-۸-۱ باکتریمی..... ۲۳
۲-۱-۸-۲ اندوکاردیت..... ۲٤
۲-۱-۸-۳ عفونت ادراری..... ۲٤
۲-۱-۸-٤ عفونت‌های زخم و بافت..... ۲٥
۲-۱-۸-٥ عفونت‌های لگن و داخل شکمی..... ۲٥
۲-۱-۸-٦ مننژیت..... ۲٥
۲-۱-۹ درمان انتروکوک‌ها..... ۲٦
۲-۱-۱۰ مقاومت آنتی بیوتیکی..... ۲۷
۲-۱-۱۰-۱ مقاومت به بتا لاکتام ها..... ۲۸
۲-۱-۱۰-۲ مقاومت به آمینوگلیکوزیدها..... ۲۹
۲-۱-۱۰-۳ مقاومت به گلیکوپپتیدها..... ۳۰
۲-۱-۱۰-٤ مقاومت به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین..... ۳۲
۲-۱-۱۰-٥ مقاومت به لینکوزامیدها..... ۳۳
۲-۱-۱۰-٦ مقاومت به استرپتوگرامین **B** و **A**..... ۳۳

۲-۱-۱۰-۷ مقاومت به اگزازولیدون..... ۳٤
۲-۱-۱۰-۸ مقاومت به ماکرولیدها..... ۳٤
۲-۱-۱۱ مقاومت چند دارویی MDR..... ۳٦
۲-۱-۱۲ اهمیت تشخیص انتروکوک ها..... ۳٦
۲-۱-۱۳ تایپینگ انتروکوک ها..... ۳۷
۲-۱-۱٤ آنتی بیوتیک های مورد استفاده در مطالعه حاضر..... ۳۸
۲-۱-۱٤-۱ لینزولید..... ۳۸
۲-۱-۱٤-۱-۲ مقاومت به لینزولید و مکانیسم اثر آن..... ۳۹
۲-۱-۱٤-۲ کوئینوپریستین/دالفوپریستین..... ٤۰
۲-۱-۱٤-۳ اریترومایسین..... ٤۲
۲-۲ مطالعات جهان..... ٤٤
۲-۳ مطالعات ایران..... ٤۷
فصل سوم..... ۵۰
۳-۱ گروههای مورد مطالعه..... ۵۱
۳-۱-۱ حجم نمونه و روش نمونه گیری..... ۵۲
۳-۲ روش گردآوری اطلاعات..... ۵۲
۳-۳ محاسبات آماری..... ۵۲
۳-٤ مواد، وسایل و دستگاههای مورد استفاده..... ۵۲
۳-٤-۱ محیط کشت های مورد استفاده..... ۵۲

۳-٤-۲ مواد مورد استفاده..... ۵۳
۳-٤-۳ دستگاههای مورد استفاده..... ٥٤
۳-٤-٤ وسایل مورد استفاده..... ٥٥
۳-٥ محلول‌های مورد استفاده..... ٥٥
۳-٥-۱ سرم فیزیولوژی..... ٥٥
۳-٥-۲ استاندارد ۰/٥ مک فارلند..... ٥٦
۳-٥-۳ بافر TBE..... ٥٧
۳-٥-٤ محلول کاری پرایمرها..... ٥٧
۳-٦ روش جداسازی و شناسایی ایزوله ها..... ٥٧
۳-٦-۱ جداسازی..... ٥٧
۳-٦-۱-۱ بررسی مستقیم..... ٥٨
۳-٦-۲ تست های بیوشیمیایی..... ٥٩
۳-٦-۲-۱ تست کاتالاز..... ٥٩
۳-٦-۲-۲ تست هیدرولیز PYR ٥٩
۳-٦-۲-۳ تست هیدرولیز اسکولین..... ٦۰
۳-۷ تایید مولکولی ایزوله ها..... ٦۱
۳-۸ ذخیره سازی ایزوله های تائید شده انتروکوک..... ٦۱
۳-۹ تکثیر و ردیابی ژنهای مورد مطالعه..... ٦۱

