٤٢٣٨٥

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران

دانشگاه تربیت‌مدرس
دانشکدهٔ علوم‌پزشکی

۱۳۸۱ /۷/ ۲۰

پایان‌نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته باکتری‌شناسی پزشکی

عنوان

بررسی الگوی مقاومت دارویی و پلاسمیدی سویه‌های کلبسیلای جدا شده از عفونت‌های ادراری

نگارش

فرشته فردوسیان

استاد راهنما

دکتر مرتضی ستاری

استاد مشاور

دکتر مجید صادقی‌زاده

۱۳۸۱

٤٢٣٨٠

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد **خانم فرشته فردوسیان**

رشته : **باکتری‌شناسی** گرایش:

تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

جناب آقای دکتر مرتضی ستاری (استاد راهنما)

جناب آقای دکتر مجید صادقی زاده (استاد مشاور)

جناب آقای دکتر عباس رضائی (نماینده شورای تحصیلات تکمیلی)

جناب آقای دکتر علیرضا زمردی پور (استاد ناظر)

سرکار خانم دکتر اشرف محبتی مبارز (استاد ناظر)

۴۲۳۸۰

تاریخ: .....
پیوست: .....

آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس مبیّن بخشی از فعالیت‌های علمی ـ پژوهشی دانشگاه است، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادهٔ ۱. در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مرکز نشر دانشگاه اطلاع دهد.

مادهٔ ۲. در صفحه سوم (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کنید:

«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد نگارنده در رشتهٔ **باکتری‌شناسی پزشکی** است. که در سال **۱۳۸۱** در دانشکدهٔ **علوم‌پزشکی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر **مرتضی ستاری** و مشاورهٔ جناب آقای دکتر **مجید صادقی‌زاده** از آن دفاع شده است».

مادهٔ ۳. به منظور جبران بخشی از هزینه‌های نشریات دانشگاه تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند، دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادهٔ ۴. در صورت عدم رعایت مادهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

مادهٔ ۵. دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادهٔ ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادهٔ ۶. اینجانب **فرشته فردوسیان** دانشجوی رشته **باکتری‌شناسی پزشکی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام‌خانوادگی

تاریخ و امضاء

تقدیم به :

پدر و مادر فداکار و بزرگوارم،

دو مهر فروزانی که دریای بی‌کران محبت، و سرچشمهٔ ایـثار و عطوفتند و فداکاری‌های بی‌دریغشان برایم پشتوانه محکمی در رویارویی با مشکلات می‌باشد.

تقدیم به :

خواهران و برادران عزیز و مهربانم،

که با عشق و دلسوزی فراوان، همواره مشوق و پشتیبان من در زندگی بوده‌اند.

سپاس و قدردانی

حمد و سپاس به درگاه خداوندی که وجود انسان را به زیور علم و معرفت بیاراست و آن را امتیازی بر سایر مخلوقاتش قرار دارد، حکیمی که بر قلم سوگند خورد و علیمی که اولین آیهٔ خود را بر رسول خاتم (ص) با «اقرأ» (بخوان) آغاز نمود.

اکنون که به لطف پروردگار یکتا و فضل الهی تدوین این مجموعه به اتمام رسیده است، برخود واجب می‌دانم مراتب تقدیر و سپاس خویش را از سرورانی که در تکمیل و تدوین آن، راهنمایی و مساعدت نموده‌اند ابراز نمایم.

استاد ارجمند جناب آقای دکتر مرتضی ستاری که زحمت راهنمایی این پایان‌نامه را تقبل نمودند و با راهنمائی‌های خردمندانه و دقت نظرخویش، در تمام مراحل کار راهگشای اینجانب بوده‌اند.

استاد گرامی جناب آقای دکتر مجید صادقی‌زاده مدیر محترم گروه ژنتیک دانشکده علوم‌پایه که مشاورهٔ این پایان‌نامه را پذیرفتند و از همکاری و مساعدت‌های ایشان در طول تحقیق بهره‌مند شده‌ام.

