

بررسی اثر آنزیم های بتا لاکتامازی بر روی تست های فنوتیپی

نویسنده: آیلا ر صباغی



انتشارات آریان قلم

سرشناسه : صباغی، آیلار، ۱۳۶۴-

عنوان و نام پدیدآورندگان : بررسی اثر آنزیم های بتا لاکتامازی بر روی تست های فنوتیپی

مشخصات نشر : تهران : آریان قلم ، ۱۳۹۳ .

مشخصات ظاهری : ۹۲ ص -

شابک : ۹۷۸-۶۰۰-۷۳۴۶-۸۵-۳

وضعیت فهرست نویسی : فیا

موضوع : بتا لاکتامازها

رده بندی کنگره : ۱۳۹۳ ۴۲۳ص/۶۰۹ QP

رده بندی دیویی : ۵۸۹/۹۰۹۲۵

شماره کتابشناسی ملی : ۳۵۷۹۲۸۲



بررسی اثر آنزیم های بتا لاکتامازی بر روی تست های فنوتیپی

ناشر : آریان قلم

مؤلف : آیلار صباغی

ناظر کیفی : نخستین پایگاه مشاوره پژوهشی دانشگاهی (نیکان)

ناظر فنی : محمد سعید زینلیان

چاپ متن : چاپ مهارت

صحافی : رئوف

نوبت چاپ : اول

تاریخ انتشار : ۱۳۹۳

تیراژ : ۱۰۰۰

قیمت : ۵۵۰۰۰ ریال

پیشگفتار

مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در میان ایزوله‌های بالینی در اکثر مواقع ناشی از تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی است. در سال‌های اخیر، تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی وسیع‌الطیف (ESBLs) و AmpC بتالاکتامازی در میان ایزوله‌های بالینی به ویژه باکتری *Escherichia coli* شیوع فراوانی یافته و مشکلات وافر را در رابطه با درمان و تشخیص این سویه‌ها از طریق تست‌های فنوتیپی پیشنهاد شده توسط سازمان جهانی CLSI (کمیته بین‌المللی استانداردهای آزمایشگاهی بالینی)، ایجاد نموده است. لذا هدف از انجام این مطالعه، بررسی الگوهای حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و تحقیق پیرامون وجود ژن‌های بتالاکتامازی SHV و AmpC (CITM, FOX) در نمونه‌های بالینی *E. coli* می‌باشد.

۵۰۰ نمونه بالینی از بیمارستان‌های شهر تهران جمع‌آوری شد که از این بین، ۲۰۰ ایزوله *E. coli* از طریق تست‌های بیوشیمیایی انتخاب گردید و به منظور تشخیص فنوتیپی سویه‌های *E. coli* مولد آنزیم‌های بتالاکتامازی، تست‌های Disk diffusion method و Combined disk به کار گرفته شد. در نهایت سویه‌های غربال شده در تست‌های فنوتیپی، جهت PCR ژن‌های بتالاکتامازی SHV، CITM و FOX مورد بررسی قرار گرفتند.

از ۲۰۰ سویه مورد بررسی، ۱۲۸ (۶۴٪) ایزوله از طریق تست‌های فنوتیپی برای انجام پروسه PCR ژن‌های SHV و AmpC انتخاب شد، ۷ (۵/۵٪) و ۱۳ (۱۰/۲٪) ایزوله به ترتیب حاوی ژن‌های SHV و CITM بود و ژن FOX در هیچ ایزوله‌ای شناسایی نشد. نتایج به دست آمده بیان گر اهمیت شناسایی سویه‌های مولد بتالاکتاماز با استفاده از روش‌های مولکولی در روند افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد.

