



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی،  
آزمایشگاه میکروبیولوژی



## آزمایشگاه میکروب ۲

جدا سازی باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک خاص

1

# زمینه ی نظری

2

▶ آنتی بیوتیک ها ترکیباتی هستند که اکثرا بوسیله میکروارگانسیم ها سنتز میشوند و روی میکروارگانسیم ها اثر میکروب کشی دارند. از میکروارگانسیم های مولد آنتی بیوتیک می توان پنی سیلیوم، استرپتومایسس و باسیلوس ها را نام برد.

▶ آنتی بیوتیک های تولیدی توسط این میکروارگانسیم ها روی خودشان اثر میکروب کشی ندارند بلکه اثرشان روی سایر میکروارگانسیم ها است. آنتی بیوتیک ها را برای درمان بیماری های عفونی باکتریال و قارچی بکار میبرند که با انتشار در جریان خون میتواند به تمام بدن دسترسی پیدا کرده و عامل عفونت را از بین ببرد.

## بررسی جهش و مقاومت به آنتی بیوتیک

➤ جهش به معنای تغییر در ژن است که تغییر در عملکرد پروتئین ها را حاصل میشود.

➤ دو نوع جهش وجود دارد:

➤ جهش اول morphological که باعث تغییر در ساختار مورفولوژی کلنی باکتری میشود.

➤ جهش دوم lethal mutasion که باعث مرگ سلول میشود.

## بررسی مقاومت و جهش استافیلوکوکوس اورئوس به پنی سیلین

### باکتری استافیلوکوکوس اورئوس:

این باکتری کوکسی گرم مثبت و بیهوازی اختیاری است. این باکتری ممکن است به صورت فلور عادی پوست یا بینی وجود داشته باشد. این باکتری میتواند بیماری های عفونی مثل گل مژه آبسه و یا بیماری های تهدید کننده ای مثل مننژیت، اندوکاردیت و... ایجاد کند.

استافیلوکوک اورئوس با تولید انترتوکسین، ایجاد مسمومیت غذایی می‌کند. باکتری ممکن است به شکل همزیست بر روی پوست وجود داشته باشد و از بینی یک سوم از مردم جدا شود. این باکتری به میزان کمتر ممکن است در گلو نیز وجود داشته باشد. وجود استافیلوکوک اورئوس در این شرایط به معنای عفونت نیست و نیازی هم به درمان در اینگونه موارد نمی‌باشد.

باکتری ممکن است در حیوانات اهلی، گربه‌ها، سگ‌ها و اسب‌ها وجود داشته باشد و موجب التهاب و عفونت پا در مرغ‌ها شود. استافیلوکوک اورئوس ممکن است بر روی سطوح خشک برای هفته‌ها تا ماه‌ها زنده بماند

برخی از فاژها (باکتریوفاژها) می‌توانند استافیلوکوک اورئوس را آلوده کنند و از این طریق موجب انتقال ژن تولید کننده توکسین پنتون- والنتین به آن شوند. از این رو، بیماری‌زایی سویه‌ها را افزایش خواهند داد.

هنگامی که سد پوستی از بین برود، باکتری به بافت حمله می‌کند و بیماری‌هایی مانند کورک و کفگیرک را ایجاد می‌کند. استافیلوکوک اورئوس در کودکان، عفونت شدید به نام سندرم پوستی فلسی شونده استافیلوکوکی را ایجاد می‌کند.

عفونت‌های استافیلوکوکی از طریق تماس با چرک زخم یا پوست با پوست انتقال پیدا می‌کنند. تماس با وسایل شخصی مانند حوله، ملحفه، لباس و وسایل ورزشی نیز در انتقال عفونت از فردی به فرد دیگر نقش دارند. عفونت‌های عمیق ممکن است شدید باشند مانند آرتریت، سپتیک، اندوکاردیت و پنومونی.