استاد گرانقدر جناب آقای دکتر عباس رضایی مدیر محترم گروه باکتری‌شناسی که از نظرات و راهنمایی‌های ارزشمند ایشان در طول تحصیل و تحقیق برخوردار بوده‌ام.

استادان و سروران گرامی جناب آقای دکتر بهزادیان‌نژاد، سرکار خانم دکتر مبارز، سرکار خانم دکتر پیرایه و سرکار خانم دکتر درّانی که در طول تحصیل از محضر علمی ایشان بهره‌مند شدم.

سرکار خانم صمیمی و سرکار خانم رازقی کارشناسان محترم گروه باکتری‌شناسی که از همکاری صمیمانهٔ ایشان در تمام مراحل تحقیق برخوردار بودم.

دوستان عزیزم که در راه پیشبرد تحقیق، یار و یاور من بوده‌اند.

پرسنل محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی بیمارستان امام خمینی (ره)

و کلیه سرورانی که به نحوی در انجام این تحقیق یاریم نمودند.

چکیده

کلبسیلاها پاتوژن‌های فرصت‌طلبی هستند که در ایجاد عفونت‌های ادراری بیمارستانی نقش دارند. در این جنس، کلبسیلا پنومونیه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این میکروارگانیسم‌ها به‌دلیل اکتساب پلاسمیدهایی که چندین ژن مقاومت دارویی مختلف را کد می‌کنند، به آنتی‌بیوتیک‌های متعددی از جمله سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف و آمینوگلیکوزیدها مقاومند.

در این تحقیق، ۵۰ سویهٔ کلبسیلای ایزوله شده از عفونت‌های ادراری بیمارستانی بررسی شدند که ۴۶ سویه (۹۲٪) کلبسیلا پنومونیه و ۴ سویه (۸٪) کلبسیلا اکسی‌توکا بود. مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک در آگار کربی – بوئر تعیین شد. آنالیز پلاسمیدی هر یک از سویه‌ها به روش لیز قلیایی انجام گرفت و باندهای پلاسمیدی، پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، زیر نور ماورابنفش در طول موج ۲۵۴nm مشاهده شدند. در تحقیق حاضر، ارتباط مقاومت دارویی و پلاسمیدی ایزوله‌ها با کمک روش‌های تیمار پلاسمیدی در دمای ۴۳°C و ترانسفورماسیون با استفاده از کلرید کلسیم سرد و شوک حرارتی به اثبات رسید.

براساس نتایج حاصل از تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی، همهٔ ایزوله‌های بررسی شده (۱۰۰٪) به آمپی‌سیلین مقاوم بودند. ۱۹ سویه (۳۸٪) به یک یا دو آنتی‌بیوتیک، و ۳۱ سویه (۶۲٪) به چندین آنتی‌بیوتیک مختلف مقاومت داشتند. نتایج حاصل از آنالیز پلاسمیدی نشان داد که تمام ایزوله‌ها (۱۰۰٪) حاوی یک تا سه باند پلاسمیدی با اندازه‌های متفاوتی بین ۱ تا ۱۸ کیلوباز می‌باشند و یک باند پلاسمیدی تقریباً ۱۸ کیلوبازی در همهٔ ایزوله‌ها مشترک بود. در روش حذف پلاسمیدی، پلاسمیدهای سبک که اغلب چند مقاومتی بودند و ژن مقاومت به سفتازیدیم، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول و آمینوگلیکوزیدهایی مانند، جنتامیسین، کانامایسین و توبرامایسین را تواماً حمل می‌کردند حذف شدند؛ و با استفاده از ترانسفورماسیون، مقاومت به آمپی‌سیلین به‌همراه پلاسمید ۱۸ کیلوبازی به سویهٔ E.coli DH5α انتقال یافت.

