دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی

عنوان:

بررسی فراوانی فاکتورهای ویرولانس در ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های آموزشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل در سال ۱۳۹۸

نگارش:

ندا سامع ملکی

اساتید راهنما:

دکتر هادی پیری دوگاهه

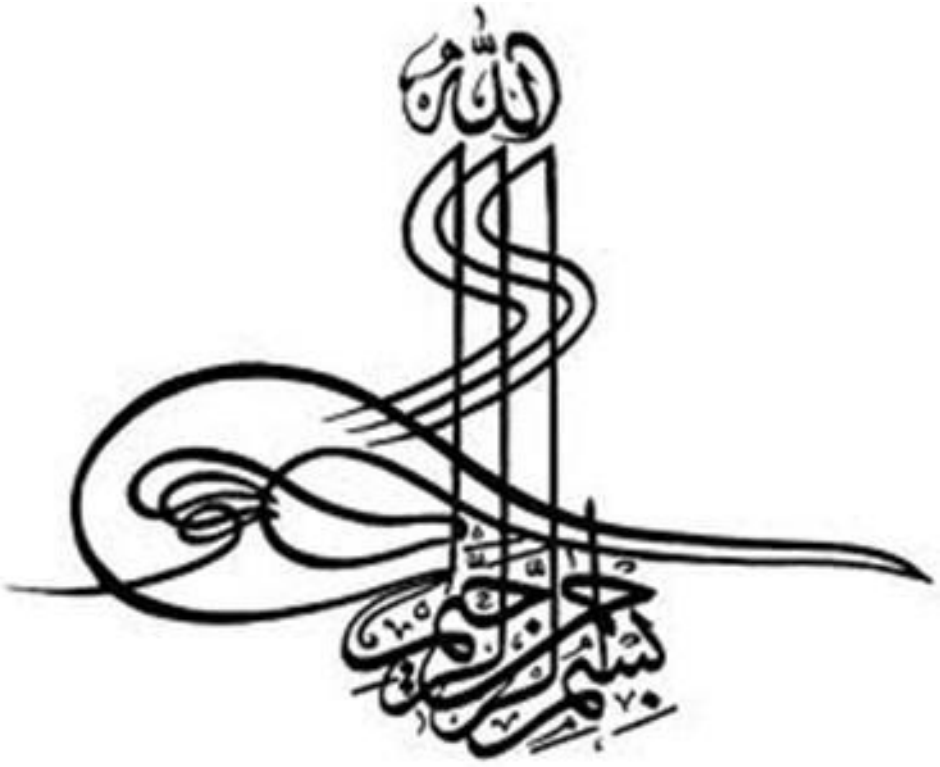
دکتر رقیه تیمورپور

استاد مشاور:

دکتر محسن ارزنلو

شهریور ماه ۱۴۰۱

شماره پایان نامه: ۰۸۱



بدینوسیله از زحمات و تلاش بی دریغ استادان محترم جناب آقای دکتر هادی پیری و سرکار خانم دکتر رقیه تیمورپور که در تهیه این مجموعه با این جانب همکاری داشته اند ، تشکر و مراتب سپاس قلبی خود را اعلام نموده و موفقیت ایشان را ازخداوند متعال خواهانم.

همچنین از جناب آقای دکتر محسن ارزنلو که در امر مشاوره این رساله مساعدت نمودند و در این مسیر نهایت مراقبت، توجه و دقت خود را مبذول فرموده اند کمال تشکر و امتنان را دارم و برای ایشان از خداوند سلامت و سعادت ابدی را خواهانم.

تقدیم و تشکر از

پدرم که هیچگاه لبخندش را دریغ نداشت،

و مادرم که هر آنچه در زندگیم دارم از وجود پاک وپراز محبت او سرچشمه میگیرد.

وهمسر وفادارم که وجودش شوق زیستن، وفایش مایه عشق،صفایش مایه آرامش وصبرش مایه پشتکار من است.

و در پایان تشکر می‌کنم از دوستان عزیزم خانم فروغ بابازاده و فرشته حسن پور که مرا در انجام این تحقیق یاری کردند.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده ۱