▶ آنتی بیوتیک پنی سیلین:

▶ پنی سیلین ها اولین گروه از دسته آنتی بیوتیک های بتالاکتام هستند و به خصوص برای باکتری های گرم مثبت به کار میروند. مکانیسم اثر: ۱. اتصال به PBP ها ۲. مهار ترانس پتیداز و جلوگیری از ساخت پپتید و گلیکان ۳. فعال شدن آنزیم های اتولیزین.

▶ مقاومت به پنی سیلین در استافیلوکوکوس اورئوس:

▶ ۱. سنتز بتالاکتاماز توسط باکتری

▶ ۲. فقدان PBPs و یا نفوذناپذیری دیواره

▶ ۳. نقص در عملکرد آنزیم های اتولیتیک

پس از کشف پنی سیلین، در ابتدا از این دارو برای درمان عفونت‌های استافیلوکوکی استفاده می‌شد اما روز به روز به مقاومت آنتی بیوتیکی علیه پنی سیلین افزوده شد بطوریکه در سال ۱۹۵۰، ۴۰ درصد سویه‌های بیمارستانی به پنی سیلین مقاوم شدند و این میزان در سال ۱۹۶۰ به ۸۰ درصد رسید.

علت این پدیده تولید پنی سیلیناز توسط باکتری بود که پنی سیلین را تجزیه می‌کند. بنابراین از آنتی بیوتیک‌های جدیدتر یعنی پنی سیلین‌های مقاوم به پنی سیلیناز (مانند اکساسیلین و متی سیلین) استفاده شد، متأسفانه این باکتری به مرور به این آنتی بیوتیک‌ها نیز مقاوم شده است. از این آنتی بیوتیک‌ها به همراه جنتامایسین برای درمان عفونت‌های جدی مانند اندوکاردیت استفاده می‌شود.



مقاومت به متی سیلین و سایر پنی سیلین‌های مقاوم به پنی سیلیناز به دلیل اپرون mec است. این اپرون، بخشی از کاست کروموزومی استافیلوکوکی (SCCmec) است. ژن mecA، پروتئین متصل شونده به پنی سیلین با نام PBP2a را کد می‌کند که میل پیوندی پایینی برای آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام دارد.

لازم است بدانید که پروتئین‌های PBP در ساخت و ساز دیواره سلولی باکتریایی نقش دارند. از این رو، وجود چنین پروتئین جدیدی تحت تأثیر آنتی بیوتیک نخواهد بود و باکتری به راحتی به زندگی خود ادامه می‌دهد.

این سویه‌ها در اصطلاح استافیلوکوک‌های مقاوم به متی سیلین (MRSA) می‌گویند. برای درمان MRSA از آنتی بیوتیک دیگری به نام وانکومایسین استفاده می‌شود. همچنین از آنتی بیوتیک جدیدی به نام لینزولید نیز برای درمان MRSA استفاده شده است.

۱. جهش سبب این میشود که سویه دیگر در محیط کشت حداقل قادر به رشد نیست که به آن Auxotroph گفته میشود.

۲. در بعضی موارد جهش سبب ایجاد مقاوت میشود که به این نوع جهش resistance mutation گفته میشود. برای مثال باکتری به یک نوع آنتی بیوتیک مثل پنی سیلین حساس بوده و حالا مقاوم شده است.

برای بررسی resistance mutation دو روش وجود دارد:

