بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده دامپزشکی
بخش پاتوبیولوژی

پایان نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد باکتری شناسی

فیلو تایپینگ و تعیین فراوانی جدایه های اشریشیاکلی واجد ژن بتالاکتاماز از موارد عفونتهای خارج گوارشی در شهرستان خرم آباد

مؤلف:
اسماء بیرانوند

استاد راهنما:
دکتر رضا قنبرپور

استاد مشاور:
دکتر بهارک اختر دانش

تیر ماه ۹۲

تقدیم به:

خدایی که آفرید انسان را، عقل را، معرفت را، عشق را

ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است.

به استوارترین تکیه گاهم، دستان پر مهر پدرم به زیباترین نگاه زندگیم، چشمان نگران مادرم

که هر آنچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بکوشم قطره ای از دریای بیکران مهربانیتان را سپاس نتوانم بگویم. امروز هستی ام به امید شماست و فردا کلید باغ بهشتم رضای شما

راه آوردی گران سنگ تر از این ارزان نداشتم تا به خاک پایتان نثار کنم باشد که حاصل تلاشم نسیم گونه غبار خستگیتان را بزداید. بوسه بر دستان پر مهرتان

تقدیم به همسرم که نشانه ی لطف الهی در زندگی من است:

به پاس قدردانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که محیطی سرشار از سلامت و آرامش را برای من فراهم آورده است. تعهد و مسئولیت را در زندگیمان تلألو خدایی بخشیدی سپاس همسرم که مسیح وار با صبرت در تمامی لحظات رفیق راه بودی.

با سپاس از پدر و مادر همسرم:

خدا را بسی شاکرم که از روی کرم پدر و مادری نصیبم ساخته که وجودشان سراسر مهر است.

پروردگارا پس توفیقم ده که هر لحظه شکر گذارشان باشم و ثانیه های عمرم را در عصای دست بودنشان بگذرانم.

وبا سپاس از خواهرم که وجودش شادی بخش و صفایش مایه ی آرامش من است.

سپاسگزارم:

نخست از استاد فرهیخته: جناب آقای دکتر رضا قنبرپورکه با صرف وقت و افزوده های سودمند خود این پایان نامه را پربارترکردند و به پاس تمام آموخته های علمی و اخلاقی که از ایشان فرا گرفتم.

و نیز از استاد مشاورم سرکار خانم دکتر بهارک اختر دانش

وهمچنین از سایر اساتید محترم به ویژه استاد بزرگوار جناب آقای دکتر مهدی گلچین که در طول تحصیل از کمک و راهنمایی های ایشان بهره مند گشتم

و دکتر محمد خلیلی به پاس قبول زحمت داوری این پایان نامه

با سپاس از دوست عزیزم زهرا همتی و دیگر همکلاسی های عزیزم

چکیده

این بررسی با هدف ژنوتایپینگ و شناسایی ژن های بتالاکتاماز و همچنین آنتی بیوگرام جدایه های اشریشیاکلی از موارد عفونت های بالینی در شهرستان خرم آباد انجام شد. در این مطالعه ۹۴ جدایه خارج گوارشی از انسان، از نظر حضور ژن های bla_{TEM}، bla_{SHV}، *chuA*، *yjaA* و *TSPE4.C2* به روش PCR بررسی شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه ها نسبت به ۹ آنتی بیوتیک شامل آمیکاسین، سفازولین، سیپروفلوکسازین، کوتریموکسازول، نیتروفورانتوئین، جنتامایسین، سفپیم، ایمیپنم و نالیدیکسیک اسید به روش انتشار دیسک انجام شد. آنالیز فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه ها متعلق به چهار گروه فیلوژنتیکی A (۶۰/۶۳ درصد)، B2 (۱۰/۶۳ درصد)، B1 (۵/۳۱ درصد) و D (۱۷/۰۲ درصد) قرار داشتند و در شش تحت گروه فیلوژنی دسته بندی شدند. بیشترین فراوانی متعلق به تحت گروه A_0 (۵۸ جدایه) و کمترین فراوانی متعلق به تحت گروه A1 (۴ جدایه) بود. ۱۳جدایه (۱۳/۸۲ درصد) از نظر ژن bla_{TEM} و۳ (۳/۱۹ درصد) جدایه از نظر ژن bla_{SHV} مثبت بود. بر اساس نتایج آنتی بیوگرام کمترین مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها مربوط به ایمیپنم (۰ درصد) و بیشترین مقاومت مربوط به سفازولین (۱۰۰ درصد) بود. در این مطالعه ۳۲ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی متفاوت شناسایی گردید و جدایه های مقاوم متعلق به گروهها وتحت گروههای فیلوژنتیکی متفاوت بودند.

