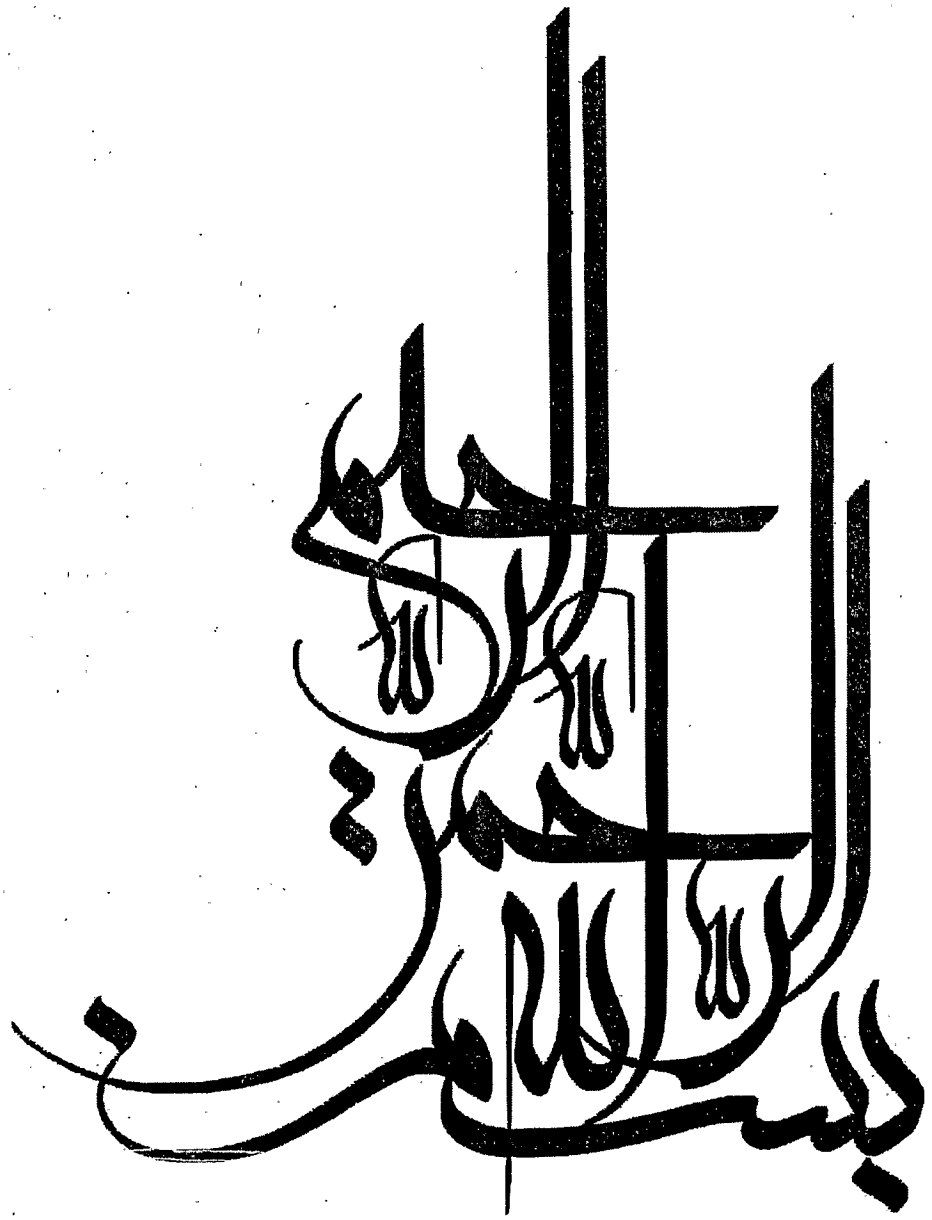

٩٥٧٠٥

دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی سویه های اشریشیاکلی تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC جدا شده از بیمارستان های منتخب تهران

پایان نامه :
برای دریافت درجه کارشناسی ارشد
در رشته بیوشیمی

مولف
صادق منصوری

۱۳۸۷ /۲/ ۲۳

استاد راهنما
دکتر محسن چیت ساز
دکتر رضا حاجی حسینی

ماه و سال انتشار
اردیبهشت ۱۳۸۷

جمهوری اسلامی ایران
وزارت علوم تحقیقات و فناوری

تاریخ .....
شماره .....
پیوست .....