براساس نتایج حاصل از این تحقیق، الگوهای مقاومت دارویی و پلاسمیدی مختلف در میان ایزوله‌های کلبسیلا، نشان‌دهندهٔ عدم شیوع یک سویهٔ خاص در بین بیماران بستری مورد مطالعه می‌باشد. همچنین با اثبات وجود ژن مقاومت به آمپی‌سیلین بر روی پلاسمید ۱۸ کیلوبازی، و مشاهدهٔ مقاومت به آمپی‌سیلین و حضور این پلاسمید در تمام ایزوله‌ها (۱۰۰٪)، می‌توان احتمال انتشار این پلاسمید حامل ژن مقاومت به آمپی‌سیلین را در میان سویه‌های کلبسیلا مطرح نمود.

واژگان کلیدی: کلبسیلا، عفونت دستگاه ادراری، مقاومت دارویی، پلاسمید

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فصل اول: کلیات ۱

مقدمه ۲

۱-۱. کلبسیلا ۴

۱-۱-۲. شکل‌شناسی ۴

۲-۱-۲. صفات بیوشیمیایی ۴

۱-۱-۳. اکولوژی ۵

۱-۱-۴. کشت ۵

۱-۱-۵. طبقه‌بندی ۵

۱-۱-۶. اپیدمیولوژی ۷

۱-۲. بیماریزایی ۸

۱-۲-۱. فاکتورهای بیماریزایی کلبسیلا ۹

۱-۲-۱-۱. کپسول پلی ساکاریدی ۱۰

۱-۲-۱-۲. پیلی (فیمبریه) ۱۲

۱-۲-۱-۳. مقاومت سرمی و لیپوپلی‌ساکارید ۱۳

۱-۲-۱-۴. سیدروفورها ۱۵

۱-۲-۱-۵. توکسین ۱۶

۱-۳. تیپ‌بندی ایزوله‌های کلبسیلا ۱۶

۱-۳-۱. بیوتایپینگ ۱۷

۱-۳-۲. سروتایپینگ ۱۷

۱-۳-۳. فاژتایپینگ ۱۷

عنوان	صفحه

۱-۳-۴. باکتریوسین تایپینگ ۱۸

۱-۳-۵. تیپ‌بندی مولکولی ۱۸

۱-۴. واکسیناسیون علیه کلبسیلا ۱۹

۱-۵. عفونت‌های بیمارستانی ناشی از کلبسیلا ۲۰

۱-۵-۱. عفونت‌های دستگاه ادراری (UTI) ناشی از کلبسیلا ۲۲

۱-۶. مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی ۲۳

۱-۶-۱. مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی درکلبسیلا ۲۴

۱-۶-۲. اساس ژنتیکی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها ۲۷

۱-۶-۲-۱. مقاومت ذاتی و اکتسابی ۲۸

۱-۶-۳. انواع مقاومت‌های ژنتیکی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها ۲۸

۱-۶-۳-۱. مقاومت کروموزومی ۲۸

۱-۶-۳-۲. مقاومت پلاسمیدی ۲۹

۱-۶-۳-۳. مقاومت ترانسپوزونی ۳۰

۱-۶-۴. فاکتورهای مؤثر درگسترش و انتشار مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی ۳۱

