



" هیچ چیز را ندیدم مگر آنکه خدا را قبل از آن و بعد از آن و با آن دیدم "

" حضرت علی (ع) "

دانشگاه تهران

دانشکده علوم

پایان نامه :

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در

رشته میکروبیولوژی

موضوع

جدا سازی سودوموناس آئرو جینسوزای

بیمارستانی ، پیپوسین تا بیپینگ و

آنتی بیوتیک تا بیپینگ آن .

براهنمائی :

دکتر فریدون ملک زاده

نگارش :

احیاء عبیدی عالی

سال تحصیلی / خرداد ۱۳۷۰

۱۵۵۳۶

شماره
تاریخ
پیوست



آموزش دوره های کارشناسی ارشد و دکترا

طبق دعوت گروه آموزشی ارشد جلسه هیات ممتحنه برای رسیدگی به پایان نامه
خانم (حمید عمیری) دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته میکروارگانیسم
آقای در ساعت ۸ روز چهارشنبه مورخ ۱۳۷۰/۲۲/۲۳

با حضور امضاء کنندگان ذیل تشکیل گردید.

در این جلسه ابتدا خانم حمید عمیری در باره پایان نامه خویش که
تحت عنوان موردی سازی و توسعه سیستم های هوشمند برای بهسازی سیستم های
تنظیم شده بود، توضیحات لازم را ارائه نمود و سپس به سئوالات وارده پاسخ داد.

هیات ممتحنه پس از مشاوره، کار تحقیقی / تحقیقی و توصیفی / توصیفی ایشان را

معادل بسیار واحد با نمره سب ارزشیابی کردند.

امضاء

هیات ممتحنه

۱ - استاد راهنمای پایان نامه :

- ۲ - خانم دکتر امیرافسانه
- ۳ - فرید ساروجی
- ۴ - دکتر پرویز آدینه
- ۵ - دکتر ...
- ۶ - مدیر گروه آموزشی

مدیر گروه آموزشی

تقدیم به :

روان شاد پدرم که بزرگترین راهنمایم بود،

و به :

گرامی مادرم که فداکاری و مهربانی بی حد می باشد.

بنام خداوند جان و خرد

در آغاز این دفتر لازم می دانم از استاد گرانقدر جناب آقای دکتر ملک زاده که راهنمایی مرا در انجام این پایان نامه پذیرفتند و در طی تحصیل همواره از محضر ایشان کسب فیض نموده و از کمک های بی دریغش^ن بهره برده ام تشکر و سپاسگزاری نمایم . هم چنین از جناب آقای دکتر پاکروان و سرکار خانم دکتر نوحی ، اساتید ارجمند که از راهنمایی های پربارشان در مدت تحصیل برخوردار بوده ام و عضویت در هیئت داوران این پایان نامه را تقبل فرمودند تشکر و قدردانی می نمایم .

از سایر اعضای محترم هیئت داوران ، اساتید بزرگوار جناب آقای دکتر ادیب فر و سرکار خانم دکتر سیاوشی که اینجانب را از ارشاد و راهنمایی های خود بهره مند نموده اند بی نهایت سپاسگزارم .

" فهرست مطالب "

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۱	خلاصه
۳	مقدمه
۸	تاریخچه
۹	مرفولوژی و ساختار
۱۰	فیزیولوژی، خصوصیات بیوشیمیایی و اختلالات کشتی
۱۱	مقاومت
۱۴	<i>P. aeruginosa</i> عفونتهای ناشی از
۱۶	شاخصهای بیماریزایی
۲۷	<i>P. aeruginosa</i> مکانیزمهای بیوشیمیایی مقاومت دارویی در
۳۹	پیوسینها
۵۱	پیوسین تا پپتیدینگ
۵۴	مواد، وسایل و روشها
۵۷	نگهداری نمونهها
۵۸	تست حساسیت به آنتی بیوتیکها
۵۹	پیوسین تا پپتیدینگ
۶۶	<i>P. aeruginosa</i> تاثیر پیوسین بر باکتریهای غیرمنسوب به
۶۸	نتایج
۶۸	بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی نمونهها
۷۲	طرح حساسیت ضد میکروبی یا طرح مقاومت آنتی بیوتیکی
۷۲	بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی در بیمارانهای مختلف