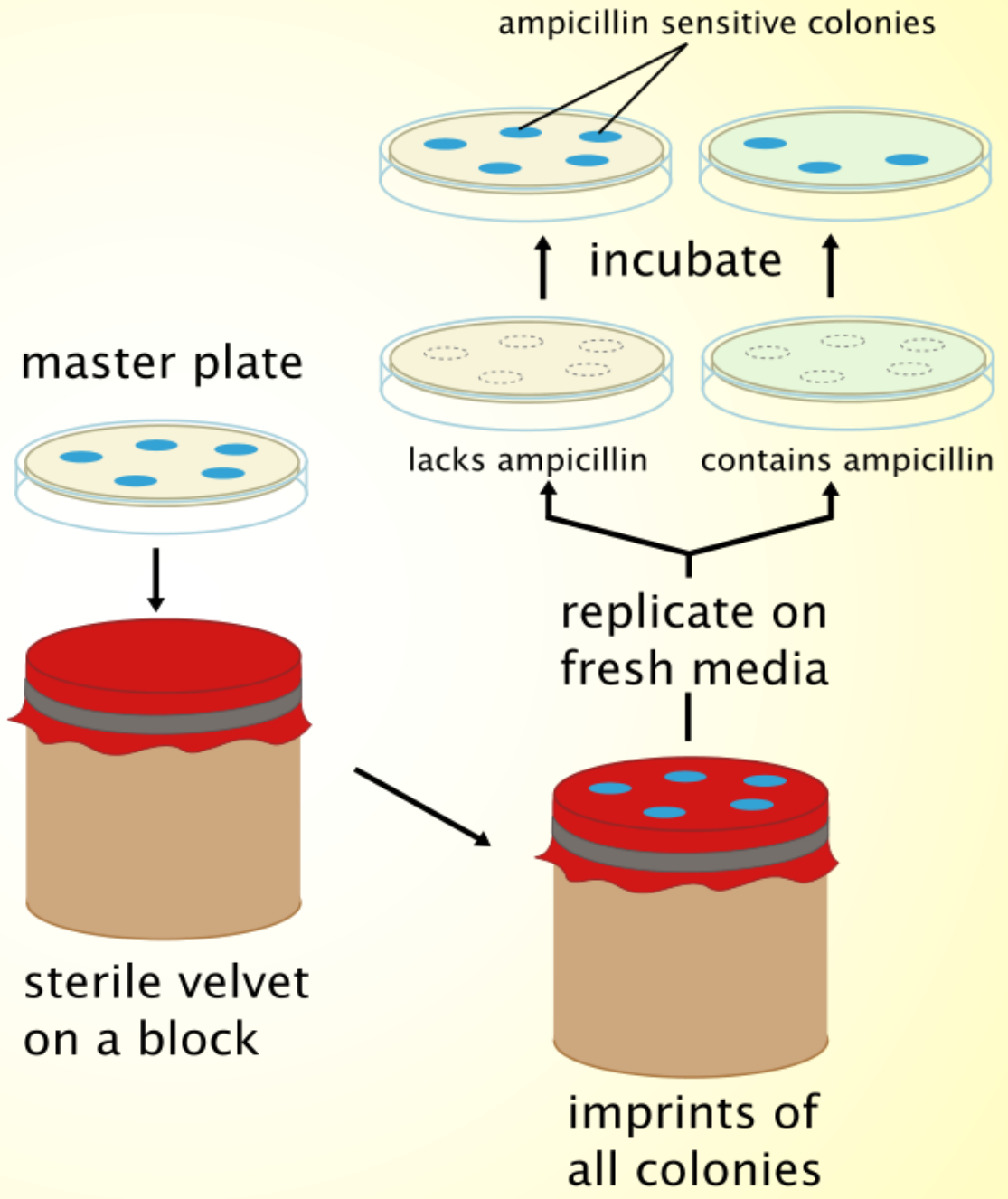
۱- **REPLICA PLATING**:

۲- **روش آگار شیب دار**:

➤ روش بسیار با ارزشی در جدا سازی و شناسایی چندین نوع از جهش یافته ها به خصوص جهش یافته های غذایی است، جهش های غذایی وقتی رخ می دهند که یک تغییر ژنتیکی نیاز های تغذیه ای یک سلول را عوض می کند. جهش یافته های غذایی (اگزوتروف ها) ممکن است به فاکتور های رشد اضافی پیدا کنند مانند اسید آمینه های خاص یا ویتامین ها که والدین آن ها (پروتوتروف) به آن ها نیاز نداشته اند.