کلمات کلیدی: اشریشیاکلی، فیلوژنتیکی، بتالاکتاماز، مقاومت آنتی بیوتیکی،PCR

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول مقدمه و هدف

مقدمه و هدف ۲

فصل دوم کلیات

۱-۲- جنس اشریشیا ۶

۱-۱-۲- مقدمه ۶

۲-۱-۲- اشریشیاکلی ۷

۳-۱-۲- طبقه بندی ۷

۴-۱-۲- خصوصیات مورفولوژی ۸

۵-۱-۲- خصوصیات بیوشیمیایی و کشت ۸

۶-۱-۲- ژنتیک ۹

۲-۲- ساختار پادگنی اشریشیاکلی ۹

۱-۲-۲- آنتی ژن سوماتیک ۱۰

۲-۲-۲- آنتی ژن K ۱۱

۳-۲-۲- آنتی ژن H ۱۲

۴-۲-۲- آنتی ژن F ۱۲

۳-۲- پاتوژنز اشریشیاکلی..... ۱۳

۱-۳-۲- فاکتورهای حدت..... ۱۳

۱-۱-۳-۲- اندوتوکسین..... ۱۳

۲-۱-۳-۲- پروتئین های اتصالی فیمبریه ای..... ۱۳

۳-۱-۳-۲- کپسول..... ۱۴

۴-۱-۳-۲- اگزو توکسین ها..... ۱۵

۱-۴-۱-۳-۲- انتروتوکسین ۱۵

۲-۴-۱-۳-۲- سیتوتوکسین ها..... ۱۷

۳-۴-۱-۳-۲- وروتوکسین ها ۱۷

۵-۱-۳-۲- همولیزین..... ۱۸

۶-۱-۳-۲- سیدروفورها..... ۱۸

۷-۱-۳-۲- سیستم ترشحی نوع III..... ۱۸

۲-۳-۲- پاتوژنز در حیوانات و طیور..... ۱۹

۱-۲-۳-۲- پاتوژنز در گوسفند..... ۱۹

۲-۲-۳-۲- پاتوژنز در گاو..... ۱۹

۳-۲-۳-۲- پاتوژنز در اسب..... ۲۰

۴-۲-۳-۲ پاتوزنز در سگ ۲۱

۵-۲-۳-۲- کلی باسیلوز در پرندگان ۲۱
۳-۳-۲- پاتوژنز در انسان ۲۱
۱-۳-۳-۲- پاتوتیپ های اشریشیاکلی های پاتوژن روده ای ۲۱
۱-۱-۳-۳-۲- پاتوتیپ اشریشیاکلی توکسین‌زای روده‌ای (ETEC) ۲۲
۲-۱-۳-۳-۲- پاتوتیپ اشریشیاکلی بیماریزای روده ای (EPEC) ۲۲
۳-۱-۳-۳-۲- پاتوتیپ اشریشیاکلی انترواگرگتیو (EAggEC) ۲۳
۴-۱-۳-۳-۲- پاتوتیپ اشریشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC) ۲۳
۵-۱-۳-۳-۲- پاتوتیپ اشریشیاکلی انترواینواسیو (EIEC) ۲۴
۲-۳-۳-۲- عفونت های اشریشیاکلی های خارج روده ای ۲۴
۱-۲-۳-۳-۲- عفونت های مجاری ادراری(UTI) ۲۵
۱-۱-۲-۳-۳-۲- سیستیت (التهاب مثانه) ۲۶
۲-۱-۲-۳-۳-۲- پیلونفریت ۲۶
۳-۱-۲-۳-۳-۲- باکتریوری ۲۶
۲-۲-۳-۳-۲- عفونت های ادراری در زنان ۲۶
۳-۲-۳-۳-۲- منتژیت ۲۷
۴-۲-۳-۳-۲- سپسیس ۲۸
۵-۲-۳-۳-۲- سپتی سمی ۲۸