عنوان

صفحه

۷۶	پیوسین تا یپینگ
۷۹	رابطه بین تیپ‌های پیوسینی شایع و مقاومت آنتی بیوتیکی
۸۱	طرح‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در رابطه با تیپ‌های پیوسینی شایع
۸۱	انتشار تیپ‌های پیوسینی در بیمارستان‌های مختلف
۸۶	رابطه بین مقاومت آنتی بیوتیکی و تیپ‌های پیوسینی شایع در بیمارستان‌ها
۹۲	انتشار تیپ‌های پیوسینی در چهار نمونه بالینی مهم
۹۲	ارزش تولید پیوسین S به عنوان یک شاخص اپیدمیولوژیک
۹۵	بررسی وجود احتمالی تیپ و ساب‌تیپ‌های پیوسینی مختلف در یک نمونه
۹۵	اثر پیوسین بر سایر باکتریها
۱۰۰	بحث
۱۱۵	منابع مورد استفاده
۱۲۵	خلاصه انگلیسی

" خلاصه "

طی پانزده ماه ، ۱۷۰ سویه سودوموناس آثروجینوزا از نمونه‌های بالینی و محیط سه بیمارستان عمومی و یک بیمارستان سوختگی تهران ، جمع آوری گردیده است . ابتدا هریک از سویه‌ها تعیین بیوتیپ شدند و سپس به کمک پیوسین تایپینگ با روش اصلاح شده GOVAN تیپ و ساب- تیپ پیوسینی هریک از نمونه‌ها شناسائی گردید . تیپ‌های پیوسینی غالب را در این بررسی PT1, PT10 و PT3 به ترتیب با تواتر ۳۰/۶٪ ، ۲۱/۷٪ و ۸/۸٪ تشکیل می دادند . ساب-تیپ‌های پیوسینی غالب ، ساب- تیپ‌های a, d, b و c به ترتیب با میزان رویداد ۱۸/۴٪ ، ۱۴/۹٪ ، ۱۲/۷٪ و ۹/۲٪ بودند . هم چنین تعداد سویه‌های قابل تیپ بندی بروش پیوسین تایپینگ ۹۵/۹٪ بود .

بعلاوه در این بررسی شنجش حساسیت نسبت به مواد ضد میکروبی بر روی همه نمونه‌های جدا شده انجام شد . آنتی بیوتیک‌های بکار رفته برای این آزمون عبارت‌اند از : آزترئونام - سفنازیدیم - سفتریاکسون ایمی پنم-سفوپرازون - آمیکاسین - سیزومی سین - پلی میکزین B - جنتامی سین - توپراما پسین - نتیل می سین - تتراسیکلین و کربنی سیلین . ۹۸/۸٪ از سویه‌های جدا شده دارای شاخص مقاومت بر علیه یک یا چند آنتی بیوتیک بودند . بیشترین مقاومت بر علیه تتراسیکلین با رویداد

۹۸/۲٪ است و علیه پلی میکزین B سویه مقاومی جدا نگردید.

در بین آنتی بیوتیک های بکار رفته سفنازیدیم موه شترتیرین —
آنتی بیوتیک بتا لاکتامی و آمیکاسین موه شترتیرین آنتی بیوتیک آمینو —
گلیکوزیدی است.

هم چنین در این بررسی مشاهده شد که در قالب تیپ پیوسین 10
سیزده طرح ، در قالب PT1 ده طرح و در قالب PT3 شش طرح مقاومست
آنتی بیوتیکی وجود دارد.

