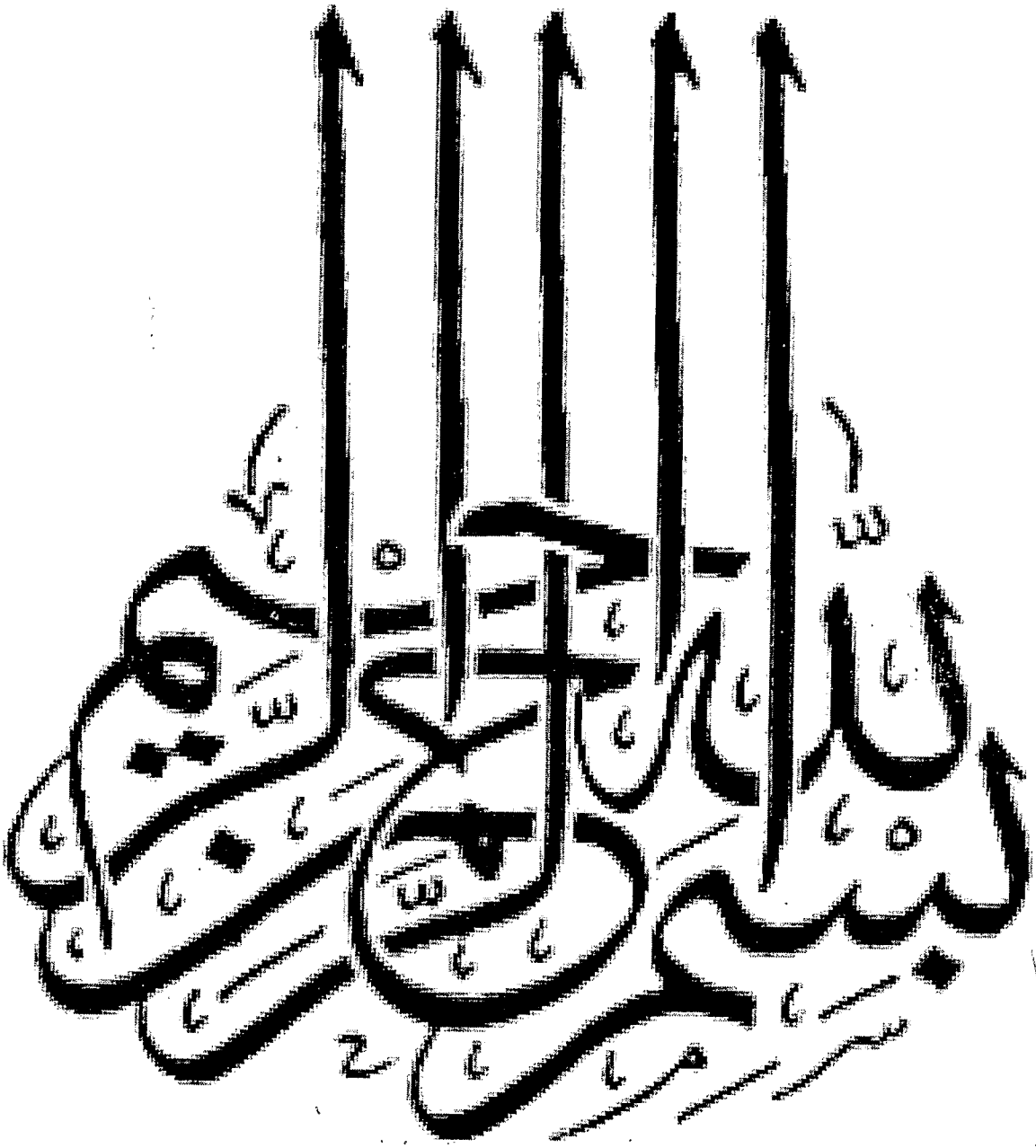

١٠٢٠٥٥

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده پزشکی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته باکتری شناسی پزشکی

عنوان

ارزیابی ژن ctx-m در سویه های کلبسیلا پنومونیه چند مقاومتی جدا شده از نمونه های کلینیکی

نگارش

عباس عبداللهی

مرکز اطلاعات و مدارک پزشکی

۱۳۸۷ /۷/ ۱۷

استاد راهنما

آقای دکتر قربان بهزادیان نژاد

استاد مشاور

سرکارخانم دکترشهین نجارپیرایه

تابستان۱۳۸۷

۱۰۳۰۵۵

فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای عباس عبدالهی رشته: باکتری شناسی 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:

دکتر قربان بهزادیان نژاد (استاد راهنما)

دکتر شهین نجار پیرایه (استاد مشاور)

دکتر محمد مهدی فیض آبادی (استاد ناظر)

دکتر مرتضی ستاری(استاد ناظرونماینده تحصیلات تکمیلی)

آئین نامه پایان نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه .چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، میتن بخشی از فعالیتهای علمی- پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلا به طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

"کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری نگارنده در رشته ... است که در سال ۱۳۸۷ ... در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی ... و مشاوره ... از آن دفاع شده است."

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ٤: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه ، معادل وجه مذکور در ماده ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب ... دانشجوی رشته ... مقطع ... تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

دستورالعمل حق مالکیت مادي و معنوي در مورد نتایج پژوهشهاي علمي
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان ، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها/ رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند.
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/ رساله نیز منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی حاصل از نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

نام و نام خانوادگی . عباس عبدالهی
تاریخ و امضاء ۱۳۸۴/۶/۱۷

تقدیم به

تمامی کسانی که

دوستشان دارم و

دوستم دارند ...

وظیفه خود می دانم از کلیه کسانی که در انجام این پایان نامه من را یاری داده اند سپاسگذاری کنم :

استاد ارجمند جناب آقای دکتر قربان بهزادیان نژاد که همواره در طول مراحل این تحقیق از هیچ کمکی به اینجانب دریغ ننمودند و از تجربیات ارزنده خود مرا بهره مند می ساختند.

استاد گرانقدر سرکار خانم دکتر شهین نجار پیرایه که به حق مشاور بسیار ارزنده ای برای کلیه دانشجویان هستند و با راهنمایی های علمی و عملی ارزنده خویش راهگشای بنده در طول این تحقیق بودند.

جناب آقای دکتر ستاری و همچنین سرکار خانم دکتر مبارز که در طول تحصیل از تجربیات گرانبهای آنها استفاده کردم .

کارشناسان محترم گروه سرکار خانم صمیمی و سرکار خانم رازقی که با همکاری و همیاری، بنده را در انجام مراحل عملی و اجرایی صبورانه یاری نمودند.

پدر و مادر مهربانم که هر چه دارم از آنها دارم و وجود خود را مدیون وجود بی همتایشان میدانم.

خواهران و برادرانم که همواره در تمامی مراحل زندگی حامی ام بوده اند.

همسر مهربان و دلبندم.

و در نهایت هم کلاسی های خوب وعزیزم...

چکیده

زمینه و هدف: کلبسیلاپنومونیه یکی از مهمترین عوامل عفونت زا بخصوص در بیماران بستری در بیمارستان به شمار می رود. اخیراً مقاومت دارویی آن، بویژه به چندین آنتی بیوتیک از دسته های دارویی مختلف مورد توجه قرار گرفته است؛ این مقاومت به گونه ای است که از عوامل ویرولانس باکتری به حساب می آید. هدف از این تحقیق، ارزیابی ژن ***bla-ctx-m-type*** یکی از انواع بتالاکتامازهای وسیع الطیف در ایزوله های کلبسیلاپنومونیه چند مقاومتی جدا شده از نمونه های کلینیکی است.

مواد و روش ها: در این مطالعه که از انواع مطالعات مقطعی – تحلیلی می باشد، طی یک دوره یک ساله از فروردین ۱۳۸۵ تا فروردین ۱۳۸۶، ۲۸۰ مورد کلبسیلاپنومونیه از نمونه های مختلف کلینیکی شامل ادرار، خون، مدفوع، زخم، ترشحات دستگاه تنفسی و سایر ترشحات چرکی و مایعات استریل بدن جدا شد. ابتدا با روش انتشار از دیسک، حساسیت دارویی آنها بررسی شد؛ سپس توسط روش E-test, MIC موارد مقاوم تعیین گردید. با استفاده از دیسک های ESBL جهت بررسی آنزیم بتالاکتاماز به روش Double Disc وجود بتالاکتاماز وسیع الطیف در انواع مقاوم تعیین شد؛ و این مقاومت ها با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت، اطلاعات جمع آوری شده توسط تعیین توالی(Sequencing) محصولات PCR مورد تجزیه و تحلیل وتایید نهایی قرار گرفتند.