۴-۲- مقاومت های آنتی بیوتیکی اشریشیاکلی..... ۲۸
۱-۴-۲- آنزیم های بتالاکتامازی..... ۲۹
۱-۱-۴-۲- انواع بتالاکتاماز های وسیع الطیف..... ۳۱
۱-۱-۱-۴-۲- بتالاکتامازهای خانواده *TEM*..... ۳۲
۲-۱-۱-۴-۲- بتالاکتامازهای خانواده *SHV*..... ۳۲
۲-۱-۴-۲- تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی..... ۳۳
۲-۴-۲- فیلوژنیک اشریشیاکلی..... ۳۳

فصل سوم روش کار

۱-۳- مواد و وسایل مورد استفاده..... ۳۶
۱-۱-۳- مواد مصرفی..... ۳۶
۲-۱-۳- مواد غیر مصرفی..... ۳۷
۲-۳- روش کار..... ۳۷
۱-۲-۳- جمع آوری و تقسیم بندی نمونه‌ها..... ۳۷
۲-۲-۳- جداسازی و تأیید بیوشیمیایی اشریشیاکلی..... ۳۷
۳-۲-۳- ذخیره نمونه ها..... ۳۸
۴-۲-۳- استخراج DNA از باکتری ها..... ۳۸
۵-۲-۳- آزمایش PCR جهت شناسایی ژن های bla_{TEM} و bla_{SHV}..... ۳۸

۶-۲-۳- آزمایش PCR فیلوژنی ۴۰

۷-۲-۳- الکتروفورز و آنالیز محصولات PCR ۴۱

۸-۲-۳- مراحل انجام الکتروفورز ۴۲

۳-۳- تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ۴۳

فصل چهارم نتایج

۱-۴- نتایج آزمایشات جداسازی و تشخیص بیوشیمیایی اشریشیاکلی ۴۶

۲-۴- نتیجه آزمایش PCR جهت شناسایی گروه های فیلوژنی ۴۶

۳-۴- نتیجه آزمایش PCR جهت شناسایی تحت گروه های فیلوژنی ۴۷

۴-۴- نتیجه آزمایش PCR جهت شناسایی ژن های bla_{TEM} و bla_{SHV} ۴۹

۵-۴- تعیین گروه ها و تحت گروه های فیلوژنی جدایه های واجد ژن bla_{TEM} ۵۱

۶-۴- تعیین گروه ها و تحت گروه های فیلوژنی جدایه های واجد ژن bla_{SHV} ۵۳

۷-۴- نتایج تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ۵۴

۱-۷-۴- بررسی تحت گروه های فیلوژنی در جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم

به کوتریموکسازول ۵۶

۲-۷-۴- بررسی تحت گروه های فیلوژنی در جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم به ایمیپنم ۵۸

۳-۷-۴- بررسی تحت گروه های فیلوژنی در جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم

به سیپروفلوکسازین ۵۹

۴-۷-۴- بررسی تحت گروه های فیلوژنی در جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم
به نیتروفورازولیدون ۶۰
۴-۷-۵- بررسی تحت گروه های فیلوژنی در جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم به جنتامایسین ۶۱
۴-۷-۶- بررسی تحت گروه های فیلوژنی در جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم
به نالیدیکسیک اسید ۶۲
۴-۷-۷- بررسی تحت گروه های فیلوژنی در جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم به سفپیم ۶۳
۴-۷-۸- بررسی تحت گروه های فیلوژنی در جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم به آمیکاسین ۶۴
۴-۷-۹- بررسی تحت گروه های فیلوژنی در جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم به سفازولین ۶۵
۴-۴- الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی ۶۶
منابع ۷۶