بعلاوه تیپ پیوسینی شایع در چهار بیمارستان مورد بررسی تعیین
و مشخص گردید که در بیمارستان I تیپ پیوسینی 1 با ۴۷/۶٪ و در —
بیمارستان II تیپ های پیوسینی 3 و 10 بطور مساوی با میزان ۱۸/۹٪
بیشترین میزان بروز را دارا بودند. در بیمارستان III (سوختگی)
و IV تیپ پیوسینی 10 به ترتیب با ۶۰٪ و ۲۵/۶٪ بیشترین میزان وقوع
را حاز بود.

در این مطالعه هم چنین مشخص گردید که اکثر سویه های مقاوم به
آنتی بیوتیک به تیپ پیوسین 10 تعلق دارند و در بیمارستان سوانح
و سوختگی (III) که میزان بروز مقاومت بالاتر می باشد فراوانی
این تیپ پیوسینی نیز بالاتر است.

ضمناً " اثر پیوسین بر باکتریهای غیر منسوب ثابت کرد که حساسیت به
پیوسین تنها به سویه های منسوب به سویه مولد و یا گونه های کاملاً نزدیک
محدود نشده، بلکه جنس های غیر مرتبط به سویه مولد پیوسین را هم در بر می گیرد.

مقدمه :

مقابله با عفونت‌های بیمارستانی یکی از مهمترین مسائل درمانی است و اهمیت آن بویژه در مواردی که امکانات بهداشتی و درمانی ناکافی باشد چندبرابر می‌شود. یکی از مشکلات درمانی، عفونتهای بیمارستانی سودوموناس آئروجینوزا است که در بسیاری از نقاط دنیا تحقیقات وسیعی را در زمینه‌های مختلف به خود اختصاص داده است. سودوموناس آئروجینوزا عامل مهم عفونت‌های بیمارستانی در سه دهه اخیر بوده و تقریباً " در ۱۰٪ این عفونتها شرکت دارد (۷۰، ۳۸ و ۸۰). ظهور این پاتوژن فرصت طلب را در عفونت‌های بیمارستانی می‌توان به فاکتورهای وابسته به میزبان انسانی و خود میکروب نسبت داد (۶۳). سودوموناس آئروجینوزا به طور وسیع در طبیعت پراکنده بوده و دارای قدرت سازش فیزیولوژیک و مقاومت ذاتی نسبت به بسیاری از عوامل ضد میکروبی می‌باشد. هم چنین بسیاری از بیماران به عفونت ناشی از این میکروب به علت سن، ضعف، درمانهای شدید خاص مثل درمان با آنتی بیوتیک‌ها و مواد ایمونوساپرسیو و جراحی حساسیت دارند (۶۳). در واقع روشهای جدید جراحی و پزشکی می‌تواند راه ایجاد عفونتهای سخت را برای پاتوژنهای فرصت طلب مثل سودوموناس آئروجینوزا هموار سازد. بنا براین فزایش عفونتهای ناشی از این باکتری قسمتی

از بهائی است که برای پیشرفت در طب مدرن باید پردازیم (۷۰) .

وسعت عفونتهای این میکروارگانیزم زیاد بوده و هیچ قسمتی از بدن انسان از عفونت با این میکروب در امان نیست و هم چنین کمتر جایی را در بیمارستان می توان یافت که از آن سودوموناس آئروجینوزا جدا نشود (۶۳) . بدین منظور بیشتر مطالعات اپیدمیولوژیک مربوط به *P. aeruginosa* منابع و مکانیزمهای انتقال میکروب از محیط بیمارستان به بیماران را شامل می شود (۳۸) . از آنجائیکه که طیف بیماریهای ناشی از این میکروب وسیع بوده و میزان رویداد آن نیز در حال افزایش است حذف منابع مهم انتشار و کنترل مداوم عفونت تقاطعی برای کنترل عفونت *P. aeruginosa* ضروری است (۲۵) .