دانشگاه پیام نور
دانشگاه جامع پیام نور استان تهران

((تصویب نامه))

پایان نامه تحت عنوان :

"بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) متعلق به خانواده‌های ژنی AmpC در سویه‌های بالینی اشریشیا کلی "

تاریخ دفاع :۸۶/۱۲/۱۹ رشته: **بیوشیمی** ساعت: **۱۳-۱۲** نمره :۱۹/۵ درجه : عالی

اعضای هیات داوران :

نام و نام خانوادگی	هیات داوران	مرتبه علمی	امضاء
۱- جناب آقای دکتر محسن چیت ساز	استاد راهنما		
۲- جناب آقای دکتر رضا حاجی حسینی	استاد راهنمای همکار		
۳- جناب آقای دکتر ناظم	استاد داور داخلی		
٤- جناب آقای دکتر لامع راد	استاد داور خارجی		
۵- سرکار خانم دکتر شامحمدی	نماینده گروه		

...ان،خیابان انقلاب،
...ان استاد نجات اللهی،
...ش خیابان سپند،
...لاک ۲۳۳
...ن: ۸۸۸۰۱۰۹۰
...نگار: ۸۸۹۰۳۱۵۸
...ست الکترونیکی:
info@Tehran.pnu.a
...انی الکترونیکی:
http://www.Tehran.pnu.a

بار الها

تو را می ستایم که شایسته ستایشی

تو را می پرستم که شایسته پرستشی

تو را دوست دارم که تنها عشق به تو برایم کافیست

و به خود مغرورم که چون تویی را در قلب و روح خویش دارم

مرا یاریم کن و تنها رضایت خود را سرلوحهٔ زندگیم قرار ده

تقدیم به روح پاک پدر بزرگوارم

که روح عاشقش هماره در تمام مراحل زندگی نظاره گر و یار و یاورم است.

تقدیم به موی سفید مادرم

سرو راست قامت بوستان زندگیم. او که سایه سار زندگی من بوده و هم او که دریای عشق و پاکی و صداقت و صفاست.

تقدیم به همسرم

او که روشنی نگاهش، باران محبت را به کلبهٔ قلبم هدیه کرد. او که وجود پرمهرش برایم مأوایی در برابر فرداهای پیش رو است.

و تقدیم به آرام جانم، باران لطیف زندگیم، گل زیبایم، یاسمن. او که شیرین ترین لحظات در خنده های کودکانه اش شکل می گیرد و پاک ترین نگاه در چشمان زیبایش طلوع می کند.

و من لم یشکر المخلوق و لم یشکر الخالق

با تشکر و سپاسگزاری فراوان از استاد ارجمند جناب آقای دکتر محسن چیت ساز

با تشکر و سپاسگزاری از استاد ارجمند جناب آقای دکتر رضا حاجی حسینی

با تشکر و سپاسگزاری از استاد ارجمند جناب آقای دکتر پرویز اولیاء

با تشکر و سپاسگزاری از استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمدرضا جلالی

با تشکر و سپاسگزاری از همکاران محترم جناب آقای حسن جدیدی، جناب آقای حسین نامی، جناب آقای سعید مرآتی، جناب آقای حمیدرضا بابایی.

با تشکر و سپاسگزاری از تمامی پرسنل محترم دانشکده پزشکی شاهد.

با تشکر و سپاسگزاری از پرسنل محترم آموزش دانشگاه پیام نور واحد تهران خصوصاً جناب آقای خلفی و جناب آقای مهدی پور.

و با تشکر و سپاسگزاری از تمامی دوستان و همکارانی که به نوعی در موفقیت اینجانب نقش داشتند.

خداوند منان به همه جزای خیر عطا فرماید.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

چکیده فارسی ..... پنج
مقدمه ۱

فصل اول (کلیات)

مقاومت داروئی ٤
منشاء مقاومت های داروئی ٤
منشاء غیرژنتیکی مقاومت داروئی ٤
منشاء ژنتیکی مقاومت داروئی ٤
مقاومت کروموزومی ٥
مقاومت خارج کروموزومی ٥
پلاسمیدهای کنژوگه ای ٦
پلاسمیدهای غیرکنژوگه ای ٦
ارگانیسم های مورد مطالعه و اهمیت بیماریزائی آن در جامعه ۷
مشخصات خانواده انتروباکتریاسه ۷
ساختمان آنتی ژنی ۸
شاخص های بیماریزایی ۸
انتروباکتریاسه های فلور طبیعی روده ۹
اشریشیاکلی ۹
عوامل موثر در بیماریزایی ۱۰
پاتوژنز عفونت های روده ای اشریشیاکلی ۱۲
اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک ۱۳
اشریشیاکلی انتروواینویسیو ۱٤
اشریشیاکلی انتروهموراژیک ۱٤
پاتوژنز عفونت های خارج روده ای اشریشیاکلی ۱٤

اهمیت اپیدمیولوژیکی و بالینی اشریشیاکلی ۱۶
مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی در اشریشیاکلی ۱۷
اپیدمیولوژی مولکولی ایجاد مقاومت ۲۲
اپیدمیولوژی و سیر مقاومت اشریشیاکلی در کشورهای اروپایی و آمریکا ۲۳
مقاومت با واسطه تولید آنزیم بتالاکتاماز ۲۷
تاریخچه ۲۸
طبقه بندی آنزیم های بتالاکتاماز ۳۰
ژنتیک آنزیم های بتالاکتاماز ۳۳
فاکتورهایی که بیان بتالاکتامازها را تحت تأثیر قرار می دهند ۳٤
بتالاکتامازهای نوع AmpC ۳۵
جنبه های مولکولی ۳۵
خصوصیات آنزیمی ۳۹
مشکلات شناسایی آنزیم های بتالاکتاماز ٤۰
روش های شناسایی سویه های تولیدکننده آنزیم های بتالاکتاماز ٤۲
شیوه های پیشنهادی CLSI برای شناسایی بتالاکتامازهای وسیع الطیف ٤۵
شیوه های تشخیصی بتالاکتامازهای وسیع الطیف موجود در بازار ٤۹
شیوه های دیگر تشخیص بتالاکتامازهای وسیع الطیف ۵۱
فاکتورهای خطر برای ایجاد عفونت ۵٦
مطالعه در انسان ۵٦
کنترل شیوع عفونت ۵۷
درمان ۵۷

فصل دوم (مواد و روشها)

اهداف طرح ۵۹
فرضیات تحقیق ۵۹
جمع آوری ایزوله های میکروبی، شناسایی و ذخیره کردن آنها ٦۱
شناسایی بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) و بتالاکتامازهای نوع AmpC ٦۰
غربالگری ایزوله ها جهت شناسایی بتالاکتامازها به روش پیشنهادی CLSI ٦۱

تهیه پودرهای آنتی بیوتیکی ٦١
تهیه محلول ذخیره آنتی بیوتیک های سفتریاکسون، سفتازیدیم، سفپیم و سفوکسیتین ٦١
کنترل کیفی رقت های مختلف آنتی بیوتیک های تهیه شده به روش رقت سریال در لوله آزمایش ٦٦
ساخت محیط های کشت ٦٨
آزمایش تعیین حداقل غلظت مهارکننده از رشد باکتری برای هریک از آنتی بیوتیک ها (MIC) ٧٠
تست های تأییدی برای شناسایی ارگانیسم های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف ٧١
تست تأیید تولید بتالاکتاماز نوع AmpC ٧١
شناسایی ژن های بتالاکتاماز نوع AmpC توسط روش PCR مخلوط ٧٢
واکنش های زنجیره ای پلی مراز (PCR) ٧٨
آنالیز و بررسی محصولات PCR ٧٩

فصل سوم (نتایج و یافته ها)

نتایج و یافته ها ٨٣

فصل چهارم (بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات)

بحث ٩٥
منابع ١٠٠
چکیده انگلیسی ١١١

فهرست جداول

جدول شماره ۲-۱: مراحل تهیه رقت های آنتی بیوتیک های سفتریاکسون، سفتازیدیم و سفوکسیتین..... ٦٤
جدول شماره ۲-۲ مراحل تهیه رقت های آنتی بیوتیک سفپیم ٦٥
جدول شماره ۲-۳ مشخصات پرایمرهای بکار رفته در تشخیص ژنهای بتالاکتامازهای نوع AmpC..... ٧٤
جدول شماره ۲-٤ روش تهیه مخلوط واکنش یا Master Mix..... ٧٧
جدول شماره ۲-٥ مراحل انجام PCR توسط دستگاه ترموسایکلر ٧٨
جدول شماره ۲-٦ خصوصیات محصولات ٧٩

فهرست نمودارها

نمودار شماره ۳-۱ توزیع فراوانی ایزوله های اشریشیاکلی سه بیمارستان منتخب تهران ٨٧
نمودار شماره ۳-۲ توزیع فراوانی ایزوله های بالینی اشریشیاکلی بر حسب بخش بستری ٨٧
نمودار شماره ۳-۳ توزیع فراوانی ایزوله های بالینی اشریشیاکلی بر حسب نوع نمونه..... ٨٨
نمودار شماره ۳-٤ درصد فراوانی نسبی شیوع ارگانیسم های تولیدکننده بتالاکتاماز بر حسب فنوتیپ ٨٨
نمودار شماره ۳-٥ توزیع MIC آنتی بیوتیک سفتازیدیم در برابر اشریشیاکلی..... ٨٩
نمودار شماره ۳-٦ توزیع MIC آنتی بیوتیک سفتازیدیم + کلاوولانیک اسید در برابر اشریشیاکلی..... ٨٩
نمودار شماره ۳-۷ توزیع MIC آنتی بیوتیک سفتریاکسون در برابر اشریشیاکلی ٩٠
نمودار شماره ۳-۸ توزیع MIC آنتی بیوتیک سفتریاکسون + کلاوولانیک اسید در برابر اشریشیاکلی ٩٠
نمودار شماره ۳-۹ توزیع MIC آنتی بیوتیک سفپیم در برابر اشریشیاکلی ٩١
نمودار شماره ۳-۱۰ توزیع MIC آنتی بیوتیک سفپیم + کلاوولانیک اسید در برابر اشریشیاکلی..... ٩١
نمودار شماره ۳-۱۱ توزیع MIC آنتی بیوتیک سفوکسیتین در برابر اشریشیاکلی ٩٢
نمودار شماره ۳-۱۲ توزیع فراوانی ایزوله های اشریشیاکلی تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC..... ٩٢
نمودار شماره ۳-۱۳ توزیع فراوانی ایزوله های اشریشیاکلی واجد خانواده های ژنی بتالاکتاماز نوع AmpC ٩٣

فهرست تصاویر

تصویر شماره ۲-۱ چگونگی تهیه رقت های سریال از آنتی بیوتیک ها..... ٦٨
تصویر شماره ۳-۱ ژل حاوی باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات PCR..... ٩٣

چکیده:

مقدمه:

استفادهٔ گسترده از آنتی بیوتیک های بتالاکتام موجب توسعه مقاومت به این گروه از آنتی بیوتیک ها در باکتری های بیماریزا از طریق تولید آنزیم بتالاکتاماز می شود. این مطالعه به جهت تعیین تولید آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC در باکتری اشریشیاکلی جداشده از سه بیمارستان منتخب شهر تهران انجام شده است.

مواد و روش ها:

تعداد ۱۵٤ ایزولهٔ بالینی اشریشیاکلی غیرتکراری از سه بیمارستان منتخب شهر تهران جمع آوری و از نظر تولید آنزیم های بتالاکتاماز با استفاده از آنتی بیوتیک های سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفپیم و همچنین مهارکنندهٔ بتالاکتاماز اسیدکلاوولانیک به روش دیسک دیفیوژن و تعیین MIC این آنتی بیوتیک ها به روش رقت در آگار مورد بررسی قرار گرفت. همچنین حساسیت این ایزوله ها به آنتی بیوتیک سفوکسیتین مورد بررسی قرار گرفت. در پایان ایزوله های کاندید داشتن این آنزیم به روش Multiplex PCR تحت آزمایش قرار گرفتند.

نتایج:

پس از آنجام آزمایشات، ایزوله ها از نظر فنوتیپ مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم به سه گروه $P^{-}C^{-}$ با فراوانی ٤۰٪، $P^{+}C^{+}$ با فراوانی ٥٤٪، $P^{+}C^{-}$ با فراوانی ۳٪ براساس معیارهای آزمایشی فنوتیپی ESBLs تقسیم شدند. از مجموع سویه های $P^{+}C^{+}$ و $P^{+}C^{-}$ که تحت آزمایش Multiplex PCR قرار گرفتند ٥ سویه واجد آنزیم بتالاکتاماز نوع AmpC با فراوانی ۳/۲٪ شناخته شد.

بحث و نتیجه گیری:

این اولین گزارش از وجود بتالاکتامازهای نوع AmpC از دستهٔ EBC-M، DHA-M و CIT-M در ایران بوده و به دلیل اهمیت ارگانیسم های تولیدکنندهٔ این آنزیم ها در ایجاد عفونت های بیمارستانی و برای جلوگیری از گسترش آنها توصیه می شود تحقیقات وسیعتری از نظر بررسی شیوع واقعی این آنزیم در ایران انجام شود.

کلید واژه ها : بتالاکتاماز، وسیع الطیف، AmpC، اشریشیاکلی

مقدمه:

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف آنزیمهای وابسته به پلاسمیدی هستند که آنتی بیوتیکهای بتالاکتام اکسی‌ایمینو مثل سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف نسل سوم از جمله سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفوتاکسیم را تجزیه می‌کنند. این آنزیم‌ها اغلب در اعضای خانواده آنتروباکتریاسه خصوصاً کلبسیلا پنومونیه و اشریشیاکلی یافت می‌شوند. شناسایی تولید بتالاکتامازهای وسیع‌اطیف راه حل مفیدی برای انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب در اختیار پزشکان قرار می‌دهد.

عفونت‌های ایجاد شده به وسیله باسیل های گرم منفی روده ای مقاوم به چند دارو که آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف تولید می‌کنند، با افزایش تعداد در واحدهای مراقبت ویژه گزارش شده است و در ارتباط با مرگ و میر و نا توانی قابل توجه می‌باشد. ESBLs بتالاکتامازهایی هستند که توانایی بروز مقاومت باکتریایی به پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های نسل اول، دوم ، سوم و آزتروئونام (اما نه سفامایسین یا کارباپنم‌ها) به وسیله هیدرولیز این آنتی بیوتیک‌ها را دارند و به وسیلهٔ مهار کننده‌های بتالاکتاماز مانند کلاوولانیک اسید مهار می‌شوند در صورتیکه بتالاکتامازهای نوع AmpC علاوه بر هیدرولیز سفالوسپورین های نسل اول، دوم، سوم، آزترونام و سفامایسین ها توسط هیدرولیز این آنتی بیوتیک ها توسط مهارکننده های بتالاکتاماز مانند کلاولانیک اسید مهار نمی شوند.

ارگانیسم‌های تولید کنندهٔ بتالاکتاماز وسیع الطیف حاوی پلاسمیدهای چند مقاومتی هستند که ممکن است به راحتی میان اعضای آنتروباکتریاسه، حتی در همان بیمار منتقل شود. در نتیجه ارگانیسم‌های تولید کنندهٔ ESBL و AmpC، اغلب به کلاس های متنوعی از آنتی بیوتیک ها مقاوم می باشند. ظهور باکتری های مولد بتالاکتاماز سیع الطیف استفادهٔ مؤثر از سفالوسپورین های وسیع الطیف در درمان عفونت های جدی ایجاد شده به وسیله این پاتوژن ها را محدود کرده است.