۳-۹-۱ پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن های مورد مطالعه..... ٦٢
۳-۹-۲ واکنش زنجیره ای پلیمراز..... ٦٣
۳-۹-۳ تهیه DNA الگو..... ٦٣
۳-۹-٤ ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده..... ٦٤
۳-۹-٥ نحوه تکثیر ژن های مورد مطالعه..... ٦٤
۳-۱۰ تایپینگ مولکولی ایزوله ها..... ٦٦
۳-۱۱ الکتروفورز..... ٦٧
۳-۱۲ تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی..... ٦٨
۳-۱۲-۱ آزمایش تعیین حساسیت به روش دیسک دیفیوژن..... ٦٨
۳-۱۲-۱-۱ روش تعیین حساسیت ایزوله‌های جمع آوری شده به روش دیسک دیفیوژن:..... ٦٨
۳-۱۲-۲ تعیین MIC انتروکوک ها به اریترومایسین..... ٧١
۳-۱۲-۲-۱ توزین پودرهای آنتی بیوتیک..... ٧١
۳-۱۲-۲-۲ تعیین MIC به روش رقت در آگار..... ٧٣
فصل چهارم..... ٧٦
٤-۱ جمع‌آوری ایزوله های انتروکوک فکالیس و انتروکوک فاسیوم..... ٧٧
٤-۲ نتایج ارزیابی مقاومت به لینزولید، کوئینوپریستین/دالفوپریستین و ونکومایسین ٧٨
٤-۳ الگوی مقاومت به کوئینوپریستین/دالفوپریستین به تفکیک منبع جداسازی در انتروکوکوس فاسیوم..... ٧٩

٤-٤ نتایج ردیابی ژنهای کدکننده مقاومت به کوئینوپریستین/دالفوپریستین در ایزوله های انتروکوک فاسیوم..... ٨٠

٤-٥ الگوی ترکیب ژن های کد کننده مقاومت به کوئینوپریستین/دالفوپریستین در ایزوله های انتروکوکوس فاسیوم..... ٨٢

٤-٦ میزان مقاومت به اریترومایسین..... ٨٣

٤-٧ الگوی مقاومت به اریترومایسین ٨٨

٤-٧-١ میزان مقاومت به اریترومایسین در ایزوله های انتروکوکوس فاسیوم به تفکیک منبع جداسازی..... ٨٨

٤-٧-٢ میزان مقاومت به اریترومایسین در ایزوله های انتروکوکوس فکالیس به تفکیک منبع جداسازی..... ٨٩

٤-٨ نتایج ردیابی ژن‌های کدکننده مقاومت به اریترومایسین ٩٠

٤-٩ پروفایل ژنی ایزوله های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم..... ٩٨

٤-١٠ تایپینگ مولکولی ایزوله های انتروکوک فاسیوم با استفاده از روش..... ٩٩

فصل پنجم..... ١٠٢

٥-١ بحث..... ١٠٣

٥-٢ محدودیت های مطالعه..... ١٠٩

٥-٣ نتیجه گیری..... ١١٠

٥-٤ پیشنهادات..... ١١١

منابع..... ۱۱۲

ضمایم..... ۱۲٤

ABSTRACT..... ۱۲۸

فهرست اشکال :