نتایج: از ۲۸۰ مورد ***K.pneumoniae***، ۶۲ مورد (۲۲/۱۴٪) دارای مقاومت دارویی چندگانه بودند؛ از این میان، تعداد ۴۰ ایزوله به تمامی سفالوسپورین های مصرفی شامل سفالوتین، سفیکسیم، سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفتی زوکسیم مقاوم بودند. در مورد نتایج E-test دانستن این نکته قابل توجه بود که هیچ حساسیتی در ۴۰ سویه تماماً مقاوم به سفالوسپورین ها، نسبت به آنتی بیوتیک وجود نداشت. همگی این نمونه ها در بررسی با روش Double Disc برای اثبات وجود ESBLs مثبت بودند؛ که این نتایج، در نهایت توسط روش PCRوSequencing بررسی و تایید شدند.

نتیجه گیری: جداسازی ۲۲/۱۴٪ مقاومت چند دارویی در کلبسیلاپنومونیه های جدا شده و اثبات وجود بتالاکتامازهای وسیع الطیف در انواع مقاوم به میزان٪۱۴/۲، توجه ویژه به مصرف سفالوسپورین های وسیع الطیف و بررسی های گسترده را در سطح ملی خاطرنشان می سازد.

کلید واژه ها: ۱. کلبسیلاپنومونیه ۲. بتالاکتامازهای وسیع الطیف ۳. مقاومت چند دارویی ۴. آنزیم CTX-M

فهرست

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱-کلبسیلا ۲

۱-۱-۱-مرفولوژی ۲

۱-۱-۲-صفات بیوشیمیایی ۲

۱-۱-۳-اکولوژی ۳

۱-۱-۴-کشت ۳

۱-۱-۵-طبقه بندی ۳

۱-۱-۶-اپیدمیولوژی ۵

۱-۱-۷-فاکتورهای بیماریزایی ۵

۱-۱-۷-۱-کپسول ۵

۱-۱-۷-۲-پیلی(فیمبریه) ۶

۱-۱-۷-۳-اندوتوکسین ۶

۱-۱-۷-۴-سیدروفورها ۶

۱-۱-۷-۵-توکسین ۷

۱-۱-۸-بیماریزایی ۷

۱-۱-۸-۱-پنومونی ۷

۱-۱-۸-۲-عفونتهای بیمارستانی ۷

۱-۱-۸-۳-عفونتهای دستگاه ادراری ۸

۱-۲-اساس مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها ۸

۱-۲-۱-مقاومت ذاتی و اکتسابی ۹

۱-۲-۲-انواع مقاومت های ژنتیکی در برابر آنتی بیوتیک ها ۹

۱-۲-۲-۱-مقاومت کروموزومی ۱۰

۱-۲-۲-۲-مقاومت پلاسمیدی ۱۱

۱-۲-۲-۳-مقاومت ترانسپوزونی ۱۲

۱-۳-فاکتورهای موثردرگسترش و انتشار مقاومت های آنتی بیوتیکی ۱۳
۱-۳-۱-انتقال ژنهای مقاومت از یک باکتری به باکتری دیگر ۱۳
۱-۳-۱-۱-کنژوگاسیون ۱۳
۱-۳-۱-۲-ترانسداکشن ۱۴
۱-۳-۱-۳-ترانسفورماسیون ۱۵
۱-۳-۲-جهش در ژنهای مقاومت ۱۶
۱-۳-۳-افزایش فشار محیطی ۱۶
۱-۴-مقدمه و تاریخچهESBL ۱۷
۱-۴-۱-گروه بندی عملی و مولکولیESBL ۱۹
۱-۴-۲-حساسیت و مشخصات بیوشیمیایی ۲۰
۱-۵-انواع ESBLها ۲۱
۱-۵-۱-TEM ۲۲
۱-۵-۲-SHV ۲۴
۱-۵-۳-CTX-M ۲۶
۱-۵-۴-OXA ۳۱
۱-۵-۵-سایرESBLs ۳۳
۱-۶-اهمیت پزشکی شناسایی ESBLs ۳۴
۱-۷-اپیدمیولوژیESBLs ۳۶

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱-کشت نمونه ها ۴۰
۲-۲-تست های بیوشیمیایی افتراقی ۴۰
۲-۳-تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار از دیسک ۴۱
۲-۳-۱-مواد و وسایل مورد نیاز ۴۱
۲-۳-۲-آماده کردن محیط کشت ۴۲