فهرست مطالب

پیشگفتار.....	۳
مقدمه.....	۹
فصل اول: کلیات	۱۱
۱-۱- باسیل های گرم منفی رودهای.....	۱۳
۲-۱- آنتی بیوتیک های بتالاکتام.....	۱۳
۳-۱- مقاومت دارویی.....	۱۷
۱-۳-۱- مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی.....	۱۷
۲-۳-۱- راه های کسب مقاومت.....	۱۸
۴-۱- بتالاکتامازها.....	۲۰
۱-۴-۱- سرین بتالاکتامازها و متالوبتالاکتامازها.....	۲۱
۲-۴-۱- آنزیم های بتالاکتامازی وسیع الطیف (ESBLs).....	۲۲
۳-۴-۱- تیپ SHV.....	۲۳
۵-۱- AmpC بتالاکتاماز.....	۲۶
۶-۱- روش های شناسایی آنزیم های ESBLs.....	۲۸
۱-۶-۱- تست های فنوتیپی.....	۲۸
۲-۶-۱- روش های مولکولی.....	۲۹
۷-۱- درمان سویه های مولد آنزیم های بتالاکتامازی.....	۲۹
۸-۱- هدف از تحقیق حاضر.....	۳۰
فصل دوم: مروری بر پیشینه	۳۱
۱ ۲ مروری بر مطالعات گذشته.....	۳۳
فصل سوم: مواد و روش ها	۳۷
۳-۱- جمع آوری نمونه ها.....	۳۹
۲ ۳ شناسایی فنوتیپی سویه های مولد آنزیم های ESBLs و AmpC بتالاکتاماز.....	۳۹
۱-۲-۳- طرز تهیه نیم مک فارلند.....	۴۰
۲-۳- استخراج DNA.....	۴۰
۴-۳- واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR).....	۴۲
۱-۴-۳- طراحی پرایمرهای یونیورسال.....	۴۲

۴۸	Polymerase chain Reaction (PCR) ۲ ۴ ۳
۴۹	Multiplex PCR ۱-۲-۴-۳
۴۹	۵-۳- آشکارسازی محصولات PCR از طریق الکتروفورز
۴۹	۱-۵-۳- تهیه ژل آگارز و انجام الکتروفورز
۵۰	۳ ۱-۲-۵- تهیه بافر الکتروفورز (TBE)
۵۰	۲-۵-۳- مشاهده باندهای DNA و آنالیز نتایج ژل الکتروفورز
۶۰	۳-۲- خالص‌سازی قطعه DNA مورد نظر از محصول PCR توسط کیت استخراج DNA (Fermentas)
۵۰	(Clean up)
۵۱	۴-۴- بررسی میزان همولوژی توالی‌های سکانس شده
۵۲	۵-۴- روش تجزیه و تحلیل داده‌ها
۵۳	فصل چهارم: نتایج
۵۵	۴-۱- شناسایی و تعیین هویت باکتری‌ها
۵۶	۴-۲- نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی
۵۷	۴-۲-۱- نتایج حاصل از آزمون غربالی دیسک آگار دیفیوژن
۵۹	۴ ۲ ۲- نتایج آزمون تأییدی (Combined disk)
۵۹	۴-۳- نتایج PCR
۵۹	۴-۳-۱- استخراج ژنوم و پروسه PCR
۶۰	۴-۳-۲- بررسی وجود ژن‌های بتالاکتامازی SHV، CITM و FOX و نمایی از BLAST پرایمر ژن SHV
۶۱	۴-۳-۲-۱- بهینه‌سازی فرایند Uniplex PCR
۶۵	۴ ۲ ۲-۳- Multiplex PCR
۶۶	۴ ۴- نتایج Sequencing
۷۱	فصل پنجم: بحث
۷۳	۵-۱- بحث
۷۷	فصل ششم: نتیجه‌گیری و پیشنهادات
۷۹	۶-۱- نتیجه‌گیری
۷۹	۶ ۲- پیشنهادات
۸۱	منابع و مآخذ