➤ در تکنیک Replica Plating جمعیت سلولی با جهش یافته ها در پلیت قرار می گیرند تا پلیت های اصل را نشان دهند. کلنی های بدست آمده از این پلیت اصلی بر روی یک پارچه ی مخملی استریل گذاشته می شود. از روی پارچه ی مخملی کلنی های ضرب شده را می توان بر روی یک محیط با موقعیت های متفاوت تلقیح نمود. موقعیت کلنی ها که پس از انکوباسیون ظهور پیدا می کنند باید مشابه کلنی ها بر روی پلیت اصلی باشند.

➤ با این روش که به یک کلنی که بر روی محیط کامل رشد می یابد ولی بر روی محیط حداقل رشد نمی کند ( دارای نقص در یک فاکتور رشد اختصاصی است) اجازه ی رشد می دهد (اگزوتروف)، می توان جایگاه وقفه متابولیکی اختصاصی حاصل از جهش را مشخص نمود.



## ۲- روش آگار شیب دار:

با استفاده از یک پلیت که آگار در آن بصورت شیب‌دار قرار دارد و روی آن پنی سیلین قرار دارد بصورتی که هر جا آگار کمتر است پنی سیلین غلظت بیشتری دارد و هر جا آگار بیشتر است پنی سیلین غلظت کمتری دارد.

با کشت دادن نمونه باکتری متوجه می شویم که در این شیب غلظت باکتری به چه میزان از پنی سیلین مقاوم است و در کدام ناحیه بهتر رشد می کند.

بررسی مقاومت و جهش استافیلوکوکوس اورئوس به پنی سیلین به چند روش مشاهده ی کلنی های موجود در هاله ی عدم رشد در تست بیوگرام ، **Replicaplatting** و **Plate** شیبدار قابل مشاهده است که در این آزمایش از روش سوم استفاده میکنیم.