۱-۶-۴-۱. کنژوگاسیون ۳۱

۱-۶-۴-۲. ترانسداکشن ۳۲

۱-۶-۴-۳. ترانسفورماسیون ۳۳

۱-۶-۴-۴. جهش در ژن‌های مقاومت ۳۴

۱-۶-۴-۵. افزایش فشارمحیطی ۳۴

۱-۷. پلاسمیدها ۳۵

عنوان	صفحه

۱-۷-۱. آنالیز پلاسمیدی ۳۷

۱-۷-۲. تخلیص DNA پلاسمیدی ۳۸

۱-۷-۲-۱. رشد و جمع آوری باکتری‌ها ۳۸

۱-۷-۲-۲. تهیه عصارهٔ سلولی ۴۰

۱-۷-۲-۳ تخلیص DNA از عصارهٔ سلولی ۴۱

۱-۷-۲-۴. تغلیظ نمونه‌های DNA ۴۲

۱-۸. الکتروفورز ۴۴

۱-۹. حذف پلاسمیدی ۴۵

فصل دوم: مروری بر مطالعات انجام شده ۴۷

فصل سوم: مواد و روش‌ها ۶۰

۳-۱. جمع آوری نمونه‌های بالینی کلبسیلا ۶۱

۳-۲. تهیه سویه استاندارد ۶۱

۳-۳. تأیید سویه‌های جمع آوری شده و استاندارد ۶۱

۳-۳-۱. رشد برروی محیط مک کانکی آگار ۶۱

۳-۳-۲. رنگ‌آمیزی گرم ۶۲

۳-۳-۳. آزمایش‌های بیوشیمیایی ۶۲

۳-۴. رنگ‌آمیزی کپسول ۶۲

۳-۴-۱. رنگ‌آمیزی کپسول به روش آنتونی ۶۲

عنوان	صفحه

۳-۵. نگهداری سویه‌ها ۶۳

۳-۶. تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار از دیسک ۶۴

۳-۶-۱. مواد و وسایل موردنیاز ۶۴

۳-۶-۲. آماده کردن محیط کشت ۶۴

۳-۶-۳. روش تهیه استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند ۶۵

۳-۶-۴. تلقیح سوسپانسیون میکروبی به محیط کشت ۶۶

۳-۶-۵. قراردادن دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی ۶۶

۳-۶-۶. بررسی نتایج آنتی‌بیوگرام ۶۷

۳-۶-۷. کنترل کیفی ۶۷

۳-۷. آنالیز پلاسمیدی ۶۸

۳-۷-۱. استخراج پلاسمید ۶۸

۳-۷-۲. استخراج پلاسمید در مقیاس کم به روش لیزقلیایی ۶۹

۳-۷-۲-۱. مواد و وسایل موردنیاز ۶۹

۳-۷-۲-۲. روش کار ۷۱

۳-۷-۳. استخراج پلاسمیدی به روش جوشاندن (Boiling) ۷۲

۳-۷-۳-۱. مواد و وسایل موردنیاز ۷۲

۳-۷-۳-۲. روش کار ۷۳

۳-۸. تعیین غلظت DNA وخلوص آن ۷۳

۳-۸-۱. روش اندازه‌گیری غلظت DNA ۷۴

۳-۹. الکتروفورز DNA پلاسمیدی برروی ژل آگارز ۷۵

عنوان	صفحه

۳-۹-۱. مواد و وسایل مورد نیاز ۷۵

۳-۹-۲. روش تهیه ژل آگارز و انجام الکتروفورز ۷۶

۳-۹-۳. بررسی ژل و عکس برداری ۷۹

۳-۱۰. حذف پلاسمیدی ۸۰

۳-۱۰-۱. حذف پلاسمید به روش تیمارحرارتی ۸۰

۳-۱۱. ترانسفورماسیون (جذب DNA توسط سلولهای باکتری) ۸۲

۳-۱۱-۱. مواد و وسایل موردنیاز ۸۴

۳-۱۱-۲. روش تهیه باکتری صلاحیتدار ۸۴

۳-۱۱-۳. روش ترانسفورماسیون با استفاده از کلرید کلسیم ۸۵

فصل چهارم: نتایج ۸۷

۴-۱. نتایج حاصل از جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌های بالینی کلبسیلا ۸۸

۴-۲. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی کپسول پلی‌ساکاریدی کلبسیلا ۹۱