وجودارگانیسم‌های تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف در یک عفونت بالینی می تواند منجر به شکست درمانی شود، بنابراین انتخاب عامل دارویی ضد میکروبی بسیار مهم می‌باشد. آزمایشهای آنتی‌بیوگرام تمامی موارد این نوع مکانیسم مقاومت را شناسایی نمی‌کند. ضمن اینکه ممکن است یک ارگانیسم تولید کننده بتالاکتاماز به علت سطوح متفاوت فعالیت بر ضد سفالوسپورین‌های مختلف، در آزمایش های معمول به بعضی از آنها حساس به نظر برسد. لذا CLSI پیشنهاد کرده است که شناسایی بتالاکتامازهای وسیع الطیف و بتالاکتامازهای نوع AmpC در کنار آزمایشهای آنتی بیوگرام برای ارگانیسم‌های جدا شده از نمونه بیماران صورت گیرد. این آزمایشات انتخاب‌های درمانی قابل اعتمادی در اختیار پزشک به منظور درمان موفقیت آمیز و جلوگیری از به کار بردن بی‌رویه آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف غیر مؤثر که شکست درمانی و تحمیل هزینه‌های سنگین به بیمار و سیستم بهداشتی درمانی را در پی دارد قرار می‌دهد.

شناسایی سویه های تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف و بتالاکتاماز نوع AmpC در آزمایشگاههای میکروب شناسی بالینی در داخل کشور هنوز متداول نشده است. این تحقیق به منظور تأکید بر اهمیت شیوع ارگانیسم‌های تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف و بتالاکتاماز نوع AmpC و لزوم شناسایی آنها انجام شده و به طور ویژه فراوانی تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف نوع AmpC را در ایزوله های بالینی اشریشیاکلی توسط روش MIC بررسی کرده است. همچنین مقایسه توزیع مقاومت ایزوله های اشریشیاکلی بر اساس توزیع MIC هر یک از آنتی بیوتیکهای سفتریاکسون ،سفتازیدیم و سفپیم و سفوکسیتین در ایزوله های بالینی اشریشیاکلی در بیمارستانهای شهید مصطفی خمینی،مرکز طبی کودکان و امام خمینی شهر تهران مورد بررسی قرار گرفته است.

فصل اول

کلیات

مقاومت دارویی:

از زمانی که سولفونامیدها و پنی سیلینها پا به عرصه وجود گذاشتند، دنیای جدیدی در پزشکی بالینی باز شد و موج نبردی وسیع (در مبارزه با بیماریهای عفونی) تحریک گردید. در نخستین روزهای کاربرد این داروها اپیدمی های خانمان سوز متعددی فرو نشانده شد اما با این حال بیماریهای ناشی از ارگانیسم های عفونی به صورت یک مشکل جدی باقی مانده است. یکی از فاکتورهای مهمی که در بقاء بیماریهای عفونی سهیم است ظرفیت بالای میکروارگانیسم ها در غلبه بر عوامل مهاری می باشد. توانایی بسیاری از میکروارگانیسم ها در بروز مقاومت در برابر عوامل متنوع ضد میکروبی یک تهدید جدی برای فواید درمانهای ضد میکروبی است[۱۱۲].

منشاء مقاومتهای دارویی:

منشاء غیر ژنتیکی مقاومت دارویی:

معمولا برای فعالیت اغلب داروهای ضد میکروبی تکثیر فعال باکتریها مورد نیاز می باشد. در نتیجه میکروارگانیسم هایی که از نظر متابولیکی غیر فعال می باشند(تکثیر نمیشوند) ممکن است به صورت فنوتیپی نسبت به داروها مقاوم باشند با این حال نسلهای بعدی آنها حساس می باشند. میکروارگانیسم ها ممکن است برای چندین نسل ساختمان اصلی هدف دارو را از دست بدهند در نتیجه مقاوم گردند. به عنوان مثال ارگانیسمهای حساس به پنی سیلینها ممکن است در طی مصرف پنی سیلین تبدیل به اشکال L که فاقد دیواره سلولی هستند بشوند. این ارگانیسمهای بدون دیواره نسبت به داروهای مهار کننده دیواره سلولی مقاوم شده ممکن است برای چندین نسل به همین ترتیب باقی بمانند. با از سرگیری ساختن دیواره سلولی این ارگانیسمهای به والد خود تبدیل شده و دوباره به دارو حساس می شوند. برخی مشکلات درمانی زمانی ایجاد می گردد که داروی انتخابی قادر به رسیدن به هدفش نباشد به عنوان مثال از سد خونی- مغزی عبور ننماید ویا باکتری درون یک آبسه قرار گرفته باشد و دارو نتواند به آن برسد. سایر مشکلات به غلظت آنتی بیوتیک وابسته است در بعضی موارد آنتی بیوتیک درون بدن دفع یا متابولیزه می گردد که این امر باعث میشود مقدار دارو در حد مناسب در خون پایدار نماند ویا مدت کمی باقی بماند و یا دارو در یک ارگان یا بافت خاص تغلیظ گردد و به مکانهای دیگر وارد نشود[۱۱۲].