افزایش عفونت های *P. aeruginosa* را با چند گزارش می توان نشان داد. در سال ۱۹۴۷ تنها ۹۱ مورد باکتری می توسط Kerby گزارش گردید که در بیماران مبتلا به بیماریهای مزمن اتفاق افتاده و در کودکان از طریق پوست و در افراد بالغ از طریق لوله های ادراری - تناسلی انتقال یافته بود. در ۱۹۵۰ باکتری میای سودوموناسی بیشتر شناسایی گردید و در ۱۹۷۶ صد و هشت باکتری می سودوموناسی توسط Flick و همکارانش که تنها از دو بیمارستان بدست آمده بود گزارش شد (۳۷) .

Benett در ۱۹۷۴ سودوموناس آئروجینوزا را عامل ۱۰٪ عفونت های بیمارستانی معرفی می کند در حالیکه Sheretz در ۱۹۸۳ میکروارگانیزم

مزبور را عامل ۱۲/۵٪ از عفونت‌های بیمارستانی می‌داند (۷۲) .
 به علت عوامل بیشماری که در انتشار این میکروارگانیسم
 هستند و عدم موفقیت در درمان عفونت‌های حاصله ضروری است که روشی
 برای شناسایی سویه‌های مختلف *P. aeruginosa* بیمارستانی به منظور
 شناخت طرز انتشار سویه خاص در یک همه‌گیری وجود داشته باشد (۶۳) .
 در واقع از روش‌های تایپینگ برای ردیابی راه‌های انتشار عفونت
 در بیمارستان استفاده می‌شود (۶) .

روش‌های اپیدمیولوژیکی که برای تیپ‌بندی *P. aeruginosa* بکار
 می‌روند متنوع بوده و شامل بیوتا‌یپینگ، سروتا‌یپینگ ، H-تایپینگ ،
 باکتریسوفی‌تایپینگ ، طرح حساسیت ضد میکروبی یا آنتی میکروبیال -
 تایپینگ ، طرح پلاسمیدی ، طرح آنزیمی و پیوسین تایپینگ می‌باشند
 (۷۳ ، ۲ و ۱۷) .

طرح‌های آنزیمی یا ایزوآنزیم‌ها کمک می‌کنند تا نمونه‌های
 کلینیکی را از منابع مختلف شناسایی کنیم (۷۳ و ۱۷) . روش دیگر
 طرح پلاسمیدی است که در باسیلهای گرم منفی به عنوان یک نشانه
 اپیدمیولوژیک بوده و در مورد آن‌د میک بودن یک سویه مقاوم آنتی -
 بیوتیک اطلاعاتی بدست می‌دهد . اما توجه کمی در مورد طرح پلاسمیدی
P. aeruginosa شده است (۳) . این روش بیشتر به همراه روش‌های دیگر
 مثل سروتا‌یپینگ و پیوسین تایپینگ در بررسی‌های اپیدمیولوژیک بکار

رفته و اطلاعات مفیدی را فراهم می آورد (۱۶) .

البته در بعضی گزارشات آمده است که طرح پلاسمیدی اطلاعات کمی را به سروتایپینگ اضافه می کند (۳) .

در ضمن روشهایی مثل طرح آنزیمی و طرح پلاسمیدی هنوز به طور روتین استفاده نمی شوند. فاز تایپینگ احتیاج به تهیه، نگهداری و استاندارد کردن فاژها دارد و روش پرزحمتی است و به علت آنکه یک طرح ثابت وجود نداشته و حساسیت به فاز با تغییرات مرفولوژیکی کلنی تغییر می کند بنابراین قابل تعمیم نمی باشد (۶۳ و ۱۷) .

اما مزیت فازتایپینگ اینست که سویه‌ها به تعداد بیشتر تیپ فاژی تقسیم می شوند. در روش H - تایپینگ تغییرات دی فاژیک حساسیت شناسائی آنتی ژن های تازه ای را کاهش می دهد (۱۷) .