۴-۳. نتایج حاصل از تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۹۱

۴-۴. نتایج حاصل از آنالیز پلاسمیدی ۹۷

۴-۵. نتایج حاصل از حذف پلاسمید ۱۰۰

۴-۶. نتایج حاصل از ترانسفورماسیون ۱۰۲

فصل پنجم: بحث ۱۰۸

فهرست منابع ۱۱۸

چکیده انگلیسی ۱۳۰

فهرست جداول

عنوان | صفحه

جدول ۱-۱. طبقه‌بندی جنس کلبسیلا ۶

جدول ۱-۲. ترکیبات دو محیط کشت M9 و LB ۳۹

جدول ۳-۱. لوله‌های استاندارد مک‌فارلند ۶۵

جدول ۴-۱. نتایج حاصل از آزمایش‌های بیوشیمیایی نمونه‌های کلبسیلا ۸۸

جدول ۴-۲. فراوانی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در میان سویه‌های کلبسیلای ایزوله شده از عفونت‌های ادراری ۹۳

جدول ۴-۳. الگوی تعداد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های کلبسیلا ۹۴

جدول ۴-۴. انواع الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های کلبسیلا ۹۶

جدول ۴-۵. انواع باندهای پلاسمیدی استخراج شده از ایزوله‌های کلبسیلا ۹۸

فهرست نمودارها

عنوان | صفحه

نمودار ۴-۱. توزیع فراوانی عفونت‌های ادراری ناشی از کلبسیلا در بیماران مطالعه شده ۹۰
نمودار ۴-۲. توزیع فراوانی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و کلبسیلا اکسی‌توکا در عفونت‌های ادراری ۹۰
نمودار ۴-۳. توزیع فراوانی سویه‌های کلبسیلای دارای یک یا دو مقاومت، و مقاومت‌های چندگانه در عفونت‌های ادراری ۹۴

فهرست شکل‌ها و تصاویر

عنوان | صفحه

شکل ۱-۱. نمای کلی از انواع فاکتورهای بیماریزایی کلبسیلا ۱۰

شکل ۱-۲. تهیه عصارهٔ سلول باکتریایی ۴۱

شکل ۱-۳. حذف پروتئین عصاره سلولی با استفاده از فنل ۴۲

شکل ۱-۴. تغلیظ DNA به وسیله اتانول. (a) اتصال مولکول‌های DNA به میله شیشه‌ای در محلول غلیظ DNA .(b) محلول‌های رقیق DNA توسط اتانول و سانتریفوژ رسوب داده می‌شوند..... ۴۳

تصویر ۳-۱. الکتروفورز نمونه‌های استخراج شده از ایزوله‌های کلبسیلا برروی ژل آگارز ۰/۸ درصد ۷۸

تصویر ۳-۲. تک کلنی‌های بدست آمده از سویه‌های تیمار شدهٔ کلبسیلا بر روی محیط نوترینت آگار فاقد آنتی‌بیوتیک ۸۳

تصویر ۳-۳. مقایسه رشد کلنی‌های تیمار شدهٔ کلبسیلا بر روی محیط‌های مولرهینتون آگار فاقد و حاوی آنتی‌بیوتیک (۸۶٪ کلنی‌های ایزوله شماره ۱۱ کلبسیلا، مقاومت به سفتازیدیم و جنتامیسین را تواماً از دست داده‌اند). ۸۳

تصویر ۴-۱. کلنی‌های درشت و موکوئیدی کلبسیلا بر روی محیط مک‌کانکی آگار ۸۹

تصویر ۴-۲. آزمایش‌های افتراقی بیوشیمیایی برای تشخیص کلبسیلا ۸۹

تصویر ۴-۳. رنگ‌آمیزی کپسول سویه‌های کلبسیلا به روش آنتونی -کلنی‌های تصویر A دارای کپسول ضخیم‌تری نسبت به کلنی‌های تصویر B می‌باشند. ۹۲

تصویر ۴-۴. نمونه آنتی‌بیوگرام سویه کلبسیلای مقاوم به یک آنتی‌بیوتیک (یک مقاومتی) ۹۵

تصویر ۴-۵. نمونه آنتی‌بیوگرام سویه کلبسیلای مقاوم به ۱۰ آنتی‌بیوتیک (۱۰ مقاومتی) ۹۵

تصویر ۴-۶. باندهای پلاسمیدی استخراج شده از ایزوله‌های کلبسیلا با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد ۹۹

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران