دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجهٔ کارشناسی ارشد رشته میکروب شناسی پزشکی

عنوان:

تشخیص مولکولی مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های *هلیکوباکترپیلوری* جدا شده از بیوپسی معده در بیماران مراجعه کننده به کلینیک ارس در استان اردبیل

نگارش:

فاطمه شهماری میکائیل دره سی

اساتید راهنما:

دکتر تیمورپور

دکتر رسول نعمتی

اساتید مشاور:

دکتر هادی پیری

دکتر محسن ارزنلو

شهریور ماه ۱۴۰۲

شماره پایان نامه: ۰۹۰

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

محضر ارزشمند خانواده عزیزم به خاطر همه ی تلاشهای محبت آمیزی که در دوران مختلف زندگی ام انجام داده اند و با مهربانی چگونه زیستن را به من آموخته اند.

به همسر مهربانم که در تمام طول تحصیل، همراه و همگام من بوده است .

به استادان فرزانه و فرهیخته‌ای که در راه کسب علم و معرفت مرا یاری نمودند.

به آنان که در راه کسب دانش راهنمایم بودند.

به آنان که نفس خیرشان و دعای روح پرورشان بدرقه ی راهم بود.

الها به من کمک کن تا بتوانم ادای دین کنم و به خواسته ی آنان جامه ی عمل بپوشانم .

خدایا توفیق خدمتی سرشار از شور و نشاط و همراه و همسو با علم و دانش و پژوهش جهت رشد و شکوفایی ایران کهنسال عنایت بفرما.

بدینوسیله از زحمات و تلاش بی دریغ استادان محترم، سرکارخانم دکتر رقیه تیمورپور و جناب آقای دکتر رسول نعمتی که در تهیه این پایان نامه با این جانب همکاری داشته اند،تشکر و قدردانی کرده،و موفقیت این عزیزان را از خداوند متعال خواهانم.

همچنین از جناب آقای دکتر هادی پیری مدیر گروه محترم گروه میکروب شناسی و جناب آقای دکتر محسن ارزنلو که در امر مشاوره این رساله مساعدت نموده و نهایت دقت و توجه خود را مبذول فرموده اند،کمال تشکرو امتنان را داشته،ازخداوند متعال برایشان صحت،سلامت و موفقیت روز افزون خواهانم.

تشکر و سپاسگزاری ویژه از داوران محترم، جناب آقای دکتر جعفر محمد شاهی ،جناب آقای دکتر رشید رمضانزاده و جناب آقای دکتر حافظ میرزانژاد،برای قبول داوری این پایان نامه

سپاس ویژه از خانواده، علی الخصوص همسر و پدرعزیزم که مشوق من در امر تحصیل بودند.تشکر از دوستان و تمام کسانی که صمیمانه مرا در این مسیر همراهی کرده اند.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده:..... ۱
فصل اول..... ۲
مقدمه ۲
۱-۱ اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق ۳
۱-۱-۱ هدف کلی طرح ۴
۱-۱-۲ اهداف اختصاصی طرح ۴
۱-۱-۳ فرضیات ۵
۱-۲ تعریف واژه های اختصاصی ۵
۱-۳-اهداف کاربردی ۵
۱-۴ ملاحظات اخلاقی ۶
فصل دوم ۴
بررسی متون ۴
۲-۱ تاریخچه کشف *هلیکوباکتر پیلوری* و طبقه بندی آن ۸
۲-۲ اپیدمیولوژی و انتقال ۹
۲-۳ ویژگی های ظاهری و خصوصیات بیوشیمیایی ۱۰
۲-۴ بیماری زایی و فاکتورهای دخیل در آن ۱۱
۲-۵ مقاومت آنتی بیوتیکی *هلیکوباکتر پیلوری*..... ۱۳
فصل سوم ۹
مواد و روش کار..... ۹