# مواد و وسایل

➤ ۱- کشت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

➤ ۲- لوله ی آزمایش

➤ ۳- محیط NA

➤ ۴- پلیت استریل

➤ ۵- پنی سیلین مایع

➤ ۶- بن ماری

➤ ۷- سمپلر

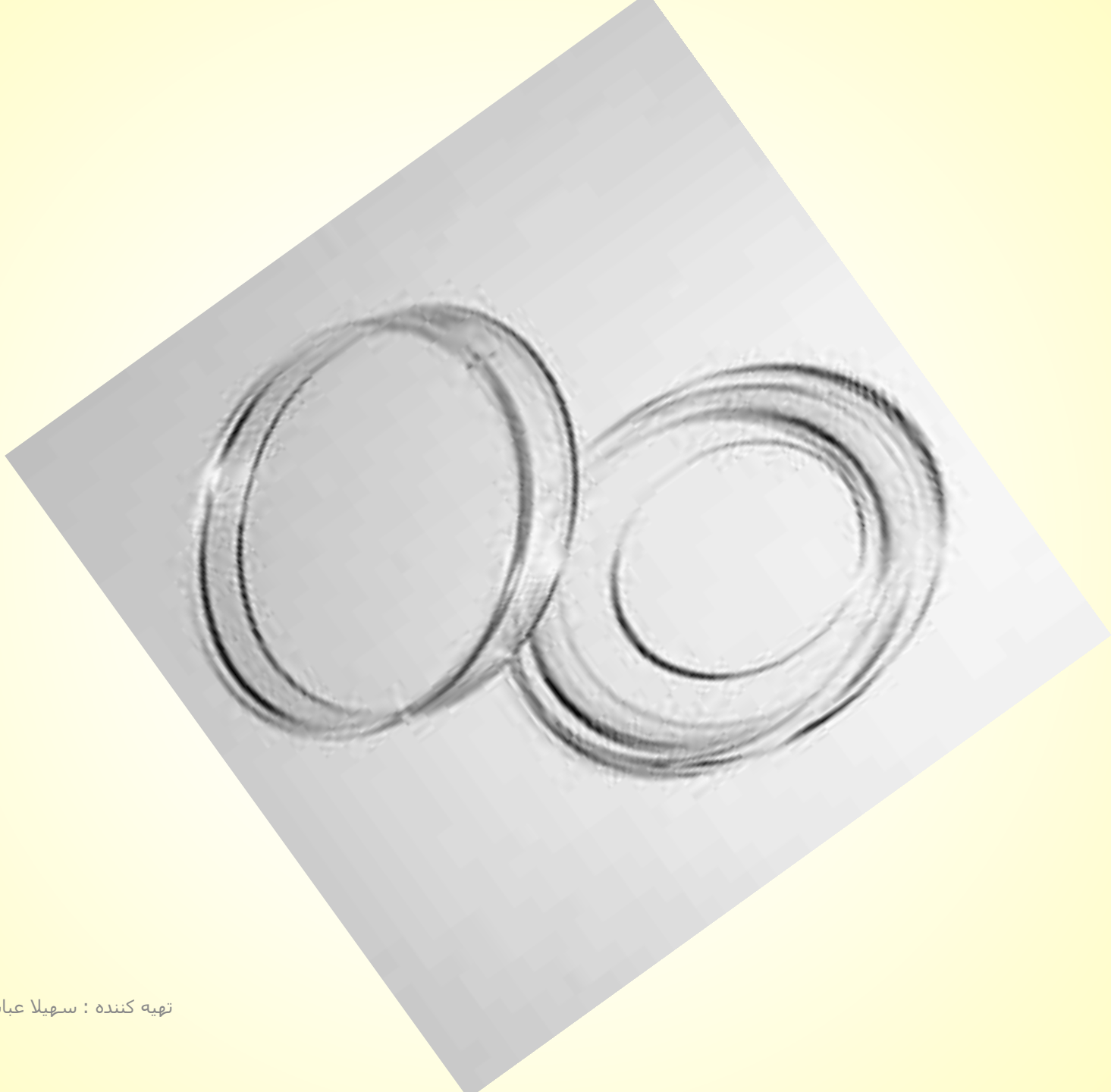
# شرح آزمایش

16

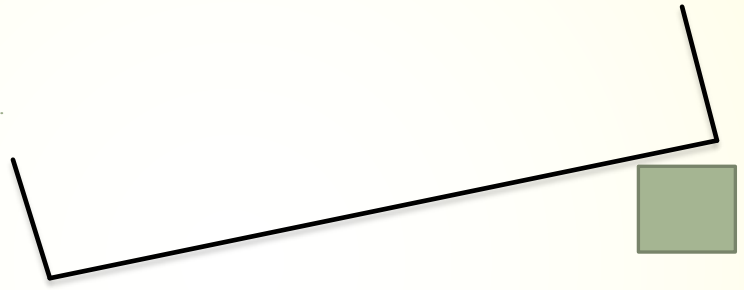
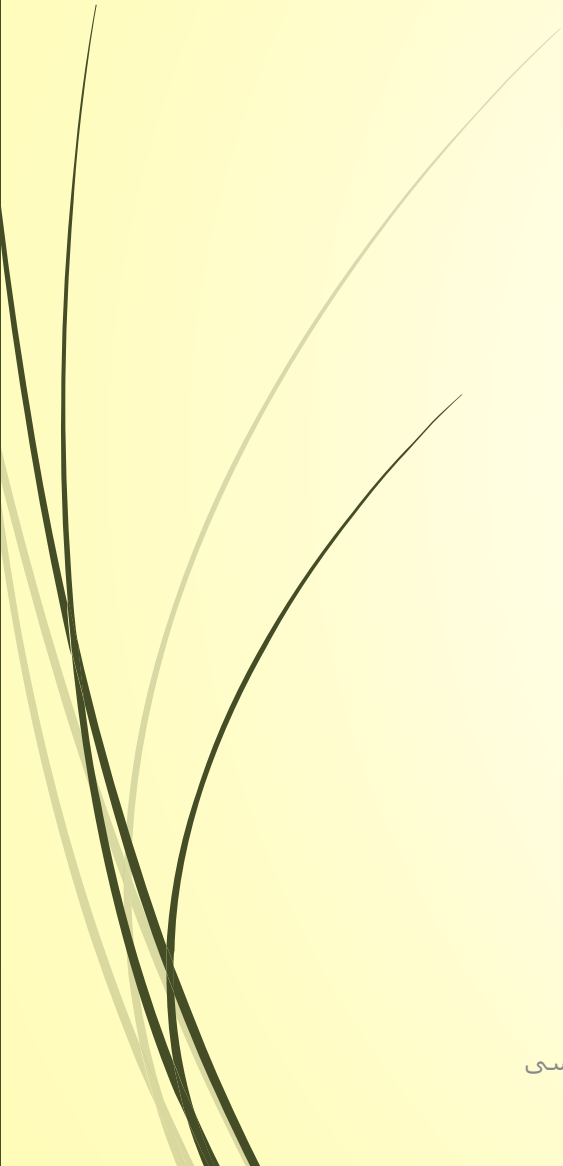
به منظور تهیه محیط کشت آگار شیب دار ابتدا یک پلیت تمیز و استریل برداشته و پشت آن را علامت گذاری می کنیم و در کنار شعله طبق علامت آگار را با شیب حدود ۱۰ درجه میریزیم به صورتی که محل علامت گذاری شده قسمت حاوی کمترین میزان آگار باشد (بیشترین میزان پنی سیلین) میگذاریم تا سفت شود و در پلیت را می بندیم تا محیط آلوده نشود.