۲-۳-۳-روش تهیه استاندارد ۰/۵ مک فارلند ۴۲
۲-۳-۴-تلقیح سوسپانسیون میکروبی به محیط کشت ۴۳
۲-۳-۵-قرار دادن دیسک های آنتی بیوتیکی ۴۴
۲-۳-۶-بررسی نتایج آنتی بیوگرام ۴۴
۲-۴-روشE-test ۴۵
۲-۴-۱-مواد و وسایل مورد نیاز ۴۵
۲-۴-۲-قرار دادن نوارهایE-test ۴۶
۲-۵-روش استفاده از دیسک هایESBL ۴۶
۲-۵-۱-مواد و وسایل مورد نیاز ۴۶
۲-۶-استخراج پلاسمید باکتری ۴۷
۲-۷-الکتروفورز ژل آگارز ۵۱
۲-۷-۱-محلولها و بافرهای مورد استفاده در الکتروفورز ژل آگارز ۵۱
۲-۷-۲-روش انجام الکتروفورز ۵۳
۲-۸-PCR ۵۴
۲-۸-۱-طراحی پرایمر ۵۴
۲-۸-۲-روش انجام PCR ۵۷

فصل سوم: نتایج تحقیق

۳-۱-نتایج کشت و آزمایشهای بیوشیمیایی ۶۱
۳-۲-نتایج حاصل از تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی ۶۲
۳-۳-نتایج حاصل از استفاده ازدیسک های ESBL ۶۶
۳-۴-اطلاعات مربوط به نمونه های کلینیکی ۶۸
۳-۵-نتایج حاصل از استخراج پلاسمیدی ۶۸
۳-۶-نتایجPCR ۶۹
۳-۷-نتایج Sequencing ۷۰

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری ۷۵
فصل پنجم: منابع ۸۱
فصل ششم: ضمایم ۹۲

فهرست جداول

جدول۱-۱-طبقه بندی جنس کلبسیلا ۴
جدول۱-۲-طبقه بندی بتالاکتامازها ۲۰
جدول۱-۳-مشخصات برخی از اعضای گروه CTX-M ۲۷
جدول۱-۴-مشخصات اعضای گروه CTX-M ۳۰
جدول۲-۱-لوله های استاندارد مک فارلند ۴۳
جدول۲-۲-برنامه مورد استفاده برای تکثیر ژنctx-m درواکنش ۵۹
جدول۳-۱-نتایج حاصل از آزمایش های بیوشیمیایی نمونه های ۶۱
جدول۳-۲-نتایج آنتی بیوگرام ۶۴
جدول۳-۳-تفکیک ایزوله ها بر اساس تعداد مقاومت ۶۶

فهرست اشکال

شکل۱-۱-نحوه عمل یک بتالاکتاماز ۲۰
شکل۱-۲-مقایسه ۳ نوع رایج از ESBLs ۲۱
شکل۱-۳-جایگزینی اسید آمینه ها در موقعیتهای متفاوت TEM-1 ..... ۲۴
شکل۱-۴-جایگزینی اسید آمینه ها در موقعیتهای متفاوت SHV-1 ..... ۲۵
شکل۳-۱-روش انتشار از دیسک در آگار(Kirby-Bauer) ۶۲
شکل۳-۲-نوع مقاوم به آنتی بیوتیک در نوارE-test ۶۳
شکل۳-۳-دیسکهای ESBL ساخت شرکت MAST ۶۷
شکل۳-۴-تشخیص انواع مقاوم با استفاده از دیسکهای ESBL ۶۷
شکل۳-۵-الکتروفورز پلاسمیدهای استخراجی ۶۸
شکل۳-۶-الکتروفورز محصول PCR ۶۹

فهرست نمودارها

نمودار۳-۱-توزیع فراوانی سویه های کلبسیلا پنومونیه دارای مقاومت..... ۶۴

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- کلبسیلا[1]

جنس کلبسیلا توسط میکروب شناس آلمانی به نام ادوین کلبس[2] در سال ۱۸۸۰ کشف شد و به همین جهت باکتری های این جنس کلبسیلا نامیده می شود. کلبسیلا پنومونیه یا باسیل فریدلاندر در سال۱۸۸۲ توسط کارل فریدلاندر[3] در خلط مبتلایان به پنومونی دیده شد، که این دلیلی بر ارتباط باکتری با ایجاد پنومونی بود[۱و۲].