منشاء ژنتیکی مقاومت دارویی:

دو مکانیسم مهم ژنتیکی وجود دارد که از طریق آنها مقاومت در برابر آنتی بیوتیکها بروز می نماید:

A: موتاسیون[1] (مقاومت کروموزومی)

B: تبادل ژنتیکی (مقاومت خارج کروموزومی)

مقاومت کروموزومی:

در گذشته در اتباط با منشاء سوشهای مقاوم به دارو اختلاف نظر وجود داشت. کوششهای قابل توجهی در ارتباط با شناسائی منشاء سوشهای مقاوم انجام گرفت تا مشخص گردد که آیا باکتریهای مقاوم از تطابق فنوتیپی منشاء گرفته و ماحصل واکنشهای بین دارو با ارگانیسم هستند ویا موتانهایی می باشند که بدون وابستگی به آنتی بیوتیک پا به عرصه وجود گذاشته اند. اکنون کاملا ثابت گردیده است که مقاومت آنتی بیوتیکی توسط هر در مکانیسم مذکور بروز می یابد [۴۹].

جهش یافته های کروموزومی اکثرا در اثر تغییر در گیرنده ساختمانی یک دارو دارای مقاومت می گردند. به این ترتیب به عنوان مثال پروتئین P_{12} که برروی زیر واحد 30S ریبوزوم باکتری به عنوان گیرنده استرپتومایسین عمل می نماید چنانچه در ژن کد کننده اش جهشی روی دهد موجب ایجاد مقاومت به استرپتومایسین می گردد. در حقیقت ناحیه کوچکی از کروموزوم باکتری حاوی ژنهای ساختمانی می باشد که برای تعدادی از گیرنده های دارویی دارای رمز هستند[۱۱۲، ۴۹].

مقاومت خارج کروموزومی:

اطلاعات ژنتیکی که مقاومت دارویی باکتریها را کنترل می کنند هم در کروموزوم باکتری و هم در DNA خارج کروموزومی وجود دارند. اطلاعات ژنتیکی یا مقاومت دارویی از یک سلول مقاوم به روشهای کانجوگاسیون[2] ترانسفورماسیون[3]، ترانس داکسیون[4] می تواند به سلولهای حساس انتقال یابند. پلاسمیدها ابزار بسیار کارآمدی برای انتشار و آرایش مجدد اطلاعات ژنتیکی هستند[۱۱۲].

پلاسمیدها را در دو تیپ طبقه بندی مینمایند:

۱- پلاسمیدهای کونجوگه ای

۲- پلاسمیدهای غیر کونجوگه ای

1- Mutation
2- Conjugation
3- Transformation
4- Transduction

پلاسمیدهای کونجوگه ای:

این پلاسمیدها از یک سلول به سلول دیگر قدرت خود انتقالی دارند ایـن توانـایی در ارتبـاط بـا ناحیـه ای از ژنهـای مرتبط با کانجوگیشن و سنتز پیلی جنسی می باشد. پلاسمیدهایی که در ارتباط با انتقـال شاخصـهای مقاومـت – دارویـی تحت عنوان پلاسمیدهای R شناخته می شوند. پلاسمیدهای کونجوگه ای واجد دو جزء متمایز هستند: ۱- فـاکتور انتقـال مقاومت[۵] (RTF) که فرایند کانجوگیشن را شروع و کنترل می نمایـد۲- شـاخص-r کـه یکسـری از ژنهـای مـرتبط بـه یکدیگر می باشند و بروز مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی اختصاصی را موجب میشوند شاخصهای مقاومـت اغلـب به صورت ترانسپوزون به پلاسمید اضافه می شوند. شاخصهای r موجب بروز مقاومت در سلول بـاکتری مـی شـوند امـا برای انتقال مقاومت و انجام کانجوگیشن حضور(RTF) ضرورت دارد[۵۳].

تماس محیطی فلور طبیعی روده با آنتی بیوتیک ها شرایط مناسبی را برای رشد ارگانیسم هایی فراهم می کند که ناقـل پلاسمیدهای R هستند. زمانی که افراد این ارگانیسم ها را در روده خود داشته باشند و توسط گونـه هـای بیمـاریزا آلـوده شوند ساپروفیت های مقاوم به دارو پلاسمیدها را به بیماریزا های حساس انتقال می دهند[۵۳].

ژنهای مقاومت می توانند از یک پلاسمید به پلاسمید دیگر از پلاسمید به کروموزوم و یـا از پلاسـمید بـه باکتریوفـاژ انتقال یابند. حال چنانچه دارویی برای درمان بیمار بکار برده شود سوشهای مقاوم جایگزین ارگانیسم های حساس به دارو خواهند شد. شواهد بالینی مشخصی وجود دارند که انتقال این مقاومت دارویی در روده انسان اتفاق می افتد[۵۳].

پلاسمیدهای غیر کونجوگه ای:

این پلاسمیدها قادر نیستند انتقال خود را شروع نمایند و قادر به تولید پیلی جنسی نمی باشند. آنها نسبت به پلاسـمید های کونجوگه ای اندازه کوچکتری دارند و بندرت برای بیش از دو ژن مقاومت در برابـر آنتـی بیوتیـک کـد مـی شـوند. فرآیند انتقال آنهـا توسـط پلاسـمیدهای کونجوگـه ای امکـان پـذیر مـی گـردد. پلاسـمیدهای غیـر کونجوگـه ای مشـابه پلاسمیدهای کونجوگه ای توسط ترانسفورمیشن[۶]، ترانس داکشن[۷] از یک ارگانیسم بـه ارگانیسـم دیگـر انتقـال مـی یابنـد [۱۱۲، ٤۹].