همزمان مقداری محیط نوترینت آگار (NA) را تهیه کرده و روی شعله گذاشته تا سفت نشود سپس وقتی آگار به اندازه کافی سفت شد مقداری از نوترینت آگار را برداشته و داخل یک لوله آزمایش می ریزیم و میگذاریم تا کمی سرد شود و بعد پنی سیلین رقیق شده به میزان ۲۰ mg/ml را اضافه می کنیم تا حرارت باعث از بین رفتن اثر آن نشود.

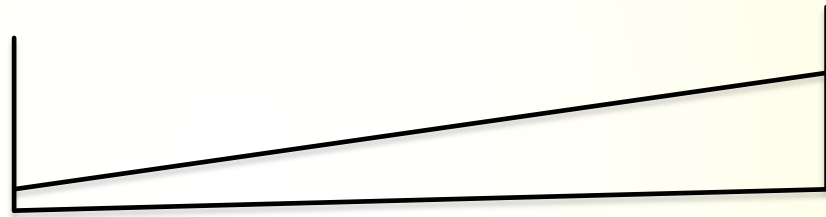
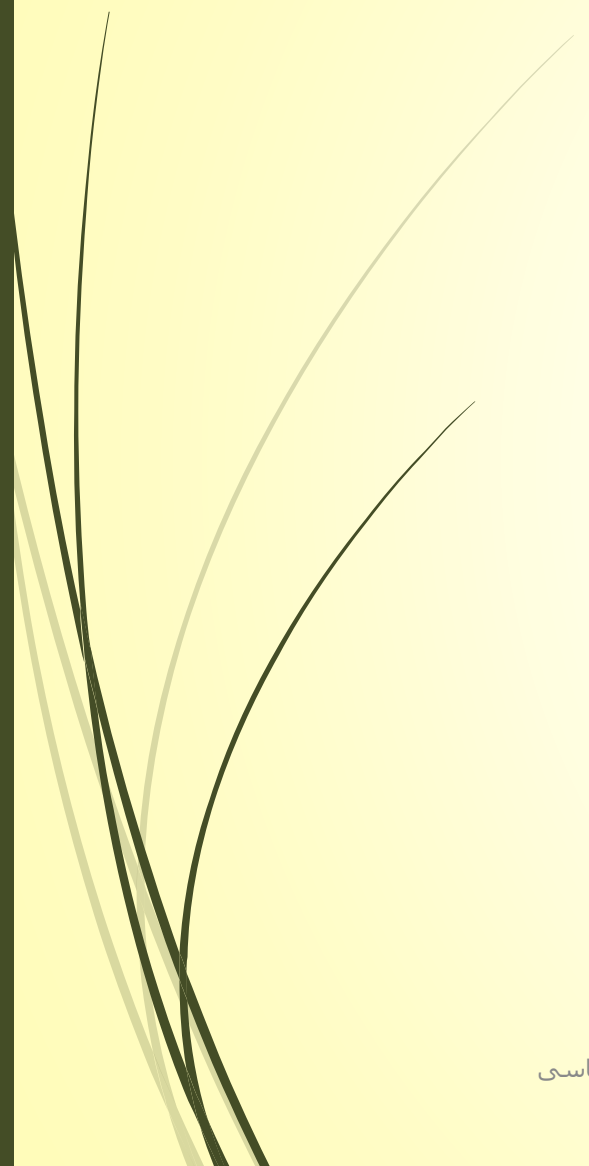