فهرست جداول

جدول ۱-۳ پرایمرها و سویه‌های استاندارد به کار رفته در PCR ژن های bla_{TEM} و bla_{SHV}..... ۳۹

جدول ۲-۳ پرایمرها و سویه‌های استاندارد به کار رفته در PCR فیلوژنی..... ۴۰

جدول ۳-۳- گروه های مختلف فیلوژنی..... ۴۱

جدول ۴-۳- آنتی بیوتیک های استفاده شده به همراه کد اختصاصی و منطقه ممانعت از رشد آن‌ها طبق دستورالعمل شرکت سازنده..... ۴۴

جدول ۱-۴ تعداد و درصد کلی جدایه ها در گروه های فیلوژنی..... ۴۷

جدول ۲-۴- تعداد و درصد جدایه ها در تحت گروه های فیلوژنی..... ۴۸

جدول۳-۴- انتشار ژن های مورد بررسی در بین جدایه ها..... ۵۰

جدول ۴-۴- انتشار جدایه های واجد ژن *blaTEM* در گروه ها و تحت گروه های فیلوژنی..... ۵۲

جدول ۵-۴- انتشار جدایه های واجد ژن *blaSHV* در گروه ها و تحت گروه های فیلوژنی ۵۳

جدول ۶-۴ تعداد و درصد جدایه‌های حساس یا نیمه حساس و مقاوم نسبت به نه آنتی‌بیوتیک ۵۶

جدول ۷-۴- تحت گروه های فیلوژنی جدایه های حساس،نیمه حساس و مقاوم به کوتریموکسازول..... ۵۷

جدول ۸-۴- تحت گروه های فیلوژنی جدایه های حساس،نیمه حساس و مقاوم به ایمیپنم ۵۸

جدول ۹-۴- تحت گروه های فیلوژنی جدایه های حساس،نیمه حساس و مقاوم به سیپروفلوکسازین..... ۵۹

جدول ۱۰-۴- تحت گروه های فیلوژنی جدایه های حساس،نیمه حساس و مقاوم به
نیتروفورازولیدون..... ۶۰
جدول ۱۱-۴- تحت گروه های فیلوژنی جدایه های حساس،نیمه حساس و مقاوم به جنتامایسین..... ۶۱
جدول ۱۲-۴- تحت گروه های فیلوژنی جدایه های حساس،نیمه حساس و مقاوم
به نالیدیکسیک اسید..... ۶۲
جدول ۱۳-۴- تحت گروه های فیلوژنی جدایه های حساس،نیمه حساس و مقاوم
به سفپیم..... ۶۳
جدول ۱۴-۴- تحت گروه های فیلوژنی جدایه های حساس،نیمه حساس و مقاوم
به آمیکاسین ۶۴
جدول ۱۵-۴- تحت گروه های فیلوژنی جدایه های حساس،نیمه حساس و مقاوم
به سفازولین ۶۵
جدول ۱۶-۴- الگوهای مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها..... ۶۶
جدول۱۷-۴- بررسی گروه های فیلوژنی در الگوهای مقاومت..... ۶۷