۱-۱-۱- مرفولوژی

کلبسیلاها باسیل های گرم منفی، بدون اسپور، کوتاه وکلفتی می باشند که دارای کپسول پلی ساکاریدی هستند، که بر اساس این کپسول تیپ بندی می شوند [۱و۲و۳].

۱-۱-۲- صفات بیوشیمیایی

واکنش های بیوشیمیایی کلبسیلا پنومونیه شامل : عدم تحرک، تخمیر گلوکز ولاکتوز، تستهای ووگس پروسکوئر[4] وسیترات ولیزین دکربوکسیلاز واوره آزمثبت؛ ولی متیل رد[5] واینـدول(Indol) منفی می باشند. کلبسیلا پنومونیه H2S تولید نمی کند(جدول ۱ ضمیمه). درصد مولکول گوانین + سیتوزین DNA کلبسیلا پنومونیه۵۸-۵۶٪ می باشد[۱و۲و۳و۴].

1-*Klebsiella*
2- Edwin Klebs
3-Friedlander
4-Voges-Proskauer
5-Methyl Red

۱-۱-۳- اکولوژی

گونه های کلبسیلا به میزان فراوانی در طبیعت یافت می گردند و احتمالاً دو جایگاه معین دارند؛ آنها یا در محیط پیرامونی مانند آبهای سطحی، فاضلاب، خاک و بر روی گیاهان یافت می شوند ویا در سطوح مخاطی پستاندارانی نظیر انسان، اسب وخوک کلونیزه می شوند[۴و۵].

۱-۱-۴- کشت

کلبسیلا پنومونیه در اغلب محیط های کشت آزمایشگاهی مانند محیط بلادآگار، ائوزین متیلن بلوآگار[1]، مک کانکی آگار ونوترینت آگار رشد می کند. ارگانیسم در محیط مک کانکی آگار کلنی های برجسته و موکوئیدی صورتی رنگی تولید می کند که هنگام برداشتن با آنس، کش می آید. کلبسیلا در اثر کشت های مکرر کپسول خود را از دست می دهد[۲و۳].

۱-۱-۵- طبقه بندی

کلبسیلا پنومونیه جنسی از خانواده انتروباکتریاسه می باشد وبر اساس آخرین تقسیم بندی برگی[2] ، طبقه بندی جدید به این شرح می باشد(جدول۱-۱):

1-Eosin methylen blue agar
2-Bergey

جدول۱-۱: طبقه بندی جنس کلبسیلا

اسامی جدید	اسامی قدیم	توضیحات
Klebsiella granulomatis	***Calymmatobacterium granulomatis***	قادر به رشد در محیط های کشت معمول نیست و سبب بیماری **granuloma inguinale** می گردد.
Klebsiella oxytoca	**Indole (+)** ***K. pneumoniae***	معمولا از نمونه های کلینیکی جدا می گردد وتفاوتش با ***K. pneumoniae*** در تولید ایندول می باشد به این ترتیب که***Klebsiella oxytoca*** ایندول(+) است.
K. pneumoniae **SubSp.** ***pneumoniae***		معمولا از نمونه های کلینیکی جدا می گردد وایندول(-) است.
K. pneumoniae **SubSp.*ozaena***	***Klebsiella ozaena***	سویه هایی از ***K. pneumoniae*** می باشند که از لحاظ بیوشیمیایی غیرفعال هستند و سبب **atrophic rhinitis** می گردد که یک حالت آن **ozena**(زخم بینی) را ایجاد می کند.
K. pneumoniae **SubSp.** ***rhinoscleromatis***	***Klebsiella rhinoscleromatis***	سویه هایی از ***K. pneumoniae*** می باشند که از لحاظ بیوشیمیایی غیرفعال هستند و سبب بیماری **granulomatous** می شود که به **rhinoscleroma** نیزمعروف است.
Raoultella ornithinolytica	***Klebsiella*** **Group 47** ***Klebsiella ornithinolytica***	تا کنون از خون ،ادرار،خلط و زخم ها جدا گردیده اند.
Raoultella planticola	***Klebsiella*** **Species 2** ***Klebsiella trevisanii*** ***Klebsiella*** **planticola**	از آب وگیاه جدا می گردد و میزان جدا سازی آن از نمونه های انسانی نادر می باشد.
Raoultella terrigena	***Klebsiella terrigena***	از خاک وآب جدا می گردد.