تهیه کننده : سهیلا عباسی

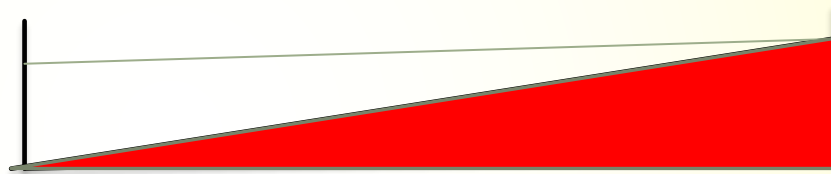


تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

غلظت بالای پنی سیلین

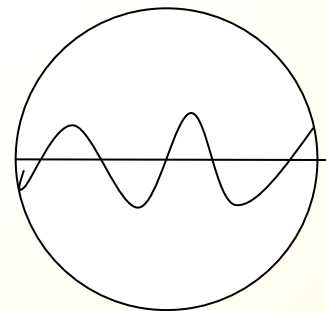


غلظت کم از پنی سیلین

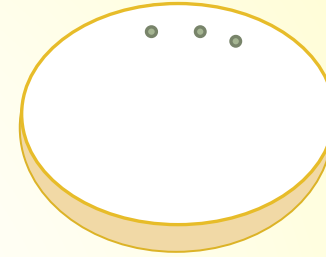
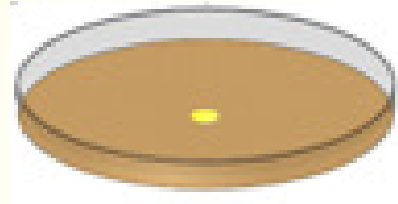
در این حالت پلیت را صاف گذاشته و مواد داخل لوله را به آن اضافه می کنیم و میگذاریم تا سفت شود سپس وسط پلیت را از آنجا که بیشترین غلظت پنی سیلین است تا آنجا که کمترین غلظت پنی سیلین است توسط لوپ استریل یک خط میکشیم و باکتری را به صورت زیگزاگی روی خط کشت می دهیم.

مشخصات نمونه و اعضای گروه را پشت پلیت یادداشت کرده و داخل انکوباتور و دمای ۳۷ درجه برای مدت ۲۴ ساعت می گذاریم

غلظت بالای پنی سیلین



غلظت کم از پنی سیلین



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

## خصوصیات باکتری های موتان یافته

➤ خصوصیات باکتری های موتان یافته در یک محیط با غلظت زیاد تغییر می کند.

➤ همچنین تست های بیوشیمیایی نیز ممکن است تغییر کند مثلاً اگر MR آن مثبت بود الان ممکن است منفی باشد.





از حسن توجه شما سپاسگزارم