کسب مواد ژنتیکی توسط پلاسمیدها و کروموزومها محدود به فرآیندهای نو ترکیبی کلاسیک نیسـت بسـیاری از ژن های مقاومت دارویی بر روی ترانسپوزونها قرار دارند. ترانسپوزونها توالی هایی ازDNA هستند کـه مـی تواننـد از درون یک ژنوم خارج شده در ژنوم دیگری وارد شوند[۵۳].

5- Resistance transforming factor

6 -Transformation

7 -Transduction

ارگانیسم مورد مطالعه و اهمیت بیماریزایی آن در جامعه:

اعضاء خانواده آنتروباکتریاسه انواع وسیعی از عفونت را در هر دو محیط بیمارستان و اجتماع ایجاد می‌کنند. بـه نظـر می‌رسد اشریشیاکلی یکی از ارگانیسمهای مهم در بین تولید کنند گـان بتالاکتامـاز وسـیع الطیـف(ESBLs)[۸] در محـیط بیمارستانی باشد [۵۳].

مشخصات خانواده انتروباکتریاسه:

برخی از انتروباکتریاسه ها (جنسهای اشریشیا، انتروبـاکتر، کلبسـیلا، پروتئـوس، سراشـیا) فلـور طبیعـی روده، برخـی (جنسهای سالمونلا و شیگلا) بیماریزای روده ای و برخی (جنس یرسینیا) بیماریزای غیر روده ای انسان و حیوانـات مـی باشند و جنس اروینیا بیماریزای گیاهان می باشد[۵۳].

این باکتریها باسیل یا کوکوباسیلهای گرم منفی فاقد اسپور، هوازی و بیهوازی اختیـاری و اکسـیداز منفـی مـی باشـند. کپسول در برخی از گونه ها مثل کلبسیلاها بزرگ و در انتروباکترها کوچکتر است و سبب موکوئیدی شدن کلنی می شود. برخی از این باکتریها متحرک با تاژه های پیرامونی هستند مثل پروتئوسـها ولـی برخـی مثـل شـیگلاها غیـر متحـرک مـی باشند[۱۱۲، ۵۳].

کلنی این باکتریها کروی، محدب و صاف با لبه های منظم است. در روی محیط افتراقی نظیر محـیط ENDO، مـک کانکی و ائوزین متیلن بلو انواع تخمیر کننده لاکتوز کلنی صورتی و انواع غیر تخمیر کننده (سالمونلا، شیگلا و پروتئوس) کلنی روشن ایجاد می کنند. کلنی اشریشیا کلی روی ائوزین متیلن بلو جلای فلزی دارد. کلنی در برخـی از آنهـا موکوئیـد است مثل انتروباکتر و کلبسیلا و برخی مثل اشریشیا کلی در محیط خوندار همولیز می دهند [۱۱۲].

همه این باکتریها گلوکز را تخمیر کرده، نیترات را به نیتریت احیا می کنند و آلژینات را مصرف نمی کنند. متمایز کردن جنس ها و گونه ها از طریق الگوی تخمیر کربو هیدراتها در محیطهای قندی، واکنش روی محیط سه قنـدی ، تولیـد اوره آز، اندول، H_2S و فعالیت آنزیمها از جمله دکربوکسیلازهای اسیدهای امینه (مثل لایزین دکربوکسیلاز) صورت می گیـرد. آزمایش IMVIC[۹] که از چپ به راست به ترتیب تولید اندول، متیل رد، وژپروسکوئر و مصرف سیترات را نشان می دهد یکی از این آزمایشها است. برخی از انتروباکتریاسه ها باکتریوسین هائی را ایجاد می کنند که بـر سـایر سـروتیپهای همـان باکتری یا میکروبهای جنسهای نزدیک موثر بوده و رشد آنها را مهار می کند. باکتریوسین اشریشـیا کلـی بنـام کلـی سـین نامیده می شود[۵۳].

---

[8] -Extended specterum betalactamases

[9] - Indol, Methyl red, Vogeproskoer, Citrate

ساختمان آنتی ژنی

سه نوع آنتی ژن در انتروباکتریاسه ها شناخته شده است:

آنتی ژن O که آنتی ژن سوماتیک یا اندوتوکسین نیز خوانده می شود. جنس آن لیپوپلی ساکاریدی است و مقاوم به حرارت و الکل می باشد. با آزمایش آگلوتیناسیون قابل شناسائی است.

آنتی ژن K که در کلبسیلا مربوط به کپسول باکتری بوده و پلی ساکاریدی است. این آنتی ژن در برخی از اشریشیا کلی ها (K_{88},K_{99}) نیز وجود دارد. در سالمونلا تیفی بنام آنتی ژن Vi خوانده می شود و مربوط به پیلی است و پروتئینی می باشد. وجود این آنتی ژن مانع آگلوتیناسیون آنتی ژن O با آنتی بادی مربوطه می شود بنابر این باید به کمک حرارت حذف گردد. شناسائی این آنتی ژن می تواند با آزمایش تورم کپسولی یا آگلوتیناسیون صورت گیرد.