فهرست جداول

جدول ۱-۳، مشخصات پرایمرها.....	۴۳
جدول ۲-۳، مشخصات مواد در واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR.....	۴۸
جدول ۳-۳، ترکیبات بافر TBE در غلظت 10X.....	۵۰
جدول ۱-۴، خصوصیات باکتری <i>E. coli</i>	۵۵
جدول ۲-۴، نتایج تست آنتی بیوگرام.....	۵۷

فهرست اشکال و نمودارها

شکل ۱-۱، ساختمان شیمیایی بنی سلین.....	۱۵
شکل ۱-۲، ساختمان شیمیایی کارباپنم.....	۱۵
شکل ۱-۳، ساختمان شیمیایی سفالوسپورین.....	۱۶
شکل ۱-۴، ساختمان شیمیایی ونگومايسين.....	۱۶
شکل ۵-۱، مکانیسم‌های مقاومت آنتی بیوتیکی.....	۱۸
شکل ۶-۱، کسب مقاومت از طریق پدیده کانجوگیشن.....	۲۰
شکل ۱-۷، مکانیسم سرین بتالاکتامازها در هیدرولیز حلقه بتالاکتامی.....	۲۱
شکل ۱-۸، نمایی از فیلوژنی خانواده بتالاکتامازی ESBLs.....	۲۳
شکل ۱-۹، نمایی از SHV-type ESBLs.....	۲۵
شکل ۱-۱۰، شمایی از عناصر تکاملی در آنزیم‌های SHV، TEM و CTXM.....	۲۶
شکل ۱-۱۱، خانواده AmpC بتالاکتاماز.....	۲۷
نمودار ۱-۲، شیوع ایزوله‌های مولد ESBLs.....	۳۳
شکل ۱-۳، نمایی از نواحی مشترک هم طراز شده در ژن SHV.....	۴۳
شکل ۱-۴، نمایی از نتایج تست‌های افتراقی باکتری <i>E. coli</i>	۵۵
نمودار ۱-۴، فراوانی ایزوله‌های <i>E. coli</i> به تفکیک نوع نمونه.....	۵۶
شکل ۲-۴، مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های مورد بررسی در این مطالعه.....	۵۸
شکل ۳-۴، نمایی از تست دیسک آگار دیفیوژن.....	۵۸
شکل ۴-۴، تشخیص فنوتیپی مولدین ESBLs و AmpC شکل سمت راست: تست فنوتیپی ESBLs مثبت، شکل سمت چپ: تست فنوتیپی AmpC مثبت.....	۵۹
شکل ۵-۴، بررسی کیفی DNA استخراج شده طی فرایند الکتروفورز.....	۶۰

- شکل ۴-۶، نمایی از BLAST پرایمر SHV..... ۶۱
- شکل ۴-۷، گرادیانت دمایی اعمال شده بر روی DNA ژنومیک سویه استاندارد..... ۶۲
- شکل ۴-۸، گرادیانت 2 MgCl اعمال شده بر روی DNA ژنومیک سویه استاندارد..... ۶۳
- شکل ۴-۹، نمایی از محصول PCR ژن SHV بتالاکتاماز..... ۶۳
- شکل ۴-۱۰، نمایی از محصول PCR ژن AmpC(CITM) بتالاکتاماز..... ۶۴
- شکل ۴-۱۱، نتایج فراوانی ژن‌های بتالاکتامازی..... ۶۵
- شکل ۴-۱۲، الکتروفورز ژل آگارز..... ۶۶
- شکل ۴-۱۳، نمایی از میزان تشابه ژن سکانس شده CITM نسبت به توالی‌های ثبت شده مربوطه در ژن بانک..... ۶۸
- شکل ۴-۱۴، نمایی از میزان تشابه ژن سکانس شده SHV نسبت به توالی‌های ثبت شده مربوطه در ژن بانک..... ۶۹