فصل اول ۳

۱-۱ مقدمه و بیان مسئله ۴

۱-۲ اهداف و فرضیات ۶

۱-۲-۱ هدف کلی ۶

۱-۲-۲ اهداف اختصاصی ۶

۱-۲-۳ اهداف کاربردی ۷

۱-۲-۴ فرضیات یا سؤالات تحقیق ۹

۱-۳ متدولوژی تحقیق ۱۰

۱-۴ تعریف واژه‌ای اختصاصی ۱۰

فصل دوم ۱۲

۲-۱ طبقه‌بندی ۱۳

۲-۲ کلیات کلبسیلا پنومونیه ۱۴

۲-۳ تاریخچه ۱۵

۲-۴ مورفولوژی و خصوصیات کشت ۱۶

۲-۵ فعالیت‌های بیوشیمیایی ۱۶

۲-۶ ساختار آنتی ژنی ۱۷

۲-۶-۱ آنتی ژن کپسولی ۱۷

۲-۶-۲ ادهزین‌ها ۲۰
۲-۶-۳ لیپوپلی ساکارید ۲۱
۲-۶-۴ سیدروفورها ۲۱
۲-۶-۵ توکسین ۲۲
۲-۷ روش‌های تایپینگ کلبسیلا پنومونیه ۲۲
۲-۷-۱ فنوتایپینگ ۲۳
۲-۷-۲ بیوتایپینگ ۲۳
۲-۷-۳ سروتایپینگ ۲۴
۲-۷-۴ باکتریوسین تایپینگ ۲۴
۲-۷-۵ فاژتایپینگ ۲۵
۲-۷-۶ آنتی بیوگرام ۲۵
۲-۷-۷ ژنوتایپینگ ۲۵
۲-۸ بیماری‌زایی ۳۰
۲-۹ آنتی بیوتیک‌ها ۳۳
۲-۹-۱ آنتی بیوتیک‌های مهارکننده سنتز دیواره سلولی ۳۳
۲-۹-۲ اصول طبقه بندی بتالاکتامازها ۳۶
۲-۱۰ مطالعات در جهان ۳۹
۲-۱۱ مطالعات در ایران ۴۱
فصل سوم: ۴۴
۳-۱ جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری ۴۵
۳-۲ جمع آوری نمونه ۴۵

۳-۳ ملاحظات اخلاقی ۴۵
۳-۴ روش انجام کار ۴۵
۳-۴-۱ ذخیره سازی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه ۴۶
۳-۴-۲ تشخیص فنوتیپیک و بیوشیمیایی ایزوله‌ها برای شناسایی گونه‌های
کلبسیلا پنومونیه ۴۶
۳-۴-۳ تست تاییدی مولکولی16SrRNA ۵۰
۳-۴-۴ استخراج DNA ۵۰
۳-۴-۵ آماده سازی پرایمرها ۵۱
۳-۴-۶ انجام آزمون PCR ۵۲
مواد و وسایل موردنیاز ۵۴
۳-۴-۷ برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler) ۵۵
۳-۴-۸ الکتروفورز محصولات PCR ۵۷
۳-۴-۹ ارزیابی سروتایپینگ ژن‌های کد کننده ژن‌های ویرولانس ۵۸
۳-۵ بررسی آماری ۶۰
۳-۶ پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های ویرولانس ۶۰
۳-۷ تعیین توالی ژن‌ها ۶۰
فصل چهارم ۶۱
۴-۱ ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه ۶۲
۴-۲ نتایج تست‌های فنوتیپی ۶۲
۴-۳ یافته‌های ژن‌های ویرولانس ۶۳
۴-۴ نتایج تعیین توالی ژن‌ها ۶۹

فصل پنجم ۷۱

۵-۱ بحث ۷۲

۵-۲ نتیجه گیری ۷۴

۵-۳ محدودیت های مطالعه ۷۵

۵-۴ پیشنهادات برای مطالعات آینده ۷۶

منابع ۷۸

فهرست جداول و نمودار

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۲ طبقه بندی باکتری کلبسیلا ۱۳

جدول ۲-۲ خصوصیات بیوشیمیایی گونه‌های شایع جنس کلبسیلا ۱۵

جدول ۳-۲ خصوصیات بیوشیمیایی زیر گونه‌های کلبسیلا پنومونیه ۱۶

جدول ۴-۲ طبقه بندی مکانیسم عملکرد آنتی بیوتیک‌ها (۱۵) ۳۳

جدول ۵ -۲ طبقه بندی بتالاکتامازها (۶۴) ۳۹

جدول ۳-۱ توالی پرایمرهای Klebsiella 16SrRNA ۵۲

جدول ۳-۲ توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت بررسی ژن‌های ویرولانس(۸۸) ۵۳

جدول ۳-۳ مقادیر لازم از مواد مورد نیاز برای انجام PCR ۵۵

جدول ۳-۴ شرایط لازم برای انجام PCR برای ژن‌های ویرولانس ۵۶

جدول ۴-۱ تعداد ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به تفکیک نوع نمونه ۶۳

جدول ۴-۲ تعداد ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به تفکیک جنس ۶۳