۳-۱ گروههای مورد مطالعه: ۲۰
۳-۲ جمع آوری نمونه: ۲۰
۳-۳ روش انجام کار: ۲۰
۳-۳-۱ انتقال نمونه ۲۰
۳-۳-۲ تشخیص بیوشیمیایی و فنوتیپی ایزوله ها ۲۱
۳-۳-۲-۱ آزمایش اکسیداز ۲۳
۳-۳-۲-۲ آزمون کاتالاز ۲۳
۳-۳-۲-۳ آزمایش اوره آز ۲۳
۳-۳-۴ ذخیره سازی نمونه ۲۴
۳-۳-۵ مقاومت آنتی بیوتیکی ۲۵
۳-۳-۵-۱ آزمون غربالگری آنتی بیوتیکی با روش انتشار دیسک: ۲۵
۳-۳-۵-۲ محلول استاندارد سه مک فارلند: ۲۶
۳-۳-۶ استخراج DNA ۲۷
۳-۳-۷ ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۳۰
۳-۳-۸ آماده سازی پرایمر ها ۳۱
۳-۳-۹ تست تایید مولکولی *16SRRNA*: ۳۲
۳-۳-۱۰ انجام آزمون PCR ۳۲
۳-۳-۱۱ برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر (THERMOCYCLER): ۳۳
۳-۳-۱۲ الکتروفورز محصولات PCR ۳۵
۳-۳-۱۲-۱ تهیه بافرTBE 10X ۳۵
فصل چهارم ۲۰
نتایج ۲۰
۴-۱ نتایج اطلاعات دموگرافیک ۴۱

۴-۲ نتایج تست های فنوتیپی ۴۱
۴-۳ تست غربالگری آنتی بیوتیکی ۴۱
فصل پنجم ۶۰
بحث و نتیجه گیری..... ۶۰
منابع ۶۶

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۱کلنی کوچک و شفاف تا قهوه ای رنگ *هلیکوباکتر پیلوری* ۲۲

شکل ۳-۲ تصویر *هلیکوباکتر پیلوری* زیر میکروسکوپ،بزرگنمایی ×۱۰۰ ..... ۲۲

شکل ۳-۳آزمایش اکسیداز اسلایدی ۲۳

شکل ۳-۳دستگاه بن ماری مورد استفاده در این مطالعه ۲۸

شکل۳-۴ دستگاه میکروسانتریفیوژ مورد استفاده در این مطالعه ۲۹

شکل ۶-۳ ترازوی حساس مورد استفاده ۲۹

شکل۵-۳ دستگاه شیکر مورد استفاده در این مطالعه ۲۹

شکل۷-۳ ترازوی معمولی مورد استفاده ۳۰

شکل۸-۳ دستگاه ترموسایکلر مورد استفاده دراین مطالعه ۳۴

شکل ۹-۳ دستگاه میکروفیوژ مورد استفاده ۳۶

شکل۱۰-۳دستگاه مشاهده ژل ۳۶

شکل ۱۱-۳ دستگاه تانک الکتروفورز ۳۷

شکل ۱۲-۳ تایید فنوتیپی ایزوله های *هلیکوباکترپیلوری* به روش آزمون اوره آز ۳۷

شکل ۱۳-۳ آزمون کاتالاز ۳۷

شکل ۱۴-۳آزمون اکسیداز ۳۷

شکل ۱۵-۳صویر *هلیکوباکتر پیلوری* زیر میکروسکوپ،بزرگنمایی ×۱۰۰ ..... ۳۸

شکل ۱۶-۳ تایید ژنوتیپی ایزوله های هلیکوباکترپیلوری با رد یابی ژن 16SRRNA..... ۳۸

شکل ۳-۱۷ : نمونه ای از نتایج آنتی بیوگرام برای ایزوله های هلیکوباکترپیلوری ۳۸
شکل۳-۱۹ نتیجه الکتروفورز ژن *P-1* ،محدوده ی مشاهده باند در ۳۲۰ BP، ۳۹
شکل ۳-۲۰ نتیجه الکتروفورز ژن RDXA،محدوده ۸۵۰BP ۳۹