ظهور مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در میان پاتوژن‌ها به ویژه در مراکز درمانی و بیمارستان‌ها به یک معضل بزرگ در رابطه با سلامت همگانی تبدیل شده است. برخی از باکتری‌ها قادر به تولید آنزیم‌هایی هستند که منجر به تغییر و یا تخریب ساختار شیمیایی آنتی‌بیوتیک‌ها و در نهایت سبب غیرفعال شدن آنتی‌بیوتیک و بروز فنوتیپ مقاوم از سوی باکتری می‌شوند. بهترین مثال از این مقاومت‌ها، آنزیم‌های بتالاکتامازی بوده که از طریق هیدرولیز حلقه بتالاکتام منجر به غیرفعال شدن آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌شوند (۱ و ۲). امروزه کاربرد روزافزون داروهای ضد میکروبی از جمله آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورینی منجر به ظهور دسته دیگری از ژن‌های بتالاکتامازی شده که در مقایسه با بتالاکتامازهای اولیه (TEM-2 و TEM-1، SHV-1) طیف فعالیت بیشتری دارند که می‌توان آن‌ها را تحت عنوان کلی ESBLs^۱ نامید (۳ و ۴). پدیده ESBLs برای اولین بار در سال ۱۹۸۳ از اروپا گزارش شد اما طولی نکشید که بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در ایالات متحده آمریکا و آسیا نیز شناسایی شدند (۵).

خانواده SHV از آنزیم‌های بتالاکتامازی طیف وسیع در سال ۱۹۸۳ از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه گزارش شد. ژن کدکننده این آنزیم در ایزوله‌های کلبسیلا یک ژن کروموزومی به حساب می‌آید. اما این ژن به صورت فاکتور R (Resistant)، طی پدیده‌ای به نام کانجوگیشن در میان سویه‌های پاتوژن گسترش پیدا کرده است (۴ و ۶). یافته‌های اخیر محققان نشان داده که یکی از مکانیسم‌های اصلی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در میان اعضای خانواده انتروباکتریاسه به ویژه *E. coli* تولید آنزیم‌های ESBLs می‌باشد که همین امر مشکلات بسیاری را در رابطه با تشخیص و درمان این سویه‌ها ایجاد نموده است (۷). بهترین روش برای شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، یک غربالگری اولیه برای حساسیت کاهش یافته نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پیشنهادی CLSI^۲ است و سپس انجام آزمون‌های تأییدی، به منظور اثبات اثر سینرژسم، بین یک نشانگر سفالوسپورین و یک مهارکننده بتالاکتامازی می‌باشد (۸). اخیراً برخی از سویه‌های باکتریایی به ویژه *E. coli* و کلبسیلا شناسایی شده‌اند که مولد یک سفالوسپوریناز از خانواده بتالاکتاماز به نام AmpC می‌باشند. AmpC بتالاکتامازها عموماً

1. Extended Spectrum Beta-Lactamases
2. Clinical and Laboratory Standards Institute

کروموزومی بوده، اما به واسطه عناصر متحرک ژنتیکی به ویژه پلازمید به راحتی بین ارگانیسم‌های دیگر منتشر شده و از آنجا که در برابر مهارکنندگان بتالاکتامازی به ویژه کلاوونیک اسید مقاوم بوده منجر به اختلال در نتیجه تست تأییدی و گزارش منفی کاذب ESBLs می‌گردد (۱۰ و ۹). از این رو تشخیص فنوتیپی میکروارگانیسم‌های مولد AmpC و ESBLs دشوار است. لذا استفاده از روش‌های مولکولی در کنار روش‌های فنوتیپی ضروری می‌باشد. از آنجا که ژن‌های خانواده بتالاکتاماز شامل زیر خانواده‌های متعدد بوده، پرایمرهای یونیورسال می‌تواند برای شناسایی کامل این زیرخانواده‌ها مؤثر باشد (۴). هدف از این تحقیق، بررسی فراوانی انواع آنزیم‌های ESBLs و شناسایی ژن‌های بتالاکتامازی خانواده SHV, AmpC(CITM,FOX) در نمونه‌های بالینی *E.coli* با استفاده از پرایمرهای یونیورسال از طریق PCR می‌باشد.