سروتایپینگ بخوبی قابل تعمیم است اما تهیه و خریداری آنتی سرمها گران می باشد. مهمترین اشکال این روش آنست که تیپ های مختلف وجود نداشته و اکثر سویه‌ها به تیپ های مشترک کمی اختصاص می یابند. (۶۳) . هم چنین سروتایپینگ به منظور تیپ بندی سویه های موکوئیسید رضایت بخش نیست (۶) .

در بین این روشها روش حساسیت ضد میکروبی معمولا" انجام می شود اما سروتایپینگ اغلب برای اهداف اپیدمیولوژیک استفاده می گردد (۲) .

روش پیوسین تایپینگ به عنوان نشانه اپیدمیولوژیک بسیار

قابل اعتماد است زیرا می توان ثبات تیپ پیوسینی را در سویه‌ها بعد از زمانهای مختلف مشاهده کرد (۶۶). تا کنون روشهای مختلفی برای پیوسین تایپینگ معرفی شده است اما پیوسین تایپینگ با روش اصلاح شده GOVAN از آن جهت که قادر به تیپ بندی سویه‌های موکوئید بوده و تنها به ۲۴ ساعت زمان احتیاج دارد مناسب تر است. در ضمیمه سویه‌های آزمایش شده به انواع متعددی از گروهها و زیرگروهها تعلق پیدا می کنند و درصد بسیار کمی غیر قابل تیپ بندی می باشند (۶۳ و ۶۷). بعد از مطالبی که عنوان گردید می توان نتیجه گرفت که پیوسین تایپینگ ویژگیهای لازم را دارد تا به عنوان تنها روش قابل اعتماد و در مطالعات اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد.

همانطور که گفته شد مرگ و میر ناشی از عفونتهای سودوموناسی در بخشهای مختلف بیمارستان بویژه بخشهای سوختگی و جراحی تحقیقات گسترده‌ای را در رابطه با منشاء انتشار سویه‌های مقاوم و تیپهای موءثر در ایجاد عفونت بیمارستانی طلب می کند. به همین خاطر رساله حاضر به منظور بررسی پراکندگی تیپهای پیوسینی خاص که عامل اپیدمیهای بیمارستانی بوده و ارتباط آنها با مقاومت دارویی انجام پذیرفته است تا بتوانیم الگوئی از عفونتهای بیمارستانی این میکروارگانیزم و طرح مقاومت دارویی آنها ارائه دهیم. با آرزوی آنکه نتایج حاصل از این تحقیق بتواند راه را در درمان و پیشگیری از انتشار عفونتهای بیمارستانی ناشی از سودوموناس آئروجینوزا هموار سازد.

تاریخچه :

جنس سودوموناس از گونه‌های متعدد باکتریهای گرم منفی ، غیر تخمیری ، هوازی که در خاک و آب بستر می‌برند تشکیل می‌گردد. در زیستگاه طبیعی خود نقش مهمی را در تجزیه مواد آلی ایفا می‌کنند. چند گونه پاتوژن گیاهی و حیوانی وجود دارد. معه‌ها بیشتر سودوموناسها انسان را آلوده نمی‌کنند و تنها *Pseudomonas mallei, P. pseudomallei* پاتوژن اجباری هستند (۸۰). اما بعضی از آنها نیز پاتوژنهای فرصت طلب مهمی هستند که افراد دارای نقص ایمنی را آلوده می‌کنند. عفونتهای انسانی معمولاً شدید بوده و به علت مقاومت این میکروبه‌ها به بسیاری از آنتی بیوتیکهای مصرفی بستختی معالجه می‌شوند (۷۸).

P. aeruginosa بیشتر از سایر انواع این جنس با بیماریهای انسان در ارتباط می‌باشد. در تعدادی از بیمارستانها این میکروب سومین عامل ایجاد عفونتهای بیمارستانی بعد از استافیلوکوکوس اورئوس و اشریاکلی است. *P. aeruginosa* یک پاتوژن مهم است و اغلب در بیماریهای فیبروز سیستیک ، نئوپلاستیک و سوختیگیهای شدید منجر به مرگ و میر می‌شود (۷۸).