فهرست نمودارها

نمودار ۱-۴ توزیع فراوانی جدایه ها درگروه های مختلف فیلوژنی..... ۴۷

نمودار۲-۴- توزیع فراوانی جدایه ها در تحت گروه های فیلوژنی..... ۴۸

نمودار ۳-۴- انتشار ژن های مورد بررسی در بین جدایه ها..... ۵۰

نمودار ۴-۴ انتشار جدایه های واجد ژن *blaTEM* در گروه های فیلوژنی..... ۵۲

نمودار ۵-۴ انتشار جدایه های واجد ژن *blaTEM* در تحت گروه های فیلوژنی..... ۵۳

نمودار ۶-۴ انتشار جدایه های واجد ژن *blaSHV* در گروه های فیلوژنی..... ۵۴

نمودار۷-۴ انتشار جدایه های واجد ژن bla_{SHV} در تحت گروه های فیلوژنی..... ۵۴

نمودار ۸-۴- نتایج تعیین حساسیت جدایه ها نسبت به ۹ آنتی بیوتیک..... ۵۵

نمودار ۹-۴- درصد فراوانی گروه های فیلوژنی جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم به کوتریموکسازول..... ۵۷

نمودار ۱۰-۴- درصد فراوانی گروه های فیلوژنی جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم به ایمیپنم..... ۵۸

نمودار ۱۱-۴- درصد فراوانی گروه های فیلوژنی جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم به سیپروفلوکسازین..... ۵۹

نمودار ۱۲-۴- درصد فراوانی گروه های فیلوژنی جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم به نیتروفورازولیدون..... ۶۰

نمودار ۱۳-۴- درصد فراوانی گروه های فیلوژنی جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم به جنتامایسین..... ۶۱
نمودار ۱۴-۴- درصد فراوانی گروه های فیلوژنی جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم به نالیدیکسیک اسید..... ۶۲
نمودار ۱۵-۴- درصد فراوانی گروه های فیلوژنی جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم به سفپیم..... ۶۳
نمودار۱۶-۴- درصد فراوانی گروه های فیلوژنی جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم آمیکاسین..... ۶۴
نمودار ۱۷-۴- درصد فراوانی گروه های فیلوژنی جدایه های حساس، نیمه حساس و مقاوم سفازولین..... ۶۵

فهرست تصاویر

تصویر ۱-۴ نتایج آزمایش PCR جهت تعیین گروه ها و تحت گروه های فیلوژنی..... ۴۹

تصویر۲-۴ نتیجه آزمایش PCR جهت شناسایی ژن های *TEM-1* و *SHV-1*..... ۵۱

فصل اول

مقدمه و هدف

مقدمه و هدف

اشریشیا[1] شایعترین جنس از خانواده انتروباکتریاسه است که متداولترین گونه ی این جنس اشریشاکلی[2] می باشد. این ارگانیسم بعد از باکتریوئیدس[3] فراوان ترین فلور نرمال روده ی بزرگ است که تحت شرایط خاص بیماری زا می شود، در نتیجه اشریشیاکلی یک باکتری فرصت طلب محسوب می گردد. اشریشیاکلی عامل ایجاد کننده ی ۳۵-۳۰ درصد کل سپتی سمی ها[4] (شایعترین عامل سپتی سمی گرم منفی و معمولترین ارگانیسمی که از کشت خون به دست می آید)، پنومونی[5]، عفونت زخم به ویژه در ناحیه ی شکم، ۴۰٪ از موارد مننژیت نوزادان، عفونت های بعد از زایمان و در نهایت این ارگانیسم شایعترین عامل عفونت مجاری ادراری[6] می باشد بطوری که ۹۰٪ از عفونت های مجاری ادراری را در زنان تشکیل می دهد (۱۲). خانم ها در سنین جوانتر به عفونت های سیستم ادراری مبتلا می شوند. علت این مسئله تفاوت هایی در ساختمان تشریحی، بلوغ جنسی و تغییراتی است که در زمان حاملگی، تولد جنین و حضور تومورها برای مادر اتفاق می افتد، اما در آقایان فقط بعد از ۴۵ سالگی که مبتلا به هیپرتروفی پروستات می شوند استعداد ابتلا به عفونت سیستم ادراری را دارند (۷). عفونت مجاری ادراری توسط گروهی از باکتری ها به نام اوروپاتوژن اشریشیاکلی[7] ایجاد می شود. باکتری می تواند قسمت های مختلف مجاری ادراری را درگیر کند، درنتیجه طبقه بندی عفونت های ادراری بر اساس منطقه ی است که آن را درگیر می کنند. طیف بروز عفونت های ادراری از سیستیت[8] تا پیلونفریت[9] تغییر می کند. پیلونفریت به عفونت مجرای ادراری فوقانی گفته می شود که اغلب با درد پهلو، حساسیت غیر طبیعی و تکرر ادرار[10] همراه با سوزش[11] می باشد. سیستیت و پیلونفریت، بیماری های حادی هستند که عفونت های مزمن یا عود کننده آن ها بطور مکرر رخ می دهد (۷).