شکل ۱-۲ ساختار شیمیایی لینزولید..... ۳۸

شکل ۲-۲ ساختار شیمیایی کوئینوپریستین/ دالفوپریستین..... ٤۱

شکل ۳-۲ ساختار شیمیایی اریترومایسین..... ٤۳

شکل ۱-۳ نمونه ای از ایزولاسیون انتروکوک ها در محیط بلاد آگار..... ۵۸

شکل ۲-۳ تصویر آزمایش کاتالاز..... ۵۹

شکل ۳-۳ آزمایش هیدرولیز اسکولین..... ٦۰

شکل ٤-٣ نمونه ای از الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن..... ٧١
شکل ٥-٣ نمونه‌ای از آزمایش تعیین MIC اریترومایسین به روش رقت در آگار..... ٧٤
شکل ١-٤ نمونه ای از نتیجه آزمایش PCR شناسایی گونه های فکالیس و فاسیوم..... ٧٨
شکل ٢-٤ تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR ژن *msrC*..... ٨١
شکل ٣-٤ تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR ژن *ermB*..... ٨٢
شکل ٤-٤ تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR ژن *ermA*..... ٩٣
شکل ٥-٤ تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR ژن *ermB*..... ٩٤
شکل ٦-٤ تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR ژن *ermC*..... ٩٥
شکل ٧-٤ تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR ژن *ermTR*..... ٩٦
شکل ٨-٤ تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR ژن *msrA*..... ٩٧
شکل ٩-٤ تصویر ژل محصول ERIC-PCR..... ١٠٠
شکل ١٠-٤ دندروگرام تشابه ژنومی سویه های انتروکوکوس فاسیوم..... ١٠١
شکل ١-٦ نمونه ای از توالی های باز شده ژن *ermB*..... ١٢٥
شکل ٢-٦ نمونه ای از توالی های باز شده ژن *msrC*..... ١٢٥
شکل ٣-٦ ژن های ثبت شده در این مطالعه..... ١٢٦

فهرست جداول:

جدول ١-٣ فراوانی ایزوله های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از منابع مختلف..... ٥١
جدول ٢-٣ توالی پرایمرهای مورد استفاده در ردیابی ژن های انتروکوک..... ٦١
جدول ٣-٣ توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن های مورد مطالعه..... ٦٢
جدول ٣-٤ محتوای واکنش PCR برای تکثیر ژنهای مورد مطالعه..... ٦٥
جدول ٣-٥ برنامه تکثیر ژنهای مورد مطالعه در واکنش PCR..... ٦٥
جدول ٣-٦ برنامه تکثیر واکنش ERIC-PCR..... ٦٦

جدول ۳-۷ مواد استفاده شده در واکنش PCR برای واکنش ERIC-PCR..... ٦٦
جدول ۳-۸ تعیین قطر هاله عدم رشد بر اساس پروتکل CLSI..... ۷۰
جدول ۳-۹ تفسیر نتایج تعیین الگوی مقاومت بر اساس میزان MIC (µg/ml) اریترومایسین برای انتروکوک ها بر اساس پروتکل CLSI..... ۷۵
جدول ٤-۱ الگوی مقاومت به کوئینوپریستین/دالفوپریستین به تفکیک منبع جداسازی در انتروکوکوس فاسیوم..... ۷۹
جدول ٤-۲ فراوانی توزیع ژن های مقاومت به کوئینوپریستین/دالفوپریستین در ایزوله های انتروکوک فاسیوم..... ۸۰
جدول ٤-۳ توزیع فراوانی MIC آنتی بیوتیک اریترومایسین در ایزوله های انتروکوکوس فاسیوم به تفکیک منبع جداسازی..... **Error! Bookmark not defined.**
جدول ٤-٤ توزیع فراوانی MIC آنتی بیوتیک اریترومایسین در ایزوله های انتروکوکوس فکالیس به تفکیک منبع جداسازی..... ۸۷
جدول ٤-۵ الگوی مقاومت به اریترومایسین در ایزوله های انتروکوکوس فاسیوم به تفکیک منبع جداسازی..... ۸۸
جدول ٤-٦ الگوی مقاومت به اریترومایسین در ایزوله های انتروکوکوس فکالیس به تفکیک منبع جداسازی..... ۸۹
جدول ٤-۷ پروفایل ژنی ایزوله های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم..... ۹۸

فهرست نمودارها :

نمودار ۱-٤ توزیع الگوی ژن های کد کننده مقاومت به کوئینوپریستین/دالفوپریستین در ایزوله های انتروکوکوس فاسیوم به تفکیک منبع جداسازی..... ۸۳
نمودار ۲-٤ فراوانی ژن های مورد مطالعه در ایزوله های انتروکوکوس فاسیوم مقاوم به اریترومایسین..... ۹۱
نمودار ۳-٤ فراوانی ژن های مورد مطالعه در ایزوله های انتروکوکوس فکالیس مقاوم به اریترومایسین..... ۹۲

اختصارات:

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

TSB: Trypticase Soy Broth

MHA: Muller Hinton Agar

MHB: Muller Hinton Broth

CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute

ERIC: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

PCR: Polymerase Chain Reaction

MDR: Multiple drug resistance

بررسی میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های لینزولید وکوئینوپریستین-دالفوپریستین در ایزوله های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از منابع مختلف در اردبیل

چکیده:

زمینه: انتروکوک ها از عوامل رایج عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌روند. بدلیل مقاومت ذاتی آنها در برابر اثر باکتری کشی بسیاری از آنتی بیوتیک ها، معمولا درمان عفونت های انتروکوکی بسیار دشوار است.