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱ مشخصات دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده در مطالعه حاضر ۲۷

جدول۳-۲ پرایمر های مورد استفاده برای شناسایی ژن های مربوط به این مطالعه ۳۱

جدول ۳-۳پرایمر مورد استفاده برای ژن 16SrRNA ۳۲

جدول۳-۴ مقادیر لازم از مواد مورد نیاز برای انجامPCR ۳۳

جدول۳-۵ برنامه PCR ژن های مربوط به این مطالعه ۳۴

جدول ۴-۱ میزان فراوانی و همچنین رابطه فاکتورهای ویرولانس با آنتی بیوتیک مترونیدازول ... ۴۴

جدول۴-۲ میزان فراوانی و رابطه فاکتورهای ویرولانس با آنتی بیوتیک کلاریترومایسین ۴۶

تشخیص مولکولی مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های *هلیکوباکترپیلوری* جدا شـده از بیوپسـی معده در بیماران مراجعه کننده به کلینیک ارس در استان اردبیل

چکیده:

زمینه: سرطان معده دومین علت شایع مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان است . هـر دو مطالعـات حیـوانی و انسانی، ارتباط واضحی را بین عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* و سرطان معده نشان داده اسـت . اگـر چـه رژیـم هـای درمانی مناسبی ارائه شده است اما ریشه کنی این باکتری از بدن، ساده و بـدون مشـکل نمـی باشـد. فاکتورهـای مختلفی میتواند برروی پیامد درمان تاثیر بگذارد که از مهمترین آنها مقاومت آنتی بیوتیکی میباشد.

هدف: این مطالعه با هدف بررسی مقاومت مولکولی بین ایزوله های *هلیکوباکتر پیلوری* جدا شده از معده بیماران مراجعه کننده به کلینیک ارس در استان اردبیل طراحی گردید.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی_ توصیفی، ۱۹۸ بیمار مراجعه کننده به کلینیک ارس در اسـتان اردبیـل بین سالهای ۱۴۰۰-۱۴۰۲ آندوسکوپی گردید و باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* از آنها جدا گردیـد. بـه کمـک تسـت های مولکولی و بیوشیمیایی، ایزوله های جدا شده ،تعیین هویـت گردیـد. بـا اسـتفاده از تکنیـک MAS-PCR مقاومت مولکولی نسبت به کلاریترومایسین و مترونیدازول، در بـین ایزولـه هـای جـدا شـده از بیمـاران بررسـی گردید.

نتایج: از کـل ۸۳ بیمـار مـورد بررسـی، ۴۰ نفـر مـرد(۴۸.۲٪) و ۴۳ نفـر زن(۵۱.۸۱٪) بودنـد. میـانگین سـنی آنها۱۵.۲۳ ±۴۷.۸۱ بود. ۲۳ (۲۷.۷٪)ایزوله نسبت به کلاریترومایسین مقاومت مولکولی داشته و تنها موتاسیون *A2143G* در ایجاد این مقاومت نقش داشت، سـایر موتاسـیون هـای مـرتبط بـا مقاومـت بـه کلاریترومایسـین مشاهده نگردید. همچنین ۳۳.۷۴٪ (n=۲۸) ایزوله هـا نسـبت بـه مترونیـدازول مقـاوم بودنـد و در ۱۸(۲۱.۶۹٪) ایزوله، مقاومت مولکولی همزمان، نسبت به کلاریترومایسین –مترونیدازول مشاهده گردید.

نتیجه گیری: باتوجه به شیوع بالای عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* در منطقه اردبیل ، رعایت بهداشت، تشخیص بـه موقع عفونت هلیکوباکتر و استفاده از رژیم درمانی مناسب جهت پیشـگیری از بـروز مقاومـت دارویـی و شکسـت درمان توصیه میشود.

کلمات کلیدی: *هلیکوباکتر پیلوری*، سرطان معده، PCR