جدول ۴-۳ فراوانی تعداد ژن های همزمان ۶۵

جدول ۴-۴ فراوانی تعداد ژن های همزمان ۶۵

جدول ۴-۵ فراوانی تعداد ژن های همزمان ۶۵

جدول ۴-۶ فراوانی تعداد ژن های همزمان ۶۶

جدول۴-۷ فراوانی تعداد ژن های همزمان ۶۶

جدول ۴-۸ فراوانی تعداد ژن های همزمان ۶۷

جدول ۴-۹ فراوانی تعداد ژن های همزمان ۶۷

نمودار ۴-۱ فراوانی همزمان ژن ها ۶۴

فهرست‌اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۲: محل اثر آنزیم بتالاکتاماز روی حلقه ی بتالاکتام ۳۵

شکل۱-۳: کلنی‌های موکوئیدی و تخمیر کننده لاکتوز بر روی محیط Emb کلبسیلا پنومونیه ۴۶

شکل ۱-۴: بررسی فنوتیپی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* ۶۰

شکل ۲-۴: نتایج ژل الکتروفورز ژن *fimH* ۶۷

شکل ۳-۴: نتایج ژل الکتروفورز ژن *k20* ۶۸

شکل ۴-۴: نتایج ژل الکتروفورز ژن *ybts* ۶۸

شکل ۵-۴: نتایج ژل الکتروفورز ژن *entB* ۶۹

شکل ۶-۴: نتایج ژل الکتروفورز ژن *mrkD* ۶۹

اختصارات:

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

TSB: Trypticase Soy Broth

MHA: Muller Hinton Agar

CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute

PCR: Polymerase Chain Reaction

بررسی فراوانی فاکتورهای ویرولانس در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های آموزشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

چکیده

زمینه: *کلبسیلاپنومونیه* به عنوان یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه نقش مهمی در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی داشته و یکی از عوامل مهم پنومونی مرتبط با ونتیلاتور و عفونت ادراری می‌باشد.

هدف: مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی ژن های مربوط به فاکتورهای ویرولانس در *کلبسیلا پنومونیه*[1] از ایزوله‌های بیمارستان‌های آموزشی شهر اردبیل انجام شد.

مواد و روش ها : از ۱ اکتبر ۲۰۱۹ تا ۳۰ نوامبر ۲۰۲۱، نمونه‌های بالینی مختلف جمع‌آوری شد و ایزوله‌های *کلبسیلاپنومونیه* با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی مرسوم تشخیص داده شدند. شناسایی نهایی *کلبسیلاپنومونیه* با استفاده از روش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی هدف‌گیری ژن khe انجام شد. روش PCR برای تایید حضور ژن‌های مرتبط با ویرولانس(*Kfu*، *ybtS*، *mrkD*، *entB*، *iutA* ، *rmpA*، *allS*، *fimH*، *wcaG*، *magA*، تیپ(k1)) *pagO* و *Aerobactin*) و تیپ‌های کپسولی اصلی

(K2,K57 ، K5، K20وK54) بر اساس پرایمرهای خاص استفاده شد.

نتایج: بیشترین تعداد ایزوله کلبسیلاپنومونیه (۷۸٪) در نمونه ادرار مشاهده شد. از تمام ۱۰۰ ایزوله‌ی کلبسیلاپنومونیه ، ۴٪ و ۲٪ به ترتیب با پرایمرهای K5 و K2 قابل تایپ بودند. تیپ‌های ۱، ۲۰ و ۵۴ در بین ایزوله‌های کلبسیلاپنومونیه شناسایی نشد. علاوه بر این، *entB* (۹۷٪) ، *fimH* (۹۴٪) و *wcaG* (۸۷٪) بیشترین فراوانی را در بین ژن‌های مرتبط با ویرولانس داشتند و تمام ایزوله‌های کلبسیلاپنومونیه ازنظر حضور ژن‌ها *allS* ، *pagO*، *magA* و aerobactin منفی بودند.

1klebsiella pneumoniae

نتیجه گیری: تجزیه و تحلیل در این مطالعه نشان داد که ۲۴٪ از کلبسیلاپنومونیه جدا شده ژن *entB-wcaG-fimH*را دارا هستند. علاوه بر این، ۵۰٪ (n = 2/4) از ایزوله‌ها ۵ ژن *ybts-mrkD-* *entB-wcaG-fimH*را به طور همزمان در خود جای داده است. یافته‌ها نشان داد که ۶ درصد از کل ایزوله‌های کلبسیلاپنومونیه قابل تایپبندی به روش مولکولی بودند که در دو سروتیپ K5 و K2 توزیع شدند. علاوه بر این، بیشتر ایزوله‌های کلبسیلاپنومونیه به انواع مختلف ژن‌های ویرولانس مثبت بودند .

واژه‌های کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، عفونت ادارای و پنومونی