آنتی ژن H که مربوط به تاژه بوده و فقط در باکتریهای متحرک وجود دارد. جنس آن پروتئینی است (پروتئین پیلین) و مانع آگلوتیناسیون آنتی ژن O نیز می شود. با آزمایش آگلوتیناسیون قابل شناسائی است. مثالی از ساختمان آنتی ژنیک در باکتری اشریشیا کلی عبارتست از: O_{75}:K_{100}:H_5 [۴۹].

شاخص های بیماریزائی

مهمترین آنها عبارتست از:

۱- **آندوتوکسین** که مربوط به LPS[10] است و در همه انتروباکتریاسه ها وجود دارد.

۲- **اگزوتوکسین** که پروتئینی بوده و در برخی ترشح می شود و بر چند نوع است:

- انتروتوکسینها: مثالهای مهم اگزوتوکسین حساس به حرارت (LT) [11] و مقاوم به حرارت (ST)[12] در اشریشیا کلی
- اگزوتوکسینهای دارای فعالیت نوروتوکسینی: مثال مهم شیگا توکسین در شیگلا دیسانتری
- وروتوکسین: که در اشریشیا کلی وجود دارد

---

10 - Lipopolysakarid
10- Heat lable toxin
11- Heat stable toxins

۳- **فاکتورهای کلونیزاسیون:** مانند کپسول، پیلی و آنتی ژن Vi

٤- **مقاومت به آنتی بیوتیکها** خصوصاً مقاومت چند گانه. اغلب این باکتریها دارای آنزیم بتالاکتاماز بوده و برخی نیز دارای بتا لاکتامازهای وسیع الطیف هستند که بیشتر توسط پلاسمیدها ایجاد شده و در روده از طریق کونژوگیشن بین باکتریهای مختلف روده ای منتقل می شوند[۱۱۲].

انتروباکتریاسه های فلور طبیعی روده:

باکتریهای جنسهای کلبسیلا، انتروباکتر، پروتئوس، مورگانلا، پرووویدنسیا، سیتروباکتر و سراشیا (کلی فرم ها) و اشریشیا کلی در روده معمولا غیر بیماریزا هستند ولی در دستگاههای دیگر بیماری می دهند بخصوص در دستگاه ادراری. از عوامل زمینه ای بیماری با این باکتریها نقص ایمنی و دستکاریهای پزشکی نظیرسوندگذاری می باشند. اغلب این باکتریها لاکتوز مثبت هستند بنحوی که واکنش TSI آنها معمولا زرد/ زرد می باشد (استثنا مهم پروتئوس). اشریشیا کلی (E coli) شایعترین باکتری هوازی اختیاری در روده است که در همه نمونه های مدفوع جدا می شود ولی سایر باکتریها گاهی حضور دارند[۱۱۲، ۵۳، ٤۹].

اشریشیاکلی:

جنس اشریشیا شامل ۵ گونه است که در خانواده آنتروباکتریاسه قرار دارند. اشریشیاکلی شایعترین و با اهمیت ترین گونه از نظر بالینی می باشد. این جنس توسط آقای Theodore Echerichia مورد نامگذاری قرار گرفت. او در سال ۱۸۸۵ طی یکسری مطالعات بر روی فلور مدفوعی کودکان این ارگانیسم را مورد شناسایی قرار داد. اشریشیاکلی یکی از بیشترین گونه های باکتریهای موجود در روده انسان می باشد که در خانواده آنتروباکتریاسه دارای بیشترین اهمیت بالینی می باشد. اشریشیاکلی از دیگر اعضای خانواده آنتروباکتریاسه توسط توانایی بالای خود در تخمیر قند لاکتوز و دیگر قندها ، تولید اندول از تریپتوفان و دکربوکسیله کردن لیزین مورد شناسایی قرار می گیرد، علاوه بر این بیشتر سویه های موجود در گونه متحرک می باشند. اکثر سویه های اشریشیاکلی موجود در کلون افراد سالم بی آزار بوده و بندرت ممکن است در این افراد بیماری ایجاد نمایند. البته سویه هایی نیز وجود دارند که قادرند در افراد سالم و بخصوص افراد دارای نقص ایمنی اختصاصی بیماری های مختص به خود را ایجاد نمایند. سویه های بیماریزا از ارگانیسمهای کومنسال با واسطه تولید فاکتورهای ویرولانس اختصاصی برای هر سویه بیمایزا تفکیک می گردند. این فاکتورها ممکن است توسط باکتریوفاژ کد شوند یا برروی پلاسمیدها قرار داشته باشند ویا بر روی جزایر بیماریزایی (PI)[۱۳] که در بر روی کروموزوم باکتری قرار دارند کد شوند. در مقایسه ای که بین توالی ژنوم سویه K-12 غیر بیماریزا با سویه های بیماریزا انجام پذیرفته مشخص

[13] -Patogenicity Island