1- *Escherichia*
2- *Escherichia coli*
3- *Bacteroides*
4- Septisemia
5- Pneumonia
6- Urinary tract infection
7- Uropathogene *Escheichia coli*
8- Cystitis
9- Pyelonephritis
10- Frequency
11- Dysuria

آنالیز ژنتیکی اشریشیاکلی نشان می دهد که این جدایه ها در چهار گروه اصلی فیلوژنتیکی A1, B1, B2, D انتشار دارند. گروه های فیلوژنی در زمینه ژن های حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی دارای تفاوت هایی هستند.

ظهور مقاومت های آنتی بیوتیکی[۱] در میان پاتوژن ها به ویژه در مراکز درمانی و بیمارستان ها به یک معضل بزرگ در رابطه با سلامت همگانی تبدیل شده است. برخی از باکتری ها قادر به تولید آنزیم هایی هستند که منجر به تغییر و تخریب ساختار شیمیایی آنتی بیوتیک ها و در نهایت سبب غیر فعال شدن آنتی بیوتیک و بروز فنوتیپ مقاوم از سوی باکتری می شوند. بهترین مثال از این مقاومت ها آنزیم های بتالاکتاماز[۲] بوده که ازطریق یک اتصال آسیل کووالانتی به گروه کربوکسیل بتالاکتام ها[۳]، ها[۳]، باعث باز شدن حلقه بتالاکتام و در نتیجه غیر فعال شدن دارو می گردند (۷۰).

کاربرد روز افزون دارو های ضد میکروبی از جمله آنتی بیوتیک های سفالوسپورینی[۴] منجر به ظهور بتالاکتامازهای وسیع الطیف یا ESBLs[۵] شده است. پدیده ی ESBLs برای اولین بار در سال ۱۹۸۳ از اروپا گزارش شد طولی نکشید که بتالاکتامازهای وسیع الطیف در ایالات متحده امریکا و آسیا نیز شناسایی شد (۵۵).

آنزیم های ESBLs در چهار گروه اصلی از A تا D تقسیم می شوند که گروه A سبب هیدرولیز پنی سیلین[۶]، سفالسپورین هایی با طیف اثر کم و وسیع می شوند که شامل (*SHV.1*، *TEM.2* و *TEM.1*) می باشند (۲۷). ژن *TEM* اولین و رایجترین بتالاکتاماز پلاسمیدی است که در سال ۱۹۶۰ برای اولین بار از اشریشیاکلی جدا شد. این آنزیم سبب مقاومت به پنی سیلین و سفالوسپورین های اولیه نظیر سفالوتین[۷] می گردد (۷۰). خانواده *SHV* در سال ۱۹۸۳از سویه های کلبسیلا پنومونیه[۸] گزارش شد. ژن ژن کد کننده ی این آنزیم در ایزوله های کلبسیلا یک ژن کروموزومی است اما این ژن به صورت فاکتور (R)[۹]، طی پدیده ایی به نام کانژوگیشن[۱۰] در میان سویه های پاتوژن گسترش پیدا کرده است (۵۵).

1- Antibiotics resistance
2- Beta- lactamases
3- Beta- lactam
4- Cephalosporins
5- Extended Spectrum Beta- lactamases
6- Penicillen
7- Cephalothin
8- *Klebsiella peneumonae*
9- Resistant
10- Conjugation