هدف: در این مطالعه فراوانی مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های لینزولید، کوئینوپریستین/ دالفوپریستین و اریترومایسین در ایزوله‌های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از محیط های بیمارستانی (نمونه های بالینی) و غیر بیمارستانی (حاملین سالم، فاضلاب های بیمارستانی، دام، طیور و شهری) بررسی و همچنین فراوانی ژن های کد کننده مقاومت به آنها در ایزوله های مقاوم مطالعه شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه، در مجموع ۲۵۱ ایزوله انتروکوکوس فکالیس و ٤٣٤ ایزوله انتروکوکوس فاسیوم وارد مطالعه شد. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی برای آنتی بیوتیک های لینزولید و کوئینوپریستین/ دالفوپریستین به کمک روش دیسک دیفیوژن و برای آنتی بیوتیک اریترومایسین از طریق روش تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) تعیین گردید. ژن های عامل مقاومت با استفاده ازروش PCR شناسایی شدند. همچنین ارتباط ژنتیکی ایزوله ها به کمک روش ERIC-PCR بررسی شد.

یافته ها: در میان ایزوله های انتروکوک فکالیس و انتروکوک فاسیوم نسبت به آنتی بیوتیک لینزولید مقاومت مشاهده نشد. ۲٤/۹٪ (n=۱۰۸/٤۳٤) ایزوله های انتروکوک فاسیوم به آنتی بیوتیک کوئینوپریستین/دالفوپریستین مقاوم بودند. فراوانی مقاومت به کوئینوپریستین/دالفوپریستین بشکل معناداری ($P < 0.05$) در ایزوله های جدا شده از نمونه های بالینی و فاضلاب طیور بالاتر بود. ژن های کد کننده مقاومت به کوئینوپریستین/دالفوپریستین، *msrC* و *ermB* به ترتیب در ۷٦/۸۵٪ و ۲۰/۳۷٪ از ایزوله های

مقاوم انتروکوکوس فاسیوم مشاهده شد. مقاومت به اریترومایسین به ترتیب در ۵۱/۸ ٪ (n=۱۳۰/۲۵۱) و ۳۷/۵ ٪ (n=۱۶۳/۴۳۴) ایزوله های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم مشاهده شد. تفاوت معنادری در فراوانی توزیع مقاومت به ایترومایسین در ایزوله های انتروکوک جدا شده از منابع مختلف مشاهده نشد. با این حال ایزوله های جمع آوری شده از نمونه های بالینی در انتروکوکوس فاسیوم و ایزوله های جمع آوری شده از نمونه های بالینی و فاضلاب دام در انتروکوکوس فکالیس میزان MIC_{50} بالاتری را نشان دادند. ژن های کد کننده مقاومت به اریترومایسین *ermA* ، *ermB* ، *ermC* و *ermTR* به ترتیب در ۱۵/۸٪، ۸۲/۱٪، ۳۶/۳٪ و ۲۳/۳٪ ایزوله های مقاوم به اریترومایسین انتروکوکوس فاسیوم و ۲۰/۲٪، ۹۱٪، ۵۳/۹٪ و ۲۲/۴٪ ایزوله های انتروکوکوس فکالیس مشاهده شدند.

نتیجه گیری:

بدلیل عدم وجود مقاومت به لینزولید، این آنتی بیوتیک می‌تواند به عنوان جایگزین در درمان عفونت های مقاوم انتروکوکی در اردبیل مورد استفاده قرار گیرد. با این حال، آنتی بیوتیک های اریترومایسین و کوئینوپریستین/ دالفوپریستین بایستی با احتیاط استفاده شوند. انتشار بالای انتروکوک های مقاوم به اریترومایسین و کوئینوپریستین/دالفوپریستین در محیط های اکولوژیک مختلف به عنوان یک تهدید بزرگ بهداشت عمومی در اردبیل محسوب می شود.

کلمات کلیدی: انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فاسیوم، مقاومت آنتی بیوتیکی، لینزولید، کوئینوپریستین/ دالفوپریستین، اریترومایسین، فاضلاب، حاملین سالم، بیماران.